

CUARTA EDICIÓN  
ACTUALIZADA

# FISIOLOGIA VEGETAL

J. Barceló Coll  
G. Nicolás Rodrigo  
B. Sabater García  
R. Sánchez Tamés

PIRAMIDE

JUAN BARCELÓ COLL  
GREGORIO NICOLÁS RODRIGO  
BARTOLOMÉ SABATER GARCÍA  
RICARDO SÁNCHEZ TAMÉS

## FISIOLOGÍA VEGETAL

Esta obra está dirigida a los estudiantes de Fisiología Vegetal de nuestra Universidad, tanto de Ciencias Biológicas como de Farmacia e Ingenieros Agrónomos. Desde hace tiempo se venía sintiendo la necesidad de un texto original que se adaptase a los programas oficiales de la asignatura.

La Fisiología Vegetal ha tenido una rápida expansión en los últimos años. El aumento de la demanda de alimentos, y en general de la biomasa, así como la preocupación por el deterioro ambiental, son un estímulo para el estudio de las funciones de las plantas. Por otra parte, la Bioquímica, la Biofísica y la Biología Celular han aportado nuevas técnicas y conceptos sobre los que asentar un conocimiento del funcionamiento de las plantas.

Ante tal complejidad de enfoques se ha pretendido dar al texto una orientación pedagógica. De este modo, cada capítulo no pretende ser un estudio exhaustivo del tema, sino que más bien se trata de dar en ellos una visión actual del problema, de forma que pretende ser asequible para todos aquellos que tengan que cursar esta disciplina. Así pues, el libro trata de dar una visión de conjunto de la Fisiología Vegetal.

Sus autores poseen una vasta experiencia en el campo de la enseñanza y de la investigación en Fisiología Vegetal, son miembros de diversas Sociedades Científicas nacionales y extranjeras y han publicado trabajos y monografías científicas en revistas de la especialidad que cubren diversas áreas de la Fisiología Vegetal.

Juan Barceló Coll es doctor en Farmacia por la Universidad de Barcelona. Ha sido catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y catedrático y decano de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Palma de Mallorca. Actualmente es catedrático en la Universidad Autónoma de Barcelona.

Gregorio Nicolás Rodrigo es doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Madrid, catedrático de Fisiología Vegetal y decano de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca.

Bartolomé Sabater García es doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Madrid. En la actualidad ocupa la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alcalá de Henares.

Ricardo Sánchez Tamés es doctor en Farmacia por la Universidad de Santiago y catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Oviedo.



# **FISIOLOGIA VEGETAL**



**JUAN BARCELÓ COLL**

Catedrático de Fisiología Vegetal en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona

**GREGORIO NICOLÁS RODRIGO**

Catedrático de Fisiología Vegetal en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Salamanca

**BARTOLOMÉ SABATER GARCÍA**

Catedrático de Fisiología Vegetal en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alcalá de Henares

**RICARDO SÁNCHEZ TAMÉS**

Catedrático de Fisiología Vegetal en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Oviedo

# **FISIOLOGIA VEGETAL**



Ediciones Pirámide, S. A. - Madrid

Primera edición, 1980  
Segunda edición corregida y aumentada, 1983  
Tercera edición, 1984  
Cuarta edición actualizada, 1987

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad, ni parte de este libro, puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética, o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito de Ediciones Pirámide, S. A.

© Juan Barceló Coll; Gregorio Nicolás Rodrigo;  
Bartolomé Sabater García; Ricardo Sánchez Tamés.  
EDICIONES PIRÁMIDE, S. A., 1987  
Don Ramón de la Cruz, 67. 28001 Madrid  
Depósito legal: M. 32.574-1986  
ISBN: 84-368-0339-6  
Printed in Spain  
Imprime: Lavel  
Los Llanos, nave 6. Humanes (Madrid)

# Índice

Prólogo a la cuarta edición .....	21
Prólogo a la primera edición .....	23

## I. INTRODUCCIÓN

<b>1. Concepto de Fisiología Vegetal .....</b>	<b>27</b>
1.1. Ámbito de estudio de la Fisiología Vegetal .....	28
1.2. Relación de la Fisiología Vegetal con la Física y la Química .....	29
1.3. Relación de la Fisiología Vegetal con la Agricultura .....	30
1.4. Definición de Fisiología Vegetal .....	30
Bibliografía recomendada .....	32

## II. LA PARED CELULAR

<b>2. La pared celular vegetal .....</b>	<b>35</b>
2.1. Composición química .....	35
2.1.1. Celulosa .....	35
2.1.2. Hemicelulosas .....	37
2.1.3. Pectinas .....	38
2.1.4. Proteínas .....	39
2.1.5. Lignina .....	41
2.1.6. Otros compuestos de la pared celular .....	42
2.2. Origen de la pared celular .....	43
2.3. Estructura de la pared celular primaria .....	44
2.4. Extensión de la pared celular primaria .....	46
2.4.1. Propiedades mecánicas de la pared celular .....	46
2.4.2. Bioquímica de la pérdida de rigidez de la pared celular .....	48
2.4.3. Potencial de presión (presión de turgencia) .....	56
2.5. Biosíntesis de los componentes de la pared celular .....	58
2.5.1. Síntesis de los precursores .....	58
2.5.2. Lípidos intermediarios .....	60
2.5.3. Sistemas enzimáticos que catalizan la síntesis de polisacáridos de la pared ..	61
2.5.4. Biosíntesis de celulosa .....	61
2.5.5. Biosíntesis de hemicelulosas .....	62
2.5.6. Biosíntesis de pectinas .....	62
2.5.7. Biosíntesis de la proteína estructural .....	63
2.5.8. Biosíntesis de lignina .....	63
2.5.9. Localización de los lugares de síntesis y control de la misma .....	65
2.5.10. Engrosamiento de la pared celular primaria .....	67

2.6. Pared celular secundaria .....	69
2.6.1. Orientación de las microfibrillas .....	69
2.6.2. Comunicaciones intercelulares en la pared secundaria .....	70
2.6.3. Modificaciones de la pared secundaria .....	72
Bibliografía recomendada .....	73

### III. RELACIONES HÍDRICAS Y NUTRICIÓN

<b>3. Relaciones hídricas en la célula</b> .....	77
3.1. Evolución de la terminología del agua en las plantas .....	78
3.2. Potencial hídrico .....	78
3.3. Componentes del potencial hídrico .....	81
3.4. Características osmóticas de la célula vegetal .....	82
3.5. Flujo del agua en las plantas .....	85
3.6. Medida de los parámetros del potencial hídrico .....	87
3.7. Resumen comparativo de las unidades y expresiones de los distintos parámetros del estado hídrico de las células vegetales .....	89
Bibliografía recomendada .....	90
<b>4. Absorción y transporte del agua</b> .....	91
4.1. El agua del suelo y su disponibilidad para la planta .....	93
4.2. Absorción y transporte del agua por las raíces .....	95
4.3. La raíz como sistema osmométrico .....	95
4.4. Vía del xilema .....	98
4.5. Mecanismo de transporte por el xilema .....	101
4.5.1. Presión radicular .....	101
4.5.2. Teoría de la tensión-cohesión .....	102
4.6. Visión de conjunto .....	104
Bibliografía recomendada .....	105
<b>5. Pérdida de agua por la planta. Transpiración</b> .....	106
5.1. Concepto y magnitud de la transpiración .....	106
5.2. Necesidad física de la transpiración .....	107
5.3. Lugar de la transpiración .....	109
5.4. Características distintivas de las células oclusivas .....	112
5.5. Métodos de medida de la transpiración. Expresión de los resultados .....	114
5.6. Eficacia de los estomas en el intercambio gaseoso. Medida de la abertura estomática .....	117
5.7. Factores externos que afectan a la velocidad de transpiración .....	120
5.7.1. Humedad atmosférica .....	120
5.7.2. Humedad del suelo .....	121
5.7.3. Concentración de CO <sub>2</sub> atmosférico .....	121
5.7.4. Iluminación .....	122
5.7.5. Concentración de oxígeno .....	123

5.7.6. Temperatura .....	124
5.7.7. Velocidad del viento .....	124
5.8. Mecanismos de control de la apertura estomática .....	126
5.9. Oscilaciones periódicas de la apertura estomática y de la transpiración .....	130
5.10. Caracteres xeromorfos que afectan a la velocidad de transpiración .....	131
5.11. Estudio cuantitativo de la transpiración .....	132
5.11.1. Resistencia de los estomas $R_g$ .....	134
5.11.2. Resistencia de la atmósfera externa inmóvil $R_{AE}$ .....	136
5.12. Funciones de la transpiración .....	136
5.13. Control artificial de la transpiración .....	137
5.14. Pérdida de agua en estado líquido por las plantas .....	138
Bibliografía recomendada .....	139
<b>6. Absorción de nutrientes por las raíces .....</b>	<b>140</b>
6.1. Relaciones suelo-planta en la nutrición .....	140
6.2. Análisis cinético de la nutrición y compartimentación .....	141
6.3. Absorción de iones por transporte pasivo .....	145
6.3.1. Difusión .....	146
6.3.2. Ecuación de Nernst .....	147
6.3.3. Potencial de membrana o transmembrana .....	148
6.3.4. Sistema de Donnan .....	148
6.3.5. Ecuación de Ussing-Teorell .....	150
6.3.6. Intercambio iónico .....	150
6.3.7. Flujo en masa .....	151
6.4. Absorción por transporte activo .....	151
6.4.1. Transporte activo por ATPasas y bombas iónicas .....	152
6.4.2. Modelo de transporte activo asociado a cinéticas multifásicas .....	156
6.5. Visión general de la absorción y de la vida de transporte de los nutrientes en la planta .....	156
Bibliografía recomendada .....	159
<b>7. Transporte por el floema .....</b>	<b>161</b>
7.1. El floema como sistema conductor de los solutos .....	161
7.2. Estructura del floema .....	162
7.2.1. Elementos del floema .....	162
7.2.2. Citología de los elementos cribosos .....	164
7.2.2.1. Elementos cribosos de las angiospermas .....	164
7.2.2.2. Formación de la placa cribosa .....	167
7.2.2.3. Secuencia de cambios estructurales durante la maduración de un elemento criboso .....	169
7.2.2.4. Elementos parenquimáticos asociados con los elementos de los tubos cribosos .....	170
7.2.3. Elementos cribosos de las gimnospermas .....	170
7.2.3.1. Área cribosa .....	171
7.2.3.2. Elementos parenquimáticos asociados con las células cribosas .....	171

7.3. Naturaleza de las sustancias transportadas por el floema .....	171
7.3.1. Carbohidratos .....	172
7.3.2. Sustancias nitrogenadas .....	172
7.3.3. Ácidos orgánicos y sustancias inorgánicas .....	174
7.3.4. Sustancias de crecimiento .....	174
7.3.5. Otras sustancias .....	175
7.4. Intensidad y velocidad del transporte .....	176
7.5. Dirección del transporte .....	177
7.5.1. Significado de órganos productores y órganos consumidores .....	177
7.5.2. Entrada de los solutos en el floema .....	178
7.5.3. Distribución de solutos por la planta .....	180
7.6. Efecto de los factores ambientales sobre el transporte .....	183
7.6.1. Luz .....	183
7.6.2. Potencial hídrico .....	183
7.6.3. Temperatura .....	184
7.7. Mecanismos de transporte por el floema .....	185
7.7.1. Mecanismos pasivos .....	185
7.7.1.1. Difusión .....	185
7.7.1.2. Flujo interfacial .....	185
7.7.1.3. Flujo de presión .....	186
7.7.2. Mecanismos activos .....	188
7.7.2.1. Electro-ósmosis .....	188
7.7.2.2. Corrientes protoplasmáticas .....	190
7.7.2.3. Otras hipótesis .....	191
Bibliografía recomendada .....	192
<b>8. Nutrición mineral</b> .....	<b>193</b>
8.1. Composición inorgánica de las plantas .....	194
8.2. Soluciones nutritivas .....	196
8.3. Relaciones cuantitativas entre el suministro de sales minerales y el crecimiento de la planta .....	199
8.4. Deficiencias minerales .....	202
8.5. Metabolismo mineral .....	205
8.6. Aspectos ecológicos de la nutrición mineral .....	209
8.6.1. Salinidad .....	209
8.6.2. Calcio y pH .....	211
8.6.3. Metales pesados .....	213
Bibliografía recomendada .....	214
<b>IV. FOTOSÍNTESIS Y PROCESOS RELACIONADOS</b>	
<b>9. Fotosíntesis. Generalidades</b> .....	<b>217</b>
9.1. Breve desarrollo histórico .....	217
9.2. Medida de la fotosíntesis .....	219
9.3. Valores de la fotosíntesis .....	222

9.4. Vías de difusión del anhídrido carbónico .....	223
9.5. Flujo del CO <sub>2</sub> durante la fotosíntesis .....	225
9.5.1. Resistencia de la hoja .....	226
9.5.2. Resistencia del mesófilo .....	227
9.5.3. Resistencia del cloroplasto .....	228
9.6. Flujo total del CO <sub>2</sub> en el cloroplasto .....	230
9.7. Relación entre transpiración y fotosíntesis .....	230
9.8. Existencia de dos reacciones fotosintéticas .....	232
9.9. Punto de compensación .....	233
Bibliografía recomendada .....	233
<b>10. Cloroplastos .....</b>	<b>234</b>
10.1. Estructura microscópica de los cloroplastos .....	235
10.2. Aislamiento y composición química de los cloroplastos .....	238
10.3. La envoltura de los cloroplastos .....	240
10.4. Organización estructural de los tilacoides .....	241
10.5. Autonomía genética parcial de los cloroplastos .....	243
10.6. Formación de los cloroplastos. Otros plastos .....	246
Bibliografía recomendada .....	249
<b>11. Pigmentos fotosintéticos .....</b>	<b>251</b>
11.1. Espectro de absorción de estructuras fotosintéticas y espectro de acción de la fotosíntesis .....	251
11.2. Estructura y distribución de los pigmentos fotosintéticos .....	253
11.2.1. Clorofilas .....	254
11.2.2. Carotenoides .....	257
11.2.3. Ficobilinas .....	258
11.3. Biosíntesis de clorofilas .....	259
11.4. Biosíntesis de carotenoides .....	262
11.5. Organización de los pigmentos fotosintéticos en los tilacoides .....	265
Bibliografía recomendada .....	266
<b>12. Absorción de la luz y transporte electrónico fotosintético .....</b>	<b>267</b>
12.1. La fase luminosa de la fotosíntesis. Generalidades .....	268
12.2. Fotoexcitación de los pigmentos fotosintéticos .....	269
12.3. Fotoquímica de los pigmentos <i>in vivo</i> .....	272
12.4. Evidencia de la existencia de dos fotoprocursos fotosintéticos. Efecto Emerson .....	273
12.5. Sistema fotosintético de transporte de electrones .....	274
12.6. Propiedades de los dos fotosistemas. Transferencia de excitación entre ellos .....	281
12.7. Metabolismo fotosintético del oxígeno .....	283
12.8. Algunos aspectos del transporte electrónico en bacterias fotosintéticas .....	284
Bibliografía recomendada .....	286
<b>13. Fotofosforilación .....</b>	<b>287</b>
13.1. Fotofosforilación cíclica y no cíclica .....	288
13.2. Funcionamiento conjunto de las dos fotofosforilaciones .....	289

13.3. Acoplamiento entre transporte de electrones y fotofosforilación .....	290
13.4. Lugares de conservación de la energía .....	291
13.5. Mecanismo de la fotofosforilación .....	293
13.6. Evidencia experimental en favor del funcionamiento de la hipótesis quimiosmótica en cloroplastos .....	299
13.7. Fotofosforilación pseudocíclica.....	301
Bibliografía recomendada .....	302
<b>14. Asimilación del CO<sub>2</sub>. Ciclo de Calvin .....</b>	<b>303</b>
14.1. Metodología del descubrimiento del ciclo de Calvin .....	304
14.2. Formulación y funcionamiento del ciclo de Calvin .....	305
14.3. Regulación del ciclo de Calvin .....	308
14.4. Rutas metabólicas a partir del ciclo de Calvin. Síntesis de sacarosa y almidón y su regulación .....	309
14.4.1. Síntesis de la sacarosa .....	311
14.4.2. Síntesis del almidón .....	313
Bibliografía recomendada .....	316
<b>15. Otras vías de fijación y asimilación fotosintética del CO<sub>2</sub> .....</b>	<b>317</b>
15.1. Plantas con ciclo dicarboxílico C-4 .....	317
15.1.1. Anatomía foliar comparada de plantas C-3 y C-4 .....	318
15.1.2. Mecanismo de fijación y asimilación del CO <sub>2</sub> en plantas C-4.....	321
15.1.3. Tipos de plantas C-4 .....	328
15.1.4. Discriminación isotópica en plantas C-3 y C-4 .....	329
15.2. Fotosíntesis en plantas con metabolismo ácido de Crasuláceas .....	329
15.3. Ciclo tricarboxílico reductivo de Arnon. Otras vías de fijación de CO <sub>2</sub> .....	332
Bibliografía recomendada .....	333
<b>16. Fotorrespiración .....</b>	<b>334</b>
16.1. El problema de la medida de la fotorrespiración .....	334
16.2. Mecanismos de la fotorrespiración .....	335
16.3. Fotorrespiración en distintos tipos de plantas .....	339
16.4. Fotorrespiración y evolución de los distintos tipos de fotosíntesis .....	342
Bibliografía recomendada .....	343
<b>17. Factores que regulan la fotosíntesis y rendimiento fotosintético .....</b>	<b>344</b>
17.1. Concepto de factor limitante .....	345
17.2. Factores que influyen sobre la fotosíntesis .....	346
17.2.1. Influencia de la luz .....	347
17.2.1.1. Plantas de sol y plantas de sombra .....	348
17.2.1.2. Intensidad luminosa .....	350
17.2.1.3. Duración de la iluminación .....	353
17.2.2. Influencia del anhídrido carbónico .....	353
17.2.3. Influencia de la temperatura .....	354
17.2.4. Influencia del oxígeno .....	355

17.2.5. Influencia del agua .....	355
17.2.6. Control metabólico de la fotosíntesis .....	356
17.2.7. Transporte de hidratos de carbono .....	356
17.2.8. Influencia de los nutrientes .....	357
17.2.9. Edad de la hoja .....	357
17.2.10. Regulación genética .....	357
17.3. Tasa de fotosíntesis y producción de una cosecha .....	358
Bibliografía recomendada .....	361
<b>18. Reducción del nitrógeno .....</b>	<b>362</b>
18.1. El ciclo del nitrógeno y las plantas .....	362
18.2. Fijación biológica del nitrógeno .....	363
18.2.1. Proceso fisiológico de la infección/simbiosis y nodulación en las leguminosas .....	364
18.2.2. Proceso biológico de la reducción del nitrógeno atmosférico .....	365
18.2.3. Alcance fisiológico de algunos conocimientos genéticos .....	369
18.3. Reducción asimiladora de los nitratos .....	370
18.3.1. Reducción del nitrato a nitrito .....	373
18.3.2. Reducción del nitrito a amoníaco .....	373
18.3.3. Localización celular y subcelular del sistema reductor de los nitratos .....	374
18.3.4. Reducción fotosintética del nitrato .....	375
18.4. Asimilación del amonio en las plantas .....	376
18.4.1. Localización de la asimilación del amonio en la planta .....	379
18.5. Control de la asimilación del N por la planta .....	380
Bibliografía recomendada .....	381
<b>19. Reducción asimiladora del sulfato .....</b>	<b>383</b>
19.1. El ciclo del azufre y las plantas .....	383
19.2. Absorción y transporte del sulfato por las plantas .....	385
19.3. Activación del sulfato .....	385
19.4. Reducción asimiladora del sulfato .....	386
19.4.1. Reducción del «sulfato activo» .....	387
19.4.2. Reducción del sulfito .....	388
19.4.3. Incorporación del azufre reducido a compuestos orgánicos .....	388
19.4.4. Localización celular y subcelular de la reducción del sulfato .....	390
19.4.5. Reducción fotosintética del sulfato .....	391
19.5. Mecanismo de la regulación de la reducción asimiladora del sulfato .....	391
Bibliografía recomendada .....	392
<b>V. RESPIRACIÓN</b>	
<b>20. Respiración y mitocondrias vegetales .....</b>	<b>395</b>
20.1. Cociente respiratorio .....	396
20.2. Determinación de la respiración .....	397
20.3. Glucólisis y fermentación .....	399

20.4. Mitochondrias vegetales .....	402
20.4.1. Estructura .....	402
20.4.2. Propiedades y composición de las membranas .....	403
20.4.3. Aislamiento y purificación .....	404
20.4.4. Determinación de la actividad respiratoria en mitocondrias aisladas .....	405
20.5. Ciclo de Krebs .....	408
20.6. Organización y operación de la cadena de transporte de electrones .....	410
20.7. Organización de los sistemas de NADH-deshidrogenasa .....	413
20.8. Fosforilación oxidativa .....	414
20.8.1. Lugares de formación de ATP .....	415
20.8.2. Mecanismo de la fosforilación oxidativa .....	416
20.9. Rendimiento energético del proceso respiratorio .....	419
20.10. Respiración resistente al cianuro .....	419
20.11. Ciclo de las pentosas fosfato .....	421
20.12. Factores que afectan a la respiración .....	422
20.12.1. Disponibilidad de sustrato .....	423
20.12.2. Disponibilidad de oxígeno .....	424
20.12.3. Temperatura .....	425
Bibliografía recomendada .....	425

## VI. CRECIMIENTO Y DESARROLLO

21. Características generales del crecimiento .....	429
21.1. Concepto de crecimiento .....	429
21.2. Crecimiento de la célula vegetal .....	430
21.3. Cuantificación del crecimiento .....	431
21.4. Expresión matemática del crecimiento .....	433
21.5. Regulación del crecimiento .....	439
21.6. Ritmos de crecimiento .....	440
Bibliografía recomendada .....	441
22. Auxinas .....	442
22.1. Extracción y valoración de auxinas .....	443
22.2. Curva óptima de crecimiento .....	446
22.3. Localización de la auxina .....	447
22.4. Biosíntesis de la auxina .....	449
22.5. Transporte del AIA y auxinas sintéticas .....	453
22.6. Degradación del AIA .....	456
22.7. Auxinas sintéticas .....	458
22.8. Receptores de las auxinas .....	461
22.9. Mecanismo de acción .....	463
22.9.1. Efecto sobre los ácidos nucleicos y proteínas .....	463
22.9.2. El efecto ácido de crecimiento .....	465
22.10. Funciones de la auxina .....	466
22.11. Efecto de estímulos ambientales y hormonales sobre el nivel de auxinas .....	467
Bibliografía recomendada .....	468

<b>23. Giberelinas</b> .....	469
23.1. Localización y extracción .....	472
23.2. Valoraciones biológicas .....	472
23.3. Relación estructura-actividad .....	475
23.4. Biosíntesis de las giberelinas .....	475
23.4.1. Regulación de la biosíntesis de giberelinas .....	479
23.4.2. Lugares de síntesis de giberelinas .....	480
23.5. Transporte de las giberelinas .....	480
23.6. Papel fisiológico de las giberelinas .....	480
23.7. Mecanismo de acción de las giberelinas .....	483
23.8. Influencia de los factores ambientales y otras hormonas sobre las giberelinas ...	485
Bibliografía recomendada .....	486
<b>24. Citoquininas</b> .....	487
24.1. Citoquininas naturales .....	488
24.2. Acción fisiológica de las citoquininas .....	489
24.3. Transporte de las citoquininas en la planta .....	493
24.4. Valoración biológica de las citoquininas .....	494
24.5. Relación entre estructura y actividad .....	496
24.6. Biosíntesis de las citoquininas .....	496
24.6.1. Rutas biosintéticas .....	498
24.6.2. Inactivación de las citoquininas .....	499
24.7. Mecanismo de acción de las citoquininas .....	499
24.8. Papel de los derivados glucosídicos de las citoquininas .....	500
24.9. Factores que influyen sobre la actividad citoquinina .....	501
Bibliografía recomendada .....	501
<b>25. Etileno</b> .....	503
25.1. Valoración del etileno .....	503
25.2. Biosíntesis .....	504
25.3. Mecanismo de acción del etileno .....	507
25.4. Acción fisiológica del etileno .....	508
25.5. Efecto de estímulos hormonales y ambientales sobre la producción de etileno ...	509
25.6. El etileno como hormona .....	511
Bibliografía recomendada .....	512
<b>26. Ácido abscísico y otros inhibidores</b> .....	513
26.1. Valoración del ABA .....	514
26.2. Localización .....	514
26.3. Acción fisiológica .....	514
26.4. Mecanismo de acción del ácido abscísico .....	516
26.5. Biosíntesis del ABA .....	516
26.6. Transporte del ABA .....	518
26.7. Influencia de factores ambientales sobre el contenido en ABA .....	518
26.8. Otras hormonas vegetales .....	519

26.9. Otros reguladores del crecimiento .....	520
Bibliografía recomendada .....	528
<b>27. Diferenciación .....</b>	<b>529</b>
27.1. Bases experimentales de la diferenciación .....	529
27.1.1. Regeneración y diferenciación en cultivo de tejidos .....	529
27.1.2. Formación de embrioides haploides a partir de microsporas .....	530
27.1.3. Protoplastos y diferenciación celular .....	531
27.2. Mecanismo de la diferenciación .....	532
27.3. Transformaciones tumorales .....	538
27.3.1. Agallas .....	538
27.3.2. Agallas de corona .....	539
27.3.3. Virus del tumor de las heridas .....	540
27.3.4. Tumores genéticos .....	541
27.4. Perspectivas y aplicaciones a la biotecnología vegetal .....	542
Bibliografía recomendada .....	544
<b>28. Morfogénesis .....</b>	<b>546</b>
28.1. Polaridad .....	546
28.1.1. Determinación de la polaridad .....	547
28.1.2. Persistencia de la polaridad .....	547
28.1.3. Polaridad celular .....	548
28.1.4. Bases estructurales y moleculares de la polaridad .....	549
28.1.5. División celular polarizada .....	550
28.1.6. División celular asimétrica .....	550
28.2. Formación de la raíz .....	553
28.3. Estructura del ápice vegetativo del brote .....	556
28.4. Desarrollo del tallo .....	557
28.5. Desarrollo de la hoja .....	560
28.6. Desarrollo de la flor .....	562
28.7. Regulación hormonal de la morfogénesis .....	564
28.8. Correlaciones de crecimiento .....	569
Bibliografía recomendada .....	575
<b>29. Movimientos de las plantas .....</b>	<b>576</b>
29.1. Tropismos .....	577
29.1.1. Fototropismo .....	578
29.1.1.1. Fototropismo del coleóptilo de gramíneas .....	579
29.1.1.2. Fototropismo en plántulas de dicotiledóneas .....	583
29.1.1.3. Fototropismo y polarotropismo de protonemas de helechos ..	583
29.1.1.4. Fototropismo de <i>Phycomyces</i> .....	585
29.1.2. Gravitropismo (geotropismo) .....	586
29.1.2.1. Respuestas gravitropicas .....	587
29.1.2.2. Percepción de la gravedad por las plantas .....	588
29.1.2.3. Procesos gravitropicos en el alga <i>Chara</i> .....	588
29.1.2.4. Procesos gravitropicos en plantas superiores .....	590

29.1.2.5. Mecanismo de la respuesta gravitrópica .....	593
29.1.2.6. Clinostatos .....	595
29.2. Nastias .....	596
29.2.1. Movimientos de crecimiento .....	596
29.2.2. Movimientos de variación .....	596
29.2.2.1. Bases biofísicas de la reacción seismonástica .....	598
29.3. Circumnutación .....	599
29.4. Movimientos intracelulares .....	601
29.4.1. Corrientes citoplasmáticas .....	601
29.4.2. Movimientos de desplazamiento de los cloroplastos .....	602
29.5. Tactismos .....	604
Bibliografía recomendada .....	604
<b>30. Fitocromo .....</b>	<b>606</b>
30.1. Fotomorfogénesis .....	606
30.2. Fitocromo .....	607
30.2.1. Antecedentes históricos .....	607
30.2.2. Propiedades del fitocromo .....	608
30.2.2.1. Técnicas de estudio del fitocromo .....	608
30.2.2.2. Aislamiento, purificación y estructura del fitocromo .....	610
30.2.2.3. Fotoconversión, formas intermedias y estado fotoestacionario del fitocromo .....	614
30.2.2.4. Metabolismo del fitocromo .....	614
30.2.3. Localización intracelular del fitocromo .....	615
30.2.4. Reacciones de alta energía .....	617
30.2.4.1. Respuestas a la luz roja .....	617
30.2.4.2. Respuestas a la luz azul .....	620
30.2.5. Fotorrespuestas reguladas por el fitocromo .....	620
30.2.6. Mecanismo de acción del fitocromo .....	622
30.2.6.1. Regulación diferencial de la expresión génica .....	622
30.2.6.2. Regulación de la permeabilidad de las membranas .....	628
30.2.6.3. Reacción primaria del fitocromo .....	629
30.2.7. Significación ecológica del fitocromo y criptocromo .....	632
Bibliografía recomendada .....	633
<b>31. Fotoperiodismo y vernalización .....</b>	<b>634</b>
31.1. Fisiología de la floración .....	634
31.2. Fotoperiodismo: descubrimiento y concepto .....	634
31.2.1. Tipos de respuestas fotoperiódicas en la inducción floral .....	636
31.2.2. Percepción e inducción fotoperiódica de la floración .....	639
31.2.3. Naturaleza hormonal de la floración .....	640
31.2.4. Interacciones luz-oscuridad en el fotoperiodismo .....	642
31.2.5. Participación del sistema fitocromo en la floración .....	644
31.2.6. Ritmos endógenos y fotoperiodismo .....	645
31.3. Vernalización: descubrimiento y concepto .....	646
31.3.1. Tipos de plantas que requieren vernalización .....	647
31.3.2. Localización de la percepción del estímulo vernalizador .....	649

31.3.3. Aspectos fisiológicos de la vernalización .....	650
Bibliografía recomendada .....	653
<b>32. Dormición de yemas y semillas .....</b>	<b>655</b>
32.1. Dormición de yemas .....	656
32.1.1. Inducción de la dormición .....	657
32.1.2. Cese de la dormición .....	658
32.1.3. Regulación hormonal .....	659
32.2. Dormición de semillas .....	662
32.2.1. Tipos de dormición .....	662
32.3. Papel de las cubiertas seminales en la dormición de las semillas .....	667
32.4. Regulación metabólica de la dormición .....	668
32.5. Regulación hormonal de la dormición .....	669
Bibliografía recomendada .....	673
<b>33. Maduración y germinación de las semillas .....</b>	<b>674</b>
33.1. Desarrollo de las semillas .....	674
33.2. Producción y almacenamiento de sustancias de reserva .....	676
33.2.1. Monocotiledóneas .....	676
33.2.2. Dicotiledóneas .....	679
33.3. Papel de las hormonas vegetales en la maduración de las semillas .....	681
33.4. Estructura y composición química de la semilla madura .....	682
33.4.1. Carbohidratos .....	684
33.4.2. Proteínas .....	685
33.4.3. Lípidos .....	686
33.4.4. Otros compuestos .....	687
33.5. Germinación .....	687
33.6. Factores que afectan la germinación .....	689
33.6.1. Agua .....	689
33.6.2. Gases .....	691
33.6.3. Temperatura .....	691
33.6.4. Luz .....	691
33.7. Aspectos metabólicos de la germinación .....	692
33.7.1. Respiración .....	692
33.7.2. Movilización de las reservas .....	693
33.8. Regulación de la germinación .....	706
33.8.1. Regulación ejercida por las cubiertas seminales y otras barreras de permeabilidad .....	706
33.8.2. Regulación ejercida por los requerimientos energéticos .....	707
33.8.3. Regulación ejercida por los acontecimientos metabólicos durante las primeras fases de la germinación .....	711
33.8.4. Regulación ejercida por la síntesis y activación de enzimas .....	717
33.8.5. Regulación ejercida por las hormonas y sustancias de crecimiento .....	719
Bibliografía recomendada .....	721

<b>34. Formación y maduración de frutos</b> .....	722
34.1. Formación del fruto .....	723
34.2. Crecimiento del fruto .....	724
34.2.1. Medida del crecimiento .....	726
34.3. Nutrición del fruto en desarrollo .....	727
34.4. Contenido endógeno de hormonas durante el desarrollo del fruto .....	730
34.5. Frutos partenocárpicos .....	732
34.6. Composición química del fruto .....	734
34.6.1. Carbohidratos .....	734
34.6.2. Ácidos orgánicos .....	735
34.6.3. Proteínas .....	737
34.6.4. Lípidos .....	738
34.6.5. Compuestos volátiles .....	738
34.6.6. Fenoles .....	740
34.6.7. Carotenoides y triterpenoides .....	740
34.6.8. Vitaminas .....	741
34.7. Maduración de frutos .....	742
34.8. Regulación hormonal de la maduración .....	744
34.9. Regulación de la maduración por factores externos .....	749
34.9.1. Efecto de la temperatura .....	749
34.9.2. Composición gaseosa de la atmósfera .....	749
34.9.2.1. Efecto de la tensión de oxígeno .....	750
34.9.2.2. Efecto de la tensión de anhídrido carbónico .....	750
Bibliografía recomendada .....	750
<b>VII. LAS PLANTAS EN CONDICIONES ADVERSAS</b>	
<b>35. Envejecimiento, abscisión y muerte de las plantas</b> .....	755
35.1. Fases de la vida de las plantas .....	756
35.1.1. Juventud .....	756
35.1.2. Madurez .....	757
35.1.3. Vejez .....	757
35.2. Tipos de envejecimiento y procesos metabólicos asociados .....	758
35.3. Ideas acerca de las causas del envejecimiento .....	760
35.4. Estudio experimental de los mecanismos que operan en el envejecimiento .....	761
35.5. Abscisión .....	766
Bibliografía recomendada .....	768
<b>36. Fisiología de las plantas en condiciones desfavorables</b> .....	770
36.1. Sequedad .....	771
36.2. Altas temperaturas .....	773
36.3. Bajas temperaturas .....	775
36.4. Salinidad y otras condiciones extremas del suelo .....	777
36.5. Altitud .....	779

36.6. Agentes químicos contaminantes .....	779
36.7. Otras situaciones desfavorables: agentes infecciosos, consumidores vegetales, alelopatía .....	783
Bibliografía recomendada .....	787
<b>Índice de organismos</b> .....	<b>788</b>
<b>Índice de materias</b> .....	<b>794</b>
<b>Índice de autores</b> .....	<b>819</b>

## Prólogo a la cuarta edición

La rapidez con que se han agotado las ediciones anteriores ha estado acompañada de avances importantes en muchos campos de la Fisiología Vegetal que nos han aconsejado una actualización profunda del texto para esta cuarta edición. Es difícil encontrar un aspecto de la Fisiología de las plantas cuya comprensión no se haya visto afectada fuertemente, en los últimos seis años, por los progresos de la Biología Molecular Vegetal y por la aplicación de nuevas técnicas físicas y químicas.

Probablemente, estamos ahora a las puertas de importantes avances, por ejemplo: en la Biología Molecular de la acción hormonal o de la diferenciación y control de la expresión genética, pero el futuro siempre tiene alguna incertidumbre y en la etapa actual están ya consolidados importantes progresos de los últimos años. La Biología Molecular de la pared celular, de la fotosíntesis y su regulación, la asimilación del nitrógeno, la Fisiología de los procesos patológicos y en situaciones extremas y los aspectos fisiológicos de la productividad vegetal, son sólo algunos de los campos cuyos progresos recientes condicionan forzosamente un texto de Fisiología Vegetal. Así, aunque se introdujeron cambios sucesivos en ediciones anteriores, creemos llegado el momento de una actualización del texto profunda en muchos capítulos, aún respetando la organización inicial de los temas.

Junto al progreso científico, la experiencia docente aconsejaba algunas remodelaciones para aproximar más el texto a las posibilidades reales de la enseñanza en la Universidad.

La actualización de la bibliografía (forzosamente muy selectiva) y de los índices de organismos, materias y autores, junto con la revisión de erratas, completan una labor que esperamos aumente significativamente la utilidad del libro y mantenga en esta edición la buena acogida dispensada a las anteriores.

Tanto como en la primera edición, la actualización de ésta ha requerido un intenso trabajo de selección de temas y publicaciones. Pero ahora, más que antes, la labor ha sido facilitada por los ánimos y la crítica valiosa de innumerables colegas. A todos ellos nuestro sincero agradecimiento. Queda para nosotros la responsabilidad final del texto con sus inevitables limitaciones.

Por último, nuestro agradecimiento a Ediciones Pirámide que no ha regateado esfuerzos en la difícil tarea de actualización del texto y que, con la competencia de su personal, está contribuyendo a hacer clásico este libro de Fisiología Vegetal.

Madrid, septiembre de 1986.

LOS AUTORES



## Prólogo a la primera edición

La experiencia docente en la Universidad muestra la gran dificultad que a veces tienen los estudiantes para poder seguir las enseñanzas de una disciplina sólo a base de los apuntes tomados en clase y de una bibliografía en lengua extranjera. Tal es el caso de la materia que nos ocupa en este libro, la Fisiología Vegetal, cuya rápida expansión en los últimos años hace a veces muy difícil, incluso para el profesorado, el poder ofrecer a sus alumnos una visión de la disciplina amplia y actual y al mismo tiempo asequible a sus conocimientos.

Basándose en estos condicionamientos, los autores han tratado de elaborar un texto de Fisiología Vegetal que reúna estas condiciones. En primer lugar, la obra da una visión amplia de lo que hoy es la Fisiología Vegetal; repasando el índice puede apreciarse, cómo éste cubre casi en su totalidad el contenido de los programas que se dan, tanto en las Facultades de Biología y Farmacia como los de las Escuelas Técnicas Superiores de Ingenieros Agrónomos, que es el alumnado a quien fundamentalmente va dirigido este libro. En segundo lugar, los capítulos están tratados con cierta profundidad, pero no con la que sería apropiada dirigirse a los especialistas, por lo que no habrá que buscar en ellos el último dato o resultado aparecido en las revistas especializadas, sino aquellos datos y teorías fuertemente contrastadas y aceptadas por el mundo científico y cuyo conocimiento sea imprescindible para que el alumno conozca la realidad actual de esta disciplina.

En ningún momento, han pretendido los autores que este libro sea un sustituto del profesor, que sigue siendo, por ahora, y esperamos que por siempre, insustituible, ayudando al alumno a sacar el máximo provecho de este libro y a ampliar en seminarios aquellos temas que considere deban ser tratados con una mayor amplitud.

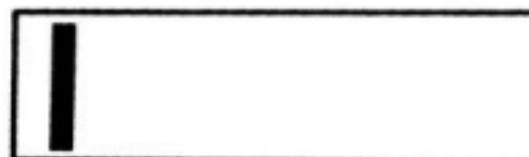
Uno de los problemas que presentan los libros de texto, sobre todo de aquellas materias en rápida y constante evolución y avance, es el poco tiempo que tienen de vida útil, ya que los descubrimientos, nuevas teorías e hipótesis se suceden con una rapidez vertiginosa. Por ello es deseo de los autores revisar periódicamente cada capítulo y realizar una puesta al día para mantener vigente el contenido del libro.

Esperamos que nuestra idea de escribir este libro haya sido acertada y que el mismo contribuya a elevar los conocimientos de esta disciplina y, sobre todo, a despertar nuevas inquietudes y preguntar sobre los muchos aspectos que aún quedan por aclarar en esta materia. No queremos tampoco olvidar al amplio número de estudiantes de Fisiología Vegetal en los países hispanoamericanos para los que también desearíamos que esta obra supusiese una importante ayuda en sus estudios.

Por último, queremos agradecer a todo el personal de nuestros respectivos Departamentos la colaboración y la comprensión que durante la elaboración del manuscrito han tenido para suplir con su entusiasmo y dedicación la menor atención, que forzosamente, y en aras de una mayor rapidez en la terminación de esta obra, hemos dedicado a nuestras tareas habituales.

Madrid, septiembre de 1980.

JUAN BARCELÓ COLL, GREGORIO NICOLÁS RODRIGO,  
BARTOLOMÉ SABATER GARCÍA y RICARDO SÁNCHEZ TAMÉS



## **Introducción**



## CONCEPTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

El conocimiento de las plantas y de su funcionamiento, adquiere cada vez mayor importancia para la humanidad. En último término, la supervivencia del género humano depende, y probablemente dependerá siempre, del crecimiento de los vegetales. En el pasado era suficiente con la vegetación natural y las cosechas crecidas por métodos tradicionales, lentamente desarrollados a través del tiempo siguiendo procedimientos de tanteo, pero debido al rápido aumento de la población en el mundo durante este siglo, el sistema ya no resulta adecuado; y en un próximo futuro, cada rama de las Ciencias Botánicas tendrá que contribuir con sus conocimientos para intentar evitar el desastre.

La importancia de ese fino manto verde que cubre la superficie del globo es consecuencia de su insospechada actividad. Las plantas crecen y se multiplican, pero a diferencia de los animales, hacen esto sin ir a la busca de la comida y sin realizar ningún apareo visible. Aristóteles definió las plantas en esta forma hace 2.000 años y aún sirve como definición aceptable de sus características externas. Las plantas constituyen el único medio de que disponen los organismos vivos para sobrevivir, mediante su capacidad de aprovechar la energía de las radiaciones solares en el proceso de la fotosíntesis. Las plantas extraen grandes cantidades de carbono a partir del anhídrido carbónico del aire y lo incorporan a su organismo. Estos compuestos carbonados que integran el organismo vegetal se transforman en otras formas de materia viva que finalmente volverán de nuevo al aire en forma de anhídrido carbónico, cerrándose así un ciclo dinámico que mantiene vivos a todos los seres sobre la faz de la tierra.

Las plantas pueden encontrarse bajo diferentes climas, desde las selvas tropicales hasta las tundras boreales, las algas de lagos y océanos, bajo gran número de formas y tamaños. Pero a pesar de la aparente desemejanza, fundamentalmente los procesos mediante los cuales los vegetales viven y se desarrollan, son extraordinariamente uniformes y se aplican por igual a toda la extensa gama de las formas vegetales.

Todo el mundo está más o menos familiarizado con ciertos aspectos de la vida de las plantas, pero pocos son los que comprenden las causas que originan numerosos fenómenos de la vida de las mismas. Muchas son las preguntas que podemos hacernos acerca de la naturaleza de estos fenómenos, pero cuantas más respuestas se encuentran, más interrogantes se abren en nuestro camino.

La vida y el crecimiento de los vegetales son la resultante de las interacciones de una multitud de procesos complicados, que el científico ha intentado investigar. Para el

estudio de los detalles de la actividad de las plantas se emplean métodos experimentales tan precisos como los usados en la Física; a fin de comprender las interrelaciones que son la esencia de su vida hay que pensar en un nivel y de una forma que es característica de las Ciencias Biológicas.

Cada día se conoce mejor el mecanismo de una planta en su totalidad. Sin embargo, la inquietud por el conocimiento de todo lo relacionado con las plantas no es privativa del hombre actual, sino que desde siempre, en un proceso tan largo como la historia del hombre, ha ido pareja con la vida del mismo. Baste recordar que el hecho de que el hombre aprendiera a utilizar mejor los vegetales, conociendo la producción y recogida de cosechas, determinó el cambio de un régimen de vida nómada por un sistema de vida sedentario que constituyó la base del desarrollo de las distintas civilizaciones. Hoy ya no nos conformamos con la explotación de las plantas, pues dada su importancia, el conocimiento de las plantas y sus funciones constituyen una de las ramas fundamentales del saber humano.

### 1.1. **Ámbito de estudio de la Fisiología Vegetal**

La parte de la Biología que se dedica al estudio de los vegetales se conoce con el nombre de Botánica. Sin embargo, el estudio de las plantas puede abordarse bajo diferentes puntos de vista y esto ha originado una serie de ramas de la Botánica como son la Anatomía, la Taxonomía, la Morfología, la Genética, la Patología y, naturalmente, la Fisiología.

A todas estas ramas de la Botánica tenemos que ponerles unos límites, con lo que intentaremos determinar su parcela de estudio; sin embargo, esto no es tarea fácil, pues la división de cualquier ciencia en varias partes no deja de ser un artificio introducido por las limitaciones de la mente humana, que hacen que ésta sólo pueda abarcar ciertos aspectos de lo que constituye un todo indivisible, en nuestro caso, la planta.

La Fisiología Vegetal abarca el estudio de algunos procesos que tienen lugar en las plantas, fundamentalmente desde el punto de vista funcional, aunque por las razones expuestas anteriormente no debe desecharse el estudio estructural de los lugares donde se realizan esos procesos. Así, se estudian actividades físicas como la entrada y salida de gases o solutos, se estudian procesos químicos como las reacciones metabólicas o procesos de crecimiento y diferenciación, pero el estudio de todos estos fenómenos bajo un punto de vista funcional no sería suficiente para llegar a un entendimiento de la vida de la planta, y así el conocer las estructuras que toman parte en estos procesos es también necesario, sea el conocimiento de una enzima o la estructura de orgánulos celulares como el cloroplasto o la mitocondria.

Vemos que el campo de estudio de la Fisiología Vegetal tiene que intentar responder a un fenómeno tan complejo como es la vida, pero con el fin de abordar el problema de forma racional, el hombre ha fraccionado ese todo tan complejo en distintos procesos individuales que luego trata de interrelacionar. ¿Cuáles son esos problemas? La lista puede hacerse tan larga o tan corta como nosotros queramos, pero vamos a dar idea de alguno de ellos.

¿Cómo entra y se desplaza, e incluso cómo sale el agua de la planta? ¿Cómo lo

hacen los solutos? ¿Cómo entran y salen los gases? ¿Cómo se fabrican los alimentos y cómo se utilizan en el desarrollo de la planta? ¿Cómo crece la planta? ¿Cómo se forman nuevos órganos? ¿Cómo se coordinan los distintos órganos y tejidos de una planta? ¿Cómo influyen las condiciones ambientales sobre el desarrollo? A todas estas interrogaciones intenta dar respuesta la Fisiología Vegetal y constituyen, por tanto, su campo de trabajo.

Decíamos antes que la Botánica se ha dividido en diferentes parcelas, cada una con su campo de estudio propio. Si nos fijamos en todas las interrogantes que acabamos de hacernos, nos daremos cuenta que sólo dedicándonos a un campo de estudio aislado pocas respuestas válidas iremos a obtener, ya que existe una estrechísima relación entre estructura y función. Todo proceso fisiológico está condicionado por la anatomía del tejido, y por las características de las células que lo integran. Además sabemos que el crecimiento coordinado de la planta es un proceso fisiológico muy complejo.

Debemos considerar, además, que dentro del reino vegetal existen gran variedad de formas y estructuras a las que necesariamente corresponden diferencias en su fisiología. No tenemos más que considerar la gran diferencia que existe entre una planta verde y un hongo. Pero sin dejar el terreno de estudio de las plantas verdes, que es al que vamos a dedicarnos, veremos a lo largo de este libro que también se presentan entre ellas considerables diferencias en su fisiología, aunque sin salirnos de un modelo o pauta común a todas ellas, ya que no es lo mismo la fisiología de una planta de trigo que la de un roble. En general, las diferencias fisiológicas en plantas verdes son más de tipo cuantitativo que cualitativo, no sólo entre diferentes especies, sino entre variedades de una misma especie.

## 1.2. Relación de la Fisiología Vegetal con la Física y la Química

Lo que distingue a la Biología de la Física es el hecho de que la primera trata de los seres vivos, y éstos tienen que distinguirse de la materia inerte, no viva, de tal forma que su estudio constituye un campo especial de la investigación científica.

Sabemos que los seres vivos gozan de una serie de propiedades que son peculiares de ellos (crecimiento, reproducción, irritabilidad) cuya existencia llevó a considerar que estos rasgos no eran reducibles a una descripción física, es decir, no podían ser explicados por las leyes fisicoquímicas, ya que éstas sólo son una descripción de las partes y no de la singularidad cualitativa del todo. Para los defensores del vitalismo, el ser vivo posee una fuerza vital que no se deriva de la organización fisicoquímica, es el *elan vital* de Bergson. Las tesis vitalistas han sido abandonadas casi totalmente, al menos en su forma original, porque las alternativas mecanicistas han demostrado ser más fructíferas, llegando a efectuar descubrimientos que no hubieran sido posibles con una óptica vitalista.

Las teorías mecanicistas consideran al ser vivo como un organismo que opera de acuerdo con las leyes de la fisicoquímica, y toda la complejidad que se observa no es consecuencia de una variedad de energía desconocida, sino de la interacción de fuerzas fisicoquímicas en el complejo sistema de organización del protoplasma.

La utilización del punto de vista mecanicista ha hecho que se apliquen técnicas experimentales de la física y de la química al estudio de las plantas y a la interpretación

de los procesos observados en términos de estas ciencias. Esto ha permitido un avance considerable en nuestro campo de estudio, la Fisiología Vegetal, y ha permitido expresar de forma cuantitativa muchas relaciones fisiológicas.

Por todo esto es necesario un conocimiento de los principios fundamentales de la Física para poder comprender algunos procesos fisiológicos, como veremos a lo largo de los capítulos que integran este libro.

El hecho de que la concepción mecanicista de los organismos haya permitido un gran avance en su conocimiento no quiere decir que cada cual no pueda tener sus ideas acerca de la existencia de ciertos principios vitalistas para tratar de explicar la vida, aunque, naturalmente, no será posible estudiarlos en el laboratorio.

### **1.3. Relación de la Fisiología Vegetal con la Agricultura**

Las plantas verdes no sólo son la fuente última de todo alimento, sino que surten de materia prima a muchas industrias, y no sólo ha aumentado el número de bocas que hay que alimentar, sino el de cuerpos que vestir y que cobijar, lo que quiere decir que se necesita cada día mayor cantidad de alimentos, fibras textiles, pasta de papel, madera, etc.

Todo esto hace que el hombre quiera obtener más y mejores productos, es decir, que la Agricultura cada vez está más en manos de especialistas, pero estos especialistas, si quieren cumplir los fines que se pretenden, deben poseer un conocimiento de los procesos que tienen lugar en las plantas y también de los efectos del medio ambiente sobre esos procesos, es decir, se necesita una aplicación práctica de los principios de la Fisiología Vegetal.

La aplicación de investigaciones fundamentales de Fisiología Vegetal llevó a mejorar los métodos de propagación, cultivo, recolección, así como de conservación de muchos productos vegetales. El control de plagas y enfermedades de las plantas ha contado con una gran ayuda en la Fisiología Vegetal. La mayor parte de la investigación que se hace hoy en Agricultura no es más que Fisiología Vegetal, habiendo contribuido esta ciencia enormemente al avance de la misma.

### **1.4. Definición de Fisiología Vegetal**

Si nos guiásemos de la definición etimológica, la Fisiología Vegetal es «un discurso acerca de la naturaleza de las plantas». La definición abarca lo suficiente como para que ningún aspecto de la Botánica quede fuera de su alcance. Sin embargo, ya hemos dicho que existen varias parcelas de estudio en la ciencia Botánica, por lo que esta definición no es aceptable. En un contexto más restringido, Fisiología Vegetal es «la ciencia que estudia las respuestas de las plantas vivas, o partes vivas de las mismas, frente a agentes externos o internos variables».

Como toda ciencia, su desarrollo comienza con la fase de observación, en la cual sólo se reconocen los problemas; se convierte posteriormente en ciencia, al realizarse medidas cuantitativas y al trasladar el conocimiento obtenido de estas medidas particu-

lares a casos más generales. La Fisiología Vegetal alcanzó su madurez más tarde que otras ramas de las ciencias botánicas y está claro que así debió ser, ya que necesitó aplicar los conocimientos de la Física y la Química en la interpretación del comportamiento de las plantas. Debido a que la Física y Química del pasado siglo eran inadecuadas para resolver estos problemas, el retraso de la Fisiología Vegetal se mantuvo hasta hace poco tiempo. Pero, además, la Fisiología Vegetal realizó una labor de acicate, al presentarle a la Física y a la Química problemas planteados en las plantas y células vegetales; tomemos de ejemplo el caso de la difusión y equilibrio de membrana.

Sin embargo, aunque necesite de ellas, la Fisiología Vegetal es algo más que el estudio de la Física y Química de los problemas que se plantean. Las plantas y células vegetales son sistemas muy organizados, y precisamente en su compleja organización reside la mayor parte de la problemática de su estudio. En cada época, el fisiólogo vegetal se veía limitado a observar, deducir e interpretar según el nivel de organización al cual podía trabajar. En una primera época se estudiaron los problemas a nivel de planta entera y órganos, posteriormente a nivel de células, pero hoy cada vez nos damos más cuenta de lo heterogéneo que resulta una célula y de la importancia de sus inclusiones.

Resulta casi axiomático considerar que la Fisiología Vegetal estudia el comportamiento de órganos en relación con la estructura submicroscópica de la célula y sus inclusiones.

Hoy ya no es posible considerar la respuesta de un organismo vegetal, como si éste respondiera única y exclusivamente a los estímulos del ambiente en que se encuentra o a condiciones nutritivas. En gran parte sus respuestas vienen condicionadas por sus características hereditarias. Esto ha llevado a la Fisiología Vegetal a poder separar procesos metabólicos en etapas discretas, asociadas al control hereditario a través de la relación gene-enzima. Para los primeros fisiólogos vegetales, el estudio de nutrición y metabolismo se hacía en términos generales amplios, aplicados a un todo funcional y orgánico: la planta. Hoy el fisiólogo vegetal está condicionado a pensar en función de las etapas graduadas, controladas por genes y frecuentemente cíclicas del metabolismo intermedio.

Al desintegrar la maquinaria de las células y estudiar lo que sucede en partículas cada vez más pequeñas, estamos perdiendo de vista, aunque podamos recuperarla luego, la visión global, el mecanismo de funcionamiento de las células en relación con su organización y estructura; y en las plantas, las interacciones que tienen lugar a medida que crecen. Casi todos los problemas planteados hoy en Fisiología Vegetal parecen llegar a un punto tal en el que tras describir cómo un proceso o función fisiológica debe funcionar *in vivo*, lo que podemos realizar *in vitro* queda muy por debajo del funcionalismo *in vivo*. Esto no supone la defensa del vitalismo, sino un reconocimiento de la complejidad de los organismos y cómo las propiedades de la materia y leyes de la energía pueden ser utilizados en formas no fácilmente comprensibles para nosotros.

En definitiva, la Física y Química no son suficientes para comprender estos procesos. La Fisiología Vegetal es una ciencia claramente biológica que no puede considerarse como una rama de la Química o aun de la Bioquímica. No es tampoco una consecuencia o expresión de la Genética, aunque sin un plan hereditario transmitido de célula a célula en la mitosis, no puede haber una comprensión profunda del metabolismo o del desarrollo. Ni aun puede asimilarse o incluirse la Fisiología Vegetal dentro de la

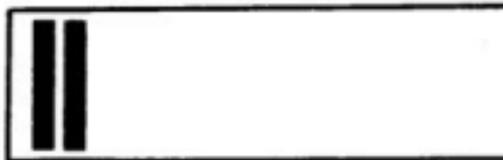
moderna Biología Molecular, ya que su campo de estudio comprende niveles de organización mucho más amplios que la molécula; y si la Biología es conocimiento de la vida, debemos recordar que las moléculas aisladas, aun las más complejas, no son la vida. La Fisiología Vegetal es todo esto y mucho más, ya que debe sintetizar el conocimiento proveniente de todos estos campos, al observar los organismos a diferentes niveles, y utilizar esas observaciones en la comprensión de cómo las células crecen y sobreviven en un mundo inorgánico y con frecuencia hostil.

Este estudio de las plantas tiene necesidad de recurrir cada día a nuevas técnicas y nuevos puntos de vista, a experimentos y esquemas amplios, a equipos de investigación organizados, y todo ello con el fin de comprender y coordinar los más variados trabajos que permitan un mejor conocimiento de las plantas.

---

#### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- HARRE, R.: *El método de la ciencia*, H. Blume Ediciones, Madrid, 1979.
- MEYER, B. S., y ANDERSON, D. B.: *Plant Physiology*, D. Van Nostrand Company, Princeton, Nueva Jersey, 1961.
- REED, H. S.: *Jan Ingenhousz, Plant Physiologist. With a History of the discovery of photosynthesis*, «Chronica Botanica», vol. 11, 1949, págs. 285-396.



**La pared celular**



## LA PARED CELULAR VEGETAL

La presencia de una pared en las células vegetales es un carácter que las diferencia de las células animales. Es posible identificar distintos tipos de células en vegetales superiores por la estructura de sus paredes, poniendo de manifiesto la estrecha relación que existe entre estructura de la pared y función de la célula a la que esa pared pertenece. La pared celular funciona como la piel y el esqueleto de las plantas. Tradicionalmente se considera que la pared es de dos tipos: pared celular primaria, que es la primera pared celular verdadera que se desarrolla en una célula joven. En muchas células es la única pared que se desarrolla, y caracterizándose, las que la poseen, por presentar un crecimiento activo. Esta pared se transforma en secundaria cuando la célula cesa de crecer. La pared secundaria se forma en la superficie interna de la pared primaria, es mucho más gruesa que ésta y presenta una composición y propiedades distintas de la primaria.

### 2.1. Composición química

Para poder entender la estructura, a veces muy compleja, que presentan las paredes celulares, es necesario conocer primero cuáles son los componentes que la integran. Los polisacáridos son los compuestos más abundantes en todas las paredes celulares vegetales. Están formados por azúcares enlazados unos con otros mediante enlaces glucosídicos, formando de esta manera largas cadenas. En la figura 2.1 puede verse la estructura de los doce azúcares encontrados hasta ahora en las paredes celulares vegetales. Los tres tipos de polisacáridos que normalmente aparecen en las paredes celulares vegetales son la celulosa, hemicelulosas y sustancias pécticas. Además de los polisacáridos, las paredes contienen proteínas, lípidos, minerales; en los últimos estadios de desarrollo las paredes pueden presentar también grandes cantidades de lignina. En los órganos aéreos las paredes celulares suelen encontrarse recubiertas de ceras, cutina y suberina.

#### 2.1.1. Celulosa

La celulosa es el componente más abundante de los vegetales. Está formada por unas cadenas lineales de unidades de glucosa enlazadas mediante uniones  $\beta$ 1-4

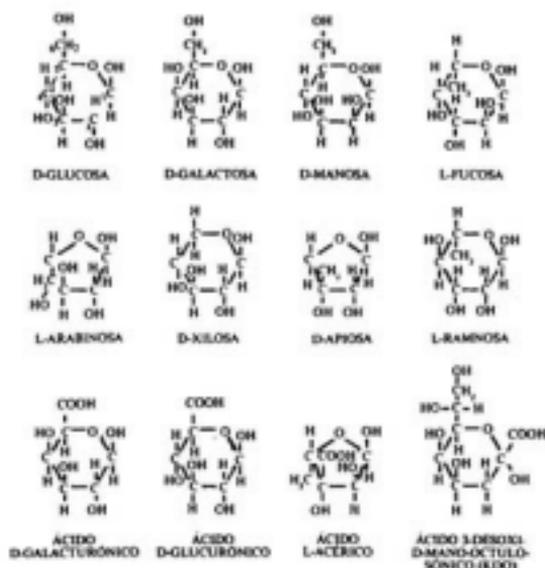


Figura 2.1.—Estructura de los doce azúcares más frecuentemente encontrados en las paredes celulares vegetales.

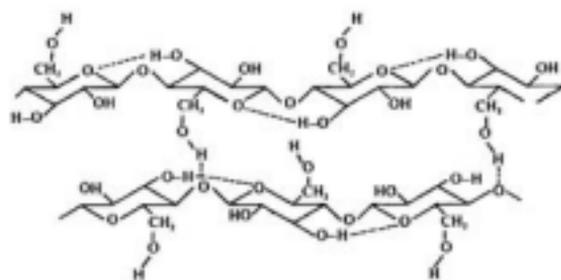


Figura 2.2.—Estructura de la celulosa.

(Fig. 2.2). Aparece en forma de agregados fibrilares cristalinos que le confieren a la pared la mayor parte de su enorme resistencia.

El grado de polimerización, es decir, el número de restos de glucosa que forman una molécula puede oscilar entre 8.000-14.000, lo que corresponde a una longitud de la cadena de 40.000-70.000 Å (4-7 μm). En las paredes primarias las cadenas de celulosa son mucho más cortas, del orden de 7.500 Å con un grado de polimerización de 2.500. Debido a su configuración molecular las cadenas de celulosa tienden a agregarse formando las estructuras conocidas como microfibrillas. Una fibrilla elemental está formada por unas 32 cadenas de celulosa; 20 fibrillas elementales forman una microfibrilla; en estado

de microfibrilla es como se encuentra la celulosa en las paredes primarias; 250 microfibrillas forman una fibrilla, y por último unas 1.500 fibrillas forman una fibra de celulosa. Esta estructura se mantiene gracias a los puentes de hidrógeno intramoleculares que se establecen entre los grupos hidroxilos en posición 3 y los puentes de oxígeno de las moléculas de glucosa adyacentes, y entre los grupos hidroxilos en posición 6 y los oxígenos glicosídicos en las cadenas adyacentes. Considerados individualmente, los puentes de hidrógeno son enlaces débiles, pero la gran cantidad que hay entre las cadenas de glucosa que componen la fibra le proporcionan una unión muy fuerte, siendo los responsables primarios de la rigidez de la pared celular.

### 2.1.2. Hemicelulosas

Las hemicelulosas son compuestos aún mal definidos que aparecen en las paredes celulares en forma amorfa o paracristalina. Los xilanos, arabinoxilanos, galactomananos, glucuroarabinoxilanos, glucomananos y xiloglucanos son las clases más frecuentes de hemicelulosas. Todas las hemicelulosas, aunque pueden estar formadas por azúcares distintos, poseen dos características estructurales comunes muy importantes a la hora de estudiar su función biológica, y que son las siguientes:

1. Todas las hemicelulosas poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos casi siempre mediante enlaces  $\beta$ 1-4 de la que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar de longitud, como ocurre en el xiloglucano de las paredes celulares de *Acer pseudo-platanus* descrito por Albersheim (Fig. 2.3) y que está formado por un glucano  $\beta$ 1-4 del que salen ramificaciones de xilosa de un solo azúcar de longitud; también aparecen restos de galactosa y fucosa unidos al glucano o a uno de los restos de xilosa.
2. Todas las hemicelulosas poseen alguna característica estructural que les impide formar agregados como las cadenas de celulosa. En los xiloglucanos, por ejemplo, que como hemos dicho poseen un glucano unido mediante enlaces  $\beta$ 1-4, la mayoría de los restos de glucosa presentan su grupo  $-\text{CH}_2\text{OH}(6)$  sustituido con cadenas de xilosa, impidiendo de esta manera la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas. Sin embargo, aunque las hemicelulosas no pueden formar agregados, sí pueden cocristalizar con las cadenas de celulosa, formando seguramente puentes de hidrógeno entre los grupos  $-\text{CH}_2\text{OH}$  de las cadenas de celulosa y los oxígenos glicosídicos de las hemicelulosas.

Trabajos recientes han demostrado la presencia en paredes celulares de algunas monocotiledóneas tales como avena, maíz, trigo y cebada de  $\beta$ -glucanos no celulósicos con enlaces glucosídicos, no sólo del tipo  $\beta$ 1-4, sino también  $\beta$ 1-3, llegando a representar estos últimos hasta el 31 por 100 de todos los enlaces glucosídicos de estos glucanos. Algunos investigadores creen que estos glucanos mixtos con enlaces  $\beta$ 1-3,  $\beta$ 1-4 desempeñan un papel muy importante en los procesos de elongación de la pared celular, tal y como veremos más adelante en este capítulo.

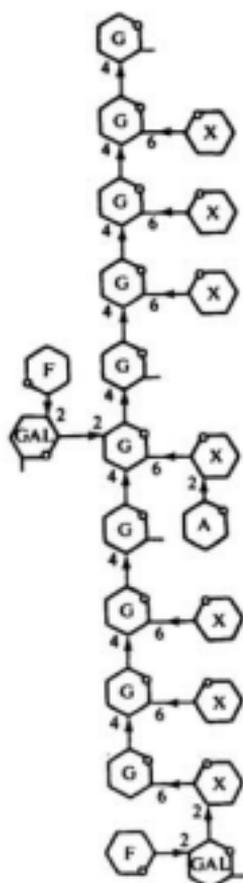


Figura 2.3.—Estructura del xiloglucano de las paredes celulares de *Acer pseudoplatanus*. X: xilosa; F: fucosa; GAL: galactosa; A: arabinosa; G: glucosa (según Alberheim).

### 2.1.3. Pectinas

Los ramnogalacturonanos, galacturonanos, galactanos, arabinanos y arabinogalactanos constituyen la fracción péctica. El ramnogalacturonano I (Fig. 2.4) está formado por largas cadenas de ácido galacturónico unidas mediante enlaces  $\alpha$  1-4, entre los que se encuentran intercalados algunos residuos de ramnosa unidos mediante enlaces 1-2. Algunos cationes divalentes, particularmente el calcio, forman complejos con los grupos carboxilo e hidroxilo de los restos de ácido galacturónico. Las propiedades intercambiadoras de iones que poseen las paredes celulares se deben precisa-

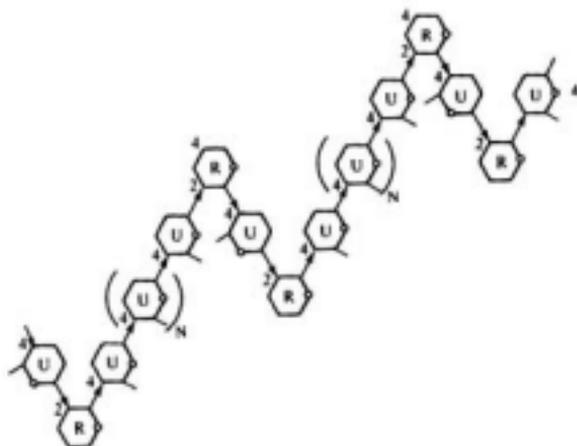


Figura 2.4.—Estructura del ramnoglacturonano de las paredes celulares de *Acer pseudoplatanus*. R: ramnosa; U: ácido galacturónico (según P. Albersheim en: *Plant Biochemistry*, 2ª ed., Academic Press, Nueva York, 1976).

mente a estos polisacáridos con ácidos urónicos. El ramnoglacturonano II es muy diferente estructuralmente del I. Contiene una elevada proporción de restos de ramnosa, pero en contraste con el I sus uniones lo son en posición 3, ó 3, 4 y también en 2, 3, 4. Aparecen también restos de un azúcar hasta hace poco desconocido, el ácido acérico, llamado así por haber sido descubierto en cultivos celulares de *Acer pseudoplatanus* y también de apiosa.

Dos clases de arabinogalactanos se han identificado en las paredes celulares de plantas superiores (Fig. 2.5). En uno de ellos la molécula está débilmente ramificada mientras que en el otro son frecuentes las ramificaciones, a veces complejas.

#### 2.1.4. Proteínas

Fueron Tupper-Carey y Priestley los primeros que en el año 1924 aislan proteínas a partir de paredes celulares de tejidos meristemáticos de *Vicia faba*. Estos resultados no fueron confirmados hasta el año 1965 en que Lamport identifica una proteína estructural en paredes celulares de *Acer pseudoplatanus*. Desde entonces, gran cantidad de análisis químicos indican que las proteínas constituyen aproximadamente un 10 por 100 del peso seco de las paredes celulares primarias, siendo la hidroxiprolina el aminoácido mayoritario, que en paredes de *Acer pseudoplatanus* representa el 10 por 100 de los aminoácidos totales y en paredes celulares de coleóptilos de *Oryza sativa* llega hasta el 30 por 100 de los aminoácidos totales. En todos los péptidos aislados de esta proteína estructural aparece siempre la secuencia serina-(hidroxiprolina). También aparecen tetrasacáridos de arabinosa enlazados glicosídicamente a casi todos los restos de hidroxiprolina.

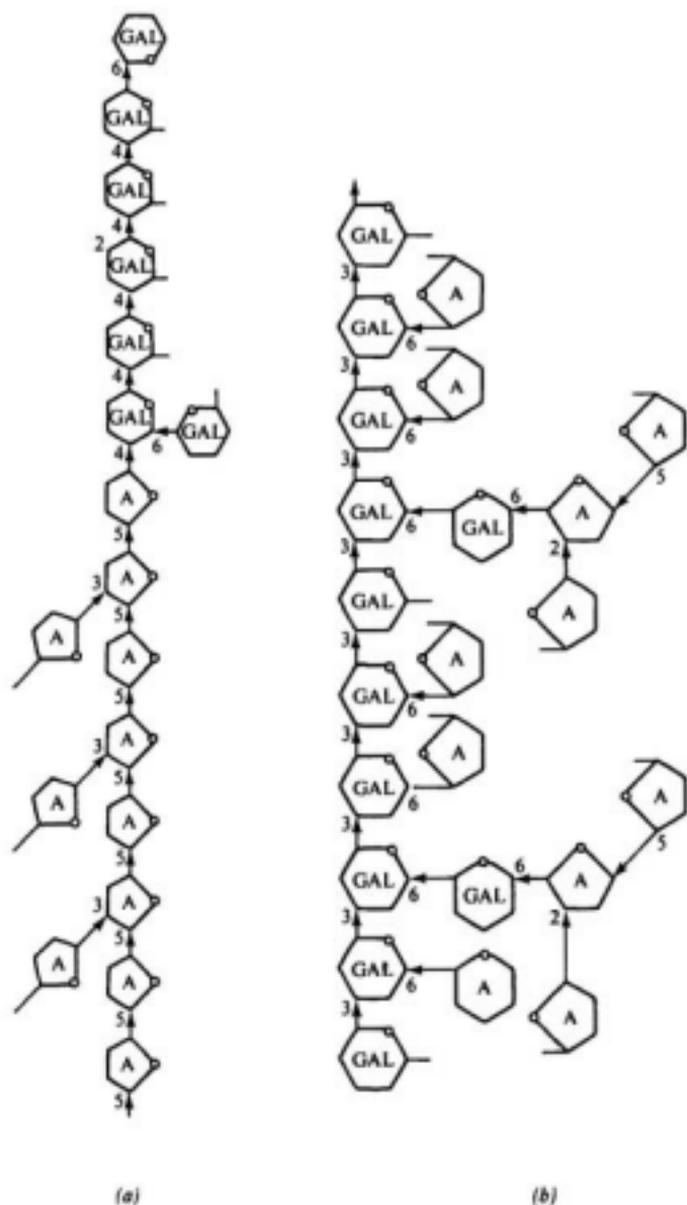


Figura 2.5.—Estructura de los arabinogalactanos de las paredes celulares de *Acer pseudoplatanus*. A: arabinosa; GAL: galactosa; R: ramnosa (según P. Albersheim en: *Plant Biochemistry*, 2.<sup>a</sup> ed., Academic Press, Nueva York, 1976).

En un principio se pensó que esta proteína podría tener un papel muy importante en el crecimiento de la pared celular, de ahí que Lamport acuñase el término «extensina» para esta proteína. Una característica notable de la extensina es su insolubilidad en los solventes convencionales de proteínas, sin embargo, es soluble en los solventes de lignina como el clorito sódico suavemente acidificado. Este hecho sugiere que su unión a la pared podría ser a través de una sustancia fenólica, corroborado por el reciente descubrimiento en las paredes celulares del dímero fenólico, isoditrosina, compuesto formado por dos tirosinas unidas por un puente difenil-éter. La formación de los puentes puede estar catalizada por una peroxidasa (Fig. 2.6). Esta proteína podría desempeñar dos funciones biológicas: control de la extensión celular y resistencia a patógenos invasores. Existe una correlación negativa entre crecimiento y actividad peroxidásica en paredes celulares y entre contenido de extensina y tasa de crecimiento. Por otra parte, la extensina puede hacer la pared celular indigerible por los patógenos, ya que es muy resistente a proteasas. Además de esta proteína estructural, en las paredes celulares vegetales existen otras proteínas, como las inhibidoras de poligalacturonasas secretadas por patógenos, o bien proteínas enzimáticas como las  $\beta$ 1-4,  $\beta$ 1-6,  $\beta$ 1-3 glucanasas,  $\alpha$ 1-6 glucanasa,  $\alpha$  y  $\beta$  galactosidasas. Muchas de ellas pueden modificar las macromoléculas de la pared y, por tanto, es muy probable que jueguen un papel importante en los procesos de crecimiento celular.

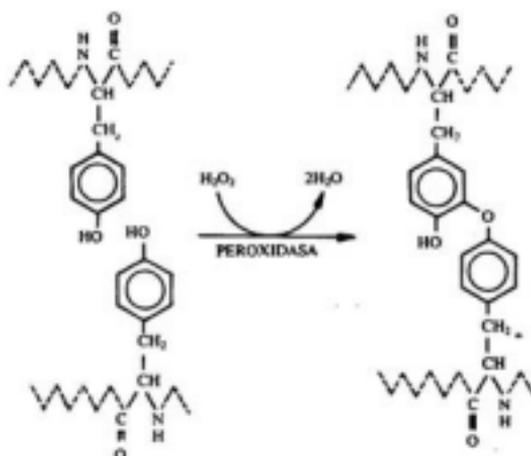


Figura 2.6.-Posible formación de isoditrosina.

### 2.1.5. Lignina

La lignina es el componente de naturaleza no polisacáridica más abundante de las paredes celulares. Se forman por deshidrogenación enzimática de los alcoholes cumárico, coniferílico y sinapílico (Fig. 2.6a) seguida por una polimerización, que dado que no está controlada enzimáticamente y que los radicales libres pueden reaccionar unos con

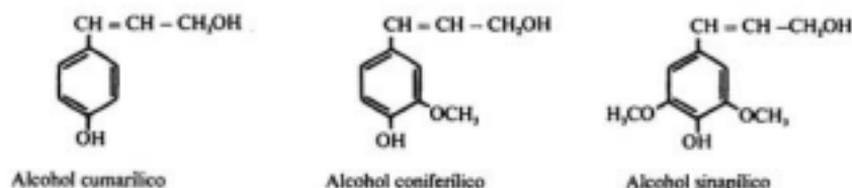


Figura 2.6a. -Precusores de la lignina.

otros en una gran variedad de formas, hace que la lignina no tenga una estructura única. Su síntesis se inicia inmediatamente que comienza a formarse la pared secundaria, avanzando desde la lámina media hacia el plasmalema. De esta forma, tanto la pared primaria como la secundaria, quedan impregnadas con esta sustancia rígida e hidrófoba que queda unida covalentemente a la matriz de polisacáridos, resultando una estructura muy fuerte y resistente a la degradación. Un aspecto interesante de la presencia de lignina en los vegetales es la sugerencia realizada por algunos científicos de que la misma se debe a la falta de un mecanismo excretorio en plantas. De esta forma, la síntesis de lignina no sería más que un mecanismo de detoxificación de sustancias fenólicas que, mediante una ruta metabólica, reaccionan entre sí formando lignina.

### 2.1.6. Otros compuestos de la pared celular

Además de los compuestos ya citados, y que podemos considerar mayoritarios en las paredes celulares, existen otros como las ceras, cutina y suberina, localizados en las paredes exteriores, es decir, en contacto con el medio ambiente, de la mayoría de las células epidérmicas. Se conoce muy poco sobre su estructura, aunque se sabe que la cutina y suberina están formadas por ácidos grasos de cadena larga como los ácidos dihidroxi-octadecanoico y trihidroxi-octadecanoico. La suberina difiere de la cutina en alguna de sus propiedades químicas, como la de ser más fácilmente saponificable por álcali que la cutina; ambos compuestos son muy resistentes al ataque enzimático. Las ceras están formadas por una mezcla de ésteres de ácidos alifáticos, de alcoholes y cetonas. Su función, al igual que la cutina y suberina, es la de formar una especie de cubierta hidrófoba sobre la superficie de las plantas, protegiéndolas contra lesiones mecánicas, una pérdida excesiva de agua y contra las invasiones de patógenos.

Ciertas sustancias minerales, como la sílice y el carbonato cálcico, pueden formar parte también de las paredes celulares. La sílice es un componente común de las paredes de las gramíneas y los equisetos. También en algunas paredes se detecta la presencia de taninos que pueden ser hidrolizables liberando, como productos de la hidrólisis, glucosa y ácidos fenólicos como el ácido gálico, y no hidrolizables, formados por flavanos. Su función puede ser la de conferir resistencia contra ataques de virus y hongos y como agente disuasorio contra los insectos comedores de hojas.

## 2.2. Origen de la pared celular

El proceso de la duplicación de un protoplasto en dos protoplastos hijos puede dividirse en dos etapas: la división del núcleo o mitosis (cariocinesis) y la división del citoplasma o citocinesis. En las células vegetales la pared nueva se origina durante la citocinesis (Fig. 2.7). La formación de la pared comienza generalmente por la formación de

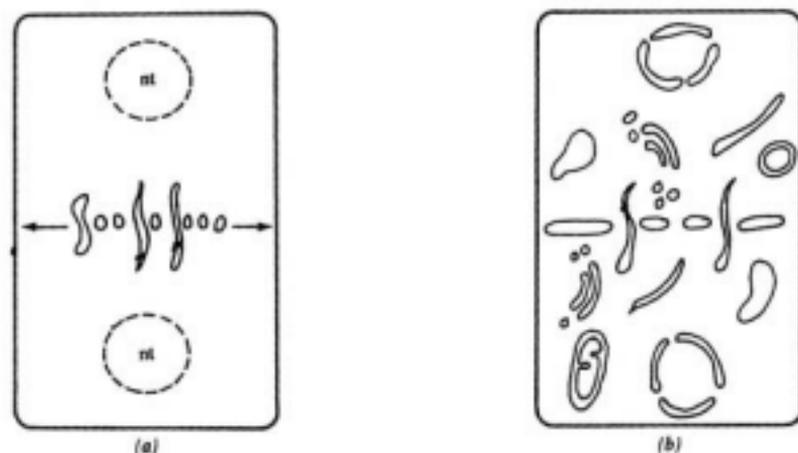


Figura 2.7.—Formación de la pared celular. a) Formación de la placa celular en el plano ecuatorial de la célula (nt, núcleos telofásicos). Las flechas indican el sentido de crecimiento de la pared nueva. b) Fase posterior en la formación de la pared por fusión de vesículas en la placa celular y aparición de orgánulos citoplasmáticos en las células hijas.

un fragmoplasto en el plano ecuatorial del huso fibroso que se extiende entre los dos núcleos hijos. Sin embargo, la primera manifestación visible de la pared celular es la llamada placa ecuatorial. Generalmente esta placa progresa a través del plano ecuatorial hasta alcanzar las paredes celulares laterales. Las vesículas que forman la placa ecuatorial proceden del aparato de Golgi, creciendo dicha placa mediante la adición de estas vesículas. Esta región se caracteriza también por la presencia de fragmentos del retículo endoplasmático y muchos ribosomas. Las membranas de las vesículas del aparato de Golgi se fusionan dando lugar al plasmalema de las dos células hijas. Los protoplasmas de las dos células hijas permanecen conectados por los plasmodesmos, que están formados por los fragmentos de retículo endoplasmático atrapados durante la formación de la pared celular. Los principales componentes químicos de la placa celular parecen ser ésteres metílicos del ácido galacturónico, como ha sido demostrado mediante colorantes específicos y posterior observación al microscopio electrónico, y por experimentos de «pulso y caza» con mio-inositol (precursor de los ácidos urónicos) marcado con tritio ( $^3\text{H}$ ). El marcaje aparece primero en las vesículas del aparato de Golgi y posteriormente

en la pared celular. Una vez que las vesículas del aparato de Golgi se han fusionado, puede detectarse celulosa a ambos lados de la placa celular. De esta forma, en esta fase la placa celular consta de tres capas: la central, no celulósica y que persiste como división entre las paredes primarias de las dos células hijas y que se llama lámina media, y las dos capas conteniendo celulosa a cada lado de la lámina media y que son los comienzos de la pared celular primaria. A nivel de las zonas ricas en plasmodesmos el espesamiento de la pared primaria es muy débil, son las llamadas punteaduras primarias.

### 2.3. Estructura de la pared celular primaria

Ya sabemos cuales son los componentes químicos que constituyen la pared celular primaria. Lo que ya no conocemos de una manera tan completa es de qué forma estos compuestos se enlazan en la pared celular para dar lugar a su compleja estructura. Albersheim y sus colaboradores han estudiado exhaustivamente los componentes polisacáridicos de las paredes celulares primarias de cultivos de células de *Acer pseudoplatanus* proponiendo un modelo estructural de la misma (Fig. 2.8). Estudios realizados con otras plantas superiores parecen indicar que este modelo estructural puede ser válido para las paredes celulares de las dicotiledóneas. Según este modelo, las fibrillas de celulosa formadas a su vez por cadenas de celulosa agregadas lateralmente mediante puentes de hidrógeno, están cubiertas completamente por una capa de xiloglucano de una molécula de espesor. Este compuesto, dispuesto paralelamente al eje de la fibrilla de celulosa, está enlazado a ésta mediante puentes de hidrógeno que se establecen entre las moléculas de glucosa de ambos polisacáridos. Por el contrario, en el lado opuesto de la cadena de xiloglucano no es posible la formación de estos puentes, ya que está impedido por las ramificaciones existentes formadas por unidades de xilosa, fucosa y galactosa. Gran parte de las moléculas de xiloglucano están enlazadas glucosídicamente en su extremo reductor a moléculas de arabinogalactanos que presentan una disposición radial respecto al eje de las fibrillas de celulosa. Los extremos reductores de los arabinogalactanos están unidos a las cadenas de ramnogalacturonanos por un enlace glucosídico, creyéndose que tiene lugar exclusivamente con las unidades de ramnosa. El último grupo de interconexiones implica las uniones proteína-polisacárido. Los residuos de hidroxiprolina de la proteína de la pared están glucosídicamente unidos a tetra-arabinosidos. Por último, las cadenas de arabinogalactano conectadas a los restos de serina de la proteína de la pared parecen estar unidos covalentemente al ramnogalacturonano. La existencia de estos enlaces glucosídicos entre las proteínas y los carbohidratos de la pared confirman la hipótesis de Lamport, quien en 1973 postulaba que la estructura de la pared celular primaria viene dada por una red compleja de carbohidrato y proteína enlazadas covalentemente. Albersheim y sus colaboradores también proponen que la pared celular primaria puede ser considerada como una única macromolécula en forma de bolsa que envuelve al protoplasto.

Las paredes celulares primarias de las monocotiledóneas, de las que no existe aún un modelo estructural como el que acabamos de describir para las dicotiledóneas, parecen estar formadas por los mismos azúcares y tener una estructura similar, formada por

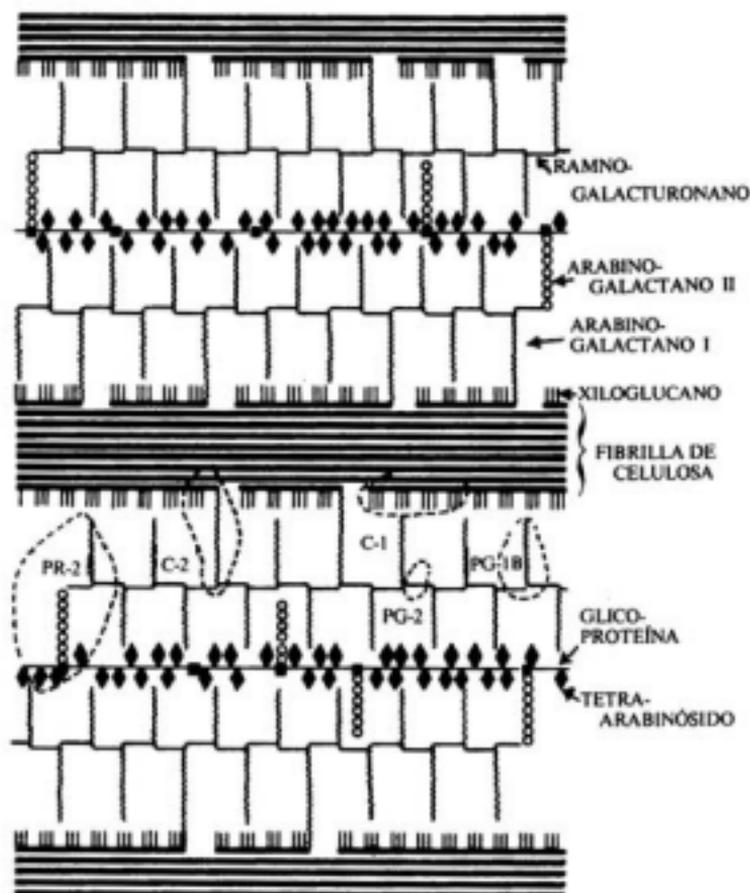


Figura 2.8.—Modelo estructural de la pared celular primaria de *Acer pseudoplatanus* (según Keegstra, en *Plant, Structure, Function and Adaptation*, MacMillan Press, Londres, 1976).

fibrillas de celulosa interconectadas por hemicelulosas y pectinas. Glucanos no celulósicos unidos mediante enlaces glucosídicos del tipo  $\beta$ 1-3 y  $\beta$ 1-4 y arabinosilanos son las hemicelulosas predominantes en las paredes celulares de monocotiledóneas en lugar de un xiloglucano (también encontrado en algunas monocotiledóneas), como en las dicotiledóneas. En algunas monocotiledóneas, los arabinosilanos presentan residuos de ácidos urónicos formando los glucuronoarabinosilanos. Estos compuestos podrían desempeñar el mismo papel que los xiloglucanos de las dicotiledóneas, recubriendo las fibrillas de celulosa y uniéndose a ellas mediante puentes de hidrógeno, aunque para poder asegurar esto definitivamente hace falta aún mayor apoyo experimental.

Últimamente, parece bien documentada la presencia en paredes celulares de monocotiledóneas de un glucano mixto no celulósico formado por enlaces  $\beta(1-3)(1-4)$ , cuya degradación podría desempeñar un papel importante en el proceso de alargamiento celular.

## 2.4. Extensión de la pared celular primaria

Las células vegetales están rodeadas por una envuelta rígida, la pared celular, cuya existencia presenta una curiosa paradoja: por una parte ha de ser lo suficientemente rígida para proporcionar la forma característica de la célula vegetal, y por otra parte, debe ser capaz de extenderse para permitir que la célula crezca. La pared celular es permeable a todas las moléculas, pero no así la membrana celular que se encuentra inmediatamente por debajo, que presenta permeabilidad selectiva y tiende a concentrar ciertas moléculas solubles e iones en el interior de la célula. Como consecuencia de esto, el agua entra en el interior de la célula por un gradiente de potencial hídrico, y en el interior aumenta el potencial de presión (presión de turgencia) presionando la membrana celular contra la pared. Si por alguna causa la pared pierde su rigidez, puede extenderse bajo la presión a que se encuentra sometida por la entrada de agua en el interior de la célula. Por tanto, será el potencial de presión la fuerza conductora de la extensión de la pared celular, y la capacidad de la pared celular para extenderse vendrá dada, al menos en parte, por las propiedades mecánicas de la pared en ese momento.

### 2.4.1. Propiedades mecánicas de la pared celular

Las propiedades mecánicas de cualquier sistema constituido por polímeros son una consecuencia de la distribución molecular de los mismos, así como de los enlaces existentes entre los polímeros y del grado de enrollamiento que presentan. Cuando se aplica una fuerza a una sustancia polimérica, ésta sufre una deformación; en el caso de las paredes celulares éstas sufren un cambio en la forma pero no en el volumen, es decir, se extienden en la dirección de la fuerza aplicada pero se contraen en las otras direcciones. Se dice que una extensión es elástica o reversible cuando el material recupera su forma primitiva una vez que la fuerza responsable de la extensión desaparece (Fig. 2.9 A), que es lo que sucede cuando un material elástico como la goma es sometido a este tratamiento; hay una extensión casi instantánea seguida por ningún aumento posterior proporcional al tiempo. En el otro extremo tenemos el caso de ciertos materiales plásticos cuyo estiramiento es proporcional al tiempo (Fig. 2.9 B); ésta es la extensión plástica que es irreversible.

La mayoría de los materiales que contienen polímeros de la longitud encontrada comúnmente en las paredes celulares presentan una extensión con características intermedias, que es la llamada extensión viscoelástica (Fig. 2.9 C). En este caso, cuando se aplica una fuerza constante, hay una cierta cantidad de extensión instantánea, pero que no se detiene, sino que continúa a una intensidad que es proporcional al logaritmo del tiempo. La parte de esta extensión dependiente del tiempo se denomina *creep*. Debido a esta proporcionalidad al logaritmo del tiempo, la longitud se aproxima pronto a una especie de meseta, aunque en realidad el material no cesa de extenderse mien-

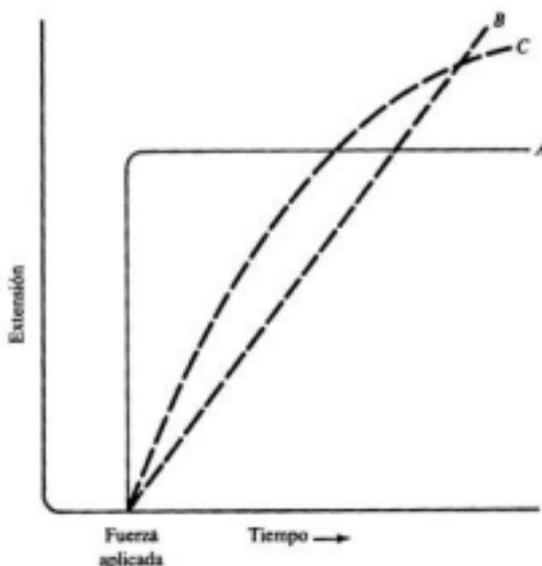


Figura 2.9.—Relación entre la extensión y el tiempo. A: extensión elástica; B: extensión plástica; C: extensión viscoelástica.

tras siga actuando la fuerza responsable de la extensión. La forma de reconciliar estos dos aspectos, extensión de la pared celular a una intensidad constantemente decreciente y el hecho de que las células crezcan a una intensidad constante durante un intervalo considerable de tiempo, sólo puede hacerse asumiendo que el crecimiento tiene lugar por una serie consecutiva de extensiones viscoelásticas (Fig. 2.10). Se ha estudiado el comportamiento mecánico de las paredes celulares de gran cantidad de especies, encontrándose que todas las paredes celulares primarias tienen propiedades mecánicas cualitativamente similares. Las diferencias que existen entre la extensión celular y las propiedades mecánicas de las paredes celulares, nos indican que la extensión de la pared celular no es únicamente una deformación física de la pared. Por ejemplo, la extensión es muy sensible a los cambios de temperatura y es inhibida por el KCN, mientras que la extensión física de la pared es casi insensible a la temperatura, y no es afectada por el KCN. Esto nos lleva a pensar que cada paso de extensión debe implicar una modificación bioquímica de la pared celular en adición a la extensión física de la pared. Ya que la extensión de la pared es fuertemente dependiente de la temperatura, parece lógico pensar que las modificaciones bioquímicas sean el factor limitante de la extensión.

Se han propuesto varios modelos para intentar explicar la extensión de la pared en los términos que acabamos de describir. Todos consisten básicamente de dos componentes: a) modificación bioquímica de la pared; b) extensión viscoelástica de la

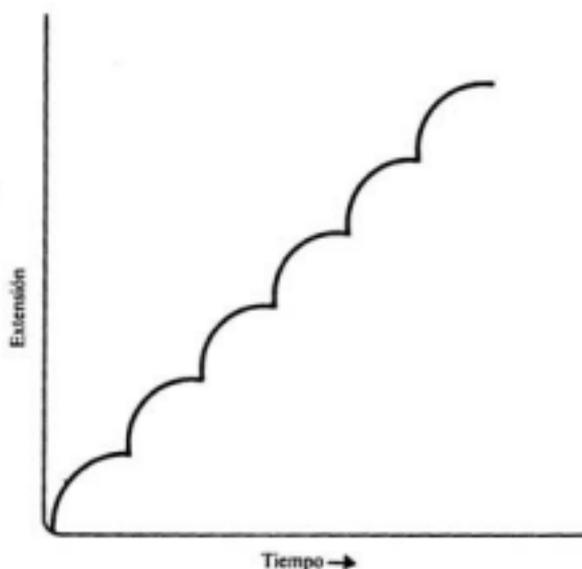
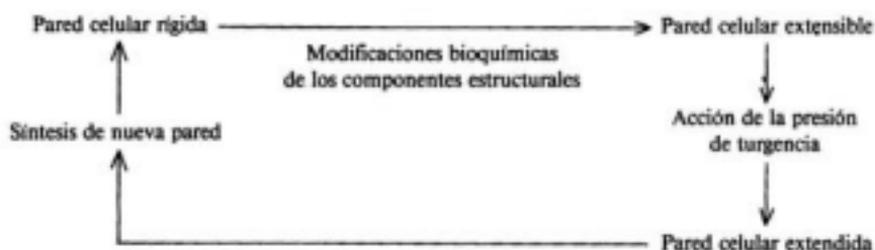


Figura 2.10.—Serie de extensiones viscoelásticas que dan lugar a una extensión continua.

pared ablandada bioquímicamente y dirigida por el potencial de presión. De acuerdo con esto, Masuda en 1978 propone el siguiente esquema basado en que la extensión celular es la expresión de una serie de pasos independientes de extensión.



#### 2.4.2. Bioquímica de la pérdida de rigidez de la pared celular

Los estudios sobre la bioquímica de la pérdida de la rigidez de la pared celular han sido posibles gracias al estudio de los efectos que sobre la misma tienen las hormonas vegetales conocidas como auxinas (Cap. 22). Cuando se dejan flotando en agua secciones de coleóptilos de avena, el alargamiento de las células de esas secciones es escaso, pero cuando se añaden auxinas al medio de incubación comienza, después de un período

do de latencia que dura de 10 a 15 minutos, un proceso de elongación celular muy rápido que continúa durante horas. Después de casi 30 años de investigación ha podido ser establecido que las auxinas provocan una pérdida de la rigidez de la pared celular, de tal forma que ésta puede extenderse bajo el potencial de presión provocado por la entrada de agua en la célula. El lugar primario de acción de las auxinas es por ahora desconocido, aunque varias líneas de evidencia parecen sugerir que estas hormonas no actúan directamente sobre la pared celular sino más bien en el citoplasma o en la membrana citoplasmática. Dada esta posible separación espacial entre el lugar de acción de las auxinas y la pared celular, parece lógico suponer la existencia de algún mensajero químico entre el citoplasma y la pared celular cuya síntesis o actividad esté inducida por las auxinas.

Hipóticamente, la pérdida de rigidez de la pared celular puede conseguirse mediante cambios en los procesos de síntesis de los materiales de la pared celular, o bien por la rotura de ciertos enlaces entre los polisacáridos de la pared, por la acción, posiblemente, de las polisacaridasas presentes en la pared y cuya síntesis puede ser inducida por auxinas. La primera posibilidad parece poco probable, pues si bien las auxinas estimulan la síntesis de los materiales de la pared celular, ésta no se detecta hasta al cabo de una hora de incubación de las paredes en presencia de auxinas, mientras que la extensión de la pared inducida por auxinas se detecta al cabo de 10-15 minutos de incubación. Es, sin embargo, indudable la necesidad de la síntesis de nueva pared celular para una extensión celular prolongada. Con respecto a la segunda hipótesis, es un hecho claro que la rotura de enlaces en la matriz polisacáridica o entre la matriz y las fibrillas de celulosa, necesariamente tendrá que afectar las propiedades mecánicas de la pared. La evidencia en favor de esta hipótesis es muy sugestiva. Las actividades de muchas polisacaridasas existentes en la pared celular como  $\beta$ 1-3 glucanasa,  $\beta$ 1-4 glucanasa (celulasa),  $\beta$ 1-6 glucanasa,  $\alpha$ 1-6 glucanasa y exogalactanasas, aumenta en respuesta a tratamientos que estimulan el crecimiento celular y la localización y actividad de estas enzimas es máxima en las zonas de mayor elongación. Recientemente, Masuda y colaboradores, así como otros investigadores, han encontrado en paredes celulares de monocotiledóneas una buena correlación entre capacidad de extensión de la pared celular y descenso en el contenido de glucosa no celulósica y en el tiempo mínimo de relajación ( $T_0$ ) de los materiales viscoelásticos de la pared celular. Los tres procesos están estimulados por las auxinas, es decir, la hormona induce la extensión de la pared celular vegetal y, por tanto, el crecimiento celular (Fig. 2.11), el descenso en glucosa no celulósica, es decir, perteneciente a un glucano de la fracción hemicelulósica (Fig. 2.12) y por último también inducen una disminución en el  $T_0$  (Fig. 2.13), lo que implica una disminución en la rigidez de la pared. Todo este proceso podría estar mediatizado por una glucanasa, ya que la nojirimicina (5-amino-5-desoxi-D-glucopiranosas), que es un potente inhibidor de la actividad de las glucanasas, inhibe la extensión inducida por auxinas (Fig. 2.14) y también inhibe el descenso inducido por auxinas del contenido en glucosa no celulósica y la disminución en el  $T_0$  (Tabla 2.1). Durante los últimos años se ha demostrado, mediante la incubación de las paredes celulares vegetales aisladas de monocotiledóneas, que éstas poseen capacidad autolítica. El producto de la hidrólisis parece ser un glucano mixto formado por enlaces  $\beta$ (1-3)(1-4) y para cuya liberación parece necesaria la actuación conjunta de dos glucanasas: una endoglucanasa que ini-

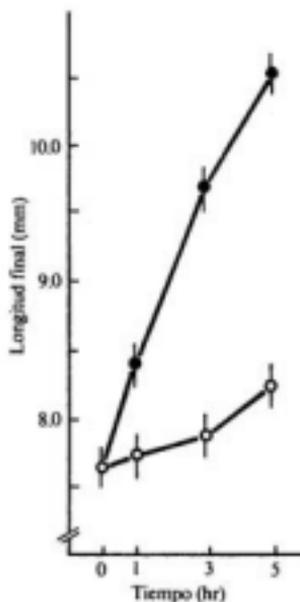


Figura 2.11.—Extensión de la pared celular de coleóptilos de arroz inducida por IAA. (○): control; (●): tratados con IAA (tomado de I. Zarrá y Y. Masuda, *Plant Cell Physiol.* 20: 1117-1124, 1979).

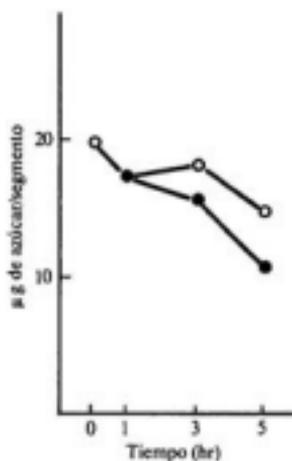


Figura 2.12.—Descenso en el contenido de glucosa no celulósica inducido por IAA en paredes celulares de coleóptilos de arroz. (○): control; (●): tratados con IAA (tomado de I. Zarrá y Y. Masuda, *Plant Cell Physiol.* 20: 1117-1124, 1979).

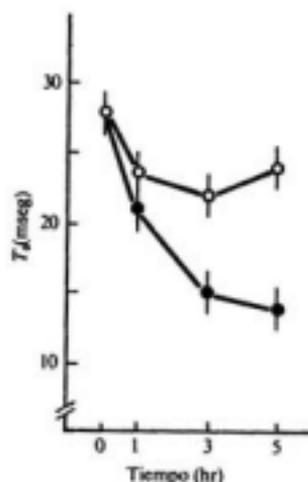


Figura 2.13.—Descenso en el tiempo mínimo de relajación inducido por IAA en paredes celulares de coleóptilos de arroz. (○): control; (●): tratados con IAA (tomado de I. Zarra y Y. Masuda, *Plant Cell Physiol.*, 20: 1117-1124, 1979).

TABLA 2.1

Efecto de la nojirimicina sobre el descenso inducido por IAA en el tiempo mínimo de relajación ( $T_d$ ) y en el contenido en glucosa no celulósica en segmentos de coleóptilos de avena (tomado de Masuda. *Bot. Mag. Tokio. Special Issue 1*: 103-123, 1978)

Tratamiento	$T_d$ , mseg	Glucosa, $\mu\text{g}/\text{segmento}$
Ninguno (Tampon, pH 6,5) .....	$18,8 \pm 1,9$	25,8
Nojirimicina, $3 \times 10^{-3}$ M .....	$18,7 \pm 1,1$	26,9
IAA $10^{-4}$ M .....	$14,7 \pm 0,9$	16,9
IAA + Nojirimicina .....	$17,9 \pm 0,9$	23,5

ciaría la digestión del polímero y una exoglucanasa que liberaría glucosa, a partir del polímero anterior.

Existen también algunos datos experimentales que permiten suponer que, en las paredes celulares de dicotiledóneas, un enzima implicado en el crecimiento podría ser una galactosidasa. En apoyo de esta idea está el hecho de que en paredes celulares de dicotiledóneas se ha demostrado un descenso inducido por la auxina de galactosa y arabinosa, por lo que se supone que la degradación de un arabinogalactano podría estar implicada en el mecanismo por el que la auxina induce la pérdida de rigidez de la pared, facilitando así el crecimiento. También y muy íntimamente relacionado con la pérdida de rigidez de la pared celular, parece estar la disminución del peso molecular de algún polisacárido de la pared. Así, tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas

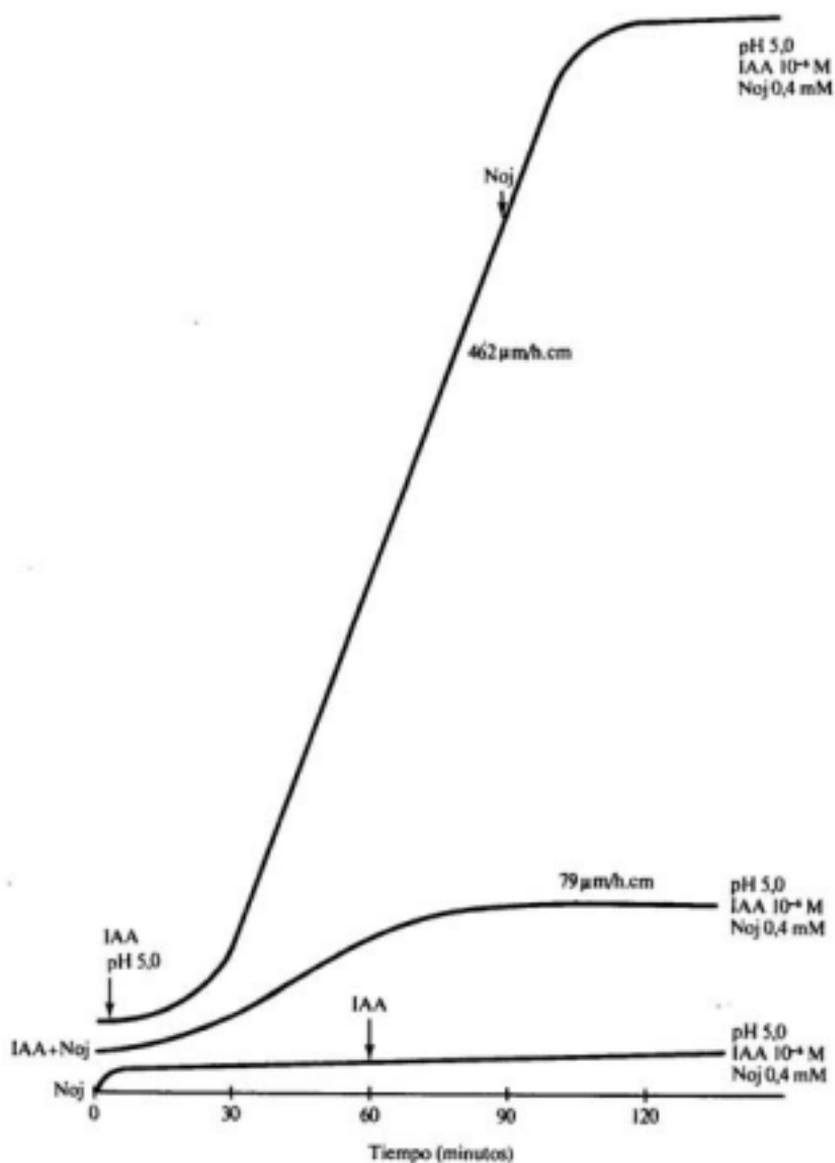


Figura 2.14.—Efecto de la nojirimicina sobre el crecimiento inducido por ácido indolacético (tomado de I. Zarra, Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, 1977).

e incluso en gimnospermas, se detecta la despolimerización de un xiloglucano que podría estar asociada a la pérdida de rigidez de la pared.

Anteriormente hemos hablado de la posible existencia de algún mensajero químico, lo que Cleland denomina factor de ablandamiento de la pared (*wall loosening factor*), entre el citoplasma y la pared celular. ¿Cuál es la naturaleza de este mensajero? Muchos investigadores piensan que este factor de ablandamiento está constituido simplemente por iones de hidrógeno. Esta creencia viene del redescubrimiento, en 1970, de un fenómeno descrito por primera vez por Bonner en 1934, y que consiste en el hecho de que la **incubación de segmentos de coleóptilos de avena en soluciones ácidas produce un crecimiento similar al inducido por las auxinas**, encontrándose que la máxima velocidad de crecimiento se obtiene al incubar el material en soluciones cuyo pH es próximo a 3,0, teniendo este efecto un tiempo de respuesta inmediato y una duración cercana a las dos horas (Fig. 2.15). Trabajos posteriores han demostrado que la epidermis de estos coleóptilos actúa como una barrera que dificulta el paso de los hidrogeniones, viéndose que cuando se elimina la epidermis, el pH óptimo de crecimiento es de 5,0, pH que puede ser perfectamente compatible con el metabolismo de la pared celular. De esta forma nació la llamada teoría del crecimiento inducido por pH ácidos y que en su estado actual podemos resumirla como sigue: las células vegetales expuestas a la acción de las auxinas excretan hidrogeniones hacia la pared celular, acidificándose el pH en esta zona. La pared celular contiene, como ya sabemos, **polisacaridasas cuyo pH óptimo oscila alrededor de 5,0 por lo que con la bajada del pH estas enzimas se activan y pueden hidrolizar una serie de enlaces en la pared**. Como resultado, la pared pierde su rigidez y puede sufrir una extensión viscoelástica provocada por el potencial de presión.

¿De qué forma las auxinas pueden inducir la excreción de hidrogeniones? Cualquier modelo que se proponga debe tener muy en cuenta los tres puntos siguientes:

1. Hay un período de latencia de unos 10 minutos desde la adición de auxinas hasta que se detecta excreción de hidrogeniones y crecimiento.
2. Es necesario que se mantenga una síntesis de proteínas continua para que la excreción pueda tener lugar. Una inhibición de la síntesis de proteínas detiene la excreción al cabo de unos 5 minutos.
3. Los lugares de unión de las auxinas se encuentran concentrados en el retículo endoplasmático, aunque pueden existir otros en la membrana celular y aparato de Golgi.

Se han propuesto varios modelos para explicar el **mecanismo por el cual las auxinas inducen la excreción de hidrogeniones** (Fig. 2.16). De todos ellos el principal candidato parece ser el situado en primer lugar, es decir, **una bomba electrogénica de protones (ATPasa) localizada en el plasmalema e inhibida por vanadato**. De hecho, el vanadato inhibe la secreción de protones inducida por auxina en epicótilos de guisante y coleóptilos de avena.

¿De qué forma el pH ácido puede provocar la pérdida de rigidez de la pared celular? En un principio se sugirió que los hidrogeniones podrían provocar una rotura no enzimática de ciertos enlaces lábiles en medio ácido entre los componentes de la pared celular; estos enlaces podrían ser del tipo siguiente:

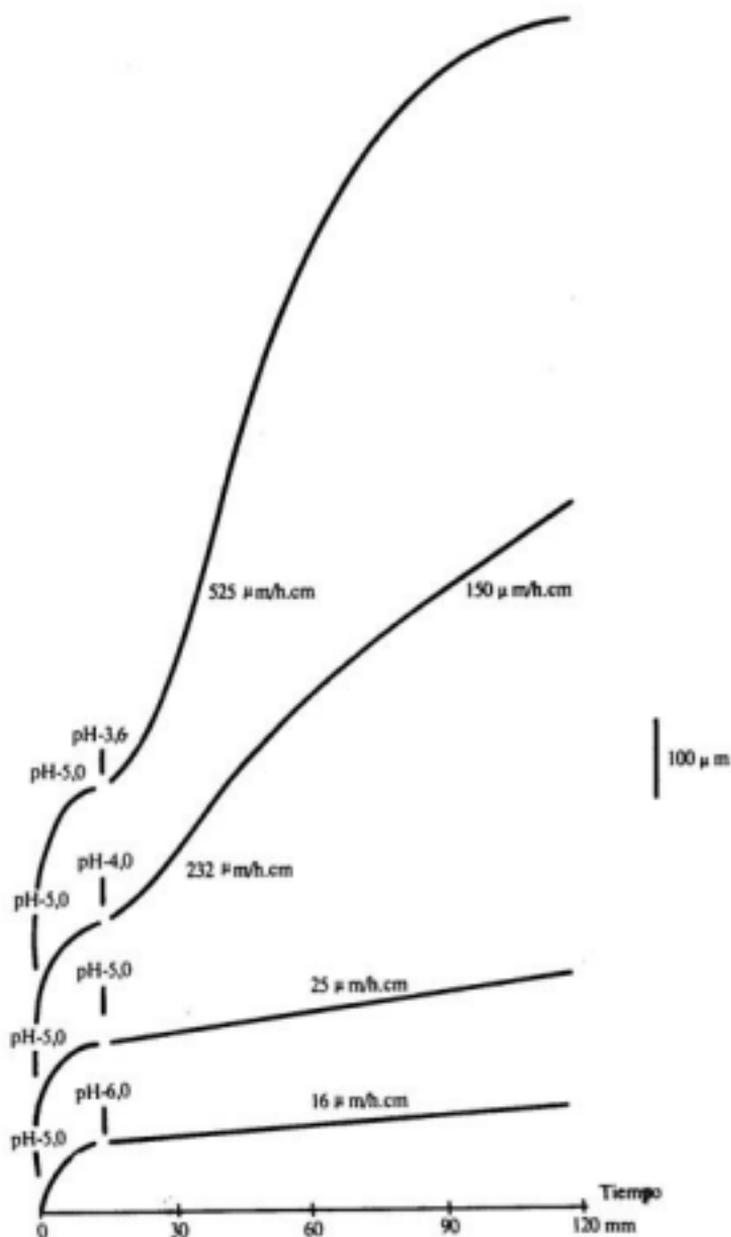


Figura 2.15.—Crecimiento inducido por pH ácido en segmentos de coleótilos de arroz (tomado de I. Zarra, Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, 1977).

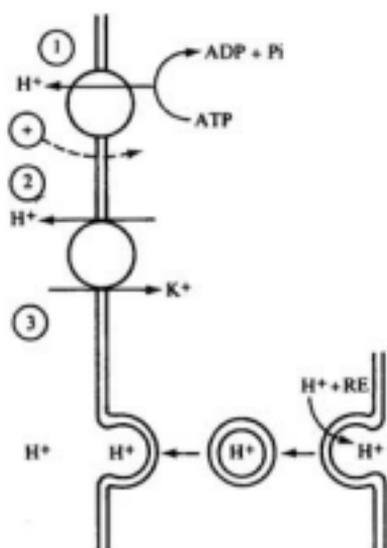


Figura 2.16.—Modelos propuestos para explicar el mecanismo por el cual las auxinas inducen la excreción de H<sup>+</sup>

- Enlace hidroxiprolina-arabinosa.
- Enlace arabinogalactano-serina.
- Puentes de hidrógeno entre el xiloglucano y la celulosa.

Sin embargo, cuando se supo que el pH óptimo del ablandamiento estaba más cerca de 5,0 que de pH 3,0 hubo que abandonar esta idea, ya que no se conoce ningún tipo de enlace en la pared celular que pueda ser roto por acción no enzimática a pH 5,0 y que sea estable a pH 7,0. En su lugar, los datos actuales sugieren, como hemos dicho antes, que los hidrogeniones activan enzimas asociadas a la pared y que pueden romper cierta clase de enlaces. La implicación de enzimas en la pérdida de rigidez de la pared puede deducirse del hecho demostrable de que paredes celulares desproteinizadas mediante tratamiento con pronasa u otros enzimas proteolíticos pierden su capacidad para responder a los pH ácidos. ¿Cuáles son los enzimas que activados por el pH ácido provocan la pérdida de rigidez, y qué tipo de enlaces son los que se rompen? Por el momento no hay respuesta a estas preguntas, aunque sí pueden hacerse algunas sugerencias. Albersheim en 1977 propone las condiciones que ha de reunir el enzima o enzimas que participen en la pérdida de rigidez:

- dicho enzima no puede únicamente romper los enlaces, ya que a pesar de la síntesis de nuevos polímeros de la pared, los polímeros existentes no pueden ser debilitados continuamente, pues la pared está constantemente bajo tensión;

- b) los enlaces que rompa dicho enzima deben de estar en el interior de las cadenas de los polímeros;
- c) debe presentar mayor actividad a pH 5,0 que a pH 7,0.

Como posibles enzimas implicados en el proceso se han propuesto las  $\beta$ -glucanasas,  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasas y transglucosilasas aunque por ahora no ha podido ser demostrado que ninguno de ellos sea el responsable. Respecto al tipo de enlace atacado, ya hemos mencionado anteriormente la liberación inducida por auxinas de glucosa no celulósica, lo que parece sugerir que sea un glucano de la matriz hemicelulósica el responsable de la pérdida de rigidez de la pared. En el guisante, una dicotiledónea, se ha demostrado que la elongación inducida por auxinas va acompañada por la liberación al medio de un xiloglucano, un efecto similar tienen los pH ácidos. La estructura de este xiloglucano coincide con la de los xiloglucanos de la pared que están enlazados covalentemente a los polímeros pécticos, pudiendo ser éste el enlace que al romperse diera lugar a la pérdida de rigidez de la pared celular. En opinión de Cleland en una revisión del tema publicada en 1978, la naturaleza del ablandamiento de la pared celular sólo quedará resuelta cuando se consiga solubilizar un enzima de la pared celular, que añadido a otras paredes desproteinizadas y en condiciones ácidas sea capaz de provocar una pérdida de rigidez en estas paredes similar a la que se obtiene *in vivo*. Hasta la fecha todos los intentos de solubilizar este enzima de la pared celular han fallado ya que se encuentra fuertemente unido a la misma.

En la figura 2.17 se representa de forma esquemática el estado actual de esta cuestión.

### 2.4.3. Potencial de presión (presión de turgencia)

La presión de turgencia, que es la fuerza responsable de la extensión de la pared celular, determina la velocidad de crecimiento, siendo ésta proporcional a la presión de turgencia en exceso de una presión crítica. La presencia de una presión crítica mínima ha sido demostrada en coleóptilos, tallos, hojas y también en algas, por lo que puede considerarse como un fenómeno general, siendo necesaria para que tengan lugar los procesos fundamentales que intervienen en la elongación de la pared: pérdida de rigidez y extensión de la misma. El hecho de que no aparezca «crecimiento almacenado» después de incubar el material vegetal en una solución de manitol, agente que actúa como regulador osmótico y que puede impedir la entrada de agua en el interior de la célula al igualar los potenciales osmóticos dentro y fuera de la célula, y que el descenso en glucosa no celulósica de la pared celular inducido por la auxina sea inhibido por concentraciones isotónicas de manitol, nos demuestran que es necesaria una presión de turgencia crítica para que tenga lugar las modificaciones bioquímicas que provocan la pérdida de rigidez de la pared celular. Estos hechos experimentales pueden explicarse de la manera siguiente:

- a) El lugar donde actúan los agentes que provocan la pérdida de rigidez sólo es accesible cuando las paredes están elásticamente extendidas por la presión de turgencia.

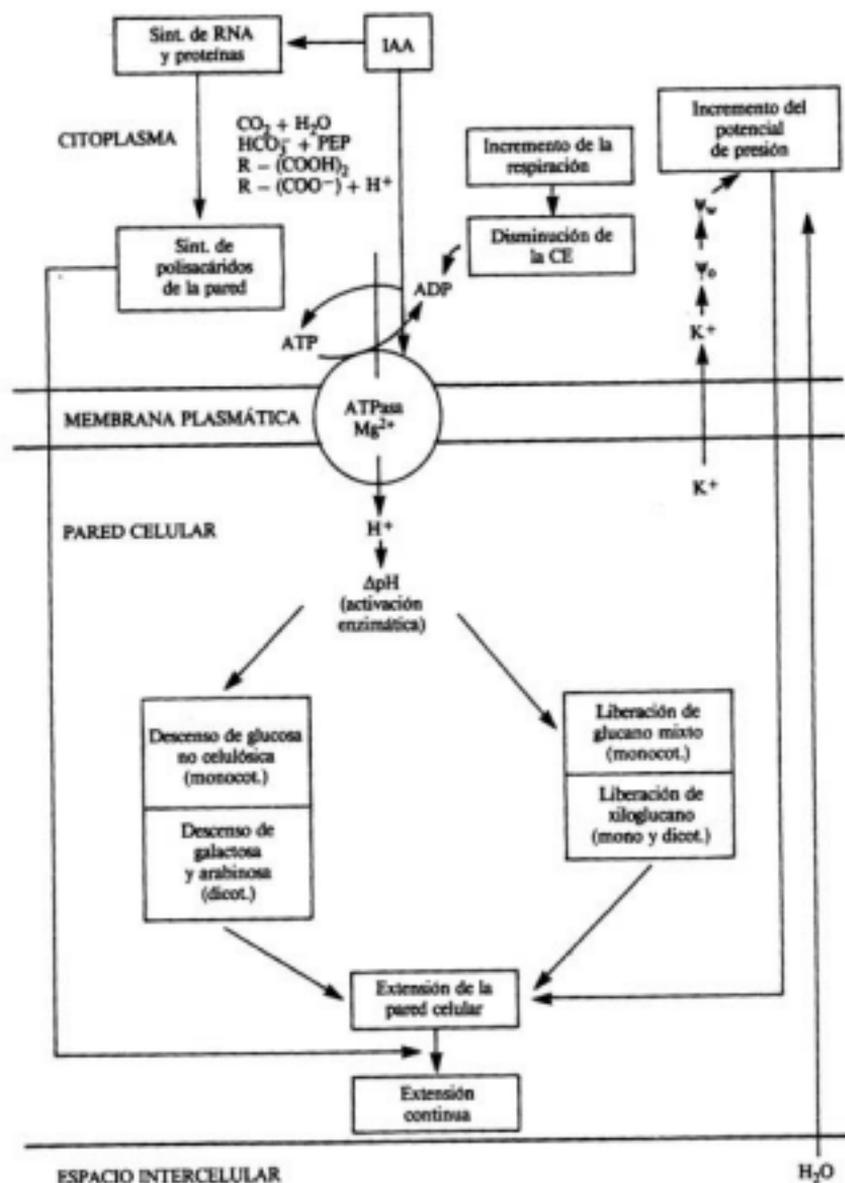


Figura 2.17.-Esquema de los procesos relacionados con la extensión de la pared celular (modificado de I. Zama, Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, 1977. E. Pérez Lourences, Tesis Doctoral, Universidad de León, 1986).

- b) Si la pared no está bajo presión, los enlaces rotos vuelven a formarse.  
 c) Es necesaria cierta presión para que puedan romperse una serie de enlaces.

En conclusión, parece claro que la presión de turgencia afecta a la extensión de la pared celular de dos formas diferentes. Primero, una presión de turgencia, superior a una presión crítica, es necesaria para que tengan lugar las modificaciones bioquímicas de la pared que provocan la pérdida de rigidez y segundo, la presión de turgencia será la fuerza conductora de la extensión afectando su velocidad.

## 2.5. Biosíntesis de los componentes de la pared celular

El proceso de la biosíntesis de los componentes de la pared celular incluye la formación de los precursores de los polímeros de la pared, la biosíntesis de estos polímeros, su ensamblaje en la pared celular y las subsecuentes alteraciones de la pared. El gran número de acontecimientos que deben estar coordinados durante la síntesis, ensamblaje y alteraciones de la pared celular implica la existencia de un sistema de control bastante complejo. Sin embargo, muy poco es lo que se sabe sobre estos procesos de control, por lo que nos limitaremos en este apartado del capítulo a estudiar la síntesis de los precursores y de los polímeros, dedicando una parte final al estudio de los lugares de síntesis de los polímeros y el posible ensamblaje de los mismos.

### 2.5.1. Síntesis de los precursores

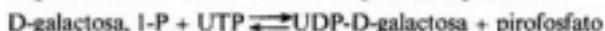
Los azúcares-nucleótidos son los donadores de carbohidratos en la formación de polisacáridos de la pared celular. El primer paso en la formación de un azúcar-nucleótido a partir de un monosacárido es la fosforilación del mismo mediante la participación del ATP, una kinasa y una mutasa,



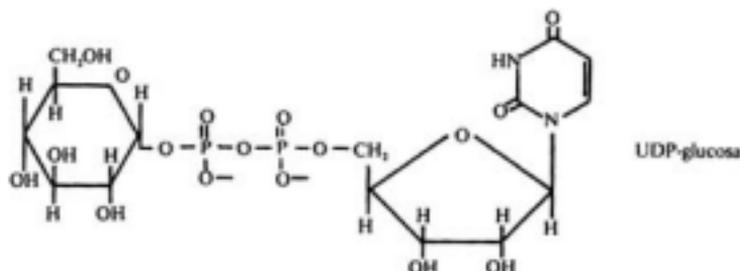
El resultado final es la obtención, en este caso, de glucosa-1-fosfato, que puede obtenerse también a partir del almidón por una reacción catalizada por una fosforilasa.



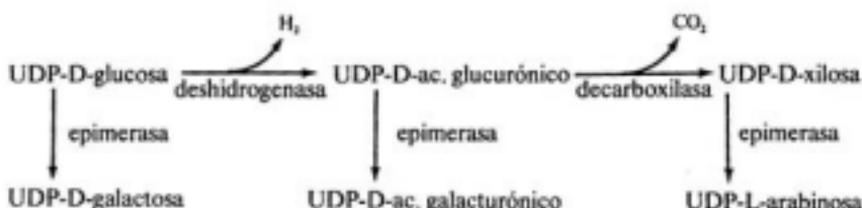
El segundo paso en la formación de los azúcares-nucleótidos está catalizado por una clase de enzimas denominados pirofosforilasas; como ejemplos citaremos las reacciones catalizadas por uridín-difosfato-D-glucosa pirofosforilasa y por la UDP-D-galactosa pirofosforilasa:



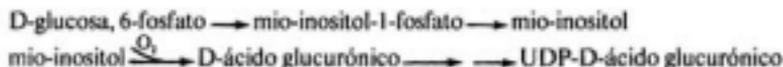
El conjunto de las kinasas, pirofosforilasas y las reacciones que forman glucosa-1-P pueden ser responsables de la síntesis de la mayoría de los azúcares-nucleótidos que actúan como donadores de carbohidratos para los polímeros de la pared:

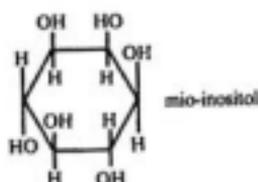


Son también posibles, y están bien documentadas experimentalmente, las interconversiones de unos azúcares-nucleótidos en otros, lo que será de gran importancia para la biosíntesis de los polímeros no celulósicos de la pared celular. Los enzimas que catalizan estas interconversiones son: deshidrogenasas, decarboxilasas y epimerasas:



El mio-inositol puede ser también un excelente precursor de los polisacáridos de la pared celular. Esta posibilidad fue sugerida por Loewus en 1965 y puede comprobarse incubando células vegetales con mio-inositol marcado; una gran proporción del marcaje aparece en las pentosas y ácidos urónicos de la pared. El mio-inositol se transforma en ácido D-glucurónico por la acción de una inositol oxigenasa que ha sido detectada en plantas superiores. Este ácido D-glucurónico puede convertirse en UDP-D-ácido glucurónico por la acción de una D-ácido glucurónico kinasa y una UDP-D-ácido glucurónico pirofosforilasa. El compuesto resultante puede convertirse en UDP-D-ácido galacturónico, UDP-D-xilosa y UDP-L-arabinosa, por los enzimas descritos anteriormente. El mio-inositol puede formarse, a su vez, a partir de glucosa-6-fosfato por la acción del enzima glucosa, 6-fosfato cicloaldolasa; el producto de esta reacción es L-mio-inositol-1-fosfato que se convierte en mio-inositol por la acción de una fosfatasa:



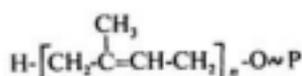


### 2.5.2. Lípidos intermediarios

Desde que Colvin, en 1959, demostró que un extracto etanólico de *Acetobacter xilinum* junto con la fracción enzimática particulada da lugar a la formación de microfibrillas de celulosa, se ha acumulado una considerable evidencia experimental apoyando la idea de la formación de lípidos intermediarios entre los azúcares-nucleótidos y la molécula aceptora. La reacción transcurriría de la forma siguiente:



Aparentemente todos los intermediarios glicolípidos son alcoholes poliprenoles mono o difosfatos:



donde el valor de  $n$  es por lo menos de 11. Los lípidos intermediarios de sistemas eucarióticos se diferencian al menos en dos aspectos de los existentes en bacterias: a) Los poliprenoles eucarióticos están compuestos generalmente de 14 a 24 unidades isoprenoideas, mientras que los bacterianos contienen entre 10 y 12 unidades. b) Los poliprenoideas eucarióticos presentan una unidad isoprenoidea saturada, mientras que en bacterias todas las unidades están no saturadas. Aparentemente, estas diferencias estructurales confieren propiedades únicas a estos transportadores lipídicos. El término dolicol se ha reservado para referirse a los lípidos intermediarios con una unidad isoprenoidea saturada. En *Phaseolus vulgaris* se ha demostrado la presencia en una fracción particulada de un enzima que cataliza la formación de un manosil-lípido a partir de GDP-D-manosa:



Algunos aspectos indicativos de la posible importancia de los glicolípidos como intermediarios en la formación de polisacáridos de la pared son:

1. Su formación es muy rápida en los experimentos *in vitro*.
2. la reacción azúcar-nucleótido + lípido  $\rightarrow$  nucleótido + glicolípido es reversible, lo que indica que el glicolípido puede ser un buen donador de azúcares.

Sin embargo, todos los intentos que se han realizado para utilizar este manosil-lípido como donador glicosílico directo en la síntesis de polisacáridos no han tenido éxito has-

ta el momento, por lo que la significación fisiológica de estos intermediarios no está claramente establecida.

### 2.5.3. Sistemas enzimáticos que catalizan la síntesis de polisacáridos de la pared

Los sistemas enzimáticos responsables de la formación de polisacáridos de la pared celular están generalmente unidos a membranas y se recogen en fracciones particuladas. Reciben varios nombres como polisacárido sintetasa (glucan sintetasa), glicosiltransferasa o sistema enzimático particulado. Catalizan la transferencia de azúcares desde los azúcares-nucleótidos o glicolípidos en el caso de que éstos actúen como intermediarios, a aceptores para formar los polisacáridos.



No se conoce el número de enzimas necesarios para transportar un único azúcar a un polisacárido, ni tampoco se conoce la naturaleza del aceptor, aunque se piensa que debe tratarse de un oligosacárido. Las polisacárido sintetetas poseen un alto grado de especificidad de sustrato; así, enzimas que utilizan UDP-D-glucosa no utilizarán GDP-D-glucosa, de igual modo enzimas que utilizan UDP-D-glucosa son incapaces de utilizar UDP-D-galactosa. También existe especificidad con respecto a los enlaces entre los azúcares (glucosa 1-4 o glucosa 1-3) y a la configuración anomérica ( $\alpha$ -glucosa,  $\beta$ -glucosa). La actividad polisacárido sintetasa se detecta midiendo la transferencia de radiactividad desde un azúcar nucleótido marcado a un polisacárido. El producto final marcado se identifica como polisacárido por su inmovilidad electroforética en tampón de tetraborato sódico o por sus propiedades de solubilidad. El producto puede ser sometido también a hidrólisis parcial, lo que resulta en la liberación de disacáridos o trisacáridos marcados. El tipo de enlace entre los azúcares se determina por una combinación de métodos químicos y cromatográficos.

### 2.5.4. Biosíntesis de celulosa

Cálculos recientes vienen a estimar que aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  toneladas de carbono están atrapadas en moléculas orgánicas en la superficie de la tierra. La más abundante de estas moléculas y que representa la tercera parte del peso seco de las plantas es la celulosa. Para una molécula de tal abundancia e importancia económica, es sorprendente el que aún no se sepa cómo se sintetiza. La mayor dificultad reside en la incapacidad para obtener un sistema *in vitro* a partir del cual se produzca celulosa identificable y en cantidad apreciable. Hasta ahora, y a pesar de las muchas falsas alarmas aparecidas en la literatura, nadie lo ha conseguido de forma concluyente e inequívoca. ¿Por qué? La respuesta en parte reside en la propia complejidad del proceso. Incluso los precursores que la planta utiliza para hacer celulosa han sido objeto de fuerte controversia, inclinándose lentamente la opinión general desde GDP-glucosa a UDP-glucosa. Al parecer, las enzimas vegetales implicadas en el proceso son capaces de transferir glucosa desde GDP o UDP a un material insoluble en álcali, teniéndose que demostrar que este material es,

o al menos incluye celulosa. El problema parece residir en que las células intactas toman el UDP-glucosa exógeno muy débilmente y que el complejo celulosa-sintetasa acepta UDP-glucosa sólo por su cara citoplasmática, por lo que de alguna forma el UDP-glucosa tendrá que encontrar su camino hacia la cara interna del plasmalema y, en general, la rotura celular conduce a la inactivación del complejo enzimático sintetizador.

Claramente la complejidad del sistema sintético es grande, habiéndose requerido para profundizar en su estudio de un sistema modelo que, como en muchos casos de la Biología celular ha sido suministrado por una bacteria *Acetobacter xylinum*, que es capaz de formar celulosa en cultivo líquido. Tomando como base este modelo, parece haberse conseguido en dos sistemas de plantas superiores, fibras de algodón y semillas de *Phaseolus aureus*, la síntesis *in vitro* de un compuesto que, por las técnicas de caracterización utilizadas (hidrólisis ácida total, enzimas específicos, metilación) parece ser celulosa. Ambos sistemas utilizan como precursor UDP-glucosa y muestran un requerimiento absoluto de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y celobiosa que, probablemente, actuará como aceptor de restos de glucosa, iniciándose así la formación de la cadena de celulosa.

#### 2.5.5. Biosíntesis de hemicelulosas

Como hemos visto anteriormente, el término hemicelulosa incluye una vasta mezcla de polisacáridos heterogéneos formados fundamentalmente por xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico. Si se revisa la literatura se pueden encontrar datos sobre la incorporación de todos estos azúcares a partir de sus respectivos nucleósidos difosfatos en polímeros clasificados como hemicelulosas. Ya vimos anteriormente en el apartado en el que estudiábamos la síntesis de los precursores las interconversiones de unos azúcares-nucleótidos en otros. Una vez formados estos precursores pueden ceder el azúcar a un aceptor, de igual forma que vimos en la síntesis de celulosa. Así, se han estudiado sistemas acelulares de vegetales superiores capaces de transferir xilosa desde UDP-D-xilosa a un xilano  $\beta$ , 1-4, o manosa desde UDP-D-mano-sa a un manano  $\beta$ , 1-4, etc. Un sistema enzimático particulado es capaz también de transferir el grupo metilo a partir de S-adenosil-L-metionina a las subunidades de ácido glucurónico que forman parte de hemicelulosas.

#### 2.5.6. Biosíntesis de pectinas

Las pectinas son polímeros formados por cadenas de ácido galacturónico y en las que los grupos carboxilos pueden estar metilados. A partir de *Phaseolus aureus* se ha obtenido un sistema particulado capaz de formar cadenas de  $\alpha$  1-4 ácido galacturónico utilizando como donador UDP-D-ácido galacturónico. Sin embargo, también otros azúcares-nucleótidos pueden actuar como donadores. Así, en un sistema obtenido a partir de tomate tiene lugar la incorporación de ácido galacturónico a partir de TDP-D-ácido galacturónico; este mismo compuesto ha sido aislado a partir de remolacha e incluso esta planta contiene un sistema enzimático capaz de convertir TDP-D-glucosa

en TDP-D-ácido galacturónico. La metilación de los grupos carboxilo tiene lugar después de que se ha formado la cadena de ácido poligalacturónico, como parece deducirse por el hecho demostrado experimentalmente de que extractos enzimáticos particulados de *Phaseolus aureus* son capaces, como hemos visto anteriormente, de ceder ácido galacturónico a partir de UDP-D-ácido galacturónico a un aceptor, pero son incapaces de hacerlo cuando el donador, es decir, UDP-ácido galacturónico se encuentra con su grupo carboxilo metilado. El donador de los grupos metilo parece ser el compuesto S-adenosil-L-metionina.

### 2.5.7. Biosíntesis de la proteína estructural

La proteína estructural de las paredes celulares vegetales llamada «extensina» por Lamport, es una glicoproteína caracterizada principalmente por la gran cantidad que posee del aminoácido hidroxiprolina. Este aminoácido sirve como punto para la unión glicosídica con carbohidratos de la pared. Poco se sabe sobre la síntesis de esta proteína; su ensamblaje tendrá lugar en los ribosomas por el mecanismo normal de la síntesis proteica. La hidroxilación de la prolina está catalizada por enzimas citoplasmáticos. Resultados recientes parecen indicar que el aparato de Golgi interviene en la glicosilación y posterior transporte de la glicoproteína a la pared celular. La glicosilación tiene lugar por un sistema enzimático particulado que transfiere la L-arabinosa a partir de UDP-L-arabinosa a la proteína para formar la glicoproteína, que como ya sabemos está formada por la proteína rica en hidroxiprolina y un tetrasacárido de arabinosa.

### 2.5.8. Biosíntesis de lignina

Como la mayoría de los componentes vegetales, la lignina se forma a partir de carbohidratos formados en el proceso fotosintético. El primer paso parece ser la formación de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina, que pueden convertirse en diversos derivados del ácido cinámico; éstos, por reducción, dan lugar a los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico (Fig. 2.6a) a partir de los cuales se formará la lignina por una reacción de deshidropolimerización. La primera parte de la ruta biosintética, es decir, la formación de los alcoholes precursores de la lignina se conoce perfectamente, ya que tiene lugar a través de la ruta del ácido siquímico, deducida a partir de estudios realizados con mutantes auxótrofos de *Escherichia coli* y *Aerobacter aerogenes*. La segunda fase de la ruta, la conversión de los precursores en lignina, es mucho menos conocida y parece implicar deshidrogenaciones enzimáticas de los alcoholes, dando lugar a una serie de compuestos que pueden polimerizarse de muchas formas posibles, por lo que la lignina no es un compuesto único y homogéneo, sino un grupo de sustancias con ciertas propiedades comunes. En la figura 2.18a se representa la ruta biosintética de la lignina, y en la figura 2.18b la posible fórmula de la lignina.

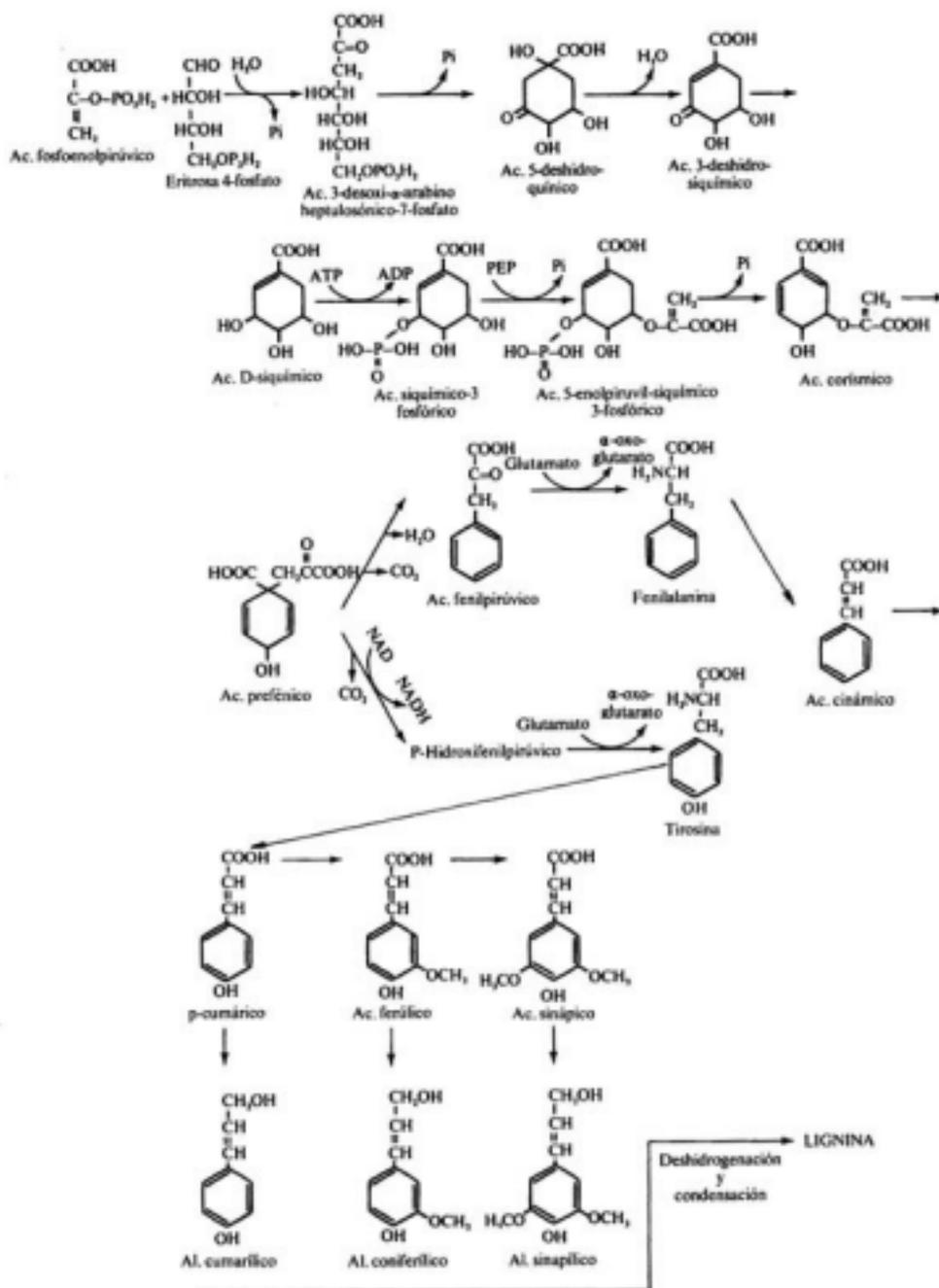


Figura 2.18a. - Ruta biosintética de la lignina.

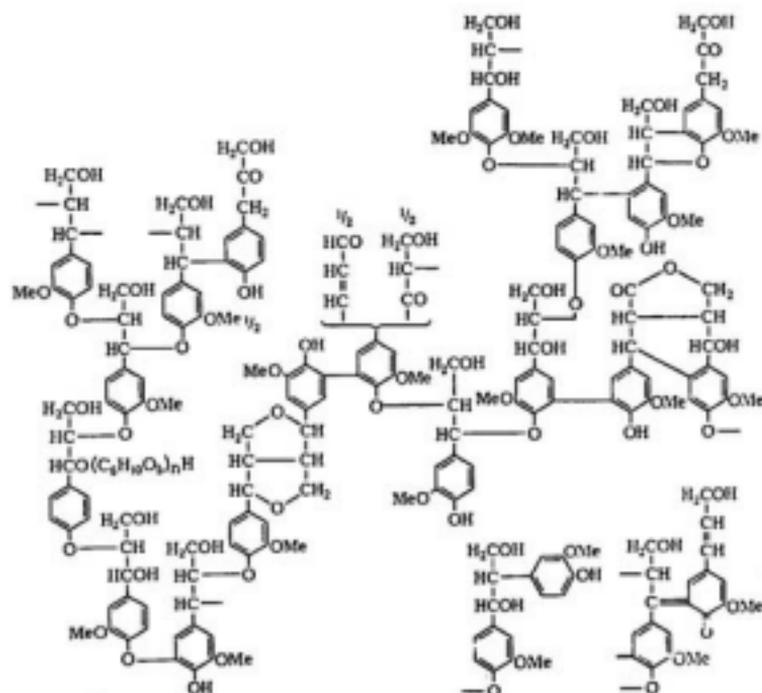


Figura 2.18b.—Posible fórmula de la lignina.

### 2.5.9. Localización de los lugares de síntesis y control de la misma

Las enzimas que generan los azúcares solubles, azúcar-nucleótidos y azúcar-fosfatos, parecen encontrarse localizadas en el citoplasma, ya que han sido detectadas en fracciones solubles en una gran cantidad de tejidos vegetales (Fig. 2.19). Por lo que respecta a las sintetetas, parece fuera de toda duda que, con la excepción de la celulosa, cuya síntesis ocurre exclusivamente en la membrana plasmática, los demás polisacáridos se forman dentro del lumen del sistema endomembranoso, sobre todo del aparato de Golgi (Fig. 2.19). Mediante experimentos de «pulso y caza» y microscopía electrónica se ha podido comprobar que los lugares de síntesis y rutas seguidas hacia el exterior por los polisacáridos son las siguientes:

- Dictiosomas del aparato de Golgi que liberan vesículas que se dirigen hacia la membrana plasmática.
- Reticulo endoplasmático y formación similar de vesículas.
- Membrana plasmática.

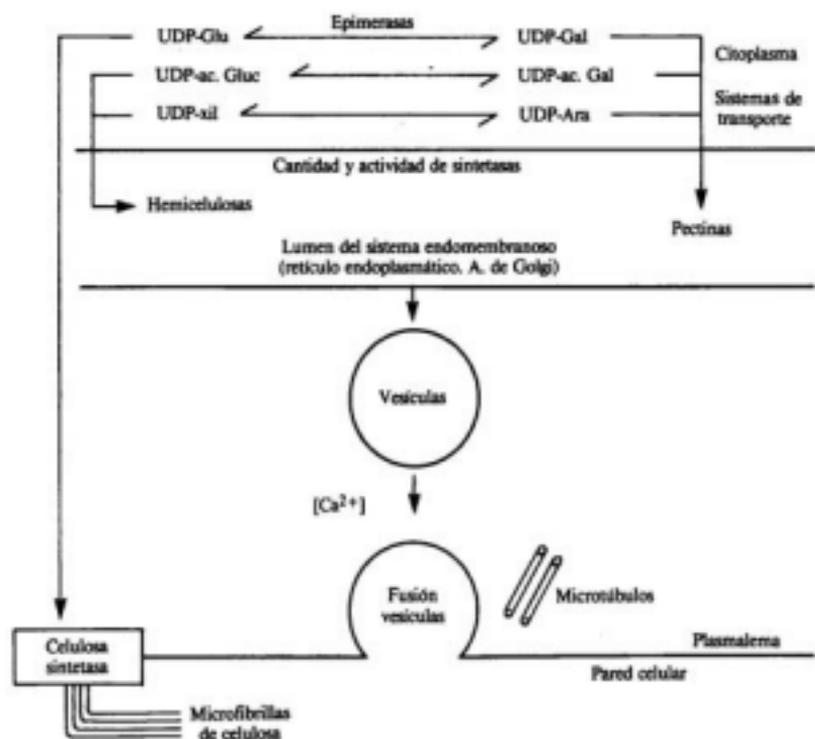


Figura 2.19.—Localización de los lugares de síntesis y puntos de control (modificado de D. H. Northcote, *Control of Cell Wall Assembly During Differentiation*, en: W. M. Dugger, S. Barnicki-Garcia (eds.), *Structure, Function and Biosynthesis of Plant Cell Walls*, Society of Plant Physiologists, 1984).

Una vez fusionadas las vesículas con la membrana plasmática se producirá la salida al exterior por un proceso de pinocitosis.

Por lo que se refiere al control del proceso, la formación de la pared celular depende en gran manera de los procesos de secreción de macromoléculas desde el interior al exterior de la célula. La síntesis de estas macromoléculas puede estar controlada, bien por la cantidad y actividad de la sintetasa correspondiente, o bien por el transporte de los precursores hacia el sistema endomembranoso; a su vez, la formación de precursores está regulada por una inhibición por producto final. Las sintetetas de hemicelulosas y pectinas se encuentran fundamentalmente en el aparato de Golgi, aunque es posible que las primeras glicosilaciones tengan lugar en el retículo endoplasmático. Un punto importante de control es el del paso de los azúcar-nucleótidos a través de las membranas, proceso que debe implicar la presencia de transportadores específicos, ya que aunque las sintetetas se encuentran dentro del lumen del sistema endomembranoso, no son funcio-

nales hasta que no se ponen en contacto con sus sustratos específicos. La incorporación de estos polisacáridos a la pared celular, depende de su transporte empaquetados en vesículas y de la fusión de estas vesículas con el plasmalema. La gran mayoría de estas vesículas, que proceden del aparato de Golgi, son dirigidas bajo condiciones controladas, probablemente por los microtúbulos, hacia el plasmalema, con el que se fusionan en un proceso dependiente de calcio. La tasa de fusión de vesículas puede ser otro factor regulador de la formación de pared celular, ya que el número de vesículas aptas para la fusión excede al número de las que realmente se fusionan y depositan nuevo material en la pared celular. De esta forma, la composición y cantidad de material de pared depositado puede responder muy rápidamente a un estímulo en la superficie celular que permita que la tasa de fusión de vesículas varíe, ajustándose a las nuevas necesidades celulares.

Como se ha indicado anteriormente, la síntesis de celulosa es muy difícil de obtener *in vitro*, siendo casi inevitable la obtención en su lugar de  $\beta$  1.3 glucanos. Las condiciones en la célula intacta para que se dé la síntesis de celulosa parecen ser las siguientes: potencial de membrana, lo que supone una membrana intacta; disponibilidad de UDP-glucosa en la cara interna del plasmalema; alta concentración intracelular de  $Mg^{2+}$  y baja de  $Ca^{2+}$ , siendo, por el contrario, necesaria una concentración elevada de este catión en el exterior para estabilizar la cara externa del plasmalema. Cualquier alteración de estas condiciones conduce a la síntesis de callosa ( $\beta$  1.3 glucano). Por último, la orientación de las microfibrillas de celulosa parece estar dirigida por los microtúbulos.

Los precursores de la lignina se forman en asociación con membranas del retículo endoplasmático, de donde emigran hacia la pared empaquetadas en vesículas. La síntesis de estos precursores puede estar regulada por los niveles de algunos enzimas como fenilalanina amonio liasa (PAL). La polimerización ocurre en la pared celular por reacción de radicales libres formados por una peroxidasa y/o una ascorbato oxidasa que pueden ser reguladoras del proceso.

#### 2.5.10. Engrosamiento de la pared celular primaria

El aumento en grosor de una célula vegetal tiene lugar por la deposición capa a capa, de materiales de la pared celular. Esto se conoce como crecimiento por aposición. Sin embargo, también puede haber un crecimiento por intususcepción, es decir, mediante inserción de nuevas partículas entre las ya preexistentes. Existen varias teorías para explicar cómo tiene lugar la deposición de las microfibrillas de celulosa, siendo las más conocidas:

1. Crecimiento en mosaico.
2. Crecimiento protoplásmico polar o bipolar.
3. Síntesis de islotes.
4. Crecimiento en red múltiple *multinet growth*.

De todas ellas la de mayor aplicación universal es la última, crecimiento en red múltiple.

tiplé, propuesta por Roelofsen y Houwink en 1953. Esta teoría está basada en observaciones realizadas en el crecimiento de pelos de *Gossypium celiba*, *Asclepias* y *Tradescantia*. En todos ellos la pared primaria presenta en el exterior una trama de microfibrillas con una orientación más o menos axial, mientras que en el interior presentan una orientación predominantemente transversal (Fig. 2.20). Se supone que el material sintetizado de nuevo es depositado contra el interior de la pared, quedando las microfibrillas orientadas más o menos transversalmente. Según continúa el crecimiento celular estas microfibrillas van siendo reorientadas en una dirección más o menos longitudinal, al mismo tiempo que nuevas microfibrillas van siendo depositadas por debajo en sentido transversal. De esta forma las microfibrillas más viejas y orientadas longitudinalmente quedarán en el exterior, y las más jóvenes orientadas transversalmente en el interior, pudiéndose comparar la construcción de esta pared a una red de pescador de varias capas. De ahí el nombre de crecimiento en red múltiple. Esta teoría, aunque es aplicable a muchas células, no explica toda la gran diversidad de estructuras de paredes primarias.

Como final de este apartado podemos decir que la deposición de nuevos materiales

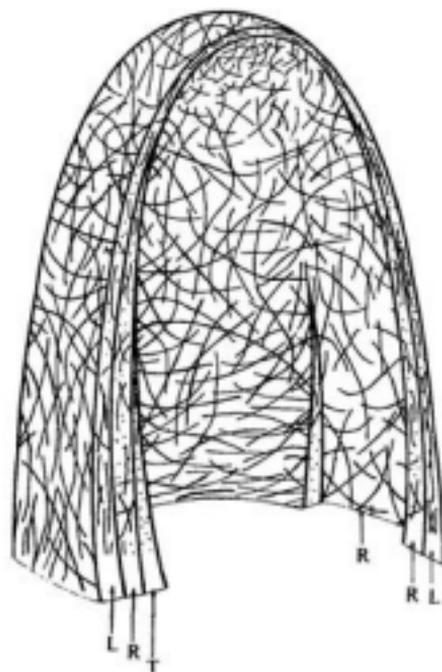


Figura 2.20.—Deposición de microfibrillas de celulosa en un pelo de algodón (*Gossypium*). En la punta, la deposición es al azar, por debajo, en la capa más interna es predominantemente transversal (T). En la capa externa las microfibrillas adoptan una disposición axial (tomado de F.A.L. Clowes y B.E. Juniper, *Plant Cells*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1968).

de la pared celular durante la extensión de la misma debe ser constante ya que a pesar del aumento en área celular no se observa disminución en el grosor de la pared.

## 2.6. Pared celular secundaria

Así como la pared primaria rodea al protoplasto durante el alargamiento celular, la pared secundaria es la estructura que rodea a la célula madura dándole su forma característica. La formación de la pared celular secundaria se caracteriza por una síntesis masiva de celulosa, mientras que la incorporación de arabinogalactanos y ramnogalacturonanos parece cesar. También parece ser cierto que en la transición de célula capaz de crecer, es decir, con pared primaria a célula imposibilitada de crecer, al formar pared secundaria, hay un aumento de proteína en la pared, ya que el contenido en hidroxiprolina de la pared aumenta. Aunque los mecanismos bioquímicos de la biosíntesis de celulosa parecen ser idénticos en los dos tipos de pared, no ocurre lo mismo con la longitud de las cadenas de celulosa ni con la forma de deposición. Mientras que en la pared primaria el grado medio de polimerización de las cadenas de celulosa es de 2.500, en las paredes secundarias éste aumenta hasta 14.000. Acabamos de ver en el apartado anterior cómo en la pared primaria las microfibrillas son depositadas al azar o con una orientación transversal. En la pared secundaria son depositadas con una orientación específica que puede permanecer más o menos fija, pareciendo que también están implicados los microtúbulos en la determinación de esta orientación.

### 2.6.1. Orientación de las microfibrillas

En las paredes primarias se dice que presentan una ultraestructura dispersa, es decir, que las microfibrillas no presentan una orientación preferida y no están fuertemente empaquetadas. En las paredes secundarias, debido a la enorme cantidad de celulosa depositada, sólo es posible un fuerte empaquetamiento paralelo de las fibrillas. Tal empaquetamiento paralelo puede presentar tres formas de orientación con respecto al eje celular: fibroso, helicoidal y anular.

La primera forma, que es la menos común, se refiere a la situación en la que las fibrillas están orientadas paralelas al eje celular principal; así se encuentran en varias fibras vegetales de importancia comercial como cáñamo y lino. En las traqueidas de coníferas la pared secundaria aparece dividida en tres capas,  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  (Fig. 2.21) orientadas helicoidalmente con respecto al eje celular. En fibras de angiospermas puede aparecer la misma estructura, aunque a veces aparece una capa gelatinosa en lugar de la capa  $S_3$ . En los vasos y traqueidas de las angiospermas predomina una estructura anular, es decir, que las fibrillas forman ángulos rectos con el eje longitudinal celular. En algunos tipos de células esclerenquimatosas o en los laticíferos de *Euphorbia splendens*, la pared celular secundaria presenta varias capas (Fig. 2.22). En ellas las fibrillas presentan disposición helicoidal pero con direcciones opuestas de una capa a la siguiente. Tal tipo de células no sólo son capaces de crecer longitudinalmente durante el crecimiento secundario, sino también en anchura.

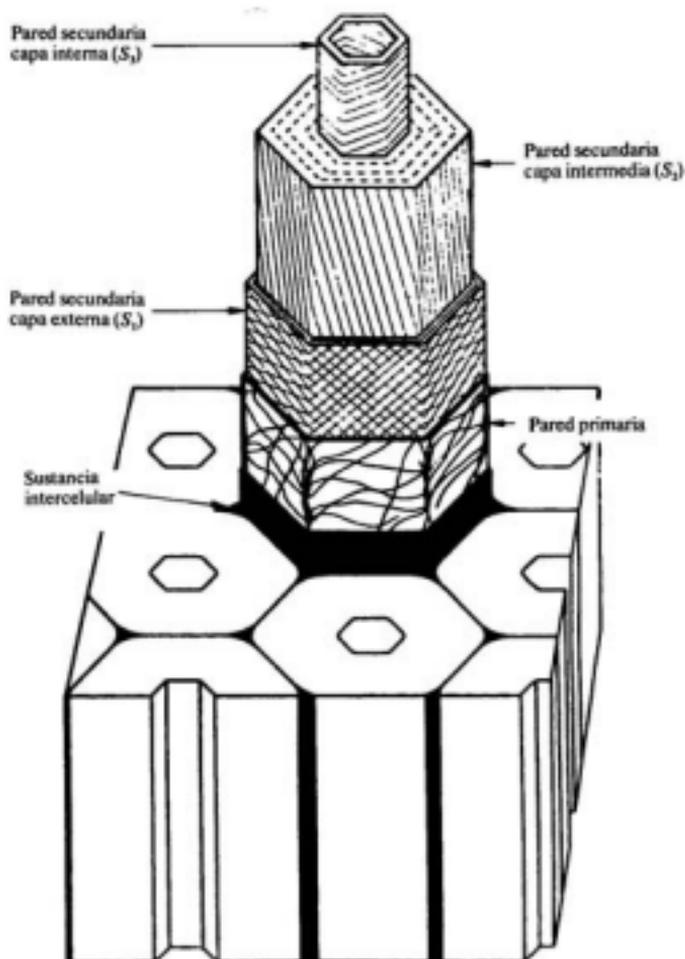


Figura 2.21.—Estructura de la pared secundaria mostrando orientación helicoidal de las fibrillas de celulosa (tomado de M. A. Hall, *Plant, Structure, Function and Adaptation*, MacMillan, Londres, 1976).

### 2.6.2. Comunicaciones intercelulares en la pared secundaria

Como ya vimos al hablar de la formación de la pared celular, los protoplastos adyacentes se mantienen en contacto mediante los plasmodesmos que atraviesan la pared celular primaria, constituyendo las punteaduras primarias. Cuando se forma la pared secundaria, éstas deberían quedar ocluidas; sin embargo, no ocurre siempre así, sino

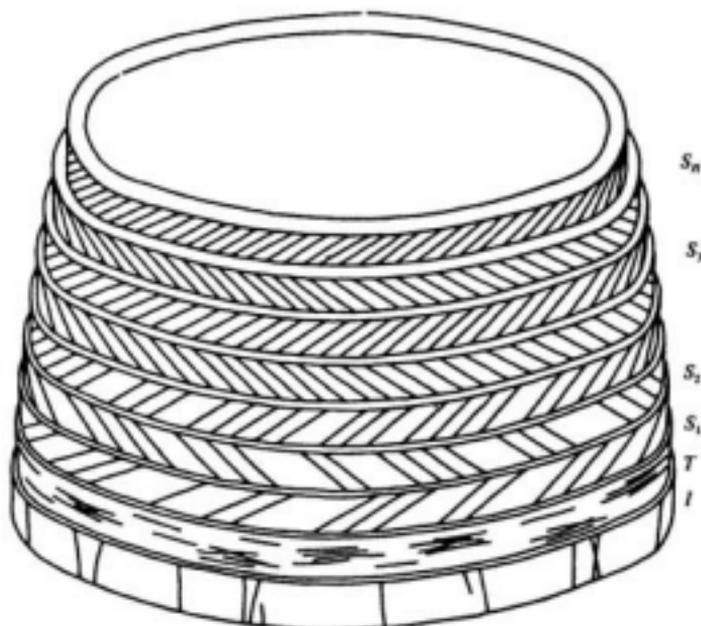


Figura 2.22.—Estructura de la pared celular secundaria de laticíferos de *Euphorbia splendens* mostrando varias capas. *l*: pared primaria. *T*: capa de transición.  $S_1$ - $S_n$ : capas de la pared secundaria (tomado de M. A. Hall, *Plant, Structure, Function and Adaptation*, MacMillan, Londres, 1976).

que zonas de la pared celular permanecen delgadas y se denominan punteaduras secundarias. Se originan en partes de la pared celular donde los plasmodesmos son muy numerosos. Las capas de la pared secundaria se depositan alrededor de la zona, pero no encima de ella. Generalmente cada punteadura tiene otra complementaria en la pared de la célula vecina y a la misma altura. Tales punteaduras forman una unidad morfológica y funcional denominada punteadura bilateral (Fig. 2.23 a). La cavidad formada por la interrupción de la pared secundaria se denomina cavidad de la punteadura. La membrana que separa las cavidades de una punteadura bilateral, y que está formada por las dos paredes primarias y la lámina media, se denomina membrana de la punteadura; esta membrana está penetrada por numerosos plasmodesmos. En las traqueidas de ciertas plantas suele aparecer un tipo especial de punteadura, las llamadas punteaduras areoladas. Éstas se caracterizan porque la pared secundaria se desarrolla sobre la cavidad de la punteadura formando un techo arqueado con un poro estrecho en el centro. En algunas de estas punteaduras la membrana aparece engrosada en su parte central recibiendo este engrosamiento el nombre de toro, y está formado por microfibrillas de celulosa colocadas de forma circular con una zona marginal más delgada con microfibrillas radiales. La membrana de la punteadura suele ser flexible, y bajo ciertas condiciones el toro puede ser desplazado contra una de las aberturas. Cuando el toro está en el centro

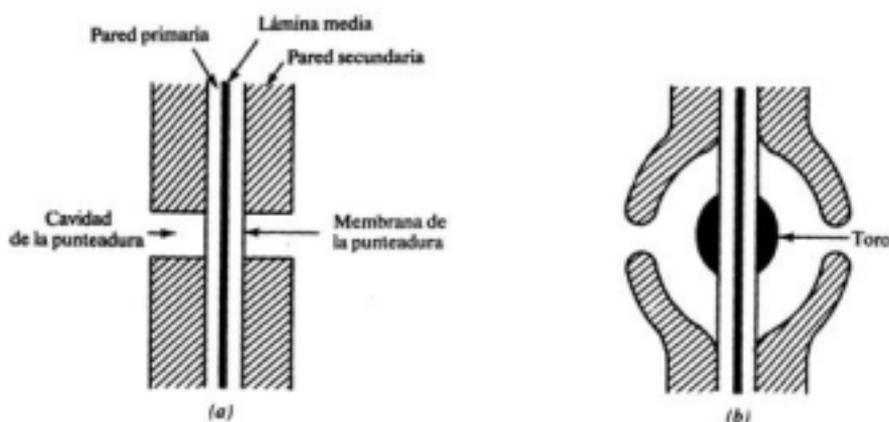


Figura 2.23.—a) Estructura de una punteadura bilateral. b) Estructura de una punteadura areolada.

de la punteadura el agua puede pasar con facilidad de una traqueida a la vecina; cuando el toro se encuentra apoyado contra una de las aberturas el paso del agua es muy débil. La mayoría de los toros del leño tardío, y en general todos los del duramen del tronco suelen tener esta última posición, habiéndose perdido la flexibilidad de la membrana. La presencia del toro es un rasgo muy característico de las punteaduras areoladas de las Gnetales y las coníferas; sin embargo, son muy escasos en las angiospermas.

### 2.6.3. Modificaciones de la pared secundaria

Algunas de las modificaciones más importantes que sufren las paredes celulares secundarias son las siguientes:

#### *Lignificación*

La estructura de muchas paredes celulares secundarias queda impregnada de lignina. Las células que sufren la lignificación lo hacen a partir de la lámina media hacia el interior, lo que ha hecho sugerir a algunos investigadores que los precursores para la síntesis de la lignina son suministrados por las células adyacentes. La determinación exacta del punto por donde comienza la lignificación puede venir determinada por la unión de un único alcohol aromático unido a los polisacáridos matriciales de la pared celular y que actuará como aceptor iniciador del proceso de la polimerización. Al contrario que la celulosa, la lignina no presenta una estructura ordenada, sino que, como las sustancias matriciales, es amorfa. Según va siendo depositada la lignina, reemplaza al agua en la pared. La pequeña cantidad de agua que queda después de la lignificación puede ser desplazada por la deposición de algunos minerales como carbonato cálcico o sílice, pudiendo también ser depositados taninos.

*Suberificación y cutinización*

La suberina se deposita en capas en el lado interior de la pared celular primaria de las células de corcho después de que han alcanzado su tamaño adulto. La cutina se deposita junto con ceras en las células epidérmicas de muchas plantas superiores. Precursores semilíquidos de la cutina, conocidos como procutinas, se segregan a través de la pared celular de las células epidérmicas. Cuando la célula ha alcanzado su tamaño adulto estos precursores se polimerizan en presencia de oxígeno formando una capa protectora hidrofóbica.

**BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

- ALBERSHEIM, P.: *The Primary Cell Wall*, en: J. Bonner y J. E. Varner (eds.), *Plant Biochemistry*, 2.ª ed., Academic Press, Nueva York, 1976.
- CLELAND, R.: *Cell Wall Extension*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 22, 1971, págs. 197-222.
- CLELAND, R., y RAYLE, D. L.: *Auxin, H<sup>+</sup> Excretion and Cell Elongation*, «Bot. Mag. Tokio, Special Issues», vol. 1, 1978, págs. 125-139.
- DUGGER, W. M., y BARTNICKI-GARCÍA, S. (eds.): *Structure, Function and Biosynthesis of Plant Cell Walls*, American Society of Plant Physiologists, 1984.
- HALL, M. A.: *The Cell Wall*, en: M. A. Hall (ed.), *Plant Structure, Function and Adaptation*, The MacMillan Press Ltd., Londres, 1976.
- KARR, A. L.: *Cell Wall Biogenesis*, en: J. Bonner y J. E. Varner (eds.), *Plant Biochemistry*, 2.ª edición, Academic Press, Nueva York, 1976.
- LABAVITCH, J. M.: *Cell wall turnover in plant development*, «Ann. Rev. of Plant Physiol.», volumen 32, 1981, págs. 385-406.
- MASUDA, Y.: *Auxin-induced Cell Wall Loosening*, «Bot. Mag. Tokio, Special Issues», vol. 1, 1978, páginas 103-123.
- MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P.: *Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants*, Ann. Rev. Biochem., 53:625-63, 1984.
- ROBINSON, D. G.: *Plant Cell Wall Synthesis*, «Advan. Bot. Res.», vol. 5, 1977, págs. 89-151.
- TANNER, B. W., y LOEWUS, F. A. (eds.): *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 13B, Plant Carbohydrates II, Springer-Verlag, 1981.





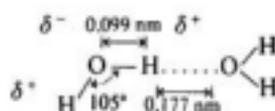
## **Relaciones hídricas y nutrición**



## RELACIONES HÍDRICAS EN LA CÉLULA

El agua es el componente químico más abundante en las plantas. Normalmente en los tejidos activos alcanza valores entre el 80 y el 95 por 100 en peso, por lo que no es de extrañar que sea uno de los factores ecológicos que mayormente condicionan el crecimiento y desarrollo de las plantas, precisamente por la abundancia, diversidad e importancia fisiológica de las funciones en que participa. Por el contrario, en tejidos en estado de reposo o de dormición, sólo alcanza del 15 al 20 por 100 del peso.

A pesar de su abundancia en la naturaleza, el agua posee unas propiedades diferenciales no muy comunes a otros hidruros de no metales (por ejemplo,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ) con los que químicamente puede ser comparada ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Así no es un gas, sino un líquido en el margen de temperaturas de  $0\text{-}100^\circ\text{C}$  y posee una elevada constante dieléctrica que explica su facilidad para disolver los electrolitos debido a su capacidad para neutralizar la atracción entre cargas eléctricas. Por su pequeño tamaño y por su naturaleza de dipolo, actúa como disolvente ideal para un amplio espectro de sustancias, sobre todo de iones y sustancias polares. Esta propiedad se debe a la repartición parcial de las cargas de su estructura covalente. En el  $\text{H}_2\text{O}$  el oxígeno se une covalentemente a los átomos de hidrógeno con distancias de  $0,099\text{ nm}$  y un ángulo de enlace de  $105^\circ$ .



La polaridad de cada molécula, debida a la carga parcial negativa del oxígeno y a la positiva de los átomos de hidrógeno, posibilita las uniones de las moléculas de agua entre sí o con otras sustancias polares, por puentes de hidrógeno. Esta disposición estructural explica la facilidad de *hidratación* de los iones y macromoléculas polivalentes, así como las propiedades de *cohesión*, *adhesión* y *tensión superficial* que luego veremos juegan un papel decisivo en los mecanismos de transporte del agua por el xilema. Otras propiedades fisico-químicas del agua de interés biológico son los elevados valores del *calor específico* y del *calor de vaporización* que facilitan la regulación térmica de la planta.

Entre las funciones más importantes del agua en la planta pueden citarse:

- Constituyente del citoplasma* que, junto con las macromoléculas coloidales (proteínas), determina su estructura y grado de agregación.

- b) *Disolvente* de gases, iones y solutos que, por la permeabilidad de las membranas celulares al agua, establece un sistema continuo en toda la planta.
- c) En muchas reacciones el agua participa directamente como *metabolito*: procesos de óxido-reducción de la fotosíntesis y de la respiración celular, ATPasas, hidrolasas, etc.
- d) Mantenimiento de la *turgencia* celular.

### 3.1. Evolución de la terminología del agua en las plantas

Si se atribuye la paternidad del nacimiento de la Fisiología Vegetal al científico inglés Stephen Hales, quien en 1727 en su obra *Vegetable Staticks* publicó una serie sistematizada de experimentos con plantas para tratar de conocer sus funciones, sobresale en seguida la atención que desde el principio los fisiólogos vegetales han prestado al estudio del agua.

Una segunda aproximación a las relaciones hídricas de las células vegetales corresponde al establecimiento del concepto y leyes de la ósmosis y de su comprobación en las células vegetales a lo largo del siglo XIX. En 1851 Nügeli descubrió la plasmolisis, en 1867 Traube investigaba los problemas de la permeabilidad en membranas artificiales, y Pfeffer, en 1877, comprobaba y medía la presión osmótica de distintas soluciones. Se suele atribuir a Nollet (1748) el descubrimiento de la ósmosis de la que Dutrochet (1872) fue un destacado impulsor de su estudio.

Los experimentos de Pfeffer permitieron que Van't Hoff formulara la teoría cinética de las soluciones diluidas y aplicara la ecuación de los gases  $PV = nRT$  para el cálculo de la presión osmótica.

Ya en nuestro siglo Otto Renner en Alemania y Bernard S. Meyer en USA han desarrollado una terminología inicial de la ósmosis en las plantas. En los años treinta, Renner introdujo el término de *fuerza de succión* (*Saugkraft*) y Meyer el de *déficit de presión de difusión* que más tarde analizaremos.

Esta terminología se mantuvo hasta recientemente, ya que ha sido a partir de los años sesenta cuando se han levantado críticas y objeciones a esta nomenclatura científica. El punto más débil radica en que se trata de una terminología exclusiva de los fisiólogos vegetales, a menudo ambigua, y no válida en otros campos, como en la edafología o incluso no generalizable en la expresión de los físicos. Para obviar este escollo, diversos especialistas de este área (Kramer, Slatyer, Weatherley, Taylor, Spanner, etc.) se han esforzado en expresar las relaciones hídricas de las plantas en un contexto más general en el que la ósmosis es uno de los varios componentes que determinan el *estado termodinámico* del agua, expresado así por su potencial químico (potencial hídrico). En los próximos apartados analizaremos con más detalle estos conceptos y terminología básica para el agua.

### 3.2. Potencial hídrico

En el sistema hidrodinámico suelo-planta-atmósfera, la planta representa un sistema intermedio situado entre una diferencia del potencial del agua del suelo y el de la

atmósfera. Con el deseo de lograr una terminología válida general que al mismo tiempo correspondiera al parámetro más adecuado para especificar el estado del agua en cualquier sistema, como ya hemos dicho, desde los años sesenta se han unificado en Fisiología Vegetal los conceptos termodinámicos del agua, expresando así su estado por la energía libre (de Gibbs) molar, o potencial químico del agua,  $\mu_w$ . Recordemos que la energía libre  $G$ , de un sistema de acuerdo con las leyes de la termodinámica, nos da la capacidad del sistema para realizar trabajo útil, y que si en la transición de un estado a otro decrece la energía libre ( $\Delta G$  negativo) ocurre un proceso espontáneo capaz de realizar un trabajo útil. Si, por el contrario, durante la transición aumenta la energía libre ( $\Delta G$  positivo) se requiere del aporte de trabajo desde el medio. En una transición sin cambio de energía libre ( $\Delta G = 0$ ) el sistema se hallará en equilibrio.

En un sistema biológico cada componente (agua, iones, solutos no electrolitos, macromoléculas, etc.) contribuye parcialmente a la energía libre del sistema y se define como *potencial químico*  $\mu_i$  del componente  $i$ , a la contribución de ese componente a la energía libre del sistema que se expresa por:

$$\mu_i = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T, P, n_{j \neq i}} \quad (3.1)$$

es decir, el potencial químico es igual a la derivada parcial de la energía libre del sistema respecto al número de moles,  $n_i$ , del componente  $i$  considerado, cuando permanecen fijos los valores de las otras posibles variables del sistema: temperatura ( $T$ ), presión ( $P$ ) y número de moles de cada uno de los otros componentes del sistema diferentes del  $i$  ( $n_{j \neq i}$ ).

El agua, como cualquier otro componente del sistema, tiene un potencial químico,  $\mu_{H_2O}$ , que se deduce de (3.1).

La diferencia de potencial químico de un componente (por ejemplo, el  $H_2O$ ) entre dos fases, determina la dirección hacia la que se difunde espontáneamente ese componente. En efecto, un componente individual  $i$ , pasará espontáneamente desde la fase  $A$  a la fase  $B$ , si el proceso determina una disminución de energía libre ( $\Delta G$  negativo). Es decir, de acuerdo con (3.1), si el potencial químico de ese componente es mayor en  $A$  que en  $B$ .

Son muchos los factores que pueden afectar el valor del potencial químico de un componente  $i$ . Una fórmula bastante general para éste es:

$$\mu_i = \mu_i^* + RT \ln a_i + \bar{V}_i P + z_i FE + m_i gh \quad (3.2)$$

donde

$\mu_i^*$ : Valor del potencial químico del componente  $i$  en estado puro y en unas condiciones fijadas de referencia de presión y temperatura.

$R$ : Constante de los gases (8,3143 J/mol K).

$T$ : Temperatura absoluta.

$a_i$ : Actividad del componente  $i$ .

$\bar{V}_i$ : Volumen molar parcial del componente  $i$  ( $\bar{V}_i = \frac{\partial V}{\partial n_i}$ , es decir,  $\bar{V}_i$  es una medida de cómo varía el volumen del sistema,  $V$ , cuando cambia el número de moles,  $n_i$ , del componente  $i$  considerado).

$P$ : Presión del sistema (se toma como valor 0 de referencia, al valor de la presión atmosférica normal, 760 mm de mercurio).

$z_i$ : Valor de la carga (si la tiene el componente  $i$ ); según ésta, puede ser positivo, negativo o nulo (caso de ser un compuesto no cargado como el agua) y siempre es un número entero.

$F$ : Constante de Faraday ( $9,649 \times 10^4$  culombios/mol, o bien  $9,649 \times 10^4$  J/mol. volt.).

$E$ : Valor del potencial eléctrico del sistema.

$m_i$ : Masa molecular del componente  $i$ .

$g$ : Valor de la gravedad.

$h$ : Altura del sistema respecto al nivel del mar.

Para el caso de un soluto su actividad viene dada por:

$$a_i = \gamma_i \cdot c_i \quad (3.3)$$

donde  $\gamma_i$  es su coeficiente de actividad (próximo a 1 para disoluciones no muy concentradas) y  $c_i$  es la concentración molar de  $i$ .

Para el caso del disolvente, la actividad viene dada por:

$$a_i = \gamma_i \cdot N_i \quad (3.4)$$

donde  $\gamma_i$  es el coeficiente de actividad del disolvente (próximo a 1 para disoluciones no muy concentradas) y  $N_i$  es la fracción molar del disolvente (número de moles del disolvente dividido por el número total de moles de la disolución).

Para el caso del vapor de agua:

$$a_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{P_{\text{H}_2\text{O}}}{P_{\text{H}_2\text{O}}^*} = \frac{\text{humedad relativa (HR)}}{100} \quad (3.5)$$

donde  $P_{\text{H}_2\text{O}}$  es la presión de vapor de agua y  $P_{\text{H}_2\text{O}}^*$  la presión de saturación de vapor de agua.

En el caso de una disolución acuosa, es fácil demostrar que:

$$RT \ln a_{\text{H}_2\text{O}} = -\bar{V}_{\text{H}_2\text{O}} (\pi + \tau) \quad (3.6)$$

donde  $\pi$ , presión osmótica, viene dada por:

$$\pi = RT \sum_j c_j \quad (3.7)$$

donde  $j$  se refiere a cada uno de los solutos.

$\tau$ , presión matricial, viene dada por:

$$\tau = - \frac{RT}{\bar{V}_{\text{H}_2\text{O}}} \ln \gamma_{\text{H}_2\text{O}} \quad (3.8)$$

Para disoluciones diluidas se puede aproximar  $\gamma_{\text{H}_2\text{O}} = 1$ , en cuyo caso su logaritmo natural será 0, siendo  $\tau$  nulo.

Como para el agua  $z_{\text{H}_2\text{O}} = 0$ , de (3.2) queda:

$$\mu_{\text{H}_2\text{O}} = \mu_{\text{H}_2\text{O}}^* - \bar{V}_{\text{H}_2\text{O}} (\pi + \tau) + \bar{V}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot P + m_{\text{H}_2\text{O}} gh \quad (3.9)$$

Para estudiar los movimientos espontáneos del agua en la planta, más que el potencial químico de ésta, se usa el término *potencial hídrico*,  $\psi$ , que se define como:

$$\psi = \frac{\mu_{H_2O} - \mu^*_{H_2O}}{\bar{V}_{H_2O}} \quad (3.10)$$

luego de acuerdo con (3.9):

$$\psi = -\pi - \tau + P + \frac{m_{H_2O}}{\bar{V}_{H_2O}} gh \quad (3.11)$$

$\frac{m_{H_2O}}{\bar{V}_{H_2O}}$  es, para el agua pura, su densidad  $\rho_{H_2O}$ . Este valor se puede tomar también para disoluciones no muy concentradas, luego:

$$\psi = P - \pi - \tau + \rho_{H_2O} gh \quad (3.12)$$

En el caso del vapor de agua en una atmósfera normal (donde por convenio hemos dicho que  $P = 0$ ), de acuerdo con (3.2), (3.5) y (3.10) y despreciando la contribución del término de altura, queda:

$$\psi = \frac{RT}{\bar{V}_{H_2O}} \ln \frac{HR}{100} \quad (3.13)$$

Al igual que ocurre para con el potencial químico del agua, podemos decir que ésta tenderá a ir espontáneamente desde las zonas con alto potencial hídrico a las zonas con bajo potencial hídrico.

El potencial hídrico tiene dimensiones de presión, expresándose en unidades SI, Pascal (Pa):

$$\text{Pa} = 1 \text{ N m}^{-2} = 1 \text{ J m}^{-3} = 10^{-5} \text{ bares}$$

Los valores usuales en la célula son del orden de Megapascales (MPa = 10 bares = 9,87 atm).

Se asigna un valor de potencial hídrico de 0 al agua pura, al nivel del mar y a la presión atmosférica normal. Veremos que para el caso de las plantas, el valor de  $\psi$  es, en general, negativo. En general, también en plantas, podemos despreciar el término de altura, con lo que el potencial hídrico de las disoluciones (3.12) se reduce a:

$$\psi = P - \pi - \tau \quad (3.14)$$

expresión que da el potencial hídrico en función de tres términos, presión estática (o de turgencia en las células), presión osmótica y presión matricial.

### 3.3. Componentes del potencial hídrico

Aunque la división del potencial hídrico en diversos aditivos ha sido cuestionada por algunos investigadores, por considerar que  $\psi$  es el único observable termodinámicamente, lo cierto es que, como señala Dainty (1976), raramente nos encontramos con equilibrio termodinámico y se considera que los procesos de flujo, del agua o del metabolismo, pueden depender de varios componentes individuales. Se acostumbra a distinguir

entre tres componentes del  $\psi$  que corresponden a la *presión hidrostática* ( $P$  o  $\psi_p$ ), *presión osmótica* ( $\pi$  o  $\psi_o$ ) y al *potencial matricial* ( $\tau$  o  $\psi_m$ ). Es decir,

$$\psi = P - \pi - \tau = \psi_p + \psi_o + \psi_m$$

o sea,  $P = \psi_p; -\pi = \psi_o; -\tau = \psi_m$  (3.15)

La *presión hidrostática* o potencial de presión,  $\psi_p$ , será, entonces, la presión en exceso de una atmósfera ejercida sobre el sistema. Debido a que tiende a presionar o acercar las moléculas tendrá signo *positivo*, por aumentar así la energía libre del sistema. Solo excepcionalmente, en el caso de presiones negativas (succión o tensión),  $\psi_p$  tendrá valor negativo.

El *potencial osmótico*,  $\psi_o$ , registra la presencia de solutos disueltos en el sistema. Corresponde al concepto tradicional de presión osmótica y para las soluciones diluidas ideales su valor es  $\pi = RTc$ , donde  $c$  es la concentración de solutos en el agua del sistema. Lógicamente,  $\psi_o$  tendrá signo *negativo*, pues los solutos disueltos descienden el potencial químico del agua.

El *potencial matricial*,  $\psi_m$ , es una medida, a presión atmosférica, de la tendencia de la matriz a absorber agua adicionalmente por interacciones de las moléculas de agua en las interfaces sólido y gas-líquido (efectos coloidales, estructuras capilares, etc.). Se trata así, también, de un componente *negativo* que disminuye el potencial hídrico.

Los tres componentes no actúan por igual en las distintas situaciones celulares de la planta, como iremos viendo a lo largo de este capítulo.

En resumen, de acuerdo con Kramer (1983), el potencial hídrico en cualquier sistema es reducido por los factores que reducen la presión de vapor relativa:

- a) Adición de solutos que diluyen el agua y reducen su actividad mediante hidratación de moléculas o iones disueltos.
- b) Fuerzas matriciales que consisten en fuerzas de superficie, y fuerzas microcapilares halladas en suelos, paredes celulares, protoplasma y demás sustancias que absorben o fijan agua.
- c) Tensiones o presiones negativas, tales como las del xilema de plantas transpirantes.
- d) Reducción de la temperatura  $T$ .

El potencial hídrico en cualquier sistema es aumentado por los factores que incrementan la presión de vapor relativa:

- a) Presión, como la de la pared celular expandida sobre el contenido de la célula.
- b) Incremento de la temperatura  $T$ .

### 3.4. Características osmóticas de la célula vegetal

En el modelo teórico de un osmómetro, dos soluciones de distinta concentración en solutos se ponen en contacto a través de una barrera semipermeable (permeable al disolvente, agua e impermeable idealmente a los solutos). En el esquema representado

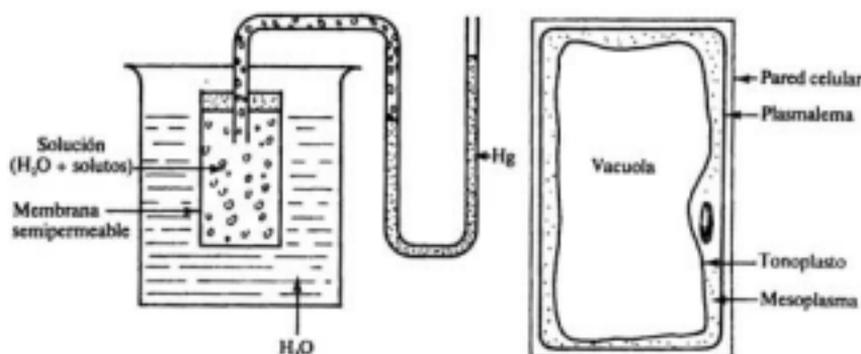


Figura 3.1.—Modelo de un osmómetro convencional y modelo de analogía para las características osmóticas de una célula vegetal (parenquimática).

en la figura 3.1 el recipiente externo contiene agua pura y se halla separado a través de una membrana semipermeable del recipiente interno en donde se ha situado una solución de agua más solutos. El recipiente interno se halla conectado por un tubo de vidrio a un manómetro. Debido al mayor  $\psi$  del agua respecto a la solución, se produce un movimiento de agua a favor del gradiente termodinámico hacia el interior de la célula osmométrica, que provoca una subida de la columna de agua en la tubuladura hasta que la *presión hidrostática* iguale a la *presión osmótica* e impida más entrada de agua. Es decir, de un modo más preciso, hasta que se alcance el equilibrio, en donde  $\Delta\psi = 0$  y  $\psi_o = \psi_p$ .

Puede establecerse un modelo de analogía entre el osmómetro y la célula vegetal. En un sentido ideal, la célula vegetal es asimilable a un osmómetro, donde el espacio externo con agua correspondería al agua que embeben de forma continua las paredes celulares (apoplasto), el recipiente interno con la solución sería el contenido hidrosoluble de las vacuolas y la barrera semipermeable se localizaría en el componente fisiológico de las membranas semipermeables del plasmalema y tonoplasto (mesoplasma). Las propiedades de elasticidad y resistencia mecánica de la pared celular son comparables a la columna de agua que origina la presión hidrostática en el osmómetro.

En la nomenclatura clásica las características osmóticas de la célula vegetal se expresan en términos de fuerza de succión, *FS*, o de déficit de presión de difusión, *DPD*,

$$FS = DPD = PO - PP \quad (3.16)$$

en donde se establece que la difusión del agua hacia la célula (*FS* o *DPD*) depende en primer lugar de la concentración osmótica (expresada como presión osmótica, *PO*) y a ella se le opone la presión de pared o presión de turgor, consecuencia de la resistencia mecánica que opone la pared celular al turgor.

En la terminología termodinámica, la *FS* o *DPD* equivale al  $\Delta\psi$  con el mismo valor numérico pero con signo negativo.

Podemos distinguir tres estados osmóticos diferentes para la célula vegetal, según la concentración en solutos del medio externo. En un medio *hipotónico* (Fig. 3.2),  $\Delta\psi$



Figura 3.2.—Estados osmóticos de la célula vegetal, para diferentes situaciones osmóticas del medio externo.

determina un flujo de agua desde el medio externo a la vacuola celular, provocando un incremento del volumen vacuolar con lo que el citoplasma, en una célula adulta, prácticamente se aplica en posición parietal presionando sobre la pared celular (*turgencia* celular). En un medio *hipertónico* el gradiente de  $\Delta\psi$  determina la salida de agua desde la vacuola al exterior; como consecuencia del descenso del volumen vacuolar se retrae, junto con el tonoplasto, el citoplasma que en parte se desprende de la pared celular, provocando la *plasmolisis*. Se entiende por *plasmolisis incipiente* a la concentración osmótica externa que inicia la separación del citoplasma de la pared celular y suele tipificarse cuando el fenómeno aparece en el 50 por 100 de las células en observación.

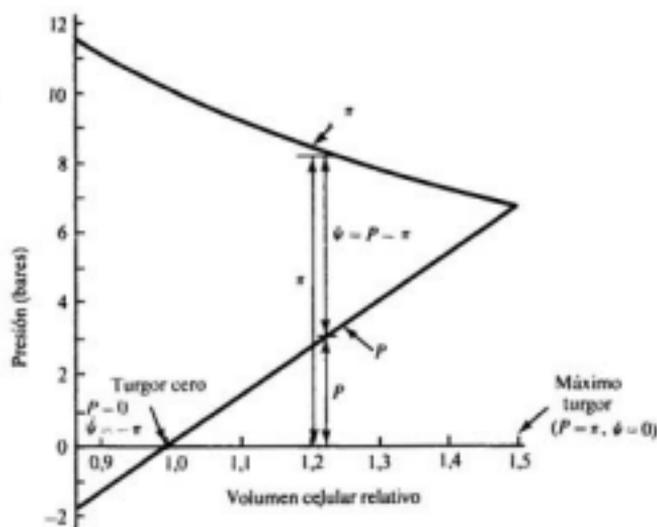


Figura 3.3.—Diagrama del estado osmótico de la célula, en donde se ilustra la relación entre la presión de turgor ( $P$ ), la presión osmótica ( $\pi$ ) y el potencial hídrico ( $\psi$ ) de una célula osmótica ideal (según Slatyer, *Plant-Water Relationships*, Academic Press, Londres, 1967).

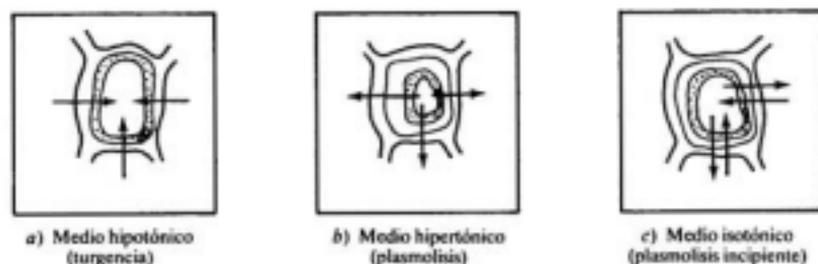


Figura 3.2.—Estados osmóticos de la célula vegetal, para diferentes situaciones osmóticas del medio externo.

determina un flujo de agua desde el medio externo a la vacuola celular, provocando un incremento del volumen vacuolar con lo que el citoplasma, en una célula adulta, prácticamente se aplica en posición parietal presionando sobre la pared celular (*turgencia* celular). En un medio *hipertónico* el gradiente de  $\Delta\psi$  determina la salida de agua desde la vacuola al exterior; como consecuencia del descenso del volumen vacuolar se retrae, junto con el tonoplasto, el citoplasma que en parte se desprende de la pared celular, provocando la *plasmolisis*. Se entiende por *plasmolisis incipiente* a la concentración osmótica externa que inicia la separación del citoplasma de la pared celular y suele tipificarse cuando el fenómeno aparece en el 50 por 100 de las células en observación.

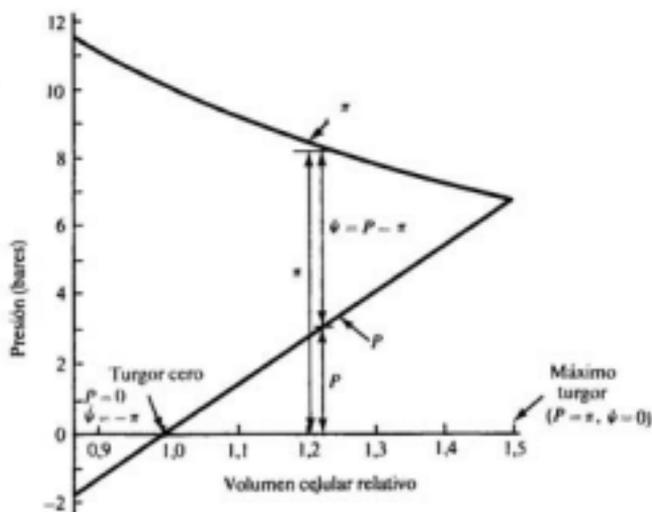


Figura 3.3.—Diagrama del estado osmótico de la célula, en donde se ilustra la relación entre la presión de turgor ( $P$ ), la presión osmótica ( $\pi$ ) y el potencial hídrico ( $\psi$ ) de una célula osmótica ideal (según Slatyer, *Plant-Water Relationships*, Academic Press, Londres, 1967).

En condiciones isotónicas  $\Delta\psi = 0$ , por lo que se establece un equilibrio estacionario sin cambio aparente del volumen celular.

Höfler (1920) representó en un diagrama las variaciones de los distintos estados osmóticos al cambiar el volumen celular. En la figura 3.3 puede observarse un esquema actualizado del diagrama de Höfler en el que se ilustran las variaciones de los potenciales hídrico, osmótico y de presión al cambiar el volumen celular. En condiciones de plasmolisis (célula flácida) alcanzan sus máximos valores  $\psi_o$  por concentración de solutos y  $\psi$ , mientras que con el retraimiento celular se anula  $\psi_p$  por lo que  $\psi = \psi_o$ . En el otro estado osmótico extremo de una célula plenamente turgente, la célula ideal en estas condiciones ha alcanzado su máximo volumen, lo que por dilución causa el descenso del  $\psi_o$  y el aumento del potencial de presión que llega a igualar el potencial osmótico  $\psi_o = \psi_p$  por lo que  $\psi = 0$ . Entre ambos casos extremos puede observarse en el diagrama la graduación en la variación de los distintos parámetros que componen al potencial hídrico.

### 3.5. Flujo del agua en las plantas

En términos termodinámicos, la diferencia de potenciales hídricos,  $\psi_2 - \psi_1 = \Delta\psi$ , entre dos sistemas en contacto es la fuerza o gradiente responsable del flujo del agua desde el sistema de mayor potencial hídrico  $\psi_1$  al de menor  $\psi_2$ , siempre y cuando el agua sea el único componente móvil entre los dos sistemas, como ocurre cuando está presente una membrana semipermeable.

El flujo del agua se rige por la ecuación

$$J_v = L_p \Delta\psi = L_p (\Delta P - \Delta\pi - \Delta\tau) = L_p (\psi_p + \psi_o + \psi_m) \quad (3.17)$$

donde

$J_v$ : Flujo de agua en  $m \cdot s^{-1}$  ( $m^3 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ).

$L_p$ : Conductancia hidráulica de la membrana en  $m \cdot s^{-1} \cdot Pa^{-1}$ .

Para el caso ideal de las células vegetales vacuolizadas, se puede despreciar el efecto del constituyente matricial, por lo que el nivel energético del gradiente de agua vendría expresado por

$$\Delta\psi = \Delta P - \Delta\pi \neq 0 \quad (3.18)$$

en este caso el flujo de agua valdrá

$$J_v = L_p (\Delta P - \Delta\pi) \quad (3.19)$$

Sólo en el caso más simple, en el que el medio externo sea el agua pura a la presión atmosférica,  $\psi = 0$ , la diferencia de potencial,  $\Delta\psi$ , puede sustituirse por el potencial de la célula,  $\psi_c$ .

$$\psi_c = \psi_p + \psi_o = P - \pi \quad (3.20)$$

Una complicación adicional se presenta cuando la membrana de separación es permeable tanto al agua como a los solutos. En este caso, la diferencia de potencial hídrico,  $\Delta\psi$ , no es la única fuerza conductora del agua. Este puede ser el caso, muchas veces, de las células vegetales en donde, estrictamente, más que una membrana semipermeable posee membranas selectivas que pueden dejar pasar solutos a dis-

tintas velocidades. En estos casos en que la membrana se aparta de una condición ideal de semipermeabilidad, el transporte entra dentro del campo de la teoría de la termodinámica irreversible. Para un estudio detallado de este tipo de deducciones se aconseja la consulta de obras más especializadas (por ejemplo, Slatyer, 1967).

En esencia, la desviación de la semipermeabilidad modifica el componente de  $\Delta\pi$  del de  $\Delta\psi$ , puesto que las fuerzas de succión de los solutos disminuyen el paso de agua. En estos casos, con carácter general, el flujo de agua viene dado por la igualdad

$$J_v = L_p (\Delta P - \sigma \Delta\pi - \Delta\tau) \quad (3.21)$$

o, si están presentes solutos que no permean junto a otros que atraviesan la membrana se tiene, aún más general

$$J_v = L_p (\Delta P - \Delta\pi_{imp} - \Delta\tau - \sum_i \sigma_p \Delta\pi_p) \quad (3.22)$$

donde

$\sigma$  : «Coeficiente de reflexión» de la membrana para un soluto específico. Su valor es inferior a 1 y alcanza el valor 0 para una membrana en la que el agua y los solutos permean con igual facilidad. Los valores negativos corresponden a casos extremos en que la membrana es más permeable a los solutos que al agua.

$\Delta\pi_{imp}$  : Variación de presión osmótica debida a solutos que no permean.

$\Delta\pi_p$  : Variación de presión osmótica debida a solutos que permean.

Los valores  $L_p$  y  $\sigma$  se han obtenido experimentalmente de un modo bastante preciso en células gigantes de algas, como en varias especies de *Characeae*. En *Nitella flexilis*, *N. translucens* y *Chara corallina* se han obtenido altos valores para  $L_p$ , del orden de  $10^{-12}$  m · s<sup>-1</sup> · Pa<sup>-1</sup>. En la tabla 3.1 se indican los coeficientes de reflexión aportados por Dainty (1976) para algunos solutos de células gigantes de varias especies de algas.

Una posterior complicación se debe al hecho de que los cambios de volumen de las células vegetales en distintos estados osmóticos no están sólo controlados por

TABLA 3.1

Coeficiente de reflexión de algunos solutos en células gigantes de algas (según Dainty en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 2, Springer-Verlag, Berlin, 1976)

Soluto	<i>Nitella flexilis</i>	<i>N. translucens</i>	<i>Chara corallina</i>	<i>Valonia utricularis</i>
Sacarosa	0,97	—	—	1
Glucosa	0,96	—	—	0,95
Glicerina	0,80	—	—	0,81
Acetamida	0,91	—	—	0,79
Urea	0,91	1	1	0,76
Formamida	0,79	1	1	—
Etilenglicol	0,94	1	1	—
Isopropanol	0,35	0,27	—	—
n-propanol	0,17	0,16	0,22	—
Etanol	0,34	0,29	0,27	—
Metanol	0,31	0,25	0,30	—

las propiedades de las membranas, sino también por la *elasticidad* de la pared celular. Para tener en cuenta las características de las propiedades elásticas de la pared celular, Philip (1958) introdujo un coeficiente, el módulo elástico volumétrico,  $\epsilon$ , cuyo análisis cae fuera de los límites de este tratado. El valor de  $\epsilon$  viene expresado por la ecuación

$$\epsilon = V \frac{dP}{dV} \approx \frac{\Delta P}{\Delta V} \cdot V$$

donde

$P$ : Presión de turgor.

$V$ : Volumen celular en plena turgencia.

$\epsilon$ : Describe el cambio fraccional en volumen en respuesta a un cambio de presión y determina la pendiente de las curvas volumen-presión de las células vegetales.

### 3.6. Medida de los parámetros del potencial hídrico

Para la determinación del potencial hídrico,  $\psi$ , se dispone de una serie de métodos. No obstante, el hecho de que por el momento no se haya podido unificar a unos pocos métodos comunes es indicativo de que aún no se ha llegado a un método de referencia válido con carácter general.

La determinación de  $\psi$  se basa en la propiedad de que cuando una célula o tejido está en equilibrio con el líquido o vapor del medio que le rodea en este estado de equilibrio de flujo dinámico,  $\Delta\psi = 0$ , o sea,  $\psi_{\text{célula}} = \psi_{\text{sol. patrón}}$ , por lo que el potencial hídrico de la solución patrón nos suministra el valor del  $\psi$  de la célula o tejido. De acuerdo con ello, sumergiendo la muestra o tejido problema en distintas soluciones patrón de diferentes concentraciones conocidas, por observación de las variaciones de peso (método gravimétrico) o de volumen (método volumétrico) puede saberse el momento del equilibrio que, lógicamente, corresponde al de la solución en donde no haya ningún cambio apreciable de peso o volumen en la muestra sumergida. Otros procedimientos utilizan como valor indicativo para reconocer el equilibrio, la medición de los cambios de concentración, por métodos refractométricos o densitométricos, de las soluciones patrón en las que previamente se ha introducido la muestra o tejido problema.

Una versión de uso frecuente del método densitométrico es el denominado método de tinción de Chardakov (Fig. 3.4). Para ello se dispone una batería duplicada de tubos con soluciones de concentración conocida de sacarosa o manitol. Una serie servirá como soluciones de prueba, mientras que la otra se utiliza como control y se conserva para comparación. En la serie de prueba se dispone el tejido problema en los tubos con las distintas concentraciones de sacarosa o manitol. Al cabo de varias horas, por lo general de 2 a 8 horas, se retira el tejido de la solución. A la serie de tubos control se les agrega una cantidad suficiente de un colorante tal como azul de metileno o naranja de metilo, con el fin de teñirlo débilmente. Se toma una gota de la solución teñida y se traslada de cada solución control al tubo correspondiente de solución de prueba que ha estado en contacto con el tejido

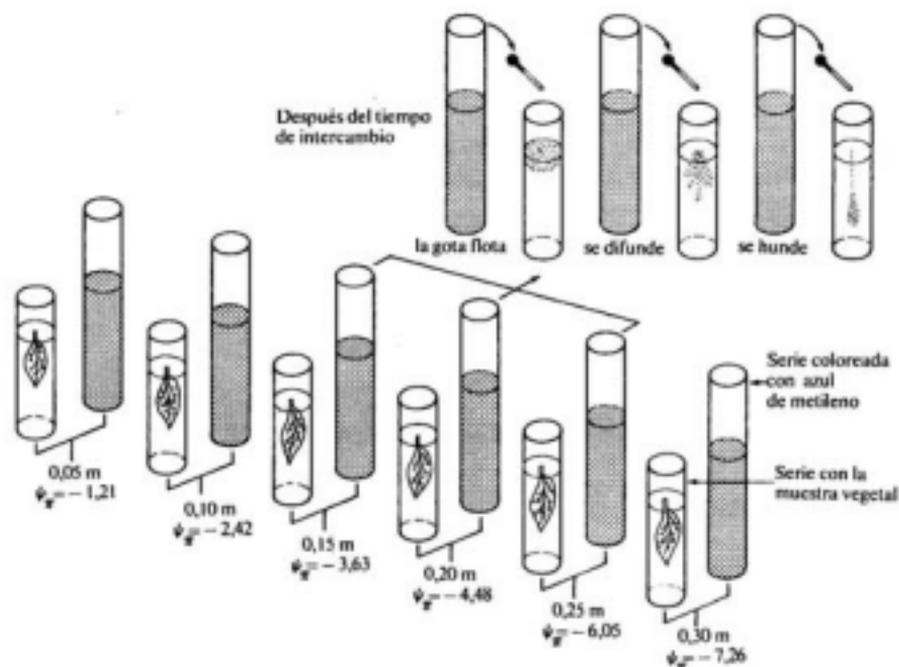


Figura 3.4.—Método del colorante o densitométrico de Chardakov.

problema. La posición de la gota coloreada nos permite deducir indirectamente, por la variación de concentración, los intercambios de agua entre el tejido problema y la solución de prueba. La gota se elevará si la solución de prueba ha sido concentrada mediante la absorción de agua por el tejido vegetal, mientras que caerá si ha sido diluida mediante la pérdida de agua por el tejido vegetal. La solución en la cual la gota de prueba ni suba ni baje tendrá un potencial osmótico igual al potencial hídrico del tejido, ya que  $\psi_p = 0$ . Aparte de estos métodos basados en el equilibrio con medios líquidos, puede también determinarse el potencial hídrico de un tejido vegetal por equilibrio de vapor. En principio, el método más simple es la medida directa de la presión de vapor del agua de una muestra que se ha colocado en un recipiente cerrado. Modernamente se suelen utilizar psicrómetros de termopares, cuya metodología se basa en la medida de la presión de vapor de agua en la atmósfera de una cámara en la cual se encierra una muestra de tejido que está en equilibrio con el vapor de agua. Los distintos tipos de psicrómetros utilizan el principio del enfriamiento de la unión de un termopar de cromo cuando el agua se evapora en su superficie, lo que ocasiona una diferencia de potencial que es medida con un galvanómetro.

Para las hojas o el vástago, Scholander (1965) ha elaborado el *método de la cámara de presión* en el que el  $\psi$  de las células de las hojas se compensa externamente por una presión ejercida desde el exterior de la hoja o el vástago, hasta que aparezca savia del

xilema. Se considera que la presión que debe aplicarse para impulsar al agua de las células foliares de nuevo al xilema es igual al potencial hídrico de las células foliares.

La *presión osmótica* o *potencial osmótico*,  $\psi_o$ , puede medirse bien por extracción del jugo vacuolar o por el método de la plasmolisis incipiente.

El *método de extracción* es especialmente útil en el caso de células de gran tamaño, así en las células gigantes de algas (Charáceas: *Valonia*, *Halicystis*, *Hidrodiclyon*, etc.). Una vez extraído el jugo celular, se puede determinar la presión osmótica por las propiedades coligativas que se manifiestan en la presión de vapor o en el descenso del punto de congelación.

El método de la plasmolisis incipiente se basa en la observación microscópica de las células de un tejido vegetal sometidas a soluciones de diferentes concentraciones osmóticas. Se representa gráficamente para cada concentración osmótica del medio, la fracción de células que inician la plasmolisis, visualizada por el comienzo de separación del citoplasma de la pared celular. La solución que provoca la plasmolisis incipiente del 50 por 100 de las células, se considera que se halla en equilibrio y corresponde con la presión osmótica de la célula vegetal.

El *potencial de presión* o presión de turgor es el componente del potencial hídrico que es debido a la presión hidrostática. En la plasmolisis límite  $\psi_p = 0$  y en la célula turgente, por el contrario, alcanza el máximo valor. Pueden presentarse presiones hidrostáticas negativas, por ejemplo, en los vasos del xilema bajo *tensión* por la corriente de transpiración. El  $\psi_p$  es el componente del potencial hídrico de más difícil determinación. Normalmente se obtiene por cálculo conociendo  $\psi_o$  y  $\psi$ :

$$\psi_p = \psi - \psi_o$$

Sólo en ocasiones es posible medir directamente la presión hidrostática relacionada con la presión de turgor de las células o tejidos vegetales. Green y Stanton (1967) han elaborado un método de medida de  $\psi_p$  en células grandes (*Nitella*), por inserción de un manómetro directamente en las células. Se trata de un manómetro capilar (100 mm de longitud y 0,7 mm de diámetro interno) en el que el aire interior es comprimido al introducir el capilar en la célula por acción de la presión hidrostática.

Para un estudio más detallado de los distintos métodos de determinación de estos parámetros ( $\psi$ ,  $\psi_o$  y  $\psi_p$ ) se aconseja la consulta de la monografía especializada de B. Slavik (1974).

### 3.7. Resumen comparativo de las unidades y expresiones de los distintos parámetros del estado hídrico de las células vegetales

A pesar de la evidente uniformidad que últimamente ha representado la introducción de la terminología termodinámica en la expresión de las relaciones hídricas, y puesto que todavía en la literatura pueden encontrarse distintas variantes entre esta terminología moderna y la que clásicamente se venía usando en Fisiología Vegetal, en la tabla 3.2 se presenta, esquemáticamente, un estudio comparativo entre los distintos términos y sus equivalencias. Se recomienda al estudiante la familiarización con estas equivalencias y la adopción genérica de la terminología termodinámica.

TABLA 3.2

Terminología y equivalencias entre el concepto termodinámico y los términos clásicos más usados para expresar los parámetros del estado hídrico de las células vegetales\*

Término actual	Símbolo	Valor numérico	Términos clásicos equivalentes	Símbolo	Valor numérico
Potencial hídrico	$\psi, \psi_w$	De cero a negativo (a veces positivo)	Fuerza de succión Déficit presión de difusión	FS DPD	De cero a positivo (signo opuesto a $\psi$ ) De cero a positivo (signo opuesto a $\psi$ )
Potencial osmótico	$\psi_s, \pi$	De cero a negativo	Presión osmótica	PO	De cero a positivo (signo opuesto a $\psi_s$ )
Potencial de presión	$\psi_p, P$	Normalmente positivo, excepcionalmente negativo	Presión de turgor Presión de pared	PT PP	De negativo a positivo De positivo a negativo
Potencial matricial	$\psi_m, \tau$	De cero a negativo	Tensión interfacial Presión matricial Succión del suelo	$\tau$	De cero a positivo De cero a positivo

\* Adaptado de Slavik (1974) y Newman (1976).

La bibliografía recomendada en este capítulo es la del 4.

## ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DEL AGUA

La planta representa una vía intermedia en el flujo del agua situada entre los altos potenciales hídricos del suelo y los más bajos de la atmósfera. Las características estructurales de la planta determinan el carácter heterogéneo de las vías de circulación a lo largo del vegetal, desde su absorción por las raíces hasta su uso en los distintos tejidos o su pérdida masiva por el proceso de la *transpiración* (Cap. 5). A efectos formales, se suele distinguir entre el transporte a *corta o mediana distancia* y el *transporte a larga distancia*. El primero comprende fundamentalmente el transporte del agua por las paredes celulares o de célula a célula, mientras que el transporte a distancia incluye la vía del xilema. Se han establecido modelos de analogía para el estudio del transporte del agua por la planta, que se han mostrado cada vez más útiles desde que en 1948 van den Honert introdujo por primera vez un estudio comparativo con la ley de Ohm. De acuerdo con este modelo de analogía, la intensidad del flujo de agua depende directamente del gradiente de potencial hídrico y está en razón inversa de las resistencias, conectadas en serie o en paralelo, que se encuentran en su recorrido. De este modo se puede considerar el sistema suelo-planta-atmósfera como un continuo hídrico, constituido por una vía principal de circulación de agua entre el suelo y la atmósfera, compuesta de redes sucesivas de distinta conductividad y de zonas de almacenamiento de agua situadas en derivación respecto a este trayecto principal y constituidas esencialmente por las células (Fig. 4.1).

La ecuación de van den Honert establece así una ley análoga a la ley de Ohm para el movimiento del agua a lo largo de una cadena de resistencias hidráulicas.

$$F = \frac{(\Delta\psi)_1}{r_1} \text{ (suelo-raíz)} = \frac{(\Delta\psi)_2}{r_2} \text{ (raíz-tallo)} = \frac{(\Delta\psi)_3}{r_3} \text{ (tallo-hoja)} = \\ = \frac{(\Delta\psi)_4}{r_4} \text{ (hoja-atmósfera)}$$

donde

$F$ : Flujo de agua a lo largo del tejido conductor.

$\Delta\psi$ : Diferencia de potencial hídrico a través de cada elemento del sistema.

$r$ : Resistencia.

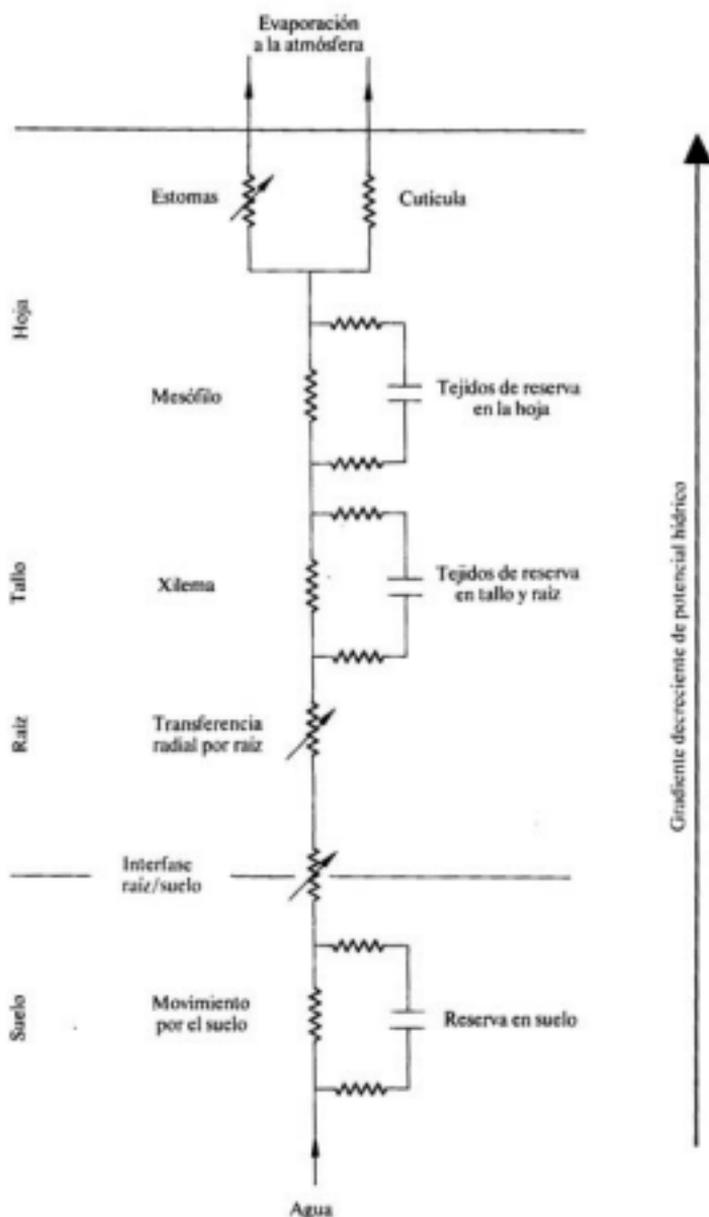


Figura 4.1.—Modelo de analogía para el transporte de agua en el sistema suelo-planta-atmósfera, en el que se indican las resistencias principales y los lugares de reserva (tomado de R. Scott Russell, *Plant Root Systems*, McGraw-Hill, Londres, 1977).

No obstante, estas expresiones sólo son válidas bajo condiciones de estado estacionario.

De acuerdo con ello, el agua sólo circulará si se mantiene un gradiente de potencial a lo largo de la vía. Es decir, el transporte del agua por la planta requiere del aporte de energía necesaria para mantener el gradiente de potencial. Este aporte energético no ocurre en todos los puntos del trayecto, sino que esencialmente la *transpiración* y la *presión radicular* son las fuerzas conductoras del flujo continuo a lo largo de la planta.

#### 4.1. El agua del suelo y su disponibilidad para la planta

El contenido y retención de agua por un suelo no tiene un carácter homogéneo, sino que resulta de la interacción de distintas fuerzas y componentes. Clásicamente se suelen distinguir cuatro tipos distintos de uniones del agua a un suelo:

- a) El *agua gravitacional* corresponde al agua que, en un suelo saturado de agua, rellena transitoriamente los espacios de aire y se pierde por infiltración, por acción de la gravedad, normalmente en 1-3 días.
- b) El *agua capilar* es la fracción de agua del suelo más importante para la dinámica hídrica de las plantas. Corresponde al agua retenida, tras el drenaje del agua gravitacional, por las superficies y fuerzas capilares del suelo.
- c) El *agua de imbibición o higroscópica* se debe a la retención de agua por acción de los coloides del suelo. Normalmente es de escasa significación, por su poca disponibilidad, para la vida de las plantas.
- d) El *vapor de agua* en equilibrio con la fase líquida que rellena los espacios de aire libre entre las partículas del suelo.

Si expresamos el contenido de agua de un suelo en términos de su energía libre, podemos distinguir varios componentes en el *potencial hídrico* de un suelo  $\psi_{\text{suelo}}$ .

$$\psi_{\text{suelo}} = \psi_m + \psi_o + \psi_p + \psi_g$$

donde

- $\psi_m$ : Potencial matricial.
- $\psi_o$ : Potencial osmótico.
- $\psi_g$ : Potencial gravitacional.
- $\psi_p$ : Potencial de presión.

Se toma como valor cero al  $\psi$  de un suelo totalmente saturado con agua pura a la presión atmosférica. De aquí que por la presencia de soluciones los suelos presentan potenciales hídricos de signo negativo. La interacción de los distintos componentes determinan muy diferentes valores de  $\psi$  para los suelos. Los valores más frecuentes para suelos normales son de  $-0,1$  a  $-0,2$  MPa.

Las magnitudes relativas de los componentes del potencial hídrico son muy distintas para la planta y el suelo. El  $\psi_m$  normalmente es poco significativo en las plantas, mientras que en el suelo alcanza elevados valores negativos al decrecer el contenido de

agua en un suelo, de forma que condiciona grandemente el  $\psi_{\text{suelo}}$ . El  $\psi_m$  es siempre un valor *negativo* y representa el componente de la atracción del agua por las fuerzas de adsorción y de capilaridad. La presencia de solutos decrece el  $\psi$ , de forma que  $\psi_o$  tiene también signo *negativo*. Su significación es muy variable, aumentando al incrementarse la concentración de la solución. Para pequeñas concentraciones en solutos, el componente más importante es  $\psi_m$  no sólo para la retención de agua, sino también como fuerza de conducción. Frente al papel decisivo que como vimos (Cap. 3) tenía  $\psi_o$  en las relaciones hídricas de las células vegetales, por el contrario, es relativamente insignificante en el suelo. En cambio, si es conveniente considerar  $\psi_r$ .

A menudo resulta adecuado la expresión logarítmica de  $\psi_{\text{suelo}}$  para lo cual se ha introducido el concepto de  $pF = \log \psi$ , que se presta sobre todo para estudios gráficos comparativos de la humedad del suelo.

Un suelo saturado de agua tiene obviamente su máxima retención de agua, pero rápidamente pierde, por acción de la gravedad, parte de su contenido en agua (agua gravitacional). Se entiende por *capacidad de campo* al contenido de humedad de un suelo en estas condiciones, es decir, un suelo saturado de agua que ha drenado libremente. A efectos prácticos se ha equiparado con el concepto de *equivalente de humedad* que corresponde al agua retenida por un suelo, expresada en porcentaje de peso seco, sometido a una centrifugación de 300 g (antes a 1.000 g) el tiempo necesario para llegar a peso constante.

Se entiende por *punto de marchitamiento permanente* (PMP) al contenido hídrico de un suelo, expresado en porcentaje de peso seco, en el que las hojas marchitas no pueden ya recuperarse de su marchitez, colocadas en una atmósfera saturada de humedad, a menos que se agregue agua al suelo.

De un modo aproximado se puede establecer que la *disponibilidad de agua de un suelo* para las plantas es la comprendida entre la capacidad de campo y el punto de

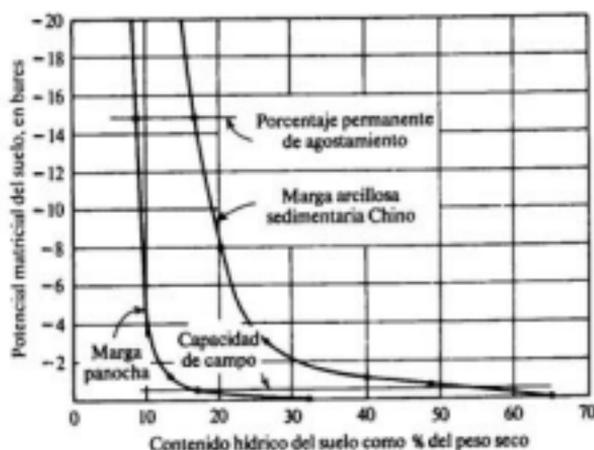


Figura 4.2.—Disponibilidad de agua en el suelo (tomado de P. J. Kramer, *Plant and Soil Water Relationships: A Modern Synthesis*, McGraw Hill, Nueva York, 1969).

marchitez permanente del suelo (Fig. 4.2) y corresponde prácticamente al agua capilar del suelo. Tanto la capacidad de campo como el PMP son característicos de cada tipo de suelo, aunque también las distintas especies vegetales pueden tener respuestas diferentes, sobre todo como se ha podido comprobar para el PMP. Los suelos de partículas finas, así de mayor superficie, tienen la capacidad de campo y el punto de marchitamiento permanente más elevados que los de textura gruesa. Por este motivo, los suelos arcillosos presentan, junto a una mayor retención de agua, también una mayor disponibilidad de ella para las plantas que los suelos arenosos. De acuerdo con ello, un mismo bajo contenido de agua puede hacer que un suelo sea húmedo y disponible (suelo arenoso) mientras otro (suelo arcilloso) se halle seco y no disponible en agua, todo ello independientemente de la poca eficacia y del escaso margen de disponibilidad del suelo arenoso.

#### 4.2. Absorción y transporte del agua por las raíces

La raíz es el órgano especializado en la sujeción de la planta y en la absorción del agua y de los nutrientes minerales del suelo (Cap. 6). La zona de máxima absorción se halla situada en la porción subapical de la raíz, por encima de la zona de división y elongación celular (Fig. 4.3). Esta absorción máxima se logra por incremento de la superficie de las raíces, por mediación de los pelos *absorbentes* o *pelos radiculares*. Los pelos absorbentes se forman a partir de células epidérmicas (*tricoblastos*) que por división desigual originan una protrusión de sus membranas hacia fuera, con lo que se consigue un considerable incremento de la superficie de absorción. Por término medio se considera que la superficie global de las raíces suele ser superior a la de la parte aérea de la misma planta. No todas las especies poseen pelos radiculares e, incluso, algunas especies (por ejemplo, de *Citrus*) carecen de ellos en suelos húmedos y los forman en suelos secos. Se considera que los pelos radiculares son un mecanismo que facilita un mejor contacto de la raíz con las partículas del suelo. La presencia de *micorrizas*, asociación simbiótica de hongos y raíces de plantas, se ha comprobado que es un mecanismo que incrementa y facilita la absorción de nutrientes del suelo, especialmente de fosfatos y seguramente de oligoelementos y de agua. Esta asociación puede ser simplemente externa (ectomicorrizas), sin que las hifas del hongo lleguen a penetrar en el interior de las células epidérmicas o cortical, quedando reducidas a un contacto en los espacios intercelulares, como ocurre en muchas gimnospermas, o la asociación puede llegar a penetrar en las células externas de la raíz (endomicorrizas), tipo más común en especies de angiospermas y en algunos géneros de gimnospermas (por ejemplo, *Juniperus*, *Cupressus*, *Sequoia*, etc.).

#### 4.3. La raíz como sistema osmométrico

Si se secciona el tallo de una planta puede observarse fácilmente cómo, en muchos casos, se produce fácilmente la exudación de la savia del xilema. Este hecho es indicativo de la acción de la *presión radicular* a que se halla sometida la vía del xilema. Por apli-

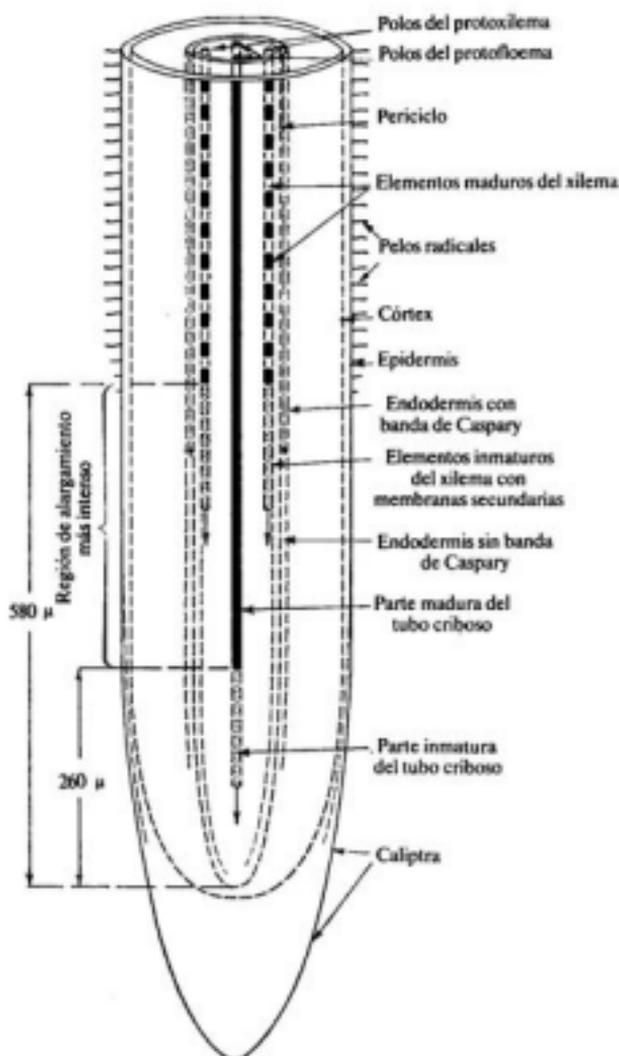


Figura 4.3.—Sección longitudinal de la extremidad de la raíz de *Nicotiana* (tabaco) (tomado de K. Esau, *Plant Anatomy*, Trans-Editions, Inc., Nueva York).

cación de un manómetro se han podido medir en diferentes especies los valores de esta *presión hidrostática* desarrollada por la raíz. Un estudio más detallado con diferentes especies y en distintos momentos ha permitido comprobar que la vía del xilema puede estar sometida tanto a *presiones* (impulsión desde la raíz) como a *tensiones* (succión o

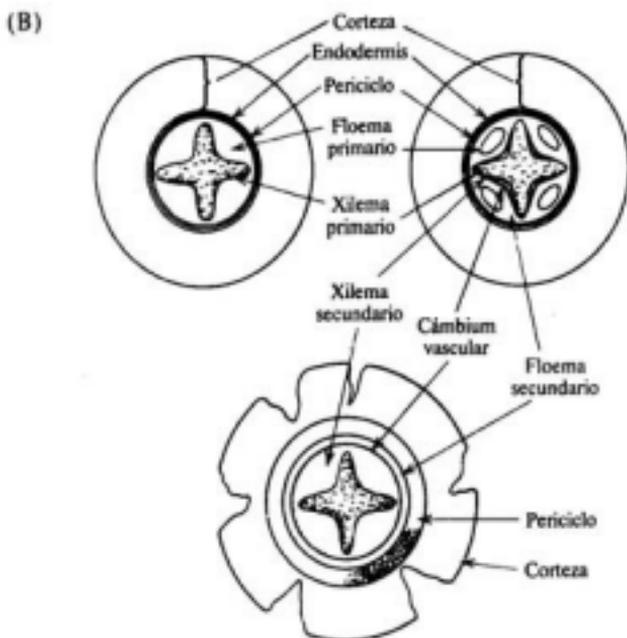
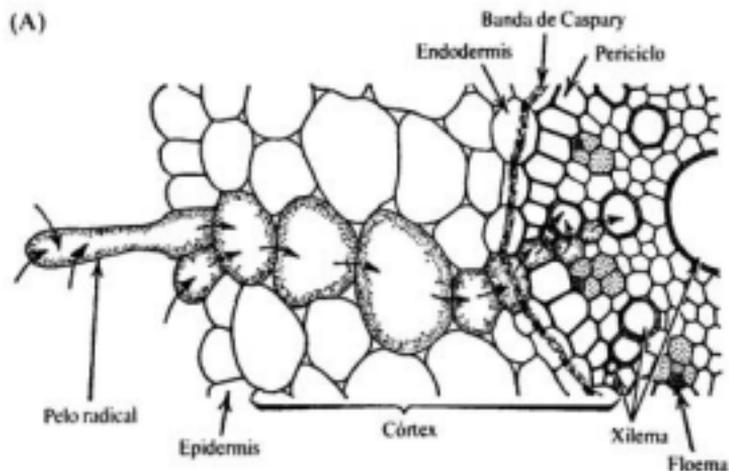


Figura 4.4.—(A) Corte transversal de la estructura primaria de una raíz de trigo. Se indican los distintos tipos de células y el camino del simplasto, para el agua y los nutrientes minerales absorbidos por la raíz. El apoplasto comprende esencialmente las paredes celulares y los espacios intercelulares. Obsérvese cómo la vía del apoplasto queda interrumpida en la endodermis por la presencia de la banda de Caspary (tomado de K. Esau, *Plant Anatomy*, Trans-Editions, Inc., Nueva York).

(B) Corte transversal de la estructura secundaria de una raíz de angiosperma. La presencia del felógeno y del cámbium vascular origina la formación de peridermis y la disposición colateral del floema y xilema (tomado de P. J. Kramer, *Plant and Soil Water Relationships: A Modern Synthesis*, McGraw-Hill, Nueva York, 1969).

bombeo desde las hojas). Ambas observaciones no se contraponen sino que tienen una explicación relativamente fácil, como veremos en el próximo apartado al discutir la teoría de la tensión cohesión.

En 1938 Alden S. Crafts y Theodore C. Broyer propusieron un mecanismo para explicar la existencia de la presión radicular. Aunque no puede darse todavía una explicación satisfactoria definitiva, esta teoría, en muchos aspectos, ha sido defendida hasta la actualidad. Según esta interpretación la raíz (Fig. 4.4) podría compararse a un osmómetro. En este sistema, el recipiente externo del osmómetro (Fig. 3.1) sería equivalente al espacio de difusión libre (*apoplasto*) hasta la endodermis; ésta correspondería a la barrera semipermeable y la parte interna a la endodermis, la estela, a la solución interna del osmómetro. Según la teoría primitiva de Crafts y Broyer, la distinta concentración osmótica del apoplasto del cilindro cortical y de la estela se debería a la mayor concentración de  $O_2$  en la parte externa a la endodermis sobre la estela. Estas condiciones favorecerían una *absorción activa de iones* en la zona de la endodermis desde el apoplasto al simplasto y una cesión de iones por la baja tensión de  $O_2$ , y como consecuencia del metabolismo energético celular, en las células parenquimáticas de la estela que así cederían de nuevo iones desde el simplasto al apoplasto (xilema) y causarían un incremento del potencial osmótico del xilema, por encima del de la solución del suelo y del parénquima cortical. Más recientemente, existen algunas evidencias en favor de un mecanismo alternativo de *secreción* de iones desde las células parenquimáticas de la estela al xilema (ver, además, la sección 6.5). Por una u otra variante, en conjunto, la raíz operaría como un verdadero osmómetro que desarrollaría una *presión hidrostática o presión radicular*.

Un hecho a destacar es que no todas las especies originan presiones radiculares del mismo orden e, incluso, en muchas especies que por su altura requieren de altas presiones radiculares para impulsar la circulación por el xilema, apenas las desarrollan (coníferas). En cambio, otras especies herbáceas presentan presiones comparativamente altas (tomate).

Una manifestación fisiológica de la existencia de la presión radicular es el fenómeno de la *gutación* que se presenta en grado variable según las especies en aquellas condiciones en que por la alta humedad del ambiente o por cierre de los estomas apenas haya transpiración, y en donde esté asegurada una buena absorción de agua por las raíces. Estas condiciones se dan fundamentalmente durante la noche. Se entiende por gutación la pérdida de agua líquida por las plantas a través de los hidatodos que se hallan situados normalmente en los ápices o márgenes de las hojas. Se trata de un fenómeno que no debe confundirse con el rocío (condensación de agua líquida en la superficie de las hojas) ni con la transpiración (pérdida de vapor de agua fundamentalmente por los estomas, ver capítulo 5). La gutación puede observarse fácilmente a primeras horas de la mañana, por ejemplo, en cereales (en el ápice de las hojas) y en el fresal (márgenes de las hojas).

#### 4.4. Via del xilema

El transporte a larga distancia de agua por la planta ocurre a través de la vía del xilema. El *xilema* es, por tanto, el tejido conductor del agua y nutrientes minerales desde el

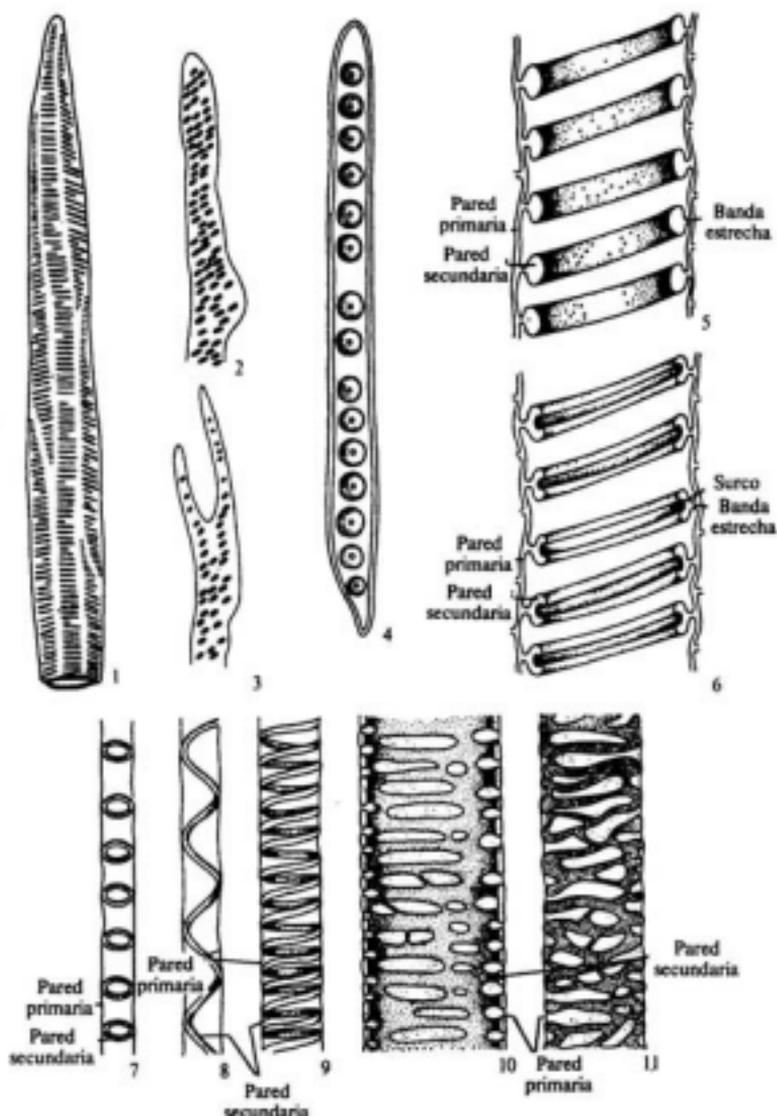


Figura 4.5.—Componentes del xilema. 1. Extremo de traqueida de *Dryopteris*; con punteadura escaleriforme. 2 y 3, extremos de traqueidas de *Kingia*. 4, traqueida de *Pinus*. 5, porción de un elemento traqueal cortado longitudinalmente, mostrando el engrosamiento helicoidal de la pared y las bandas por las que se unen a la pared primaria. 6, como en 5, pero donde el engrosamiento helicoidal muestra un surco profundo. 7-11, diferentes tipos de engrosamiento de pared en los elementos traqueales. 7, engrosamiento anular. 8, engrosamiento helicoidal. 9, engrosamiento helicoidal denso. 10, engrosamiento escaleriforme. 11, engrosamiento reticular (tomado de A. Fahn, *Anatomía Vegetal*, Pirámide, Madrid, 1985).

lugar de su absorción, las raíces, al resto de tejidos de la planta. Forma un sistema continuo que, partiendo de la estela en las raíces, y a través del tallo, alcanza hasta las hojas. Estructuralmente el xilema no es un sistema homogéneo, sino que pueden distinguirse cuatro tipos distintos de componentes: *traqueidas*, *vasos*, *fibras* y *parénquima*. De ellos, únicamente tienen una misión conductora claramente definida las traqueidas y los vasos. Las *fibras* del xilema coadyuvan al soporte mecánico del órgano y las células del *parénquima* del xilema son elementos vivos con función de reserva y de transporte lateral. De los elementos conductores las *traqueidas* (Fig. 4.5) son los filogenéticamente más primitivos y son características sobre todo de las gimnospermas, que carecen de vasos verdaderos. En las angiospermas se presentan conjuntamente traqueidas y *miembros de los vasos*. Ambos elementos conductores, en su estado adulto funcional de transporte, son células *muertas* que han sufrido previamente en su diferenciación un proceso de engrosamiento y lignificación de sus paredes celulares, perdiendo su citoplasma para originar así el lumen. Mientras que las traqueidas en sus conexiones longitudinales mantienen su individualidad, los *elementos de los vasos* llegan a disolver sus paredes transversales formando un verdadero tubo de conducción (vaso, o menos moderno, tráquea). Otra diferencia de ambos tipos de elementos conductores

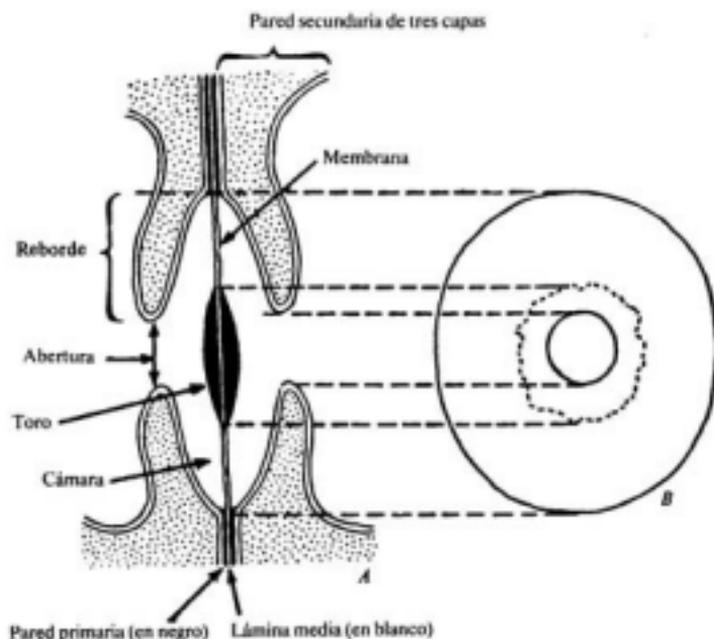


Figura 4.6.—Poro areolado. Par de punteaduras areoladas de *Pinus* vistas en sección (A) y de frente (B). La pared de la punteadura consta de dos paredes primarias y de la lámina media, pero es más delgada que la misma estructura triple en la parte de la pared desprovista de punteadura. El toro se forma por espesamiento de la pared primaria (tomado de K. Esau, *Plant Anatomy*, Trans-Editors, Inc., Nueva York).

reside en su tamaño. Las traqueidas miden normalmente unos 5 mm de largo y 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y los vasos de 20 a 800  $\mu\text{m}$  de diámetro y longitudes desde unos pocos centímetros a varios metros. Las conexiones laterales y las transversales, en el caso particular de las traqueidas, se logran a través de un sistema de *punteaduras*, dispuestas a menudo por pares coincidentes en las dos células vecinas. Muy característico de las traqueidas (Fig. 4.6) son los *poros areolados*. En ellos la pared secundaria se interrumpe formando un típico reborde y la comunicación se establece a través de la pared primaria. La parte central del poro normalmente posee un típico engrosamiento, el *toro*, cuya función es la regulación del cierre del poro, importante sobre todo cuando como consecuencia de lesiones del xilema y por entrada de aire o variaciones de presión, se podrían producir fácilmente cavitaciones que podrían ser fatales para la continuidad funcional del sistema conductor. A veces es difícil separar funcionalmente las traqueidas de las fibras, pues éstas pueden también realizar un cierto transporte de agua. Normalmente se distinguen entre sí por ser menores los lúmenes y las punteaduras de las fibras.

Se considera que no todos los elementos conductores (traqueidas y vasos) participan a la vez y con la misma intensidad en el transporte de agua. En el leño o xilema se distingue entre la *albura* y el *duramen* que corresponden, respectivamente, a un estado más joven y más viejo y que se diferencian visualmente por la mayor coloración que, por deposición de sustancias, con el tiempo adquiere el leño del duramen. Son los elementos más jóvenes de la albura los que cada año juegan el papel funcional más importante en la conducción.

#### 4.5. Mecanismo de transporte por el xilema

Un aspecto muy interesante y que ha sido continuamente debatido desde los comienzos del estudio de la Fisiología Vegetal es el que se refiere al mecanismo por el que asciende la savia por el xilema. Para las plantas herbáceas, por su tamaño menor, el problema teóricamente no ofrece de entrada muchas dificultades. No ocurre así con las especies arbóreas, que en algunos casos alcanzan alturas superiores a los 100 metros (*Sequoia* en California y *Eucalyptus* en Australia).

Se han dado diferentes interpretaciones para el mecanismo que opera en el xilema y, entre ellas, destacaremos por su mayor significación, según el punto de vista actual, las teorías de la *presión radicular* y de la *tensión-cohesión*.

##### 4.5.1. Presión radicular

Ya hemos visto que la raíz puede operar como un sistema osmométrico que origina una *presión hidrostática* o *presión radicular*. Aunque la magnitud de esta presión puede variar en las diferentes especies, los valores medios normalmente son del orden de 0,1 a 0,2 MPa. Esta presión radicular sufre continuamente cambios a lo largo del día y de las estaciones, debido a la variación que experimentan las condiciones ambientales. Los valores medidos explican bien la fuerza impulsora para el transporte del agua en la mayoría de plantas herbáceas, pero, en cambio, son insuficientes para sostener la circula-

ción en el xilema en las especies de mayor altura. Otro factor adicional a tener en cuenta es que, en muchos casos, no sólo no puede demostrarse la existencia de una *presión positiva* en el xilema, sino todo lo contrario, se comprueba que se encuentra bajo *presión negativa* o *tensión*. Por todo ello se considera que la presión radicular no es el mecanismo principal que sirve de motor a la circulación del xilema, aunque sí puede operar con grados variables de significación según las condiciones de la economía hídrica de la planta en cada momento en relación a su estado fisiológico y el efecto del entorno. Así, durante el día, el xilema más bien se halla bajo tensión por efecto de la fuerte transpiración; por la noche el cierre de los estomas y el consiguiente descenso de la transpiración hacen que sea operativa la presión radicular, tal como ha podido comprobarse por medición experimental. Igualmente al cesar la dormición, con el brote de las yemas en primavera, la presión radicular juega un papel esencial en el movimiento por el xilema antes que se desarrolle, con la función de las hojas, el mecanismo de flujo de la corriente de transpiración. La presión radicular puede jugar un papel adicional para recomponer la cavitación que puede producirse en los elementos de conducción.

#### 4.5.2. Teoría de la tensión-cohesión

Si en la teoría de la presión radicular la fuerza impulsora reside en la presión hidrostática originada por la raíz, en la teoría de la *tensión-cohesión*, la propulsión proviene desde arriba, exactamente de la *energía* de la transpiración (Cap. 5). Stephen Hales, en 1725, logró demostrar que en los elementos conductores del xilema operaban fuerzas capilares y señaló el papel decisivo para los movimientos del agua, de la transpiración. La definición inicial de la teoría de la tensión-cohesión data de finales del siglo pasado y se debe fundamentalmente a los trabajos y deducciones de Josef Böhm (1892), H. H. Dixon y John Joly (1894) y Askenasy (1895).

Antes de entrar a considerar la versión moderna de esta teoría, recordemos algunas propiedades físicas que operan en el xilema. En primer lugar, el tamaño y características de continuidad de los elementos conductores del xilema se pueden equiparar a los de un *capilar*. En un capilar el movimiento de ascenso está en razón inversa al radio del capilar, pero, a su vez, la disminución del diámetro perjudica al flujo de agua por incremento de la resistencia de frotamiento. En el curso de la evolución las plantas terrestres han llegado a un equilibrio adaptativo por el que al disminuir el radio de los vasos aumenta compensatoriamente el número de vasos.

De acuerdo con la ecuación de Hagen-Poiseuille el flujo hidráulico para un capilar vale

$$J_v = \frac{r^2}{8\eta} \frac{\Delta\psi_p}{x}$$

$$\text{o sea, en un capilar: } L = \frac{r^2}{8\eta} \text{ y } L_p = \frac{L}{x}$$

donde

$J_v$ : Flujo hidráulico.

$\Delta\psi_p$ : Diferencia de potencial de presión.

$r$ : Radio del capilar.

- $x$ : Distancia recorrida.  
 $\eta$ : Viscosidad del líquido.  
 $L$ : Conductividad hidráulica.  
 $L_p$ : Conductancia hidráulica.

Aún más significativas se consideran las propiedades de *adhesión* de las moléculas de agua a las paredes celulares y las de *cohesión* de las moléculas de agua entre sí. Ambas propiedades se deben a la facilidad de establecer enlaces por puente de hidrógeno entre el agua y las sustancias polares o de las moléculas de agua entre sí (Cap. 3).

En términos modernos, la teoría de la tensión-cohesión puede establecerse del siguiente modo. Existe un gradiente de potencial hídrico entre la planta y la atmósfera, y la *energía* necesaria para el movimiento del agua por el xilema es la de la evaporación del agua por las hojas (transpiración). Como consecuencia de la pérdida de agua desde las células del mesófilo a los espacios intercelulares y de su difusión, a favor de gradiente, a la atmósfera, esencialmente a través de los estomas, se produce un déficit hídrico en las células más externas del mesófilo (descenso del  $\psi$ ). Como consecuencia de ello el agua fluye a favor de gradiente desde las células vecinas más internas, con mayor potencial hídrico, hacia las más externas que ya hemos visto se hallan en déficit hídrico. Este déficit hídrico se propaga sucesivamente hasta llegar a la altura de los conductos del xilema en donde su naturaleza capilar y la acción de las propiedades de cohesión de las moléculas de agua entre sí y de la adhesión a las paredes celulares, juntamente con la existencia de este déficit hídrico, provoca una *tensión* (*presión negativa*) capaz de elevar a la columna de agua de una forma continua desde el extremo inferior de los vasos en la raíz hasta las hojas. Como consecuencia de ello, el descenso del potencial hídrico en los extremos inferiores del xilema determina el flujo hidráulico desde las células de la estela de la raíz y, por propagación de los déficits hídricos, sucesivamente en el parénquima cortical, epidermis y suelo.

Las principales objeciones a esta teoría se centran en la comprobación de la existencia de esta tensión o presión negativa en el xilema y en la necesidad de la no rotura (cavitación) de las columnas de agua del xilema, sometidas a altas tensiones para que sea operativo el mecanismo. La existencia de tensiones en el xilema ya se había deducido hace años indirectamente por medio de *dendrógafos* (MacDougal, 1925). Los *dendrógafos* permiten medir de una forma sensible las variaciones de diámetro en los troncos de los árboles, y se basan en el hecho de que dichas variaciones de diámetro son atribuibles a las contracciones de volumen reversibles en el xilema cuando está sometido a *tensión* o a su incremento bajo *presión*. Este tipo de mediciones indican diámetros algo mayores durante la noche (presión radicular) y menores durante el día al estar sometidas las plantas a tensión por la corriente de transpiración. Más recientemente se han obtenido comprobaciones más directas por el método de la cámara de presión (Scholander y cols., 1965). El método, en esencia, consiste en encerrar una rama recién cortada en una cámara de presión y en medir la presión necesaria para producir la salida de savia por la superficie cortada. Se considera que esta presión es igual a la tensión que existe en el agua del xilema antes de ser cortada la rama. Con este método se han podido medir claramente la existencia de tensiones de  $-0,5$  a  $-8$  MPa y valores mucho más negativos de las tensiones durante el día que por la noche.

El segundo aspecto muy discutido ha sido la integridad de las columnas de agua sometidas a fuertes tensiones. Se calcula que para impulsar la subida de la savia por el xilema en los árboles de mayor altura se requieren del orden de unos 4 MPa. De un modo aproximado puede decirse que se requieren 0,1 MPa por cada 10 m de ascenso de la savia, aparte las resistencias de frotamiento que pueda ofrecer el recorrido. En términos físicos, el problema se plantea si a altas tensiones puede romperse la continuidad de la columna de agua, es decir, si se provoca la *cavitación* de los conductos del xilema. Teóricamente se calcula que es necesaria una tensión de unos 130 MPa para romper una columna de agua en tensión en un capilar, valores que están por debajo de los obtenidos experimentalmente para el xilema. No obstante, las posibles roturas que pudieran provocarse, sobre todo en los vasos mayores, podrían ser de nuevo reparadas por acción de la presión radicular. Hay que tener en cuenta que no todo el xilema se halla a la vez en estado funcional de transporte y que la cavitación de algunos conductos no afecta a la operación del conjunto. Zimmermann (1965) ha comprobado la existencia de columnas de agua por congelación de secciones de tallos y observación microscópica de los conductos del xilema en los que la existencia de agua condujo a congelación.

La presencia en los conductos del xilema de punteaduras o poros ha sido también un tema que ha atraído el interés de los fisiólogos vegetales por su posible participación o por su impedimento del transporte de la corriente de transpiración. El hecho que el agua pueda atravesar con relativa facilidad las membranas de los poros hace creer que su principal función sea la prevención de la propagación de gases de un conducto a otro en los vasos en cavitación. La presencia del toro en los poros areolados coadyuva más fácilmente a esta función protectora.

#### 4.6. Visión de conjunto

En resumen, el sistema hidrodinámico suelo-planta-aire forma un sistema cuyo flujo se produce a favor de gradiente de los potenciales hídricos y en el sentido decreciente

$$\psi_{\text{agua pura}} \rightarrow \psi_{\text{suelo}} \rightarrow \psi_{\text{raíz}} \rightarrow \psi_{\text{xilema}} \rightarrow \psi_{\text{hoja}} \rightarrow \psi_{\text{atmósfera}}$$

La planta total no requiere en todos los puntos de su trayecto el aporte de energía para el mantenimiento de estos gradientes de potencial hídrico. El aporte más significativo es la energía física que interviene en la evaporación del agua por las hojas en el proceso de la transpiración y, más secundariamente, la presión radicular que se origina por mecanismos osmóticos en la raíz. A este flujo

$$F = \frac{\Delta\psi}{r}$$

se oponen distintos grados de resistencias a lo largo de la planta, que en el sistema del agua en fase líquida se considera que alcanzan sus valores máximos en la raíz, en la incorporación del agua del apoplasto al simplasto en la barrera de la endodermis y, en la fase de vapor, en las hojas, en los estomas, en el proceso de la transpiración, tras la evaporación del agua de las células del mesófilo a los espacios intercelulares. Otro punto crítico es su difusión a la atmósfera a través de los estomas (Cap. 5) cuya anatomía, disposición y mecanismo de regulación han llegado, en muchos casos, a un grado muy eficaz de control adaptativo a la economía hídrica

de la planta y a la necesidad de intercambio de gases (sobre todo  $\text{CO}_2$ ) para la fotosíntesis (véase las diferencias comparativas entre las plantas C-3, C-4 y CAM en los capítulos 14 y 15).

Muy diversos factores fisiológicos afectan a la intensidad de la absorción y flujo de la corriente de transpiración. Citemos entre ellos las características del suelo y su disponibilidad en agua, el número y características del sistema radicular de la planta, las características osmóticas de cada especie vegetal, el número y disposición de las hojas, las características estructurales, funcionales y de posición de los estomas, el grado de cutinización de la epidermis de las hojas, la humedad del medio, luz,  $\text{CO}_2$ , temperatura, etc. (véase el capítulo 36 para plantas en condiciones adversas).

Para estos estudios del flujo del agua a través de la planta se han demostrado muy operativos los modelos de analogía que ya hemos considerado al principio del capítulo (Fig. 4.1).

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BAKER, D. A.: *Water Relations*, en: *Advanced Plant Physiology* (Edit. M. B. Wilkins), Pitman, Londres, 1984, págs. 297-318.
- BOYER, J. S.: *Water Transport*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 473-516, 1985.
- DAINTY, J.: *The Water Relations of Plants*, en: *Physiology of Plant Growth and Development*, Ed. M. B. Wilkins, McGraw-Hill, Londres, 1969, págs. 421-452.
- DAINTY, J.: *Water Relations of Plants Cells*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, volumen 2, Ed. U. Lüttge y M. G. Pitman, Springer-Verlag, Berlin, 1976, págs. 12-35.
- HOUSE, C. R.: *Water Transport in Cells and Tissue*, Edward Arnold, Londres, 1974.
- KOZŁOWSKI, T. T. (ed.): *Water Deficits and Plant Growth*, 3 vols., Academic Press, Nueva York, Londres, 1968 a, b, 1972.
- KRAMER, P. J.: *Water Relations of Plants*, Academic Press, Nueva York, 1983.
- LANGE, O. L.; KAPPEN, L., y SCHULZER, E. D.: *Water and Plant Life*, Springer-Verlag, Berlin, 1976.
- MILBURN, J. A.: *Water Flow in Plants*, Longman, Londres, 1979.
- NEWMAN, E. I.: *Water Relations*, en: *Plant Structure, Function and Adaptation*, Ed. M. A. Hall, The MacMillan Press Ltd., Nueva York, 1976, págs. 157-196.
- NOBEL, P. K.: *Biophysical Plant Physiology and Ecology*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1983.
- SLATYER, R. O.: *Plant-Water Relationships*, Academic Press, Londres, Nueva York, 1967.
- SLAVIK, B.: *Methods of Studying Plant Water Relations*, Springer-Verlag, Berlin, 1974.
- WARDLAW, I. F., y PASSIOURA, J. B. (eds.): *Transport and Transfer Processes in Plants*, Academic Press, Londres, 1976.
- WEATHERLEY, P. E.: *Some Aspects of Water Relations*, en: «Advan. Bot. Research», vol. 3, 1970, págs. 171-206.
- WINTER, E. J.: *Water, Soil and the Plant*, The MacMillan Press Ltd., Nueva York, 1976.
- ZIMMERMANN, M. H.: *Xylem Structure and the Ascent of Sap*, Springer-Verlag, Berlin, 1983.
- ZIMMERMANN, U., y STEUDLE, E.: *Physical Aspects of Water Relations of Plant Cells*, en: «Advan. Bot. Research», vol. 6, 1978, págs. 45-117.

## PÉRDIDA DE AGUA POR LA PLANTA. TRANSPIRACIÓN

La mayor parte del agua absorbida por la planta es perdida por ésta en estado de vapor por un proceso que recibe el nombre de *Transpiración*.

En el balance hídrico de la planta sólo una parte pequeña del agua absorbida es retenida para contribuir, principalmente como medio dispersante, al crecimiento de las partes jóvenes de la planta. Una porción mucho menor del agua absorbida es destruida, principalmente en la fotosíntesis. Una cantidad de agua aún menor se forma en los procesos respiratorios pero, globalmente consideradas, las pérdidas o formaciones de agua en los procesos metabólicos son insignificantes en el balance hídrico de la planta. Incluso el agua retenida y no transformada químicamente tiene en general un valor relativamente muy pequeño en el balance hídrico según se verá en este capítulo.

Muchas plantas pueden perder agua en estado líquido por procesos que veremos al final del capítulo, pero la forma mayoritaria de pérdida de agua por la planta ocurre en estado vapor por transpiración.

### 5.1. Concepto y magnitud de la transpiración

La transpiración o pérdida de agua en estado vapor por la planta es un fenómeno común a todas las plantas terrestres. Su existencia se puede poner de manifiesto con observaciones y experiencias sencillas. Así, por ejemplo, una planta o rama encerrada en una campana de cristal determina al poco tiempo la formación de gotitas de agua en la pared interior de la campana, debido a un aumento del vapor de agua de la atmósfera del interior de la campana. Por otra parte, todos hemos observado alguna vez cómo la planta que se deja de regar se marchita y pierde peso, con lo cual parece lógico pensar que la causa de la pérdida de peso, recuperable con la reanudación del riego, es la pérdida de agua en estado vapor.

Físicamente la transpiración es un proceso más complejo que la simple evaporación. De hecho la transpiración incluye dos etapas:

1.ª Una evaporación del agua (mayoritariamente desde las paredes de las células del mesófilo a los espacios aéreos de éste). 2.ª Una difusión del agua en estado vapor por los espacios aéreos del interior de la planta hasta el exterior.

Más adelante examinaremos las técnicas utilizadas para medir la transpiración, por las cuales se ha podido determinar que su valor es muy considerable.

Se ha estimado que una planta de maíz pierde unos 200 kg de agua por transpiración durante un ciclo de vida normal. Una plantación de maíz pierde por  $m^2$  y ciclo de cultivo 300 kg de agua. Un árbol de envergadura media puede perder durante un mes de verano unos 5.000 kg de agua. Un bosque pierde por transpiración, como valor normal, 500 kg de agua por  $m^2$  y año.

La cantidad de agua que pierde una planta por cada gramo de materia seca que produce es una medida de la relación de eficacias de transpiración y fotosíntesis. Su valor, que depende de la planta y de las condiciones ambientales, nunca es inferior a 100 aun en plantas de gran eficacia fotosintética y adaptadas a ambientes secos. En otras plantas puede alcanzar valores próximos a 1.000. Para la mayoría de las plantas cultivadas la relación de agua perdida por transpiración a materia seca formada oscila entre 300 y 600.

Entre un 50 y un 85 por 100 del agua de lluvia que cae en un terreno con vegetación vuelve a la atmósfera por transpiración de las plantas. En general se estima que un terreno con vegetación pierde tres veces más agua en estado vapor que la que perdería sin vegetación. Como valor medio diurno típico, una planta puede perder por transpiración entre 0,5 y 1 gramo de agua por hora y por decímetro cuadrado de superficie foliar. Es decir, una hoja pierde por transpiración, en una hora, una masa de agua que por término medio equivale del 25 al 50 por 100 de su propia masa fresca. En ciertas condiciones este porcentaje puede superar el 100 por 100. Naturalmente, el agua que la hoja pierde por transpiración ha de ser repuesta rápidamente en forma líquida, tomándola la hoja de otras zonas de la planta y originando con ello una gran corriente en la planta dirigida hacia las zonas de mayor transpiración según se vio en el capítulo 4.

Como veremos más adelante, la magnitud de la transpiración varía mucho de unas plantas a otras: frente a unos 2 a 3 kg de agua que puede perder una planta de maíz en un día, un cactus grande del desierto puede perder en ese mismo periodo sólo unos 25 g de agua.

Esta gran variación nos indica que las plantas deben usar muy diversos métodos de controlar la magnitud de la transpiración. El estudio de los diversos mecanismos de control de la transpiración constituye, pues, un capítulo importante de la Fisiología Vegetal. Pero, además, es indudable su interés práctico, pues proporciona información sobre los requerimientos hídricos de una planta según las condiciones ambientales y abre la posibilidad de controlarlos artificialmente mediante una alteración de la transpiración.

## 5.2. Necesidad física de la transpiración

Globalmente considerada, la transpiración consiste en la transferencia de agua desde la planta a la atmósfera, lo que requiere que el potencial hídrico de la atmósfera sea menor que el de la planta, o más concretamente, menor que el de las estructuras a partir de las cuales tiene lugar la transpiración que, como veremos, son casi exclusivamente las hojas.

El potencial hídrico del agua en estado vapor se puede expresar (apartado 3.2) por la fórmula:

$$\psi_v = \frac{RT}{V_{H_2O}} \cdot \ln \frac{HR}{100} \quad (5.1)$$

donde *HR* es la humedad relativa.

$\frac{RT}{V_{H_2O}}$  a 20° C tiene un valor de 1.350 bares, siendo entonces la expresión anterior:

$$\psi_v = 1.350 \ln \frac{HR}{100} \quad (5.2)$$

La humedad relativa no puede sobrepasar el valor de 100, por lo que el cociente  $HR/100$  tendrá en general un valor inferior a 1, y su logaritmo natural un valor negativo. Como el término  $\ln HR/100$  está afectado en (5.2) por un coeficiente muy elevado, aun para valores de  $HR$  próximos a 100, tendremos valores del potencial hídrico negativos y muy altos en valor absoluto. En la figura 5.1 se representa la función (5.2) gráficamente, en escala lineal y en escala semilogarítmica. Como puede verse,  $\psi_v$  varía muy acusadamente con  $HR$ ; así, por ejemplo, de un valor de  $\psi_v = 0$  para  $HR = 100\%$ , se pasa a un valor de  $\psi_v = -13,5$  bares para un  $HR = 99\%$ . Con un  $HR = 90\%$  el valor de  $\psi_v$  es de  $-142$  bares. Teniendo en cuenta que en las hojas el valor normal de  $\psi$  oscila entre  $-2$  y  $-15$  bares (en las raíces es aún mayor) y que la humedad relativa atmosférica, aun con lluvia intensa, raramente sobrepasa el 95 por 100 (que corresponde a un valor de  $\psi_v$  de  $-68$  bares), se comprende que prácticamente el agua de todas las plantas tiene tendencia a pasar a la atmósfera y así ocurrirá rápidamente a menos que la planta oponga resistencias que hagan más lento el proceso.

Con el paso al medio terrestre las plantas se encontraron con un ambiente de potencial hídrico extraordinariamente bajo que determinó un paso continuo de agua de la planta a la atmósfera. Como veremos en este capítulo, muchos aspectos de la transpiración se explican por la aparición en las plantas terrestres de mecanismos que tratan de reducir la velocidad de este proceso de pérdida de agua.

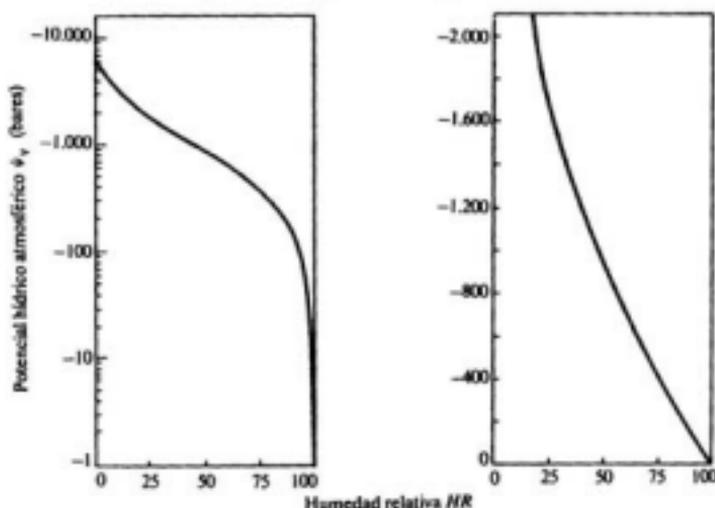


Figura 5.1.—Variación del potencial hídrico atmosférico con la humedad relativa.

### 5.3. Lugar de la transpiración

La transpiración mayoritariamente tiene lugar por las hojas, y concretamente en éstas por los estomas. Experiencias con estructuras aisladas de la planta revelan que existe una relación directa entre la abundancia de estomas en una estructura y su velocidad de transpiración. Si a una hoja se aplica un papel con  $\text{CoCl}_2$  seco que es azul, con el agua que se pierde por transpiración se hidrata y toma color rosa. La distribución de puntos rosa en el papel aplicado se corresponde exactamente con la distribución de estomas en la superficie de la estructura estudiada, lo que demuestra también el papel fundamental de los estomas en la transpiración. Que las hojas sean la estructura a través de la cual ocurre mayoritariamente la transpiración se debe precisamente a la abundancia de estomas en ellas.

Otras rutas posibles para la pérdida del agua en la planta por transpiración pueden ser la cutícula que recubre toda la epidermis (excepto el ostiolo de los estomas) y las lenticelas de los tallos. De todas formas, estas rutas son minoritarias en la mayoría de los casos, pues las lenticelas son mucho menos abundantes que los estomas y su contribución a la pérdida de agua es insignificante. La cutícula, a pesar de su gran superficie, es de naturaleza fuertemente hidrofóbica y, por tanto, muy impermeable al agua. Como veremos, su grosor es muy variable de unas plantas a otras, al objeto de oponer mayor o menor resistencia al paso del agua. Únicamente en condiciones de estomas bastante cerrados, la transpiración cuticular puede suponer un porcentaje considerable de la transpiración total. En experiencias con estomas cerrados se puede medir el valor de la transpiración cuticular. En su parte más externa, la cutícula está formada por ceras epicuticulares, que son una mezcla compleja de: ésteres de ácidos grasos y alcoholes de cadena larga, hidroxiácidos grasos, alcoholes libres, hidrocarburos y cetonas. La cutina es la porción mayoritaria y más interna de la cutícula; consiste en una mezcla compleja de hidroxiácidos grasos formando, con enlaces ésteres cruzados, una red macromolecular tridimensional (Fig. 5.2).

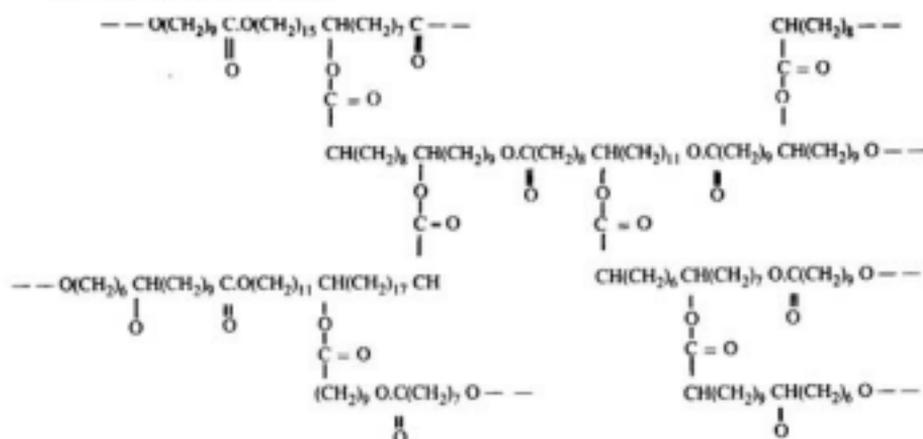


Figura 5.2.-Estructura de la cutina.

Además de su contribución minoritaria a la transpiración, los cambios de estado físico, composición química y grosor de la cutícula que puedan servir de control de la transpiración, son siempre mucho menos rápidos y reversibles que los cambios en el valor de la abertura estomática, de ahí que estos últimos se hayan estudiado más intensamente en lo que respecta a su papel en la transpiración.

Los estomas son discontinuidades del tejido epidérmico que resultan de la disposición frente a frente de dos células, característicamente diferentes de las del resto de la epidermis. La morfología de estas células, aunque variable de unas plantas a otras, recuerda en general la forma de una judía. En la figura 5.3 se representan esquemáticamente epidermis de hojas de distintos tipos de plantas mostrando los estomas. La disposición de estas dos células (llamadas oclusivas o de guarda) es tal, que quedan frente a frente las dos concavidades, dejando así un hueco llamado ostiolo que comunica directamente con la llamada cámara subestomática, la cual queda hacia dentro de la hoja por debajo del estoma y conectada al resto de los espacios aéreos del mesófilo. En la figura 5.4 se muestra gráficamente la relación de los estomas con los espacios aéreos del mesófilo. Al conjunto de células oclusivas y ostiolo se le llama estoma. En muchas plantas, sobre todo en las más evolucionadas, las células epidérmicas adyacentes a las oclusivas son morfológicamente diferentes de las del resto de las células epidérmicas, y se llaman células accesorias. Como veremos, estas células modificadas participan en el mecanismo de apertura y cierre del estoma que determina una mayor o menor superficie del ostiolo. Al conjunto de estoma y células accesorias se le llama aparato estomático. Aunque el término de células accesorias se reserva para las células epidérmicas morfológicamente diferentes, que hemos mencionado anteriormente, es probable que en plantas sin células con apariencia morfológica de accesorias, las células epidérmicas adyacentes a las oclusivas y no modificadas morfológicamente, cumplan funciones semejantes a las que, como veremos, se asignan a las células accesorias propiamente dichas.

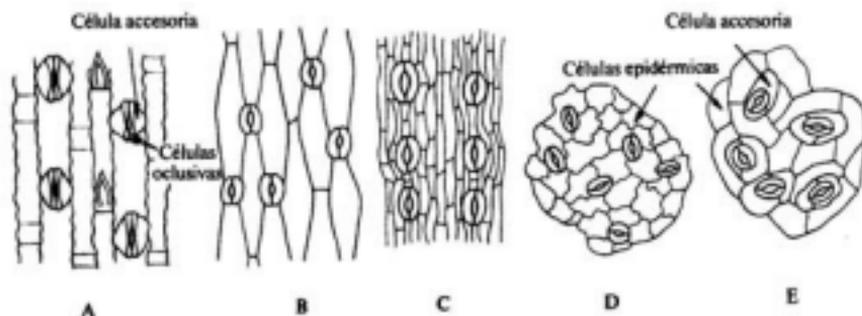


Figura 5.3.—Disposición típica de los estomas en epidermis de algunas plantas. (A) maíz, (B) cebolla, (C) pino, (D) judía, (E) plantas suculentas (tomado de R. G. Bidwell, *Plant Physiology*, Macmillan Publishing, Nueva York, 1974).

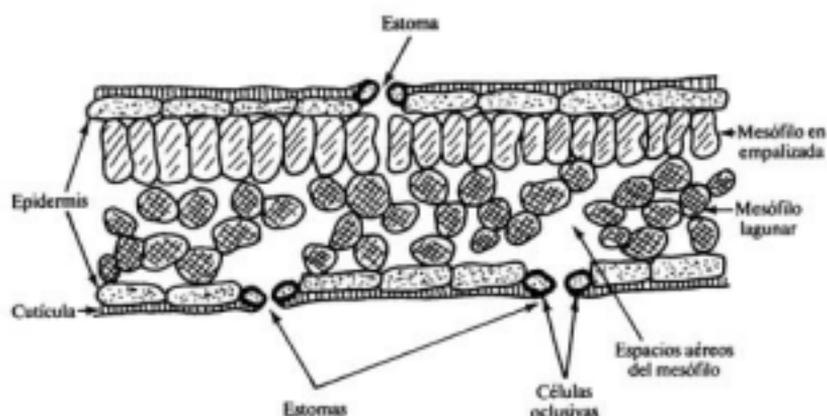


Figura 5.4.—Esquema de un corte típico de hoja mostrando la comunicación de los estomas con los espacios aéreos del mesófilo.

En general, los estomas aparecen distribuidos en la epidermis de hojas y tallos herbáceos, e incluso en regiones de flores y frutos, con una disposición irregular aunque con una densidad constante para epidermis del mismo tipo. En hojas, donde mayoritariamente ocurre la transpiración, el número de estomas por unidad de superficie es muy variable de una especie a otra, y dentro de una misma especie es, en general, mayor en el envés que en el haz. En la tabla 5.1 se indican algunos valores típicos de densidad de estomas en haz y envés de diversas plantas. Como puede observarse en dicotiledóneas, especialmente en árboles, en general es mayor la densidad de estomas en el envés que en el haz. En algunas plantas, especialmente monocotiledóneas, la densidad de estomas en el haz es sensiblemente igual, e incluso mayor, que en el envés. En plantas con hojas

TABLA 5.1

Densidad de estomas en las hojas de algunas especies (número/mm<sup>2</sup>)

Especie	Envés	Haz	Especie	Envés	Haz
Alfalfa .....	138	170	Manzano .....	294	0
Avena .....	23	25	Naranja .....	450	0
Begonia .....	40	0	Patata .....	160	51
Coleo .....	141	0	Peral .....	225	0
Geranio .....	59	19	Ricino .....	175	64
Girasol .....	150	85	Roble .....	820	0
Guisante .....	116	100	Tomate .....	130	12
Judía .....	280	40	Trigo .....	14	33
Maíz .....	68	52			

flotadoras sólo hay estomas en la cara superior. En plantas adaptadas a ambientes secos el número de estomas por unidad de superficie es muy bajo para reducir así las pérdidas de agua. Como una regla casi general, dentro de mesofitas cuanto mayor es el número de estomas por unidad de superficie, más pequeños son éstos y, por tanto, más pequeño su ostiolo, compensándose así un número bajo de estomas con una mayor superficie de cada uno de ellos. Algunas especies de *Isoetaceae* (pteridofitas) carecen de estomas y toman por las raíces el  $\text{CO}_2$  para la fotosíntesis.

#### 5.4. Características distintivas de las células oclusivas

Aparte de su morfología externa característica, las células oclusivas presentan una pared excepcionalmente engrosada en determinadas regiones que varían de unas plantas a otras. También, a diferencia del resto de las células epidérmicas, las células oclusivas contienen cloroplastos. Las posibilidades funcionales de estos cloroplastos no se conocen bien, aunque parece claro que no pueden realizar la asimilación fotosintética del  $\text{CO}_2$ . Aunque existe alguna discusión al respecto, parece que las células oclusivas tienen pocos o ningún plasmodesmo con las células que las rodean. En cualquier caso parece claro que los fenómenos de transporte entre células oclusivas y sus vecinas parecen controlados por mecanismos propios de nivel de membrana, y no existe un libre paso de sustancias entre ellas. De acuerdo con esto, el estado hídrico y los solutos contenidos en las células oclusivas pueden ser muy diferentes de los de las células adyacentes. Las células oclusivas suelen contener granos de almidón fácilmente visibles al microscopio y que son más abundantes con estomas cerrados que con estomas abiertos. Las células oclusivas pueden acumular grandes cantidades de catión potasio. Especialmente, contienen este ion en gran cantidad cuando los estomas están abiertos, para lo cual parecen tomarlo de las células próximas, accesorias o no, más que de los espacios intercelulares.

Esta acumulación de  $\text{K}^+$  no supone una pérdida relativa del mismo muy grande en el resto de la epidermis, ya que las células oclusivas tienen un volumen comparativamente pequeño (unos  $10^{-11}$  litros) y sólo son una porción minoritaria de la epidermis. Este hecho supone también que los requerimientos energéticos para la acumulación de solutos asociada con apertura y cierre de estomas serán una fracción insignificante dentro del balance energético de la planta.

Parece que otra característica excepcional de las células oclusivas es su bajo potencial osmótico. Se estiman valores de éste de entre  $-50$  y  $-100$  atmósferas, variables en un estoma dado según el tamaño de la célula oclusiva, que a su vez está relacionado con la mayor o menor abertura estomática. Cabe suponer que este bajo potencial osmótico vaya acompañado de un elevado potencial de presión, dando unos valores del potencial hídrico semejantes a los de otras células próximas.

En respuesta a distintos agentes, las células oclusivas toman o pierden agua, con lo que aumentan o disminuyen de volumen, y respectivamente se abre o se cierra el estoma, es decir, aumenta o disminuye el tamaño del ostiolo. Esta propiedad es fundamental para controlar la velocidad de transpiración de la planta, ya que ésta, mayoritariamente, ocurre via estomas.

Los estomas son, pues, estructuras fundamentales que controlan el intercambio gaseoso entre la atmósfera externa y los espacios aéreos del mesófilo. Los estomas no son sólo la vía de salida del vapor de agua, sino también de flujos de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ . Normalmente, el primero se dirige hacia el interior de la hoja, mientras que el  $\text{O}_2$  es perdido por la planta. Una mayor abertura del estoma significará, pues, una más rápida entrada del  $\text{CO}_2$  para ser utilizado en la fotosíntesis, una más rápida salida de  $\text{O}_2$  y una más rápida pérdida de agua por la planta. Variando, pues, la turgencia de las células oclusivas, se verán afectadas las velocidades de procesos tan importantes para la planta como son la fotosíntesis y la transpiración. Constituye, entonces, un aspecto de sumo interés, estudiar qué agentes, y de qué manera, controlan la turgencia de las células oclusivas, aspecto que abordamos en el apartado 5.8. Nos queda, sin embargo, por aclarar aquí cómo operan los cambios de turgencia de la célula oclusiva para que un aumento de ella signifique una mayor abertura del estoma, y a la inversa, una disminución de turgencia provoque cierre del estoma.

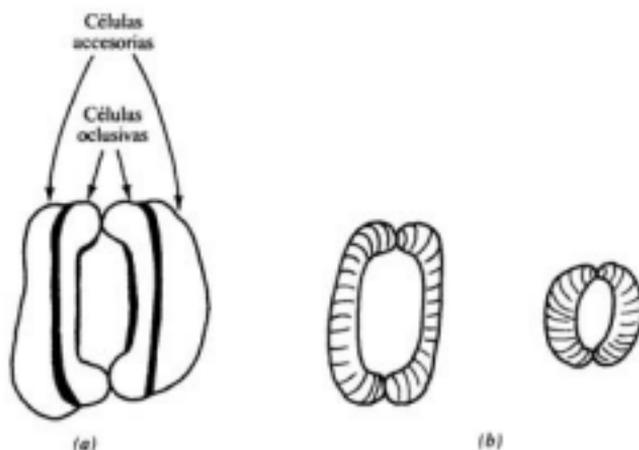


Figura 5.5.—a) Estoma de gramíneas mostrando los engrosamientos de las paredes de las células oclusivas. b) Disposición típica de las microfibrillas de celulosa en las células oclusivas.

Tradicionalmente se ha explicado la abertura de estomas por aumento de turgencia de las células oclusivas en función de la mayor o menor deformabilidad de las paredes de las células oclusivas, de manera que las regiones menos gruesas de las paredes, y, por tanto, más deformables por un aumento de turgencia están en zonas de la célula cuya dilatación determina apertura de estomas. Así, en las células oclusivas de gramíneas (Fig. 5.5a) que tienen forma parecida a la de un teléfono, las paredes más engrosadas son la ventral y dorsal, siendo menos engrosadas las zonas que se corresponden con el auricular y micro del teléfono. Una dilatación de estas últimas zonas por aumento de turgencia empuja hacia la zona de la pared dor-

sal al conjunto de ambas paredes ventral y dorsal, alejándose entre sí las paredes ventrales de las dos células oclusivas y abriéndose más el estoma. Esta forma de teléfono de las células oclusivas de gramíneas es un avance evolutivo respecto a otras plantas cuyas células oclusivas tienen forma más parecida a una judía. El volumen más pequeño de las células en forma de teléfono significa menos requerimiento energético en los procesos de transporte activo que se necesitan para los fenómenos de turgencia. Quizá más que la distribución de engrosamientos de paredes, es la especial distribución de las microfibrillas de celulosa de las paredes, la que determina los cambios de forma de las células oclusivas como consecuencia de los cambios de turgencia.

Como se indica en la figura 5.5b las microfibrillas de celulosa se disponen como anillos cerrados que rodean a la célula oclusiva y perpendiculares al eje del estoma. Esto significa que un aumento de tamaño de la célula sólo puede ocurrir en longitud (perpendicular al anillo de celulosa) no en grosor de la célula. La presión ejercida por el resto de la epidermis parece ser tal, que ésta cede más fácilmente por la zona de la pared dorsal que por los extremos de las células oclusivas, por lo que un aumento de longitud de éstas obligará a una curvatura de las mismas, quedando convexas en la zona dorsal y, por tanto, abriendo el ostiolo. En el caso de gramíneas, la abertura del estoma no requiere curvatura de la pared dorsal; toda ella es empujada junto con la ventral al aumentar la longitud de las zonas micro y auricular que son los extremos de la célula. Evidentemente, la presión ejercida por el resto de las células epidérmicas, y quizá también por células del mesófilo, debe jugar un papel importante en los cambios de forma de las células oclusivas. Probablemente ocurren cambios de turgencia de signo opuesto a los de las células oclusivas, en las células epidérmicas que las rodean, facilitando así los cambios de forma de las células de los estomas.

Los intercambios de agua de la célula oclusiva parecen ocurrir mayoritariamente con el agua de los espacios intercelulares próximos, que a fin de cuentas son ramificaciones de la corriente de agua que asciende desde el suelo. En las proximidades de la célula oclusiva, el agua de esta corriente ha de repartirse entre las células epidérmicas que la rodean y la misma célula oclusiva. No es de extrañar que una mayor demanda de ésta determine además una menor turgencia de las vecinas, y viceversa.

Los intercambios de agua de la célula oclusiva con la cámara subestomática no parecen probables. En primer lugar, porque separándolas está el agua de la pared celular de la célula oclusiva, y en segundo lugar porque aunque la humedad relativa en la cámara subestomática es alta (entre un 95 y un 99 por 100), su potencial hídrico resulta aún muy bajo (véase el apartado 5.2) como para que pueda existir paso de agua desde ésta hacia la célula oclusiva.

## **5.5. Métodos de medida de la transpiración. Expresión de los resultados**

Por su interés en la práctica agrícola y también porque la investigación de los mecanismos que operan en el control de la transpiración requiere la medida de ésta, se han

ideado diversas técnicas de medida de la transpiración. Revisaremos aquí sólo algunas de las más usadas. Ninguna es perfecta y aplicable a todas las condiciones. Según el material vegetal y el margen de error aceptable, se usará una u otra técnica y a veces se deberán usar y comparar diversas técnicas.

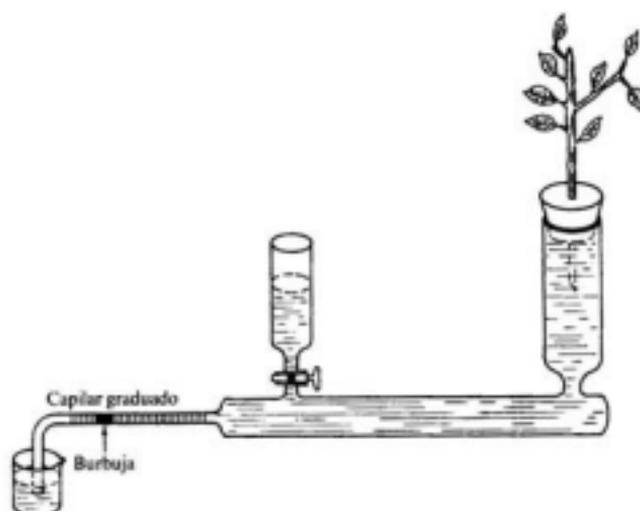


Figura 5.6.-Potómetro de inmersión.

Una técnica frecuentemente utilizada en el laboratorio, emplea el potómetro para la medida de la transpiración. En la figura 5.6 se representa esquemáticamente el empleo del potómetro. Para ello se coloca un corte de tallo usando un tapón de goma taladrado sumergido en un depósito de agua. El agua que pierde el depósito por la transpiración del corte de tallo se puede medir fácilmente por el movimiento de una burbuja a través de un pequeño capilar graduado conectado al depósito de agua en que se sumerge la porción cortada del tallo. Para el caso de una planta pequeña, se pueden sumergir todas las raíces. En realidad este método mide la absorción de agua, pero ésta, en la generalidad de los casos, es sensiblemente igual a la pérdida por transpiración. En cualquier caso, antes y al final de la corta experiencia se puede pesar el corte de tallo para corregir los datos con el agua retenida. De todas formas, las condiciones en que se realizan las medidas con el potómetro distan bastante de ser las condiciones en que se encuentra la planta en la naturaleza, de ahí que sus indicaciones sean sólo aproximadas.

En el caso de una planta colocada en una maceta, si ésta se cubre adecuadamente para evitar las pérdidas de agua por evaporación, siguiendo la disminución de peso del conjunto y corrigiendo con el agua añadida periódicamente a la maceta, se tiene una medida aproximada de la transpiración con la única corrección, significativa a tiempos largos, del aumento de tamaño de la planta. Este mismo método se emplea a escala

mucho mayor en los llamados lisímetros, en que una planta o varias de cierta envergadura se mantienen en el recipiente (lisímetro) de varios metros cúbicos, colocado sobre una balanza con la que se sigue el cambio de peso. Las plantas en un lisímetro se pueden someter a diversas condiciones de luz, temperatura, viento, etc., que se aproximen a las naturales y den una medida significativa de la transpiración.

Un método más de laboratorio que puede reproducir también condiciones casi naturales consiste en colocar la planta en una cámara en la que entra, a velocidad controlada, una corriente de aire de humedad conocida, la salida de aire se hace por otro tubo en el que se determina también la humedad del aire. La diferencia entre ambas permite determinar la velocidad de transpiración de la planta contenida en la cámara. Esta cámara puede estar acondicionada para imitar, dentro de ciertos límites, diversas situaciones ambientales de luz, temperatura, humedad, etc... En realidad, estas cámaras son utilizadas casi siempre para medir simultáneamente transpiración y fotosíntesis, determinando además de la humedad, el contenido de  $\text{CO}_2$  del aire de entrada y salida. Esta técnica, con muy variables dimensiones de la cámara, se puede aplicar en campo dentro de ciertas limitaciones, en especial las impuestas por la naturaleza del material de las paredes de la cámara que difícilmente será 100 por 100 permeable a las distintas longitudes de onda de la radiación solar.

Un método frecuentemente empleado consiste en cortar una hoja y seguir inmediatamente su pérdida de peso a lo largo del tiempo. Suele aceptarse, aunque no siempre debe ser cierto, que la velocidad inicial de pérdida de peso es igual a la velocidad de transpiración.

Como veremos, un gran número de factores que afectan a la velocidad de transpiración hacen que las medidas obtenidas por cualquiera de los métodos indicados deban tomarse con las adecuadas precauciones. En particular se debe considerar en cada método cuáles son los factores que se pueden haber variado respecto a las condiciones habituales de la planta o porción de la planta.

Los resultados de la medida de la transpiración se pueden expresar de diversas formas. Se denomina *intensidad* de transpiración a la masa de agua perdida por unidad de tiempo y unidad de superficie considerada de transpiración. Esta superficie puede ser de la hoja, de la planta, de la plantación, etc. La transpiración *relativa* designa al resultado de dividir la masa de agua transpirada por la masa de agua que se evapora en las mismas condiciones y en el mismo tiempo de una superficie igual de agua pura. Este cociente siempre es inferior a uno. La transpiración relativa no se afecta por la humedad atmosférica, cuyo efecto es igual sobre el numerador que sobre el denominador de la división que da la transpiración relativa. Otra forma de expresión de la transpiración, es como masa de agua transpirada dividida por la masa de agua que, en las mismas condiciones y tiempo, se evaporaría de una superficie de agua pura igual a la suma de superficies de ostiolas en esas condiciones, de la estructura vegetal considerada.

Así como la transpiración relativa es siempre inferior a uno, el cociente de transpiración a evaporación de superficie equivalente a la de ostiolas es siempre superior a uno. Como veremos a continuación, en las razones que justifican estas diferencias de ambos cocientes, están las causas de la gran eficacia de los estomas en el intercambio gaseoso de las hojas.

## 5.6. Eficacia de los estomas en el intercambio gaseoso.

### Medida de la abertura estomática

En sistemas experimentales artificiales se puede aproximar la situación de intercambio gaseoso a través de los estomas de una hoja estudiando la difusión de un gas (vapor de agua,  $\text{CO}_2$ , etc.) a través de taladros realizados sobre una fina placa de un material impermeable al gas estudiado. Los taladros en una disposición regular equivaldrían a los estomas situados en un material impermeable que imitaría a la epidermis. Esa fina placa taladrada, colocada sobre una superficie de agua líquida, imitaría bastante bien la situación de la pérdida de agua por la hoja. Se puede estudiar el efecto del tamaño de los poros practicados en la placa (dentro de los márgenes de tamaños de estomas) y de la distancia entre ellos, sobre la velocidad de pérdida de agua y en general de difusión de los gases.

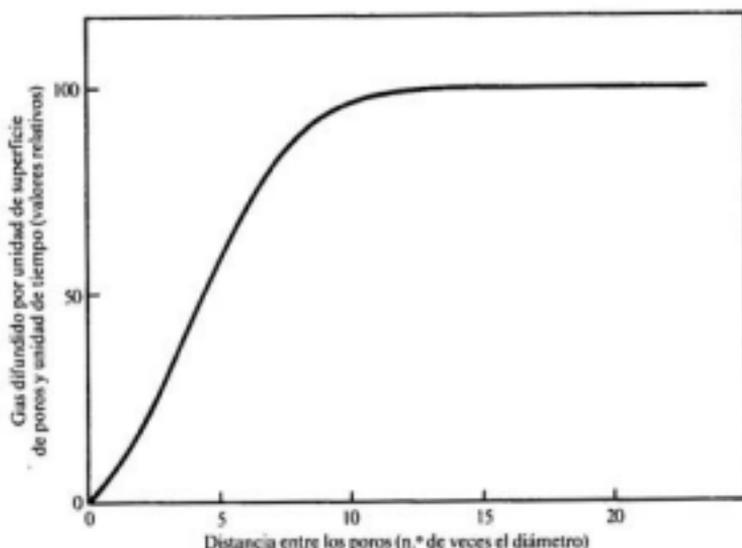


Figura 5.7.—Influencia de la distancia entre los poros sobre la velocidad de difusión de un gas a través de una superficie impermeable con poros de  $20 \mu\text{m}$  de diámetro.

Como puede verse en la figura 5.7, la difusión de un gas por unidad de superficie de poros aumenta al aumentar la distancia entre ellos. A pequeñas distancias, pequeños aumentos de éstas determinan un rápido aumento de la velocidad de difusión; a distancias mayores, los aumentos van siendo más pequeños y la difusión por unidad de superficie se aproxima asintóticamente a un valor máximo que prácticamente se alcanza con distancias 10 veces el diámetro de los poros. Es significativo en este sentido que la separación aproximada de los estomas en la mayoría de las plantas de climas templados sea

del orden de 10 veces el tamaño medio de los ostiolos. Quiere decir esto que la tendencia evolutiva ha llevado a que las hojas, para un tamaño determinado de estomas, tengan el máximo de capacidad de intercambio gaseoso con el mínimo número de estomas.

Para comprender físicamente la razón de la eficacia de la difusión a través de poros con una distancia mínima entre ellos, hay que recordar que la velocidad de difusión es proporcional al gradiente de la sustancia a difundir. Si cerca de una abertura, a través de la cual se puede difundir una sustancia, existe una segunda abertura, la sustancia que se difunde por ésta hace que sea menor el gradiente que encuentra la sustancia que se va a difundir por la primera abertura. La interacción a la inversa de la primera sobre la segunda abertura, también es cierta, y en conjunto significa que el flujo por abertura individual sea menor, aunque el flujo total por las dos aberturas sea mayor que lo sería por una sola de ellas. Situándonos en el caso de los estomas en la hoja, en el exterior y en las proximidades de un estoma abierto, la humedad es menor cuando nos alejamos del estoma, debido al vapor que continuamente sale por el ostiolo y que se va diluyendo en el mayor volumen de las lejanías del ostiolo. Si dos estomas están muy juntos, las humedades de las proximidades de cada uno de ellos dificultan (hacen menor el gradiente) la difusión por el otro. Sobre este punto volveremos para un tratamiento cuantitativo en el apartado 5.11.

Es evidente, por tanto, que todos los ostiolos de una hoja separados transpiran más,

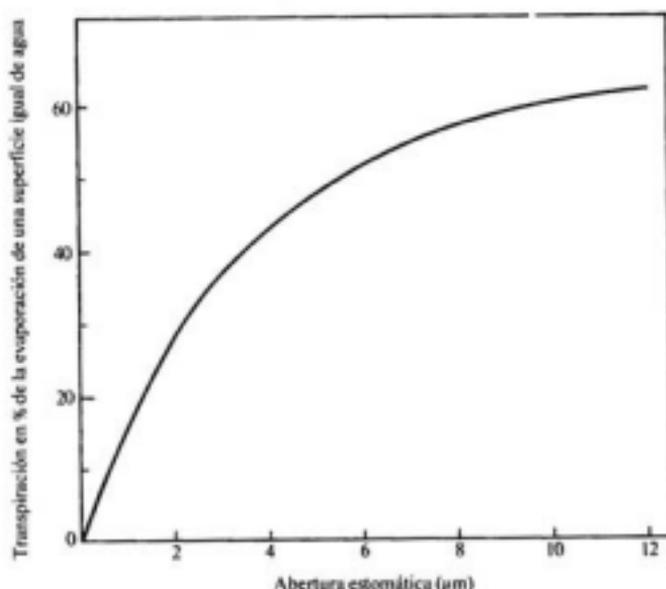


Figura 5.8.—Variación típica de la velocidad de transpiración en función de la abertura estomática. El pequeño valor de la transpiración a abertura 0, corresponde a la transpiración cuticular.

que agua se evaporaría de una superficie de agua pura igual a la suma de superficies de ostiolos, y en consecuencia el cociente de ambos valores será mayor que uno como apuntábamos en el apartado anterior.

En la figura 5.8 se muestra el efecto de la mayor o menor abertura estomática en la velocidad de transpiración. Como puede verse, a pequeñas aberturas cambios pequeños de éstas determinan cambios bruscos de la velocidad de transpiración. Sin embargo, con estomas bastante abiertos, aumentos de la abertura determinan pequeños aumentos de la transpiración. En este ejemplo la relación diámetro de ostiolo a distancia se va haciendo menor al aumentar aquél, con lo cual, aunque aumenta la transpiración, aumenta más rápidamente la superficie del ostiolo y, por tanto, la transpiración por unidad de superficie de ostiolo abierto disminuye. El término diámetro de ostiolo es operacional y con él designamos al de un círculo del mismo área que el ostiolo. En la figura 5.8 se ha representado la transpiración en tanto por ciento de la evaporación de una superficie de agua pura igual a la de la hoja (es decir, se ha representado la transpiración relativa multiplicada por 100). De nuevo se pone de manifiesto la eficacia de los estomas en el intercambio gaseoso; con una superficie total de ostiolos que en ningún caso sobrepasa el 4 por 100 de la superficie total de la hoja, se llegan a valores de transpiración de un 60 por 100 del valor de evaporación de una superficie de agua pura igual a la del total de la hoja. Aunque, como hemos apuntado en el apartado anterior, la transpiración relativa nunca puede llegar al valor de 1, son significativos los altos valores que alcanza con tan pequeña proporción de superficie de libre transpiración.

Debe resultar ya evidente la gran importancia que la mayor o menor abertura estomática tiene en la transpiración. De ahí que se hayan ideado diversas técnicas para

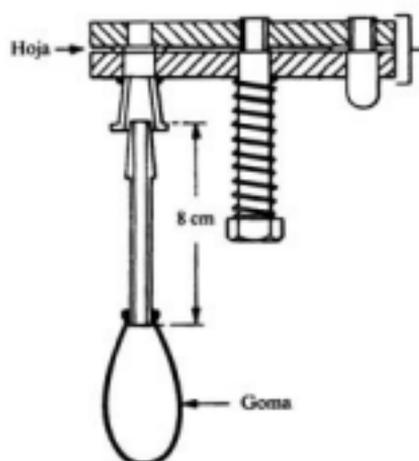


Figura 5.9.—Porómetro de campo. Antes de colocar la hoja se comprime la goma. El tiempo requerido por la goma para recuperar su forma es inversamente proporcional a la porosidad de la hoja que se coloca.

medir dicha abertura. La medida de la abertura de estomas sometidos a diversas condiciones, se puede realizar por observación microscópica de los estomas o de moldes de la superficie de la epidermis, obtenidos con sustancias que se hacen solidificar rápidamente sobre ella. Se trata, en cualquier caso, de métodos lentos y que no se pueden acoplar a sistemas de registro automático.

Se han desarrollado métodos indirectos de medida de abertura estomática más rápidos que se puedan acoplar a sistemas de registro midiendo la permeabilidad o porosidad de la hoja a un gas. En el *porómetro* se aplica a un lado de la hoja un gas determinado, a presión o no. Al otro lado, en un recipiente también adosado a la hoja, se puede registrar el aumento de concentración de ese gas con el tiempo, por ejemplo, por un método espectrofotométrico. La velocidad de aumento de concentración se puede calibrar previamente con un método directo para relacionarlo con la abertura estomática. Existen porómetros aún más simples (Fig. 5.9) también basados en suponer una relación directa entre abertura estomática y permeabilidad de una hoja a los gases. En cualquier caso se deben tomar precauciones en la interpretación de los resultados, sobre todo por la posible alteración de la abertura estomática al aplicar el porómetro.

## 5.7. Factores externos que afectan a la velocidad de transpiración

Dentro de los factores que afectan a la transpiración, los hay que afectan sólo al proceso de difusión en sí, los hay que sólo afectan al grado de abertura estomática y los hay que afectan a ambos, difusión y abertura estomática. En este apartado consideraremos efectos típicos en la generalidad de las plantas sin entrar en tratamientos cuantitativos. Estos últimos, así como los factores propios de la planta, se dejan para apartados posteriores. De todas formas muchos factores que consideraremos como factores propios de la planta, como ciertas adaptaciones a ambientes secos, resultan de una adaptación reversible a diversos factores ambientales. Hay incluso adaptaciones permanentes hereditarias que también han resultado evolutivamente de la respuesta por selección natural a condiciones ambientales determinadas. Un poco arbitrariamente al hablar aquí de factores externos nos referimos a factores que determinan una respuesta rápida en la velocidad de transpiración.

### 5.7.1. Humedad atmosférica

En la transpiración la última etapa consiste en la difusión del vapor de agua desde la cámara subestomática al exterior. Por las leyes de la difusión (Cap. 6), el flujo de una sustancia es proporcional al gradiente de concentración de esa sustancia. En una forma aproximada, proporcional en nuestro caso a la diferencia de humedad entre la cámara subestomática y el exterior. Por tanto, un aumento de humedad atmosférica determina una disminución de la transpiración porque disminuye la diferencia de humedad entre la cámara subestomática y el exterior. A pesar, o quizá en relación con esta disminución de la transpiración, un aumento de la humedad atmosférica favorece una mayor abertura estomática que haría aumentar la transpiración. De estos dos efectos opuestos del aumento de la humedad atmosférica sobre la velocidad de la transpiración, siempre

predomina el primero, y el efecto neto es que disminuye la velocidad de transpiración, por supuesto favoreciendo al mismo tiempo la entrada de  $\text{CO}_2$  para fotosíntesis.

### **5.7.2. Humedad del suelo**

A mayor humedad del suelo mayor absorción de agua, en consecuencia potencial hídrico más alto en general en la planta y específicamente en la célula oclusiva, mayor turgencia de ésta y estoma más abierto. La humedad exclusivamente del suelo no afecta sensiblemente al gradiente de humedad a través del estoma; en consecuencia, el único efecto de la mayor humedad del suelo favoreciendo mayor abertura de estomas determinará una mayor transpiración. Por las razones apuntadas, aquellos factores que puedan afectar a la absorción de agua por las raíces (temperatura, ventilación, etc.) afectarán en el mismo sentido a la abertura estomática y a la transpiración.

### **5.7.3. Concentración de $\text{CO}_2$ atmosférico**

La concentración de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera afecta sensiblemente a la transpiración. A mayor concentración de  $\text{CO}_2$  menor abertura estomática y menor velocidad de transpiración. Una alta concentración de  $\text{CO}_2$  puede incluso cerrar totalmente el estoma. El significado fisiológico de esta respuesta parece residir en el papel que los estomas juegan en establecer un adecuado balance entre fotosíntesis y transpiración. En efecto, la demanda fotosintética de  $\text{CO}_2$  en una situación dada requiere una determinada abertura estomática para un gradiente determinado de  $\text{CO}_2$  entre el exterior y la cámara subestomática. Si este gradiente aumenta, en principio habría más flujo de  $\text{CO}_2$  en relación con la demanda fotosintética; este flujo en exceso se corrige con una menor abertura estomática, logrando así una menor pérdida de agua de la planta por transpiración.

Los márgenes de concentración de  $\text{CO}_2$  en que responden los estomas están, en la mayoría de las plantas, dentro de sus variaciones usuales en la atmósfera, lo que refuerza la idea de que esta respuesta es un sistema de que la planta logre la máxima economía de agua con los requerimientos fotosintéticos usuales. Hay que tener en cuenta que, por ejemplo, la concentración de  $\text{CO}_2$  puede bajar mucho en una densa comunidad vegetal (ver 17.2.2).

La respuesta estomática a los cambios de concentración de  $\text{CO}_2$  atmosférico es rápida, en unos 5 segundos ya se ha logrado la mitad de la magnitud final de respuesta. La respuesta ocurre tanto en la luz como en la oscuridad.

La estructura que finalmente detecta el cambio de concentración de  $\text{CO}_2$  es la misma célula oclusiva. En ella, la concentración de  $\text{CO}_2$  depende de la concentración de éste en los espacios aéreos del mesófilo y del metabolismo del  $\text{CO}_2$  en la propia célula oclusiva. Asimismo, la concentración de  $\text{CO}_2$  en los espacios aéreos del mesófilo es mayoritariamente el resultado del balance entre la velocidad de difusión del  $\text{CO}_2$  hasta ellos desde el exterior, y la velocidad de consumo fotosintético del mismo en las células mesofílicas. Así, un aumento de la concentración externa de  $\text{CO}_2$  determina inicialmente un mayor flujo del mismo al interior, que a su vez determina un aumento de concentración de  $\text{CO}_2$  en los espacios aéreos del mesófilo, sólo parcialmente

compensado con una mayor fotosíntesis. Por un razonamiento similar, el aumento de concentración de  $\text{CO}_2$  en los espacios aéreos del mesófilo, determina un aumento de la concentración del mismo en la célula oclusiva; este aumento en dichas células actúa como una señal que inhibe la causa que la originó, cerrando parcialmente el estoma, con lo que disminuye ahora la entrada de  $\text{CO}_2$  y dando una cadena de acontecimientos opuesta a la descrita anteriormente. A través de este sistema oscilante que se amortigua rápidamente, se alcanza una situación estacionaria con una nueva abertura estomática para la nueva concentración externa de  $\text{CO}_2$ .

#### 5.7.4. Iluminación

Un aumento de iluminación abre estomas, y, por tanto, aumenta la transpiración en una respuesta que requiere aproximadamente una hora. La disminución de luz cierra estomas en una respuesta algo más rápida que la anterior. El sentido fisiológico es bien aparente; en ausencia de luz no es posible la fotosíntesis, no es necesario el  $\text{CO}_2$  y, por tanto, se cierran estomas para evitar la pérdida de agua. Una interpretación rápida de estas explicaciones podría sugerir que la transpiración es un mal inevitable que acompaña al necesario intercambio gaseoso fotosintético y que dentro de lo posible la transpiración se evita al máximo. Como veremos al final del capítulo, la realidad no es tan simple, e incluso ya en el capítulo anterior hemos podido ver cómo la transpiración moviliza una poderosa corriente de agua en la planta.

Como resultado del efecto de la luz a lo largo de las 24 horas en condiciones normales, los estomas y la transpiración oscilan en abertura e intensidad respectivamente, estando abiertos y con intensa transpiración durante el día y a la inversa de noche.

Un examen del efecto comparado de luz de distintas longitudes de onda provocando apertura estomática, revela que las longitudes de onda más eficaces provocando apertura estomática son las mismas que resultan más eficaces en fotosíntesis. Parece, pues, probable que el efecto de la luz abriendo estomas sea debido a que aumenta la fotosíntesis y, por tanto, disminuye la concentración de  $\text{CO}_2$ , con lo que se abre el estoma, según hemos visto. La luz tiene así un efecto activando la fotosíntesis en el mesófilo y en las células oclusivas. Existen muchas pruebas que sugieren que los efectos principales de la luz están mediados, vía fotosíntesis, por su efecto sobre la concentración estacionaria de  $\text{CO}_2$  en la célula oclusiva, pruebas que a su vez apoyan la afirmación que hacíamos anteriormente de que la estructura que finalmente detecta cambios de concentración de  $\text{CO}_2$  es la célula oclusiva. Así, por ejemplo, los estomas de hojas etioladas, sin clorofila ni estructuras fotosintéticas, no responden a la luz. Si se tratan las hojas con DCMU (un inhibidor de la fotosíntesis, capítulo 12), la luz no provoca apertura de estomas.

Existe una importante excepción a esta respuesta casi general de abrir estomas con luz. Las plantas suculentas abren sus estomas de noche y las cierran de día. Como veremos en capítulos posteriores, las plantas suculentas han desarrollado un mecanismo fotosintético especial por el que fijan  $\text{CO}_2$  de noche, reduciéndolo de día para sintetizar material orgánico. De hecho, la reducción del  $\text{CO}_2$  fijado es el proceso que realmente requiere los productos que se forman en la etapa luminosa de la fotosíntesis. De esta manera, las plantas que han desarrollado suculencia de un órgano fotosintético son plan-

tus adaptadas a ambientes áridos en que mantienen cerrados los estomas de día, evitando la pérdida de agua, y los abren de noche, cuando las bajas temperaturas hacen que para una misma cantidad de agua en la atmósfera ésta se encuentre más saturada de humedad. Se evita de noche una pérdida excesiva de agua, pues el gradiente de ésta a través del estoma es desfavorable, y se favorece en cambio la entrada de  $\text{CO}_2$ . En lo que sigue, salvo que se diga expresamente, nos referimos a transpiración de plantas no suculentas.

Además del efecto de la luz típica de la fotosíntesis, existe un efecto sobreimpuesto de abertura estimulada por luz azul, menos importante cuantitativamente, y cuyo mecanismo se estudia actualmente. Una posibilidad no confirmada con claridad todavía es la posible participación de Fitocromo (Cap. 30) en las respuestas estomáticas.

Cuando la planta se encuentra en un acusado déficit hídrico, los estomas se cierran. En la mayoría de las plantas mesofitas, valores de potencial hídrico de  $-10$  atmósferas provocan cierre de estomas en 10 ó 15 minutos, aun en presencia de luz y ausencia de  $\text{CO}_2$ , es decir, se trata de un efecto que predomina sobre cualquier otro. El cierre de estomas, además de cortar la transpiración, impide la entrada de  $\text{CO}_2$  para la fotosíntesis. Incluso la fotosíntesis es sacrificada para evitar pérdidas excesivas de agua que pueden ser fatales. Se ha podido comprobar que el efecto de los bajos potenciales hídricos está mediado por el ácido abscísico (ABA), hormona retardante del crecimiento, que se estudia en capítulos posteriores. Los niveles de esta hormona suben bruscamente entre los 5 y los 8 minutos después de bajar el potencial hídrico. Estos altos niveles interfieren el funcionamiento del estoma en la forma que estudiaremos en el apartado 5.8. En algunos casos se ha descrito antagonismo de citokininas, hormonas estimulantes del crecimiento, con la acción del ABA cerrando estomas.

El cierre de estomas por bajos potenciales hídricos de las hojas es frecuente en condiciones naturales. En muchas plantas en días cálidos y luminosos, al comienzo de la tarde, el exceso de transpiración provoca una bajada transitoria del potencial hídrico, que a su vez determina un cierre más o menos pronunciado del estoma.

### 5.7.5. Concentración de oxígeno

Los efectos de concentraciones variables de oxígeno sobre la abertura estomática son complejos y dependen de la presencia o no de luz, de la temperatura, del  $\text{CO}_2$  presente, e incluso del mismo margen de variación que se considere de las concentraciones de  $\text{O}_2$ . En general, una concentración atmosférica alta de  $\text{O}_2$  favorece el cierre de estomas. Aparte de posibles efectos, que se discutirán más adelante, sobre el papel del oxígeno para la producción respiratoria de ATP que se pueda requerir para los movimientos del estoma, parece claro un efecto decisivo del  $\text{O}_2$  al favorecer la formación de  $\text{CO}_2$  (vía respiratoria mitocondrial y/o fotorrespiración) y con ello cierre de estoma.

La dependencia de los efectos del oxígeno de otros factores depende en buena medida del efecto de estos factores sobre los procesos de formación de  $\text{CO}_2$  con oxígeno. Por ejemplo, la formación en fotorrespiración del  $\text{CO}_2$  requiere también luz y es afectada por la temperatura. Se podrían citar muchos casos en este sentido cuya comprensión requiere un conocimiento más detallado de los procesos respiratorios de plantas que se tratan en capítulos posteriores.

No debe extrañar que el oxígeno, a pesar de ser un gas que se ha de difundir por el estoma, no tenga un efecto directo sobre los movimientos de éste. La concentración atmosférica del oxígeno es mucho más alta que la del  $\text{CO}_2$ . Pequeños cambios relativos de la concentración de oxígeno a cualquier lado del estoma son mucho más altos en valor absoluto que los que puedan darse para el  $\text{CO}_2$ . Alcanzar difusiones de oxígeno equivalentes a las del  $\text{CO}_2$  puede lograrse, pues, con menor superficie de difusión, debido a que puede formarse fácilmente un gradiente de oxígeno muy elevado.

### 5.7.6. Temperatura

En general, las temperaturas elevadas favorecen la transpiración. Sus efectos sobre la abertura estomática son complejos y variables de unas plantas a otras, según veremos. Pero con independencia del efecto sobre los estomas, las temperaturas elevadas aumentan la velocidad de salida del agua.

El rápido aumento de la presión de saturación de agua en la atmósfera al aumentar la temperatura (Fig. 5.10) hace que para una humedad absoluta determinada en la atmósfera, al aumentar la temperatura disminuya rápidamente la humedad relativa, con lo cual aumenta el gradiente de difusión de vapor de agua entre la cámara subestomática (que siempre contiene una alta humedad relativa) y el exterior, y con ello la transpiración. Por otra parte, al aumentar la temperatura, aumenta el coeficiente de difusión del vapor de agua y con ello de nuevo la velocidad de transpiración.

Como hemos indicado, el efecto de la temperatura sobre la abertura estomática es complejo. En general, aumentos de temperatura en el rango de  $0^\circ\text{C}$  a  $30^\circ\text{C}$  favorecen la abertura estomática. Aunque no está claramente establecido, parece ser que en el rango considerado, la respuesta a los cambios de temperatura se debe al efecto de ésta sobre los mecanismos de respuesta al  $\text{CO}_2$ , que veremos en el apartado siguiente. Así pues, a temperaturas moderadas, los aumentos de éstas aumentan la transpiración por favorecer el proceso de difusión y la apertura estomática.

Temperaturas superiores a  $30^\circ\text{C}$  o  $40^\circ\text{C}$ , en general, favorecen el cierre de los estomas. Parece ser que esto se debe a que con estas temperaturas se favorecen los procesos respiratorios más que los fotosintéticos, con lo que la cantidad de  $\text{CO}_2$  aumenta y se cierra el estoma. De todas formas, temperaturas muy elevadas pueden provocar insensibilización del estoma al  $\text{CO}_2$ , con lo cual el estoma permanece abierto y el efecto refrigerante de la transpiración evita los efectos dañinos de las temperaturas altas en las hojas.

Es probable que las temperaturas elevadas tengan otro efecto, favoreciendo la permeabilidad al agua de la cutícula y, con ello, aumentando la transpiración cuticular.

### 5.7.7. Velocidad del viento

La velocidad del viento no tiene un efecto directo sobre la abertura estomática, pero tiene un gran efecto sobre la transpiración por afectar al gradiente de humedad a través del estoma. Como veremos al estudiar cuantitativamente la transpiración, junto a la abertura estomática, un factor que puede ser limitante es la velocidad de difusión del vapor de agua a través de la capa de aire inmóvil adherida a la superficie de la hoja.

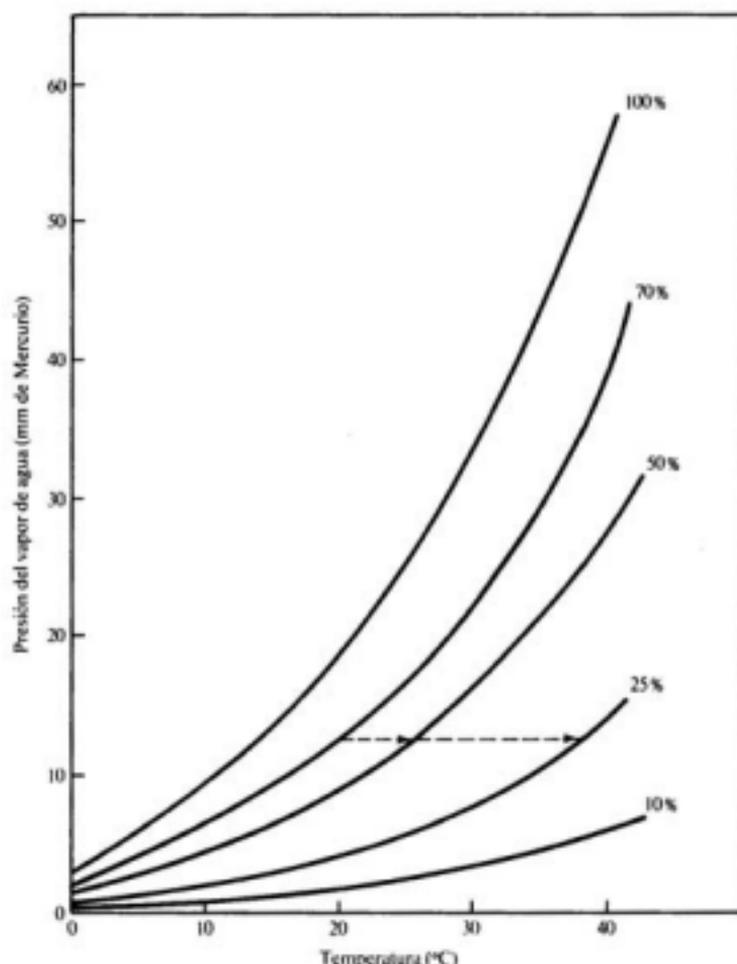


Figura 5.10.-Efecto de la temperatura sobre la presión de saturación de vapor de agua atmosférico (100 por 100 de humedad relativa). Se incluyen las presiones de vapor para humedades relativas no saturantes. En la línea de trazo discontinuo, se puede ver el efecto de aumentos de temperaturas sobre la humedad relativa, para una misma presión de vapor de agua.

Sobre esta capa, el vapor de agua se difunde según la ley de Fick (apartado 5.11 y capítulo 6), en la cual el gradiente:  $dc/dx$ , se puede aproximar por  $\Delta c/\Delta x$ . Donde  $\Delta c$  es la diferencia de concentración de vapor de agua entre la cámara subestomática y los límites externos de la capa inmóvil, y  $\Delta x$  es el grosor de esa capa inmóvil de aire. El gradiente será, entonces, tanto mayor cuanto menor sea  $\Delta x$ , y éste es tanto menor cuanto mayor es la velocidad del viento. En efecto, según su velocidad, el viento «barre» más o

menos esa capa de aire inmóvil, de forma que a mayor velocidad del viento menor espesor de la capa inmóvil.

En consecuencia, cuanto mayor es la velocidad del viento mayor es la velocidad de transpiración.

Como veremos más adelante (apartado 5.11) en condiciones de estomas bastante abiertos y velocidades del viento bajas, estas velocidades más que la abertura estomática, son el factor limitante en la velocidad de transpiración, debido a la gran barrera a la difusión que supone la gruesa capa de aire inmóvil adherida a la hoja.

Los efectos que hemos visto sobre la transpiración, operando en conjunto, determinan una eficaz regulación de la economía hídrica. Nosotros nos hemos referido siempre a efectos iniciales de cada factor ambiental. De operar un factor de una manera prolongada, puede dar lugar a nuevos factores, estos a otros y así sucesivamente. Por ejemplo, un viento intenso, debido a la gran transpiración que provoca da lugar a un enfriamiento de la hoja que tiene otra serie de consecuencias en las velocidades de difusión en los niveles estacionarios de  $\text{CO}_2$  y también en la propia magnitud del gradiente a través del estoma, pues si la hoja está más fría que el ambiente, aunque la humedad relativa en éste sea menor que en la cámara subestomática, la concentración de agua puede ser mayor en la atmósfera externa y no ocurrirá la transpiración. En este caso se llega a una temperatura de equilibrio de la hoja. En cada caso un estudio cuantitativo y detallado nos podrá informar sobre la evolución del proceso de transpiración con el tiempo.

## 5.8. Mecanismos de control de la abertura estomática

Como hemos podido ver, un buen número de factores externos, y aun el propio estado hídrico de la planta, tienen un efecto acusado sobre la abertura estomática. A través de este efecto ejercen su control sobre la velocidad de transpiración.

Ya hemos visto en el apartado 5.4 cómo los cambios reversibles de apertura y cierre de estomas están determinados por cambios de turgencia de las células oclusivas. La cuestión consiste ahora en aclarar cómo esos cambios de turgencia pueden estar determinados por los factores que hemos visto que afectan a la abertura estomática.

En primer lugar es preciso concretar la naturaleza de estos cambios de turgencia. Múltiples resultados experimentales demuestran que la apertura de los estomas, en la mayoría de las plantas, resulta de una acumulación de iones, principalmente  $\text{K}^+$ , en las células oclusivas. A causa de esta acumulación, disminuye el potencial osmótico en las células oclusivas (por tanto disminuye el potencial hídrico), lo que determina una entrada de agua y con ello la turgencia de las células oclusivas que lleva a la apertura del estoma. Experimentos que usan isótopo  $^{42}\text{K}^+$  no parecen dejar dudas a la anterior interpretación. En sistemas artificiales el  $\text{K}^+$  puede ser sustituido por  $\text{Rb}^+$  y en la naturaleza quizá en halofitas en ciertas condiciones, el  $\text{K}^+$  puede ser sustituido por  $\text{Na}^+$  como agente osmóticamente activo en los cambios de turgencia observada.

Aun corregidos por el aumento de volumen celular, los aumentos de concentración de  $\text{K}^+$  en la célula oclusiva con el paso de estoma cerrado a estoma abierto son de aproximadamente 0,3 M. Estos aumentos, por sí solos, significarían disminuciones

de potencial osmótico de aproximadamente 6 atmósferas. Aparte, habrían de tenerse en cuenta los transportes asociados de otros iones para mantener la electroneutralidad de la célula oclusiva. Entre estos transportes, está, por una parte, el del ion  $\text{Cl}^-$  que entra en cierta medida acompañando al  $\text{K}^+$  y que, por tanto, también contribuye a disminuir el potencial osmótico de la célula oclusiva. La cantidad de  $\text{Cl}^-$  que penetra varía de unas plantas a otras, teniendo en muchos casos un valor próximo al 40 por 100 de la cantidad de  $\text{K}^+$  que penetra. El resto de la carga positiva que daría el exceso de  $\text{K}^+$  en la célula, es compensado por una salida equivalente de protones la cual, en cambio, no significa un aumento de potencial osmótico en la célula oclusiva, pues los protones proceden de la disociación del ácido málico. Éste se forma en un proceso que es, según muchos autores, el que inicia la serie de acontecimientos que llevan a un aumento de  $\text{K}^+$  en la célula. En síntesis, la idea más aceptada hoy día sobre estos acontecimientos es la siguiente: el almidón es degradado, vía glicolisis, hasta fosfoenolpirúvico (PEP) que con  $\text{CO}_2$  en reacción catalizada por fosfoenolpirúvico carboxilasa da ácido oxalacético, éste pasa a ácido málico con piridín nucleótido reducido en reacción catalizada por málico deshidrogenasa. Los protones del málico salen al exterior, determinando así una entrada de  $\text{K}^+$  para neutralizar la carga eléctrica de la célula. Adicionalmente entra una cantidad menor de  $\text{K}^+$  acompañado de  $\text{Cl}^-$ . Con más detalle este modelo requiere una serie de precisiones que pasamos a analizar.

Como ya se indicó en el apartado 5.4, el almidón de las células oclusivas es menos abundante con estomas abiertos. No parece que como resultado de la degradación del almidón con la apertura estomática, se acumulen monosacáridos en una cantidad significativa como para ser ellos los responsables de las disminuciones de potencial osmótico que provocan el aumento de turgencia de las células oclusivas (Sayre y Scarth). En lugar de una acumulación de monosacáridos, éstos son finalmente transformados en ácido málico. Es sorprendente que el proceso de apertura estomática requiere  $\text{CO}_2$  en una cantidad significativa para el paso de fosfoenolpirúvico a oxalacético cuando, como hemos visto, un aumento de la concentración de  $\text{CO}_2$  en la célula oclusiva determina cierre de estomas. Sin embargo, existen pocas dudas en cuanto a que tiene lugar una acumulación de málico junto con  $\text{K}^+$  en la vacuola de la célula oclusiva con el estoma abierto. Es significativo que en algunas plantas, el máximo de abertura estomática no ocurre en atmósferas libres de  $\text{CO}_2$ , sino con una baja concentración de éste.

En las células oclusivas de algunas plantas no se ha encontrado almidón. Puede ocurrir que en su lugar se encuentre otro polímero de reserva, o que tomen precursores de ácido málico de otras células.

Existen varias etapas en el mecanismo propuesto que pueden requerir energía. Así, puede requerir energía la entrada de malato en la vacuola, la salida de protones de la célula oclusiva y/o la entrada de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la célula oclusiva. También parecen requerir energía los procesos asociados al cierre de estomas. Los protones salen al exterior por una bomba electrogénica que utiliza ATP (mecanismo quimiosmótico). El ATP parece ser suministrado, mayoritariamente, por la fosforilación oxidativa (Cap. 20) en las abundantes mitocondrias de las células oclusivas. Los cloroplastos de las células, que no pueden convertir  $\text{CO}_2$  en azúcares pero incluyen los dos fotosistemas (Cap. 12),

parecen también proporcionar ATP por fotofosforilación. La entrada de  $K^+$  parece ser pasiva, a través de canales iónicos específicos, como resultado del potencial eléctrico creado por la salida de protones.

Para el cierre de estomas es fundamental la disminución de la cantidad de malato; los niveles estacionarios de éste deben resultar de un equilibrio entre la velocidad de su síntesis y la de su degradación. Cuando disminuye la síntesis predomina la degradación y disminuirá la concentración de malato. Se sabe poco del destino de éste en su degradación, y menos aún de un posible control de la degradación, tal como ocurre con el control de la síntesis por los factores externos según vamos a ver.

Un gran número de efectos sobre la apertura estomática, están mediados por cambios en la concentración de  $CO_2$ . Se plantea, pues, el problema de cómo el  $CO_2$  afecta a la apertura estomática. En este sentido ya hemos mencionado la paradoja de que éste se necesite para los procesos metabólicos que llevan a la apertura de estomas y al mismo tiempo provoque cierre de estomas. Más aún, existen indicios de que la respuesta a altas concentraciones de  $CO_2$  cerrando estomas está mediada también por fosfoenolpirúvico carboxilasa como indican las similares cinéticas de saturación con  $CO_2$  de la velocidad del enzima y de la respuesta de cierre de esto-

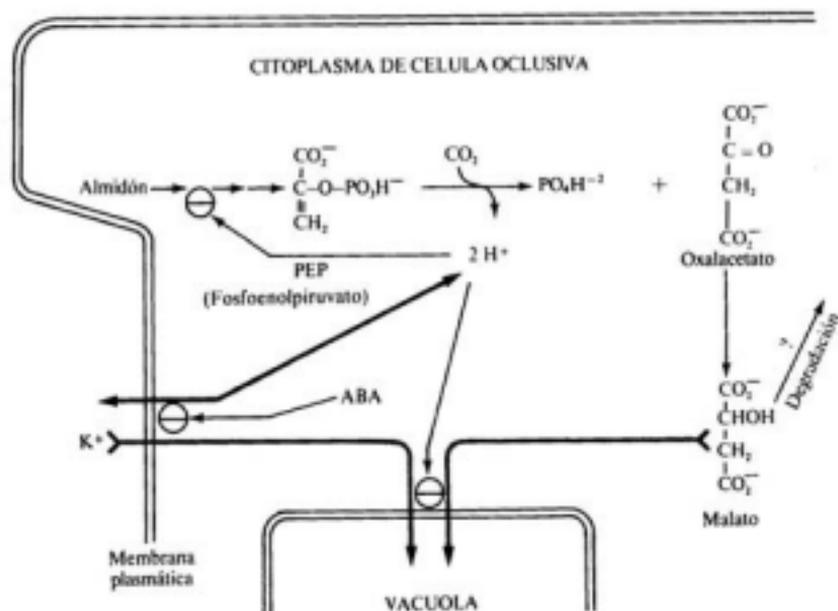


Figura 5.11.—Procesos que determinan apertura estomática y algunos probables mecanismos de control. Las flechas gruesas se refieren a transporte de compuestos. Las flechas delgadas acabadas en  $\ominus$ , se refieren a inhibición, por el compuesto situado al comienzo de la flecha, del proceso situado al final de la flecha. La abreviatura ABA, indica ácido abscísico.

mas. Para explicar estos resultados se ha propuesto la siguiente interpretación del mecanismo de acción del  $\text{CO}_2$  sobre la abertura estomática: si la concentración de  $\text{CO}_2$  es muy alta, el málico se forma muy rápidamente, más rápidamente que puede ser secuestrado por la vacuola, y en consecuencia el citoplasma se acidifica, y presumiblemente por el pH ácido se inhibe la misma formación de málico (probablemente por baja actividad a pH ácido del sistema enzimático de degradación del almidón) y aún más, su transporte a la vacuola. Ésta, así, no puede tomar ion potasio y los sistemas de control de transporte de protones hacia fuera, y potasio hacia dentro, determinan una inhibición de estos transportes y cierre de estomas. Por el contrario, a bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  la velocidad de formación de málico no supera a la de su paso a la vacuola; así el pH no será ácido, podrá seguir formándose málico desde almidón y el malato se acumulará en la vacuola, permitiendo así la entrada de  $\text{K}^+$  y la operación de los transportes de protones y potasio, y con ello la apertura del estoma. En la figura 5.11 se representa un modelo de reacciones y flujos que llevan a la apertura estomática, así como algunos posibles mecanismos de control.

Existen además fuertes evidencias de que la acción del  $\text{CO}_2$  está mediada por los cambios de acidez que provoca en las células oclusivas. Así, en éstas, se puede medir un pH más ácido cuando están cerradas. Además es bien conocido que vapores ácidos (por ejemplo,  $\text{HCl}$ ) provocan cierre de estomas, mientras que vapores alcalinos (por ejemplo,  $\text{NH}_3$ ) provocan apertura de estomas. El  $\text{CO}_2$  en agua actúa como ácido débil, y como tal no puede provocar cambios de pH de suficiente magnitud. En cambio si forma un ácido carboxílico (málico), éste es suficientemente fuerte para explicar cambios en actividades enzimáticas y de sistemas de transporte. Aunque aparentemente paradójica, la explicación que hemos apuntado para el mecanismo de acción del  $\text{CO}_2$  cerrando estomas, es hoy día la más aceptada. Para algunos autores, el efecto del  $\text{CO}_2$  cerrando estomas se podría ejercer inhibiendo el transporte de  $\text{K}^+$  o la fotofosforilación que proporcionaría ATP para la salida de protones.

La situación paradójica de que las plantas suculentas con un metabolismo fotosintético especial cierran estomas de día y los abran de noche, se podría explicar por el metabolismo particular de estas plantas. Como dijimos fijan  $\text{CO}_2$  de noche y lo liberan de día dentro de ellas para ser utilizado en la asimilación fotosintética. Precisamente esta liberación diurna podría provocar tan altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  que determinen cierre de estomas en la forma que hemos visto.

Los bajos potenciales hídricos de la hoja determinan cierre de estomas en una acción que está mediada por ácido abscísico. Parece que éste actúa inhibiendo, a nivel de plasmalema, el sistema de transporte de protones hacia el exterior, con lo cual no puede acumularse  $\text{K}^+$  y se bloquea el proceso de formación de málico por acidificación del citoplasma, tal como ocurría con un exceso de  $\text{CO}_2$ .

Otro factor que afecta a la abertura estomática, en una acción no mediada por  $\text{CO}_2$ , es la humedad atmosférica. Un aumento de ésta provoca apertura estomática. Se ha sugerido que esta acción puede estar mediada por el control de la llamada transpiración peristomática, que es la que ocurre a través de la cutícula que recubre a la célula oclusiva. Se tienen evidencias de que esta transpiración es mucho

más intensa que la que ocurre por el resto de la cutícula. El agua de esta transpiración procederá de la pared de la célula oclusiva situada por debajo de la cutícula, precisamente lo que parece ser la vía mayoritaria de entrada de agua de la planta en la célula oclusiva. Una pérdida abundante de agua de esta corriente vía cutícula resta paso de agua a la célula oclusiva, impidiendo así su turgencia y determinando con ello cierre de estomas. Evidentemente, esta pérdida vía transpiración peristomática será menor a mayor humedad atmosférica. Esta transpiración peristomática actuaría así como control de la abertura estomática por la humedad ambiental a través de un mecanismo que implica a su vez una pequeñísima pérdida de agua.

La luz azul parece activar el bombeo de protones al exterior de la célula oclusiva, creándose el potencial eléctrico que determina la entrada de  $K^+$ . Este efecto de la luz azul es activador, no de fuente energética como la que, vía fotosíntesis, proporciona la luz fotosintéticamente activa en las células oclusivas.

### 5.9. Oscilaciones periódicas de la abertura estomática y de la transpiración

En condiciones normales, debido fundamentalmente al efecto de los cambios de iluminación, los estomas de una planta se abren y cierran rítmicamente con un período de 24 horas. Es notable el que los estomas de muchas plantas mantenidas en la oscuridad o bajo iluminación continua, continúan abriéndose y cerrándose con un período de aproximadamente 24 horas. En estas condiciones, las variaciones de abertura estomática son de sólo entre un 20 y un 40 por 100, de las que se observan en condiciones naturales de alternancia del día y la noche.

Relacionadas con estas variaciones estomáticas se han medido, también en condiciones ambientales constantes, variaciones rítmicas del potencial hídrico de las hojas y del contenido de almidón de células oclusivas, con períodos de aproximadamente 24 horas.

Adicionalmente la abertura estomática oscila en condiciones constantes, con amplitudes pequeñas y períodos, en general, de unos pocos minutos. Estas oscilaciones, más o menos amortiguadas al pasar a condiciones constantes, son características de todo fenómeno que como el de la apertura y cierre de estomas está sometido a múltiples mecanismos de control. Cuando en el apartado 5.7 hemos considerado el efecto de la concentración de  $CO_2$  sobre la abertura estomática hemos podido analizar brevemente cómo un cambio de concentración de  $CO_2$  puede determinar la aparición de oscilaciones, aun cuando se alcanzan condiciones constantes. Un análisis detallado de los períodos de oscilación puede ser útil para estudiar los mecanismos de control del agente causante de cada oscilación.

La composición de distintas oscilaciones de bajos períodos puede, en teoría, dar lugar a oscilaciones de alto período. Parece así sugestivo apuntar que en las condiciones normales en la Tierra, con su período de revolución de 24 horas, los mecanismos de control de abertura estomática que se han seleccionado en la evolución de las plantas son tales que la composición de sus períodos cortos asociados da períodos de 24 horas, pues así coinciden con los de los factores externos más importantes en la abertura estomática y se evita el que se produzca un desfase entre ambos.

### 5.10. Caracteres xeromorfos que afectan a la velocidad de transpiración

Junto a los cambios rápidos para el control de la transpiración que suponen los efectos sobre la apertura y cierre de estomas, en las plantas existen otras respuestas cuando se exponen por un tiempo prolongado a determinados ambientes, especialmente cuando estos ambientes son secos.

Lo que en muchas plantas son respuestas morfológicas y fisiológicas lentas a ambientes prolongadamente secos, pero no habituales en dichas plantas, en otras plantas se presentan de una forma constitutiva hereditaria. Estas últimas plantas son pobladores característicos de ambientes secos (plantas xerófitas). En general, cuando una planta mesofita (de ambiente moderadamente húmedo) es sometida a situaciones anormales a ella, de prolongada sequía, suele modificarse adoptando algunas características que son habituales en plantas xerófitas, de ahí el nombre de caracteres xeromorfos. Dicha adaptación es reversible y cesa paulatinamente cuando se vuelve a las condiciones normales de humedad.

En relación con la transpiración, las adaptaciones, permanentes o no a ambientes secos, consisten en general en cambios que reducen la transpiración para compensar el menor aporte de agua a la planta.

Entre los caracteres xeromorfos más frecuentes tenemos el del bajo número de estomas. Se encuentran también la presencia de estomas y grupos de estomas hundidos (a más bajo nivel que el resto de la epidermis) y la existencia de abundantes pelos, dos características que contribuyen a estabilizar una capa atmosférica relativamente gruesa y muy húmeda, adyacente al ostiolo y que dificulta enormemente la difusión de agua. Es frecuente encontrar una cutícula muy gruesa, e incluso extensa cutinización de las células del mesófilo y enrollamiento de las hojas para reducir la superficie de transpiración. Unas respuestas casi generales a la sequía prolongada consisten en la disminución de la relación superficie/volumen de la planta (aproximándola a valores propios de xerófitas) y en un aumento de la sensibilidad de los estomas a déficit hídrico de la planta y a la concentración de  $\text{CO}_2$ . En general, esta mayor sensibilidad se debe a un aumento de los niveles de ácido abscísico.

El fenómeno del metabolismo de las plantas suculentas determina una variación del hábito de transpiración para adaptarlo a ambientes de sequedad prolongada y con fuerte variación del día a la noche y cuyo fundamento ya hemos visto. Es frecuente que plantas normalmente no suculentas presenten en ambientes secos adaptaciones a suculencia. Esta puede implicar al metabolismo fotosintético, a la morfología típica suculenta (baja relación superficie/volumen) o a ambas manifestaciones.

Como se verá en los capítulos dedicados a la fotosíntesis, ciertas plantas (maíz, caña de azúcar, etc...) presentan un mecanismo fotosintético especial que llamaremos fotosíntesis C-4 que, entre otras cosas, supone poder realizar eficazmente la fotosíntesis a concentraciones muy bajas de  $\text{CO}_2$  en el mesófilo. Esto implica que manteniendo una eficaz fotosíntesis pueden tener sus estomas más cerrados que una planta con fotosíntesis normal que llamaremos fotosíntesis C-3. En consecuencia, las plantas con fotosíntesis C-4 pueden, en condiciones de sequedad, tener mucha menos transpiración que una planta C-3, constituyendo bajo este aspecto, el carácter C-4, una forma de adaptación a ambientes secos. De hecho, las plantas con metabolismo típico de suculentas y las plan-

tas con fotosíntesis C-4, se encuentran entre las que tienen bajas relaciones de agua perdida por transpiración a materia seca producida. Mientras que el metabolismo típico de suculentas es característico de adaptaciones a ambientes de humedad muy variable del día a la noche, el mecanismo fotosintético C-4 es frecuente en plantas adaptadas a sequedad más continua a lo largo del día y la noche.

### 5.11. Estudio cuantitativo de la transpiración

La transpiración es un proceso por el cual el vapor de agua que se produce a partir de la que, en estado líquido, baña las paredes de las células mesofilicas, se difunde desde su lugar de producción hasta la atmósfera que rodea a la planta.

En su ruta, el agua encuentra una serie de resistencias que se oponen a su difusión, como son la resistencia que oponen los espacios aéreos intercelulares casi saturados de agua, la resistencia de los estomas y la resistencia de las capas de aire prácticamente inmóvil y bastante húmedo adyacentes a la superficie de la planta. En una ruta alternativa el agua que baña las paredes externas de las células epidérmicas puede perderse a través de la cutícula. Después de la resistencia de ésta, el vapor formado encuentra la resistencia de la capa de aire inmóvil y húmedo adyacente a la planta.

Las etapas de difusión del proceso de transpiración obedecen la ley de Fick, según la cual el flujo de vapor de agua que atraviesa una unidad de superficie por una unidad de tiempo  $\phi$  será:

$$\phi = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (5.3)$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión del vapor de agua y  $\partial c/\partial x$  es el gradiente de concentración de vapor de agua a lo largo de la dirección  $x$ , perpendicular a la superficie a través de la cual se considera el flujo (el gradiente es la derivada parcial de la concentración respecto a la dirección considerada). Aproximando las derivadas por cociente de incrementos finitos y considerando el sentido opuesto a  $x$ , (5.3) se transforma en:

$$\phi = D \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} \quad (5.4)$$

Si al cociente  $\Delta x/D$  lo llamamos  $R$  queda:

$$\phi = \frac{\Delta c}{R} \quad (5.5)$$

La fórmula del flujo en la ecuación (5.5) es muy útil para aplicar al estudio de la transpiración, pues permite expresar el flujo en función de un término  $R$ , que tiene todas las analogías de una resistencia a ese flujo. Éste será proporcional a la diferencia de concentración entre los puntos en que se considera el flujo, e inversamente proporcional a la resistencia  $R$  a ese flujo entre dichos dos puntos. La analogía con las fórmulas que expresan la intensidad de corriente eléctrica en función de la diferencia de potencial y la resistencia es evidente y de hecho podremos operar de una forma análoga. En

la figura 5.11 representamos un modelo con resistencias de las vías de la transpiración en la hoja, en donde  $R_{AI}$  representa la resistencia en la zona de la atmósfera interior del mesófilo,  $R_E$  la resistencia de los estomas,  $R_C$  la resistencia de la cutícula,  $R_{AE}$  la resistencia de la atmósfera externa inmóvil y adyacente a la planta. Es fácil ver que la resistencia tiene las dimensiones de tiempo dividido por longitud. Normalmente, en los estudios de transpiración la unidad utilizada de resistencia al flujo es el segundo/centímetro.

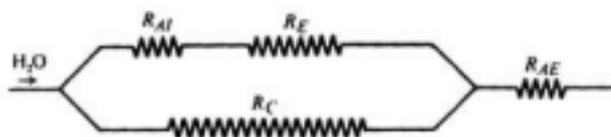


Figura 5.12.—Modelo de resistencias a la difusión de agua en la transpiración. El significado de las abreviaturas se indica en el texto.

Lo mismo que ocurre en los modelos eléctricos, la resistencia  $R_T$  del conjunto representado en la figura 5.12, que equivale a la de una cara de la hoja, sería tal que dividiendo por ella el  $\Delta c$  que va de los espacios intercelulares del mesófilo a la atmósfera externa, nos daría el flujo de vapor de agua por esa cara de la hoja. Si nos encontramos en situación de flujo estacionario, en el que la concentración de vapor de agua no varía en ningún punto fijo, el flujo de transpiración sería igual al flujo a través de la capa de aire inmóvil y también a la suma del flujo a través de los estomas y el flujo a través de la cutícula. Igualmente, el flujo a través de los estomas será igual al flujo a través de los espacios intercelulares. En resumen, si cada  $\Delta c$  y flujo considerado los designamos respectivamente por  $\Delta c$  y  $\phi$ , con un subíndice igual al de la resistencia considerada, tendremos las siguientes igualdades:

$$\begin{aligned} \phi_E = \frac{\Delta C_E}{R_E} = \phi_{AI} = \frac{\Delta C_{AI}}{R_{AI}}; \phi_C = \frac{\Delta C_C}{R_C}; \phi_{AE} = \frac{\Delta C_{AE}}{R_{AE}} = \\ = \phi_T = \frac{\Delta C_T}{R_T} \end{aligned} \quad (5.6)$$

y que:

$$\phi_T = \phi_E + \phi_C \quad (5.7)$$

por otra parte es evidente que:

$$\Delta C_T = \Delta C_{AI} + \Delta C_E + \Delta C_{AE} \quad (5.8)$$

o bien:

$$\Delta C_T = \Delta C_C + \Delta C_{AE} \quad (5.9)$$

de (5.8) y (5.9) se deduce:

$$\Delta C_C = \Delta C_{AI} + \Delta C_E \quad (5.10)$$

Si, por ejemplo, sustituimos en (5.8) y (5.9), los resultados de despejar cada  $\Delta C_i$  ( $i$  variable) en (5.6), quedan, respectivamente:

$$\phi_T R_T = \phi_{AI} R_{AI} + \phi_E R_E + \phi_{AE} R_{AE} \quad (5.11)$$

$$\phi_T R_T = \phi_C R_C + \phi_{AE} R_{AE} \quad (5.12)$$

como según (5.6),

$$\phi_{AI} = \phi_E; \phi_T = \phi_E + \phi_C; \text{ y } \phi_T = \phi_{AE};$$

(5.11) y (5.12) se pueden transformar respectivamente en:

$$\phi_T R_T = \phi_E (R_{AI} + R_E) + \phi_T R_{AE} \quad (5.13)$$

$$\phi_T R_T = (\phi_T - \phi_E) R_C + \phi_T R_{AE} \quad (5.14)$$

operando con (5.13) y (5.14) es fácil ver que  $R_T$  se puede expresar por:

$$R_T = R_{AE} + \frac{1}{\frac{1}{R_C} + \frac{1}{R_{AI} + R_E}} \quad (5.15)$$

En realidad, el resultado (5.15) se puede deducir más rápidamente por aplicación sucesiva de las reglas:

- Resistencias en serie dan una resistencia suma de ambas.
- Resistencias en paralelo dan una resistencia resultante tal que su inversa es la suma de las inversas de las resistencias implicadas.

La ecuación (5.15) que recordamos se refiere a una sola cara de la hoja (la otra está en paralelo con ésta) es fundamental para comprender cuál o cuáles de las distintas resistencias son más importantes como factores determinantes de la velocidad de transpiración. Vamos a estimar a continuación los valores de cada una de las resistencias implicadas en la fórmula (5.15).

#### 5.11.1. Resistencia de los estomas $R_E$

Como la ecuación de Fick en forma aproximada, (5.4) y (5.5), se refiere a unidad de superficie de hoja y los ostiolos sólo son una porción de dicha superficie, habrá que multiplicar la expresión del flujo por un factor que será el tanto por uno que supone dicha superficie de ostiolos. Si  $n$  es el número de estomas por unidad de superficie y  $\pi r^2$  la superficie de cada ostiolo para unas condiciones determinadas (aproximando el ostiolo con una forma circular), el factor a aplicar será:  $n\pi r^2$ . Así, la ecuación (5.4) se transforma en:

$$\phi = D \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} \cdot n\pi r^2 \quad (5.16)$$

donde  $\Delta x$  sería el grosor del estoma que designamos por  $d$ . En realidad, el valor  $\Delta x$  que

habría que usar es algo mayor debido a la forma de las superficies de igual humedad en la cara externa del ostiolo que hacen que la zona de alta humedad relativa semejante a la de la cámara subestomática sea algo mayor que  $d$ . Una aproximación válida es sustituir  $\Delta x$  por  $d + r$ . Así (5.16) se transforma en:

$$\phi = D \cdot \frac{\Delta c}{d + r} \cdot n\pi r^2 \quad (5.17)$$

que, teniendo en cuenta (5.5), queda:

$$R_E = \frac{\Delta c}{\phi} = \frac{d + r}{Dn\pi r^2} \quad (5.18)$$

Considerando que el coeficiente de difusión del vapor de agua  $D$  a  $20^\circ\text{C}$  es de  $0,25\text{ cm}^2/\text{s}$ , si suponemos un caso de estomas relativamente abiertos, con un  $r = 5\ \mu\text{m}$  y  $d = 10\ \mu\text{m}$  (valores típicos en una mesofita), el valor de  $n\pi r^2$  en una mesofita típica puede ser de  $0,02$  (2 por 100 de la superficie de la hoja). Así da un valor de  $R_E$  de  $0,3\text{ s/cm}$ . Con un valor de  $d = 50\ \mu\text{m}$ , obtendríamos para la misma situación,  $R_E = 5,5\text{ s/cm}$ . Según el valor de  $r$ ,  $n$  y  $d$ , podemos encontrar valores de  $R_E$  que oscilan entre unas pocas décimas y 10 o más  $\text{s/cm}$ .

Estimaciones indirectas de  $R_{AI}$  y  $R_C$ , dan valores para la primera de entre  $0,1$  y  $0,3\text{ s/cm}$  para la mayoría de las plantas, pudiendo alcanzar en xerófitas hasta  $2\text{ s/cm}$ .  $R_C$  tiene en mesofitas valores de entre  $20$  y  $80\text{ s/cm}$ , pudiendo alcanzar en xerófitas valores de  $200$  o incluso más.

Con estos datos, si nos fijamos en la ecuación (5.15) en el término:

$$\frac{1}{\frac{1}{R_C} + \frac{1}{R_{AI} + R_E}} \quad (5.19)$$

donde  $R_{AI}$  es, en la mayoría de los casos, muy pequeño comparado con  $R_E$  y en cualquier caso, en general,  $1/R_C$  es muy pequeño comparado con  $1/R_E$ , por lo que en condiciones de estomas no muy abiertos (5.19) se puede sustituir por:

$$\frac{1}{\frac{1}{R_E}} = R_E$$

Así que (5.15) se puede aproximar por

$$R_T = R_{AE} + R_E \quad (5.20)$$

despreciándose el resto de las resistencias en la ecuación del flujo de transpiración. Cuando los estomas están muy abiertos, todo el término (5.19) tiene, en general, un valor despreciable frente a  $R_{AE}$ , como vamos a ver. Solamente en situaciones de estomas muy cerrados es relevante el valor de  $R_C$  para los cálculos. En cualquier caso, el valor del término (5.19), para situaciones de apertura estomática moderada oscila, para la mayoría de las plantas cultivadas, entre  $1$  y  $5\text{ s/cm}$ . Dicho término corresponde a la resistencia que ofrece la hoja a la transpiración.

5.11.2. Resistencia de la atmósfera externa inmóvil  $R_{AE}$ 

De acuerdo con la fórmula aproximada de la difusión (5.5)

$$R_{AE} = \frac{\delta^{AE}}{D} \quad (5.21)$$

donde  $\delta^{AE}$  es el grosor de la capa de aire inmóvil. El grosor de dicha capa es tanto menor cuanto mayor es la velocidad del viento y menor es el tamaño de la hoja, debido a que el viento ejerce un efecto de barrido sobre dicha capa; este efecto se atenúa en hojas grandes. Con fines prácticos el valor de  $\delta^{AE}$  se puede aproximar de una forma semiempírica por la fórmula:

$$\delta^{AE} = 0,4 \sqrt{\frac{l}{v}} \quad (5.22)$$

donde  $\delta^{AE}$  (en cm) se expresa en función de la dimensión longitudinal máxima de la hoja en cm ( $l$ ) y de la velocidad del viento en cm/s ( $v$ ).

El viento raramente tiene velocidades menores de 10 o mayores de 1.000 cm/s, siendo lo normal que oscile entre 100 y 200 cm/s. Para los cálculos se suele tomar el valor de  $v$ , medio metro por encima de las plantas.

Aunque fuertemente variables con los tamaños de las hojas y la velocidad del viento se pueden tomar como valores típicos de  $R_{AE}$  del orden de 1 s/cm, lo que hace que en muchas situaciones (estomas muy abiertos y velocidades de viento muy pequeñas) el término  $R_{AE}$  influya sustancialmente en la fórmula (5.15), e incluso pueda ser el factor limitante de la velocidad de transpiración. En los demás casos, en general, el factor limitante de la velocidad de transpiración es el valor de la abertura estomática. En cualquier caso, un aumento de la velocidad del viento determina una disminución de  $R_{AE}$  por disminuir  $\delta^{AE}$  según la expresión (5.22), lo que da lugar a un aumento de la velocidad de transpiración. El valor de  $R_E$  nos dará la importancia relativa de los cambios de transpiración por cambios de la velocidad del viento.

## 5.12. Funciones de la transpiración

De cuanto venimos diciendo pudiera sacarse la conclusión de que la transpiración es un mal inevitable, resultado de la necesidad que tienen las plantas terrestres de realizar un intercambio de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  en una atmósfera con bajo potencial hídrico. Para ello, la planta habría desarrollado unos sofisticados mecanismos de control y adaptaciones, que ahorran el máximo de agua. Sin embargo, muchos autores piensan que la transpiración juega papeles específicos en la planta.

Sin necesidad de precisar si la transpiración está orientada a una función determinada o si es el resultado de la necesidad de otros procesos, la cuestión fundamental consiste en analizar si la poderosa corriente de agua que es la transpiración es utilizada por la planta de alguna manera. Otra cuestión, no obligatoriamente ligada a la anterior, es la de si la transpiración es necesaria para la planta. Aunque se ha descrito que algunas

plantas continúan creciendo en ambientes atmosféricos saturados de humedad, esto no significa que no haya transpiración, pues una temperatura ligeramente mayor en la hoja que en la atmósfera es suficiente para que se establezca un gradiente de concentración de vapor de agua entre ellas que permita la transpiración.

Uno de los papeles que se ha atribuido a la transpiración es el de un mecanismo de refrigeración de la hoja. Son muchos los factores que determinan el balance energético de la hoja. Dentro de él las contribuciones de las energías implicadas en los procesos metabólicos (fotosintéticos o no) son minoritarias. Como ejemplo típico en un día normal una mesofita puede absorber unas 0,5 calorías/cm<sup>2</sup> hoja/min más de radiación solar directa y radiación infrarroja que puede perder por radiación infrarroja. Aproximadamente un 50 por 100 de esta diferencia de energía se pierde por conducción a otras partes de la planta y por convección. El resto, 0,25 calorías/cm<sup>2</sup>/min, darían cuenta del calor consumido para la evaporación de los 0,40 μ moles de agua/cm<sup>2</sup> hoja/s, que aproximadamente perdería esa mesofita. De no consumirse, esta diferencia de energía produciría un aumento de temperatura en la hoja de aproximadamente 0,1° C/min hasta que se equilibrasen convenientemente los términos de radiación, convección y conducción del balance energético. Una mesofita a la sombra pierde mucha menos agua, pues los estomas están menos abiertos, y si sus hojas son basales, el gradiente de humedad será menor. Pero también absorbe mucha menos radiación solar, con lo que la contribución de la transpiración para equilibrar las diferencias entre radiación absorbida y emitida sigue siendo proporcionalmente alta en el balance energético de la hoja.

Es significativo que una de las características adaptativas de las xerófitas, que tienen una transpiración muy reducida, es la de poder soportar temperaturas interiores enormemente elevadas (de 40 a 50° C), pues su baja transpiración no es muy importante en el balance energético, y éste ha de equilibrarse aumentando la emisión de radiación infrarroja y las pérdidas de calor por conducción y convección que aumentan todas al aumentar la temperatura.

Otro uso que la planta hace de la transpiración es el de servir para concentrar los nutrientes minerales que la planta toma muy diluidos del suelo. Además, esta corriente de agua que se crea desde el suelo a la planta sirve para movilizar los nutrientes contenidos en aquél y dirigirlos hacia la planta. En el capítulo anterior hemos tenido ocasión de ver cómo la transpiración parece ser el factor esencial en la ascensión del agua en el xilema, ascensión que juega un papel fundamental en la distribución de nutrientes en la planta.

Parece, pues, que aunque inicialmente, en la evolución, la transpiración fue un mal inevitable, las plantas han sabido sacar posteriormente un buen provecho de ella, aunque falta por ver si la transpiración no fue un factor fundamental en la aparición de las grandes plantas terrestres, por las funciones que hemos apuntado que desempeña, y que posteriormente una mayor sequedad atmosférica obligó a la aparición de mecanismos de control específicos.

### 5.13. Control artificial de la transpiración

Se estima que la mayor parte de las muertes prematuras de plantas en la biosfera hoy día son debidas a su desecación por un exceso de transpiración. Los mecanismos

naturales de control de la transpiración no son en muchos casos suficientes para prevenir la muerte de la planta. Este fenómeno tiene una gran importancia económica para el caso de las plantas cultivadas, por lo que se han realizado intentos de controlar artificialmente la transpiración mediante el uso de antitranspirantes de acción más o menos prolongada.

Algunos de los antitranspirantes provocan cierre de estomas e incluyen diversos agentes químicos como arsenito, dinitrofenol (ambos a muy bajas concentraciones que no afectan a otros procesos), acetato fenilmercuríco, 8-hidroxiquinolina,  $\alpha$ -hidroxisulfonatos, ácidos alquenilsuccínicos, etc., que son inhibidores metabólicos cuyo mecanismo de actuación es conocido en muchos casos. Estas sustancias, al mismo tiempo que inhiben la transpiración, inhiben la fotosíntesis al cerrar los estomas. Ya hemos estudiado también el efecto del ácido abscísico y su acción antitranspirante.

Otra aproximación al problema consiste en dispersar sobre las hojas delgadas capas de plásticos o ceras, que se pueden aplicar con pulverizador y luego solidifican formando como una cutícula continua artificial. Tales capas serían ideales si fueran impermeables al agua y libremente permeables al  $\text{CO}_2$  y al  $\text{O}_2$ , pues impedirían la transpiración sin afectar a la fotosíntesis ni a la respiración, cosa que hasta ahora no se ha resuelto de una forma satisfactoria.

#### 5.14. Pérdida de agua en estado líquido por las plantas

La forma más común de pérdida de agua en estado líquido se llama *gutación*. Ésta se observa sobre todo al anochecer o de madrugada, después de una noche calurosa y húmeda, en forma de pequeñas gotas suspendidas en los ápices foliares de gramíneas, en los dientes de los bordes de las hojas de algunas plantas (*Alchemilla*, *Fuchsia*) o simplemente frente a los extremos de los grandes nervios foliares (*Tropaeolum*). A pesar de su apariencia de rocío, este agua procede de la planta y su salida normalmente tiene lugar a través de estomas acuíferos llamados hidatodos, situados frente a los terminales de los grandes nervios foliares, a diferencia de los estomas aeríferos o neumátodos, más distribuidos, como hemos visto, por el resto de la epidermis. Entre el terminal del nervio y la abertura al exterior se encuentra un grupo de células parenquimáticas pequeñas llamadas epitemas, desprovistas de clorofila y capaces de segregar agua líquida que junto con las células oclusivas de la abertura constituyen los hidatodos epitémicos. Existen también, pero con menos frecuencia, hidatodos epidérmicos e hidatodos tricómicos que resultan de la modificación de células epidérmicas o pelos pluricelulares, respectivamente.

En los hidatodos epitémicos, las células oclusivas son a veces vivas y entonces pueden cerrar el ostiolo, como ocurre en los estomas aeríferos. En otras especies, las células oclusivas mueren pronto y el ostiolo permanece ampliamente abierto. Frecuentemente, el agua segregada es rica en carbonato cálcico, el cual, a veces, puede recubrir estos estomas al cabo de algún tiempo, formando escamitas blancas. El agua segregada puede contener, además, otras sustancias inorgánicas y orgánicas.

La gutación, de hecho sólo se produce y en pequeña cantidad nada más, cuando, en una situación transitoria, una abundante absorción de agua por las raíces no se puede

compensar por una pérdida en forma vapor. La turgencia de las células epitémicas hacen en estos casos que pierdan agua por un exceso de presión de turgencia en su interior.

Existen otras formas, en general aún menos importantes cuantitativamente, de pérdida de agua en forma líquida, como es la que acompaña a la secreción de néctares florales o extraflorales de la planta, pero su papel está orientado a otras funciones en la planta distintas de la regulación hídrica.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BARRS, H. D.: *Cyclic Variations in Stomatal Aperture, Transpiration and Leaf Water Potential under Constant Environmental Conditions*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 22, 1971, págs. 223-236.
- HELLER, R.: *Biologie Végétale*, vol. II, *Nutrition et Métabolisme*, Masson et Cie, Paris, 1969.
- HSIAO, T. C.: *Stomatal Ion Transport*, en *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 2. (Ed. por V. Lüttge y M. G. Pitman), Springer-Verlag, Berlín, 1976.
- KRAMER, P. J.: *Water Relations in Plants*, Academic Press, Nueva York, 1983.
- MACROBBIE, E. A. C.: *Ion Channels in Plant Cells*, «Nature», vol. 313, 1985, pág. 52.
- MAIER-MAERCHER, U.: «*Peristomatal Transpiration» and Stomatal Movement: A Controversial View*, «Zeit. Pflanzenphysiol.», vol. 91, 1979, págs. 25-43.
- NOBEL, P. S.: *Biophysical Plant Physiology and Ecology*, Freeman, San Francisco, 1983.
- RASCHKE, K.: *Stomatal Action*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 26, 1975, págs. 309-340.
- SUTCLIFFE, I.: *Plant and Temperature*, Edward Arnold, Londres, 1977.
- WILLMER, C. M.: *Stomata*, Longman, Londres, 1983.
- ZEIGER, E.: *The Biology of Stomatal Guard Cells*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 34, 1983, páginas 441-475.
- ZELICH, I.: *Stomatal control*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 20, 1969, págs. 329-350.

## ABSORCIÓN DE NUTRIENTES POR LAS RAÍCES

La planta normalmente absorbe los nutrientes minerales (Cap. 8) del suelo a través de las raíces. Los mecanismos de absorción por los vegetales han sido objeto de estudio científico, sobre todo a partir del impulso dado a los planteamientos de la nutrición mineral de las plantas por Justus von Liebig en el siglo XIX. Paralelamente a los estudios de la ósmosis (Cap. 3) nació un fuerte interés por el conocimiento de la estructura de las membranas, de sus propiedades de permeabilidad y de los mecanismos de absorción.

Pronto se hizo evidente que las plantas *acumulaban* de una forma *selectiva* los distintos iones del suelo, muchas veces contra gradientes de concentraciones. Así, mientras en el suelo los valores medios de concentración de los iones para muchos elementos esenciales son de 1 mM o menos, en la planta alcanzan valores superiores, del orden del doble como es el caso del  $K^+$ . Igualmente la mayoría de plantas terrestres acumulan  $K^+$  en preferencia al  $Na^+$ , incluso en medios más ricos en  $Na^+$  que en  $K^+$ .

Se han dado diversas interpretaciones a la hora de establecer los mecanismos de la absorción de los nutrientes en los vegetales. Unas, puramente físicas, difícilmente explican la acumulación contragradiante de potencial. Otras, más modernamente, tienen en cuenta la necesidad de aporte energético para vencer este contragradiante. En todo caso, se piensa que el proceso de la absorción es más complejo de lo que en un principio se pensaba y que distintos mecanismos pueden a la vez cooperar en el efecto neto de la absorción. Igualmente cada vez hay más evidencias en favor de que los mismos mecanismos pueden actuar en las distintas células vegetales, bien se trate de un pelo absorbente o de otra célula vegetal.

### 6.1. Relaciones suelo-planta en la nutrición

A excepción de la nutrición del C (fotosíntesis) y parcialmente del  $O_2$ , el resto de elementos esenciales son captados del suelo por la planta a través de su sistema radicular. De aquí la importancia que reviste el conocimiento de la composición y estructura del suelo para el estudio de las relaciones suelo-planta que conducen a la absorción de nutrientes para la planta. La absorción raramente se realiza en forma de sal, sino individualmente en forma de iones. La simple presencia de un elemento en un suelo no es indicativa de su disponibilidad para la planta. Solamente se hallan disponibles para ella

aquellos elementos que se encuentran en forma *soluble* o por *intercambio iónico* con las micelas del suelo. Este intercambio es preferencialmente *catiónico*, dado el predominio de cargas negativas superficiales en las micelas inorgánicas (arcillas) y orgánicas (humus) del suelo.

Últimamente ha merecido una atención especial el estudio de las *interfases* suelo-planta en relación con la nutrición del agua y los minerales. Estas interfases residen fundamentalmente en las paredes de las células más externas de la raíz, la *epidermis* y los *pelos radiculares*, que ya han sido considerados en el capítulo 4 (Fig. 4.4.). Se considera que juega un papel esencial en estas relaciones la existencia del *mucigel*, situado precisamente en estas interfases entre la epidermis y los pelos radiculares, a los que envuelve como una funda o película mucilaginosa, y el suelo. Se debe a Jenny y Grossenbacher (1963) el establecimiento de la existencia del mucigel. No obstante, ya en 1883 Schwarz había señalado la presencia de esta película mucilaginosa que posteriormente demostraron por microscopía electrónica Jenny y Grossenbacher. En un principio, el mucigel recibió poca atención, tanto por parte de los anatomistas como de los fisiólogos vegetales. Las evidencias recientes le sitúan de nuevo en un lugar destacado en el estudio de las relaciones suelo-raíz, debido a que el contacto entre las raíces en crecimiento y la matriz sólida del suelo se establece grandemente por medio de él. Además, el mucigel y los exudados solubles que origina la raíz constituyen el sustrato para los microorganismos de la rizosfera. Se considera que el mucigel es segregado por el aparato de Golgi de las células externas de la cofia. En su composición forman una mezcla compleja en la que predominan los hidratos de carbono. La presencia de microorganismos facilita la formación del mucigel. Entre las distintas funciones que se le atribuyen, son de señalar una misión de «nicho protegido» para la rápida mutiplicación de las bacterias y para la acumulación de exudados solubles de las raíces y su participación en la transferencia de nutrientes a las raíces. En este sentido, se ha señalado que las cargas negativas del mucigel juegan un papel en el intercambio catiónico directo entre las micelas del suelo y las raíces. En el capítulo 4 ya se ha considerado el incremento de absorción de agua y nutrientes por efecto de las micorrizas.

## 6.2. Análisis cinético de la nutrición y compartimentación

La aplicación de los estudios cinéticos, en donde se representa la absorción de un elemento en función del tiempo (Fig. 6.1), permite distinguir dos fases distintas en las *curvas de absorción* así obtenidas. En una primera fase ocurre una rápida absorción, los iones absorbidos no presentan carácter acumulativo y su difusión es reversible. Por el contrario, la segunda fase se caracteriza por una absorción más lenta, de carácter lineal y mucho más compleja, pues actúa normalmente contragradiante y en sentido irreversible. Las curvas de absorción se obtienen fácilmente con el empleo de soluciones de un ion marcado radiactivo.

Este comportamiento hace pensar que en la absorción participan distintos compartimentos celulares y la intervención del metabolismo energético celular para el segundo tipo de mecanismos que requieren vencer la presencia de una *barrera de difusión* o membrana semipermeable.

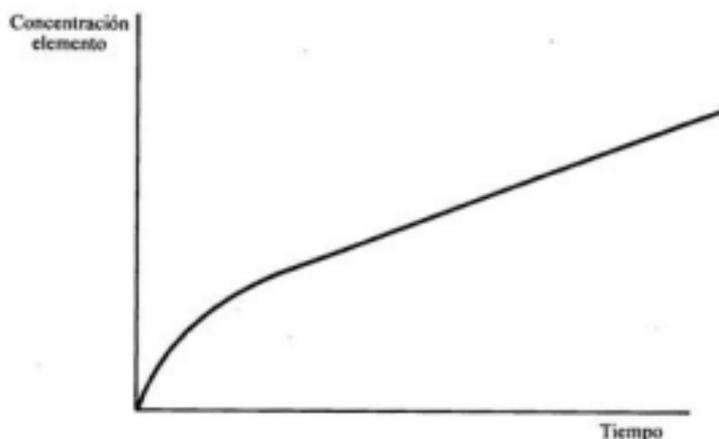


Figura 6.1.—Curva de absorción: estudio cinético de la absorción de un elemento por la planta en función del tiempo.

Formalmente se distingue entre *transporte pasivo*, *transporte activo* y *transporte facilitado*. El *transporte pasivo* ocurre por difusión libre de los iones a favor de gradiente. Se trata, pues, de un mecanismo puramente físico y, de acuerdo con los principios de la termodinámica, de carácter espontáneo. El *transporte activo* es un mecanismo de difusión contragradiente de concentraciones que requiere del aporte energético por parte de la célula. El *transporte facilitado*, en realidad, es una variante del transporte pasivo, pues el movimiento es a favor de gradiente de concentraciones, pero por las características de la sustancia y de la membrana, el ion o soluto debe unirse a una sustancia intermedia (transportador) para poder atravesarla.

De igual modo, como en el caso de la economía hídrica de la planta (Cap. 4), también en la nutrición mineral hay que distinguir entre el *apoplasto* (o *apoplasma* en la nomenclatura de Ariz) y el *simplasto* (o *simplasma* de Ariz), conceptos que fueron introducidos inicialmente en 1930 por Münch. El *apoplasto* comprende la zona de difusión libre (*espacio libre*) y está constituido fundamentalmente por las paredes celulares, los espacios intercelulares y el lumen del xilema. Como ya vimos (Cap. 4), el apoplasto forma un sistema continuo sólo interrumpido a la altura de la *endodermis*, debido a la presencia de los engrosamientos de la banda de Caspary en las paredes radiales de la endodermis (Fig. 4.4). En el apoplasto no hay, pues, barreras de permeabilidad, siguiendo el movimiento de nutrientes las leyes de la difusión simple. El *simplasto*, por el contrario, requiere que los solutos atraviesen la barrera semipermeable, o selectivamente permeable, del plasmalema. Una vez atravesado el plasmalema, en el seno del citoplasma el simplasto forma un sistema unitario y continuo que se intercomunica célula a célula por los plasmodesmos a través de los desmotúbulos o conexiones del retículo endoplasmático. Recordemos que la absorción activa del agua por la raíz en realidad era una absorción osmótica de agua, gracias a la *absorción activa de iones* en la

endodermis. Una tercera vía incluye el transporte de iones del citoplasma a la vacuola y de vacuola a vacuola, pero parece ser menos significativa.

Un segundo tipo de análisis cinético de resultados prometedores, consiste en los estudios de la *velocidad de absorción* de un elemento en función de la *dosis* de este elemento y la aplicación de la hipótesis de la cinética enzimática al transporte de iones y al funcionamiento de los transportadores, desarrollado inicialmente por Epstein y Hagen (1952), y Epstein (1953), al comprobar que las isotermas de absorción iónica obedecían a la ecuación de Michaelis-Menten. Esta hipótesis se basa en el hecho de que cinéticamente el proceso de la catálisis enzimática y el del transporte de iones por las membranas celulares por medio de un *transportador* son similares y se funda en la unión transitoria a los sitios activos de los agentes (enzima o transportador) a los sustratos (sustrato o ion, respectivamente).

De acuerdo con la hipótesis de Epstein y Hagen (1952) para un ion (*A*) transportado por *T* vale:



comparable a la ecuación de *Michaelis-Menten* de las reacciones enzimáticas:



con lo que, de acuerdo con el cálculo desarrollado por la cinética enzimática, similarmente se llega a que la velocidad de transporte *v* es:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot C_2}{K_m + C_2}$$

donde

$V_{\max}$ : Velocidad máxima de transporte.

$C_2$ : Concentración del ion en el medio.

$K_m$ : Constante de Michaelis, que es igual a la concentración del ion sustrato que da la mitad de la velocidad máxima de transporte.

De acuerdo con esta hipótesis, la selectividad y especificidad del transporte de iones se debe a la afinidad diferencial a los sitios activos del transportador para los diferentes iones. La inhibición competitiva se explica por la afinidad de dos o más iones distintos para idénticos sitios del transportador.

Para concentraciones *medias*, la representación de las velocidades de absorción en función de la concentración suministra, por lo general, curvas de tipo hiperbólico (figura 6.2). El incremento de las concentraciones produce un aumento de la velocidad de absorción hasta alcanzar un carácter asintótico para mayores concentraciones, debido a la saturación del transportador. Cuando se representa la inversa de la velocidad  $1/V$  frente a la inversa de la concentración  $1/C_2$ , debe obtenerse una recta. Tal circunstancia ha podido ser comprobada frecuentemente sobre todo en trabajos con el  $K^+$  y  $Rb^+$ , así como las características de una inhibición competitiva entre ambos elementos químicamente tan similares. Este tipo de estudios permite calcular fácilmente las correspondientes  $K_m$ , obteniéndose normalmente valores de algunos mM.

A *mayores* concentraciones no se produce la saturación tan fácilmente y los resultados obtenidos siguen un curso más complejo (Fig. 6.3). En general, ha habido versiones contrapuestas a la hora de interpretar estos resultados complejos. En muchos casos se

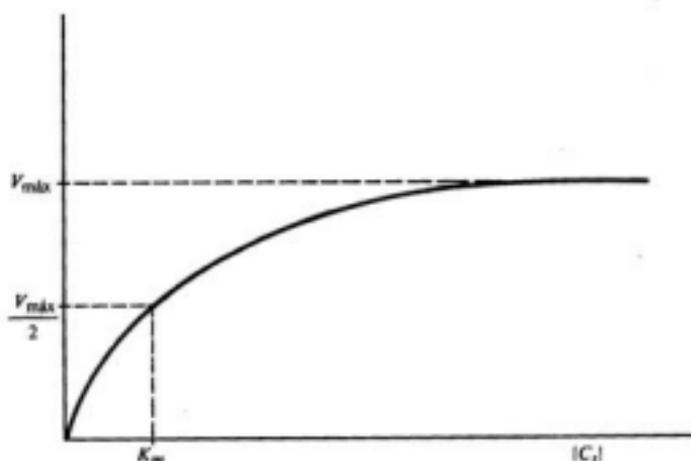


Figura 6.2.—Representación gráfica de la velocidad de absorción,  $V$ , en función de la concentración del nutriente.  $V_{máx}$  = velocidad máxima de absorción;  $K_m$  = constante de Michaelis;  $[C_i]$  = concentración externa del ion.

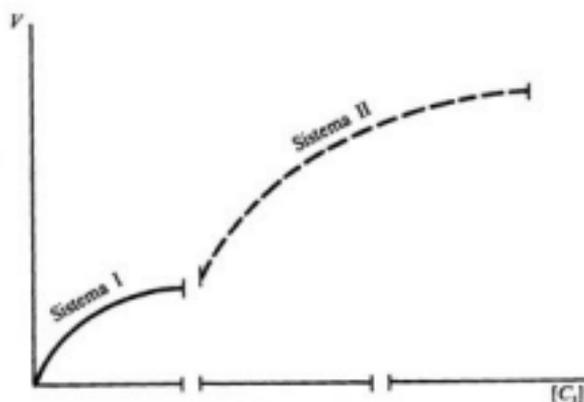


Figura 6.3.—Curva de absorción de un ion para concentraciones mayores.

ha hecho una distinción entre mecanismos «duales» y mecanismos «unitarios». En los mecanismos «duales», la dualidad aparente en la cinética de absorción sería el reflejo de dos mecanismos con distintas afinidades para los iones, el sistema I con una  $K_M$  baja, es decir, con alta afinidad para los iones, y el sistema II, que puede presentar múltiples puntos de saturación (Fig. 6.3.), con una  $K_M$  alta, es decir, con baja afinidad. A pesar de la existencia de todo un conjunto de resultados experimentales y del estudio de modelos de simulación con computadora, no hay unanimidad a la hora de interpretar la localización de ambos sistemas en los modelos duales. Para Epstein

(1976) los sistemas I y II se localizan en paralelo en el plasmalema, formando así un modelo exterior-interior (modelo bicompartimental). A bajas concentraciones (0,2 mM o menos) según Epstein (1976) operaría únicamente el «mecanismo I» de alta afinidad. En el margen de altas concentraciones intervendría en paralelo el «mecanismo II» a velocidad máxima y el «mecanismo I» a velocidades dependientes de la concentración externa. Por el contrario, otras interpretaciones (Torii y Laties) sostienen que los dos sistemas se encuentran dispuestos en serie, el sistema I en el plasmalema y el sistema II en el tonoplasto, constituyendo así un modelo exterior-citoplasma-vacuola (modelo tricompartmental). Para los mecanismos «unitarios» Nissen ha propuesto un «mecanismo único multifásico». Su análisis se basa en representaciones del tipo de Lineweaver-Burk, e interpreta que hay un único mecanismo que cambia sus características en cantidades discretas de la concentración externa del ion, precisamente en las concentraciones que producen la inflexión en las isotermas convencionales. Nissen sostiene que el sistema multifásico se localiza tanto en el plasmalema como en el tonoplasto. Diversos autores han sugerido que en la base molecular del mecanismo multifásico podría funcionar un sistema afín a la cinética de enzimas cooperativos del tipo de Koshland. Esta cinética se basa en enzimas con múltiples subunidades, en las cuales la unión del sustrato a las subunidades induce cambios conformacionales en la molécula proteica con cambios de reactividad de otras subunidades que aumentan o disminuyen la afinidad. Según ello, las ATPasas de las membranas de las células vegetales podrían ser la base molecular de un mecanismo de este tipo.

### 6.3. Absorción de iones por transporte pasivo

En los procesos de transporte pasivo la difusión de iones ocurre a favor del gradiente del *potencial químico* o, mejor expresado, del *potencial electroquímico*, sin necesidad de aporte de energía externa (proceso exergónico).

En el capítulo 3 hemos introducido ya el concepto de potencial químico. Este parámetro es de gran utilidad en el estudio de los movimientos pasivos de los nutrientes, pues una sustancia tiende a moverse espontáneamente hacia las regiones de menor potencial químico. Según sabemos, el potencial químico de una sustancia viene dado por la ecuación:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i + \bar{V}_i P + z_i F E + m_i g h$$

Para el caso del agua, al ser una molécula sin carga,  $z = 0$ , por lo que el término eléctrico no entra en su potencial químico. Para los *iones* es distinto, pues por la presencia de su carga,  $z_i F E$  adquiere un valor importante. En las condiciones biológicas no tienen significación los componentes de la presión hidrostática y de la gravedad, dado que  $\Delta h = 0$  y los cambios de  $\bar{V}_i P$  son tan pequeños que no se consideran. De este modo, el potencial químico para los iones o *potencial electroquímico* se expresa por:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i + z_i F E$$

## 6.3.1. Difusión

La difusión es un proceso espontáneo por el que ocurre un movimiento neto de una sustancia de una región a otra a favor de su potencial químico. Se debe a las propiedades cinéticas de las moléculas, por las que ocurren movimientos térmicos al azar de las moléculas que integran una solución. El resultado teórico final es la distribución uniforme de los potenciales químicos en todos los puntos del sistema o equilibrio de difusión.

Fick (1855) estableció sobre bases empíricas lo que actualmente se conoce por *primera ley de Fick* o de la difusión:

$$\frac{dQ}{dt} = -D \, ds \, \frac{dc}{dx}$$

donde

$dQ$ : Cantidad de sustancia que difunde en el tiempo  $dt$ .

$ds$ : Superficie de difusión.

$\frac{dc}{dx}$ : Gradiente de concentración.

$D$ : Coeficiente de difusión que en condiciones isobaras e isotérmicas depende de la naturaleza del disolvente y del soluto.

La expresión anterior se refiere a una «difusión libre» en un espacio sin ninguna barrera (Fig. 6.4). En el caso de una difusión a través de una membrana, la igualdad anterior se convierte en:

$$\frac{dQ}{dt} = -P \cdot s (c_e - c_i)$$

o

$$\phi = -P (c_e - c_i)$$

donde  $P$  es el coeficiente de permeabilidad que en condiciones isobaras e isotérmicas depende no sólo de los solutos y disolventes, sino también de las características de la membrana. La *ósmosis* es un caso especial de difusión a través de una *membrana semipermeable ideal* (Cap. 3). Para cada membrana, la desviación del comportamiento ideal en su permeabilidad viene indicada por el coeficiente de reflexión,  $\sigma$  (Cap. 3). En el caso de una membrana semipermeable ideal,  $\sigma = 1$ . Si la membrana es permeable tanto al agua como a los solutos,  $\sigma = 0$ . En general, las membranas biológicas presentan valores  $0 < \sigma < 1$ .

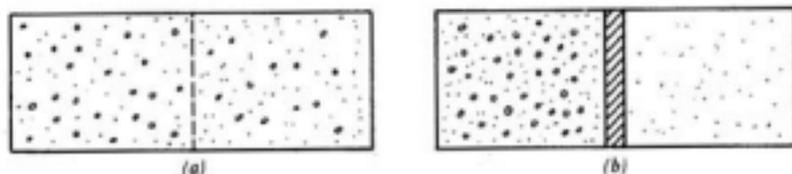


Figura 6.4.—a) Difusión libre entre dos compartimentos separados por membranas permeables a los solutos y al agua. b) Difusión a través de una membrana semipermeable.

La *segunda ley de Fick* de la difusión establece la relación de la concentración en función del tiempo y de la distancia, por medio de la ecuación diferencial parcial:

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_x = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}\right)_t$$

donde

$c$ : Concentración.

$t$ : Tiempo.

$x$ : Distancia.

$D$ : Constante.

Por derivación de esta segunda ley de Fick se obtiene la relación tiempo-distancia en la difusión que puede formularse:

$$t = \frac{x^2}{4D}$$

Esta expresión nos muestra que el tiempo de difusión es proporcional al cuadrado de la distancia de difusión. De aquí que la difusión sea un mecanismo de transporte importante a nivel celular, pero bastante inefectivo en el transporte a distancia en las plantas.

### 6.3.2. Ecuación de Nernst

Hemos visto que el potencial electroquímico determina la dirección del movimiento de iones entre dos regiones de distinto gradiente. En el caso que dos soluciones de iones se hallen separadas por una membrana aislante eléctricamente y expresando por  $\mu_i^I$  y  $\mu_i^{II}$  respectivamente, los potenciales químicos de los iones en cada una de las fases que separa la membrana (interna y externa), en el estado de equilibrio se igualan los potenciales electroquímicos de la parte externa e interna,  $\mu_i^I = \mu_i^{II}$ .

Ya hemos visto que en el potencial electroquímico, por su escaso o nulo valor, no se tienen en cuenta ni el componente de la gravedad ni el de la presión hidrostática  $\bar{V}P$ , por lo que el potencial electroquímico de la solución interna,  $\mu_i^I$ , y externa,  $\mu_i^{II}$ , valdrán:

$$\mu_i^I = \mu_i^{\circ} + RT \ln a_i^I + z_i F E^I$$

y

$$\mu_i^{II} = \mu_i^{\circ} + RT \ln a_i^{II} + z_i F E^{II}$$

$\mu_i^{\circ}$  se puede eliminar de ambos miembros de la ecuación, por ser un término que se refiere a las mismas condiciones estándar del ion  $i$  en ambas soluciones. Tenemos así, en el *equilibrio*:

$$\mu_i^{\circ} + RT \ln a_i^I + z_i F E^I = \mu_i^{\circ} + RT \ln a_i^{II} + z_i F E^{II}$$

por lo que la diferencia de potencial eléctrico,  $E^I - E^{II}$  en la membrana en equilibrio vale:

$$E_N = E^I - E^{II} = \frac{R \cdot T}{z_i \cdot F} \ln \frac{a_i^{II}}{a_i^I} = \frac{0,0592}{z_i} \log \frac{a_i^{II}}{a_i^I} \text{ (voltios)}$$

que se conoce como *potencial de Nernst* o ecuación de Nernst.

En el caso de que la distribución de iones sea pasiva por el gradiente electroquímico, en el equilibrio el sistema cumple la ecuación de Nernst. La medición de potenciales de Nernst,  $\Delta E$ , desviados respecto a los valores normales teóricos calculados, hace suponer la existencia de un transporte activo de iones, por lo que en muchos casos se usa como criterio para reconocer un transporte activo en los sistemas vegetales.

### 6.3.3. Potencial de membrana o transmembrana

La aplicación de dos microelectrodos, uno colocado en el citoplasma o en la vacuola y el otro en el exterior, conectados a un voltímetro, permite medir potenciales de membrana en las células vegetales. El flujo pasivo de iones debido a la existencia de potenciales químicos de los diversos iones y a la baja conductividad eléctrica de las biomembranas, produce una diferencia de potencial eléctrico en las membranas, que se conoce como *potencial de membrana* o, quizá más correcto, *potencial de transmembrana*. El potencial de membrana,  $E_M$ , se obtiene experimentalmente y corresponde a la suma del potencial de todas las sustancias con carga. La célula vegetal puede producir potenciales de transmembrana por distintos mecanismos. Entre ellos se citan:

- Por difusión diferencial del anión y catión de un electrólito se llega a una diferencia de distribución de cargas eléctricas, a la que se conoce por *potencial de difusión*.
- Por el mecanismo de Donnan.
- Por transporte activo de iones y distribución diferencial de cargas por medio de las denominadas *bombas electrogenas* que por un transporte diferencial de iones de una región a la otra crean el potencial de transmembrana.

Las células gigantes de varias especies de algas (*Chara*, *Nitella*, *Nitellopsis*, *Valonia*, *Halicystis*) se prestan, sobre todo, a este tipo de mediciones. Más difícil, por el momento, resultan las experiencias con células de plantas superiores. En general, los valores medidos dan una diferencia de potencial negativo entre el interior y exterior del orden del centenar de mV.

### 6.3.4. Sistema de Donnan

Un caso especial de formación de potencial de membrana es cuando el coeficiente de permeabilidad de un determinado ion en un sistema es muy pequeño y prácticamente no hay flujo de este ion. En estas condiciones, se origina una diferencia de potencial eléctrico si el sistema se halla adyacente a una fase acuosa que contiene iones pequeños móviles (*potencial de Donnan*). Esta diferencia de potencial eléctrico o potencial de Donnan puede ser vista como un potencial de difusión.

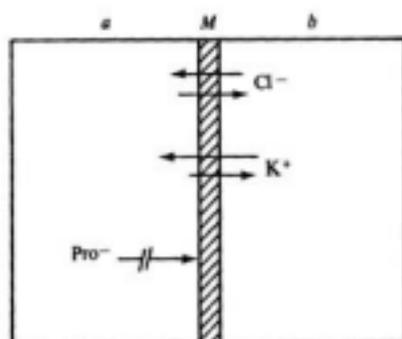


Figura 6.5.—Sistema de Donnan. Dos compartimentos, *a* y *b*, separados por una membrana (*M*) semipermeable, que permite el paso libre del agua y los solutos pequeños ( $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$ ), pero no de las macromoléculas ( $\text{Pro}^-$ ). La distribución por difusión libre de los solutos pequeños y el equilibrio de cargas en ambos compartimentos determina una mayor concentración de iones  $\text{K}^+$  en *a* respecto a *b*.

El sistema de Donnan es, así, un caso de permeabilidad selectiva de una membrana que separa dos compartimentos (Fig. 6.5), y en donde determinados iones no son difusibles de un compartimento al otro. Como consecuencia de la presencia de cargas difusibles en los dos compartimentos, se produce una diferencia de potencial de difusión permanente.

Entre las consecuencias más marcadas del equilibrio Donnan hay que señalar que la concentración molar total de iones difusibles es más elevada en el compartimento en donde están presentes los iones no difusibles y que el potencial osmótico es más negativo del lado de los iones no difusibles que del otro.

Spongamos el caso sencillo de los iones difusibles  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  y la presencia de un anión no difusible en el interior  $\text{A}^-$  (por ejemplo, proteínas cargadas negativamente) (Fig. 6.5). En el equilibrio se cumple que:

$$[\text{K}^+]_{\text{ext}} [\text{Cl}^-]_{\text{ext}} = [\text{K}^+]_{\text{int}} [\text{Cl}^-]_{\text{int}}$$

pero como

$$[\text{K}^+]_{\text{int}} = [\text{Cl}^-]_{\text{int}} + [\text{A}^-]_{\text{int}}$$

y

$$[\text{K}^+]_{\text{ext}} = [\text{Cl}^-]_{\text{ext}}$$

se habrá producido una difusión de  $\text{K}^+$  contragradiente. Es decir, debido a que el potencial electroquímico está integrado no sólo por la concentración del ion, sino también por la carga, se puede llegar al equilibrio con concentraciones distintas y, por ende, a la entrada contragradiente de cationes en este caso concreto. Por este motivo, a veces se distingue entre el espacio de difusión libre, que obedece a las leyes de la difusión simple, y el *espacio libre de Donnan* que al menos para ciertos iones explicaría la aparente anomalía de su difusión contragradiente sin absorción activa. De este modo, para las partículas con cargas se habla de un *espacio libre aparente* integrado por dos compartimentos distintos, el *espacio libre del agua* y el *espacio libre de Donnan*:

$$\text{espacio libre aparente} = \text{espacio libre del agua} + \text{espacio libre de Donnan}$$

Si aplicamos la ecuación de Nernst, el potencial de Donnan sería, para este ejemplo:

$$E_D = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_{ext}}{[K^+]_{int}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[Cl^-]_{ext}}{[Cl^-]_{int}}$$

o, en general, para un catión  $C^+$  y un anión  $A^-$ :

$$E_D = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[C^+]_{ext}}{[C^+]_{int}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[A^-]_{ext}}{[A^-]_{int}}$$

La dirección del potencial de Donnan viene determinada siempre por la carga del ion no permeable. En nuestro caso, un anión no difusible y, por tanto, la fase interna es negativa respecto a la externa. En el equilibrio

$$\frac{[C^+]_{int}}{[C^+]_{ext}} = \frac{[A^-]_{ext}}{[A^-]_{int}} = r$$

que es el equilibrio de Donnan.  $r$  es el cociente de Donnan. Con CA se asume un electrólito binario de iones monovalentes.

### 6.3.5. Ecuación de Ussing-Teorell

Uno de los criterios fisicoquímicos más útiles para decidir si un determinado movimiento de iones a través de una membrana es activo o pasivo, es la aplicación de la ecuación de Ussing-Teorell o *relación de flujo*. Para los iones que se mueven pasivamente, esta expresión muestra que la relación de flujo de entrada y de salida depende de las concentraciones interna y externa tanto como de la diferencia de potencial eléctrico de la membrana.

La relación de flujos

$$\frac{J_i^{int}}{J_i^{ext}} = \frac{c_i^{int}}{c_i^{ext} e^{z_i F E_M / RT}}$$

sólo es válida para iones que se muevan pasivamente sin interactuar con otras sustancias que puedan así atravesar la membrana. En el equilibrio, cuando  $J_i^{int}/J_i^{ext} = 1$ , la ecuación de Ussing-Teorell se reduce a la de Nernst. Si el flujo de iones no cumple el criterio de Ussing-Teorell se concluye, generalmente, que ocurre un transporte activo.

### 6.3.6. Intercambio iónico

Otro mecanismo fisico-químico que participa también en la absorción pasiva de iones es el proceso de intercambio iónico. En virtud de él, las superficies celulares intercambian iones con una solución externa o incluso directamente a partir de los iones adsorbidos en las partículas del suelo. Por predominar las cargas negativas en las paredes celulares (grupos carboxilo,  $-COO^-$ ) fundamentalmente se trata de intercambio catiónico. De este modo, se logra una mayor absorción que actuando únicamente el mecanismo de difusión libre.

### 6.3.7 Flujo en masa

Aunque no parece ser un mecanismo esencialmente importante en este sentido, la corriente de transpiración que circula por el sistema continuo que va desde las hojas-xilema-raíz es responsable subsidiariamente del arrastre pasivo, por flujo en masa, de iones de la solución del suelo en el proceso de la *absorción pasiva* del agua por las raíces (Cap. 4).

### 6.4. Absorción por transporte activo

Acabamos de ver (6.3) que las leyes de Fick, la ecuación de Nernst y la ecuación de Ussing-Teorell se aplican a los procesos de transporte pasivo. Por el contrario, hemos visto que el transporte activo es muy probable cuando un sistema investigado no obedece a estas leyes. Es decir, en el transporte activo las partículas sin carga son transportadas activamente si su movimiento neto es contra un gradiente de concentración y las partículas con carga eléctrica son transportadas activamente si su movimiento neto es contragradiante de su potencial electroquímico. Por ello, de acuerdo con Ussing, se entiende por transporte activo al movimiento de un ion contragradiante de su potencial electroquímico. Este proceso contragradiante requiere termodinámicamente del aporte de energía externa que suministra el metabolismo celular.

Como ya hemos visto, en la primera mitad de nuestro siglo los análisis de células vegetales gigantes de algas (*Nitella*, *Valonia*) permitieron comprobar que las células vegetales concentraban los nutrientes contragradiante del medio. De este modo se hizo evidente la participación, junto a los procesos del transporte pasivo, de algún mecanismo de absorción activa. A pesar de la intensa investigación que a lo largo de todo este tiempo ha estado sometida los problemas de la absorción activa de los vegetales, no se dispone, por el momento, de una visión general de un mecanismo de valor explícito. Cada vez ha ido ganando más fuerza la existencia de un mecanismo de «bombeo» de los solutos por medio de «transportadores» o vectores, situados en las membranas de la célula (plasmalema, tonoplasto) o de los orgánulos (cloroplasto, mitocondria), que permiten en muchos casos, de una forma unidireccional o vectorial, el movimiento de los nutrientes desde el exterior al interior celular. Ya en 1900 Pfeffer reconoció la absorción contragradiante por medio de transportadores, aunque la teoría de los transportadores se desarrolló sobre todo a partir de los estudios de Lundegårdh (desde 1933) y de Epstein (desde 1952).

Ya en estas primeras investigaciones, pronto se hizo evidente que la participación del sistema de transferencia de electrones (respiratorio o fotosintético) en la absorción activa podía actuar a través de su acoplamiento con la fosforilación oxidativa o con la fotofosforilación. Es decir, se estableció una necesidad energética, por lo demás obvia termodinámicamente, suministrada por el ATP, para el proceso de acumulación contragradiante de concentraciones, a la par que el estudio de la cinética de los transportadores y de sus posibles variantes, como ya hemos visto (apartado 6.2), indicaba que las ATPasas de las membranas de las células vegetales podrían estar en la base del mecanismo molecular.

### 6.4.1. Transporte activo por ATPasas y bombas iónicas

Recientemente ha recibido fuerte atención la operación de las ATPasas como agentes de transferencia de energía para el transporte activo de iones a través de las membranas biológicas. Si bien los primeros indicios se obtuvieron con bacterias y células animales, mientras que los vegetales presentaban dificultades de estudio y ciertas contradicciones, actualmente se dispone ya de un cuerpo más elaborado y coherente de experimentos y evidencias con células vegetales que permiten una interpretación más general. Todos estos estudios indican la existencia de un mecanismo general de participación de las ATPasas en la creación de gradientes iónicos electroquímicos.

Según la *hipótesis quimiosmótica* de Mitchell (Caps. 13 y 20), el transporte vectorial de electrones y protones en la fotosíntesis y en la respiración origina un gradiente de energía libre de protones ( $H^+$ ) en la membrana en la que operan los transportadores de electrones. Este gradiente de  $H^+$  se compone de un gradiente de pH y de un potencial eléctrico (véase apartado 6.3), es decir, por la separación de cargas tiene un carácter *electrógeno*. La energía útil total de este gradiente electroquímico de  $H^+$  ( $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ ) es de

$$\Delta\bar{\mu}_{H^+} = F\Delta\psi = F\Delta\psi - 2,3RT\Delta pH \text{ (J/mol)}$$

en donde,  $F$  = constante de Faraday;  $R$  = constante de los gases,  $T$  = temperatura absoluta;  $\Delta\psi$  = potencial de membrana en mV y  $\Delta pH$  = gradiente de pH. A 25 °C, la fuerza motora de protones ( $\Delta_p$  o pmf) es

$$\Delta_p = \Delta\bar{\mu}_{H^+}/F = \Delta\psi - 59 \Delta pH \text{ (mV)}$$

En los cloroplastos y mitocondrias el gradiente de energía puede ser utilizado para la síntesis de ATP (fotofosforilación, Cap. 13, y fosforilación oxidativa, Cap. 20) por el sistema de una ATPasa en sentido inverso.



De este modo, las ATPasas actúan como transductores de energía, convirtiendo la energía potencial del gradiente de protones en energía química del grupo fosfato terminal del ATP. Para la operación del sistema es fundamental que la membrana tenga baja permeabilidad pasiva a los  $H^+$ .

Una operación alternativa importante, que concierne a este capítulo, es la posibilidad de la aplicación de la hipótesis de Mitchell al transporte de iones, según un modelo de transporte enzimático *vectorial* (ordenado en el espacio), por el que la hidrólisis del ATP



se acopla al transporte a través de las membranas. La ATPasa de transporte permite así convertir la energía química del ATP en energía potencial de gradiente de concentración de un ión (potencial electroquímico), *transporte activo primario*, que adicionalmente puede servir, en presencia de transportadores adecuados, para el *transporte activo secundario* de otros solutos. Como vemos son, pues, *bombas iónicas*. En el transporte activo *primario*, el transporte del ión o soluto está ligado directamente a la energía de la ATPasa o a procesos de óxido-reducción, mientras que en el transporte activo *secundario* la energía para el transporte contra gradiente no proviene de la energía liberada por la ATPasa, sino del potencial electroquímico que ha generado.

Se conocen fundamentalmente ATPasas implicadas en el transporte de  $H^+$  (*bomba de protones*),  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (*bombas iónicas*).

Se considera que hay varios mecanismos por los que el flujo de  $H^+$  y  $OH^-$  puede estar ligado al flujo de solutos:

- En el transporte activo electrógeno de  $H^+$  la diferencia de potencial eléctrico creado permite el movimiento de los cationes en dirección opuesta al de la bomba de  $H^+$  (*antiport*) o en la misma dirección (*symport*) los aniones. Se trata así de un transporte activo *secundario*.
- La bomba de  $H^+$  puede estar acoplada químicamente con los iones movilizados en un sistema de cotransporte eléctricamente neutro (transporte activo *primario*).
- La ATPasa- $H^+$  electrógena crea un potencial de membrana que provoca un flujo electrofóretico de los cationes ( $K^+$ ) (*uniport*; transporte activo *secundario*).
- El transporte activo es debido al gradiente de pH creado por la bomba de  $H^+$  (transporte activo *secundario*).
- El gradiente de pH determina la distribución de ácidos y bases débiles entre la solución y el citoplasma que ha sido implicada en el transporte de AIA (véase auxinas, Cap. 22).

Si bien las ATPasas presentan propiedades generales, no obstante ofrecen diversas particularidades, según el nivel de organismo y organización (bacterias, mitocondrias, cloroplastos, membranas de células eucariotas animales y vegetales). A diferencia de las células eucariotas animales, en las que opera grandemente el sistema de la *bomba ATPasa  $Na^+-K^+$*  (estequiometría: bombean 3  $Na^+$  hacia fuera y 2  $K^+$  hacia dentro, de aquí su carácter electrógeno), en las plantas superiores se cree que el proceso de transporte activo primario es de transporte electrógeno de protones (bomba de protones o ATPasa- $H^+$  electrógena) y que esta fuerza motora de protones generada por la bomba de protones provee la energía o fuerza motora para el transporte (activo secundario) de los solutos (cationes, aniones, aminoácidos y azúcares). Como ya veremos en otros apartados de este libro, las bombas de protones desempeñan diversas funciones importantes en el metabolismo y función de las células vegetales; así, entre otras: absorción de precursores biosintéticos, regulación del turgor y volumen celular, regulación del pH citoplasmático (y con ello de diversos enzimas del metabolismo celular), homeostasis de la composición iónica intracelular, apertura y cierre de los estomas (Cap. 5), mecanismo de carga del floema en el transporte de la sacarosa (Cap. 7), transporte del malato en las plantas CAM (Cap. 15), regulación del crecimiento en extensión de la célula y pared celular (Caps. 2 y 22), gravitropismo (Cap. 29) y fotomorfogénesis (Cap. 30).

En la figura 6.6 se resumen, comparativamente, las principales operaciones de la ATPasa  $Na^+-K^+$  de la membrana de la célula animal y de la ATPasa de  $H^+$  vectorial de las plantas: (A) bomba electrógena primaria, (B) entrada activa secundaria de solutos (*symport*), (C) salida activa secundaria de solutos (*antiport*) y (D) entrada (o salida) activa de cationes (o aniones) (*uniport*).

El perfeccionamiento en estos últimos años de las técnicas de estudio de vesículas microsomaes y de vesículas de membranas purificadas de origen conocido permite ya localizar y conocer las ATPasas de las células de plantas superiores. Sobre todo hay

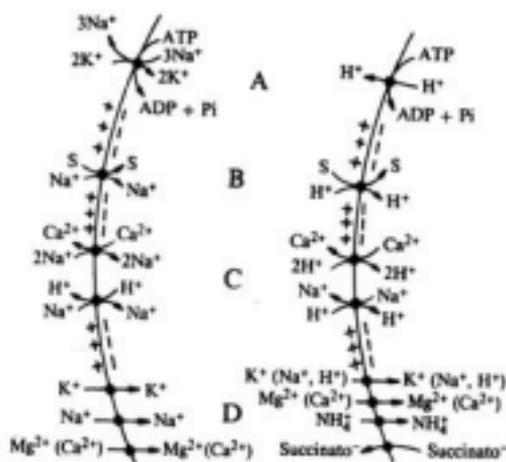


Figura 6.6.-Visión comparativa de la ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> de la membrana plasmática de la célula animal (izquierda) y de la ATPasa de H<sup>+</sup> de hongos, algas y plantas (derecha): (A) bomba electrogénica primaria, (B) entrada activa secundaria de solutos (*simport*), (C) salida activa secundaria de solutos (*asport*) y (D) entrada (o salida) de cationes (o aniones) (*asport*) (tomado de R. Serrano, *Plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi*, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1985).

fuerzas evidencias de dos tipos de ATPasa-H<sup>+</sup> asociadas a membranas vegetales (membrana plasmática y tonoplasto sobre todo y, con menor conocimiento, del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi).

Si comparamos las ATPasas con las ya conocidas de otros organismos se pueden destacar las siguientes características diferenciales. Las ATPasas de bacterias, mitocondrias y cloroplastos (tipo I) (Caps. 13 y 20) son de transporte de H<sup>+</sup>, no forman intermediario fosforilado, tienen un pH alcalino y estructuras muy complejas de subunidades hidrófilas F<sub>1</sub> (externas a la membrana) e hidrófobas F<sub>0</sub> (integradas en la membrana), siendo sensibles a la azida y a la dicitohexilcarbodiimida y a la oligomicina en el caso de las mitocondrias. Las ATPasas animales (tipo II) catalizan transportes de intercambio de Na<sup>+</sup> por K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> por K<sup>+</sup> y transporte de Ca<sup>2+</sup>, son inhibidas por el vanadato y, en el caso de la ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> por la uabaína, su pH es neutro y forman un intermediario acilfosfato en una subunidad catalítica mayor (100 Kd) transmembrana. De los dos tipos de ATPasas de las membranas de las células vegetales, uno, las asociadas con la membrana plasmática y quizá con el aparato de Golgi, se parecen a las ATPasas animales por su estructura (subunidad catalítica de 100 Kd) y mecanismo de reacción (intermediario fosforilado, pH óptimo casi neutro, sensibilidad al vanadato). Pero, por otra parte, se parecen a las de las bacterias, mitocondrias y cloroplastos por su sensibilidad a la dicitohexilcarbodiimida, lo que, por el posible bloqueo del canal conductor de protones de la bomba de protones, sugiere el papel de bomba de protones electrogénica.

El segundo modelo de ATPasa de H<sup>+</sup> de las plantas se localiza en el tonoplasto (y

seguramente en otras membranas, sobre todo el retículo endoplásmico) y no es adscribible fácilmente a ninguna de las categorías conocidas de ATPasas de transporte. La ATPasa de tonoplasto es resistente al vanadato, sensible a los aniones, no forma intermediario fosforilado del enzima y puede ser similar al tipo de las ATPasas  $F_1F_0$  del cloroplasto, mitocondria y bacterias por el complejo de varias subunidades.

Otro hecho general a destacar es que las ATPasas  $F_1F_0$  tienen una estequiometría de 2-4  $H^+/ATP$  y así son fácilmente reversibles, mientras que las ATPasas de plantas y hongos son fisiológicamente irreversibles por presentar una estequiometría de 1  $H^+/ATP$ .

En todo caso, hemos de tener en cuenta que no es fácil adscribir a los tipos y organizaciones anteriores todos los tipos de ATPasas de  $H^+$ . Así, ya se han descrito modernamente ATPasas bombas de protones electrógenas en diversas células animales, que son vanadato insensibles y sensibles a los aniones. Así, las ATPasas de  $H^+$  no mitocondriales no se restringen sólo a las plantas superiores, algas y hongos como inicialmente se creía. Un punto también importante de desconocimiento es la regulación en las células de estas bombas de  $H^+$ , su posible mayor diversidad y su significación biológica en la compartimentación celular y en la regulación del crecimiento y desarro-

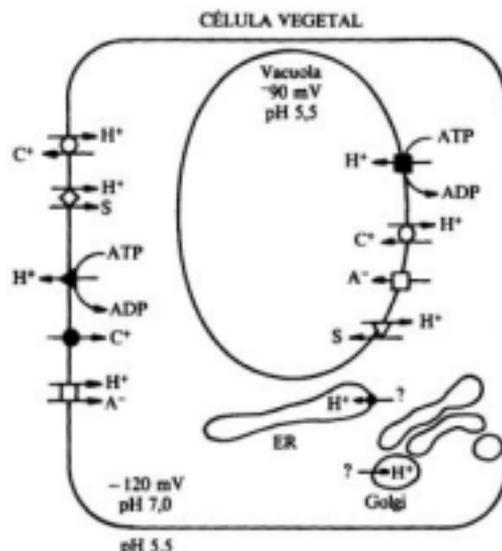


Figura 6.7.—Modelo de trabajo de las ATPasas translocadoras de  $H^+$  y sistemas de transporte de solutos acoplados al  $H^+$  en una célula vegetal simplificada. La ATPasa de membrana plasmática y la de tonoplasto generan un gradiente electroquímico de protones que provee la fuerza motora para el transporte activo de cationes ( $C^+$ ), aniones ( $A^-$ ) y azúcares (S). Las evidencias de transporte acoplado al  $H^+$  en vesículas de tonoplasto incluyen sistemas *antiport* para  $H^+/Ca^{2+}$ ,  $H^+/K^+$ ,  $H^+/sacarosa$  y  $H^+/glucosa$  y absorción de  $Cl^-$  por el potencial creado. Los transportadores acoplados al  $H^+$  hallados en vesículas de membrana plasmática incluyen sistemas de *antiport*  $H^+/K^+$  y *symport*  $H^+/AIA$ . También puede haber ATPasas bombas de  $H^+$  electrógenas en otras membranas subcelulares como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (tomado de H. See, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36:175-208, 1985).

llo de las plantas. En todo caso, los rápidos progresos en estos últimos años en este campo nos abren nuevas perspectivas para la fisiología del transporte.

Como resumen final de la operación, a nivel subcelular, de las ATPasas de las plantas, véase el modelo de trabajo de Sze (Fig. 6.7) en relación con los diferentes sistemas de transporte de solutos.

La diversidad de funciones metabólicas en las que participa el  $\text{Ca}^{2+}$  (Cap. 8), la comprobación de la existencia de la calmodulina en plantas, su función como mensajero secundario (Cap. 30) y el papel de este elemento en el apoplasto celular han impulsado una activa investigación sobre el mecanismo de transporte del calcio y su regulación a nivel de membranas y célula, que es de esperar que pronto nos pueda dar una explicación general de su mecanismo.

Mucho más discutible es la participación de la bomba ATPasa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  (bien comprobada y operativa en las células animales) en las células vegetales. En este mecanismo, la energía del ATP se emplea en una expulsión del  $\text{Na}^+$  y una entrada de  $\text{K}^+$  en la célula. Un hecho distintivo, caso de darse este mecanismo, es que, al revés de lo que ocurre en la célula animal, la uabaina no inhibe específicamente la actividad de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  de la célula vegetal.

Otra variante más sencilla, las bombas de extrusión de  $\text{Na}^+$  han sido descritas especialmente en las algas y en las plantas superiores resistentes a medios salinos.

La pinocitosis, o absorción de sustancias del exterior por invaginación del plasmalema y formación de vesículas internas, ha sido también citada como mecanismo de absorción en las células vegetales.

#### 6.4.2. Modelo de transporte activo asociado a cinéticas multifásicas

En un modelo propuesto recientemente (Sabater, 1982) (Fig. 6.8), se postula que la permeasa  $P$  puede estar en sucesivos estados de activación:  $P_1, P_2, \dots, P_n$  con afinidades crecientes para el nutriente que puede transportar. Cada estado  $P_i$  se puede formar, en una reacción que requiere energía, a partir de un estado de grado inferior  $P_{i-1}$ , siempre que la permeasa no tenga nutriente ligado a ella. En cualquier estado  $P_i$ , la permeasa tiene dos tipos de sitios ligantes para el nutriente: uno que sirve para transportarlo y otro sitio al que se unen varias moléculas de nutriente y que es el sitio efector. El modelo permite explicar las cinéticas multifásicas de absorción, así como los diferentes requerimientos energéticos según la concentración de nutriente. El modelo también da una explicación al aparentemente elevado número de sitios ligantes de nutriente en la membrana de las células vegetales.

#### 6.5. Visión general de la absorción y de la vía de transporte de los nutrientes en la planta

Hasta el momento, en este capítulo, hemos considerado los mecanismos generales de transporte o absorción de nutrientes minerales a corta distancia, es decir, a nivel de célula. No obstante, en la planta superior este conjunto de células que forman el

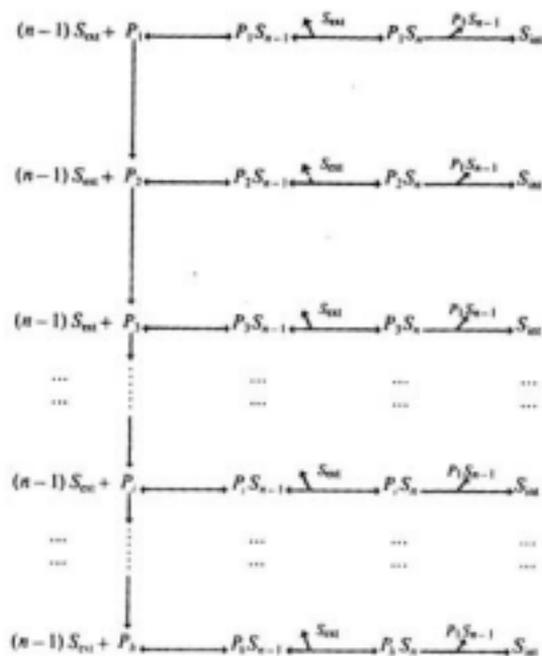


Figura 6.8.-Modelo de transporte activo asociado a cinéticas multifásicas:  $h$  es el número de fases;  $S$  es el nutriente transportado; est. e int. se refieren, respectivamente, al exterior y al interior de la célula.

cuerpo de la planta se diferencia e integra en tejidos y órganos. En las secciones 4.2 y 4.3 (Figs. 4.3 y 4.4) se han tratado las características anatómicas y funcionales de la raíz como órgano de absorción del agua. En 6.1 se han considerado las relaciones de la raíz con el suelo, como fuente de nutrientes para las plantas. En conjunto, pues, la vía de transporte de los nutrientes comprenderá el estudio de la absorción de los nutrientes, especialmente por la raíz, su camino radial a través de la raíz con ingreso en la corriente de transpiración del xilema, para así ser transportado a los distintos territorios celulares de la planta. Todo este conjunto de vías, a corta, mediana y larga distancia, se pueden considerar interdependientes con mecanismos específicos de acoplamiento y regulación.

En el *transporte a corta distancia*, los iones del suelo, o de una solución externa, son absorbidos por la raíz en el espacio libre. En el mecanismo de absorción intervienen tanto procesos estrictamente fisicoquímicos (absorción pasiva) como procesos contragradientes del potencial electroquímico que requieren de energía externa (absorción activa). En la raíz los iones pueden seguir la vía del apoplasto hasta la endodermis, en donde la banda de Caspary (Fig. 4.4A) interrumpe la vía del apoplasto, por lo que deben penetrar activamente hacia el simplasto o simplasma, o bien pueden ser absorbidos en la misma epidermis o en los pelos radiculares y transportados célula

a célula por medio de los plasmodesmos en el sistema del simplasma o simplasto. Una vez en el cilindro central o estela, los iones serían cedidos o secretados desde el simplasto al apoplasto, ingresando así en la vía del xilema.

Para este transporte radial de iones a través de la raíz (*transporte a media distancia*), como ya hemos visto (sección 4.3), Crafts y Broyer propusieron ya en 1938 una hipótesis que ha recibido apoyo hasta la actualidad. Según la versión moderna de esta hipótesis, el apoplasto (espacio de difusión libre) del cilindro cortical puede ser penetrado por agua e iones desde el medio externo. De este modo el plasmalema de todas las células corticales actuaría como una gran superficie para la absorción activa al interior del simplasto de la raíz. En general, se considera que el movimiento de iones es fundamentalmente simplásmico, mientras el del agua principalmente apoplásmico. Por todo ello, la *membrana* es el lugar de control del transporte de iones hacia el xilema.

Si bien hay una aceptación prácticamente general sobre el transporte simplásmico de la teoría de Crafts y Broyer, en cambio es más discutida la aseveración de que una vez en el interior del cilindro central, los iones son liberados pasivamente hacia los vasos del xilema. En un principio se argumentaba que la baja presión parcial del  $O_2$  en las células del parénquima de la estela no permitirían mantener la respiración necesaria para sostener en las células el gradiente interno de iones. No obstante, medidas más ajustadas parecen indicar que este gradiente de  $O_2$  es seguramente demasiado pequeño para explicar esta liberación de iones.

En otro orden de ideas, se han encontrado evidencias, sobre todo con experimentos con inhibidores metabólicos, que sugieren la existencia de un sistema activo de bombeo en las células parenquimáticas del xilema. En este sentido, Pitman establece un modelo de dos bombas: una responsable de la *carga del simplasto* y otra para la *carga de los vasos*, excluyéndose así la hipótesis antigua de una bomba que operaba a nivel de la endodermis.

Una vez los iones han alcanzado el xilema son arrastrados pasivamente por la corriente de transpiración a lo largo de toda la planta (*transporte a larga distancia*), como ya hemos tratado en las secciones 4.4, 4.5 y 4.6.

Con el empleo de elementos minerales radiactivos se puede comprobar fácilmente que los nutrientes minerales son transportados vía xilema por la corriente de transpiración en flujo de masa. Ya en 1939 Stout y Hoagland realizaron un experimento que demuestra el transporte de minerales por el xilema y la posibilidad de movimiento lateral de sustancias minerales entre el xilema y el floema. Suministraron potasio radiactivo ( $K^{42}$ ) a un sauce y en una porción de una rama separaron con papel de parafina el leño (xilema) de la corteza (floema). En secciones a distintos niveles de la porción considerada (Fig. 6.9) se analizaron los contenidos de  $K^{42}$  en xilema y floema. Pudo comprobarse que en la porción aislada longitudinalmente había bajo contenido de  $K^{42}$  en floema y alto en xilema. En cambio, secciones por encima o por debajo de la parte aislada mostraron fuertes incrementos de  $K^{42}$  en el floema como consecuencia de movimiento lateral desde el xilema.

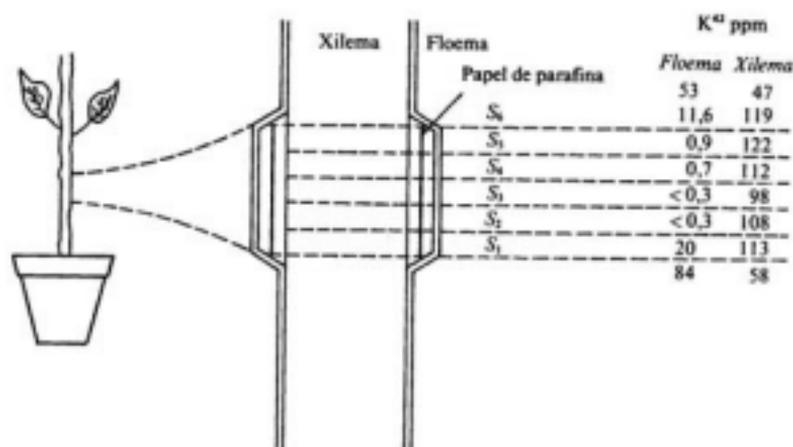


Figura 6.9.-Movimiento ascendente de K<sup>+</sup> en el xilema. En una porción de una rama de sauce se aísla, por medio de un papel de parafina, el xilema y el floema. El análisis del contenido de K<sup>+</sup> a distintos niveles dentro de la porción aislada muestra el transporte del K<sup>+</sup> por el xilema. En las regiones no aisladas (superior e inferior) ocurre a la vez un transporte lateral de K<sup>+</sup> desde el xilema al floema (adaptado de Stout y Hoagland, 1939).

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- ANDERSON, W. P. (ed.): *Ion Transport in Plants*, Academic Press, Londres, 1973.
- BOWLING, D. J. F.: *Uptake of Ions by Plants Roots*, Chapman and Hall, Londres, 1976.
- BRISKIN, D. P., y POOLE, R. J.: *The Plasma Membrane ATPase of Higher Plant Cells*, «What's New in Plant Physiology», vol. 14, 1983, págs. 1-4.
- CLARKSON, D. T.: *Ionic relations*, en: *Advanced Plant Physiology* (Edit. M. B. Wilkins), Pitman, Londres, 1984, págs. 319-353.
- CLARKSON, D. T.: *Factors Affecting Mineral Nutrient Acquisition by Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 77-115.
- EPSTEIN, E.: *Mineral Nutrition of Plants. Principles and Perspectives*, Wiley, Nueva York, 1972.
- GAUCH, H. G.: *Inorganic Plant Nutrition*, Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, 1972.
- GLASS, A. D. M.: *Regulation of Ion Transport*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 34, 1983, páginas 311-326.
- HELLER, R.: *L'absorption minérale chez les végétaux*, Masson et Cie, Paris, 1974.
- HEWITT, E. J., y SMITH, T. A.: *Plant Mineral Nutrition*, The English Universities Press, Londres, 1975.
- HIGINBOTHAM, N.: *The mineral absorption process in plants*, «Bot. Rev.», vol. 39, 1973, páginas 15-69.
- LAUCHLI, A., y BIELESKI, R. L.: *Inorganic Plant Nutrition*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vols. 15A y 15B, Springer-Verlag, Berlín, 1983.

- LIN, W.: *Energetics of Membrane Transport in Protoplasts*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 34, 1983, págs. 311-326.
- LÜTTGE, U. y HIGINBOTHAM, N.: *Transport in Plants*, Springer-Verlag, Nueva York, 1979.
- LÜTTGE, U., y PITMAN, M. G. (eds.): *Transport in Plants II*, Parte A, *Cells*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. II, Springer-Verlag, Berlin, 1976.
- LÜTTGE, U., y PITMAN, M. G. (eds.): *Transport in Plants II*, Parte B, *Tissues and Organs*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. II, Springer-Verlag, Berlin, 1976.
- MENGEL, K., y KIRKBY, E. A.: *Principles of Plant Nutrition*, 3<sup>rd</sup> edit., International Potash Institute, Berna, 1982.
- NISSEN, P.: *Uptake mechanisms: Inorganic and Organic*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 25, 1974, págs. 53-79.
- POOLE, R. J.: *Energy Coupling for Membrane Transport*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 29, 1978, págs. 437-460.
- REINHOLD, L., y KAPLAN, A.: *Membrane Transport of Sugars and Amino Acids*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 35, 1984, págs. 45-83.
- ROBINSON, D. G.: *Plant Membranes*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1985.
- SABATER, B.: *A Mechanism for Multiphasic Uptake of Solutes in Plants*, «Physiologia Plantarum», vol. 55, 1982, págs. 121-128.
- SCHWARZ, M.: *The Relation of Ion Transport to Phosphorylation*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 22, 1971, págs. 469-484.
- SERRANO, R.: *Plasma Membrane ATPase of Fungi and Plants as a Novel Type of Proton Pump*, «Cult. Top. Cell. Regul.», vol. 23, 1984, págs. 87-126.
- SERRANO, R.: *Plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi*, CRC Press, Boca Raton, 1985.
- SPANSWICK, R. M.: *Electrogenic Ion Pumps*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 32, 1981, páginas 267-289.
- SPANSWICK, R. M.; LUCAS, W. J., y DAINTY, J. (eds.): *Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1980.
- SUTCLIFFE, J. F., y BAKER, D. A.: *Las plantas y las sales minerales*, Omega, Barcelona, 1979.
- SZE, H.: *H<sup>+</sup>-Translocating ATPases: Advances Using Membrane Vesicles*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 175-208.

## TRANSPORTE POR EL FLOEMA

Todos los organismos multicelulares necesitan para poder funcionar un sistema de transporte altamente organizado. En los organismos unicelulares los desplazamientos de sustancias dentro del territorio celular pueden explicarse fácilmente en términos de transporte pasivo, siguiendo gradientes de concentración, o mediante transporte activo, siempre que haya necesidad de atravesar alguna membrana. La necesidad de un sistema de transporte en los vegetales surgió como consecuencia del proceso evolutivo seguido por los mismos, y que hizo que al comenzar a colonizar la tierra firme los órganos especializados en la absorción de agua y nutrientes minerales del suelo, y los órganos especializados en la elaboración de nutrientes orgánicos quedaran separados espacialmente, teniendo a veces necesidad estos nutrientes de recorrer distancias considerables. Para este transporte de nutrientes entre largas distancias existen en los vegetales superiores dos sistemas de conducción, el xilema y el floema, que en conjunto constituyen el sistema vascular. Si para el transporte del agua por el xilema existe una teoría generalmente aceptada por la Fisiología Vegetal (Cap. 4) no ocurre lo mismo con el transporte de solutos, o savia elaborada, en la terminología antigua, por el floema, problema sobre el que existen todavía bastantes dudas y confusión.

### 7.1. El floema como sistema conductor de los solutos

El primer científico en sugerir que la savia elaborada era transportada por el floema (nombre dado por Nägeli en 1858, derivado del griego *phloios* = corteza) fue el fisiólogo Theodor Hartig, descubridor de los tubos cribosos en 1837 y de la exudación del xilema y floema en 1860. La técnica utilizada por Hartig para poner de manifiesto el papel del floema fue la del descortezamiento anular, procedimiento ideado por Stephen Hales en 1726. Tal técnica consiste en la eliminación de un anillo de corteza en el tallo, de tal forma que el flujo de materiales por el floema quede interrumpido. Este tratamiento invariablemente mostraba que el crecimiento por debajo de la zona descortezada quedaba reducido, mientras que en las hojas no aparecían síntomas de marchitamiento por deficiencia de agua, pudiéndose concluir como resultado de este experimento que el agua se movía en sentido ascendente por el leño, mientras que las sustancias elaboradas se movían en sentido descendente por la corteza. Mason y Maskell en 1928 en plantas de algodón y utilizando las técnicas de descortezamiento anular y análisis de azúcares, esta-

blecen claramente el papel del floema en el transporte de solutos. Demuestran que el floema es el tejido transportador de sacarosa y que las oscilaciones diurnas en el contenido foliar de azúcares pueden ser detectadas algunas horas más tarde en las zonas más inferiores de la corteza, pero no del leño.

El concepto de transporte descendente por el floema hubo de ser modificado cuando Curtis, en 1935, demuestra en *Philadelphus pubescens* y en *Rhus typhina*, también por descortezamiento anular, que el transporte de azúcares hacia las yemas apicales, es decir, transporte ascendente de azúcares hacia las yemas, tiene lugar también por el floema.

El uso de los isótopos radiactivos, y especialmente la utilización de sacarosa marcada con  $^{14}\text{C}$ , han venido a confirmar las observaciones anteriores sobre el floema como tejido conductor de solutos. Otra técnica experimental que ha permitido establecer el papel del floema, ha sido la utilización de áfidos que se alimentan de las sustancias transportadas por el floema. Estos áfidos se alimentan mediante la inserción de sus estiletes directamente en los tubos cribosos; si se secciona el cuerpo del animal dejando exclusivamente el estilete, el contenido de los tubos cribosos fluirá durante algunos días a través del estilete. Este fluido puede ser recogido y su análisis químico demuestra su elevado contenido en sacarosa.

Toda la evidencia experimental que hoy se posee, indica claramente que el transporte de solutos desde las hojas a todas las demás partes del vegetal tiene lugar fundamentalmente a través de los tubos cribosos del floema y que este transporte no es sólo descendente, sino también puede ser ascendente.

## 7.2. Estructura del floema

El floema es un tejido complejo, tanto morfológica como fisiológicamente. Sus componentes básicos son los elementos cribosos, varias clases de células parenquimáticas (células acompañantes, células albuminosas, parenquima floemático, etc.) fibras y esclereidas. En especies provistas de un sistema laticífero como en *Hevea brasiliensis*, los elementos de este sistema pueden encontrarse también en el floema.

### 7.2.1. Elementos del floema

Los elementos conductores del floema, a los que denominaremos, siguiendo la terminología de Esau, elementos cribosos, pueden ser de dos tipos: a) células cribosas; b) elementos de los tubos cribosos.

La especialización morfológica de los elementos cribosos se pone de manifiesto en el desarrollo de áreas cribosas y placas cribosa sobre sus paredes celulares y en las modificaciones de sus protoplastos. Las áreas cribosas (Fig. 7.1) son zonas deprimidas de la pared celular provistas de poros a través de los cuales los protoplastos de los elementos cribosos adyacentes se comunican por los filamentos de conexión, rodeadas generalmente por un cilindro de calosa, polisacárido formado por restos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ 1-3. En ciertas plantas como las coniferales, todas las áreas cribosas de

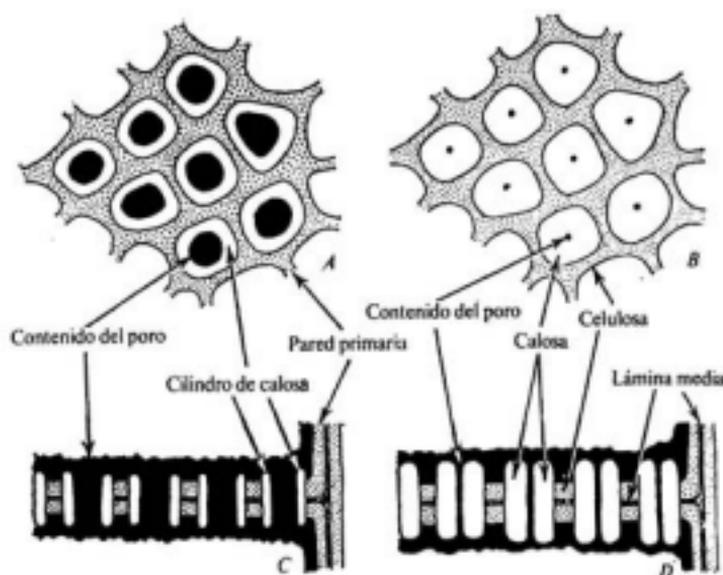


Figura 7.1.—Interpretación de la estructura de una área cribosa en un tubo criboso de angiosperma (tomado de K. Esau, *Plant Anatomy*, Trans-Editions, Inc., Nueva York).

un elemento son parecidas en cuanto a su grado de especialización, mientras que en otras, como en la mayoría de las angiospermas, algunas áreas están más especializadas, localizándose generalmente en las paredes terminales de los elementos, recibiendo entonces el nombre de placas cribosas (Figs. 7.2 y 7.3). Si consta de una sola área cribosa se denomina placa cribosa simple, y si son varias, placa cribosa compuesta.

Los dos tipos de elementos cribosos, las células cribosas y los elementos de los tubos cribosos, se distinguen por el grado de diferenciación de sus áreas cribosas y por la distribución de las áreas sobre la pared celular. Las células cribosas son generalmente largas y delgadas, con extremos afilados o paredes terminales muy inclinadas; sus áreas cribosas no están especializadas, careciendo, por tanto, de placas cribosas. Desde un punto de vista filogenético se las considera como precursoras de los elementos de los tubos cribosos, siendo muy abundantes en las gimnospermas y plantas vasculares inferiores. Los elementos de los tubos cribosos poseen placas cribosas, generalmente sobre las paredes terminales, que varían desde muy inclinadas hasta transversales. Ordinariamente los elementos de los tubos cribosos se disponen formando series longitudinales, presentándose las placas cribosas en las paredes comunes. Estas series de tubos constituyen los tubos cribosos que son muy abundantes en las angiospermas.

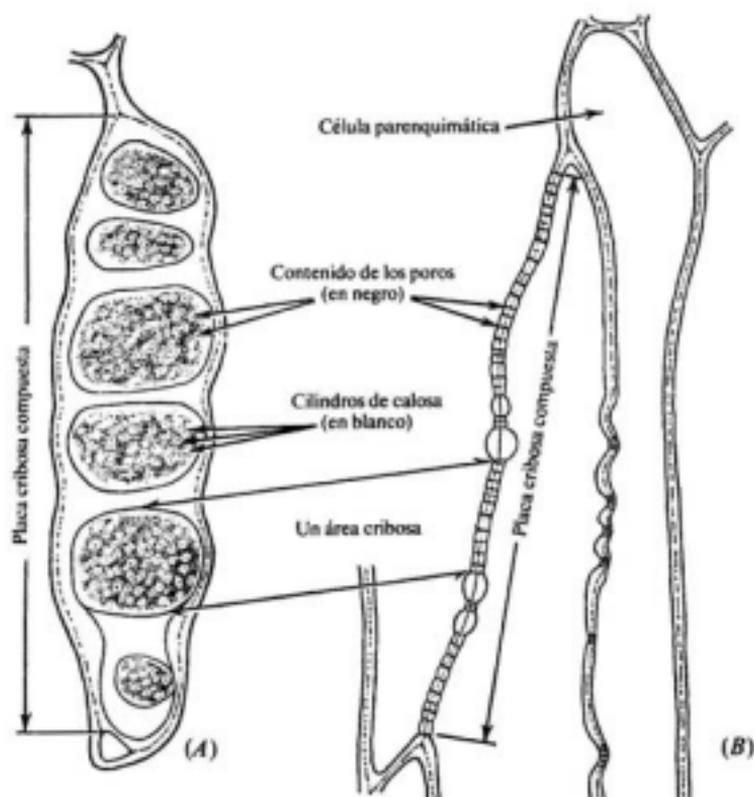


Figura 7.2.—Área cribosa compuesta de *Nicotiana* (tabaco) en vista superficial (A) y en sección longitudinal (B) (tomado de K. Esau, *Plant Anatomy*, Trans-Editions, Nueva York).

## 7.2.2. Citología de los elementos cribosos

Como veremos más adelante en este capítulo, no existe unanimidad sobre el mecanismo o posibles mecanismos mediante los cuales los solutos son transportados por el floema. Esta falta de unanimidad se debe a que tampoco la existe sobre la estructura de los tubos cribosos funcionales, debido a la gran labilidad de estos elementos, que pueden sufrir alteraciones considerables por los tratamientos a que son sometidos los tejidos para su examen microscópico.

### 7.2.2.1. Elementos cribosos de las angiospermas

Generalmente, las angiospermas tienen elementos de los tubos cribosos asociados con células parenquimatosas nucleadas denominadas células acompañantes (Fig. 7.4).

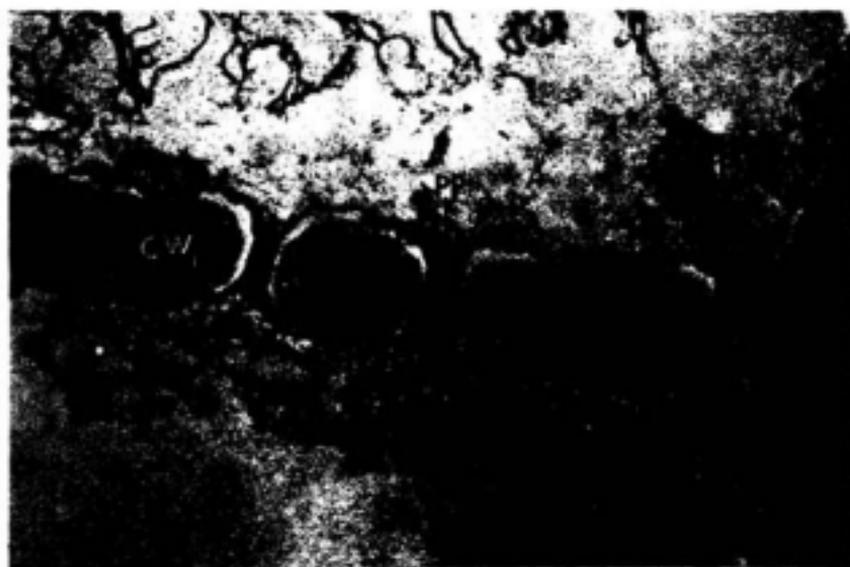


Figura 7.3.—Esquema de una placa cribosa. CW<sub>1</sub> = Pared celular primaria. PP = Proteína P taponando los poros de la placa. PM = Membrana citoplasmática. C = Calosa recubriendo la pared celular (tomado de M. C. Ledbetter y K. R. Porter, *Introduction to the Fine Structure of Plant Cells*, Springer-Verlag, Berlín, 1970).

**Pared celular.**—La pared celular suele ser primaria, compuesta fundamentalmente por celulosa aunque las pruebas microquímicas dan también reacción positiva para la pectina. Algunas paredes, como en magnolia y laurel, poseen unos engrosamientos internos con un brillo marcado, denominados por ello espesamientos nacarados. La pared alcanza su máximo espesor inmediatamente antes de la maduración del elemento criboso. Algunos enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa ácida y ATPasa han sido localizados en las paredes celulares de los elementos de los tubos cribosos.

**Núcleo.**—Una de las características más conocidas del protoplasto de los elementos de los tubos cribosos es la ausencia de núcleo, aunque se han encontrado algunas plantas como *Ulmus americana*, *Robinia*, *Vitis* y *Secoia* en los que muchos elementos de los tubos cribosos maduros contienen núcleos aparentemente normales. La estructura de los elementos cribosos inmaduros se parece a la de las células procambiales y cambiales a partir de las cuales se diferencian. La degradación del núcleo comienza por una lobulación del mismo, seguida por una desaparición gradual del contenido cromatinico y ruptura de la membrana nuclear. En algunas plantas, el nucléolo o nucléolos salen del núcleo antes de su desintegración, permaneciendo en el citoplasma del elemento criboso; sin embargo, se ha visto que muchas inclusiones esféricas de los elementos cribosos maduros, que se consideraban como nucléolos, no lo son.

**Retículo endoplasmático.**—Los elementos de los tubos cribosos inmaduros poseen un retículo endoplasmático rugoso, similar al de cualquier célula vegetal nucleada.

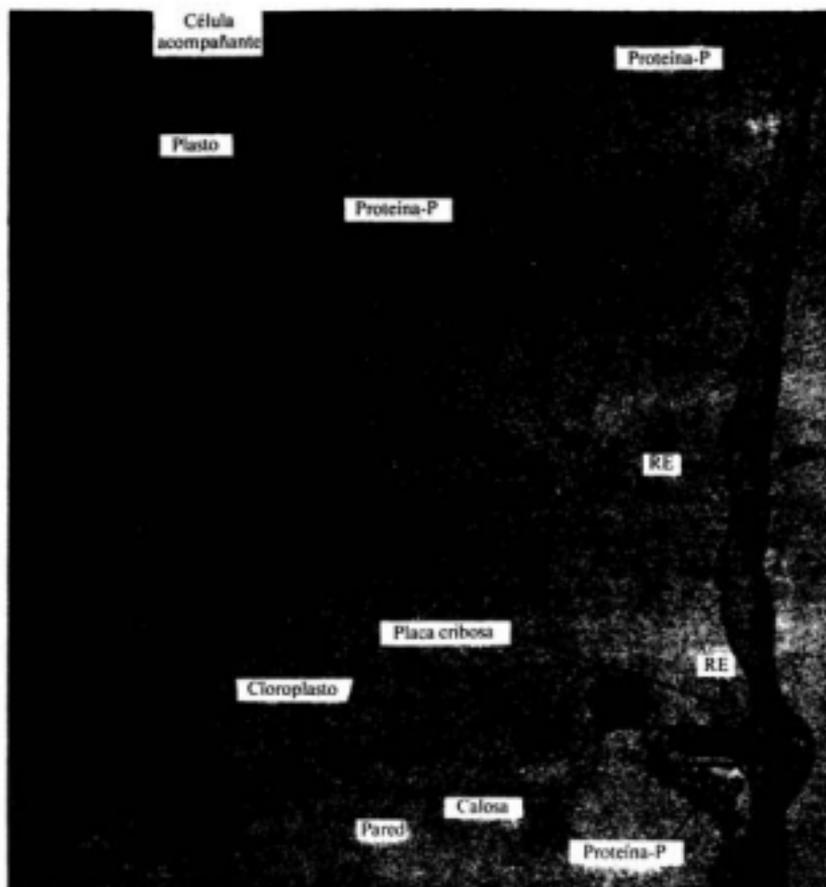


Figura 7.4.—Esquema de la sección longitudinal de un elemento de tubo criboso (tomado de K. Esau, *Plant Anatomy*; Trans-Edicions, Nueva York).

Durante el proceso de maduración del elemento, el retículo endoplasmático comienza a adoptar una posición parietal, los ribosomas desaparecen y en los elementos maduros el retículo endoplasmático es liso.

*Dictiosomas, plastos y mitocondrias.*—Los dictiosomas son relativamente abundantes en los elementos cribosos inmaduros; algunos aparecen todavía en las últimas fases de la diferenciación y están ausentes en los elementos maduros. Los plastos de los elementos cribosos pueden contener granos de almidón, cristales, filamentos o cuerpos esféricos densos. Están presentes normalmente en los elementos maduros. Pueden reconocerse dos tipos de plastos: plastos tipo S, que almacenan almidón, y plastos tipo P,

que almacenan inclusiones proteicas y a veces también granos de almidón. En dicotiledóneas se encuentran los dos tipos de plastos mientras que en las monocotiledóneas sólo se ha encontrado por ahora el tipo P. Las mitocondrias presentan un aspecto normal en los elementos inmaduros, pueden sufrir modificaciones durante la diferenciación y están presentes en los elementos maduros aunque no hay pruebas concluyentes de que sean completamente funcionales.

**Plasmalema y tonoplasto.**—El plasmalema es probablemente la única estructura celular que permanece en los elementos maduros y que conserva íntegramente su funcionalidad. Se han detectado en el plasmalema de elementos maduros algunas enzimas como fosfatasa ácida y ATPasa, sugiriéndose que pueden desempeñar un papel importante en la transferencia de solutos e iones entre los elementos cribosos y las células parenquimatosas contiguas, así como en la síntesis de calosa en las placas cribosas. Los elementos inmaduros contienen normalmente pequeñas vacuolas que pueden fusionarse durante las primeras fases de la diferenciación, formando otras mayores. En los elementos maduros se observa una ausencia casi total de tonoplasto debido a su degradación durante la maduración, lo que da lugar a una aparente integración entre citoplasma y componentes vacuolares. Sin embargo, y a pesar de tal integración, siempre se observa una delgada capa parietal de citoplasma muy próxima al plasmalema en los elementos maduros.

**Proteína-P.**—En los elementos cribosos se encuentra una sustancia más o menos viscosa, denominada originalmente mucilago (slime) y hoy denominada, dada su naturaleza proteica, proteína-P (Phloem-Protein). Es un componente muy característico del protoplasto de los elementos de los tubos cribosos de dicotiledóneas, mientras que su aparición en monocotiledóneas es muy esporádica. Investigaciones realizadas en *Ulmus americana* y *Cucurbita maxima* han demostrado que la proteína-P ocupa una posición parietal en el elemento criboso maduro (Fig. 7.4). Puede presentarse bajo forma amorfa, tubular, filamentosa o cristalina, dependiendo de la especie y del estado de diferenciación del elemento criboso. Las dos formas más corrientes son la filamentosa, formando los llamados por algunos autores, filamentos plasmáticos, siendo esta forma la más frecuente en los elementos cribosos maduros, y la tubular más frecuente en los elementos cribosos jóvenes, como ocurre en *Nicotiana*, en la cual los cuerpos de proteína-P están constituidos por túbulos de unos 23 nm de diámetro. Durante la diferenciación subsiguiente, los cuerpos de proteína-P se dispersan, pierden su estructura tubular y toman el aspecto de filamentos de unos 15 nm de diámetro. Se sabe muy poco sobre su origen, aunque es de suponer que debe ser sintetizada durante los primeros estados de la diferenciación cuando aún existen ribosomas; es muy probable que el retículo endoplasmático intervenga en el proceso de la síntesis. Algunas actividades enzimáticas como fosfatasa ácida y ATPasa han sido localizadas en la proteína-P. Su función es por ahora desconocida, aunque se ha sugerido que puede actuar taponando la placa cribosa, evitando la pérdida de solutos en tubos cribosos dañados (Fig. 7.3).

#### 7.2.2.2. Formación de la placa cribosa

La formación de los poros tal como se ha visto con el microscopio electrónico (figura 7.5) es la siguiente: el lugar del futuro poro está ocupado al principio por un solo plas-

modos y se comienza a distinguir del resto de la pared por la aparición de un par de plaquitas o collares de calosa, uno en cada lado de la pared. Las plaquitas opuestas se funden y en medio de las plaquitas fusionadas aparece un agujero que crece centrifuga-

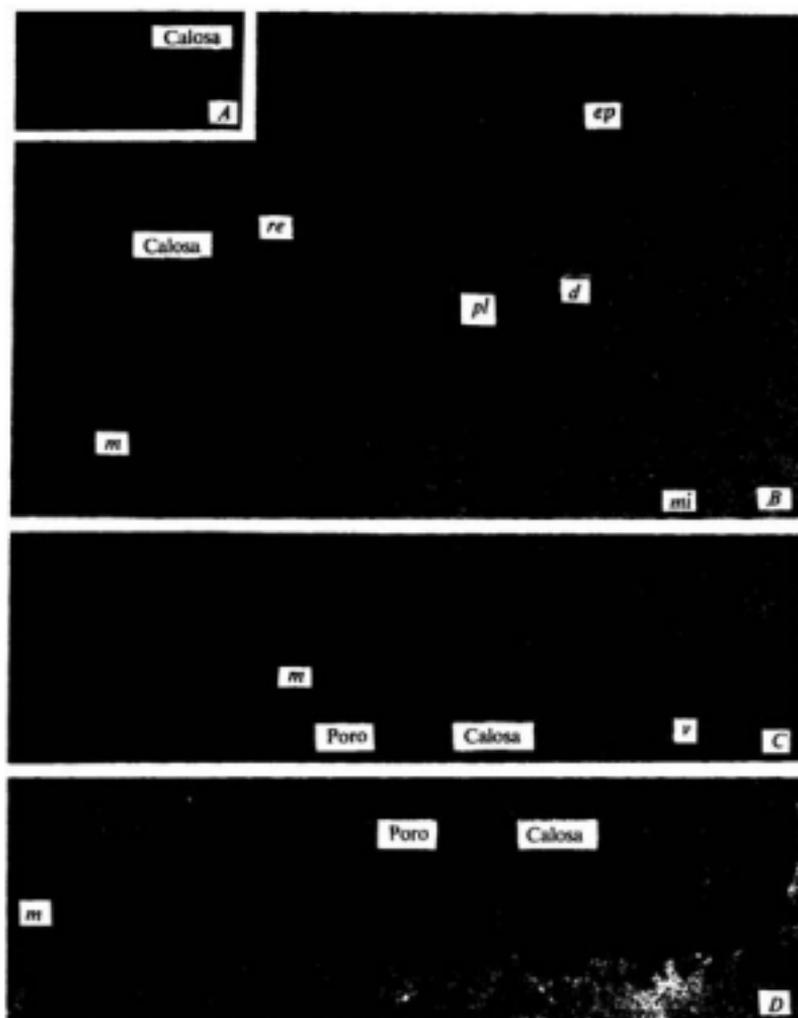


Figura 7.5.—Desarrollo de una placa cribosa en *Robinia* (A,  $\times 970$ ) y *Cucurbita* (B-D, micrografías electrónicas de secciones longitudinales). A, vista superficial de placa cribosa con poros cubiertos por calosa. B, placa cribosa joven con los poros (ep) cubiertos por laminitas de calosa y retículo endoplasmático (re). Un solo plasmodesmo en un poro (pl). C, poro abierto recientemente, tapizado con calosa. En el citoplasma las vesículas (v) han reemplazado al re. D, placa cribosa madura. Algunas acumulaciones de mucilago encima de ella y en los poros. La pared de la placa cribosa señalada con m (K. Esau y otros, *Bot. Gaz.* 123, 1962) (tomado de K. Esau, *Plant Anatomy*, Trans-Editions, Nueva York).

mente. Así, desde su inicio el poro está tapizado de calosa. Uno de los problemas más importantes que queda por resolver es sobre la naturaleza del contenido de los poros de la placa cribosa, es decir, saber con exactitud si los poros en los elementos cribosos funcionales están abiertos, permitiendo así el flujo de sustancias de un elemento criboso al contiguo, o por el contrario, si los poros están taponados, lo que requeriría un consumo de energía para que las sustancias transportadas pudieran atravesarlas. Es frecuente observar imágenes de placas cribosas con los poros completamente taponados por proteína-P u otros materiales (Fig. 7.3) o bien completamente libres de ninguna oclusión (Fig. 7.4). La cuestión, que ha sido y es origen de constantes debates entre fisiólogos e histólogos, es saber cuál de estas imágenes representa la verdadera estructura de los poros de la placa cribosa *in vivo*. Los defensores del taponamiento de los poros en los elementos cribosos, se basan en que la mayoría de los estudios muestran los poros taponados con proteína-P o algún material membranoso. Los oponentes argumentan que el taponamiento se debe a una reacción provocada en los tejidos por los reactivos utilizados para preparar el material para su observación microscópica y que, por tanto, tales tapones no son más que artefactos. Los defensores de la no obstrucción de los poros, señalan que cuando el floema se fija por métodos que evitan la pérdida de presión en los elementos cribosos, un gran número de poros aparecen sin ninguna clase de taponamiento. De igual forma, mediante el uso de bajas temperaturas para provocar una muerte instantánea del tejido antes de la fijación, se muestra que los poros no están siempre (quizá nunca) completamente taponados en los elementos cribosos funcionales. La cuestión no está ni mucho menos resuelta, pero hay evidencia experimental cada vez mayor en apoyo de que los poros de las placas cribosas no están taponados.

#### 7.2.2.3. Secuencia de cambios estructurales durante la maduración de un elemento criboso

Los cambios estructurales que tienen lugar durante la maduración de un elemento criboso pueden resumirse como sigue:

- a) Los elementos inmaduros son muy similares a cualquier célula vegetal nucleada.
- b) Durante el crecimiento celular, el núcleo comienza a lobularse, aparecen microtúbulos corticales, se observan plasmodesmos tanto en las paredes laterales como terminales; en las especies que la presentan, comienza la aparición de la proteína-P.
- c) Comienzan a formarse las plaquitas de calosa que delimitarán el futuro poro.
- d) La cromatina comienza su desaparición gradual; el retículo endoplasmático liso, por liberación de los ribosomas que aparecen ahora en el citoplasma, se sitúa en la periferia celular. La proteína-P, si está presente, comienza a dispersarse en el citoplasma, los plastos adoptan una forma ovoide o esférica. Las plaquitas de calosa se fusionan.
- e) Las mitocondrias y plastos se sitúan en la periferia celular; los microtúbulos y dictiosomas desaparecen; los poros de la placa cribosa comienzan a ser aparentes, el núcleo se desintegra y también los tonoplastos, quedando el citoplasma repartido uniformemente por todo el territorio celular.

- f) Paralelamente con la desintegración nuclear y de los tonoplastos, se completa la formación de los poros de la placa cribosa, los ribosomas desaparecen, el retículo endoplasmático, mitocondrias y plastos aparecen en la periferia celular, la proteína-P, si está presente, puede ocupar el lumen vacío, o puede adoptar una disposición parietal.

#### 7.2.2.4. Elementos parenquimáticos asociados con los elementos de los tubos cribosos

Los elementos de los tubos cribosos de las angiospermas están asociados a células parenquimáticas muy especializadas, llamadas células acompañantes (Fig. 7.4). Generalmente se originan a partir de la misma célula meristemática que los elementos cribosos. Ambos tipos de células presentan numerosas conexiones, bien mediante poros en las paredes laterales de los elementos de los tubos cribosos, o bien mediante plasmodesmos frecuentemente ramificados en la parte de las células acompañantes. Las células acompañantes conservan sus núcleos a lo largo de toda su vida, y durante su desarrollo aumenta la densidad de su protoplasto, en parte debido al aumento en la población de ribosomas. En adición a los ribosomas y núcleo, contienen también numerosas mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y plastos. Algunas células acompañantes contienen también proteína-P. Mediante estudios histoquímicos se ha demostrado la presencia en las células acompañantes de una actividad fosfatasa ácida muy fuerte, así como actividades peroxidásicas y ATPásicas; la presencia de estos enzimas sugiere que las células acompañantes pueden desempeñar un papel importante en el transporte de azúcares hacia los tubos cribosos.

#### 7.2.3. Elementos cribosos de las gimnospermas

Los elementos cribosos más abundantes en las gimnospermas son las células cribosas, en las cuales todas las áreas cribosas presentan el mismo grado de especialización. Las células inmaduras son semejantes a cualquier célula vegetal.

**Pared celular.**—Con la sola excepción de las pináceas, cuya pared presenta engrosamientos secundarios, la pared celular de las células cribosas es primaria.

**Núcleo.**—El núcleo de las células cribosas, sobre todo en las coníferas, no se desintegra totalmente al alcanzar éstas su madurez. El núcleo degenerado persiste como una masa densa a los electrones (cuando se examina por medio de la microscopía electrónica) con fragmentos intactos de la membrana nuclear.

**Retículo endoplasmático.**—Durante la diferenciación de las células cribosas, el retículo endoplasmático que en las células inmaduras es rugoso, se transforma en liso, adoptando en las células maduras una disposición parietal formando agregaciones masivas en las áreas cribosas. En *Pinus resinosa* y en *Pinus silvestris* las agregaciones masivas del retículo endoplasmático están interconectadas a través del área cribosa.

**Plastos y mitocondrias.**—En las células cribosas se encuentran tanto los plastos tipo S como tipo P. Plastos tipo S se han encontrado en *Ginkgo*, *Ephedra* y *Welwitschia*, mientras que todas las pináceas examinadas contienen plastos tipo P. Las mitocondrias

sufren muy pocos cambios durante la maduración de las células cribosas, aunque en las células maduras las crestas mitocondriales aparecen algo hinchadas.

*Otros componentes citoplasmáticos.*—Dictiosomas y microtúbulos presentes en células inmaduras desaparecen junto con los ribosomas en las maduras. Desaparecen también los tonoplastos, conservándose el plasmalema. No hay por el momento ninguna prueba concluyente que demuestre la presencia de proteína-P en gimnospermas.

### 7.2.3.1. Área cribosa

Las áreas cribosas en las gimnospermas se encuentran en la cara radial de las paredes celulares de la célula cribosa. El área cribosa consta de varios poros conectados en el medio de la pared celular por unas cavidades alargadas que generalmente contienen material membranoso que parece continuarse a ambos lados del área cribosa con el retículo endoplasmático; aunque los poros completamente desarrollados pueden estar revestidos de calosa, no se ha observado que las plaquitas de calosa intervengan en el desarrollo del poro, como fue descrito en las angiospermas.

Como resumen podemos decir que una célula cribosa madura de una gimnosperma contiene plasmalema, plastos, mitocondrias, un retículo endoplasmático muy modificado, el núcleo está ausente, o si está presente lo está completamente degenerado; todos los orgánulos existentes ocupan una posición parietal, el lumen celular aparece vacío y no se observan filamentos transcelulares.

### 7.2.3.2. Elementos parenquimáticos asociados con las células cribosas

Las células cribosas de las gimnospermas no tienen células acompañantes. En su lugar, ciertas células parenquimáticas del floema y radiomedulares, se hallan aparentemente asociadas, tanto morfológica como fisiológicamente con las células cribosas. Estas células parenquimáticas han recibido el nombre de células albuminosas debido a que se tiñen intensamente con los colorantes citoplasmáticos. El hecho principal que distingue a las células albuminosas de los restantes elementos parenquimáticos del floema son sus comunicaciones mediante poros y plasmodesmos ramificados con las células cribosas. Al igual que las células acompañantes, las células albuminosas presentan una gran similitud con las restantes células vegetales nucleadas. Gran cantidad de datos histoquímicos sugieren que las células albuminosas desempeñan un papel importante en el transporte a larga distancia de solutos por las células cribosas.

## 7.3. Naturaleza de las sustancias transportadas por el floema

El conocimiento de la naturaleza química de las sustancias transportadas por el floema es muy interesante por varios aspectos:

- a) Permite una mejor comprensión de las relaciones metabólicas entre las diferentes partes de una planta durante su desarrollo.

- b) Puede dar algunas indicaciones sobre el mecanismo del transporte.
- c) El conocimiento de qué sustancias pueden, y cuáles no pueden ser transportadas por el floema, es de gran utilidad para la utilización racional de herbicidas y fertilizantes adecuados.

Uno de los métodos más antiguos para determinar las sustancias transportadas por el floema, consiste en una simple incisión en la corteza que interese los elementos conductores funcionales del floema. Este método, que puede ser bueno con especies arbóreas, no sirve con las herbáceas, ya que con la excepción de *Ricinus communis*, *Yucca flacida* y varias especies de *Cucurbita*, no muestran una marcada exudación del floema. Tampoco sirve en plantas con células cribosas como las gimnospermas. La técnica del estilete de áfidos también suministra por exudación jugo floemático; el problema principal es el de obtener cantidades suficientes de exudado para poder realizar análisis relevantes: La demostración microautorradiográfica de sustancias marcadas en los elementos cribosos es una prueba para conocer las sustancias que son transportadas por el floema. En la tabla 7.1 se muestra la composición de un exudado de floema.

### 7.3.1. Carbohidratos

En la mayoría de las especies, los azúcares, además del agua, constituyen la mayor parte de las sustancias transportadas por el floema. Cualquier análisis del exudado floemático revela una composición muy rica en carbohidratos, siendo casi siempre la sacarosa el azúcar dominante. Es sorprendente la ausencia en el jugo floemático de azúcares reductores. En base a la composición de azúcares del jugo floemático pueden distinguirse tres tipos de plantas:

- a) Especies con sacarosa como azúcar dominante, con pequeñas proporciones de oligosacáridos del tipo de la rafinosa. La mayoría de las especies analizadas pertenecen a este grupo y en algunos casos como *Salix viminalis*, la sacarosa representa el 98 por 100 del total de azúcares y está a una concentración del 20 por 100 (p/v).
- b) Especies con considerables cantidades de oligosacáridos además de sacarosa. Los oligosacáridos pertenecen a la familia de la rafinosa (Fig. 7.6). Se encuentran especies en las mirtáceas, oleáceas y verbenáceas.
- c) Especies que contienen considerables cantidades de azúcar-alcoholes, además de los azúcares mencionados anteriormente. A este grupo pertenecen *Fraxinus* y *Syringa* que contienen D-manitol y *Prunus serotina* y *Malus domestica* que contienen sorbitol.

### 7.3.2. Sustancias nitrogenadas

Los aminoácidos constituyen la fracción más importante de las sustancias nitrogenadas transportadas por el floema, siendo el ácido glutámico, el ácido aspártico y sus amidas glutamina y asparragina las más abundantes. Algunas especies muestran concentra-

TABLA 7.1  
Composición de exudado de floema de *Ricinus communis*  
mediante incisiones realizadas en la corteza

Componentes	mg/ml
Materia seca .....	100-125
Sacarosa .....	80-126
Azúcares reductores .....	Ausentes
Proteína .....	1,45-2,20
Aminoácidos .....	5,2 (como ácido glutámico)
Ceto ácidos .....	2,0-3,2 (como ácido málico)
Fosfato .....	0,35-0,55
Sulfato .....	0,024-0,048
Cloruro .....	0,355-0,675
Nitrato .....	Ausente
Bicarbonato .....	0,010
Potasio .....	2,3-4,4
Sodio .....	0,046-0,276
Calcio .....	0,020-0,092
Magnesio .....	0,109-0,122
Amonio .....	0,029
Auxinas .....	$10,5 \times 10^4$
Giberelinas .....	$2,3 \times 10^4$
Citoquininas .....	$1,08 \times 10^4$
ATP .....	0,24-0,36
pH .....	8,0-8,2
Conductancia .....	$13,2 \mu\text{mho/cm}$ a $18^\circ \text{C}$
Potencial osmótico .....	- 14,2 a - 15,2 bares
Viscosidad .....	1,34 c P a $20^\circ \text{C}$

Modificado de Hall, *Plant Structure, Function and Adaptation*, The MacMillan Press, Londres, 1976.

ciones relativamente elevadas de serina. La prolina es el aminoácido más abundante en el jugo floemático de *Robinia*, mientras que en algunas especies de los géneros *Betula*, *Alnus* y *Juglans* presentan concentraciones considerables de citrulina. En general, todas las sustancias nitrogenadas de bajo peso molecular pueden ser fácilmente transportadas por el floema. También se ha detectado la presencia de proteínas en los exudados de floema en concentraciones que oscilan entre 0,1 mg/ml en *Robinia* hasta 3,6 mg/ml en *Fraxinus americana*. La proteína-P constituye la fracción más importante de las proteínas totales exudadas por el floema; otra fracción importante la constituyen las proteínas de naturaleza enzimática. La concentración de nitrógeno total en el jugo floemático no es constante durante el año, sino que presenta oscilaciones estacionales; en sau-

ce, el contenido de nitrógeno total es de 2 mg/ml al final de la dormición de las yemas, de 1,2 mg/ml durante el desarrollo de las hojas, de 0,3 mg/ml durante el verano y de 1,3 mg/ml durante la movilización del nitrógeno desde las hojas, en el otoño.

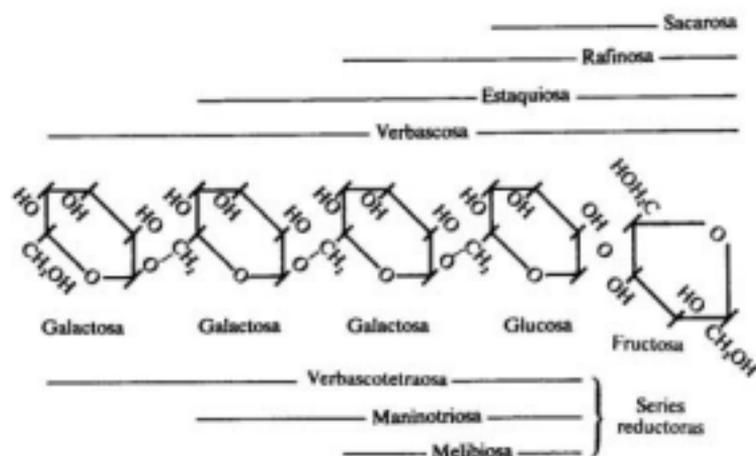


Figura 7.6.—Familia de oligosacáridos de la rafinosa (tomado de M. H. Zimmermann y J. A. Milburn, *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. I, Springer-Verlag, Berlin, 1975).

### 7.3.3. Ácidos orgánicos y sustancias inorgánicas

Un número considerable de ácidos orgánicos han sido detectados en los exudados floemáticos de gran cantidad de plantas. Así, en *Robinia pseudoacacia* se ha detectado ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, ácido pirúvico, oxalacético, fumárico, succínico, malónico, oxálico, málico, cítrico, tartárico, siquímico, quínico y glucónico. En *Tilia platyphyllos* se ha detectado ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, pirúvico, fumárico, málico, cítrico, tartárico y siquímico. Todos ellos aparecen en concentraciones muy bajas, del orden de  $\mu\text{g/ml}$ , por lo que se les considera constituyentes menores del jugo floemático.

Aunque generalmente se considera al floema como el sistema conductor de sustancias orgánicas, no hay que olvidar que también transporta agua e iones inorgánicos en una forma comparable, aunque no idéntica, al xilema. Con la ayuda de radioisótopos se ha podido demostrar que el potasio es el catión predominante en los exudados floemáticos. Otros cationes encontrados son el sodio, calcio y magnesio. Los aniones que más frecuentemente se encuentran en exudados floemáticos son el fosfato, sulfato, cloruro nitrato y bicarbonato.

### 7.3.4. Sustancias de crecimiento

La presencia de las sustancias reguladoras del crecimiento en los elementos conductores, y por consiguiente su transporte por el floema, es de gran importancia en los procesos reguladores en los que intervienen estos compuestos. Así, el equilibrio entre la

concentración de promotores e inhibidores en el floema, que puede variar profundamente con las condiciones ambientales (longitud del día, por ejemplo) o con el estado de desarrollo, puede afectar profundamente el crecimiento y desarrollo. La presencia de las sustancias naturales de crecimiento en exudados de floema ha sido demostrada de manera inequívoca en varias especies vegetales (tabla 7.2). También existe evidencia considerable de que el estímulo floral es transportado junto con los solutos, por el floema.

### 7.3.5. Otras sustancias

Se ha detectado la presencia en algunos exudados floemáticos de vitaminas como tiamina en *Cucurbita pepo*, *Quercus rubra*, niacina en *Quercus borealis*, ácido ascórbico en *Robinia pseudoacacia*.

TABLA 7.2  
Sustancias naturales de crecimiento en los exudados floemáticos  
de diversas especies vegetales

Especie vegetal	IAA	GA	CQ	ABA
<i>Robinia pseudoacacia</i> .....	+	+		
<i>Fagus sylvatica</i> .....	+	+		
<i>Ricinus communis</i> .....	+	+	+	
<i>Tilia cordata</i> .....		+		
<i>Quercus robur</i> .....		+		
<i>Taraxacum officinale</i> .....		+		
<i>Vicia faba</i> .....		+		
<i>Salix viminalis</i> .....		+		
<i>Xanthium strumarium</i> .....			+	+

De gran interés, por la importancia que puede tener en los mecanismos de transporte de solutos por el floema, es la presencia en los exudados floemáticos de ATP. Como veremos más adelante en este capítulo, todos los mecanismos propuestos para explicar el transporte de solutos dependen, bien directa o indirectamente, de un aporte adecuado de energía. Se supone que esta energía es suministrada en forma de ATP por las células acompañantes o sus análogas, que presentan una gran abundancia de mitocondrias. En algunos exudados floemáticos, se ha encontrado la presencia de lípidos como en *Robinia pseudoacacia* en la que la fracción del exudado floemático soluble en éter representa el 0,13 por 100 del peso seco, o en *Tilia platyphyllos* que representa el 0,54 por 100. Las hojas jóvenes de *Glycine max* pueden exportar sustancias de naturaleza esteroide. Partículas víricas como *curlytop virus* y *beet-yellow virus* y, lo que es más sorprendente, un protozoo como *Phytomonas leptovasarum* que produce necrosis en el floema de la planta del café, son transportados también por el floema.

La lista de todos los compuestos naturales que aparecen en los exudados de floema aumenta de año en año, y no hay ninguna duda de que seguirá aumentando, ya que las

técnicas de análisis son cada vez más refinadas. Además de los componentes naturales, toda una serie de compuestos sintéticos como herbicidas, fungicidas, insecticidas y reguladores del crecimiento sintéticos son transportados también por el floema.

#### 7.4. Intensidad y velocidad del transporte

Al considerar estos problemas, lo primero que tenemos que hacer es definir intensidad y velocidad. La intensidad se expresa por la cantidad de soluto transportado por unidad de tiempo, y la velocidad como la distancia lineal recorrida por unidad de tiempo. Estos dos conceptos se han confundido muchas veces en la literatura sobre el tema, y sobre todo el término intensidad de transporte se ha utilizado erróneamente, ya que lo que se quería indicar muchas veces con este término era realmente la velocidad de transporte. Un método muy utilizado para medir la velocidad de transporte en el floema ha sido el de seguir el movimiento de una sustancia marcadora, fluoresceína o isótopos radiactivos, a lo largo del tallo en relación con el tiempo. Así se han obtenido velocidades lineales entre 30-100 cm/h en plantas C-3 y más de 200 cm/h en plantas C-4. Sin embargo, los valores de velocidad lineal no son más que una indicación de la velocidad media de las moléculas en movimiento por el floema, ya que no son cilindros fluidos los que se mueven, sino una serie de moléculas de muy distinta naturaleza química. Por ello, para poder cuantificar el flujo de solutos y obtener unos resultados más consistentes y reproducibles, la intensidad del transporte de materia seca es probablemente un parámetro más revelador que la velocidad lineal solamente. Se mide el transporte de materia o peso seco mejor que el peso fresco, ya que el contenido de agua en un tejido vegetal presenta grandes variaciones en espacios muy cortos de tiempo. La mayoría de estos estudios se han realizado midiendo el aumento en peso seco en frutos o tubérculos en relación con el tiempo (asumiendo que toda la transferencia de peso seco tiene lugar a través del floema). Por este método se han medido intensidades de transporte de 1,70 g/h. Las velocidades requeridas para estas intensidades de transporte dependerán de los valores asumidos para la concentración de los solutos transportados (determinada directamente a partir de los exudados de floema) y del área de la sección transversal del sistema conductor, ya que para una determinada concentración e intensidad de transporte, la velocidad varía inversamente con este área. De tal forma, la transferencia de peso seco por unidad de tiempo, es decir, la intensidad de transporte se expresa como transferencia de masa, donde:

$$\text{Transferencia de masa} = \text{Área} \times \text{Velocidad} \times \text{Concentración}$$

$$\text{(g/h)} \quad \quad \quad \text{(cm}^2\text{)} \quad \text{(cm/h)} \quad \quad \quad \text{(g/cm}^3\text{)}$$

Dividiendo este valor por el área de la sección transversal del sistema conductor, tenemos la transferencia específica de masa:

$$\text{Transferencia específica de masa} = \text{Velocidad} \times \text{Concentración}$$

$$\text{(g/h/cm}^2\text{)} \quad \quad \quad \text{(cm/h)} \quad \quad \quad \text{(g/cm}^3\text{)}$$

En la tabla 7.3 pueden verse algunos valores de intensidad de transporte medidos por la transferencia específica de masa.

## 7.5. Dirección del transporte

Tres aspectos fundamentales hay que considerar en relación con la dirección del transporte de solutos por el floema:

- Significado de órganos productores y órganos consumidores.
- Entrada de los solutos en el floema.
- Distribución de solutos por la planta.

### 7.5.1. Significado de órganos productores y órganos consumidores

Durante toda la vida de una planta hay un continuo transporte de solutos de una parte a otra. Mason y Maskell, en 1928, demostraron que la dirección normal de transporte de una sustancia podía invertirse cambiando la posición relativa de los órganos suministradores y de los consumidores de esa sustancia; así nació el concepto de fuentes y sumideros (*sources and sinks*). Nosotros utilizaremos la terminología de órganos productores y órganos consumidores. El transporte de solutos por el floema es hoy considerado en términos de movimiento entre órganos productores y consumidores. Un órgano productor es un lugar de producción o almacenamiento de sustancias orgánicas, fundamentalmente carbohidratos, en el que la disponibilidad de estos compuestos excede a su utilización; como ejemplos están las hojas maduras, cotiledones o endospermos de semillas en germinación, tejidos de reserva del tallo, hoja o raíz cuando están brotando. Un órgano consumidor es un lugar de consumo de sustancias orgánicas, bien para la formación de nuevos órganos o para la acumulación de sustancias de reserva; como

TABLA 7.3

Intensidad de transporte en algunos órganos vegetales, determinada por la transferencia específica de masa

Órgano y especie vegetal	Transferencia específica de masa (g de peso seco. cm <sup>-2</sup> de floema. h <sup>-1</sup> )
<i>Solanum</i> (tubérculo) .....	4,5
<i>Dioscorea</i> (tubérculo) .....	4,4
<i>Kigelia</i> (pedúnculo del fruto) .....	2,6
<i>Cucurbita</i> (pedúnculo del fruto) .....	3,3
<i>Phaseolus</i> (peciolo) .....	0,56
<i>Tropaeolum</i> (peciolo) .....	0,7
<i>Lolium temulentum</i> (limbo) .....	4,4
<i>Digitaria sanguinalis</i> (limbo) .....	4,7
<i>Paspalum dilatatum</i> (limbo) .....	12,7
<i>Cynodon dactylon</i> (limbo) .....	6,6
<i>Chloris gayana</i> (limbo) .....	14,9

ejemplo están los meristemos, hojas jóvenes, cotiledones o endospermos de semillas en formación, tejidos de reserva de tallo, hoja o raíz cuando están almacenando estas sustancias. El floema es la vía de unión entre productores y consumidores, y todo el crecimiento y desarrollo de una planta no es más que un reflejo de la transferencia de materiales entre productores y consumidores. El tamaño y las actividades metabólicas de productores y consumidores pueden ejercer profunda influencia en el crecimiento y desarrollo vegetal; así, la reducción en el tamaño de un consumidor puede tener como consecuencia un cambio en el modelo de distribución de solutos desde las hojas, favoreciendo a otro consumidor o reduciendo la intensidad de producción fotosintética en la hoja.

### 7.5.2. Entrada de los solutos en el floema

El primer paso en el transporte de solutos desde los órganos productores a los consumidores, es su entrada activa y selectiva en el sistema conductor (carga del floema), y mediante el cual las sustancias que van a ser transportadas, sacarosa fundamentalmente, pueden acumularse en el floema alcanzando una concentración superior a la que se encuentra fuera de los tubos cribosos.

El sistema vascular de las hojas, sobre todo en las angiospermas, está fuertemente especializado para la carga del floema y para el transporte de solutos. Las venas principales sufren una serie de sucesivas ramificaciones, de tal forma que las células del mesófilo foliar nunca quedan a una distancia superior a  $100\ \mu\text{m}$  (diámetro de 2-3 células) de la vénula o capilar más próximo. En el floema de estas vénulas o capilares, las células acompañantes están profundamente adaptadas para el transporte de solutos, presentan un diámetro doble del de los tubos cribosos, contenido elevado de ribosomas y mitocondrias, así como una actividad fosfatasa elevada. Esau ha propuesto para estas células, que además presentan un gran número de plasmodesmos entre ellas y los elementos cribosos, el término de «células intermediarias». Además de estas adaptaciones estructurales, las hojas de muchas dicotiledóneas herbáceas presentan unas células acompañantes especializadas, denominadas «células de transferencia», que se caracterizan por la presencia de unas protuberancias en la pared celular.

Dos aspectos hay que considerar en relación con la entrada de los solutos en el floema, el transporte célula a célula, que precede a la carga del floema, y el mecanismo implicado en la carga del floema. El transporte de azúcares desde los cloroplastos de las células del mesófilo hasta las vénulas menores, hecho que dura varios minutos, puede tener lugar a través del simplasto, es decir, atravesando los espacios metabólicos celulares y pasando de célula a célula a través de los plasmodesmos, o bien por el apoplasto o espacio libre del tejido. Cada vez hay mayor evidencia experimental que indica que en algún momento de la ruta de transporte, la sacarosa sale al apoplasto, desde donde es activamente enviada o «cargada» en el complejo célula acompañante-elemento criboso. Dada la evidencia de que los azúcares se mueven a través del mesófilo por el simplasto y que la liberación de sacarosa a todo lo largo del mesófilo y su subsecuente movimiento hacia el haz vascular podría ser impedido por el flujo de transpiración en dirección contraria, parece muy probable que la sacarosa sea liberada en la proximidad del floema, siendo los candidatos más probables el parenquima floemático, conectado

simplásticamente con el mesófilo, o las células del mesófilo adyacentes a las células acompañantes. El mecanismo de este flujo parece ser, de acuerdo con la evidencia experimental que se posee, mediante un cotransporte sacarosa/ $K^+$ . El lugar en el que los azúcares dejan el apoplasto y pasan al simplasto, probablemente a nivel de las células acompañantes, es el lugar de la carga, así al menos parece deducirse de estudios autorradiográficos que muestran cómo la sacarosa no pasa directamente a los tubos cribosos, sino que se acumula en las células acompañantes y que, según la planta, pueden ser las células intermediarias o de transferencia. Tal acumulación de sacarosa procedente del espacio libre se realiza en contra de un gradiente de concentración, requiriendo, por tanto, un aporte de energía, siendo el plasmalema el lugar de este transporte activo. Este fenómeno es muy selectivo, ya que ciertos azúcares, como sacarosa y estaquinoso, pasan fácilmente la membrana plasmática, mientras que glucosa o fructosa no la pasan nunca. Los azúcares acumulados pasarán finalmente al tubo criboso a través de la red de plasmodesmos.

En cuanto a la carga del floema (Fig. 7.7), un mecanismo quimiosmótico parece ser el responsable. Durante los últimos años se ha acumulado evidencia que apoya la existencia de un sistema activo de cotransporte sacarosa/ $H^+$  en plantas superiores. La fuerza conductora de este cotransporte sería el gradiente de potencial electroquímico del flujo de protones creado por una ATPasa. El posterior desplazamiento de protones

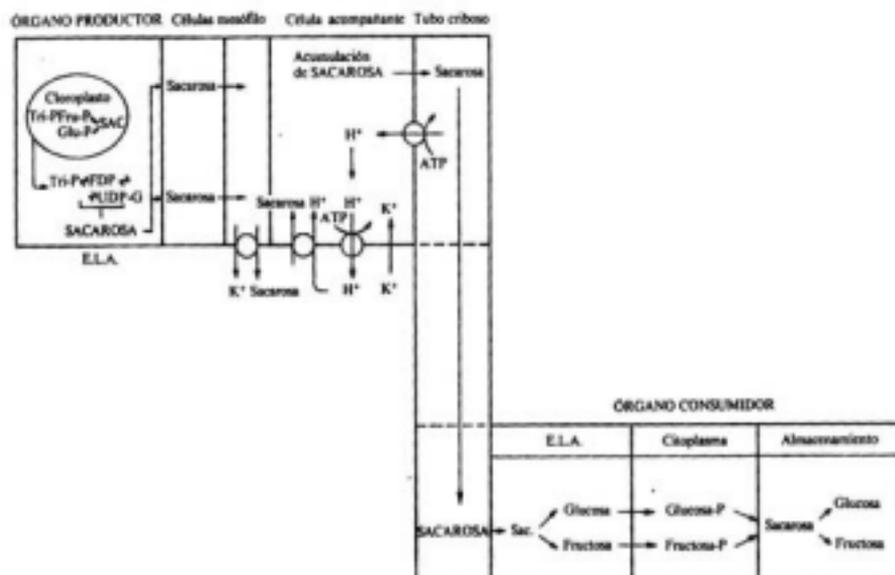


Figura 7.7.—Carga y descarga del floema. Posible mecanismo de transporte de sacarosa entre el órgano productor y el órgano consumidor.

a favor de gradiente, estaría acoplado al transporte activo secundario de sacarosa al interior de la célula acompañante. Para mantener el equilibrio de cargas, se produciría también una entrada de  $K^+$ . Las características conocidas del floema son consistentes con esta hipótesis; así, los estudios de composición química revelan que junto con su alto contenido de sacarosa (0.8M) el floema tiene una concentración de protones baja (pH 7,5-8,5) y una concentración elevada de  $K$  (100-200 mM). Por último, estudios de localización citoquímica muestran que las membranas del floema contienen ATPasas. Por otra parte, estudios con inhibidores específicos muestran que el PCMBs (p-cloromercuribenzenosulfonato) inhibe la toma de sacarosa, el flujo de protones y la actividad ATPásica, siendo revertidos estos efectos por fusicoccina, conocido estimulador del intercambio  $H^+/K^+$ . La acumulación activa de sacarosa requiere de un gasto de energía, sugiriéndose que el ATP necesario podría ser suministrado por el metabolismo del 1,4 por 100 de la sacarosa transportada.

Por lo que respecta a la descarga del floema, este proceso ha sido mucho menos estudiado, aunque se ha sugerido que el paso limitante puede ser la actividad de una invertasa ácida localizada en el espacio libre que actuaría como una válvula de reflujo para evitar una recarga del floema con sacarosa. Esta invertasa podría a su vez estar controlada por el pH. Otro posible factor regulador podría ser el transporte activo de las hexosas resultantes hacia las células en crecimiento.

### 7.5.3. Distribución de solutos por la planta

Estudios realizados utilizando  $^{14}C$  sobre las relaciones entre órganos productores y consumidores, condujeron a la generalización de que las hojas inferiores exportan solutos, de forma mayoritaria hacia las raíces, las hojas superiores hacia las zonas apicales y las hojas intermedias, pueden exportar solutos en ambas direcciones. Tal generalización tropezó pronto con algunos problemas, como en la patata, donde la mayoría de los órganos consumidores se encuentran por debajo de los productores, todas las hojas exportan solutos en una proporción mucho mayor en sentido descendente que ascendente. En tomate, los frutos (órganos consumidores) se encuentran repartidos a lo largo del tallo, y la dirección de movimiento de solutos desde las hojas es un reflejo de la distribución de los consumidores. Los solutos son transportados de forma prioritaria a las zonas de rápido crecimiento de la planta, yemas, hojas jóvenes, tallos y raíces en crecimiento, semillas y frutos en desarrollo, o hacia los órganos de almacenamiento de sustancias de reserva. Por tanto, es más seguro afirmar que el modelo de distribución de solutos está determinado por la posición que ocupan en la planta los órganos productores y consumidores.

Parece obvio, entonces, que el transporte de solutos por el floema ocurre simultáneamente en ambas direcciones. En la figura 7.8 puede verse la distribución de metabolitos marcados después de encerrar una hoja madura de una planta de calabaza en atmósfera enriquecida con  $^{14}CO_2$ ; los metabolitos circulan tanto hacia la parte superior como a la inferior de la planta. Este experimento demuestra claramente que los solutos se mueven simultáneamente en ambas direcciones por el tallo. Lo que aún no ha sido probado de una forma concluyente es si los solutos se desplazan en diferentes direcciones siguiendo distintos conductos del floema, o si emplean el mismo conducto a la vez.

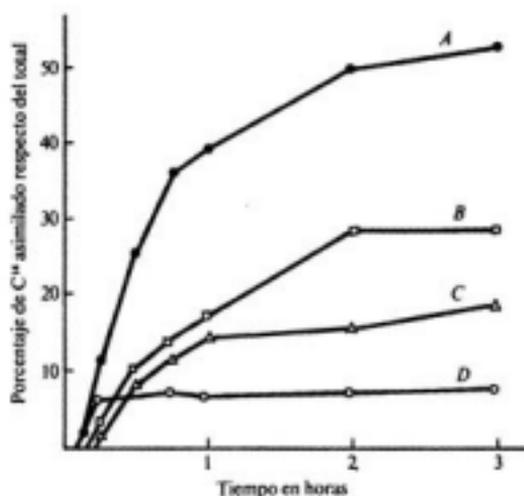


Figura 7.8.—Distribución de metabolitos marcados en una planta de calabaza. A: Total de sustancias salidas de la hoja primaria. B: Hacia la parte superior de la planta. C: Hacia la parte inferior. D: Pociolo (según J. A. Webb y P. R. Gorham, «Plant Physiol», vol. 39, 1964, págs. 663-667).

Éste es uno de los problemas más importantes que quedan por resolver en relación con el transporte de solutos por el floema, ya que si se llegara a demostrar que el transporte bidireccional ocurre simultáneamente en un mismo tubo criboso, habría que descartar por completo la hipótesis del flujo de presión como mecanismo responsable del movimiento de solutos.

El modelo de distribución de solutos puede sufrir alteraciones profundas en la mayoría de las especies al comenzar la fase reproductora, ya que se formarán nuevos consumidores que demandarán suministro de solutos; algunos, como las flores, son consumidores débiles, pero otros, como los frutos, son consumidores muy fuertes, de tal forma que el crecimiento de las partes vegetativas queda interrumpido por falta de suministro de solutos; la intensidad y duración de tal transporte a órganos como la espiga en cereales, determina en una proporción muy elevada la producción final y rendimiento de estos cultivos.

La ruta seguida y el modelo de distribución de solutos puede estar también profundamente influenciado por la anatomía vascular de la planta. Así, se ha observado tanto en judía francesa como en tomate, cómo los solutos transportados desde las hojas superiores hacia la yema apical recorren un pequeño trayecto en sentido descendente antes de comenzar el ascendente que los lleve hacia las yemas; esto se debe a que las trazas vasculares de la hoja se fusionan con los haces vasculares del tallo por debajo del punto de inserción de la hoja en el tallo.

Estudios diversos sobre los modelos de transporte, indican que los solutos circulan por el floema y se mueven hacia arriba o hacia abajo pero sólo entre puntos que tienen conexión vascular directa, siendo el movimiento tangencial prácticamente nulo. Así en remolacha (Fig. 7.9 A) se ha demostrado que cuando se coloca una hoja en una atmós-

fera de  $^{14}\text{CO}_2$ , los metabolitos aparecen exclusivamente en las hojas situadas por encima o por debajo de la hoja tratada. Sin embargo, tal control del sistema vascular sobre el modelo de distribución de solutos no parece absoluto (Fig. 7.9 B), ya que si se eliminan las hojas maduras (productores) de un lado de la planta, las hojas jóvenes de ese mismo lado y que serían los consumidores habituales de las hojas eliminadas, comienzan a ser suministradas por hojas productoras del otro lado de la planta que normalmente no lo hacen; esto pone de manifiesto la existencia de cierto transporte tangencial, y es un hecho muy importante, ya que en condiciones naturales puede servir para mantener un transporte ininterrumpido después de sufrir algún accidente o enfermedad que elimine los suministros habituales.

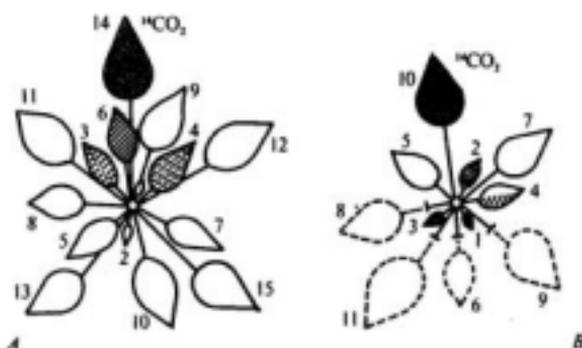


Figura 7.9.—A: distribución de  $^{14}\text{C}$  en las hojas de una planta de remolacha. Una semana después de haber mantenido una sola hoja madura (la núm. 14) durante 4 horas en atmósfera de  $^{14}\text{CO}_2$ , la radiactividad aparece en un solo lado de la planta. B: Se han cortado las hojas maduras de un lado de la planta; en este caso la radiactividad se localiza en ambos lados de la planta (según K. W. Joy, «J. Exp. Bot.», vol. 15, 1964, págs. 485-490).

Además de por la colocación relativa de órganos productores y consumidores y por la estructura del sistema vascular, la distribución de asimilados puede estar también bajo control hormonal.

Así, en plantas decapitadas de *Phaseolus vulgaris* en las que se aplica en el corte ácido indolacético, puede observarse al cabo de unas horas cómo la sacarosa marcada con  $^{14}\text{C}$  se acumula en esta zona; si además de ácido indolacético se añade ácido giberélico o benzilaminopurina, el efecto movilizador de la sacarosa marcada es aún mayor. Una de las posibles explicaciones puede ser que las hormonas estimulen la actividad del órgano consumidor, aumentando de esta forma la demanda de solutos, otra explicación puede basarse en un efecto más directo de las hormonas sobre el sistema de transporte, bien a nivel del propio mecanismo responsable del flujo de solutos, o bien sobre el proceso de descarga de solutos en el órgano consumidor; según este último mecanismo, los solutos serán dirigidos hacia los consumidores por las hormonas. Alternativamente, los consumidores podrían exportar hormonas hacia los productores en donde podrían afectar procesos tales como carga del floema, actividad de enzimas fotosintetizadores o abertura estomática.

## 7.6. Efecto de los factores ambientales sobre el transporte

Tres son los factores ambientales, luz, potencial hídrico y temperatura, que han demostrado afectar de una manera más profunda la intensidad de transporte y distribución de solutos. Cada uno de estos factores puede modificar el proceso del transporte de solutos afectando al órgano productor, consumidor, sistema conductor o a las tres partes simultáneamente.

### 7.6.1. Luz

Dos parecen ser los efectos de la luz sobre el transporte de solutos: uno asociado con la tasa de fotosíntesis, es decir, con la actividad del órgano productor y el segundo asociado con un posible fotocontrol del transporte, dependiendo de la calidad de la luz recibida por la planta. Los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la luz sobre el transporte de solutos son confusos y contradictorios. Numerosos estudios indican que la exportación de azúcares a partir de las hojas disminuye con la oscuridad, alcanzándose valores de sólo el 25 por 100 de los obtenidos en luz. Por otra parte, trabajos realizados por Nelson y Gorhan en 1957 sobre el transporte de sacarosa radiactiva, depositada en solución sobre la superficie foliar de plantas de soja, muestran cómo después de 14 horas de iluminación, sólo un 1 por 100 de la radiactividad ha salido de la hoja, mientras que en un mismo periodo de oscuridad, casi un 40 por 100 de la radiactividad ha salido en dirección a las raíces. Parece ser, pues, que los azúcares suministrados exógenamente son difícilmente transportados en iluminación: en cambio, en oscuridad el transporte hacia las raíces se ve favorecido. En otro orden de cosas, Hartt en 1966 encuentra que en caña de azúcar, el transporte de azúcares está bajo fotocontrol, ya que el transporte hacia las raíces es estimulado por la luz roja y azul, mientras que la luz rojo-lejano no estimula el transporte, sino que actúa como completa oscuridad; los resultados parecen sugerir un fotocontrol mediante una reacción de alta energía.

### 7.6.2. Potencial hídrico

Uno de los efectos de la carencia de agua sobre el transporte de solutos podría ser de forma indirecta, afectando la intensidad fotosintética y, consecuentemente, el proceso de carga del floema. Sin embargo, hay considerable evidencia experimental que sugiere que el efecto de la carencia de agua es directamente sobre el transporte. Induciendo una carencia de agua en plantas de caña de azúcar, se observa que mientras la fotosíntesis sólo disminuye un 18 por 100 con respecto a los controles, el transporte de azúcares marcados con  $^{14}\text{C}$  disminuye un 90 por 100. Weatherley y sus colaboradores, en 1959, suministran otra prueba del efecto directo de la carencia de agua sobre el transporte de solutos en segmentos aislados de corteza de sauce, utilizando la técnica del estilete de áfidos. Provocan una disminución del potencial hídrico introduciendo una solución de manitol en el xilema de los segmentos. La caída del potencial hídrico conduce a una caída en el flujo de exudación y en la tasa de exudación de sacarosa. Concluyen que la disminución en la exudación de sacarosa se produce por una disminución en el flujo de agua hacia el tubo criboso, lo que a su vez conduce a una disminución en la tasa de carga del floema.

Parece fuera de toda duda que la carencia de agua puede afectar el transporte de solutos, bien actuando sobre la carga de solutos en el órgano productor, bien sobre la descarga en el órgano consumidor, lo que ya no parece tan claro por faltar la prueba inequívoca, es que la disminución del potencial hídrico pueda afectar directamente el transporte dentro de los tubos cribosos. Si asumimos que el transporte puede tener lugar mediante el mecanismo de flujo en masa (ver apartado siguiente) es fácil poder entender cómo un retardo en el transporte puede estar causado por un contenido bajo de agua debido a un aumento en la viscosidad de la solución que es transportada.

### 7.6.3. Temperatura

Probablemente ningún factor ambiental ha recibido mayor atención que la temperatura. Cuando plantas enteras se tratan a diferentes temperaturas, se observa un rango óptimo para el transporte de solutos entre 20 y 30° C. Por debajo de 10° C y por encima de 40° C el transporte es inhibido considerablemente. La respuesta a la temperatura demuestra que el transporte de solutos es un proceso que depende de un suministro de energía, ya que se obtienen  $Q_{10}$  del orden de 2-3:

$$Q_{10} = \frac{\text{Intensidad del proceso a } T^{\circ}\text{C} + 10}{\text{Intensidad del proceso a } T^{\circ}\text{C}}$$

Sin embargo, los análisis de los efectos de la temperatura sobre el transporte se ven complicados por la influencia de la temperatura sobre otros procesos de las plantas que pueden afectar directa o indirectamente el movimiento de los solutos. Por ello, son mucho más importantes los tratamientos localizados en determinadas zonas del vegetal que en la planta entera. El tratamiento con temperaturas bajas de segmentos del sistema de transporte, da lugar a dos tipos de respuestas, según se trate de plantas sensibles o insensibles al enfriamiento. En plantas sensibles al enfriamiento, parece existir una temperatura umbral situada sobre los 12° C, por debajo de la cual se observa una inhibición muy marcada del transporte, debido a alteraciones estructurales. En plantas insensibles al enfriamiento, el umbral se sitúa alrededor de los 0° C. La existencia de dos tipos distintos de respuesta a la temperatura sugiere también la existencia de dos mecanismos distintos responsables de la inhibición del transporte durante el enfriamiento. El análisis de los  $Q_{10}$  obtenidos puede utilizarse como indicativo del mecanismo responsable. Una  $Q_{10}$  de 1,2 a 1,5 indican un mecanismo limitado por procesos físicos, como difusión o viscosidad, mientras que valores de  $Q_{10}$  de 2 a 4 indican procesos termoquímicos, y  $Q_{10}$  por encima de 4 indican desnaturalización de proteínas. Cuando se analizan de esta forma los cambios inducidos por la temperatura en el transporte de solutos en judía, planta sensible al enfriamiento, se obtiene una  $Q_{10}$  de 1,3 para temperaturas entre 10 y 25° C y una  $Q_{10}$  de 6 por debajo de 10° C. En remolacha, planta insensible al enfriamiento, se obtiene una  $Q_{10}$  de 1,3 en todo el rango de temperatura estudiado.

Experimentos realizados mediante la aplicación de temperaturas elevadas (40-60° C) localizadas en determinadas zonas del vegetal, indican que el efecto inhibitorio es el resultado de cambios en la integridad estructural de los elementos cribosos (proba-

blemente a nivel del plasmalema) que pueden ser permanentemente o lentamente irreversibles.

## **7.7. Mecanismos de transporte por el floema**

Durante los últimos 100 años se ha trabajado intensamente para tratar de aclarar cuál es el mecanismo responsable del movimiento de los solutos por el floema. Aún hoy día, no existe una hipótesis que sea generalmente aceptada, todas tienen sus defensores y detractores y éste es uno de los muchos problemas que aún esperan en el campo de la Fisiología Vegetal una respuesta clara y convincente.

Cualquiera de los mecanismos propuestos necesita un suministro de energía en algún momento durante su funcionamiento. Tomando como base el lugar donde se requiere el aporte de energía todos los mecanismos propuestos pueden clasificarse en dos grupos: pasivos y activos. Un mecanismo pasivo puede ser definido como aquel en el que no se necesita un aporte de energía directamente en las moléculas del soluto mientras están siendo transportadas dentro de los elementos cribosos. En los mecanismos pasivos, la energía se utiliza en cualquier extremo del sistema, bien bombeando los solutos en el órgano productor para que penetren en el floema, bien facilitando su salida en el órgano consumidor. También se necesita energía para mantener la integridad estructural de los tubos cribosos. En los mecanismos activos también es necesario el aporte de energía en los extremos del sistema y para mantener la integridad estructural del sistema conductor, pero además, y esta es la diferencia principal entre ambos mecanismos, se necesita un aporte adicional de energía directamente en las moléculas del soluto en tránsito por los tubos cribosos.

### **7.7.1. Mecanismos pasivos**

#### **7.7.1.1. Difusión**

La explicación del movimiento de solutos por simple difusión no puede considerarse como una hipótesis. Si la incluimos aquí es únicamente con el objetivo de dar una idea lo más completa posible de todos los mecanismos propuestos. Mason y Maskell, en 1928, trabajando en algodón encuentran que el transporte por el floema presentaba muchas similitudes con el proceso de difusión. Sin embargo, el movimiento por difusión es demasiado lento como para poder ser responsable del transporte de solutos. Mason y Maskell llegaron a la conclusión de que el movimiento de sacarosa por el floema es de 20.000 a 40.000 veces más rápido de lo que sería por simple difusión.

#### **7.7.1.2. Flujo interfacial**

Van den Honert, en 1932, aporta la posibilidad de que el transporte de solutos puede tener lugar por medio de interfases originadas dentro de los elementos cribosos. Su sugerencia estaba basada en el hecho observado de que cuando una gota de un líquido

insoluble en agua, cuyas moléculas poseen un grupo polar, se coloca sobre una superficie acuosa, esta sustancia se extiende rápidamente sobre la misma. Este mecanismo puede demostrarse en un sistema modelo, consistente en dos ampollas de vidrio conectadas por un tubo en el que se prepara una interfase agua/éter, llenando la mitad inferior del aparato con agua acidificada conteniendo una sustancia indicadora e incolora a pH ácido, colocando por encima de esta fase acuosa una capa de éter. En un extremo del aparato se deposita una gota de una solución alcalina de oleato potásico, pudiendo medirse la velocidad de movimiento de esta sustancia sobre la superficie acuosa por el cambio de color de la sustancia indicadora. Así, han podido medirse velocidades de hasta 120 cm/h y superiores, aunque las cantidades transportadas son muy pequeñas. Antes del descubrimiento de la presencia de ciertas estructuras en el interior de los tubos cribosos esta hipótesis recibió muy poca consideración, sin embargo, cuando se demostró la presencia de estructuras, varios investigadores sugirieron que estos componentes estructurales del floema podrían suministrar una serie de interfases que podrían explicar el transporte de solutos por el floema. Estos componentes estructurales podrían ser el plasmalema, tonoplasto, proteína-P y retículo endoplasmático. El plasmalema forma una interfase entre un medio líquido y móvil, el citoplasma, y uno sólido e inmóvil, la pared celular; se ha demostrado que las interfases líquido/sólido imponen una resistencia viscosa excesiva. El tonoplasto presenta dos fases líquidas y móviles, citoplasma y vacuola a ambos lados; las interfases líquido/líquido pueden suministrar un flujo interfacial rápido, pero dado que el tonoplasto apenas si existe en elementos cribosos maduros, también ha sido descartado. Las fibrillas de proteína-P podrían ser otra posibilidad, pero una de las conclusiones generalmente aceptadas en el campo del transporte por el floema es la de que estas fibrillas no pueden moverse libremente de un elemento a otro, y ya hemos dicho anteriormente que el flujo interfacial en una interfase líquido/sólido inmóvil es muy lento. De todas las estructuras propuestas, la única que en principio podría ofrecer ciertas posibilidades es el retículo endoplasmático, aunque para ello sería necesario que este sistema membranoso pudiera fluir libremente de un elemento a otro, que existiera un suministro continuo de componentes membranosos en el órgano productor, que éstos fueran eliminados en el órgano consumidor y que de alguna forma existiera una recirculación de estos componentes; dado que tal sistema parece muy improbable, muchos investigadores piensan que el flujo interfacial no puede ser el mecanismo que explique el transporte por el floema.

### 7.7.1.3. Flujo de presión

No hay duda que cuando Ernst Münch en 1930 postulaba su hipótesis del flujo de presión (flujo en masa) se daba a conocer la teoría que hasta la fecha ha gozado de mayor éxito y aceptación. Según Peel, la principal razón de su éxito es su simplicidad. Sin embargo, esta misma simplicidad ha trabajado también en contra de su aceptación universal, ya que muchos investigadores dudan del funcionamiento de un proceso tan simple en un sistema aparentemente tan complicado como el floema. El fundamento de esta hipótesis está basado en el modelo de la figura 7.10.

Consta de dos osmómetros A y B cubiertos por una membrana semipermeable y rodeados por agua. Inicialmente, ambos osmómetros y el tubo que los conecta están lle-

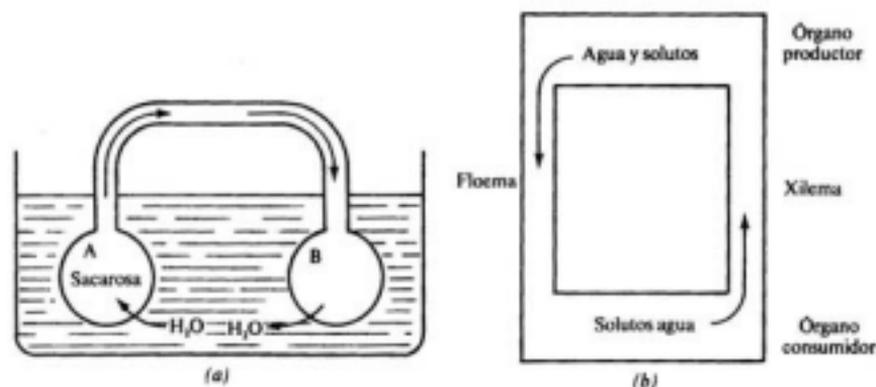


Figura 7.10.—a) Modelo experimental en el que se basa la hipótesis del flujo de presión. b) Posible funcionamiento en una planta.

nos de agua. Si introducimos sacarosa en el osmómetro A, disminuirá el potencial osmótico, provocando la entrada de agua desde el recipiente exterior; la presión hidrostática aumentará en A, con lo que el agua junto con la sacarosa iniciará su movimiento hacia el osmómetro B. El subsecuente aumento en la presión hidrostática en B, provocará una salida de agua por ósmosis hacia el recipiente exterior. El proceso continuará hasta que las concentraciones de sacarosa en A y B se igualen. Si aplicamos algún mecanismo por el cual se mantenga un aporte constante de sacarosa en A y una retirada en B, el sistema seguirá funcionando indefinidamente. Este modelo puede ser fácilmente trasladado a una planta (Fig. 7.10 b). El osmómetro A puede ser un órgano productor, una hoja, por ejemplo, en el que se están formando solutos por fotosíntesis; éstos pasan a los tubos cribosos disminuyendo el potencial osmótico y, por consiguiente, también el potencial hídrico, penetrando el agua procedente del xilema en los tubos cribosos por lo que aumenta el potencial de presión en los tubos cribosos conectados al órgano productor. El osmómetro B puede ser un órgano consumidor, la raíz, en la cual se están consumiendo solutos y disminuyendo, por tanto, el potencial de presión. Esta diferencia de potencial de presión (flujo de presión) entre productor y consumidor, hace que los solutos fluyan por el floema (flujo en masa) siempre en el sentido de productor a consumidor. El agua que saldría fuera del tubo criboso a nivel de consumidor, pasa al xilema y es de nuevo transportada hacia las hojas.

Un considerable número de observaciones experimentales parecen apoyar la hipótesis del flujo de presión como mecanismo responsable del transporte de solutos por el floema. Podemos citar algunas, como que el transporte de solutos por el floema en *Gossypium* parece fluir siempre desde concentraciones elevadas a concentraciones bajas de solutos; transporte de virus en *Nicotiana* y *Beta* similar al transporte de solutos; transporte de partículas de carbono a través de la placa cribosa en *Yucca*; pasaje de partículas de carbono a través de la placa cribosa en *Heracleum*. De todas las pruebas, las más convincentes son las de exudación del jugo floemático; así, cuando se realizan punciones en la corteza de algunos árboles como *Quercus*, *Salix*, etc., se obtiene una

salida casi instantánea de fluido floemático, lo que demuestra que se encuentra bajo presión.

Dos tipos de objeciones, una de naturaleza estructural y otra fisiológica, son las que por el momento hacen que la hipótesis del flujo de presión no tenga una aceptación universal. La primera señala que para que el flujo de presión pueda operar en los tubos cribosos requiere un sistema conductor que ofrezca poca resistencia, es decir, que el lumen celular de los elementos de los tubos cribosos esté prácticamente libre de resistencias citoplasmáticas y que los poros de las placas cribosas estén abiertos. Ya hemos descrito anteriormente, al hablar de las placas cribosas, el problema del taponamiento de los poros, y de cómo hay cada vez más evidencia experimental en apoyo de que las placas cribosas no están *in vivo* taponadas, o al menos totalmente taponadas. Esto último es muy importante, ya que algunos investigadores han señalado que la hipótesis del flujo de presión en los tubos cribosos puede ser posible con tal de que la obstrucción de los poros no sea muy grande. La evidencia estructural indica que la hipótesis del flujo de presión sería aplicable sólo a los tubos cribosos de las angiospermas pero no a las células cribosas de las gimnospermas y muchas criptógamas vasculares, ya que en muchas de estas plantas los poros de las áreas cribosas están taponados con retículo endoplasmático y otros materiales membranosos; sin embargo, pruebas de exudación de fluido floemático en varias coníferas parecen indicar que los solutos son transportados por el mismo mecanismo que en angiospermas. Por el momento no se poseen datos que permitan reconciliar estos hechos.

La segunda objeción está basada en la existencia de transporte bidireccional. La hipótesis del flujo de presión no puede explicar el transporte bidireccional simultáneo en un mismo tubo criboso. Por ahora no existe ninguna prueba inequívoca sobre la existencia de este transporte bidireccional; sin embargo, si alguna vez llega a demostrarse claramente su existencia, la hipótesis de Münch deberá ser abandonada o cuando menos complementada con algún mecanismo adicional.

## 7.7.2. Mecanismos activos

### 7.7.2.1. Electro-ósmosis

La hipótesis electro-osmótica propuesta por Spanner en 1958, implica una circulación de iones en las placas cribosas mantenida por la actividad metabólica. En su trabajo de 1958, Spanner critica la hipótesis del flujo de presión basándose en las observaciones de microscopía electrónica que muestran los poros de las placas cribosas taponados. Propone que un proceso electro-osmótico sería posible si se dan tres requisitos básicos:

1. Debe existir una membrana que posea poros cargados eléctricamente,
2. Los poros deben estar ocluidos, pero no tanto que impidan el paso libre de iones hidratados,
3. Debe existir una diferencia de potencial a través de la membrana que debe ser mantenida para que el transporte tenga lugar.

Spanner propone que la placa cribosa puede constituir la membrana necesaria con los poros taponados con proteína-P. Los filamentos de la proteína están colocados unos paralelos a otros con una separación entre ellos del orden de 10 nm, lo que permitirá el paso de iones hidratados (potasio fundamentalmente). El que el punto isoelectrónico de esta proteína sea ligeramente ácido, mientras que el pH del jugo floemático es alcalino, hace que los filamentos proteicos que taponan los poros queden cargados negativamente; así, vemos cómo se satisfacen los dos primeros requisitos básicos. Finalmente, la diferencia de potencial, es decir, la polarización de la placa cribosa se mantiene por una circulación de potasio a través de la placa cribosa mediante una toma activa a través de la membrana del tubo criboso, saturado por encima de la placa cribosa y una eliminación en el tubo criboso por debajo de la placa; el potasio es devuelto a través de las células acompañantes o de las paredes celulares del elemento criboso. El ATP suministra la energía para mantener esta circulación de potasio. El esquema general de funcionamiento puede verse en la figura 7.11.

De acuerdo con esta hipótesis, los cationes se moverían rápidamente a través de los poros siguiendo un gradiente de potencial y haciéndolo de igual forma las moléculas cargadas positivamente, el agua y las moléculas neutras, es decir, habría un flujo de

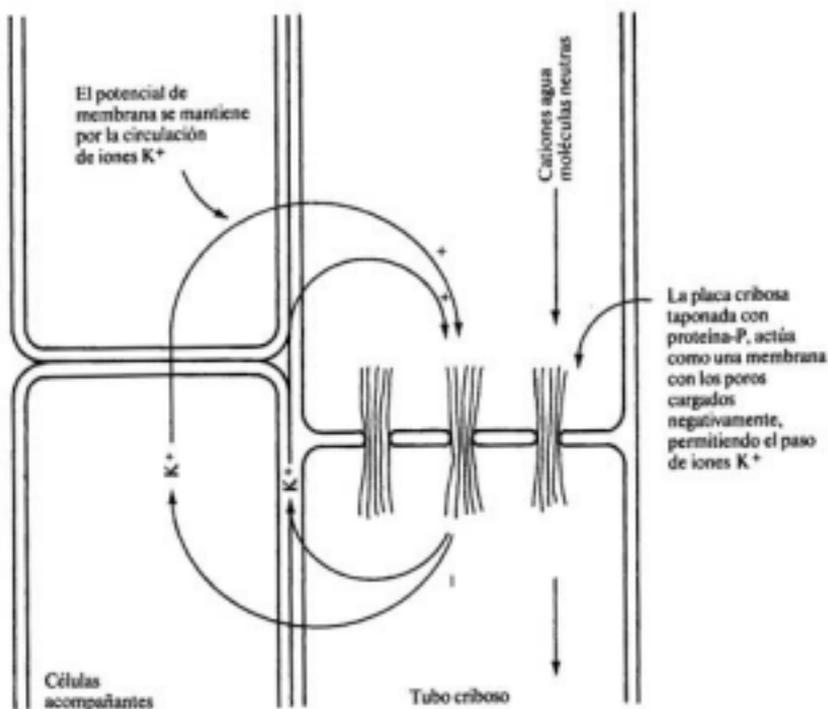


Figura 7.11.—Esquema exponiendo el posible funcionamiento de la hipótesis electro-ósmótica (modificado de D. C. Spanner y R. L. Jones, «Planta», vol. 92, 1970, págs. 64-72).

masa similar al que se originaba en la hipótesis del flujo de presión, con la excepción de que no existiría un gradiente continuo de potencial de presión a lo largo del tubo criboso, sino que el perfil del gradiente en este caso, tendría un aspecto de dientes de sierra con una disminución de gradiente a lo largo de lumen de cada elemento criboso seguido por un aumento brusco del gradiente al comienzo del elemento siguiente.

Se han puesto varias objeciones serias a esta teoría, como la de que no explica el transporte simultáneo de aniones y cationes, ya que si los poros de las placas cribosas están cargados negativamente, sólo podrían atravesarlas iones cargados positivamente; según Spanner, este transporte de cationes y aniones sería posible si la concentración de la solución que rodea la placa cribosa se eleva, ya que una fuerza iónica elevada tiende a anular la capacidad de las membranas para discriminar entre aniones y cationes y ambos podrían atravesarla. Esta hipótesis, al igual que la del flujo de presión, tampoco suministra una explicación para el posible transporte bidireccional simultáneo en el mismo tubo criboso. Otra objeción es la que afirma que el calor generado en el mantenimiento de la circulación de potasio evaporaría el contenido de los tubos cribosos.

#### 7.7.2.2. Corrientes protoplasmáticas

De Vries, en 1885, fue el primero en sugerir que alguna clase de movimiento protoplasmático podría ser el responsable del movimiento de solutos por los tubos cribosos. Tal propuesta no carece de sentido, ya que si se observan al microscopio pelos estaminales de *Tradescantia spp.* u hojas de *Elodea canadensis*, puede verse en el interior de las células individuales una especie de movimientos de filamentos del citoplasma. Tal tipo de movimiento recibe el nombre de ciclosis. Si este tipo de movimiento ocurriera en el interior de los elementos cribosos, podría colaborar en el transporte de solutos desde un extremo a otro de cada célula. Esta hipótesis, sin embargo, no ofrece ninguna explicación al paso de sustancias a través de la placa cribosa. Otra seria objeción es el hecho de que la ciclosis sólo ha sido observada en elementos cribosos inmaduros.

Canny, en 1962, desarrolla la hipótesis de las corrientes transcelulares. En su modelo (Fig. 7.12) una serie de filamentos transcelulares atraviesan los tubos cribosos a través de los poros de las placas cribosas. La parte del lumen no ocupada por los filamentos actúa como reservorio. La energía para el movimiento de los filamentos se obtiene por el consumo de parte de la sacarosa transportada. Esta hipótesis tiene la gran ventaja de permitir el movimiento bidireccional simultáneo, ya que unos filamentos pueden moverse en una dirección y otros en otra, dentro de un mismo tubo criboso. A pesar de esta ventaja, presenta una serie de inconvenientes muy serios, como son que los cálculos realizados sobre la tasa de transporte de solutos que tiene lugar en el floema, exceden con mucho las posibilidades de este mecanismo; también existe el problema de qué ocurre con los filamentos al final de su recorrido. Por último, y como el mismo Canny ha reconocido, está la casi certeza que se tiene de que este tipo de corrientes protoplasmáticas no ocurren en los elementos cribosos maduros.

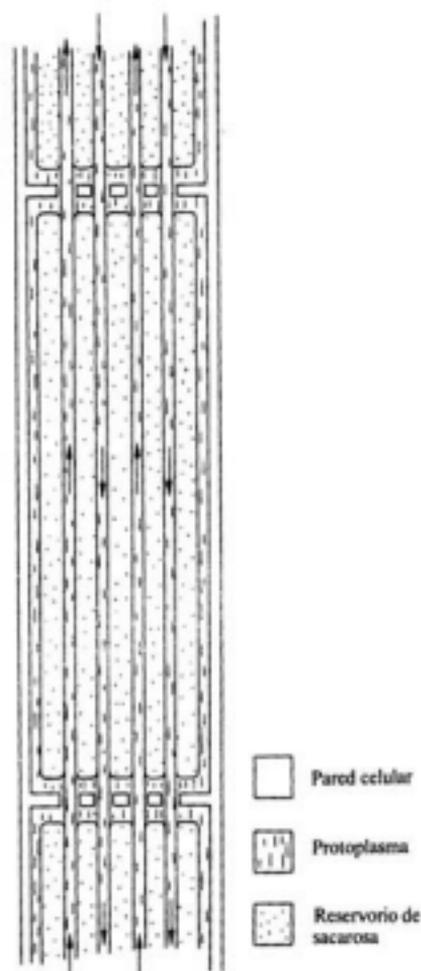


Figura 7.12.—Mecanismo de las corrientes transceldulares (tomado de M. J. Canny, «Ann. Bot.», vol. 26, 1962, páginas 603-617.

### 7.7.2.3. Otras hipótesis

Utilizando un modelo semejante al observado en la figura 7.12, Thaine, en 1964, propone que los filamentos que atraviesan los elementos cribosos son tubos fibrilares rodeados por una membrana, con paredes contráctiles capaces de generar movimiento. La energía en este modelo se utilizaría para la contracción de las moléculas de proteína, quizá de un modo similar a como ocurre en las fibras musculares animales. Mediante

contracciones, ciertas partículas y soluciones concentradas podrían transportarse por los tubos cribosos. Su principal objeción, al igual que la hipótesis anterior, es la falta de evidencia de que tales estructuras existan realmente.

Fensom, en 1972, propone la existencia de una red de material microfibrilar en el interior de los tubos cribosos, formada por unos túbulos de diámetro muy pequeño que pueden presentar contracciones ondulares y que atravesarían las placas cribosas. Fuera del material microfibrilar puede presentarse también un flujo en masa; la energía necesaria para este flujo se obtendría de las contracciones, así como de la presión hidrostática. Según esta hipótesis, cuando los poros están taponados, sólo el movimiento ondulatorio o peristáltico del material microfibrilar sería el responsable del transporte de materiales entre elementos adyacentes, pero cuando no están taponados o no lo están totalmente, también el flujo en masa podría colaborar en el transporte. Aquí nos tropezamos con la misma dificultad que ya hemos mencionado en las anteriores hipótesis, es decir, la falta de evidencia de que estas estructuras, en este caso el material microfibrilar, existan en los elementos cribosos maduros.

Como puede verse de lo expuesto en este apartado, el mecanismo de transporte por el floema no está ni siquiera medianamente resuelto, representando uno de los más importantes desafíos que hoy tiene la Fisiología Vegetal. En nuestra opinión, existen dos problemas: el transporte bidireccional simultáneo en un mismo tubo criboso y la existencia o no de ciertas estructuras celulares en los elementos cribosos maduros, que mientras no se resuelvan claramente en un sentido o en otro, supondrán un serio inconveniente al conocimiento de este proceso fundamental en el funcionamiento de las plantas.

---

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- CRONSHAW, J.: *Phloem Structure and Function*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 32, 1981, páginas 465-484.
- GIANGUINTA, R. T.: *Phloem Loading of Sucrose*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», 34: 347-387, 1983.
- MARSHALL, C., y SAGAR, G. R.: *Transport in the Phloem*, en: *Plant Structure, Function and Adaptation*, M. A. Hall (ed.), The MacMillan Press Ltd., Londres, 1976.
- PEEL, A. J.: *Transport of Nutrients in Plants*, Butterworths, Londres, 1974.
- STUMPF, P. K., y CONN, E. E. (eds.): *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise, volume 3, Carbohydrates: Structure and Function*, Academic Press, 1980.
- ZIMMERMANN, M. H., y MILBURN, J. A. (eds.): *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 1, *Transport in Plants. I. Phloem transport*, Springer-Verlag, Berlin, 1975.

## NUTRICIÓN MINERAL

La nutrición mineral de las plantas es la parte de la Fisiología Vegetal que estudia los procesos relacionados con la adquisición de los elementos minerales y el papel que estos elementos desempeñan en la vida de las plantas. Los conocimientos que hoy tenemos de nutrición mineral son bastante amplios, pero su adquisición ha sido lenta y difícil. Hasta mediados del siglo XVII dominaron las ideas de Aristóteles, que mantenía que toda la materia estaba formada por cuatro elementos: tierra, agua, aire y fuego. Fue Van Helmont (1577-1644) el que acabó con esta idea al realizar lo que podemos considerar el primer experimento cuantitativo en nutrición mineral. Su experimento, ya clásico en la Fisiología Vegetal, consistió en lo siguiente: plantó una rama de sauce de un peso aproximado de 2,5 kg en un recipiente con unos 150 kg de tierra seca a la que añadió nada más que agua. Al cabo de 5 años la rama se había transformado en un árbol de unos 80 kg de peso, mientras que la tierra sólo había disminuido unos gramos. Concluyó que este aumento en peso del sauce era debido exclusivamente al agua con la que había regado la planta durante los cinco años que duró el experimento. A pesar de que su conclusión era totalmente errónea, ya que no tenía en cuenta los elementos adquiridos del suelo y el carbono procedente de la atmósfera, debemos considerar a Van Helmont como uno de los pioneros de una ciencia nueva. La importancia de las sustancias minerales en el crecimiento vegetal fue establecida por John Woodward (1665-1728), quien constata que el agua que penetra en las plantas por los poros y es exhalada a la atmósfera, arrastra en disolución una gran cantidad de sustancias minerales, que de esta forma penetran en la planta. Esta conclusión está basada en experimentos en los que observa que las plantas crecen mejor en agua que contenga disueltas algunas sustancias que en agua destilada. Stephen Hales (1677-1761), que estudió los movimientos del agua en la planta, y se interesó por los mecanismos de circulación de la savia, fue de los primeros en comprobar que el aire contribuía de alguna forma a la nutrición vegetal. Theodore de Saussure (1787-1845) publica en 1804 un libro titulado *Recherches Chimiques sur la Vegetation*, en el que describe sus trabajos realizados con *Polygonum persicaria* crecida en soluciones de una sal y algunos solutos orgánicos. Observa que no todos los solutos eran absorbidos por la planta en iguales cantidades; podemos considerarlo como el descubridor de la absorción selectiva de solutos por las plantas. También enuncia los principios de esencialidad de algunos nutrientes. Basándose en estas nociones de elementos esenciales y no esenciales, Carl Sprenger (1787-1859) señala que el suelo puede ser a veces improductivo debido a que presenta una deficiencia en un solo elemento que es

necesario para las plantas, tenemos aquí una clara definición de la ley del mínimo atribuida erróneamente por muchos investigadores a Justus von Liebig (1803-1873) cuya aportación principal a la nutrición mineral no fue ésta, sino la definitiva anulación de la teoría del humus, según la cual la materia orgánica del suelo era la fuente suministradora del carbono que las plantas absorbían. En 1860 Julius von Sachs demuestra que las plantas pueden crecer en soluciones nutritivas sin necesidad de añadir la fase sólida del suelo. Prepara por primera vez soluciones nutritivas acuosas en las que están presentes todos los elementos esenciales para el desarrollo vegetal. En 1865 W. Knop publica una fórmula nutritiva para el crecimiento de plantas que ha sido utilizada durante un siglo. Desde entonces todas las soluciones nutritivas que se han preparado no han sido más que modificaciones mejoradas de las fórmulas de Sachs y Knop, y todos los esfuerzos se han dirigido hacia la consecución de la solución nutritiva óptima. Los descubrimientos realizados en el siglo XX no vamos a considerarlos como «históricos» y nos referiremos a muchos de ellos en las diferentes secciones de este capítulo.

### 8.1. Composición inorgánica de las plantas

Si un trozo de material vegetal fresco se seca en una estufa a 105° C durante 24 horas, el material seco resultante constituirá solo aproximadamente el 15 por 100 del peso fresco inicial. Entre el 90 y el 95 por 100 de este residuo seco estará constituido por tres elementos, carbono, oxígeno e hidrógeno, procediendo los tres del aire y del agua. El resto del material seco constituye lo que denominamos el contenido mineral de la planta y que es tomado por ésta del suelo.

Un análisis químico de un vegetal nos revelará la presencia de un gran número de elementos químicos; algunos de ellos serán esenciales para la vida del vegetal mientras que otros no lo serán. La presencia de estos últimos es debida a que los mecanismos de absorción no son capaces de seleccionar entre uno y otros. Es importante dejar bien claro cuáles son los criterios que nos permitan distinguir entre elementos esenciales y no esenciales. Vamos a tomar en consideración tres criterios:

1. Cuando en ausencia de un determinado elemento la planta no puede completar su ciclo biológico.
2. La acción del elemento debe ser específica, es decir, ningún otro elemento puede sustituirlo totalmente.
3. El elemento debe estar implicado directamente en la nutrición vegetal, bien como constituyente de un metabolito esencial, o que sea requerido para el funcionamiento de un enzima.

Hasta mediados del siglo XIX los científicos no dispusieron de un método que les permitiera conocer qué elementos eran esenciales y cuáles no; este método fue el de la preparación de medios de cultivo de composición conocida, en los cuales podía eliminarse un elemento y ver su efectos sobre el desarrollo vegetal. De esta forma ha podido establecerse que además del carbono, hidrógeno y oxígeno otros 13 elementos (tabla 8.1) son esenciales para el desarrollo de las plantas. Estos elementos esenciales pueden a

TABLA 8.1  
Elementos esenciales y concentraciones adecuadas en plantas

Elemento	Forma utilizable por la planta	Concentración en tanto por 100 en el tejido seco	Número relativo de átomos en relación con el molibdeno
Molibdeno	$\text{MoO}_4^{2-}$	0,00001	1
Cobre	$\text{Cu}^+, \text{Cu}^{++}$	0,0006	100
Zinc	$\text{Zn}^{++}$	0,0020	300
Manganeso	$\text{Mn}^{++}$	0,0050	1.000
Hierro	$\text{Fe}^{+++}, \text{Fe}^{++}$	0,010	2.000
Boro	$\text{BO}_3^{3-}, \text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	0,002	2.000
Cloro	$\text{Cl}^-$	0,010	3.000
Azufre	$\text{SO}_4^{2-}$	0,1	30.000
Fósforo	$\text{H}_2\text{PO}_4^-, \text{HPO}_4^{2-}$	0,2	60.000
Magnesio	$\text{Mg}^{++}$	0,2	80.000
Cálcio	$\text{Ca}^{++}$	0,5	125.000
Potasio	$\text{K}^+$	1,0	250.000
Nitrógeno	$\text{NO}_3^-, \text{NH}_4^+$	1,5	1.000.000
Oxígeno	$\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}$	45	30.000.000
Carbono	$\text{CO}_2$	45	35.000.000
Hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}$	6	60.000.000

Modificado de F. B. Salisbury y C. W. Ross, *Plant Physiology*, Wadsworth Pu. Co. Inc. Belmont, 1969.

su vez subdividirse en macronutrientes y micronutrientes, según que sean requeridos por los vegetales en grandes o pequeñas cantidades. Entre los macronutrientes tenemos: nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio. La lista de los micronutrientes está formada por los siguientes elementos: manganeso, boro, hierro, zinc, cobre, cloro y molibdeno.

Ya hemos mencionado anteriormente la presencia en vegetales de ciertos elementos minerales, los cuales no parecen desempeñar, por ahora, ninguna función esencial en las plantas; estos elementos son los llamados elementos no esenciales. Entre ellos podemos citar: el aluminio, implicado en una reacción bioquímica interesante: cuando las plantas de *Hydrangea* con flores de color rosa se tratan con sales de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ) el color de las flores cambia de rosa a azul, probablemente por la formación de un complejo coloidal estable en medio ácido del aluminio con el pigmento delphinina. Algunas plantas como *Astragalus crotolariae* y *Astragalus bisulcatus* acumulan selenio bajo la forma de metilselenocisteína. El bario, que es otro de los elementos no esenciales, puede a veces reemplazar en parte al calcio. Algunos enzimas pueden ser activados no sólo por elementos esenciales, sino también por elementos aparentemente no esenciales, como cobalto y níquel, sugiriendo que pueden ser utilizados por la planta cuando el elemento esencial normal es deficiente.

## 8.2. Soluciones nutritivas

El principal medio mineral de las plantas es el suelo; sin embargo, el suelo es un medio muy heterogéneo que presenta de un lugar a otro grandes variaciones, tanto químicas como físicas y biológicas dependiendo del material que forma la roca madre, del clima, topografía, edad y factores biológicos. Por tanto, no tardaron mucho tiempo los científicos en darse cuenta de la imposibilidad de emplear suelos como medio para el crecimiento de plantas, si se quiere realizar algún tipo de estudio serio sobre nutrición mineral. Las soluciones nutritivas representan un medio excelente para regular la cantidad y la proporción relativa de las sales minerales suministradas a las plantas en cualquier experimento. En una solución de cultivo típica, las plantas se mantienen con las raíces sumergidas en la solución que contiene los elementos nutritivos. Es necesario que la solución se mantenga oxigenada mediante burbujeo de aire. Si los nutrientes y el pH de la solución se mantienen dentro de niveles adecuados y se vigilan también otras condiciones como luz y temperatura, las plantas crecerán en estas soluciones como si se tratara del suelo más fértil.

Desde comienzos del siglo XX, muchos investigadores volcaron sus esfuerzos en la consecución de la mejor solución nutritiva para el crecimiento de plantas en general o al menos para una especie dada. Pronto se hizo evidente que no existía tal fórmula óptima. El análisis de los resultados demostró que tal objetivo era imposible de conseguir ya que para una misma especie se encontraba que distintas soluciones podían ser las óptimas según la estación del año en que se realizase el experimento o según se modificasen las condiciones experimentales de longitud del día, temperatura, intensidad de iluminación, etc. De hecho es lógico que así ocurra, ya que en condiciones naturales igual crecimiento óptimo puede obtenerse para un determinado cultivo en varios suelos fértiles, aunque su composición sea distinta. En la tabla 8.2 se da la composición de algunas de las soluciones nutritivas más utilizadas.

En todas las soluciones se suministran siempre tres macronutrientes en forma de cationes: potasio, calcio y magnesio. Otros tres aparecen siempre en forma aniónica: nitrato, fosfato y sulfato. Todos los macronutrientes, por tanto, pueden ser suministrados por tres sales como nitrato cálcico, fosfato potásico y sulfato magnésico: sin embargo, a la hora de preparar soluciones nutritivas se añaden al menos cuatro sales, ya que esto permite una mayor flexibilidad al establecer las proporciones entre los distintos iones. Además de los macronutrientes, debe prepararse también una solución de micronutrientes. En las soluciones nutritivas más antiguas, como las de Knop y Crone, no se tenía en cuenta este factor, ya que por aquel tiempo se desconocía la necesidad de estos componentes; de todas formas, todos se suministraban en la solución nutritiva, bien aportados por el agua que se utilizaba o bien como contaminantes de las sales que se añadían.

El pH de las soluciones del suelo oscila entre valores por debajo de 4 en los suelos más ácidos, hasta valores algo por encima de 8 en los más alcalinos. Algunas especies vegetales están adaptadas a vivir en estos valores extremos de pH, aunque la mayoría sólo presentan un crecimiento aceptable para valores de pH entre 5 y 7, por lo cual estos son los valores de pH entre los que oscilan todas las soluciones nutritivas. La importancia del pH en las soluciones nutritivas es grande, ya que ejerce una influencia

TABLA 8.2

Composición de algunas soluciones nutritivas utilizadas en nutrición mineral

Solución de Knop	g/l
KNO <sub>3</sub> .....	0,2
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	0,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0,2
FePO <sub>4</sub> .....	0,1
Solución de Crone	g/l
KNO <sub>3</sub> .....	1,0
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	0,25
CaSO <sub>4</sub> .....	0,25
Fe <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0,25
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0,25
Solución de Hoagland y Arnon (macronutrientes)	g/l
KNO <sub>3</sub> .....	1,02
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	0,492
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,23
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0,49
Solución de Hoagland y Arnon (micronutrientes)	mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	2,86
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O .....	1,81
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O .....	0,08
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0,22
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O .....	0,09
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0,5%	0,6 ml
Ac. tartárico 0,4%	1 a 3 veces/semana

considerable en la solubilidad de varios componentes. Así, el ion férrico (Fe<sup>3+</sup>) a pH 8 precipita como hidróxido férrico Fe(OH)<sub>3</sub>, con lo que el hierro deja de ser asequible a la planta que crece en esa solución y aparecen síntomas de carencia en ese elemento. Con valores de pH por encima de 7, ciertos elementos como Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> tampoco son asequibles a la planta que crece en esa solución. Sin embargo, el problema se resuelve si son añadidos como sales del agente quelante EDTA (Fig. 8.1). En estas condiciones se mantienen en solución y, por tanto, son perfectamente asequibles para las plantas. También pueden utilizarse para mantener el pH de una solución nutritiva cam-

biadores iónicos. Otro aspecto del pH es el efecto que los iones hidrógeno e hidroxilo tienen sobre las membranas de las células corticales de la raíz, afectando la absorción activa de iones.

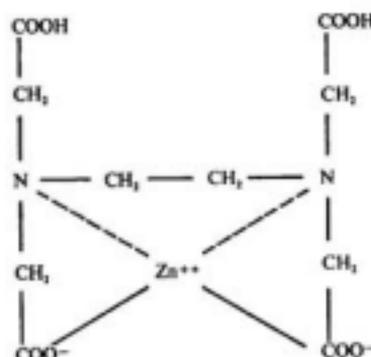


Figura 8.1.—Quelato Zn-EDTA.

Otro aspecto importante a considerar en las soluciones nutritivas es su potencial osmótico. Como ya se ha visto en el capítulo 3, cuanto mayor sea la concentración de solutos menor será el potencial hídrico del agua en la que están disueltos; esto quiere decir que la tendencia del agua a difundir disminuye por la presencia de solutos. Los potenciales osmóticos más corrientes de plantas que crecen en medios no salinos oscilan entre  $-1$  y  $-2$ MPa, mientras que los potenciales osmóticos de las soluciones nutritivas oscilan entre  $-0,05$  y  $-0,1$ MPa. Los potenciales osmóticos de las soluciones del suelo en áreas no salinas y bajo condiciones de suministro adecuado de agua, raramente son inferiores a  $-0,2$ MPa. Por tanto, y teniendo en cuenta que el movimiento del agua entre dos soluciones siempre es en el sentido de mayor a menor potencial hídrico, los potenciales osmóticos de las soluciones nutritivas en condiciones normales no suponen un obstáculo a la entrada del agua en las plantas.

A veces, ciertas dificultades aconsejan introducir algunas modificaciones al preparar las soluciones nutritivas. Las más frecuentes son los llamados cultivos de arena o de grava, que consisten en la preparación de un medio de soporte inerte formado por arena lavada, grava o material plástico, cuya misión es actuar como soporte de la planta que es periódicamente irrigada con la solución nutritiva, bien vertiéndola sobre su superficie, dejándola gotear sobre su superficie u obligándola a subir desde el fondo del recipiente mediante un sistema de bombeo. De los tres métodos, el primero es el más fácil de manejar pero permite poco control. El cultivo por goteo puede regularse de modo que la cantidad de solución que va entrando sea la misma que la que drena del recipiente. Este método permite un suministro continuo de líquido nutritivo y un control parcial de la cantidad de nutrientes que llegan al sistema radicular. El último siste-

ma, la subirrigación, puede ponerse en marcha automáticamente y suministra también un control parcial de la cantidad de nutrientes que llegan a las raíces de las plantas. Este sistema es el más conveniente de los tres, pero es el que plantea mayores dificultades y el más caro de montaje.

Estas técnicas presentan dos grandes dificultades. En primer lugar no son aconsejables para estudios de micronutrientes, ya que los soportes inertes pueden aportar algún contaminante que invalida los resultados. En segundo término, cuando se quiera obtener raíces para analizarlas, parte del sistema radical puede perderse al tratar de separarlo del soporte sólido. Estas técnicas son particularmente aconsejables para la producción comercial de plantas alimenticias u ornamentales.

### 8.3. Relaciones cuantitativas entre el suministro de sales minerales y el crecimiento de la planta

Para estudiar las relaciones cuantitativas que existen entre el suministro de sales minerales y el crecimiento de una planta se utilizan varios métodos; uno de ellos es el unifactorial, que consiste en elegir un elemento e introducirlo en un medio nutritivo bajo diversas concentraciones y medir el crecimiento correspondiente. Se obtiene así una curva de acción o curva de cosecha (Fig. 8.2) en la que pueden distinguirse tres fases: fase de deficiencia, que cuando es muy acusada va acompañada de síntomas patológicos; fase óptima, en la cual el crecimiento es máximo; fase de toxicidad, debida a que un exceso del elemento provoca una disminución del crecimiento. En 1909, Mitscherlich, como resultado de sus reflexiones sobre la ley del mínimo, erróneamente atribuida a Liebig y que dice que «el rendimiento de una cosecha siempre depende del elemento nutritivo más débilmente representado», interpreta lo que ocurre en la fase de

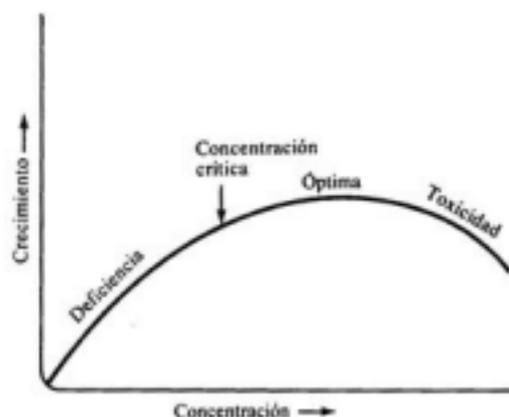


Figura 8.2.—Curva de acción.

deficiencia de la curva de acción, diciendo que «un aporte mineral es tanto más eficaz en cuanto que la carencia en ese elemento sea más acusada», es decir, cuanto más se acerque la curva de acción a la fase óptima menos eficaz será un aporte mineral desde el punto de vista del crecimiento. Esto es lo que se conoce como ley de Mitscherlich o ley de la asimilación decreciente (Fig. 8.3). En la fase óptima, de nada sirve aumentar la dosis del elemento, denominado consumo de lujo, recibiendo, por su parte, la denominación de concentración crítica aquella a partir de la cual no se observa ningún incremento. Matemáticamente, la ley de Mitscherlich se expresa de la forma siguiente:

$$dy/dx = (A - Y) C$$

siendo:

$dy$ : Aumento en crecimiento o rendimiento resultante del incremento en un elemento dado ( $dx$ ).

$A$ : Rendimiento máximo posible cuando todos los elementos están en concentración óptima.

$Y$ : Rendimiento obtenido después de aplicar una cantidad determinada del elemento  $x$ .

$C$ : Constante de acción que varía con la naturaleza del elemento estudiado.

Según Mitscherlich, los valores de  $C$  son de 0,122 para el nitrógeno, 0,60 para el  $P_2O_5$  y 0,40 para el  $K_2O$ . Las diversas críticas que se pueden hacer a esta ley son las siguientes:

1. La curva teórica es asíntota (Fig. 8.3) mientras que en la curva de acción (figura 8.2) hay una fase, la de toxicidad, en la cual el crecimiento disminuye. Mitscherlich olvida los fenómenos de toxicidad, y su fórmula, por tanto, es inaplicable por encima de la fase óptima.
2. La ley olvida también las inflexiones que a veces se producen al comienzo del tratamiento (curva sigmoide) y que se traducen en una disminución del efecto benéfico del aporte de un elemento cuando el medio está muy desequilibrado.

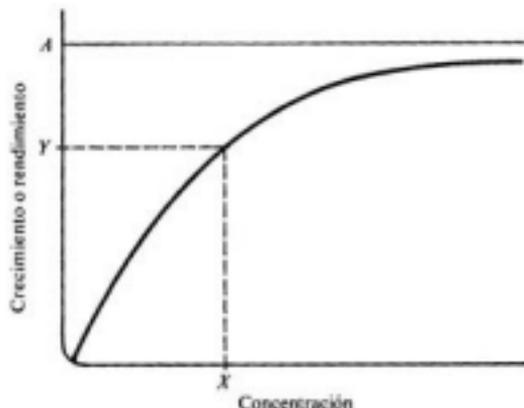


Figura 8.3.—Ley de Mitscherlich.

3. La constante de acción  $C$  es muy variable con la edad y con el medio, sobre todo cuando existen interacciones entre varios elementos.

De todas formas, para realizar un análisis factorial completo se requiere realizar muchos ensayos  $X^n$ , siendo  $X$  el número de concentraciones diferentes utilizadas y  $n$  el número de elementos considerados. La complejidad de este tratamiento aumenta si consideramos que los distintos elementos interaccionan entre sí; habría que tener en cuenta, por tanto, para abarcar todas las posibles interacciones, no sólo las concentraciones de cada elemento, sino la suma de las concentraciones de todos los elementos, la concentración relativa de un elemento con relación a la concentración suma de todos los elementos y la concentración de cada elemento respecto a la concentración individual de cada uno de los otros elementos, lo que hace que el estudio de una interacción alimenticia de este tipo sea demasiado complicado y que, por tanto, estos estudios queden reducidos a las interacciones binarias y terciarias.

En las interacciones binarias se hacen variar las proporciones relativas de dos elementos manteniendo siempre su suma constante y manteniendo también sin variación todos los otros elementos. La experimentación demuestra que la curva de rendimiento (Fig. 8.4) presenta una producción máxima  $Y_m$  para una proporción dada  $X_m$  de los dos elementos estudiados,  $X_1$ ,  $X_2$ .

Las interacciones ternarias consideran el efecto equilibrado de tres elementos de un medio nutritivo. La representación gráfica de un sistema de este tipo, postulada por Homès y sus colaboradores, se realiza mediante un triángulo equilátero en cuyos vértices se incluyen las máximas concentraciones de cada elemento (Fig. 8.5). En el triángulo representado en la figura, la base corresponde a una concentración nula de K, correspondiendo toda paralela a esta base, a una concentración dada de K,  $a_1$  y  $b_1$  representan un nivel binario de Ca y Mg con la concentración de K constante, donde  $l$ , representa el rendimiento máximo. Si repetimos el experimento trazando las paralelas con respecto a la base opuesta a los vértices que representan la máxima concentración de Ca y Mg,

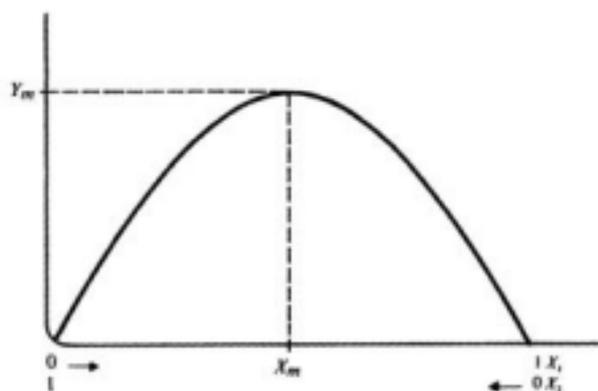


Fig. 8.4.—Interacción binaria.

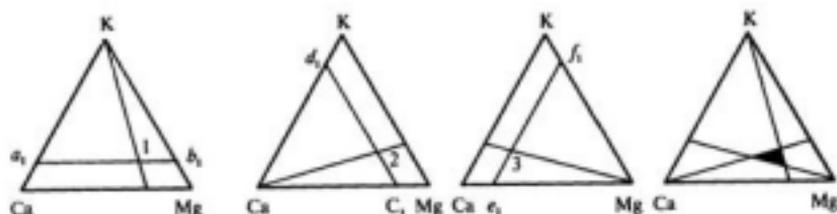


Figura 8.5.—Interacción ternaria.

obtendremos las interacciones binarias de Mg y K con una concentración constante de Ca, y las de K y Ca con una concentración constante de Mg, siendo los puntos 2 y 3 los de máximo rendimiento. Como resultado final, tendremos tres rectas que unirían los tres vértices con sus respectivas bases. En teoría, estas tres rectas deberían cortarse en un punto que representaría la concentración óptima de los tres elementos. En la práctica, sin embargo, tales rectas no se cortan en un punto, sino que delimitan un área que representa varias concentraciones, que para los tres elementos considerados da valores próximos a los óptimos.

#### 8.4. Deficiencias minerales

Se considera que una planta es deficiente en un elemento cuando su concentración en los tejidos cae por debajo de los niveles que permiten un crecimiento óptimo. Una deficiencia puede desarrollarse cuando la concentración del elemento en cuestión en el suelo o en la solución nutritiva es baja, o bien si el elemento está presente en una forma química que no puede ser utilizada por la planta. A veces puede también desarrollarse una deficiencia debido a los efectos antagonísticos entre distintos elementos, de tal forma que la presencia de un elemento en una determinada concentración puede impedir la absorción de otro. Cuando un tejido es deficiente en un elemento esencial, se producen una serie de alteraciones metabólicas que pueden retrasar o incluso interrumpir los procesos de crecimiento y desarrollo. Si las deficiencias son muy severas, se pueden desarrollar en la planta una serie de síntomas patológicos que pueden permitir a los agricultores familiarizados con éstos, identificar *de visu* deficiencias en los cultivos. Sin embargo, las alteraciones metabólicas con la consiguiente disminución en el rendimiento, pueden tener lugar sin que aparezca ningún síntoma de deficiencia, o mucho antes de que tales síntomas aparezcan, por lo que es necesario disponer de un método que nos permita conocer en un momento dado el estado nutricional de una planta. El método más utilizado hoy es el del análisis de tejidos. Este análisis está basado en la determinación de la concentración crítica (Fig. 8.2) que es la concentración de un determinado elemento que se encuentra justo por debajo de aquella que produce un crecimiento óptimo. Deben obtenerse curvas de cosecha para cada cultivo y para cada elemento, de tal manera que conozcamos cuál es la concentración crítica de cada elemento y poder

compararla con los resultados obtenidos en el campo. Para cada cultivo es necesario determinar qué parte de la planta es la más indicativa de su estado nutritivo, qué método de muestreo en el campo es el más adecuado y en qué momento del ciclo biológico y cuántas veces durante la estación de crecimiento deben realizarse estos análisis. Para elementos con gran movilidad dentro de la planta, como el potasio o nitrógeno, su concentración en la hoja es un buen índice de su estado nutricional. Pero para elementos que son muy inmóviles dentro de la planta como el calcio, los análisis foliares son irrelevantes con respecto al estado nutritivo de otras partes de la planta.

Como hemos mencionado anteriormente, la identificación *de visu* de una determinada deficiencia sólo está al alcance de especialistas muy familiarizados con los síntomas de deficiencia, y aun a veces esta identificación es casi imposible de ser realizada con éxito, ya que en condiciones de campo es muy raro que aparezca una deficiencia en un solo elemento; es más normal que una deficiencia sea múltiple, lo que hace muy difícil dar un diagnóstico basado exclusivamente en la sintomatología. Otro factor que supone una complicación más para el diagnóstico visual es el hecho de que muchos síntomas, como clorosis o amarilleamiento, seguido por necrosis de las áreas cloróticas, son comunes en las deficiencias de varios elementos esenciales. Hay que tener en cuenta también que los síntomas de deficiencia en un determinado elemento pueden variar mucho entre plantas diferentes por lo que el conocimiento de la sintomatología en una especie dada puede ser muy poca ayuda a la hora de tratar de identificar esa misma deficiencia en otra especie.

Una observación muy importante al emitir un diagnóstico es la de si los síntomas aparecen primero en las hojas jóvenes o viejas, ya que esto nos puede dar una idea sobre la movilidad o inmovilidad del elemento dentro de la planta. Si durante el crecimiento se manifiesta una carencia, los elementos móviles presentes en las hojas viejas se desplazan a los meristemas, apareciendo los síntomas primero en estas hojas viejas, mientras que los inmóviles permanecen fijos en ellas apareciendo los síntomas primero en las hojas jóvenes.

Vamos a describir a continuación los síntomas de carencia más característicos que aparecen en las plantas como resultado de las deficiencias en los elementos esenciales.

**Nitrógeno.**—Exceptuando la sequía, no hay otra deficiencia que presente unos síntomas tan dramáticos como la de nitrógeno. La clorosis es el síntoma más característico y que, debido a la gran movilidad de este elemento, aparece primero en las hojas viejas. En monocotiledóneas la clorosis comienza en la punta de las hojas y avanza hacia la base. En casos de extrema deficiencia todas las hojas aparecen amarillentas. Frecuentemente se forman pigmentos antociánicos como en las tomateras, en las que puede observarse una coloración púrpura en los peciolo y nervios de las hojas.

**Fósforo.**—Uno de los primeros síntomas que se observan en muchas especies es una coloración verde oscura o verde azulada de las hojas. Otro síntoma muy general es la formación de pigmentos antociánicos adquiriendo las hojas una coloración púrpura. En maíz, este color púrpura aparece en los bordes de la hoja, mientras que en tomate aparece en las venas de la hoja. Debido a la gran movilidad del fósforo son las hojas viejas las primeras en presentar los síntomas. Se reduce el crecimiento de la planta y en condiciones de extrema carencia las plantas presentan un aspecto achaparrado.

**Potasio.**—El síntoma general más característico de la deficiencia de potasio es la aparición de un moteado de manchas cloróticas seguido por el desarrollo de zonas necróticas en la punta y los bordes de las hojas. Debido a la movilidad de este elemento, los síntomas aparecen primero en las hojas maduras, en algunas especies las hojas presentan coloración verde oscura o verde azulada confundiendo con la deficiencia de fósforo. En general, una planta deficiente en potasio, presenta un aspecto achaparrado debido al acortamiento de los entrenudos. En condiciones extremas, las yemas terminales y laterales pueden morir.

**Calcio.**—Los síntomas de deficiencia en calcio son fáciles de observar y muy espectaculares. Las regiones meristemáticas de los tallos, hojas y raíces son atacadas fuertemente y pueden acabar muriendo, cesando el crecimiento de estos órganos. Las raíces pueden acortarse, en los bordes de las hojas jóvenes aparece clorosis seguida de necrosis. También es un síntoma característico la malformación de las hojas jóvenes, siendo el síntoma más fácil de reconocer la forma de gancho que adquieren las puntas de las hojas. Debido a la inmovilidad del calcio dentro de la planta los síntomas aparecen primero en las hojas jóvenes. Las deficiencias de calcio son más frecuentes en los suelos ácidos, de tal forma que la deficiencia en este elemento va acompañada por niveles tóxicos de iones hidrógeno y de iones de metales pesados como aluminio y manganeso que son solubles en medio ácido. Las raíces dañadas por la deficiencia de calcio son más susceptibles a la infección de bacterias y hongos.

**Azufre.**—Los síntomas de deficiencia en azufre son parecidos a los de la deficiencia en nitrógeno. Se presenta una clorosis general seguida en algunas especies por la producción de pigmentos antocianícos. Sin embargo, hay una diferencia fundamental, ya que debido a la inmovilidad de este elemento los síntomas aparecen primero en las hojas jóvenes.

**Magnesio.**—La clorosis intervenal en las hojas es uno de los síntomas más característicos de la deficiencia en este elemento, aunque la variedad de síntomas en diferentes especies es tan grande que se hace difícil el poder dar síntomas generales de deficiencia en magnesio. A veces se producen también, como en el algodón, pigmentos antocianícos en las hojas. Los síntomas, cualesquiera que sean, se presentan primero en las hojas maduras, dato indicativo de su movilidad dentro de la planta.

**Hierro.**—Debido a la relativa inmovilidad de este elemento, el síntoma más característico es una clorosis general de las hojas jóvenes, que puede comenzar como intervenal, pero al cabo del tiempo también los nervios acaban perdiendo la clorofila. La deficiencia en hierro es bastante frecuente en árboles frutales.

**Manganeso.**—Los síntomas de deficiencia en manganeso varían mucho de unas especies a otras, aunque el más frecuente suele ser una clorosis intervenal, pudiendo también aparecer manchas necróticas en las hojas. Generalmente, los síntomas suelen aparecer primero en las hojas más jóvenes, aunque también, se dan casos de aparición anterior en las hojas viejas. En las semillas de leguminosas puede presentarse necrosis en los cotiledones o en el embrión.

**Zinc.**—Los primeros síntomas corresponden a una clorosis localizada entre los nervios de las hojas más viejas, que se suele iniciar en el ápice y en los bordes. Se produce un retardo en el crecimiento que se manifiesta en forma de hojas más pequeñas y entre-

nudos mas cortos. El aspecto irregular de las hojas es quizás el síntoma mas fácil de reconocer. En casos extremos, la floración y la fructificación son frecuentemente dañados. La planta entera adquiere un aspecto de roseta o achaparrado.

**Cobre.**—Aunque los síntomas pueden variar mucho en las distintas especies, esta deficiencia suele provocar una necrosis del ápice de las hojas jóvenes que progresa a lo largo del margen de la hoja, pudiendo quedar los bordes enrollados. Las hojas pueden presentar clorosis, muriendo a menudo los brotes jóvenes.

**Cloro.**—Es el elemento cuya esencialidad para los vegetales ha sido confirmada más recientemente. El marchitamiento de las hojas es el síntoma más frecuente observado en la deficiencia de cloro. En tomate aparece un color bronceado en las hojas, seguido de clorosis y necrosis.

**Boro.**—Debido a su inmovilidad, los síntomas se presentan en primer lugar en las zonas más jóvenes, tanto de raíces como de tallos, cuyos ápices terminales pueden acabar muriendo. Las hojas presentan una textura dura y cobriza y los tallos quebradizos y agrietados. En general, las flores no llegan a formarse. Las infecciones bacterianas tanto de tallos como de raíces son, a veces, una consecuencia secundaria de la deficiencia de boro.

**Molibdeno.**—Los síntomas de deficiencia comienzan con una clorosis intervenal pudiendo confundirse con una deficiencia de manganeso. Las zonas cloróticas pueden necrosarse logrando que la hoja se seque por completo. La floración se ve fuertemente inhibida y si llegan a formarse flores éstas caen antes de producir fruto. En coliflor puede observarse un síntoma muy característico de deficiencia de molibdeno, que consiste en que los tejidos de la hoja se secan por completo, quedando solamente el nervio central y algunos restos de lámina foliar; se conoce a este síntoma como «cola de látigo» por el aspecto que toma la hoja.

## 8.5. Metabolismo mineral

Podemos definir el metabolismo mineral como el proceso mediante el cual los elementos nutritivos minerales se incorporan en metabolitos vegetales, o bien actúan como cofactores o agentes catalíticos en varios procesos metabólicos en el interior de las células vegetales. En este apartado vamos a referirnos al papel que en el metabolismo vegetal desempeñan los elementos minerales esenciales. De los criterios de esencialidad ya hablamos al estudiar la composición inorgánica de las plantas.

**Nitrógeno.**—Es considerado como el cuarto elemento más abundante en vegetales después del carbono, hidrógeno y oxígeno. Como componente de proteínas, coenzimas, nucleótidos y clorofila está implicado en todos los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal. Su principal síntoma de carencia, la clorosis, se debe a una inhibición de la síntesis de clorofila. Las plantas pueden absorber el nitrógeno en forma catiónica como ion amonio, o en forma aniónica como ion nitrato. A menos que el medio de cultivo esté tamponado, la absorción de amonio tiende a disminuir el pH, mientras que la absorción de nitrato tiene efectos contrarios. En la mayoría de los suelos bien aireados, los nitratos

son la forma principal de reserva nitrogenada. La absorción de amonio suele provocar en las plantas una gran demanda de carbohidratos, ya que al poder ser utilizado inmediatamente en la síntesis de aminoácidos se requiere un suministro adecuado de esqueletos carbonados que por aminación se transformarán en aminoácidos. La absorción de nitratos no provoca este efecto ya que tiene que ser primeramente reducido y, por ello, la demanda de carbohidratos es menor. El ion amonio puede actuar como activador de varias enzimas, generalmente los mismos para los que el potasio actúa como catión activador.

**Fósforo.**—Gran parte del fósforo del suelo se encuentra en forma inorgánica, especialmente en forma de iones fosfato  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ . La cantidad de una y otra forma depende del pH, de modo que a pH bajo se favorece la forma  $H_2PO_4^-$  y a pH elevado, la forma  $HPO_4^{2-}$ . Fundamentalmente es absorbido en la forma ácida. Al contrario que los otros elementos tomados también en forma aniónica, nitrato y sulfato, el fosfato no necesita ser reducido en el interior de la célula antes de ser incorporado en compuestos orgánicos. Forma parte de los ácidos nucleicos, adenosin-fosfatos (AMP, ADP, ATP) y piridín nucleótidos (NAD, NADP) por lo que participa en todas las reacciones energéticas del metabolismo, procesos anabólicos y transferencia de las características hereditarias. Su deficiencia, por tanto, provoca severas alteraciones del metabolismo y desarrollo vegetal. El fósforo forma parte también de otros componentes de las plantas como el piridoxal fosfato, que actúa como coenzima de los sistemas de transaminación, y ácido fítico, principal forma de reserva de fósforo en las semillas.

**Potasio.**—Este elemento es el único catión monovalente que es esencial no solamente para los vegetales, sino también para todos los seres vivos, con la excepción de algunos microorganismos en los que puede ser sustituido por el rubidio. Aunque la mayoría de las plantas requieren cantidades relativamente grandes de potasio, no ha sido aislado ningún metabolito vegetal que contenga este elemento. El principal papel del potasio es el de actuar como activador de numerosos enzimas entre los que podemos citar: acético tiokinasa, aldolasa, piruvato kinasa, succinil-CoA sintetasa, ATPasas, etc. No está aún aclarado el porqué para una acción simplemente catalítica como es la de actuar como activador enzimático requieren las plantas concentraciones relativamente elevadas de potasio. Se ha sugerido por algunos investigadores que el potasio mantiene un ambiente iónico apropiado para preservar la estructura tridimensional necesaria en orden a obtener una actividad enzimática óptima. El potasio también parece desempeñar un papel importante en el transporte de azúcares por el floema, y de hecho el potasio está implicado en la teoría electro-osmótica de transporte de solutos por el floema (Cap. 7). También durante los últimos años ha ido ganando cada vez más aceptación el papel del potasio en los mecanismos reguladores de la apertura y cierre de estomas.

**Calcio.**—Este elemento puede actuar en plantas bajo dos formas: como componente estructural de paredes y membranas celulares y como cofactor de varias enzimas. Clásicamente, el calcio ha sido asociado con la estructura de la pared celular de la cual formaría parte como pectato cálcico localizado en la lámina media. La supuesta eliminación de calcio mediante el agente quelante EDTA se ha utilizado como método para el aislamiento de células vegetales. Su función en la pared celular se supone que es contribuir por algún mecanismo aún no conocido a la rigidez de la pared misma. También

se ha relacionado el calcio con la función de la membrana celular. Al microscopio electrónico puede comprobarse cómo en tejidos deficientes en este elemento, las membranas aparecen desorganizadas. También la eliminación de calcio mediante agentes quelantes provoca un aumento en el flujo iónico en uno y otro sentido hacia ambos lados de la membrana. El calcio puede actuar como agente protector contra los iones hidrógeno, concentraciones salinas elevadas o bien contra otros iones presentes en el medio potencialmente tóxicos. Como cofactor enzimático son conocidos los efectos termo-estabilizadores del calcio en las  $\alpha$ -amilasas. También actúa como activador de fosfatasa en patata, algunas ATPasas de cloroplastos y de la fosfolipasa D de col y zanahoria.

**Azufre.**—Es absorbido por las plantas en forma de sulfato y debe ser reducido antes de poder ser incorporado en componentes orgánicos. Su función más importante es la participación en la estructura de las proteínas formando parte de los aminoácidos azufrados, cisteína, cistina y metionina. También forma parte el azufre de compuestos como tiamina, biotina y coenzima A, metabolitos esenciales en el metabolismo de las plantas, ya que actúan como cofactores o coenzimas de varios sistemas enzimáticos. Otra función del azufre se encuentra en los grupos sulfhidrilo presentes en muchas enzimas y que en muchos casos son necesarios para su actividad (Cap. 19).

**Magnesio.**—Al igual que el calcio, el magnesio puede encontrarse en plantas como elemento estructural o como cofactor enzimático. Su papel estructural es formando parte de la molécula de clorofila, aunque bajo esta forma sólo constituye el 10 por 100 del magnesio presente en las hojas. Como activador enzimático, el magnesio es cofactor de casi todos los enzimas que actúan sobre sustratos fosforilados, por lo que es de una gran importancia en el metabolismo energético. El magnesio presenta fenómenos de antagonismo con otros iones, fundamentalmente con el calcio y el potasio. Tal antagonismo es tan fuerte que la presencia de uno de ellos en el medio puede provocar deficiencia del otro elemento al impedir su absorción.

**Hierro.**—Al igual que otros elementos que ya hemos visto, el hierro funciona como componente estructural y como cofactor enzimático. Forma parte estructural de los citocromos, citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa y ferredoxina. Se encuentra tanto en sistemas respiratorios como fotosintetizadores. Aproximadamente, el 75 por 100 del hierro celular está asociado con los cloroplastos, dato significativo del importante papel que este elemento desempeña en la fotosíntesis. El hierro es esencial para la síntesis de clorofila (Cap. 11). Cuando se suministra a plantas hierro en diferentes concentraciones, se observa una buena correlación entre contenido de hierro y contenido de clorofila. Trabajos realizados hace algunos años, primero con el alga *Euglena* y después en espinaca, parecen indicar que el hierro es necesario para la actividad del enzima  $\gamma$ -aminolevulinato deshidratasa, y se consideró que este paso podría controlar la síntesis de clorofila en sistemas deficientes en hierro.

**Manganeso.**—El papel del manganeso que ha sido estudiado más intensamente durante los últimos años es el que desempeña en la liberación de oxígeno que tiene lugar en el fotosistema II durante la fotosíntesis. La hipótesis más aceptada es la de que actúa como transportador de electrones entre el agua y el fotosistema II. La deficiencia de manganeso provoca también una desorganización en la estructura de la membrana

de los cloroplastos lo que se traduce en una inhibición del fotosistema II. La respiración es también profundamente afectada por la deficiencia en manganeso ya que este elemento actúa como activador de muchas enzimas del ciclo de Krebs. Otras enzimas activadas por manganeso son la arginasa, que convierte la arginina en urea y ornitina y el enzima málico dependiente de NAD en plantas C-4. Los requerimientos de manganeso, en general, no son muy específicos, ya que este elemento puede ser sustituido por magnesio, obteniéndose casi la misma eficiencia. Cuando este elemento se encuentra presente en concentraciones elevadas puede inducir una deficiencia en hierro debido a los efectos competitivos que se establecen entre estos dos elementos.

**Zinc.**—Los marcados efectos que la deficiencia de zinc tiene en el crecimiento vegetal se deben a las relaciones de este elemento con los niveles de auxinas. En plantas deficientes en zinc, la concentración de ácido indolacético disminuye antes de que aparezcan los primeros síntomas. Gran cantidad de trabajos realizados sobre el efecto del zinc en la biosíntesis de auxinas, parecen indicar que este elemento desempeña un papel importante en la ruta metabólica que desde triptófano conduce a la formación de ácido indolacético. Además de su papel en la biosíntesis de las auxinas, el zinc participa en el metabolismo vegetal como activador de varias enzimas. El primer enzima que se descubrió necesitaba zinc para su actividad es la anhidrasa carbónica cuyos niveles en plantas con deficiencia de zinc son sólo un 10 por 100 de su concentración normal. Otros enzimas que requieren zinc son: alcohol deshidrogenasa, algunas piridín nucleótido deshidrogenasas, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y triosa fosfato deshidrogenasa. Una característica importante de la deficiencia de zinc es el acúmulo de compuestos nitrogenados solubles, como aminoácidos y aminoras, lo que sugiere una inhibición de la síntesis de proteínas, probablemente por el efecto activador que la deficiencia de zinc tiene sobre la actividad ribonucleásica.

**Cobre.**—Este elemento forma parte de un grupo de enzimas tales como tirosinasa, lacasa, fenolasas y ácido ascórbico oxidasa, todas ellas caracterizadas por la utilización directa del oxígeno en la oxidación del sustrato. El cobre interviene también en la fotosíntesis, formando parte de la plastocianina, proteína que participa en el transporte de electrones fotosintéticos. La deficiencia de cobre interfiere de alguna forma con la síntesis de proteínas y al igual que la deficiencia de zinc provoca un acúmulo de compuestos nitrogenados solubles.

**Cloro.**—Es probable que el cloro desempeñe más de una función específica en el metabolismo vegetal, pero por ahora la única que se conoce es en el desprendimiento de oxígeno en el fotosistema II. Su función exacta en este mecanismo no se conoce pero se ha sugerido que actúa en el lado oxidante del fotosistema II probablemente protegiéndole contra la fotoinactivación mediante la eliminación de oxidantes perjudiciales producidos durante la fotólisis del agua. La tendencia de la deficiencia en cloro a causar marchitamiento sugiere que puede desempeñar algún papel en la transpiración, de hecho en maíz, el cloro interviene en la apertura de los estomas en la luz. No se ha encontrado nunca deficiencia de cloro en condiciones naturales.

**Boro.**—Aunque los síntomas de deficiencia en boro son espectaculares, no se conoce con exactitud cual es el mecanismo de acción de este elemento. Uno de los síntomas característicos de la deficiencia en boro es la acumulación de sustancias fenólicas for-

madas por la condensación de eritrosa-4-fosfato, formado en la ruta de las pentosas fosfato, y de piruvato formado en la glucólisis. El boro parece regular la degradación de glucosa por estas dos vías, ya que se ha demostrado que se combina con el ácido 6-fosfogluconico, sustrato inicial de la ruta de las pentosas fosfato. Este complejo inhibe la actividad del enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa resultando en una disminución de la formación de eritrosa-4-fosfato; en ausencia de boro no se produce tal inhibición y se favorece la formación de fenoles. Probablemente el efecto mejor conocido del boro sea su función en el transporte de azúcares. Se supone que el boro formaría un complejo con los azúcares facilitando de esta forma el transporte de los mismos a través de la planta. Otras sugerencias alternativas son las que suponen que el boro inhibe la síntesis de almidón manteniéndose los azúcares en formas solubles fácilmente transportables, o bien que el boro aumenta la síntesis de sacarosa, que es el principal azúcar transportado en vegetales. También se ha sugerido que el boro puede desempeñar alguna función en el metabolismo del RNA y en la síntesis de ácido giberélico, ya que en plantas deficientes en este elemento se observa una disminución en el contenido en ácido ribonucleico y en ácido giberélico.

*Molibdeno.*—Desde hace algún tiempo se sabe que la función fundamental del molibdeno en el metabolismo vegetal está en relación con la fijación del nitrógeno atmosférico y con la asimilación de los nitratos (Cap. 18). La esencialidad de este elemento fue claramente establecida cuando se demostró que formaba parte del enzima nitrato reductasa. Por ello, la sintomatología es mucho más acusada cuando el nitrógeno se suministra en forma de nitrato que en forma de ion amonio. En las plantas con deficiencia de molibdeno los niveles de azúcares y ácido ascórbico son generalmente mas bajos que en las plantas control. El molibdeno forma parte también de una de las proteínas que constituyen el enzima nitrogenasa.

## 8.6. Aspectos ecológicos de la nutrición mineral

La distribución de la vegetación natural, aunque está fuertemente afectada por el suministro adecuado de nutrientes, también se encuentra fuertemente influenciada por la presencia de grandes concentraciones de ciertos elementos, que pueden tener efectos perjudiciales sobre el desarrollo vegetal. Desde el punto de vista ecológico las plantas pueden clasificarse en varios grupos según su forma de reaccionar frente a las condiciones ambientales. Vamos a referirnos a tres aspectos fundamentales que van a ejercer una gran influencia sobre la distribución de la vegetación y que son la presencia en el suelo de sal, calcio o metales pesados.

### 8.6.1. Salinidad

La sal restringe el crecimiento de las plantas sobre la tierra más que ninguna otra sustancia inhibidora de las que pueden encontrarse en condiciones naturales. Las plantas que crecen en ambientes salinos se las denomina halofitas, y aunque este término no

representa ningún taxon botánico es significativo el hecho de que la mayoría de las halofitas pertenezcan a un reducido grupo de familias como por ejemplo: Quenopodiaceas, y Plumbaginaceas, perteneciendo a la primera los géneros *Beta*, *Atriplex*, *Halimione*, *Salicornia*, *Suaeda* y *Salsola*. Las condiciones salinas presentan dos problemas fundamentales a las plantas que viven en esas condiciones: el perjuicio directo causado por las concentraciones elevadas de cloruro sódico y el perjuicio indirecto causado por los potenciales osmóticos tan bajos que se crean en el suelo debido a la elevada concentración de solutos. Este último efecto obliga a las plantas expuestas a estas condiciones a mantener potenciales osmóticos intracelulares aún más bajos que los del suelo, ya que de otra manera se produciría una desecación de la planta debido a que el agua no sólo no entraría en ella, sino que tendería a salir hacia el suelo. Esto lo consiguen las plantas bien por la toma de concentraciones elevadas de sal o bien por la producción intracelular de elevadas concentraciones de azúcares solubles como sacarosa, glucosa y fructosa; ambos procesos disminuirán el potencial osmótico intracelular y podrían facilitar la entrada de agua.

La toma por las raíces de grandes cantidades de sodio puede crear dificultades para la toma de otros elementos como potasio o fósforo. Por ello, las halofitas deben hacer frente a la toma de iones presentes en pequeñas cantidades, aun cuando sus sistemas específicos de transporte podrían estar afectados por la presencia masiva de sodio. Epstein sugiere en halofitas la presencia de un sistema doble de transporte, uno que es más efectivo con iones presentes en concentraciones elevadas y otro que presenta su eficiencia máxima con iones presentes en concentraciones bajas (Cap. 6).

La resistencia de las plantas a la salinidad puede estar asociada con tres mecanismos diferentes:

- a) La exclusión de sal.
- b) La excreción de sal.
- c) La dilución de la concentración salina dentro de la célula.

Algunas plantas halofitas como *Agropirum junceiforme* presentan concentraciones bajas tanto de sodio como de cloruro en el interior de sus células. El mecanismo de exclusión no se conoce, pero se ha sugerido que el sodio es bombeado activamente fuera de la célula mientras que su entrada es pasiva. En *Eragrostis tenella* opera un mecanismo de exclusión parcial de sodio, ya que las concentraciones elevadas de este elemento quedan confinadas a las raíces y no pasan hacia el tallo. El género *Atriplex* presenta un sistema de excreción salina mediante la presencia de glándulas especializadas en las hojas, que no son mas que pelos vesiculares que eliminan activamente la sal del interior de la hoja hacia el exterior. Tal tipo de glándulas salinas están también presentes en los géneros *Spartina*, *Glaux*, *Armeria*, *Tamarix*. Ciertas especies controlan la acumulación progresiva de sal mediante el desarrollo de succulencia. *Suaeda maritima* presenta hojas delgadas después de la germinación en primavera, al final del verano las hojas se hinchan aumentando el contenido de agua dentro de la hoja evitando un descenso en el potencial osmótico debido a una concentración salina excesiva. El problema de la acumulación salina puede ser grave en las especies perennes; en las de hoja caduca la sal se elimina con la caída de la hoja en el otoño; en las de hoja perenne la alternancia de con-

centraciones elevadas y bajas de azúcares puede mantener potenciales osmóticos bajos, permitiendo que la planta llegue a la próxima estación de crecimiento sin tener concentraciones salinas tóxicas.

### 8.6.2. Calcio y pH

Un hecho repetidamente observado por botánicos y ecólogos desde hace muchos años es la naturaleza diferente de la flora que crece en suelos ricos en carbonato cálcico y, por tanto, con un pH elevado, de la que se encuentra en suelos ácidos y pobres en calcio. Debido a la fuerte relación existente entre la cantidad de calcio de un suelo y su pH (Fig. 8.6) se ha creado una gran confusión entre los efectos del calcio y del pH, tendiéndose a llamar a todas las plantas que crecen en suelos alcalinos «calcícolas» y a las que crecen en suelos ácidos «calcifugas». Para evitar esta confusión se utilizan los términos de «basófilas» para las plantas que aparecen en suelos con pH elevado pero bajos en calcio, como los suelos de serpentina, y «acidófilas» para las que crecen en suelos ácidos.

Si consideramos exclusivamente los efectos del calcio, las plantas calcícolas serían aquellas tolerantes a los niveles elevados de calcio en el suelo, que posiblemente tienen requerimientos elevados de este elemento y en los que la concentración intracelular de

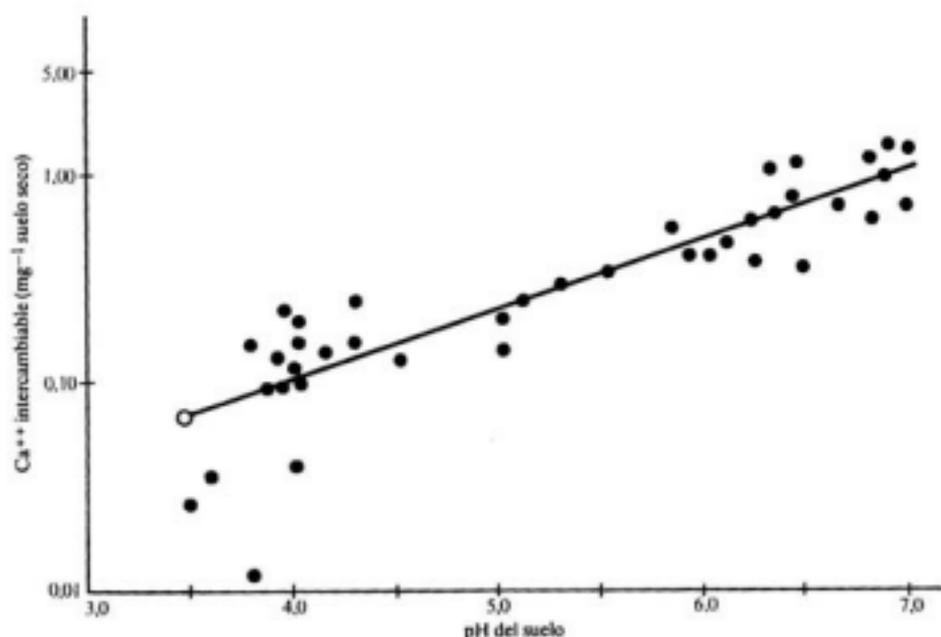


Figura 8.6.—Relación entre contenido de calcio y pH en varios suelos del norte de España (tomado de P. Bannister, *Introduction to Physiological Plant Ecology*, Blackwell Scientific, Oxford, 1976).

calcio es elevada debido a la concentración intracelular también elevada de ácido málico, formándose malato cálcico que mantiene al elemento en solución. Las plantas calcifugas serían aquellas con baja tolerancia al calcio, capaces de subsistir sólo en suelos pobres en calcio y en las que la concentración intracelular de calcio sería muy baja debido a la presencia de oxalato que precipita el calcio como oxalato cálcico. Plantas calcifugas como *Juncus squamosus* y *Nardus stricta* muestran su mejor crecimiento en soluciones con niveles bajos de calcio, mientras que la calcícola *Origanum vulgare* requiere niveles elevados de calcio.

Los efectos independientes del calcio y del pH se han demostrado observando el comportamiento de especies calcícolas y calcifugas del género *Agrostis*. Cuando *Agrostis stolonifera*, planta calcícola, y *Agrostis setacea*, planta calcifuga, crecen a pH 4,5 (Fig. 8.7) en soluciones en las que progresivamente se va aumentando la concentración

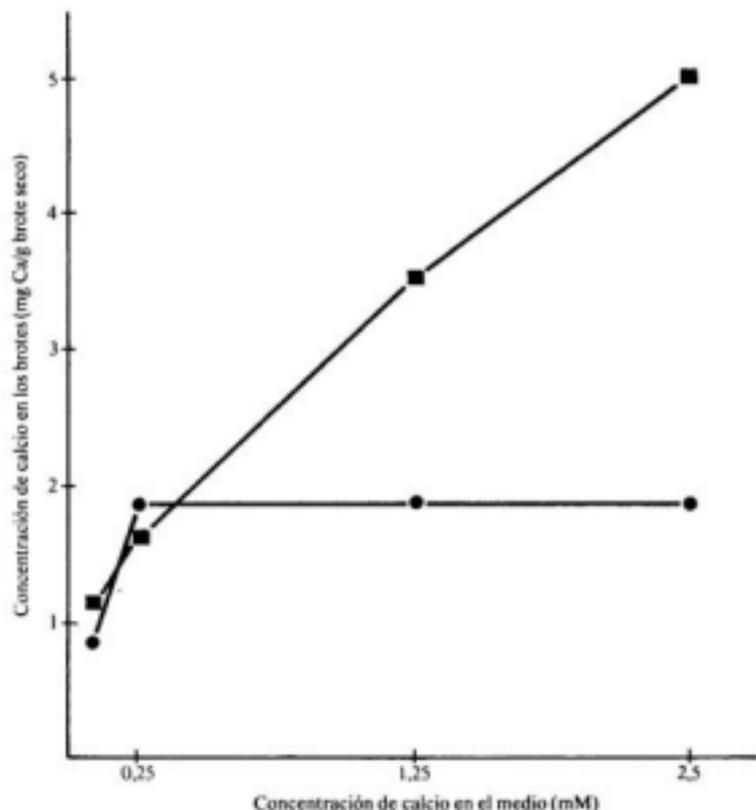


Figura 8.7.—Concentración de calcio en *Agrostis stolonifera* (■) y en *Agrostis setacea* (●) en función de la concentración de calcio en el medio externo (tomado de P. Bannister, *Introduction to Physiological Plant Ecology*, Blackwell Scientific, Oxford, 1976).

de calcio, se observa cómo la primera acumula cantidades cada vez mayores de calcio en sus tejidos y crece mejor, mientras que la segunda no responde a la adición de calcio por encima de 0,25 mM.

Los efectos tóxicos del calcio pueden ser responsables de la exclusión de algunas especies en los suelos calcáreos. Cuando las plantas calcífugas crecen en suelos calcáreos, se desarrolla en ellas una clorosis inducida por la cal y que se ha comprobado no es más que una deficiencia en hierro. Esto es debido a que las plantas calcífugas no están adaptadas a la utilización del hierro en suelos calcáreos, ya que las concentraciones de este elemento en solución en estos suelos es muy baja. Las plantas calcícolas sí están adaptadas a esta condición, y por ello no desarrollan los síntomas típicos de deficiencia de hierro. También puede deberse esta clorosis a que el ion bicarbonato, muy abundante en suelos calcáreos, interfiere con la toma de hierro. Por tanto, la toxicidad del ion bicarbonato es otro factor a tener en cuenta al considerar la exclusión de algunas especies vegetales en los suelos calcáreos.

La exclusión de plantas calcícolas de los suelos ácidos podría deberse a una deficiencia en calcio, aunque la causa generalmente considerada como fundamental en esta exclusión es la elevada solubilidad de algunos metales pesados, fundamentalmente el aluminio a pH ácidos. Las especies de hábitats calcáreos son generalmente más sensibles a los efectos tóxicos del aluminio que aquellas de los suelos ácidos y pobres en calcio. Así, se ha demostrado que la incapacidad de la planta calcícola *Scabiosa columbaria* para crecer en suelos ácidos se debe a su intolerancia a los iones aluminio. No se conoce bien el mecanismo de la toxicidad del aluminio; una posible causa, como se ha encontrado en *Hordeum vulgare*, es la precipitación del fosfato de aluminio en los tejidos radiculares, provocando una deficiencia en fósforo.

### 8.6.3. Metales pesados

El hecho de que numerosas plantas puedan crecer en suelos que contienen concentraciones elevadas de ciertos iones metálicos, indica que deben estar de alguna forma adaptadas a estas condiciones particulares. Las plantas pueden evitar los efectos tóxicos colonizando las áreas donde la concentración metálica sea menor dentro del área contaminada, o mediante mecanismos de exclusión o absorción selectiva. A pesar de todo, cuando se analizan los tejidos de algunas plantas como *Minuartia verna*, *Cerastium holosteroides*, *Agrostis tenuis* o *Calluna vulgaris* se observa que presentan concentraciones elevadas de Zn, Pb, Ni, Cr, Cu, Co. A estas plantas se las considera tolerantes a los metales pesados. Algunas de estas plantas, como varias especies del género *Astragalus* que acumulan selenio, se utilizan como indicadoras de yacimientos metálicos. La tolerancia está genéticamente determinada y parece ser una característica dominante y poligénica. La tolerancia metálica suele ser muy específica; así, plantas que son tolerantes a un determinado ion no suelen serlo a otros iones, aunque tengan unas características fisicoquímicas similares, si están ausentes de los suelos en que normalmente crecen estas plantas. Tolerancias múltiples aparecen cuando varios iones están presentes en el mismo suelo; así hay clones de *Agrostis stolonifera* que son tolerantes al magnesio y al níquel; también son frecuentes casos de tolerancia simultánea al zinc y al níquel.

No se conoce aún con exactitud el mecanismo por el que las plantas tolerantes resisten los efectos tóxicos. En el caso de la resistencia al zinc, se ha encontrado que las plantas tolerantes acumulan el metal en las paredes celulares, y este puede ser el mecanismo por el que la planta evita la presencia de concentraciones tóxicas de este elemento en el interior de la célula. Una hipótesis prometedora es la que supone que las plantas sintetizan agentes quelantes que formarían complejos con los metales pesados de tal forma que los transformarían en inocuos.

Las razas con tolerancia metálica tienden a ser excluidas de los suelos normales por las no tolerantes, que son más vigorosas y con una tasa mayor de crecimiento. A pesar de esto, las razas tolerantes son de gran utilidad en la recuperación de suelos transformados en inservibles por la explotación de zonas mineras.

---

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BANNISTER, P.: *Introduction to Physiological Plant Ecology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1976.
- CLARKSON, D. T., y HANSON, J. B.: *The Mineral Nutrition of Higher Plants*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 31, 1980, págs. 239-298.
- CRAWFORD, R. M. M.: *Mineral Nutrition*, en: M. A. Hall (ed.), *Plant Structure Function and Adaptation*, The MacMillan Press, Londres, 1976.
- EPSTEIN, E.: *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1972.
- GAUCH, H. G.: *Inorganic Plant Nutrition*, Dowden, Hutchinson and Ross Inc. Stroudsburg, 1972.
- LAUCHLI, A., y BIELESKI, R. L. (eds.): *Inorganic Plant Nutrition*, «Encyclopedia of Plant Physiology», vol. 15A, Springer-Verlag, 1983.
- RAINS, D. W.: *Mineral Metabolism*, en: J. Bonner y J. E. Varner (eds.), *Plant Biochemistry* 2.ª ed., Academic Press, Nueva York, 1976.

# **IV**

**Fotosíntesis y  
procesos  
relacionados**



## FOTOSÍNTESIS. GENERALIDADES

La fotosíntesis es el mecanismo mediante el cual se puede garantizar que la vida sobre la tierra no llega a su fin por falta de energía. En esencia consiste en la liberación del oxígeno integrante de la molécula del agua y el almacenamiento del poder reductor resultante en numerosos compuestos carbonados que constituyen la materia viva. Es un proceso de oxidorreducción en que un donador de electrones, el agua, se oxida y un aceptor, el anhídrido carbónico u otro aceptor adecuado se reduce.

Hoy día, el concepto de fotosíntesis no se aplica solamente a la reducción del anhídrido carbónico, sino que el poder reductor originado como consecuencia de la fotólisis del agua puede utilizarse en la reducción de otros compuestos como los nitratos o sulfatos. En este sentido, el concepto de fotosíntesis es más amplio de lo que ha sido considerado hasta hace unos años y en los capítulos 18 y 19 se hará un estudio de la reducción fotosintética de nitratos y sulfatos.

La fotosíntesis es importante para el hombre por una serie de razones; quizás la más llamativa, pero no la más importante, sea el hecho de que mediante la fotosíntesis se producen alimentos y oxígeno, que son los productos finales. Sin embargo, en un estudio del proceso total esto sería secundario y lo fundamental es el estudio de la captación y transformación de la energía, es decir, la captación de energía luminosa y su transformación en energía química. Este proceso o serie de procesos constituyen un apasionante campo de estudio que se irá desarrollando en este capítulo y los siguientes.

Aunque etimológicamente fotosíntesis significa síntesis con ayuda de la luz, en realidad se limita a una sola reacción, la síntesis de materia orgánica por las plantas iluminadas. Constituye el proceso fundamental de la vida.

### 9.1. Breve desarrollo histórico

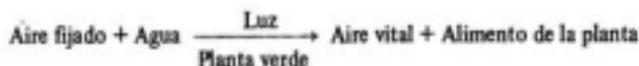
Aunque los trabajos de van Helmont deberían haber puesto en tela de juicio la teoría aristotélica del humus, no fue hasta bien entrado el siglo XIX que, gracias a la autoridad de Justus von Liebig (1803-1873), fue totalmente abandonada. Por otra parte, la posibilidad de que la luz del sol tuviera algo que ver con el desarrollo del color verde de las plantas ya había sido apuntada por el mismo Aristóteles, pero pasó desapercibida. Stephen Hales (1677-1761) hace la primera mención en este sentido, al proponer que la luz del sol puede actuar «ennobleciendo los principios de los vegetales» e incluso avanza la idea de que la toma de aire por las hojas sirve para alimentar la planta.

La posibilidad de manejar gases abrió un nuevo camino en estos estudios y así tenemos que Joseph Priestley (1733-1804), en una serie de experimentos, llega a la conclusión de que las plantas verdes eran capaces de restaurar o purificar el aire que había sido hecho nocivo por la respiración de un animal. A este aire purificado le denominó «aire desflogisticado», que en realidad es el oxígeno desprendido por las plantas. Priestley, aunque descubrió el oxígeno como producto de la fotosíntesis, no reconoció la necesidad de la luz, ni tampoco que las plantas utilizaban el «aire fijado» o «aire flogisticado».

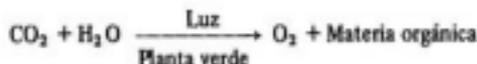
En el año 1779 un médico austriaco, Jan Ingenhousz (1730-1799) pasó unas vacaciones en Inglaterra y repitió los experimentos de Priestley y algunos de su propia cosecha. Como resultado de sus trabajos, concluye que las plantas vician el aire tanto en la luz como en la oscuridad, igual que los animales, pero que al iluminarlas la luz del sol, la liberación de aire desflogisticado excede al que se consume. Casi simultáneamente, Jean Senebier (1742-1809), aparte de hacer observaciones análogas a las de Ingenhousz, añade que la capacidad de las plantas para regenerar el aire depende de la presencia de aire fijado (anhídrido carbónico). Este aire fijado, disuelto en agua, es el alimento que las plantas extraen del aire que las rodea.

El último término en la ecuación fotosintética, esto es, el agua, fue puesto de manifiesto tras los trabajos de Theodore de Saussure (1767-1845). En 1804 publicó un trabajo en que demostraba que el peso de materia orgánica y oxígeno producido en la fotosíntesis era mayor que el del «aire fijado» (anhídrido carbónico consumido). Puesto que en las plantas sólo se incorporaba aire y agua, concluyó que el otro reactivo que faltaba era el agua.

La ecuación tal como había sido expresada en la nomenclatura prequímica sería:

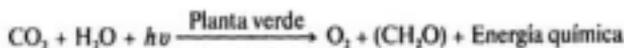


Ingenhousz tradujo la terminología flogística a la nomenclatura química y así quedó la ecuación de la fotosíntesis

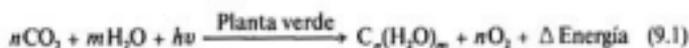


Posteriormente Dutrochet, en 1837, demostró que sólo las células que contienen clorofila realizan la reducción del anhídrido carbónico.

Para completar el cuadro hay que añadir un nombre a la historia de la fotosíntesis y es el de Julius Robert Mayer (1814-1878), uno de los formuladores de la ley de la Conservación de la Energía. Durante la fotosíntesis existe almacenamiento de la energía luminosa en forma de energía química



De una forma más general podemos escribir:



En el caso de que se forme glucosa,  $m = n = 6$ .

El hecho de que la fotosíntesis lleva a la formación de hidratos de carbono, fue demostrada por Sachs, quien expuso la mitad de una hoja a la luz, dejando la otra mitad a oscuras. Al cabo de cierto tiempo sometía toda la hoja a los vapores de yodo, observando que la mitad iluminada tomaba color violeta oscuro, debido a la reacción del almidón con el yodo.

A la vista de la ecuación (9.1) se puede concluir que la fotosíntesis puede manifestarse perceptiblemente por un desprendimiento de gas (el oxígeno). Así, si se introduce una planta acuática o terrestre en un embudo y se coloca como indica la figura 9.1, se observa cómo se desprenden burbujas que si se recogen en un tubo puede demostrarse que están formadas por oxígeno.

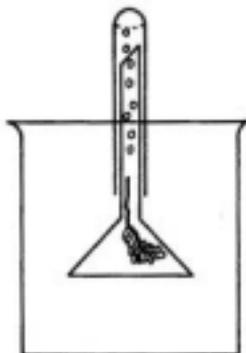


Figura 9.1

## 9.2. Medida de la fotosíntesis

La Fisiología Vegetal es una ciencia experimental y, por tanto, necesita utilizar métodos que permitan cambiar los factores del ambiente en cantidades conocidas y medir las respuestas de las plantas frente a esos cambios.

Para medir la fotosíntesis pueden utilizarse, en principio, cualquiera de los términos de la ecuación (9.1). Sin embargo, solamente algunos de ellos se emplean corrientemente hoy día, como son: absorción de anhídrido carbónico, desprendimiento de oxígeno, aumento de peso seco, energía total fijada o energía luminosa absorbida. La incorporación del agua no se utiliza por aparecer a ambos lados de la ecuación y porque aun con

el empleo de isótopos, dada la gran facilidad de intercambio de los átomos de H y O, no podría tener aplicación práctica.

Al realizar medidas de fotosíntesis, hay que tener en cuenta que la planta o sus órganos respiran simultáneamente, por tanto, lo que nosotros medimos es la ganancia neta de fotosíntesis, a dicha cantidad tendremos que añadirle lo que simultáneamente le resta la respiración. Cuando la intensidad fotosintética es elevada, la respiración puede ser 1/10 a 1/30 del valor de la primera y, por tanto, en muchos casos no suele tenerse en cuenta, pero conviene aclarar que si la fotosíntesis neta se mide en periodos largos que incluyan tiempos de iluminación y tiempo de oscuridad, esta corrección hay que establecerla siempre.

El anhídrido carbónico es el sustrato de la fotosíntesis; un cambio en su concentración será mucho más crítico que un cambio en la concentración de oxígeno. Sin embargo, si queremos medir fotosíntesis tiene que haber cambios. Varios son los sistemas que pueden utilizarse para medir la intensidad fotosintética de una planta, pero todos ellos se reducen a tres técnicas fundamentales, pudiendo variar las técnicas de análisis e incluso pudiendo elegirse parámetros distintos al  $\text{CO}_2$  para realizar estas medidas.

La intensidad o cantidad de fotosíntesis de una hoja, puede hacerse en un sistema abierto (Fig. 9.2) midiéndose la concentración de anhídrido carbónico antes y después de pasar sobre la hoja una corriente de aire, y conociendo el flujo de dicha corriente de aire. La velocidad del flujo, multiplicado por el cambio de concentración, nos dará la cantidad de  $\text{CO}_2$  consumida durante la fotosíntesis.

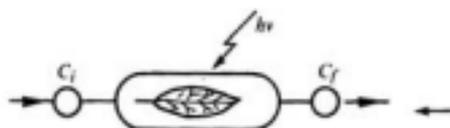


Figura 9.2

Con los sistemas abiertos hay que procurar emplear un método de medida muy sensible y una gran velocidad de paso del gas, para que las variaciones de la concentración sean pequeñas y podamos tener una idea de la concentración media sobre la hoja  $C$ ,

$$C = \frac{C_i - C_f}{\ln(C_i/C_f)}$$

dónde  $C_i$  y  $C_f$  son las concentraciones de  $\text{CO}_2$  leídas antes y después de pasar la corriente de aire sobre la hoja.

En vez de medirse concentraciones en un momento dado, puede utilizarse una técnica integradora midiendo durante cierto tiempo el  $\text{CO}_2$  total que queda en la corriente de aire que pasa sobre la hoja y compararlo con una corriente de aire análoga que no ha pasado sobre la misma.

El sistema cerrado de la figura 9.3 tiene el inconveniente de que a no ser que se opere con un volumen muy grande de aire, la disminución de la concentración de  $\text{CO}_2$  con el tiempo puede influir de forma muy notoria sobre la fotosíntesis. Por ello, conviene operar en volúmenes de gas grandes y así evitar que la concentración de  $\text{CO}_2$  disminuya mucho.

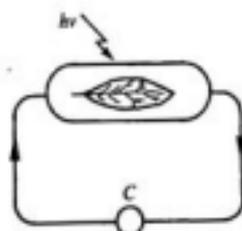


Figura 9.3

El mejor método es un circuito semicerrado (Fig. 9.4). En este circuito el aire circula como en un circuito cerrado, pero hay una entrada y salida de gas para evitar que la concentración de  $\text{CO}_2$  disminuya de forma apreciable y afecte a los valores de intensidad fotosintética.

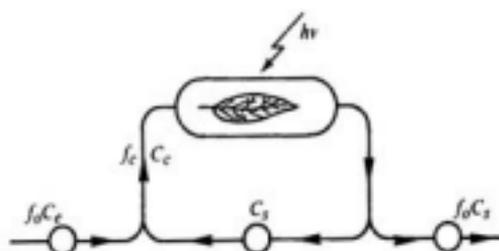


Figura 9.4

El aire circula por el circuito con un flujo grande  $f_c$  y a una concentración de  $\text{CO}_2$ ,  $C_c$ . Se introduce un flujo lento de gas  $f_o$  que es aproximadamente 1/100 de  $f_c$ , pero con una elevada concentración de  $\text{CO}_2$ ,  $C_o$ . Este gas se introduce de forma que pueda mezclarse bien con el que existe en el interior del circuito. Una vez que esta mezcla gaseosa ha pasado sobre la hoja, se deja salir del circuito un volumen de gas igual al que entra  $f_o$ . Este gas que dejamos salir tendrá una concentración  $C_o$  que podremos medir con una técnica adecuada. Cuando se alcance el equilibrio tendremos que la tasa de asimilación, es decir, el  $\text{CO}_2$  fijado por la hoja será

$$A = f_c (C_c - C_o) \quad (9.2)$$

Por otra parte, sabemos que el  $\text{CO}_2$  que introducimos en el circuito será igual a lo que dejamos salir más lo que se asimila por la hoja, es decir:

$$f_o C_e = A + f_a C_i$$

Sustituyendo  $A$  por su valor en (9.2) tendremos:

$$\frac{C_e - C_s}{C_e - C_s} = \frac{f_c}{f_o}$$

De aquí se calcula el valor de  $C_c$ :

$$C_c = \frac{f_o}{f_c} (C_e - C_s) + C_s$$

Como todos los términos de la ecuación podemos medirlos con instrumentación adecuada, el cálculo de la concentración de  $\text{CO}_2$  que pasa sobre la hoja,  $C_c$ , puede hacerse fácilmente.

Las medidas de la concentración de  $\text{CO}_2$ , o el  $\text{CO}_2$  total absorbido por una planta puede determinarse de varias formas. Se puede recoger el  $\text{CO}_2$  en una solución de álcali, puede medirse la conductividad eléctrica en una solución o medir variaciones de los valores de pH. También pueden hacerse medidas sobre el gas con el empleo de un analizador de gases en el infrarrojo, o midiendo cambios en la temperatura de una mezcla gaseosa con un diaferómetro o katarómetro. Cualquiera de estos procedimientos nos dará una idea del  $\text{CO}_2$  que se ha consumido en la fotosíntesis, siendo las medidas más o menos sensibles, y más o menos exactas, según la técnica empleada. Conviene recordar que en todos los casos habrá que hacer las correcciones pertinentes debidas a la respiración, pues la planta, además de fotosintetizar, está respirando, es decir, que está expulsando  $\text{CO}_2$  al exterior y este valor, que en realidad es pequeño, sin embargo, debe tenerse en cuenta a la hora de calcular la fotosíntesis real de una hoja o de una planta.

En vez de medir variaciones en la concentración de  $\text{CO}_2$ , a veces conviene determinar el oxígeno desprendido, existiendo también técnicas adecuadas para ello. Pueden utilizarse métodos químicos, como el de Winkler o el de Linossier, que son rápidos y bastante sensibles, o métodos físicos o fisicoquímicos, desde algunos tan simples como el contado de burbujas o determinación de su volumen, hasta otros que utilizan el manómetro de Warburg o el empleo de electrodo de oxígeno. Al igual que en el caso de medir el  $\text{CO}_2$  cada procedimiento será adecuado para determinadas condiciones de experimentación y en función del material con que se trabaje.

### 9.3. Valores de la fotosíntesis

Si partimos del dato de que en el aire hay una concentración de  $\text{CO}_2$  del 0,03 por 100 en volumen, o lo que es lo mismo 0,16 mg de C por litro, para formar 1 g de materia seca ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) que contiene 400 mg de C, es preciso que la planta extraiga el  $\text{CO}_2$  de unos 2.400 l de aire. Esto nos da una idea de la magnitud del fenómeno considerando, que no es el caso, que todo el  $\text{CO}_2$  de ese aire es extraído por la planta. Una cosecha de 200 Tm por hectárea, representa como mínimo un volumen de aire pasado por las plantas de 600.000  $\text{m}^3$ .

En condiciones óptimas, los valores de asimilación que se obtienen por cada gramo de tejido seco, es decir, por cada 10-15 g de tejido fresco, son de 10 a 20 ml de  $\text{CO}_2$ , o sea, 20 a 40 mg de  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, en la naturaleza los valores que normalmente se encuentran son mucho menores debido a las deficiencias tanto de orden interno como de orden externo, y en general oscilan alrededor de 1/10 a 1/20 de los valores máximos. Como veremos más adelante, sólo un 1 ó 2 por 100 de la energía recibida por la hoja o por un dosel vegetal es utilizado en la fotosíntesis, aparte de las pérdidas debidas a otros factores, principalmente a la respiración.

#### 9.4. Vías de difusión del anhídrido carbónico

Para que haya fotosíntesis es necesario que el  $\text{CO}_2$  llegue hasta el interior del cloroplasto, que es donde tendrá lugar su reducción, como veremos en el capítulo 14. Aunque una pequeña cantidad de  $\text{CO}_2$  puede proceder de la propia respiración de la planta, no sería suficiente para que la planta aumentara de peso.

Hacia el año 1900, F. F. Blackman, H. T. Brown y F. Escombe, llegaron a la conclusión de que la difusión del anhídrido carbónico al interior de las hojas estaba estrechamente relacionado con la presencia y número de estomas (Tabla 9.1). Demostraron que si se suministra  $\text{CO}_2$  al haz o al envés de una hoja, la intensidad de la fotosíntesis era proporcional al número de estomas de la superficie en que se aplicaba. Si el envés de una hoja se recubre de vaselina, la tasa de fotosíntesis disminuye de forma considerable. Sin embargo, pronto se vio que, aparte del número de estomas, había que considerar el estado de los mismos y, por tanto, la difusión de  $\text{CO}_2$  también dependía del grado de apertura que presentarían los estomas.

TABLA 9.1  
Relación entre distribución de estomas y difusión del  $\text{CO}_2$

Planta	Estomas haz/estomas envés	Difusión haz/envés
<i>Catalpa bignonioides</i> .....	0/100	0/100
<i>Nerium oleander</i> .....	0/100	3/100
<i>Hedera helix</i> .....	0/100	4/100
<i>Prunus laurocerasus</i> .....	0/100	0/100
<i>Polygonum sacchalinense</i> .....	0/100	6/100
<i>Phaseolus vulgaris</i> .....	0/100	8/100
<i>Nuphar advenum</i> .....	100/0	100/0
<i>Iris germanica</i> .....	100/100	100/95
<i>Senecio macrophyllus</i> .....	100/126	100/92
<i>Tropaeolum majus</i> .....	100/200	100/265
<i>Helianthus tuberosus</i> .....	100/240	100/273
<i>Populus nigra</i> .....	100/575	100/375

Brown y Escombe calcularon que si todos los estomas estuvieran completamente abiertos, una hoja que fotosintetiza absorbe 70 veces más  $\text{CO}_2$  por unidad de superficie de estomas que una superficie igual de  $\text{NaOH}$ , 1N.

Parecía difícil creer que con la pequeña superficie, en relación al total de la superficie foliar que ocupan los estomas, fueran, sin embargo, el camino para la difusión del  $\text{CO}_2$ . En experimentos realizados con un tubo de vidrio cubierto en un extremo con celofán y que en el fondo, a una distancia fija, contenía una solución concentrada de  $\text{NaOH}$ , pudo observarse que la difusión por poro aumentaba al disminuir el número de poros. Así con un área total de poros del 1,25 por 100 de la sección del tubo, la difusión era un 45 por 100 de la correspondiente al tubo abierto, y para un área de poros del 0,31 por 100 de la sección del tubo, la difusión era un 14 por 100 del máximo. Esto demuestra que si los poros son de diámetro pequeño y de muy poco espesor, una pequeña proporción del área total del tubo permite una intensidad de difusión que no difiere mucho de la que se realiza por el tubo completamente abierto.

En el capítulo 5, al estudiar la pérdida de agua por la planta, nos encontramos con una situación similar, que se perdía más agua por los estomas que la que se perdería por la superficie de la hoja; esto es debido al efecto de borde de los poros que allí se ha descrito y que es de aplicación a la difusión del  $\text{CO}_2$ , sólo que allí el razonamiento se hacía con las moléculas de agua que salen de la hoja en forma de vapor y aquí será con las de  $\text{CO}_2$  que penetran en la misma hoja.

El  $\text{CO}_2$  que penetra al interior de la hoja puede proceder del aire que rodea a la hoja o, en el caso de plantas acuáticas, del  $\text{CO}_2$  disuelto en el agua que baña a la planta. De esta forma, la planta fotosintetizante consume  $\text{CO}_2$  de sus proximidades, y como consecuencia se formará un gradiente de concentraciones, ya que el  $\text{CO}_2$  difundirá desde las zonas de alta a las de baja concentración. Esta difusión y posterior penetración al interior de la hoja, será tanto más activa cuanto más agitado esté el medio, aire o agua, en el que se encuentre la planta. Parece como si las moléculas de aire o de agua se opusieran al desplazamiento de las de  $\text{CO}_2$ .

Partiendo de la misma consideración que hacíamos en el capítulo 5 al estudiar la transpiración, el flujo de  $\text{CO}_2$  que atraviesa una unidad de superficie por unidad de tiempo será

$$\phi_c = -D_c \frac{\delta c}{\delta x}$$

donde  $D_c$  es el coeficiente de difusión del  $\text{CO}_2$  (en el aire,  $D_c$  tiene un valor de  $1,6 \times 10^{-1} \text{ cm}^2 \times \text{seg}^{-1}$  y en el agua es  $1,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \times \text{seg}^{-1}$ ) y  $\delta c/\delta x$  es el gradiente de concentración del  $\text{CO}_2$  a lo largo de la dirección  $x$ . Al igual que hacíamos en 5.4 podemos escribir:

$$\phi_c = D_c \frac{\Delta c}{\Delta x}$$

si:

$$\frac{\Delta x}{D_c} = R \Rightarrow \phi_c = \frac{\Delta c}{R}$$

Podemos, así, explicar el flujo  $\phi_c$  en función de una resistencia.

De esta forma, los diferentes recorridos que el  $\text{CO}_2$  tiene que realizar hasta llegar al cloroplasto, que son de diferente área y se realizan a través de diferentes medios, pueden expresarse en función de la resistencia que tiene que vencer. Así, pueden sumarse series de resistencias fácilmente, expresándolas en forma de su recorrido equivalente en aire. Este recorrido equivalente en aire sería un tubo ideal lleno de aire de sección unidad y que con la misma diferencia de concentración entre sus extremos que la del recorrido real, tuviera una velocidad de difusión u ofreciera una resistencia igual a la del recorrido real. Este valor puede deducirse de:

$$R = \frac{\Delta c}{\Phi_c} = \frac{\Delta x}{D_c}$$

y es independiente de la sustancia que difunde. Lo único que influirá será el medio en que se realice la difusión. Así, para el agua habría que multiplicar por el coeficiente de difusión del agua con respecto al aire ( $10^4$ ).

### 9.5. Flujo del $\text{CO}_2$ durante la fotosíntesis

Para que el  $\text{CO}_2$  llegue al interior del cloroplasto, que es donde va a tener lugar su reducción, tiene que difundir desde la atmósfera más o menos turbulenta y atravesar una serie de obstáculos que oponen resistencias variables a su paso. Estas resistencias son: la capa de aire limitante, los estomas, el espacio intercelular del mesófilo, la propia célula del mesófilo que tiene que atravesar para llegar al cloroplasto. Una parte de estas vías de difusión son iguales, aunque en sentido contrario, que para las moléculas de vapor de agua, concretamente desde la capa limitante hasta la pared de la célula del mesófilo, pero es que además el  $\text{CO}_2$  tiene que atravesar esa pared, la membrana plasmática, parte del citoplasma, las membranas que rodean al cloroplasto y algo del estroma cloroplástico.

Esquemáticamente podemos representar estas vías con las resistencias que tiene que vencer el  $\text{CO}_2$  según difunde desde el aire turbulento que rodea a la hoja hasta el lugar de fijación dentro del cloroplasto (Fig. 9.5), donde

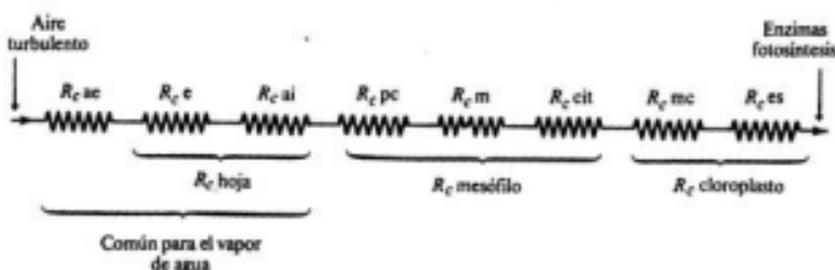


Figura 9.5

$R_{c,ae}$  es la resistencia que ofrece la capa de aire limitante,  $R_{c,e}$  es la resistencia que ofrece el poro estomático,  $R_{c,ai}$  representa la resistencia de los espacios aéreos del mesófilo,  $R_{c,pc}$  es la resistencia que ofrece la pared celular,  $R_{c,m}$  es la resistencia de la membrana celular,  $R_{c,cit}$  es la resistencia del citoplasma,  $R_{c,mc}$  es la resistencia de la membrana cloroplástica y  $R_c$  es la resistencia que ofrece el estroma cloroplástico.

Podemos agrupar esta serie de resistencias en tres grupos: resistencia de la hoja ( $R_{c,hoja}$ ), resistencia del mesófilo ( $R_{c,mesófilo}$ ) y resistencia del cloroplasto ( $R_{c,cloroplasto}$ ), indicando cada una de ellas las resistencias parciales que se indican en el esquema de resistencias.

### 9.5.1. Resistencia de la hoja

Debemos aclarar que las tres primeras resistencias que encuentra el  $CO_2$  al entrar en la hoja a través del estoma son análogas a las consideradas en el caso de la transpiración, por lo que podemos sustituir en la ecuación (5.15) los subíndices y tenemos la expresión

$$R_{c,ae} + R_{c,hoja} = R_{c,ae} + R_{c,e} + R_{c,ai}$$

Bien entendido que en este caso consideramos que la difusión de  $CO_2$  a través de la cutícula es despreciable.

Por otra parte, según (5.18) y (5.21) y extendiendo la analogía al espacio aéreo interno, podemos escribir:

$$R_{c,ae} = \frac{\delta_{ae}}{D_c}; R_{c,e} = \frac{d_{st} + r_{st}}{D_c n \pi r^2}; R_{c,ai} = \frac{\delta_{ai}}{D_c}$$

De aquí la resistencia total es

$$R_{c, total} = \frac{1}{D_c} \left( \delta_{ae} + \frac{d_{st} + r_{st}}{n \pi r^2} + \delta_{ai} \right)$$

Salvo los coeficientes, esta expresión es análoga a la que representa la resistencia que encuentra el vapor de agua al salir de la hoja.

La resistencia de la hoja ( $R_{c,hoja}$ ) que se mide para una planta mesófito, es de 2 a 15 seg/cm cuando los estomas están completamente abiertos. Para hojas de plantas xerófitas varía entre 7 y 30 seg/cm, igualmente cuando los estomas están abiertos.

Naturalmente, aún quedan por considerar otras resistencias hasta que el  $CO_2$  llegue a su punto de utilización. Al igual que cuando considerábamos las resistencias estomáticas introducíamos un factor de corrección ( $n\pi r^2$ ) en función del área de estomas en relación al área total de la hoja. También debemos considerar ahora, que el área de las células del mesófilo a través de las cuales puede difundir el  $CO_2$ , es mucho mayor que el área de la hoja y, por tanto, habrá que introducir un factor de corrección que será  $S_{mes}/S$ , donde  $S_{mes}$  representa el área de células del mesófilo y  $S$  la superficie foliar. En la figura 5.3 puede apreciarse perfectamente esta diferencia entre ambas superficies. El mesófilo en empalizada tiene de un 10 a un 40 por 100 de su volumen de aire, mientras que el tejido lagunar tiene de un 50 a un 80 por 100.

### 9.5.2. Resistencia del mesófilo

Al considerar las resistencias que aún tiene que vencer el  $\text{CO}_2$  a su paso hasta llegar al interior del cloroplasto, consideramos que tanto la pared celular, como el plasmalema y el citoplasma de la célula mesofílica se sitúan formando capas paralelas una sobre otra, de tal forma que el coeficiente de corrección  $S_{mes}/S$  habrá que aplicarlo a las distintas resistencias. Pero además se considera que los cloroplastos se sitúan, en general, ocupando una sola capa alrededor de la periferia del citoplasma, por lo que también a lo que difunde hacia los cloroplastos habrá que aplicarle el mismo término de corrección. Así, la resistencia de cualquiera de los componentes que quedan ( $R_c^i$ ) se verá reducida del valor teórico  $1/P_c^i$ , donde  $P_c^i$  es el valor de la permeabilidad en cualquiera de las barreras, por el valor recíproco del factor de corrección  $S_{mes}/S$ .

$$R_c^i = \frac{S/S_{mes}}{P_c^i} = \frac{S \cdot \Delta x}{S_{mes} \cdot D_c \cdot K_c} \quad (9.3)$$

Esta expresión se deduce de la definición de coeficiente de permeabilidad ( $P = D_c K_c \Delta x$ ), donde  $\Delta x$  es el espesor de la barrera,  $D_c$  es el coeficiente de difusión del  $\text{CO}_2$  en ella y  $K_c$  un coeficiente de partición.

Si aplicamos la ecuación 9.3 a la pared celular, nos encontramos que para una pared celular de  $1\mu\text{m}$ , el coeficiente de difusión con las correcciones debidas a la tortuosidad de los canalillos intrafibrilares será  $D_c = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$  y el valor de la constante  $K_c$  será 1,0. Si el valor de  $S_{mes}/S$  es 20, que será un valor medio para mesofitas, el valor que toma la ecuación 9.3 será

$$R_c = (1/20)(1,0 \times 10^{-4} \text{ cm})/(5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg})(1,0) = 1 \text{ seg/cm}$$

Esto indica que la pared celular ofrece muy baja resistencia a la difusión de  $\text{CO}_2$ .

Igual consideración podemos aplicar a la resistencia debida a la membrana plasmática, si consideramos que la permeabilidad de la membrana plasmática se le puede dar un valor de  $P_c$  de  $10^{-2} \text{ cm/seg}$ . Al aplicar la ecuación 9.3, tenemos

$$R_c = (1/20)(10^{-2} \text{ cm/seg})$$

o sea,  $5 \text{ seg/cm}$ , que es una resistencia moderada y sugiere que la difusión es un mecanismo apto para suministrar sustrato a la fotosíntesis a través de la membrana plasmática. Esto no es óbice para que además puedan existir mecanismos de transporte activo o de difusión facilitada con lo que se obtendría una reducción de la resistencia.

En el citoplasma la resistencia a la difusión es pequeña, ya que el camino a recorrer es muy corto, pues el cloroplasto está orientado muy próximo a la membrana plasmática y viene a ser del orden de  $0,2\mu\text{m}$ . En este caso, el coeficiente de difusión  $D_c$  es algo mayor que en agua debido a la naturaleza proteica que posee el citoplasma, y será del orden de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{seg}$  a  $20^\circ \text{ C}$  y el valor de  $K_c$  consideraremos que es de 1,0. Si aplicamos estos valores a 9.3 tenemos:

$$R_c = (1/20)(0,2 \times 10^{-4} \text{ cm})/(1,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{seg})(1,0) = 0,1 \text{ seg/cm}$$

un valor muy pequeño de resistencia a la difusión del  $\text{CO}_2$ , lo que nos habla en pro de la conveniencia de que los cloroplastos se orienten en la periferia del mesófilo, ya que la resistencia a la difusión del  $\text{CO}_2$  en el citoplasma es en estas circunstancias muy baja.

La suma de estas tres resistencias, situadas en serie, nos dará la resistencia del mesófilo ( $R_{c,\text{mes}} = R_{c,\text{pc}} + R_{c,\text{m}} + R_{c,\text{cit}}$ ) y sumando los valores calculados (1seg/cm + 5seg/cm + 0,1seg/cm) obtenemos un valor total de 6,1seg/cm. Los valores que se calculan de forma más bien indirecta para  $R_{c,\text{mes}}$  oscilan entre 2 y 8 seg/cm, por lo que vemos que el valor obtenido en función de la difusión de  $\text{CO}_2$  a través de cada una de las barreras está bastante de acuerdo con los valores medidos.

### 9.5.3. Resistencia del cloroplasto

Las dos últimas barreras estructurales que hemos citado son debidas al cloroplasto. Se han calculado las resistencias de ambas a la difusión y la suma puede estar en valores del orden de 4 a 5 seg/cm. Al igual que en el caso de la membrana plasmática, no cabe descartar aquí la existencia de un transporte activo o de una difusión facilitada con lo que  $R_{c,\text{cloroplasto}}$  sería menor, pero de todas formas los valores obtenidos son compatibles con la difusión de  $\text{CO}_2$  a través de las membranas limitantes del cloroplasto.

## 9.6. Flujo total de $\text{CO}_2$ en el cloroplasto

En una hoja siempre tenemos dos flujos de  $\text{CO}_2$ , uno el que procedente del aire va a ser fijado en la fotosíntesis y otro del  $\text{CO}_2$  producido como consecuencia de la respiración (5 por 100 del fijado en la fotosíntesis) y el procedente de la fotorrespiración (30 por 100 del  $\text{CO}_2$  fijado en la fotosíntesis). Este segundo tenderá a salir hacia el exterior, pero puede ser fijado también en los cloroplastos y de hecho es lo que sucede. La resistencia o resistencias que este  $\text{CO}_2$  encuentra en su camino desde el lugar de producción hasta el cloroplasto, lo representaremos por  $R_f$ .

El flujo neto de  $\text{CO}_2$  ( $\phi$ ) será igual al flujo de  $\text{CO}_2$  que interviene en la fotosíntesis procedente del exterior ( $\phi_{c,e}$ ) menos el flujo de  $\text{CO}_2$  que procede de la respiración y fotorrespiración ( $\phi_{c,i}$ ).

Pueden compararse los flujos de  $\text{CO}_2$  y las resistencias que encuentran a su paso con un circuito eléctrico como el de la figura 9.6. La batería  $E$  representa la diferencia en concentración de  $\text{CO}_2$  entre el aire turbulento del exterior de la hoja y la que exista en las enzimas fotosintéticas  $E = (C_{c,\text{at}} - C_{c,\text{clor}}) = \Delta C_c$ , es la fuerza motora del anhídrido carbónico y produce una corriente que es  $\phi_{c,e}$ , mientras que la diferencia de concentraciones entre lo que se produce por respiración y fotorrespiración y la que hay en los enzimas fotosintéticos ( $e$ ) produce una corriente  $\phi_{c,i}$ .

La corriente  $\phi_{c,e}$  cruza la resistencia  $R_{c,ae}$ ,  $R_{c,\text{hoja}}$  y  $R_{c,\text{mes}}$  antes de unirse a la corriente  $\phi_{c,i}$ , mientras que ésta cruza  $R_{c,\text{int}}$ . Ambas corrientes o flujos de  $\text{CO}_2$  pueden utilizarse para fotosíntesis en el cloroplasto.

Analizando el circuito y aplicando la ley de Ohm ( $E = IR$ ) y la segunda ley de

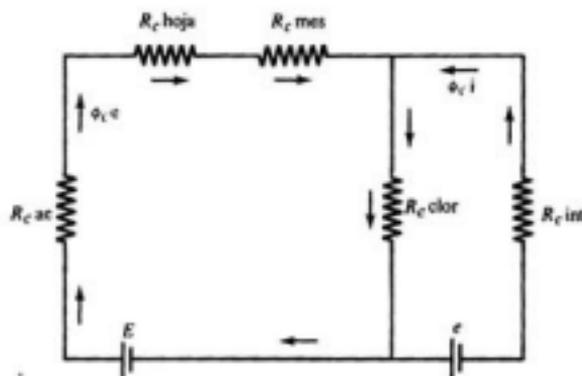


Figura 9.6

Kirchhoff, que dice que el cambio total de potencial eléctrico alrededor de un circuito cerrado es cero, y considerando primero la parte izquierda del circuito tenemos:

$$\Delta C_c - \phi_c e (R_{c ae} + R_{c hoja} + R_{c mes}) - (\phi_c e + \phi_c i) R_{c clor} = 0$$

observando el circuito desde  $E$  y dividiendo toda esta expresión por  $\phi_c e$ , obtendremos el valor de la resistencia total del circuito

$$R_{c tot} = \frac{E}{\phi_c e} = \frac{\Delta C_c}{\phi_c e} = R_{c ae} + R_{c hoja} + R_{c mes} + \frac{\phi_c e + \phi_c i}{\phi_c e} \times R_{c clor} \quad (9.4)$$

Vemos que  $R_{c tot}$  aumenta al aumentar  $\phi_c i$ ; si aumenta la fotorrespiración o la respiración y  $\Delta C_c$  es constante, entonces debe disminuir  $\phi_c$  si todo lo demás permanece constante.

En el esquema eléctrico propuesto, el flujo de  $\text{CO}_2$  fotosintético vendría dado por  $\phi_c$  que sería la tasa de fotosíntesis aparente. Como conocemos la resistencia total que viene dada por 9.4 podemos calcular el flujo

$$\phi_c = \frac{\Delta C_c}{R_{c tot}} = \frac{C_{c at} - C_{c clor}}{R_{c ae} + R_{c hoja} + R_{c mes} + \frac{R_{c clor}}{1 - \phi_c i / \phi_c e}} \quad (9.5)$$

Considerando la concentración de  $\text{CO}_2$  en el aire turbulento de 300 ppm, o sea, 13 nM de  $\text{CO}_2/\text{cm}^3$  a  $20^\circ\text{C}$  y 1 at de presión, la concentración del  $\text{CO}_2$  en el cloroplasto variará con las especies, en general para plantas que fotorrespiran será de 3 nM de  $\text{CO}_2/\text{cm}^3$ , y para plantas que no fotorrespiran puede considerarse prácticamente despreciable. Así, se obtienen valores de flujos para hojas de plantas leñosas de 0,5-0,7 nM/ $\text{cm}^2 \cdot \text{seg}$ , lo que indica una  $R_{c tot}$  de 20 seg/cm. A menor resistencia total mayor será el flujo, lo que indica que existe mayor tasa de fotosíntesis.

Cuando no hay fotorrespiración  $\phi_c$  tiende a ser mayor (9.5), en primer lugar por ser

menor  $\phi_c$ , y en segundo lugar porque  $C_c$  clor tiende a ser también menor, lo que aumenta  $\Delta C_c$ . Además estas plantas suelen presentar una relación  $S_{mes}/S$  por encima de 50, cuando lo normal en plantas que fotorrespiran es alrededor de 20-30, lo que hace que disminuya  $R_{c,mes}$  y  $R_{c,clor}$  que son inversamente proporcionales a  $S_{mes}/S$ . Se obtienen así valores de  $R_{c,tot}$  de 3 seg/cm y flujos del orden de 4 nM/cm<sup>2</sup> . seg.

### 9.7. Relación entre transpiración y fotosíntesis

El flujo de agua en una planta mesofítica típica es del orden de 0,4  $\mu$ M/cm<sup>2</sup> . seg. Por otra parte, el flujo de CO<sub>2</sub> es del orden de 1,2 nM/cm<sup>2</sup> . seg, es decir, que por cada molécula de CO<sub>2</sub> que se fija, salen de la hoja 300 moléculas de agua. En el caso de algunas plantas que no fotorrespiran, esta relación suele ser algo menor, del orden de 100 moléculas de H<sub>2</sub>O por cada molécula de CO<sub>2</sub>. Como podemos apreciar, la fijación del carbono supone para la planta el pagar un elevado tributo en forma de moléculas de agua, lo que en muchas zonas del globo es un peligro potencial para las plantas. Sin embargo, hay especies que han evolucionado hasta conseguir mecanismos de fijación del CO<sub>2</sub> (plantas crasuláceas) sin que la pérdida de agua sea tan elevada.

### 9.8. Existencia de dos reacciones fotosintéticas

En el año 1905 Blackman realizó una serie de experimentos en que midió la velocidad de fotosíntesis en función de la intensidad luminosa o de la concentración de anhídrido carbónico, observando que en los dos casos se pasaba de una relación de proporcionalidad cuando la intensidad luminosa era débil o la concentración de anhídrido carbónico era baja a una relación en que los valores obtenidos eran independientes de las variables estudiadas (Fig. 9.7).

De esto dedujo Blackman que la fotosíntesis consta de una reacción fotoquímica, seguida de una reacción oscura. Cuando se opera a bajas intensidades luminosas, la tasa de la reacción viene determinada por la velocidad del proceso fotoquímico, mientras que cuando la intensidad luminosa era elevada, la velocidad de la reacción parecía estar determinada exclusivamente por la reacción oscura o enzimática.

Podemos escribir, entonces, de acuerdo con la ecuación de Michaelis:



donde  $S$  es el sustrato,  $E$  el enzima,  $SE$  un complejo de asociación de moléculas de  $S$  y  $E$ , y  $P$  el producto de la reacción.

Una vez formado el complejo  $SE$ , mediante un proceso que es reversible, hay una transformación de  $S$  en el producto  $P$ , que se separa del enzima  $E$ . Según esto, la reacción fotoquímica sería la encargada de suministrar el sustrato  $S$  que se utilizaría en la reacción enzimática. Esta segunda transformación requiere un cierto tiempo  $t_n$ , a partir del cual puede calcularse la constante de reacción  $K_r = 1/t_n$ , que es el número de moléculas de sustrato que una molécula de enzima puede transformar en un segundo.

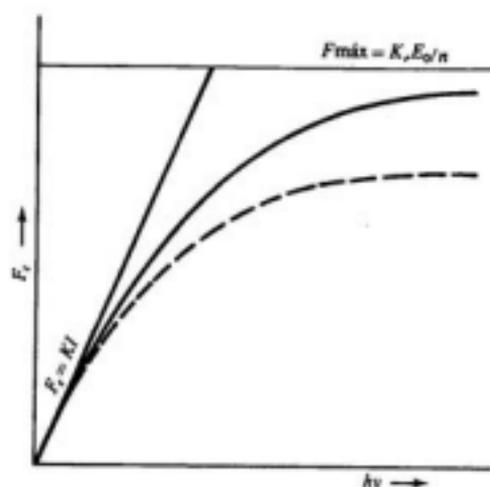


Figura 9.7.—Relación entre tasa de la fotosíntesis e intensidad luminosa. La línea de trazos corresponde a menor temperatura.

La reacción luminosa determina una intensidad fotosintética  $F_t = K_i I$ , en que  $K_i$  es una constante de proporcionalidad. Por otra parte, la reacción oscura enzimática determina una intensidad fotosintética  $F_{t,máx} = K_r(E_0)/n$  (Fig. 9.8), en que  $(E_0)$  es la concentración total de moléculas de enzima y  $n$  es el número de cuantos, cuyo significado se explica más adelante.

La teoría de que el mecanismo de la fotosíntesis consta de dos etapas explica satisfactoriamente la saturación por la luz. Pero también sirve para explicar la influencia de la temperatura y de algunos venenos metabólicos sobre la tasa de fotosíntesis. Al disminuir la temperatura o añadir ciertos venenos, la absorción de energía no se ve afectada ni tampoco el suministro del sustrato  $S$ ; por tanto, en la etapa limitada por la luz ninguno de estos factores influye sobre la fotosíntesis; sin embargo, sí influyen sobre el proceso oscuro o enzimático. Al disminuir la temperatura el techo disminuye, pues las reacciones enzimáticas funcionan peor a temperaturas bajas, los venenos metabólicos disminuirán el techo al rebajar el número de moléculas de enzima utilizables.

Sin embargo, la situación no es tan simple como aquí se expone, pues la etapa enzimática no es única y son varias las reacciones catalizadas por enzimas, como se verá en capítulos posteriores.

Si como se deduce de la interpretación de los experimentos de Blackman, la fotosíntesis es la resultante de un proceso luminoso instantáneo y otro proceso oscuro o enzimático que requiere un cierto tiempo para completarse, las dos reacciones podrán separarse mediante el empleo de destellos luminosos. Este experimento fue realizado por Emerson y Arnold en 1932, quienes expusieron una suspensión de al-

gas *Chlorella* a destellos de  $10^{-3}$  seg midiendo la producción de oxígeno en función de la energía del destello y de la duración de los intervalos de oscuridad. Observaron que la producción de oxígeno por destello aumentaba de forma proporcional al aumentar la energía de los mismos; hasta que se alcanzaba un techo, el comportamiento era análogo al que tenía lugar en luz continua (Fig. 9.8).

Si se mide la producción de  $O_2$  en este experimento en función del intervalo oscuro entre destellos, se observa que aumenta a medida que se incrementa la duración del período oscuro hasta que éste alcanza un valor de 0,1 seg; en intervalos superiores la curva alcanza saturación. Esto es una indicación de que este tiempo de 0,1 seg es el que necesita la reacción enzimática para consumir todo el sustrato producido en la fase luminosa, aunque el tiempo medio para transformar una molécula de sustrato es menor de 0,02 seg a temperatura ambiente.

Las variaciones de temperatura y los venenos no afectan para nada el rendimiento máximo por destello, pero sí el intervalo oscuro entre destellos necesario para obtener ese máximo; al igual que sucedía en los experimentos con luz continua, queda perfectamente demostrada la hipótesis de Blackman que postula la existencia de dos tipos de reacciones.

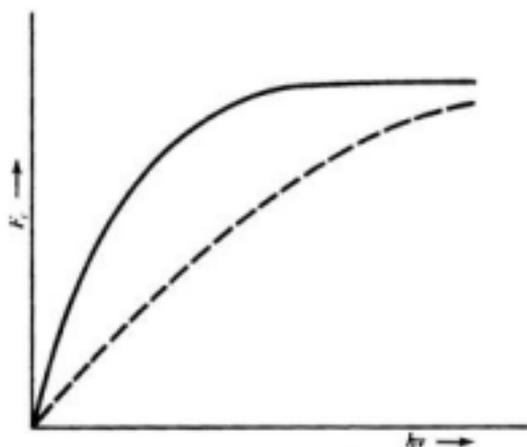


Figura 9.8.—Relación entre fotosíntesis y la energía de los destellos. La línea de trazos corresponde a destellos más frecuentes.

### 9.9. Punto de compensación

Cuando la resistencia al flujo de  $CO_2$  hacia el interior del cloroplasto ( $R_c$ , tot) aumenta mucho, la expresión  $C_a a / R_c$ , tot se hace cero y entonces  $\phi_c e = \phi_c i$ , es decir, el flujo de  $CO_2$  producido en la respiración y fotorrespiración, es compensado exactamente por el

consumo de  $\text{CO}_2$  fotosintético. El aumento de la resistencia puede ser originado porque el gradiente de  $C_e - C_c$  se hace muy pequeño al disminuir  $C_c$ . Cuando esto ocurre, el valor que alcanza  $C_e$  es denominado punto de compensación para el  $\text{CO}_2$ . En plantas que fotorrespiran, el punto de compensación es más alto que en plantas que no fotorrespiran. En plantas que no fotorrespiran el punto de compensación está entre 5-10 ppm de  $\text{CO}_2$  en el aire turbulento que rodea a la hoja. En plantas que sí fotorrespiran, oscila entre 40-100 ppm de  $\text{CO}_2$ .

El mismo concepto puede aplicarse a la luz. Si disminuimos la cantidad de energía luminosa que incide sobre la hoja, llegaremos a un valor en que no hay fotosíntesis neta; esta intensidad luminosa en que no hay flujo aparente de  $\text{CO}_2$ , se denomina punto de compensación para la luz de la fotosíntesis. A diferencia del punto de compensación para el  $\text{CO}_2$ , en este caso los valores que se obtienen son análogos para plantas que fotorrespiran como para las que no fotorrespiran. Esto es debido a que la fotorrespiración y la respiración se ven afectadas por igual al disminuir la luz. En plantas que fotorrespiran a  $20^\circ\text{C}$  y 300 ppm oscila entre 300-500 lux y para las que no fotorrespiran, varía de 200-400 lux.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- HEATH, O. V. S.: *The Physiological Aspects of Photosynthesis*, Heinemann Educational Books Ltd., Londres, 1969.
- KAMEN, M. D.: *Primary Processes in Photosynthesis*, Academic Press, Nueva York, 1963.
- NOBEL, P. S.: *Introduction to Biophysical Plant Physiology*, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1974.
- RABINOWITCH, E. Govindjee: *Photosynthesis*, John Wiley and Sons Ltd., Nueva York, 1969.
- WHITTINGHAM, C. P.: *El mecanismo de la fotosíntesis*, H. Blume Ediciones, Madrid, 1976.

## CLOROPLASTOS

Los cloroplastos son unos orgánulos subcelulares presentes en la mayor parte de las células de las estructuras fotosintéticas de las plantas. Su tamaño, en general grande (5 a  $10\mu\text{m}$  de diámetro), y su color característicamente verde, permiten distinguirlos fácilmente dentro de la célula con el microscopio óptico. Sin embargo, la observación de sus detalles estructurales requiere el uso del microscopio electrónico. Su número por célula varía desde sólo uno en algunas algas, a varias decenas en muchas plantas superiores. Típicamente, una Angiosperma puede contener entre 15 y 20 cloroplastos por célula fotosintética, aunque en casos pueden llegar a tener varios centenares de cloroplastos por célula. De su importancia puede ser un dato significativo el hecho de que sus proteínas componentes constituyen más del 50 por 100 de las del total de las hojas.

Ya a finales del siglo XIX parecía claro que el proceso fotosintético tiene lugar en los cloroplastos, y así Engelmann pudo demostrar en 1894 que la producción fotosintética de oxígeno y almidón en el alga verde *Spirogyra*, sólo tiene lugar si se ilumina su gran cloroplasto.

Los cloroplastos difieren bastante en forma y tamaño de unas plantas a otras, y son característicos exclusivamente de organismos encarióticos fotosintéticos. Los organismos procarióticos fotosintéticos, algas verde-azules y bacterias fotosintéticas, tienen otras estructuras netamente diferentes para realizar la fotosíntesis, aun a pesar de que las algas verde-azules son capaces de realizar una fotosíntesis, con desprendimiento de oxígeno desde el agua, semejante a la de las plantas superiores.

En cualquier caso, todo organismo capaz de realizar procesos fotosintéticos, contiene en sus células un sistema *laminar* de doble membrana. En el caso de organismos eucarióticos, esa estructura laminar está separada del citoplasma por una cubierta membranosa, formando lo que se llama un cloroplasto. En las bacterias fotosintéticas, la estructura laminar fotosintética no aparece separada del citoplasma, aunque en algunos casos parece agruparse formando estructuras discretas que reciben el nombre de *cromatóforos*. En el caso de las algas procarióticas o verde-azules, el sistema laminar surge de la membrana plasmática, como resultado de ramificaciones y plegamientos de ésta hacia el interior del citoplasma.

En este capítulo nos referiremos fundamentalmente a los cloroplastos y no a estructuras fotosintéticas de procarióticos.

Como veremos, en realidad los cloroplastos son una subclase de orgánulos subcelu-

lares llamados *plastos*, que bajo una cierta variedad de formas y funciones se encuentran en la mayor parte de las células de las plantas.

### 10.1. Estructura microscópica de los cloroplastos

Las figuras 10.1 y 10.2 muestran dos micrografías electrónicas de cloroplastos, donde se pueden apreciar una serie de estructuras laminares rodeadas de una matriz, y todo ello contenido en una doble membrana que constituye la envoltura del cloroplasto.

Característicamente, en cloroplastos de plantas superiores las estructuras laminares o *lamelas* se disponen de forma aproximadamente paralela y extendidas en la dirección de las dimensiones máximas del cloroplasto. Éste, característicamente también en plantas superiores, suele tener forma de plato, con una cara cóncava o plana y otra convexa. La estructura en doble membrana de cada lamela, confiere a ésta una apariencia como si se tratara de una bolsa aplastada en la que se han dispuesto muy próximas, prácticamente paralelas, las dos caras de la bolsa. Estas bolsas o lamelas pueden tener dimensiones considerables, pero otras veces se presentan como bolsas pequeñas. Frecuentemente, ciertas regiones de lamelas grandes y conjuntos de lamelas pequeñas, se empaquetan paralelamente dando estructuras membranosas más compactas de 10 a 100 lamelas de grosor, que reciben el nombre de grana o granos.

Los grana tienen a veces apariencia cilíndrica y otras veces más irregular. Suelen quedar conectados unos con otros por las lamelas más grandes que forman parte de ellos. Su número por cloroplasto es variable de unas plantas a otras, variando además con las condiciones fisiológicas en una forma que veremos en capítulos posteriores, aunque un valor típico puede ser el de unos 50 granos por cloroplasto. Su tamaño, también variable, puede tener valores típicos de 0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$ . En la figura 10.3 se representa un esquema típico de lamelas en relación con los grana, visto en una disposición tridimensional. En la figura 10.4 se representa, también esquemáticamente, un corte hipotético de un grana con sus unidades membranosas constituyentes.

Las membranas de las lamelas, que reciben el nombre de *tilacoides*, parecen encerrar un pequeño volumen al que separan del resto del cloroplasto, es decir, de la matriz interior de éste que recibe también el nombre de *estroma*. Además, las lamelas pueden mostrar perforaciones que en las zonas que las rodean tienen pegadas o continuas las dos membranas, en otro caso paralelas, de las lamelas.

El sistema de lamelas no parece estar conectado al sistema de doble membrana que forma el límite del cloroplasto. Las membranas de éste, con un grosor de unos 60 Å, muestran al microscopio electrónico, como las de tilacoides, la típica estructura de dos capas de proteínas separadas por una bicapa lipídica.

Las membranas de las lamelas tienen un grosor de unos 70 Å y en cada pareja están separadas entre sí unos 100-500 Å.

Los pigmentos fotosintéticos se localizan en las membranas de tilacoides o lamelas. Por tanto, como se explicará más adelante, en estas membranas se realiza la absorción de la energía luminosa. También se localizan en los tilacoides los sistemas fotosintéticos transportadores de electrones y de formación de ATP. En el estroma se realizan, entre otros, los procesos de conversión del  $\text{CO}_2$  en carbohidratos, usando los coenzimas rege-



Figura 10.1.—Cloroplasto de Avena. (E) cubiertas. (F) lamelas. (G) grano de almidón. (S) granos (tomado de E. S. Gunning y M. W. Steer, *Ultrastructure and the Biology of Plant Cells*, Edward Arnold, Londres, 1975).



Figura 10.2.—Microfotografía electrónica de cloroplasto de espinaca. La barra corresponde a una longitud de  $1\ \mu\text{m}$  (tomado de J. Bonner y J. E. Varner, *Plant Biochemistry*, 3.<sup>a</sup> ed., Academic Press, Nueva York, 1976).

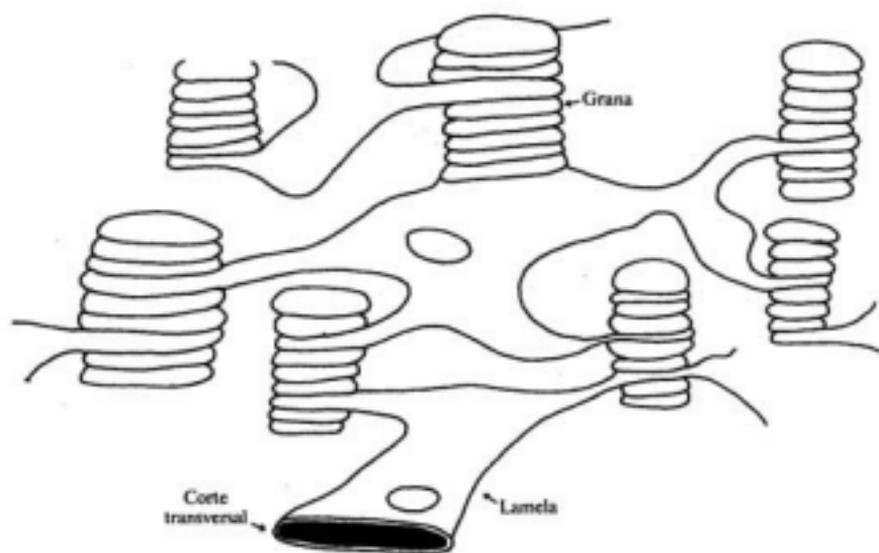


Figura 10.3.—Organización tridimensional de lamelas y grana.

nerados en la estructura membranosa. Por tratamientos adecuados, sonicación seguida de centrifugación diferencial, se pueden separar de cloroplastos aislados las lamelas y el estroma. En cada fracción aislada se pueden ensayar sus capacidades bioquímicas.

La envoltura del cloroplasto presenta propiedades de permeabilidad selectiva, probablemente localizadas a nivel de su membrana más interna.

La importancia de las membranas de tilacoides requiere un estudio más detallado de su estructura, que abordamos en un apartado siguiente.

Frecuentemente, los cloroplastos de muchas algas contienen un gránulo, a veces muy voluminoso, que recibe el nombre de *pirenoide*. La función de éste no está clara, algunos autores lo consideran como un depósito de material de reserva. En otros casos, el pirenoide se ha considerado como implicado en la formación del almidón.

Normalmente, los cloroplastos contienen granos de almidón que pueden llegar a ocupar una porción muy grande del volumen del cloroplasto.

## 10.2. Aislamiento y composición química de los cloroplastos

Un estudio detallado de la composición química y de las funciones de los cloroplastos requiere su aislamiento. La obtención de cloroplastos estructural y funcionalmente intactos y a la vez libres de contaminación por otros componentes celulares es una tarea difícil. La técnica a seguir en la preparación de los cloroplastos aislados depende de los componentes y funciones que se quieren estudiar en los cloroplastos, del

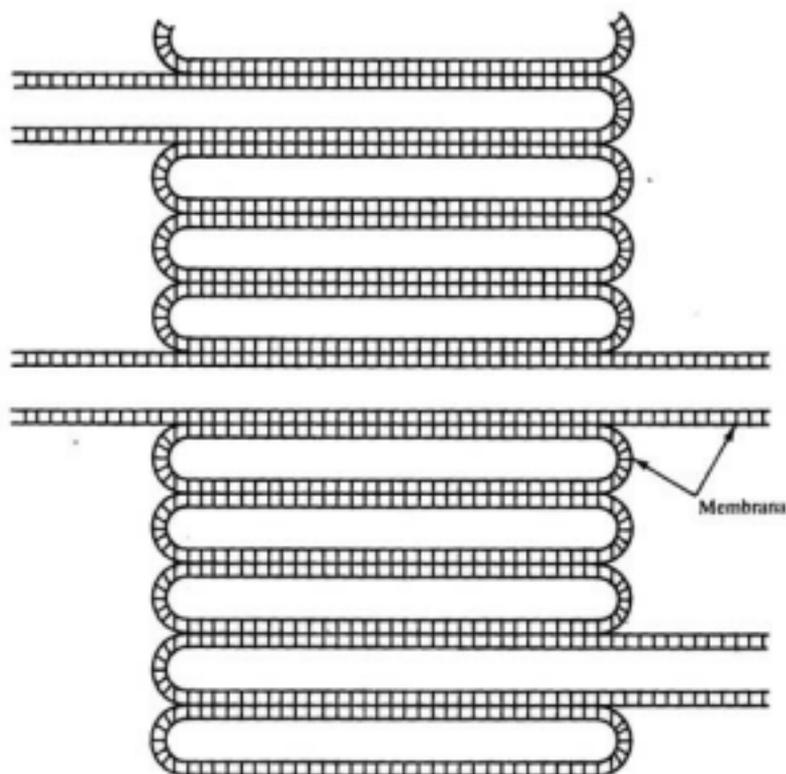


Figura 10.4.—Corte transversal de un grana. El grosor de las membranas está exagerado en comparación con el del grana.

material biológico de partida y del grado de pureza deseado. La preparación de extractos acelulares se suele realizar en un medio tamponado a pH entre 6,3 y 8,5, al que se añade un protector de grupos  $-SH$  (como mercaptoetanol, ditioneol, cisteína, etc.), una sal diluida de  $Mg^{+2}$  (aproximadamente 1 mM) y sacarosa o glucosa a una concentración entre 0,2 y 0,5 M para dar una disolución isotónica. El  $Mg^{+2}$  favorece la conservación de muchas funciones fotosintéticas durante el aislamiento de los cloroplastos. El protector de grupos  $-SH$  de proteínas, además, inhibe actividades fenolosas que de otra forma, con los fenoles que se liberan de la vacuola durante la rotura de las células, darían lugar a la formación de quinonas y taninos que inhiben muchas funciones de los cloroplastos. Otra forma de evitar los problemas derivados de la oxidación de los fenoles consiste en incluir en el medio de extracción el polímero polivinilpirrolidona que retiene a los taninos. Para lograr la máxima integridad de la envoltura de los cloroplastos, es preferible romper las células con breves tratamientos (3 a 5 s) con un homogeneizador con cuchillas. Usualmente, el extracto se

pasa por unas capas de gasa para separar restos celulares de tamaño grande (células sin romper, paredes, etc.).

Los cloroplastos se pueden aislar del medio de extracción por centrifugación fraccionada, precipitando usualmente después de centrifugar durante 1 a 10 min a  $1.000 \times g$ . Para una mayor purificación, se pueden realizar varios lavados o centrifugar en un gradiente de densidad (por ejemplo, con sacarosa). Los cloroplastos intactos suelen tener una densidad de 1,21 a 1,22  $g\ cm^{-3}$ .

Normalmente, con las técnicas descritas, se pierden muchos componentes de los cloroplastos de bajo peso molecular y solubles en agua. Si interesa conservar éstos, se recomienda homogeneizar con disolventes orgánicos (por ejemplo, mezclas de hexano y tetracloruro de carbono) después de liofilizar las hojas. Se pueden realizar posteriormente lavados o centrifugaciones en gradiente de densidad también con disolventes orgánicos. El uso de disolventes orgánicos en cambio suele provocar la pérdida de algunos componentes lipídicos.

De los cloroplastos aislados, entre un 20 y un 30 por 100 es materia seca, de la cual, aproximadamente, el 60 por 100 son proteínas, un 20 por 100 lípidos (4,3 clorofilas, 0,7 carotenoides y 15 por 100 lípidos incoloros), un 2 por 100 RNA y cantidades mucho menores de DNA. La masa seca incluye también iones inorgánicos, aminoácidos libres, hexosaminas, intermediarios fotosintéticos, etc. Existen también algunas evidencias de la presencia de compuestos fenólicos.

### 10.3. La envoltura de los cloroplastos

El sistema membranoso de la envoltura de los cloroplastos carece de clorofilas y, aunque contiene carotenoides (principalmente violaxantina), éstos no están implicados en el aprovechamiento fotosintético de la energía luminosa. Recientemente, gracias al uso de técnicas que han permitido obtener preparaciones bastante puras de las membranas de la envoltura de los cloroplastos, se ha logrado una mejor caracterización de su composición química y de sus funciones. En base a estos estudios, se acepta hoy día que, a diferencia de otros orgánulos subcelulares, el origen de la envoltura de los cloroplastos es independiente del retículo endoplásmico. Al igual que los tilacoides, la envoltura de los cloroplastos es rica en sulfolípidos y galactolípidos y, en cambio, casi no tiene fosfatidiletanolamina. Contiene quinonas y unas 75 proteínas diferentes con pesos moleculares de entre 20.000 y 140.000 daltons. Parece claro que la envoltura de los cloroplastos es el lugar de síntesis de componentes de membranas (en particular de tilacoides) como fosfolípidos, carotenos, etc., así como de otros compuestos como flavonoides, terpenos, quinonas, etc. Por su composición, las membranas de la envoltura de los cloroplastos son muy parecidas a las de las algas verde-azules, lo que sugiere una relación filogenética.

En relación con el papel de la envoltura en el metabolismo lipídico, es significativo señalar aquí que el interior de los cloroplastos (o de los plastos en general) es el lugar de síntesis de ácidos grasos en la célula vegetal.

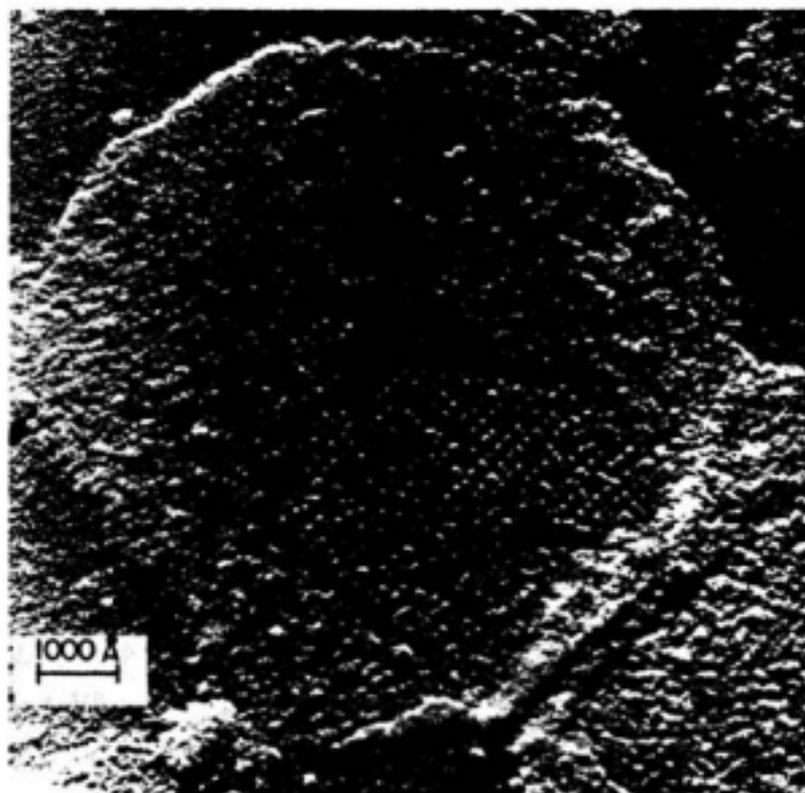


Figura 10.5.—Disposición ordenada de cuantosomas en una porción de tilacoide de cloroplasto de espinacas (tomado de J. Bonner y J. E. Varner, *Plant Biochemistry*, 3.<sup>a</sup> ed., Academic Press, Nueva York, 1976).

#### 10.4. Organización estructural de los tilacoides

Los tilacoides contienen poca fosfatidil-colina y carecen de fosfatidil-etanolamina, pero son ricos en sulfolípidos y galactolípidos. Estos últimos son lípidos sin carga eléctrica y con ácidos grasos muy insaturados que parecen conferir bastante fluidez a las membranas, facilitando así el desplazamiento de los transportadores de electrones.

Existen evidencias considerables de que los tilacoides que forman grana tienen composición y propiedades funcionales diferentes de los que no lo forman (estos últimos llamados tilacoides o lamelas del estroma). Aparte de diferencias cuantitativas y cualitativas en las proteínas y los lípidos componentes, la relación clorofila *a*/clorofila *b* es mucho mayor en tilacoides del estroma que en los de los grana. Este hecho y otros sobre los que no entramos en detalle, son indicativos de la existencia de diferentes siste-

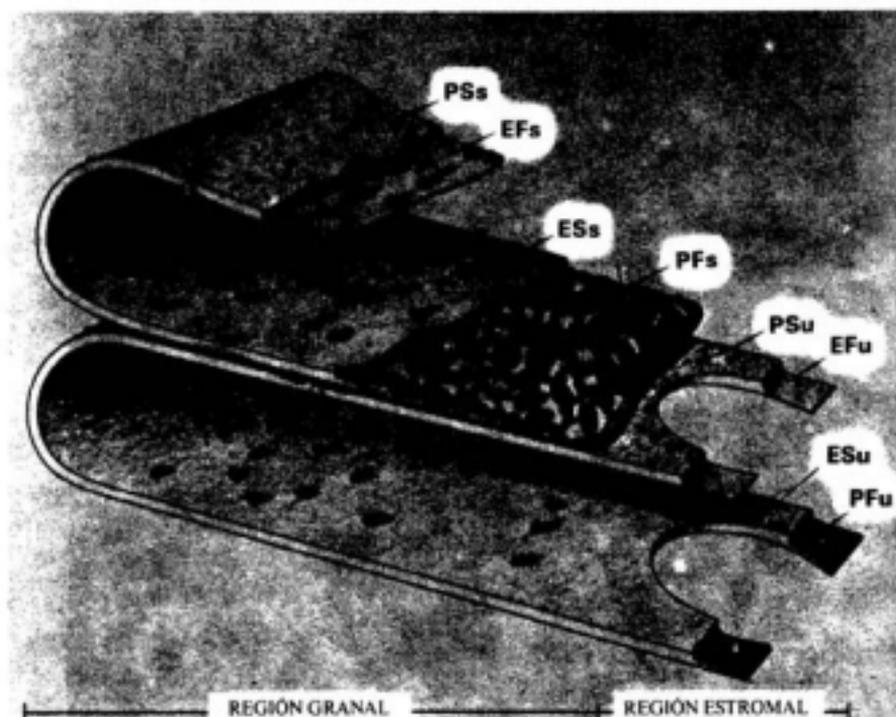


Figura 10.6.—Modelo estructural de tilacoides (tomado de H. Smith, *The Molecular Biology of Plant Cells*, Blackwell, Oxford, 1977).

mas transportadores de electrones en ambos tipos de tilacoides. Concretamente, mientras que en tilacoides del estroma sólo se encuentra el llamado fotosistema I, que estudiamos en las lecciones 12 y 13, en tilacoides de los grana se encuentran ambos fotosistemas, I y II. Más aún, según algunos autores, los tilacoides granales carecen de fotosistema I. Como veremos, esto da lugar a muy diferentes propiedades funcionales en ambos tipos de lamelas. Además, las lamelas del estroma contienen relativamente más factor de acoplamiento de la fotofosforilación (Cap. 13) y ribulosa difosfato carboxilasa (el enzima fijador del  $\text{CO}_2$  que se estudiará en el capítulo 14) que las lamelas de los grana. Es curioso que aunque, como ya hemos mencionado, el proceso de conversión de  $\text{CO}_2$  en carbohidratos tiene lugar en el estroma, el primer enzima del proceso se encuentra frecuentemente asociado a las lamelas, si bien por su cara externa (la que se orienta al estroma), y precisamente con más preferencia en las lamelas del estroma. El hecho de que también en lamelas del estroma se encuentre preferentemente el complejo proteínico factor en la fotofosforilación, tiene su explicación en la función principal de dichas lamelas, que es la de realizar la fotofosforilación cíclica, ya que ésta parece ser la única posibilidad funcional de un fotosistema I no asociado con fotosistema II.

Preparaciones adecuadas de lamelas granales de ciertos cloroplastos (Fig. 10.5),

muestran una estructura repetida de partículas de aproximadamente  $180 \times 160 \times 100 \text{ \AA}$  que aparecen empaquetadas en una estructura ordenada. Esta unidad estructural se puede observar, aunque en formaciones menos ordenadas, en otras preparaciones de lamelas granales. Se pensaba antes que estas partículas eran las estructuras mínimas capaces de realizar fotosíntesis (*cuantosoma*). Hoy se piensa que la situación no es tan simple. Estudios sobre la localización de diversas proteínas, en particular los transportadores de electrones y las proteínas implicadas en la fotofosforilación que veremos en el capítulo 12, y el examen por microscopía electrónica de preparaciones de criofractura, proporcionan nuevas ideas sobre la arquitectura de los tilacoides.

La técnica de criofractura permite apreciar una distribución asimétrica de partículas dentro de los tilacoides, así como diferencias ultraestructurales entre tilacoides de estroma y los de los grana. En esta técnica, el plano de fractura se realiza a lo largo de las regiones hidrofóbicas de los tilacoides y permite observar así sus distintas caras.

En la figura 10.6 se representa un modelo estructural de tilacoides, que se postula de las observaciones de microfotografías de preparaciones por criofractura de tilacoides. Hacia el interior de la membrana de tilacoides, se aprecia una mitad (PFs y PFu en la figura) con un gran número de subunidades pequeñas. Esta mitad, es la más próxima al estroma, o a las membranas de otros tilacoides en el caso de los tilacoides granales. La otra mitad interior de la membrana de tilacoides (EFs), contiene partículas grandes en el caso de tilacoides grandes, pero no en los estromales (EFu) y es la que queda más alejada del estroma o, en su caso, de tilacoides adyacentes y queda más próxima al interior de las bolsas encerradas por los tilacoides. Hacia el exterior de la membrana de tilacoides, y en la región orientada hacia el estroma, se aprecian unas partículas de tamaño mediano más abundantes en tilacoides no lavados y estromales (PSu) que en los granales (PSs). Estas partículas son probablemente de factor de acoplamiento y de ribulosa difosfato carboxilasa. Hacia la región externa y alejada del estroma de la membrana de tilacoides [la orientada hacia el interior de las bolsas (ESs)], se aprecia en tilacoides granales agrupaciones voluminosas probablemente de tipo cuantosoma.

### 10.5. Autonomía genética parcial de los cloroplastos

Los cloroplastos contienen DNA, RNA y toda la maquinaria necesaria para los procesos de replicación del DNA, transcripción y traducción. En el DNA de cloroplastos, se encuentran genes adicionales a los nucleares. La forma de heredarse los caracteres determinados por los genes de cloroplastos, es conocida desde hace tiempo, y no sigue las leyes mendelianas ya que al nuevo individuo, en la mayoría de las plantas, sólo son aportados por el óvulo. Es decir, sólo el óvulo aporta proplastos que darán cloroplastos en el nuevo individuo.

El DNA de cloroplastos de plantas superiores es circular, tiene la típica estructura en doble hélice, un alto peso molecular del orden de  $10^6$  daltons y una longitud de aproximadamente  $50 \mu\text{m}$ . Se estima que existen entre 10 y 30 moléculas idénticas de DNA por cloroplasto. A pesar de esta multiplicidad de copias, dentro de cada molécula individual de DNA de cloroplastos, no parecen abundar las secuencias repetidas tan frecuentes en el genoma nuclear. La proporción de bases guanina y citosina (G + C) es

menor (38 por 100) en el DNA de cloroplastos que en el DNA nuclear (62 por 100), por lo que la densidad del DNA de cloroplastos ( $1,697 \text{ g cm}^{-3}$ ) en un gradiente de CsCl es menor que la densidad del DNA nuclear ( $1,723 \text{ g cm}^{-3}$ ) y ambos se pueden separar por ultracentrifugación en un gradiente de CsCl. Parece que el DNA de cloroplastos se encuentra localizado en ciertas regiones (nucleoides) de los cloroplastos (aproximadamente 4 cromosomas por nucleoide) y con algún punto de unión a la envoltura de los cloroplastos. En general, el número de nucleoides por cloroplasto es tanto mayor cuanto más lo es el cloroplasto.

Se sabe que el DNA de cloroplastos codifica el rRNA de los ribosomas de cloroplastos, la mayor parte, si no todos, los tRNA de cloroplastos, quedándole capacidad para codificar entre 150 y 300 cadenas polipeptídicas diferentes, de tamaño medio ( $4 \times 10^4$  daltons). En realidad, son muchas menos las proteínas que se conocen con seguridad que estén codificadas por el DNA de cloroplastos. Más aún, se sabe que muchas proteínas de cloroplastos están codificadas en el genoma nuclear y no en el de cloroplastos.

Entre las proteínas de cloroplastos codificadas en el genoma de éste, se encuentran:

- a) Subunidad grande de la ribulosa difosfato-carboxilasa, enzima que ya hemos mencionado en el apartado anterior y que constituye la llamada fracción proteínica I (F1) de los cloroplastos. La proteína F1 constituye aproximadamente un 50 por 100 del total de proteínas solubles de la hoja, por lo que es, con mucho, la proteína más abundante de la naturaleza. Consta de dos tipos de cadenas polipeptídicas, la de mayor peso molecular ( $5,5 \times 10^4$  daltons) codificada en el genoma de cloroplastos y la de menor peso molecular ( $1,2 \times 10^4$  daltons) codificada en el genoma nuclear.
- b) Proteínas de complejos proteína-clorofila que se verán en capítulos posteriores.
- c) Algunas proteínas ribosomales.
- d) Nitrito reductasa.
- e) Proteína de 32.000 daltons asociada al fotosistema II y responsable de la sensibilidad a herbicidas derivados de la urea (tipo DCMU, véase apartado 12.5).
- f) Las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$  del factor de acoplamiento de la fotofosforilación (Cap. 13).

En la figura 10.7 se muestra un mapa del DNA de cloroplastos de espinacas, indicando las regiones invertidas repetidas, que incluyen los genes de los rRNA de cloroplastos, y la localización de los genes de: diversos tRNAs, subunidad grande de la ribulosa difosfato carboxilasa (rbcL), subunidades de la ATPasa (atpA, B y E) y proteína de 32.000 daltons asociada al fotosistema II (psb A). En la mayoría de las plantas, el mapa del DNA de cloroplastos es muy parecido al de espinacas. Muchas proteínas de cloroplastos tienen interés como objeto de manipulación en ingeniería genética por afectar al rendimiento fotosintético o por condicionar la sensibilidad a herbicidas.

Las proteínas que hemos mencionado como codificadas en el DNA de cloroplastos, son además sintetizadas en los ribosomas de cloroplastos. Estos últimos, tienen un coeficiente de sedimentación de alrededor de 70S y la síntesis de proteínas en ellos se inhibe

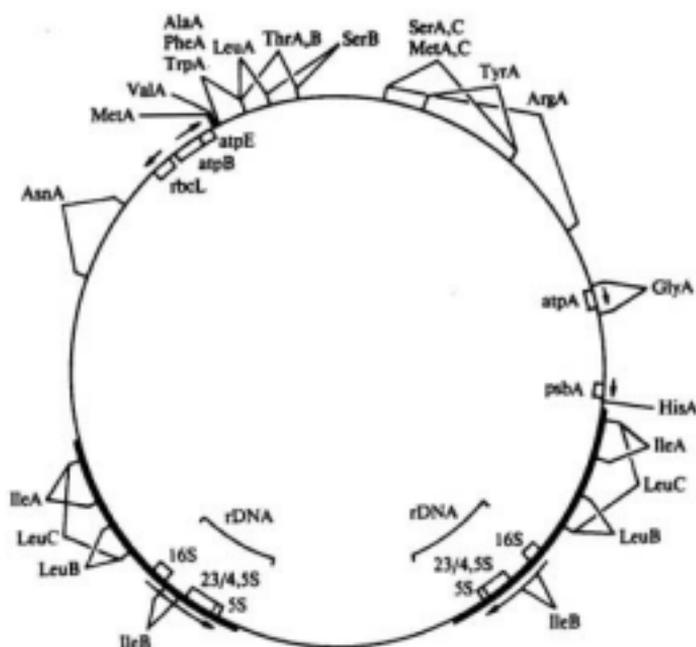


Figura 10.7.—Mapa del DNA de cloroplastos de espinacas. El trazado grueso corresponde a las regiones invertidas repetidas. Las flechas sobre los genes de los rRNA y proteínas corresponden a la dirección de lectura en transcripción.

por cloranfenicol. Estas características de los ribosomas de cloroplastos, los diferencian netamente de los ribosomas de citoplasma, que tienen un coeficiente de sedimentación de 80S y en los que la síntesis de proteínas se inhibe por cicloheximida.

De todas formas, aunque no hay aún evidencia positiva para algún caso concreto, no puede descartarse que la traducción de RNA, producto de algún gen nuclear, ocurra en cloroplastos y a la inversa con el de algún gen de cloroplastos.

La formación de los cloroplastos es, pues, un proceso en el que intervienen, de una forma acoplada, genes nucleares y genes de cloroplastos, aunque queda aún mucho por saber sobre la aportación concreta de cada genoma y la forma en que se establece la coordinación de la expresión de ambos genomas.

En este sentido, en los últimos años se ha estudiado mucho la coordinación de la síntesis de las dos cadenas polipeptídicas de la proteína F1. Es significativo el que en muchos complejos proteínicos de cloroplastos, unas cadenas polipeptídicas estén codificadas en cloroplastos y otras en el núcleo. Probablemente este hecho permite establecer una coordinación de la expresión genética del núcleo y de los cloroplastos. La subunidad pequeña de la proteína F1 es sintetizada en los ribosomas 80S de citoplasma, en forma de un precursor de alto peso molecular. Probablemen-

te la envoltura de los cloroplastos reconoce con una permeasa específica al tramo adicional de la cadena polipeptídica de la subunidad pequeña de la proteína F1, y la incorpora al interior de los cloroplastos. En este compartimento la subunidad pequeña, ya reducida a su tamaño definitivo, forma con la subunidad grande sintetizada en los ribosomas 70S de cloroplastos, el complejo fracción proteínica I (Figura 10.8).

Debido principalmente a esta autonomía genética parcial de los cloroplastos, y a la similitud de su aparato de síntesis de proteínas con el de bacterias, muchos autores han sugerido que el origen evolutivo de los cloroplastos resultó de una simbiosis intracelular entre un antepasado, probablemente semejante a las actuales algas verde-azules, y una célula no fotosintética. Se postula que en el curso de la evolución, el organismo fotosintético fue perdiendo algunos genes que se incorporaron al núcleo de la célula receptora. Es significativo evolutivamente el caso del diflagelado *Cyanophora paradoxa*, que presenta unas inclusiones fotosintéticas (cianelos) con características intermedias entre un cloroplasto y una cianobacteria. Así, el cianelo tiene una composición química más próxima a la de una cianobacteria y una delgada pared de peptidoglucano. En cambio, tiene un genoma ( $1,17 \times 10^6$  daltons) diez veces más pequeño que el de una cianobacteria y semejante al de un cloroplasto. Además, el cianelo no sobrevive aislado.

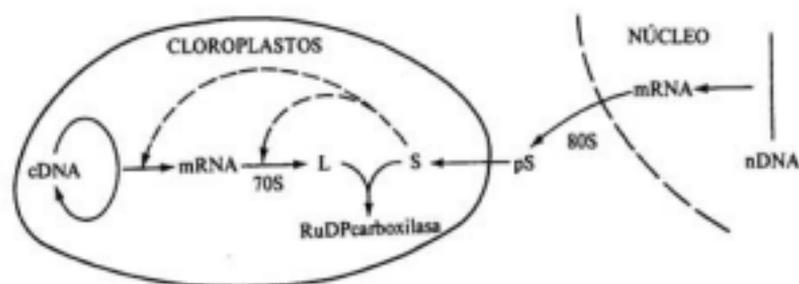


Figura 10.8.—Cooperación de los genomas de cloroplastos y del núcleo en la síntesis de la fracción proteínica I o ribulosa-difosfato carboxilasa (RuDPcarboxilasa). L es la subunidad grande, S es la subunidad pequeña y pS el polipéptido precursor de la subunidad pequeña. En flechas con trazo discontinuo se representan posibles vías de regulación.

### 10.6. Formación de los cloroplastos. Otros plastos

En el curso de la diferenciación, a partir de células meristemáticas, en ciertos tipos de células se forman cloroplastos que no se encuentran presentes en las células meristemáticas originales.

La primera etapa perceptible de la formación de los cloroplastos es la formación de

proplastos. Parece que en las células meristemáticas se encuentran unas estructuras precursoras de unos  $0,5\mu\text{m}$  de diámetro, con envoltura de doble membrana y el material genético que luego se encontrará en el cloroplasto adulto. Estas estructuras precursoras pueden replicarse y, en condiciones adecuadas, evolucionar a estructuras de proplastos.

En el curso normal de formación de cloroplastos en presencia de la luz, la membrana interna de la estructura precursora se invagina, formando prolongaciones paralelas a las superficies plano-convexas. Después, estas invaginaciones se aplastan, evolucionando hacia estructuras típicas de tilacoides (Fig. 10.9). Paralelamente, tiene lugar una activa síntesis de clorofila y proteínas.

En ausencia de luz, las invaginaciones, en lugar de evolucionar a estructura de tilacoides, forman unas estructuras tubulares (Fig. 10.9) que se funden en una red cúbica por cruces de tres tubos, formando lo que se llama *cuerpo prolamelar*. La red cúbica del cuerpo prolamelar la forman tubos de unos  $300\text{ \AA}$  de diámetro, rodeados de la matriz. En esta etapa, el orgánulo recibe el nombre de *etioplasto*. Si se ilumina el etioplasto, rápidamente tiene lugar una dispersión del cuerpo prolamelar, transformándose los tubos en tilacoides y el etioplasto en cloroplasto. En la figura 10.10 se muestran diversas etapas de la conversión de etioplasto en cloroplasto. En una primera etapa, al iluminar,

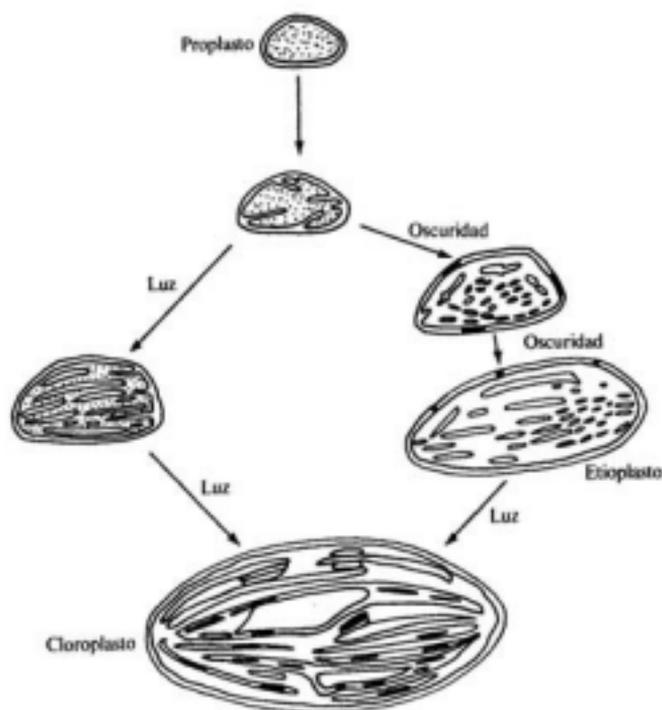


Figura 10.9.-Evolución desde proplasto hasta cloroplasto.

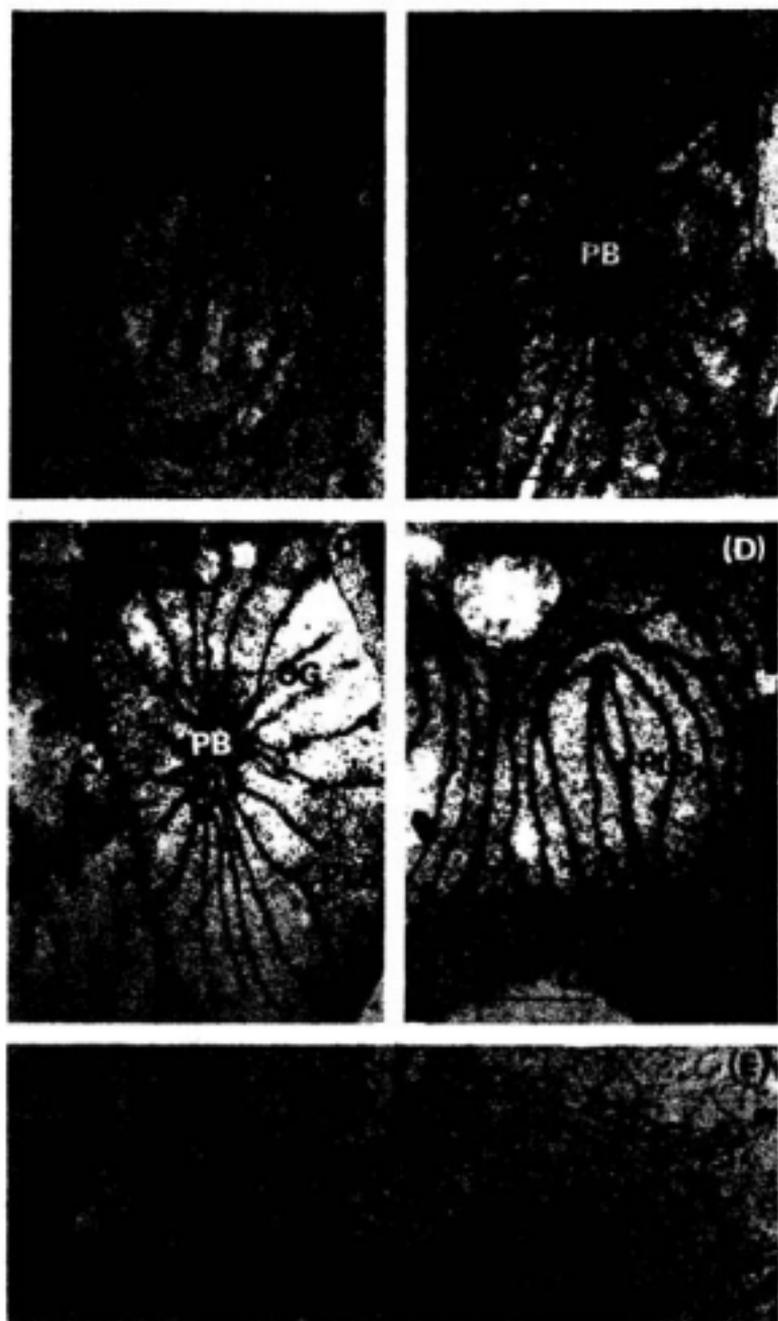


Figura 10.10.—Etapas sucesivas de conversión de etioplasto en cloroplasto (tomado de H. Smith, *The Molecular Biology of Plant Cells*, Blackwell, Oxford, 1977).

tiene lugar una conversión de protoclorofilida en clorofilida y después una síntesis masiva de clorofilida y finalmente clorofila. Junto a la incorporación de nuevos componentes al cloroplasto en formación, tiene lugar una aparición secuencial de las distintas actividades fotosintéticas.

La luz y las citoquininas (Cap. 24) controlan la formación de cloroplastos de otras diversas formas, que tendremos ocasión de ver en capítulos posteriores. Por una parte, afectan en las etapas de biosíntesis de clorofila y, además, algunos efectos de la luz están mediados por el pigmento fitocromo (Cap. 30).

Al igual que sus estructuras precursoras, los cloroplastos adultos pueden dividirse, y así se han observado cloroplastos en estado de división, tanto en algas como en plantas superiores. La división tiene lugar por estrangulamiento de su envoltura, previo reparto del material genético. Los cloroplastos resultantes de la división, pueden crecer por incorporación de nuevo material sintetizado en el citoplasma y en el mismo cloroplasto.

Como ya hemos mencionado al principio del capítulo, los cloroplastos son sólo un tipo de los diversos plastos. Los plastos son unas estructuras emparentadas entre sí, características de las plantas y que tienen una cubierta de doble membrana. Si los plastos contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, tenemos el tipo de plastos que llamamos *cloroplastos*. Si contienen pigmentos no fotosintéticos, son los llamados *cromoplastos*. Los pigmentos almacenados en cromoplastos son del tipo carotenoide, a diferencia de algunas vacuolas que almacenan pigmentos de tipo flavonoide. Un ejemplo de cromoplastos son los del pimiento rojo, en los que se pueden ver restos de tilacoides que han quedado en el proceso de su formación a partir de cloroplastos.

Los plastos no coloreados reciben el nombre de *leucoplastos*. Entre ellos, los *amiloplastos* sintetizan y almacenan grandes granos de almidón, a diferencia de los cloroplastos que tienen granos pequeños de almidón. En algunas plantas es frecuente encontrar estructuras intermedias entre cloroplastos y amiloplastos, como ocurre en las células de la vaina de plantas con fotosíntesis C-4 (Cap. 13). Otros tipos de leucoplastos son los *proteinoplastos* y los *elaioplastos* que acumulan respectivamente proteínas y grasas. Todos los tipos de plastos parecen relacionados, pudiendo ocurrir en muchos casos la transformación de un tipo en otro y, en cualquier caso, todos parecen directa o indirectamente derivados de proplastos.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BAKER, N. A., y BARBER, J. (eds.): *Chloroplast Biogenesis*, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- DOUCE, R., y JOYARD, J.: *Does the Plastid Envelope Derive from the Endoplasmic Reticulum?* «Trends in Biochemical Sciences», vol. 6, 1981, págs. 237-239.
- GOVINDIEE (ed.): *Photosynthesis*, vols. I y II, Academic Press, Londres, 1982.
- HATCH, M. D., y BOARDMAN, N. K. (eds.): *Photosynthesis*, The Biochemistry of Plants, vol. 8, Academic Press, Londres, 1981.
- KIRK, J. T. O., y TILNEY-BASSETT, R. A. E.: *The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 1974.

- KUNG, S. D.: *Expression of Chloroplast Genomes in Higher Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 28, 1977, págs. 401-437.
- PARK, R. B.: *The Chloroplast*, en *Plant Biochemistry*, 3.ª ed. (ed. por J. Bonner y J. E. Varner), Academic Press, Nueva York, 1976, págs. 115-145.
- SMITH, H. (ed.): *The Molecular Biology of Plant Cells*, Blackwell, Oxford, 1977.
- SMITH, S. M., y ELLIS, R. T.: *Processing of Small Subunit Precursors of Ribulose Bisphosphate Carboxylase and its Assembly into Whole Enzyme are Stromal Events*, «Natures», volumen 278, 1979, págs. 662-664.
- WHITFIELD, P. R., y BOTTOMLEY, W.: *Organization and Structure of Chloroplast Genes*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 34, 1983, págs. 279-310.

## PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Un principio básico de la fotoquímica y la fotobiología, es que cualquier efecto directo de la luz sobre el comportamiento de las moléculas, es debido a que éstas absorben la luz adecuada para provocar ese comportamiento. El comportamiento de las moléculas, cuando absorben la luz, puede afectar al estado de otras moléculas que no absorben esa luz. En estas últimas tendremos unos efectos indirectos de la luz, pero en cualquier caso siempre tiene que haber algunas moléculas iniciales receptoras del estímulo luminoso.

Si un compuesto absorbe luz de determinadas longitudes de onda, dentro de la zona del espectro electromagnético sensible al ojo humano, al iluminarlo con luz blanca solar, sólo percibimos de él aquella luz no absorbida, la cual dará un color característico a ese compuesto. Como sabemos, las estructuras fotosintéticas de plantas superiores son de color verde. Esto significa que esas estructuras contienen compuestos capaces, conjuntamente, de absorber luz de distintas zonas de espectro visible excepto del verde. Estos compuestos son los llamados pigmentos fotosintéticos cuya estructura, biosíntesis y organización en los cloroplastos abordamos en este capítulo.

### 11.1. Espectro de absorción de estructuras fotosintéticas y espectro de acción de la fotosíntesis

De acuerdo con los principios esbozados en la introducción, la eficacia relativa de las radiaciones de distintas longitudes de onda para producir fotosíntesis, lo que se llama espectro de acción de la fotosíntesis, debe guardar un estrecho paralelismo con la absorción relativa de la luz de distintas longitudes de onda por las estructuras fotosintéticas, que es lo que conocemos como su espectro de absorción.

Como se puede ver en la figura 11.1, existe, en efecto, una estrecha correlación entre el espectro de acción de la fotosíntesis y el espectro de absorción en el caso representado del alga verde *Uva taeniata*. Pero, además, ambos espectros son también semejantes a los de plantas superiores. Ambos espectros muestran máximos, aproximadamente a 440 nm en la región del azul, y 680 nm en la región del rojo, y baja eficacia de absorción y de fotosíntesis con luz de longitudes de onda entre 500 y 600 nm. Diferencias de cierta entidad entre ambos espectros, ocurren principalmente entre 450 y 500

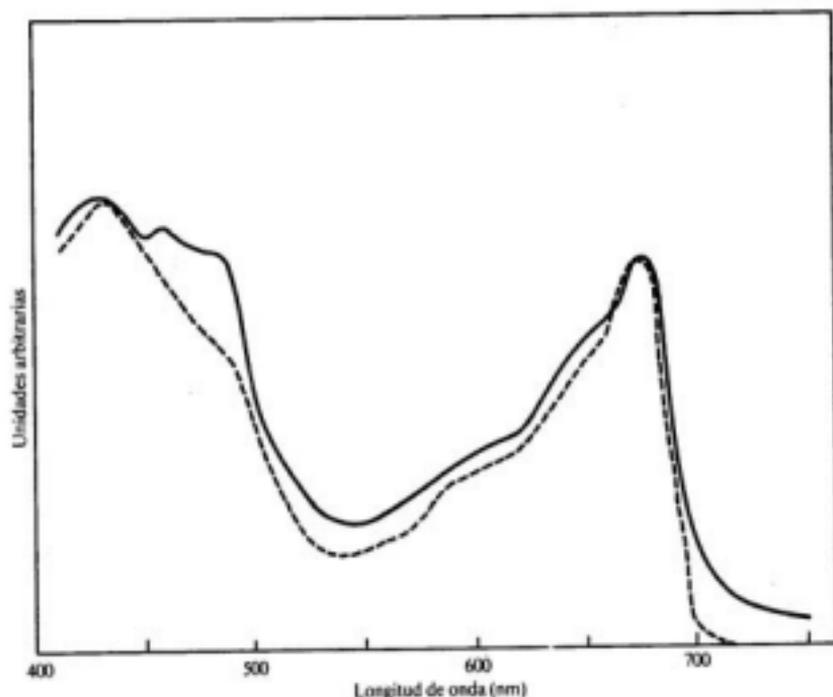


Figura 11.1.—Espectro de absorción (—) del alga verde *Uva taeniata*, y espectro de acción de su actividad fotosintética (· · · · ·).

nm y en las proximidades de los 700 nm, y serán objeto de comentario en este capítulo y en el siguiente.

El espectro de acción representado en la figura 11.1, se refiere, no a la proporción de energía, sino a la proporción de cuantos de luz de cada longitud de onda indicada que son utilizados en fotosíntesis. Esta es, para un cuanto, inversamente proporcional a la longitud de onda.

Los espectros de absorción de los pigmentos responsables de la fotosíntesis, no tienen por qué ser exactamente iguales cuando se ensayan en estado puro con los de los mismos pigmentos *in vivo*. En efecto, *in vivo* los pigmentos pueden estar asociados con otras estructuras que modifican ligeramente su espectro, en general ensanchando las bandas de los máximos e incluso, modificando ligeramente su posición. De todas formas los pigmentos aislados de estructuras fotosintéticas y que participan en la absorción fotosintética de luz, han de tener espectros cuya composición dé una curva muy semejante a la representada en la figura 11.1, pues la estrecha correspondencia entre los

espectros de acción y de absorción indica que la absorción de luz por compuestos que no utilizan dicha absorción en la fotosíntesis, ha de ser proporcionalmente muy pequeña.

Aun teniendo en cuenta la menor eficacia fotosintética de luz de longitudes de onda entre 500 y 600 nm, el espectro de absorción del aparato fotosintético de plantas superiores, y por tanto también su espectro de acción, muestran una notable adaptación a la luz solar incidente sobre la superficie de la tierra. En efecto, el 98 por 100 de la energía de la radiación solar está comprendida en ondas electromagnéticas de longitud entre 200 y 4.000 nm, pero debido a la absorción por la atmósfera, la mayor parte de la radiación que llega a la superficie terrestre queda entre 300 y 900 nm de longitud. Las plantas superiores aprovechan bien esta radiación entre 400 y 700 nm. Veremos cómo las bacterias fotosintéticas pueden aprovechar luz de mayores longitudes de onda, cubriendo en conjunto la adaptación fotosintética una fracción muy importante del total de radiación solar.

En la figura 11.2 se muestran los espectros de absorción de algunos importantes pigmentos fotosintéticos, una vez aislados.

## 11.2. Estructura y distribución de los pigmentos fotosintéticos

Todas las células fotosintéticas contienen al menos un tipo de clorofila. Además, la mayor parte de las células fotosintéticas tienen carotenoides y/o ficobilinas. Estas últi-

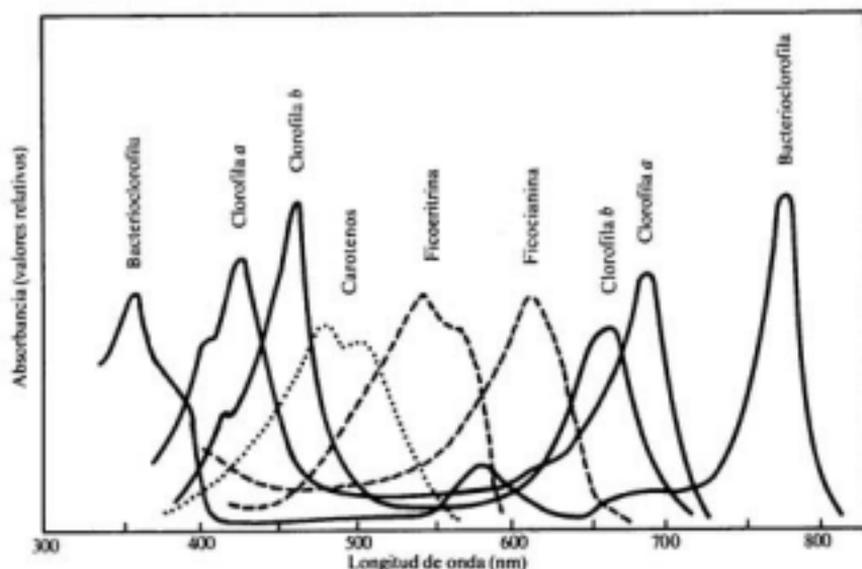


Figura 11.2.—Espectros de absorción de algunos pigmentos fotosintéticos.

mas pueden ser azules o rojas y los carotenoides fotosintéticos son amarillos. A los carotenoides y ficobilinas se les conoce como pigmentos accesorios.

En algunos organismos fotosintéticos, el color de estos pigmentos accesorios puede enmascarar al color verde de las clorofilas, dando otros colores característicos al organismo. Seguidamente vamos a considerar los distintos tipos de pigmentos.

### 11.2.1. Clorofilas

Las clorofilas son pigmentos fotosintéticos verdes que constan de cuatro anillos pirrólicos que forman un macrociclo con diversos sustituyentes laterales (Fig. 11.3). Los pirroles, a través de sus átomos de nitrógeno, forman en el centro de anillo un complejo con el catión  $Mg^{++}$  quedando una estructura casi plana. En el anillo IV, que en realidad es un pirrol reducido, y a través de un enlace éster con un resto de propiónico, se encuentra unido el fitol, que es un largo brazo hidrofóbico de naturaleza terpenoide con veinte átomos de carbono. Cuando por hidrólisis se separa el fitol, la estructura resultante recibe el nombre de clorofilida. Adicionalmente a los cuatro anillos pirrólicos, las clorofilas presentan un quinto anillo unido al anillo III. En la figura 11.3 se han representado las moléculas de clorofila *a* y clorofila *b* con la nomenclatura más usual para sus anillos y posiciones. Los electrones del sistema de dobles enlaces conjugados son los que absorben radiación del visible, excitándose a diversos niveles de energía que analizaremos más adelante.

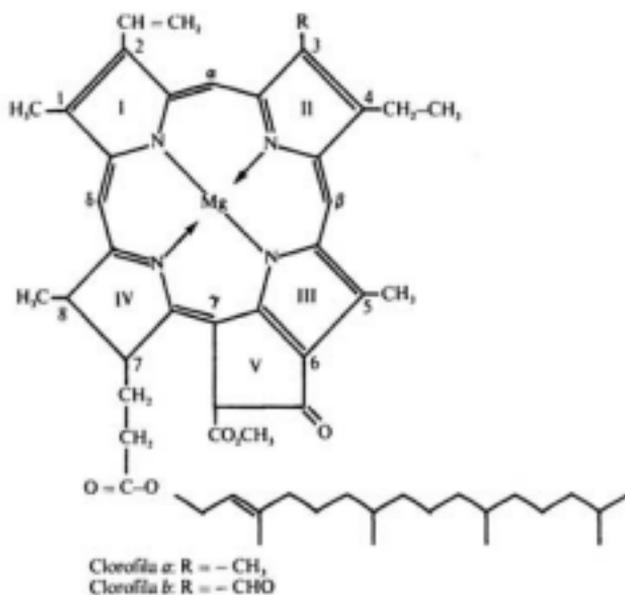


Figura 11.3.—Clorofilas *a* y *b*.

Las clorofilas se pueden extraer de estructuras fotosintéticas con alcohol o acetona y se pueden separar entre ellas, y de otros pigmentos, por cromatografía.

En la figura 11.2 se representan los espectros de absorción de las clorofilas *a* y *b* disueltas en éter. En estas condiciones, la clorofila *a* presenta máximos de absorción a 663 y 420 nm, y la clorofila *b* los tiene a 644 y 430 nm. Ninguna de ellas absorbe en el verde, lo que les da su color característico. Lo mismo que al variar el disolvente varían los máximos, éstos también cambian en células intactas y pueden mostrar en estas condiciones varios máximos. Más adelante, analizaremos la naturaleza de las distintas formas de clorofila *in vivo* que originan esos máximos.

Todos los organismos fotosintéticos que producen oxígeno a partir de agua durante la fotosíntesis (es decir, todos los organismos fotosintéticos excepto las bacterias fotosintéticas) contienen clorofila *a*. Ésta, junto con una cantidad menor (entre un tercio y la mitad) de clorofila *b*, constituyen las clorofilas de las plantas verdes y se encuentran localizadas en los tilacoides. En lugar de clorofila *b*, las algas pardas, diatomeas y dinoflagelados contienen junto a clorofila *a* el tipo de clorofila llamada *c*, mientras que las algas rojas contienen clorofila *d*. Especies de *Prochloron* (relacionado con algas verde-azules o cianobacterias) contienen clorofila *b* en lugar de ficobilinas (apartado 11.2.3), lo que, según algunos autores, puede indicar una relación filogenética de estos organismos con los cloroplastos.

La clorofila *c* presenta máximos de absorción en éter a 447, 579 y 627 nm, a diferencia de la clorofila *a* tiene un doble enlace entre los carbonos 7 y 8 y el resto unido al carbono 7 no es propionil-fitol, sino acrilil-fitol. Se conocen algunas variantes de la clorofila *c* que afectan al sustituyente del carbono 4, e incluso con cambio en la posición del ani-

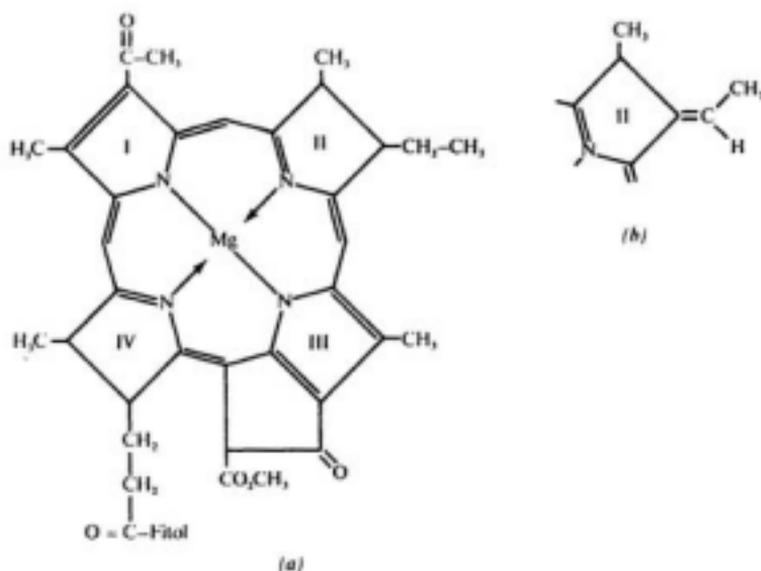


Figura 11.4.—Bacterioclorofilas *a* y *b*.

llo V. Es significativo que los organismos que la presentan, parecen ser responsables de la mayor parte de la fijación del  $\text{CO}_2$  en el mundo. La clorofila *d* se encuentra en pequeñas cantidades. Su máximo de absorción en el rojo está a unos 670 nm. Su estructura es semejante a la de la clorofila *a*, excepto que el sustituyente de carbono 2 es  $-\text{CHO}$ .

En la mayoría de las bacterias fotosintéticas, la forma de clorofila que presentan es la bacterioclorofila. En general, ésta es del llamado tipo *a*, aunque en algunas especies de *Rhodospseudomonas* se ha encontrado otra forma de bacterioclorofila llamada bacterioclorofila *b*. En algunas clorobacteriáceas la bacterioclorofila *a* acompaña, como componente minoritario, a la llamada clorofila de *Chlorobium*.

Los espectros de las bacterioclorofilas muestran el máximo de absorción en el rojo, a mayor longitud de onda (700 y 720 nm respectivamente para *a* y *b*) que las clorofilas de organismos fotosintéticos capaces de desprender oxígeno del agua. Las bacterias fotosintéticas son así capaces de realizar su fotosíntesis con luz del infrarrojo próximo.

En la figura 11.4 se muestran las estructuras de las bacterioclorofilas *a* y *b*. La diferencia entre ellas reside en los sustituyentes en el carbono 4, aparte de diferencias en la configuración. Comparando con la figura 11.3 se ve que, a diferencia de las clorofilas, las bacterioclorofilas tienen el anillo II en estado reducido.

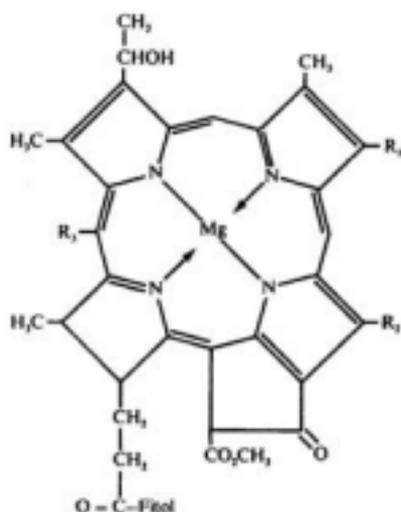


Figura 11.5.—Clorofilas de *Chlorobium*.  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  pueden ser diferentes sustituyentes.

En la figura 11.5 se muestra la estructura básica de la llamada clorofila de *Chlorobium*. En realidad, se trata de una familia de clorofilas que pueden tener diversos sustituyentes, indicados como R en la figura (metilo, etilo, isobutilo y n-propilo) en las posiciones 4,5 y 8. El máximo de absorción en el rojo, lo presentan aproximadamente a 650 nm.

## 11.2.2. Carotenoides

Los carotenoides son poliisoprenoides de 40 átomos de carbono. Muchos de ellos se encuentran en estructuras fotosintéticas como pigmentos accesorios. En cloroplastos se encuentran en las membranas de tilacoides y en las membranas de la envoltura de cloroplastos. En este último caso, su papel no está relacionado con el aprovechamiento

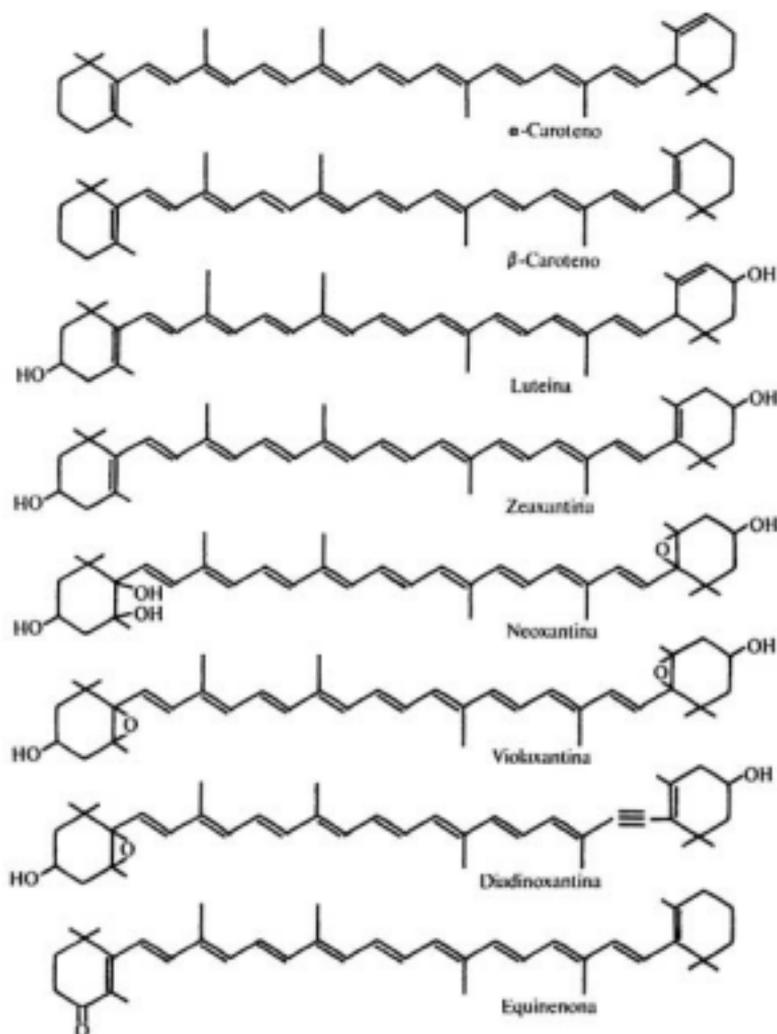


Figura 11.6.—Importantes carotenoides fotosintéticos.

fotosintético de la energía luminosa. Los carotenoides que participan en la fotosíntesis pueden ser del tipo caroteno, en cuyo caso su molécula consta exclusivamente de carbono e hidrógeno, o pueden ser del tipo xantofila que contiene oxígeno además de carbono e hidrógeno.

Los principales carotenoides de cloroplastos de plantas superiores son  $\beta$ -caroteno, Luteína, Violaxantina y Neoxantina. Sus estructuras, junto con la de algunos otros carotenoides fotosintéticos, se representan en la figura 11.6. El sistema conjugado de dobles enlaces es el responsable de la absorción de luz en la zona de visible.

En algas eucarióticas se ha encontrado una mayor variedad de carotenoides de cloroplastos, variedad que incluso se ha utilizado con fines taxonómicos. En muchas algas, como ocurre en algas verdes, se encuentran en general los mismos carotenoides que en las plantas superiores. En algas rojas en cambio los más frecuentes son  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos, Luteína y Zeaxantina. La principal xantofila de *Euglenofitas* es Diadinoxantina. El  $\beta$ -caroteno está presente en los cloroplastos de todas las algas eucarióticas.

También el  $\beta$ -caroteno está presente en algas verde-azules (procarióticas). Otros carotenoides frecuentes en estas algas son: Equinenona y Zeaxantina.

Los carotenoides fotosintéticos, en general, presentan un máximo de absorción en la zona 450-490 nm, y otros menores en zonas próximas, mostrando un color de amarillo a naranja. Sirven, pues, para utilizar fotosintéticamente luz poco absorbida por las clorofilas. Los carotenoides además tienen un papel protector contra la fotodestrucción de las clorofilas de ahí que como se ve en la figura 11.1, en la zona de máxima absorción de luz por los carotenoides, exista una desviación entre espectros de acción y de absorción, con mayores valores relativos para este último.

En otros cromoplastos distintos de cloroplastos se pueden acumular otros carotenoides, como ocurre con el licopeno en el tomate.

### 11.2.3. Ficobilinas

Son tetrapirroles que no forman un macrociclo como ocurre con las clorofilas. Se encuentran unidas covalentemente con proteínas específicas formando las llamadas biliproteínas, o más exactamente ficobiliproteínas. Sólo se encuentran en los aparatos fotosintéticos de algas rojas, algas verde-azules y Criptofitas.

Los espectros de absorción de cada pigmento varían con las proteínas a que se unen, absorben intensamente en zonas que varían entre 480 y 670 nm, captando así longitudes de onda poco utilizadas por las clorofilas. Su color puede ser tan intenso, que enmascare al de la clorofila en el organismo fotosintético.

Básicamente se consideran dos tipos, las Ficoeritrinas (rojas) y las Ficocianinas (azules). En una especie suele haber a la vez los dos tipos, aunque en general predomina uno de ellos. En la figura 11.7, se representan las estructuras de los pigmentos respectivos: Ficoeritrobilina y Ficocianobilina. La unión covalente a proteínas parece realizarse por enlaces éster con residuos de serina y mediante puentes de azufre con cisteína cuyo grupo -SH se adiciona a un doble enlace del pigmento. Como ocurre con otros pigmentos fotosintéticos, presentan un sistema conjugado de dobles enlaces, la excitación de cuyos electrones es responsable de la absorción de luz del espectro visible y su utilización fotosintética.

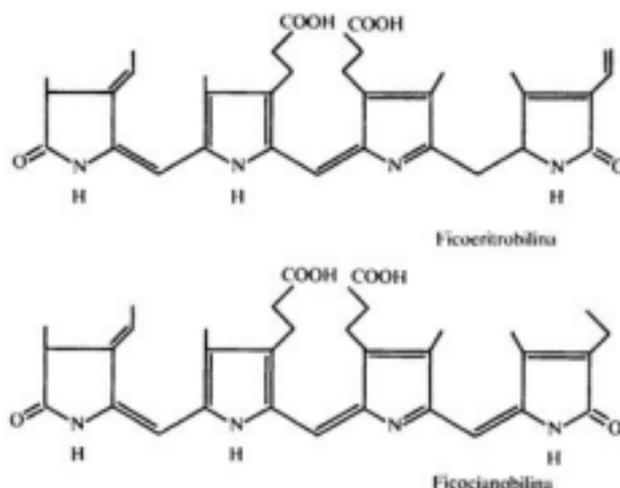


Figura 11.7.—Ficobilinas.

### 11.3. Biosíntesis de clorofilas

En la figura 11.8 se representa esquemáticamente la vía de biosíntesis de clorofilas. Quedan aún muchas dudas respecto a cofactores, algún otro intermediario posible, orden de los intermediarios y caracterización precisa de enzimas implicados. Comentaremos primero algunas de las características más importantes de la ruta biosintética, así como alguno de los problemas planteados.

El primer intermediario característico de la ruta biosintética de clorofilas es el ácido amino levulínico (ALA). Se ha sugerido su formación a partir de  $\gamma$ ,  $\delta$ -dicetoveralato o de succinilCoA y glicina (como en la síntesis de porfirinas animales). Estudios recientes indican más bien que el ALA se forma en cloroplastos a partir de glutamato por una vía singular. Primero el glutamato es activado a glutamil-RNA por una reacción parecida a la de activación para síntesis de proteínas. El RNA implicado es de bajo peso molecular y está codificado en el genoma de cloroplastos. Una deshidrogenasa reduce con NADPH el glutamato activado a glutamato semialdehído ( $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-CHO}$ ) que con una transaminasa pasa a ALA. Dos moléculas de ácido aminolevulínico se condensan para dar por deshidratación una molécula de porfobilinógeno. Cuatro moléculas de éste con pérdida de  $\text{NH}_3$ , dan un tetrapirrol cerrado en reacción catalizada por la urógeno I sintetasa. La colaboración de la urógeno III cosintetasa hace que se dé un cambio de posición de los sustituyentes en lo que luego será el anillo pirrólico IV. Descarboxilaciones y deshidrogenaciones sucesivas llevan hasta la protoporfirina IX a cuyo nivel se bifurcan las rutas biosintéticas de clorofilas y ferroporfirinas. Para la síntesis de clorofilas, la protoporfirina IX compleja al catión  $\text{Mg}^{2+}$  y a continuación tienen lugar una serie de reacciones que llevan a la formación del anillo V, formando la 2,4-divinil feoporfirina  $a_2$  magnésica. Ésta, en dos hidrogenaciones sucesivas forma

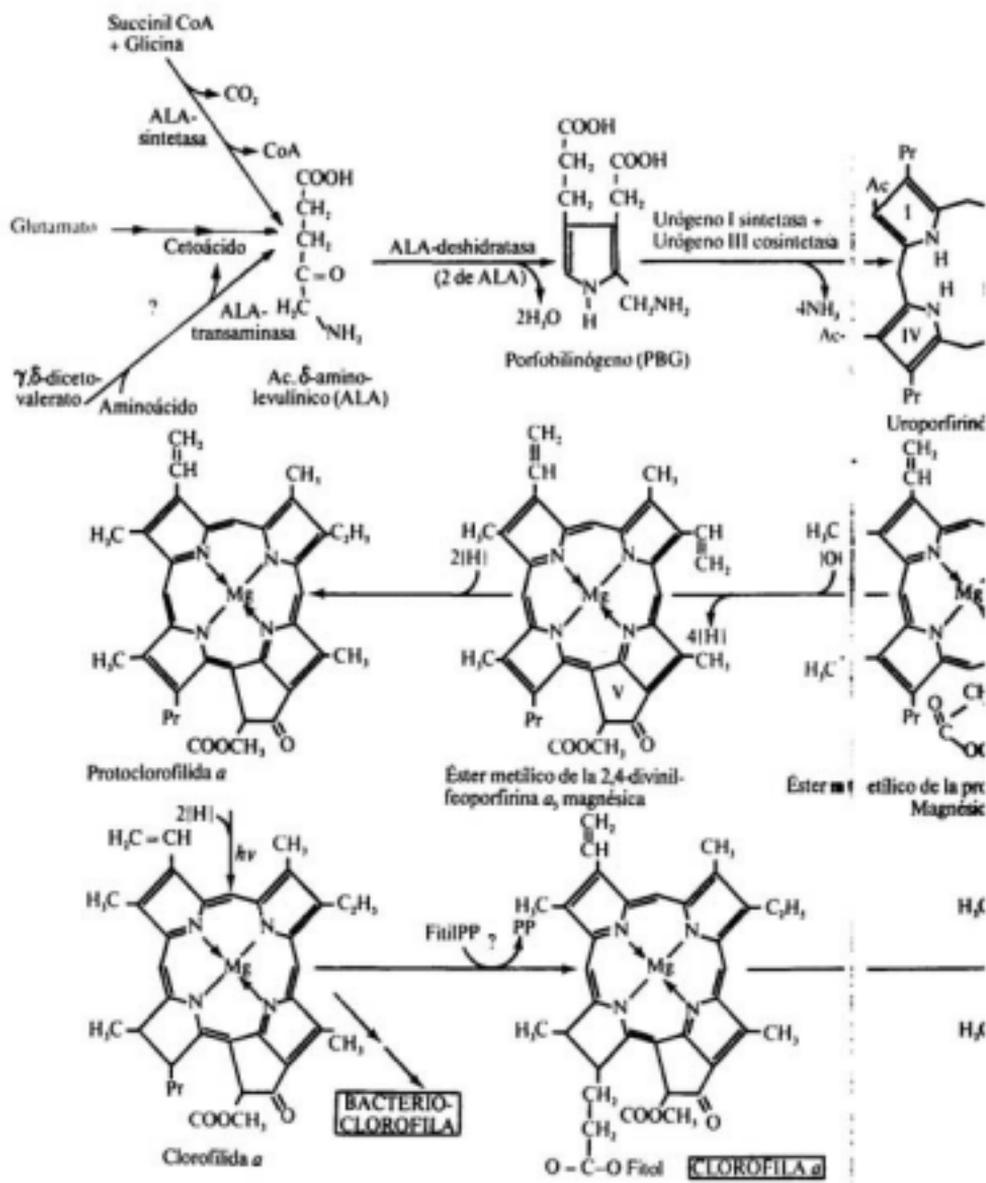
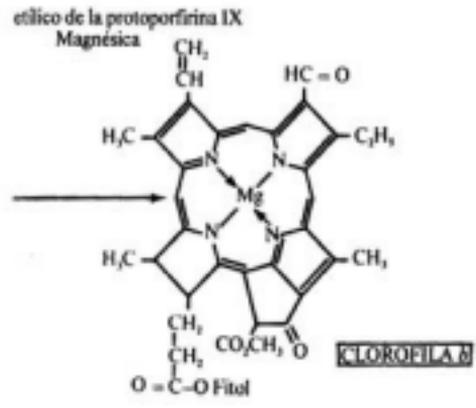
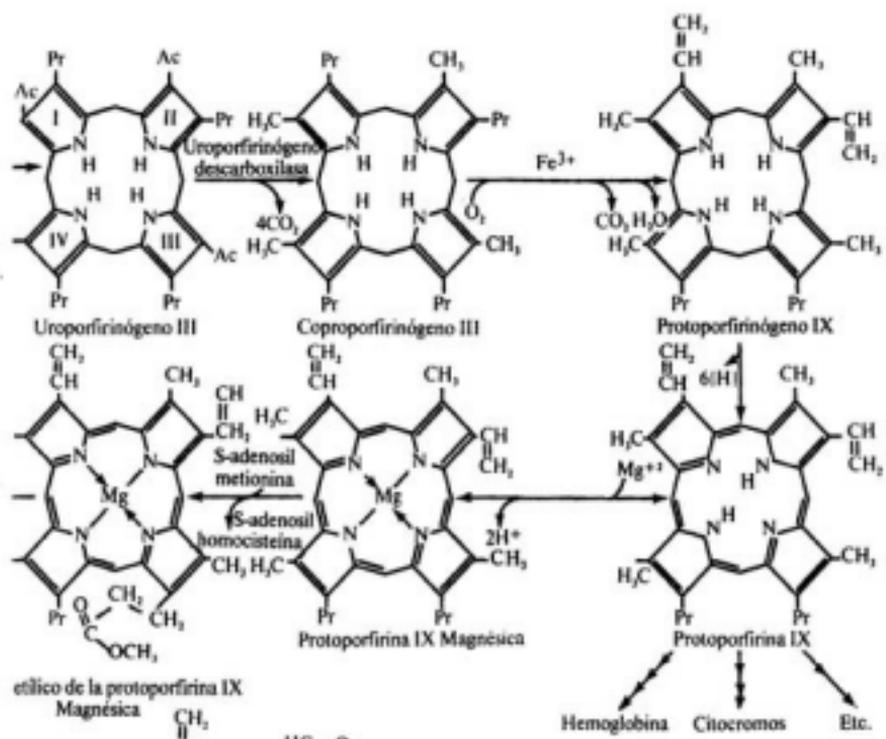


Figura 11.8.—Biosíntesis de clorofila.



la clorofilida *a* que se esterifica con fitol, dando la clorofila *a*. La entrada del fitol puede también ocurrir a nivel de protoclorofilida, sin alterar la transformación básica del anillo tetrapirrólico hasta clorofila *a*. En la figura 11.8 se indican también posibles vías de formación de clorofila *b* y bacterioclorofila *a*.

La reducción de protoclorofilida a clorofilida *a*, ocurre con aquella unida a una proteína formando el complejo protoclorofilida-holocromo. En general, esta etapa requiere luz. El máximo de absorción del complejo se encuentra a 650 nm y al iluminar con luz de esta longitud de onda, el complejo se transforma por hidrogenación en clorofilida *a*-holocromo, cuyo máximo de absorción es de 680 nm. En algunos casos, como ocurre en semillas de coníferas y en muchas algas, puede haber formación de clorofila en la oscuridad. Probablemente, en estos casos se requiera un factor no conocido diferente de la luz para la acción de la protoclorofilida reductasa.

En hojas etioladas se acumula protoclorofilida que al iluminar se convierte en clorofilida. En el capítulo 10 ya comentamos esta conversión en relación con la biogénesis de cloroplastos.

Las etapas de conversión de ALA en clorofilas tienen lugar en los cloroplastos, aunque los enzimas son sintetizados en el citoplasma y codificados en el núcleo. Probablemente las últimas etapas de formación de clorofilas ocurren en tilacoides o estructuras membranosas precursoras de tilacoides. Es posible que también la formación de ALA se realice en los cloroplastos. El control de la biosíntesis de clorofilas es ejercido por muchos factores cuya acción está además relacionada con su efecto general sobre formación de cloroplastos. De estos factores uno de los más estudiados es la luz.

Aparte del requerimiento directo de luz para la conversión de la protoclorofilida en clorofilida, la iluminación determina una más rápida formación de protoclorofilida. Parece que la iluminación induce enzimas que catalizan la formación de ALA. En estas etapas, parece que los efectos de la luz pueden estar mediados por el Fitocromo (Cap. 30). Por otra parte, protoclorofilida y quizás también clorofilida y/o clorofila, pueden actuar como inhibidores de las primeras etapas de su ruta biosintética en la formación de ALA y en la conversión de protoporfirina IX en protoporfirina magnésica.

El hierro se requiere en la síntesis de clorofilas, al menos en la transformación del coproporfirinógeno III. Por otra parte, el hierro puede formar con protoporfirina IX el protohemo (que puede dar hemoproteínas y es la vía de biosíntesis de ficobilinas) y éste inhibir la formación de ALA. También se ha sugerido que el hierro se requiere en la reacción catalizada por el enzima ALA-deshidratasa.

#### 11.4. Biosíntesis de carotenoides

Como compuestos isoprénicos, los carotenoides se sintetizan vía ácido mevalónico a partir de intermediarios de dos átomos de carbono.

Las etapas iniciales de la biosíntesis han sido más estudiadas en estructuras animales o vegetales no relacionadas con biosíntesis de carotenoides. Estas etapas iniciales llevan hasta la formación de los precursores isopentenilpirofosfato (IPP) y dimetilalilpirofosfato (DAPP) según la secuencia representada en la figura 11.9. El intermediario  $\beta$ -hidroxib-metilglutaril-CoA también se puede formar a partir de leucina, pero la vía mayoritaria es la representada en la figura 11.9 a partir de tres moléculas de acetil CoA. El interme-

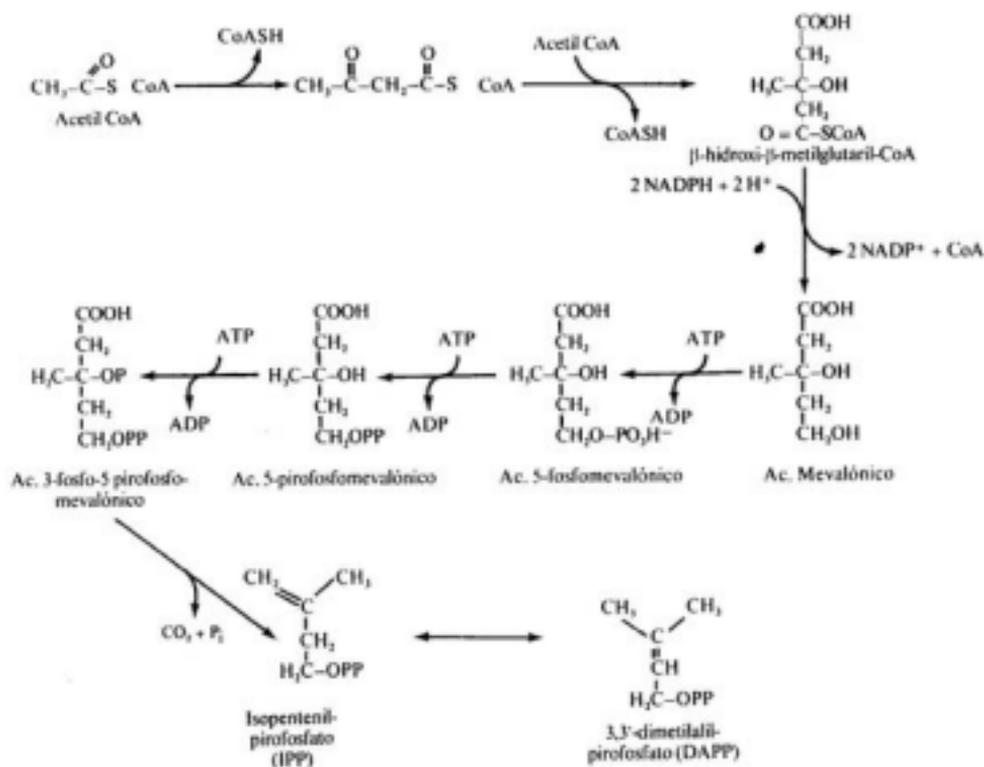


Figura 11.9.—Biosíntesis de los precursores isoprenicos: IPP y DAPP.

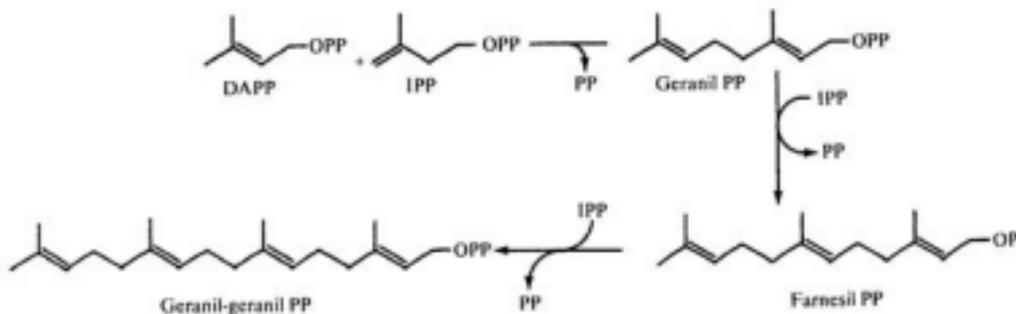


Figura 11.10.—Biosíntesis de geranil-geranil PP.

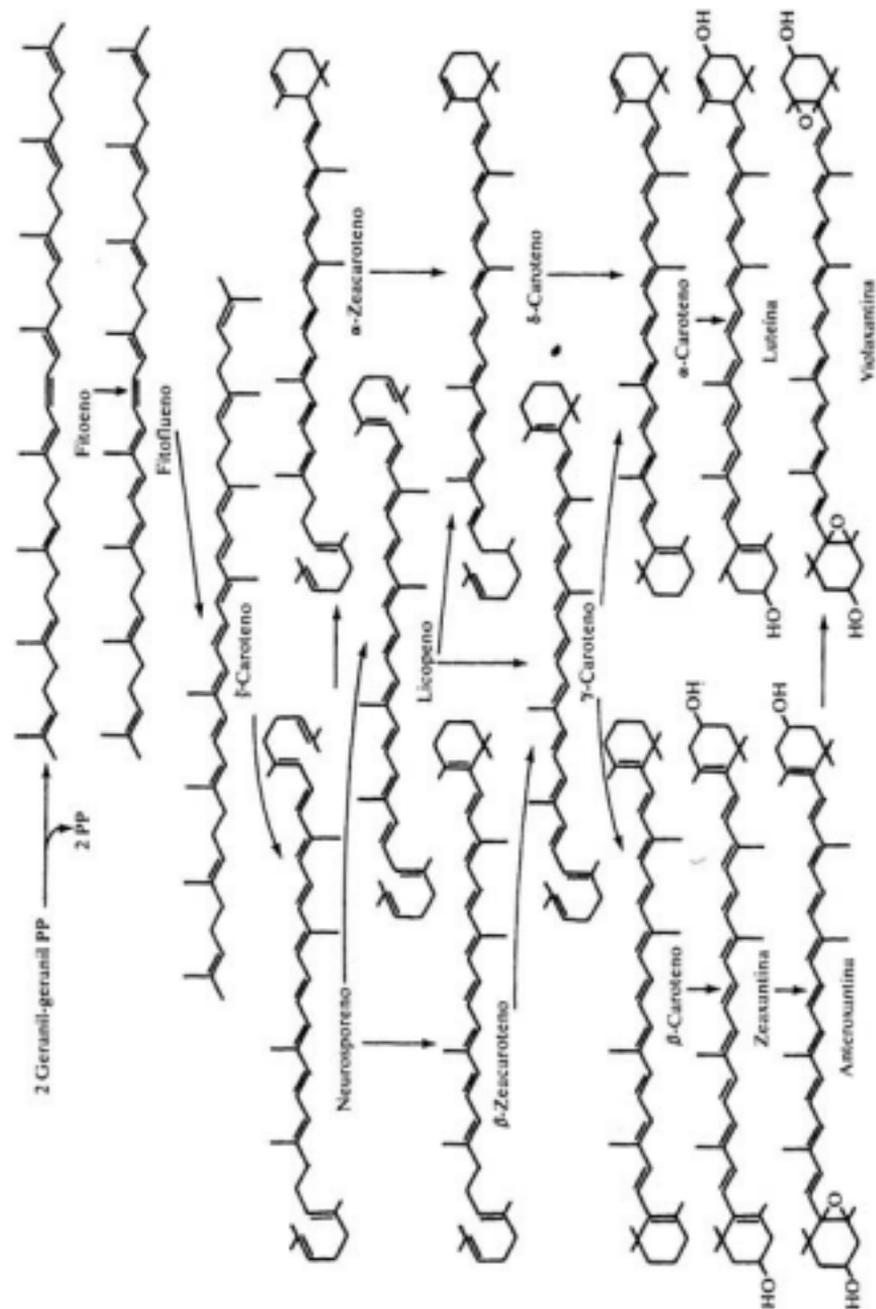


Figura 11.11.- Esquema de biosíntesis de algunos carotenoides.

diario ácido mevalónico, marcado radiactivamente, se usa frecuentemente en estudios de biosíntesis de compuestos isoprenicos debido a su solubilidad y permeabilidad.

Consideraciones de moléculas de IPP y DAPP, como las representadas en la figura 11.10 para la formación del geranyl-geranyl pirofosfato, dan lugar a la formación de diversos compuestos isoprenicos.

La condensación de dos moléculas de geranyl-geranyl pirofosfato inicia la vía específica de biosíntesis de carotenoides. La biosíntesis de éstos ha sido mas estudiada en frutos y en hongos. En la figura 11.11, representamos la secuencia de intermediarios en la formación de algunos carotenoides fotosintéticos. Como puede verse, desde la formación del fitoeno, producto de la condensación de dos moléculas de geranyl-geranyl pirofosfato, las distintas etapas son primero desaturaciones sucesivas y después ciclaciones en los extremos de la molécula. A veces, la secuencia de pasos no está perfectamente establecida y coexisten más de una vía.

En la figura 11.11 se incluyen algunas etapas de la formación de carotenoides oxigenados.

Los carotenoides de cloroplastos son sintetizados en éstos. En hojas etioladas se encuentran sólo pequeñas cantidades de xantofilas. Al iluminar tiene lugar un aumento considerable de todos los carotenoides de cloroplastos. Parece que en el control de la síntesis de los distintos derivados isoprenicos, juega un papel importante la compartimentación de las respectivas rutas biosintéticas en distintas estructuras subcelulares, y la distribución de los precursores hacia una u otra estructura. En el caso concreto de los mecanismos de control de la biosíntesis de carotenoides de cloroplastos, queda aún un amplio campo de investigación por abordar.

### 11.5. Organización de los pigmentos fotosintéticos en los tilacoides

El conocimiento de la organización precisa de los pigmentos que absorben la energía luminosa en los tilacoides, es fundamental para comprender su funcionamiento y concretamente, cómo esta energía absorbida puede ser utilizada. La complejidad de cualquier estudio a nivel de estructura membranosa, ha hecho que los progresos en este campo sean muy lentos. Algunos aspectos de los tipos de agrupamientos de pigmentos serán abordados en el próximo capítulo. Nos limitaremos aquí a considerar la información que, en relación con la organización estructural en tilacoides, vienen suministrando los estudios de los complejos aislados por ataque con detergentes a los tilacoides.

El estudio de estos complejos parece sugerir que son semejantes a las formas en que se encuentra la clorofila en los cloroplastos, indicando así que ésta se encuentra ligada no covalentemente con proteínas específicas en el complejo lipoproteico de los tilacoides.

De estos complejos, dos son solubilizados con detergentes. Uno de ellos, el llamado P700-clorofila *a*-proteína, contiene clorofila *a* y parece estar presente en todas las plantas. En plantas con clorofila *b* se encuentra el complejo llamado clorofila *a/b*-proteína, que contiene ambos tipos de clorofila. Cuando en el capítulo siguiente abordemos la organización funcional de los tilacoides, resultará más claro el porqué de la presencia de estos complejos y su posible relación con dos centros receptores de luz en cloroplastos.

En el acoplamiento de los complejos proteína-clorofila en los tilacoides, deben jugar un papel importante las fuerzas hidrofóbicas de carotenoides, grupo fitol y lípidos de la membrana. En particular se ha sugerido una interacción precisa entre el grupo fitol y los galactolípidos.

El complejo P700-clorofila *a*-proteína, tiene clorofila *a* y  $\beta$ -caroteno en una relación molar 20-30/1. Parece contener un aceptor primario de electrones asociado con uno de los centros receptores de luz (Cap. 12), así como otros transportadores de electrones. El peso molecular del complejo es de unos 110.000 daltons. La relación clorofila *a*/P700 (una forma especial de clorofila que veremos en el próximo capítulo) es de 40 a 50. Se ha sugerido que *in vivo*, se asocian tres de estos complejos, uno solo de los cuales aporta P700.

El complejo clorofila *a/b*-proteína, tiene una relación clorofila *a*/clorofila *b* de 1.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BEALE, S. I.:  $\delta$ -aminolevulinic Acid in Plants: its Biosynthesis, Regulation, and Role in Plastid Development, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 29, 1978, págs. 95-120.
- BOGORAD, L.: Chlorophyll Biosynthesis, en: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2.<sup>a</sup> edición, vol. 1 (Ed. por T. W. Goodwin), Academic Press, Londres, 1976, págs. 64-148.
- BRITTON, G.: Biosynthesis of Carotenoids, en: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2.<sup>a</sup> edición, vol. 1 (Ed. por T. W. Goodwin), Academic Press, Londres, 1976, págs. 262-327.
- CASTELFRANCO, P. A., y BEALE, S. I.: Chlorophyll Biosynthesis: Recent Advances and Areas of Current Interest, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 34, 1983, págs. 241-278.
- GOODWIN, T. W.: Distribution of Carotenoids, en: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2.<sup>a</sup> ed., vol. 1 (Ed. por T. W. Goodwin), Academic Press, Londres, 1976, páginas 225-261.
- JACKSON, A. H.: Structure, Properties and Distribution of Chlorophylls, en: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2.<sup>a</sup> ed., vol. 1 (Ed. por T. W. Goodwin), Academic Press, Londres, 1976, págs. 1-63.
- KRISHNAN, M., y GNANAM, A.: A basic chlorophyll-protein complex, «FEBS letters», vol. 97, 1979, págs. 322-331.
- Ó CARRA, P., y Ó ECHTÁ, C.: Algal Biliproteins and Phycobilins, en: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2.<sup>a</sup> ed., vol. 1 (Ed. por T. W. Goodwin), Academic Press, Londres, 1976, páginas 328-376.
- THORNBER, J. P.: Chlorophyll-proteins: Light-harvesting and Reaction Center Components of Plants, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 26, 1975, págs. 127-158.
- WANG, W.; HUANG, D.; STACHON, D.; GOUGH, S. P., y KANNANGARA, C. G.: Purification, Characterization and Fractionation of the  $\delta$ -aminolevulinic Acid Synthesizing Enzymes from Light-Grown *Chlamydomonas Reinhardtii* Cells, «Plant Physiol.», vol. 74, 1984, págs. 569-575.

## ABSORCIÓN DE LA LUZ Y TRANSPORTE ELECTRÓNICO FOTOSINTÉTICO

De una serie de experimentos realizados a principios de este siglo por Blackman para estudiar los efectos de la concentración de  $\text{CO}_2$ , de la intensidad de iluminación y de la temperatura sobre la velocidad del proceso fotosintético, se llegó a la conclusión de que en el mecanismo de la fotosíntesis se podían distinguir dos procesos: uno oscuro dependiente de la concentración de  $\text{CO}_2$  y otro luminoso (ver Cap. 9). Mientras que la velocidad del primero es afectada fuertemente por la temperatura, la velocidad del proceso luminoso es insensible a la temperatura. Un gran número de experimentos posteriores han confirmado la utilidad de la separación conceptual de ambos procesos, oscuro y luminoso, y han aportado nuevas pruebas a su favor. Así, por ejemplo, cuando se sigue el curso de la asimilación fotosintética del  $^{14}\text{CO}_2$ , si bruscamente es suprimida la luz, aunque rápidamente se anula la asimilación del  $^{14}\text{CO}_2$ , hay un período perceptible en el que todavía continúa la incorporación del marcaje radiactivo en la materia orgánica en ausencia de la luz. Incluso se puede conseguir fotosíntesis con iluminaciones interrumpidas por períodos de oscuridad, en los que tiene lugar la asimilación del  $\text{CO}_2$ , experimento que por su interés consideraremos en detalle más adelante.

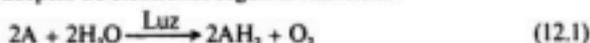
Más aún, si se iluminan cloroplastos en ausencia de  $\text{CO}_2$  y a continuación se rompen y se separan los grana, en el estroma resultante se puede conseguir una pequeña conversión oscura de  $\text{CO}_2$  en hexosas a expensas de algo producido por los grana durante el período anterior de iluminación.

Evidentemente, la conversión del  $\text{CO}_2$  en materia orgánica (azúcares principalmente) ocurre en lo que llamamos fase oscura de la fotosíntesis. Parece, pues, lógico pensar que en la llamada fase luminosa se producen, por efecto de la luz, ciertos compuestos necesarios para convertir  $\text{CO}_2$  en azúcares en la fase oscura. Los términos operacionales fase oscura y fase luminosa, no deben inducir a confusión; en la naturaleza ambas fases ocurren a la luz, pero experimental y transitoriamente, una de ellas se puede realizar en la oscuridad.

En este capítulo vamos a estudiar la llamada fase luminosa de la fotosíntesis, es decir, la serie de procesos que van desde la absorción de luz, hasta la producción de compuestos utilizados en la llamada fase oscura de la fotosíntesis, para convertir  $\text{CO}_2$  en azúcares.

### 12.1. La fase luminosa de la fotosíntesis. Generalidades

Como ya se apuntó en el capítulo 9, el proceso fotosintético en plantas verdes consiste básicamente en una óxido-reducción, en que electrones del agua pasan al carbono del  $\text{CO}_2$  en una reacción ayudada por la luz. El conocimiento del mecanismo del proceso implicará, entre otras cosas, un conocimiento de los posibles transportadores de electrones entre el agua y el  $\text{CO}_2$ . Evidentemente, al menos en alguna etapa de ese transporte de electrones se requiere activación por luz. Un primer éxito en el estudio experimental de los posibles intermedios transportadores de electrones, lo consiguió Hill en 1937, cuando observó que al iluminar preparaciones acelulares, que contenían cloroplastos, en presencia de algún aceptor artificial de electrones (como podría ser ferricianuro o algún colorante orgánico aceptor de electrones), se producía desprendimiento de oxígeno y reducción del aceptor de electrones según la reacción:



Esta reacción, llamada de Hill, es formalmente igual a la reacción global de la fotosíntesis si sustituimos 2A por  $\text{CO}_2$  y  $2\text{AH}_2$  por  $\text{CH}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ . El poder utilizar otros aceptores de electrones distintos del  $\text{CO}_2$ , significa que podemos separar el proceso de absorción de la luz con transporte de electrones, del proceso de conversión del  $\text{CO}_2$  en carbohidratos. Centrados en el primer proceso y con la herramienta experimental de la reacción de Hill (12.1), la cuestión consistiría en identificar los posibles aceptores A naturales y los posibles intermedios transportadores de electrones.

En 1950, Ochoa y Vishniac encontraron que el  $\text{NADP}^+$  podía actuar como reactivo de Hill aceptor de electrones (A), según la reacción:



Conocido el papel del NADPH en muchos procesos biosintéticos, parecía probable que el NADPH fuese el reductor que, formado en la fase luminosa de la fotosíntesis, se utilizase en la fase oscura para la reducción del  $\text{CO}_2$  a carbohidratos, con regeneración del  $\text{NADP}^+$  que de nuevo daría NADPH en el proceso luminoso. El par  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  actuaría, pues, como un coenzima entre los dos procesos luminoso y oscuro.

En 1954, Arnon y sus colaboradores encontraron que cloroplastos iluminados podían formar ATP a partir de ADP y fosfato. Surgía así la posibilidad de que el ATP también se utilizase en el proceso biosintético oscuro y se regenerase en el luminoso.

Como veremos en este capítulo y los siguientes, efectivamente NADPH y ATP actúan como los productos formados en la fase luminosa, que convierten  $\text{CO}_2$  en carbohidratos en un proceso que no requiere iluminación.

Los procesos de formación de NADPH y ATP, y la absorción de luz ocurren en los tilacoides de cloroplastos, mientras que la formación de azúcares a partir de  $\text{CO}_2$ , NADPH y ATP ocurren en el estroma de cloroplastos y, quizás adicionalmente, alguna etapa, en el citoplasma de la célula fotosintética.

En cloroplastos y concretamente en sus tilacoides, se encuentran diversos posibles transportadores de electrones como citocromos, quinonas, proteínas con hierro y azufre, etc. Su posible papel como transportadores intermedios de electrones entre el agua

y el  $\text{NADP}^+$  lo veremos más adelante. Como el potencial redox del par  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  es de  $-0,32$  voltios, mientras que el del par  $1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  es de  $+0,82$  voltios los electrones tenderían a pasar desde el par de bajo potencial al de alto potencial, es decir, desde  $\text{NADPH}$  al  $\text{O}_2$ , formando  $\text{NADP}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Para que ocurra el proceso inverso, tal como se muestra en la reacción (12.2), intercalados en la ruta de transportadores de electrones entre el agua y el  $\text{NADP}^+$ , tienen que funcionar algún o algunos pasos de empuje exergónico con luz, que al excitar electrones de algún o algunos intermedios, hacen que los puedan perder más fácilmente, es decir, que tengan menor potencial redox que si no se excitan con luz.

A continuación estudiaremos primero la absorción de luz, que permite excitar los electrones en la cadena fotosintética transportadora de electrones. Como ya sabemos, la luz es absorbida por la clorofila y otros pigmentos fotosintéticos.

### 12.2. Fotoexcitación de los pigmentos fotosintéticos

Como es bien sabido, la energía de las ondas electromagnéticas es absorbida y emitida sólo en forma de partículas no fraccionables de energía, llamadas cuantos o fotones. El valor de dicha energía viene dado por:

$$e = h \cdot \nu \quad (12.3)$$

donde  $e$  es la energía del fotón,  $h$  la constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-27}$  ergios), y  $\nu$  es la frecuencia de la onda electromagnética que esta relacionada inversamente con la longitud de onda ( $\lambda$ ) por:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (12.4)$$

siendo  $c$  la velocidad de la onda electromagnética. Para un número de Avogadro de fotones ( $6,02 \times 10^{23}$ ), que pueden ser absorbidos por un mol de pigmento, su energía en kilocalorías se puede expresar por:

$$E = \frac{28.000}{\lambda \text{ (en nm)}} \quad (12.5)$$

Sólo existen ciertos niveles energéticos concretos de una molécula, debidos al estado de sus electrones, vibración de enlaces, etc. No es posible cualquier estado energético de las moléculas, a base de diferencias de energía arbitrariamente pequeñas entre un estado energético y otro.

Un fotón sólo puede ser absorbido por una molécula, si ésta dispone de niveles de energía cuya diferencia sea exactamente igual a la energía del fotón. Para el caso de ondas electromagnéticas de la zona del visible ( $\lambda$  entre 400 y 700 nm), la absorción de un fotón implica la excitación de electrones a niveles de mayor energía. En el caso de los pigmentos fotosintéticos, la absorción de fotones de luz del visible determina la excitación de electrones de su sistema conjugado de dobles enlaces. Concretamente, en un pigmento fotosintético dado, es posible la absorción de un fotón de una luz visible determinada, porque un electrón de los dos, que con spin opuesto, ocupan el nivel de mayor energía en el estado normal, es excitado a un nivel vacío de electrones de mayor

energía. La diferencia de energía entre los dos niveles considerados, es exactamente igual a la del fotón. En la práctica, para cada nivel electrónico de energía, existe un gran número de subniveles de energía de las moléculas de los pigmentos fotosintéticos, debido a vibración de enlaces y a rotaciones. La diferencia de energía entre estos subniveles, determinados por los posibles estados de rotación y vibración, es muy pequeña comparada con la diferencia de energía entre los niveles posibles de excitación electrónica. De ahí, que más que una sola longitud de onda concreta que pueda ser absorbida por una excitación electrónica, ésta puede ocurrir con una serie de longitudes de onda próximas, que dan la apariencia de una banda de absorción y que implican, junto con la excitación electrónica, cambios en los subniveles energéticos de vibración y de rotación del pigmento.

En la figura 12.1 se representan las transiciones electrónicas en clorofila *a* por excitación con luz. La iluminación de clorofila *a* con luz de, aproximadamente, 430 nm, determina el paso de un electrón de su última capa electrónica ocupada (estado normal o fundamental), a otra capa electrónica (nivel 1) que excede en energía a la anterior en unas 60 kcal por mol de clorofila *a*, precisamente igual a la energía de un mol ( $6,02 \times 10^{23}$ ) de fotones (también llamado einstein) de luz de 430 nm.

La molécula de clorofila puede permanecer en el nivel electrónico excitado 1 por un periodo de tiempo muy corto, del orden de  $10^{-12}$  segundos. La energía alcanzada se puede perder de diversas formas, que veremos, y que finalmente implican la vuelta del electrón al nivel fundamental.

La iluminación de la clorofila *a* con luz de 660 nm, determina el paso de un electrón del nivel fundamental al nivel que llamamos 2, con aumento de unas 42,5 kcal/mol de clorofila. Es posible la transición electrónica del nivel 1 al nivel 2, a través de los subniveles de vibración sin que se produzca emisión de radiación y si pérdida de energía en forma de calor. Próximo al nivel 2 se encuentra el nivel 3 (40 kcal/mol de clorofila), que sólo se diferencia del 2 por valores de energía próximos a los que separan a los subniveles de vibración. El nivel 3 se puede alcanzar desde el nivel 2 por pérdida de energía en forma de calor. El nivel 3 es significativamente más estable que los anteriores (duración del orden de  $10^{-8}$  segundos). Desde él, el electrón puede volver directamente al nivel fundamental con emisión de fluorescencia de 690 a 700 nm de longitud de onda. Esta emisión fluorescente de luz roja, es fácilmente apreciable en disoluciones concentradas de clorofila iluminada con luz blanca o con luz azul.

En los tres niveles de excitación estudiados, el electrón excitado conserva el spin que tenía en el estado fundamental. Como éste es de signo opuesto al de su electrón acompañante en el nivel fundamental, en todos los casos el spin resultante es 0. Existe en clorofilas un cuarto nivel energético que se alcanza desde el nivel 3 con cambio de spin del electrón excitado. El nivel 4 será, por tanto, triplete. Este nivel más estable (con duración aproximada de  $10^{-3}$  segundos), difícilmente se puede alcanzar por iluminación de la molécula sin excitar y desde él, se puede volver al nivel fundamental con emisión de fosforescencia.

El nivel 4 no parece tener un papel fotosintético. En cambio, si juegan un papel fundamental los niveles 1, 2 y 3. En primer lugar el nivel 3, que se puede alcanzar desde los 1 y 2 (y por supuesto, directamente por iluminación de la clorofila *a* en el nivel fundamental), es suficientemente estable como para dar tiempo a la interacción de la molécula

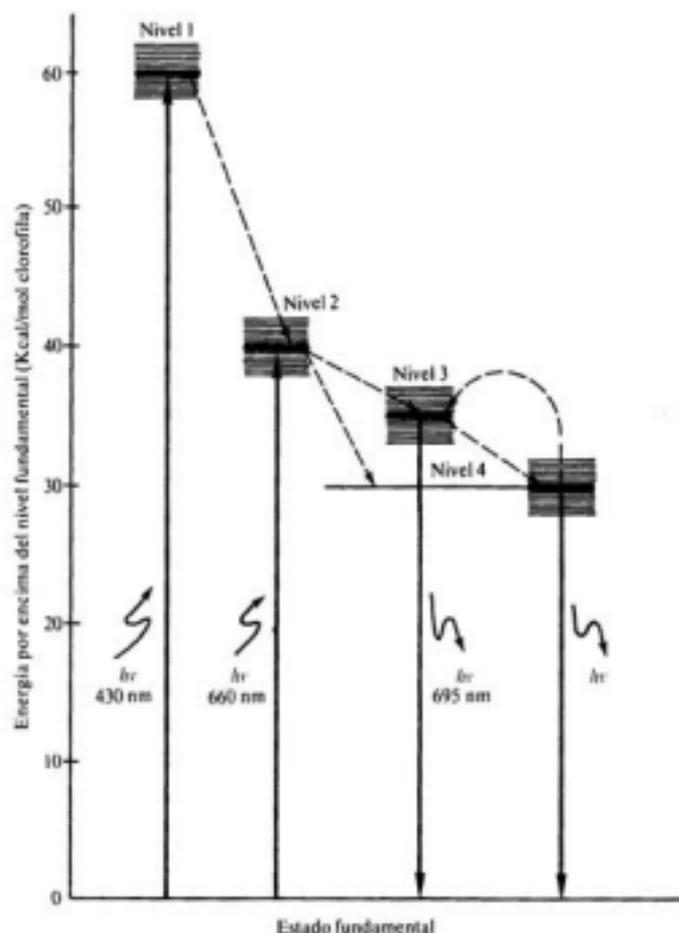


Figura 12.1.—Niveles de energía y transiciones electrónicas en la molécula de clorofila.

la de clorofila *a*, en este estado excitada, con otras moléculas. Comparada con la molécula de clorofila en el nivel fundamental, la excitada en el nivel 3 puede perder más fácilmente un electrón, pues necesita menos energía (las 40 kcal/mol menos) que la molécula no excitada. En otras palabras, la molécula excitada es más reductora, y situada adecuadamente en la cadena transportadora de electrones desde el agua al NADP<sup>+</sup>, puede servir como el necesario empuje exergónico para que pueda ocurrir el transporte de electrones en el sentido indicado.

De la reconsideración de los niveles indicados en la figura 12.1, es evidente que la

luz roja es energéticamente más rentable para producir fluorescencia o nivel 3 que la luz azul.

La clorofila *b*, tiene unos niveles energéticos muy parecidos a los de la clorofila *a*, y también emite fluorescencia con un rendimiento cuántico sensiblemente igual al de la clorofila *a*, en cambio, carotenos y xantofilas no emiten fluorescencia.

En la clorofila *b* se ha encontrado el paso de nivel 4 al 3 ayudado por la agitación térmica. Esto origina una débil emisión adicional de fluorescencia, más retardada que la considerada para clorofila *a*.

### 12.3. Fotoquímica de los pigmentos *in vivo*

Aunque con ligeros desplazamientos de los máximos de absorción a mayores longitudes de onda y ligeros ensanchamientos de las bandas de absorción, los espectros de los pigmentos *in vivo* parecen ser sensiblemente iguales a los de los pigmentos *in vitro*. Es de suponer, pues, que la distribución de los niveles energéticos de los pigmentos debe ser sensiblemente igual *in vivo* que *in vitro*.

Sin embargo, mientras que la fluorescencia observada *in vitro* alcanza rendimientos del orden del 30 por 100, *in vivo* apenas se alcanzan rendimientos de un 5 por 100 para intensidades de luz no saturantes de la fotosíntesis. Los rendimientos en fluorescencia *in vivo*, son mayores para intensidades muy por encima de las saturantes de la fotosíntesis. El rendimiento en fluorescencia *in vivo*, aumenta si se baja la concentración de CO<sub>2</sub> o se suministran inhibidores de la fotosíntesis. Da la impresión como si *in vivo*, la luz absorbida se pudiera utilizar en dos procesos distintos, fotosíntesis y fluorescencia, que compiten entre sí.

Por otra parte, se encuentra fluorescencia de clorofilas cuando se iluminan cloroplastos *in vivo* con luz absorbida por carotenoides. Se puede medir fluorescencia de clorofila *a* por absorción de luz por clorofila *b* en *Chlorella*, o por absorción de luz por ficobilinas en algas rojas y algas verde-azules. Todo lo cual indica la existencia de transferencias de excitación electrónica entre distintos pigmentos fotosintéticos. Razonablemente si esas transferencias de excitación pueden dar lugar a la emisión de fluorescencia, también pueden ser utilizadas en fotosíntesis.

La transferencia de excitación puede ocurrir también entre moléculas iguales, y de hecho se ha observado entre moléculas de clorofila *a*. La transferencia de excitación ocurre si dos moléculas están próximas y adecuadamente orientadas, y se debe a una interacción entre las estructuras electrónicas de ambas moléculas, según la cual la vuelta del electrón excitado de una molécula al estado fundamental se acopla con la excitación de un electrón de la otra molécula a un nivel de energía superior en una magnitud igual a la pérdida por la primera molécula.

Las ligeras modificaciones *in vivo* de los espectros de los pigmentos, respecto de la situación *in vitro*, se debe atribuir a su interacción con los componentes proteicos y lipídicos de los tilacoides. Cabe la posibilidad de que un tipo de pigmento, por ejemplo, clorofila *a*, presente distintos tipos de asociaciones en los tilacoides y así su espectro *in vivo*, será el resultado de la superposición de las distintas formas de la clorofila *a* presentes en los tilacoides. El análisis de la gráfica que representa la derivada de la absorbancia res-

pecto a la longitud de onda, frente a esta misma, y que se puede obtener con el espectrofotómetro diferencial, permite identificar la existencia de distintas formas de un mismo pigmento *in vivo*. Cada una de las distintas formas se puede caracterizar por un máximo de absorción. Así, en plantas superiores se pueden caracterizar *in vivo* tres formas de clorofila *a* con máximos de absorción respectivos a 673, 683 y 695 nm. Igualmente, en bacterias fotosintéticas se pueden identificar tres formas de bacterioclorofila con máximos respectivos a 800, 850 y 890 nm.

Cuando para producir fluorescencia *in vivo* se utiliza excitación con luz polarizada, una pequeña parte de la fluorescencia inducida esta también polarizada y muestra un máximo de intensidad a 718 nm. En cambio, la mayor parte de la fluorescencia inducida no está polarizada y presenta su máximo de intensidad de emisión a 685 nm. Así, parece que una parte de las moléculas de clorofila *a*, se encuentra en los tilacoides en una orientación diferente a la del resto de las moléculas de clorofila *a* y, además, tiene unos niveles energéticos ligeramente diferentes.

Parece pues que, respecto a niveles energéticos excitados que puedan ser utilizados en reacciones químicas, según sugiere el hecho de que producen fluorescencia, existen dos formas diferentes de clorofila *a in vivo* que emiten fluorescencia con máximo respectivamente a 685 y 718 nm. A sus respectivos estados de excitación fluorescentes, pueden llegar por absorción de luz por ellas mismas o por transferencia de excitación desde otras moléculas de clorofila *a* o, en general, de otros pigmentos que han sido los que verdaderamente han absorbido la luz. El hecho de que se encuentren más formas de clorofila *a in vivo* por estudio de los espectros de absorción que por estudios de fluorescencia, indica que no todas las formas de clorofila *a* presentes son fluorescentes.

Evidentemente, la iluminación con luz de más de 685 nm no puede inducir fluorescencia de 685 nm que tiene más energía por fotón, por lo que se encuentra una disminución acusada del rendimiento en fluorescencia por iluminación con luz del rojo lejano. Este fenómeno guarda un gran paralelismo con los resultados, que estudiamos en el apartado siguiente, sobre la eficacia fotosintética de las distintas longitudes de onda.

## 12.4. Evidencia de la existencia de dos fotoprocesos fotosintéticos.

### Efecto Emerson

Como ya mencionamos en el apartado 11.1, en las proximidades de 700 nm hay una diferencia notable entre el espectro de acción de la fotosíntesis y el espectro de absorción del aparato fotosintético. De hecho, luces monocromáticas de longitudes de onda mayores de 680-690 nm, aunque son absorbidas por la clorofila *a*, son muy ineficaces para producir fotosíntesis.

Emerson encontró que si en lugar de iluminar con una sola luz monocromática, se ilumina la estructura fotosintética simultáneamente con una luz de más de 680 nm y con otra luz de menos de 680 nm, la velocidad de fotosíntesis que se obtiene es mayor que la suma de las dos velocidades de fotosíntesis que se miden cuando la iluminación se hace con cada luz individualmente (Fig. 12.2). Este efecto de aumento de la eficacia fotosintética recibe el nombre de efecto Emerson. Parece como si la iluminación simultánea

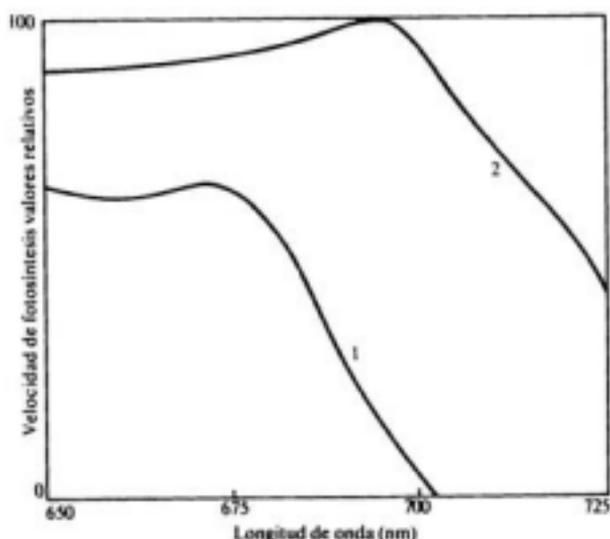


Figura 12.2.—Velocidad de la fotosíntesis en una suspensión de algas verdes iluminada con luz monocromática de la longitud de onda indicada (1), y cuando se ilumina simultáneamente con luz de 650 nm y luz de la longitud de onda indicada (2). Cuando se varía la longitud de onda, se suministra siempre el mismo número de fotones. La iluminación con luz suplementaria de 650 nm (2), se hace con un número de fotones que es un tercio del anterior.

con luz de menos de 680 nm y con luz de más de 680 nm, permitiese un aprovechamiento fotosintético de la luz absorbida de más de 680 nm, que no se puede lograr cuando esta última se suministra sola a la estructura fotosintética. O, en otras palabras, la luz de más de 680 nm puede ser utilizada para fotosíntesis, si simultáneamente se le suministra luz de menos de 680 nm, lo que indica que para la fotosíntesis tienen que operar dos sistemas de captación de luz, uno de los cuales (fotosistema II) no admite luz de más de 680 nm mientras que el otro (fotosistema I) sí. Ambos admiten luz de menos de 680 nm. Con luces monocromáticas de más de 680 nm, deja de operar el fotosistema II y con ello se impide el funcionamiento fotosintético. Como veremos en el apartado siguiente, nuevos tipos de evidencias confirman la existencia de dos fotosistemas en fotosíntesis.

### 12.5. Sistema fotosintético de transporte de electrones

Se pueden identificar intermedios transportadores de electrones si se produce algún cambio espectral de la estructura fotosintética como resultado de la iluminación. Es de suponer que la iluminación produce un cambio en el estado redox de los transportadores ya que activa un flujo de electrones. Si estos transportadores cambian su espectro como resultado de la pérdida o ganancia de electrones, su participación en el transporte fotosintético de electrones se deducirá del efecto de la luz sobre su espectro. El funda-

mento de la técnica es aplicable a espectros de absorción del visible y en general de otros tipos (como resonancia de spin electrónico, etc.).

Con el uso de estas técnicas espectroscópicas, Kok identificó en células que realizan fotosíntesis con desprendimiento de oxígeno, un componente de máximo de absorción a 700 nm que se designa como P700. Al iluminar, disminuye la absorbancia debida a este componente. Como dicha absorbancia también desaparece con el agente oxidante ferricianuro, es de suponer que la disminución de absorbancia por iluminación es debida a la pérdida de un electrón. El compuesto P700 es, en realidad, una molécula de clorofila *a* situada en un entorno especial que le hace modificar parcialmente su espectro. Se estima que sólo una de cada 400 moléculas de clorofila está en la forma de P700. La molécula de P700 puede perder un electrón por recibir excitaciones procedentes de otras moléculas de clorofila *a* que hayan sido iluminadas.

Por técnicas semejantes, se ha identificado en cloroplastos otro pigmento receptor de excitaciones que por la posición de su máximo de absorbancia se designa como P680. También es una molécula de clorofila en un entorno especial.

P700 y P680 están asociados respectivamente con los fotosistemas I y II que mencionamos en el apartado 12.4. La asignación a cada fotosistema se podría deducir por consideraciones energéticas, pero, como vamos a ver a continuación, existen muchas otras pruebas que apoyan la asignación de P700 y P680 a los fotosistemas I y II, respectivamente.

El máximo de disminución de absorbancia a 700 nm debido a la oxidación del P700 se consigue con iluminación, precisamente, de longitud de onda de 700 nm. Iluminación con luz de 670 nm, aun aumentando la intensidad, no consigue oxidar una proporción tan elevada de moléculas de P700. Parece como si cuando operase el fotosistema II por usar luz de menos de 680 nm, de alguna forma, éste sirve de recarga de electrones al P700 oxidado y no todas las moléculas de P700 se pueden encontrar oxidadas en estas condiciones.

Cuando los cloroplastos se tratan con el inhibidor de fotosíntesis DCMU, 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea, la luz de 680 nm es tan efectiva como la de 700 nm para provocar oxidación del P700, lo que parece indicar que el DCMU bloquea el paso de electrones desde el fotosistema II hasta el I.

Se ha podido identificar una serie de señales espectroscópicas que desaparecen con iluminación de 700 nm, en especial en presencia de DCMU, en un proceso que corresponde a la oxidación de intermedios transportadores y que se puede impedir parcialmente por iluminación con luz de menos de 680 nm, si no está presente el DCMU. Razonablemente, corresponden a intermedios transportadores de electrones entre el fotosistema I y el fotosistema II. Su secuencia precisa en la cadena transportadora de electrones, se puede deducir del orden en que se oxidan con luz de 700 nm, de su potencial redox y de otras experiencias en cuyo detalle no entraremos.

De acuerdo con los potenciales redox que se pueden medir de los componentes P700 y P680, así como de una larga serie de experiencias complementarias, desde hace tiempo se acepta el esquema de transporte de electrones desde el agua al NADP<sup>+</sup> que se representa en la figura 12.3. Naturalmente, el esquema representado en la figura 12.3 está resumido. Existen otros transportadores intermedios, algunos de los cuales discutiremos en este apartado.

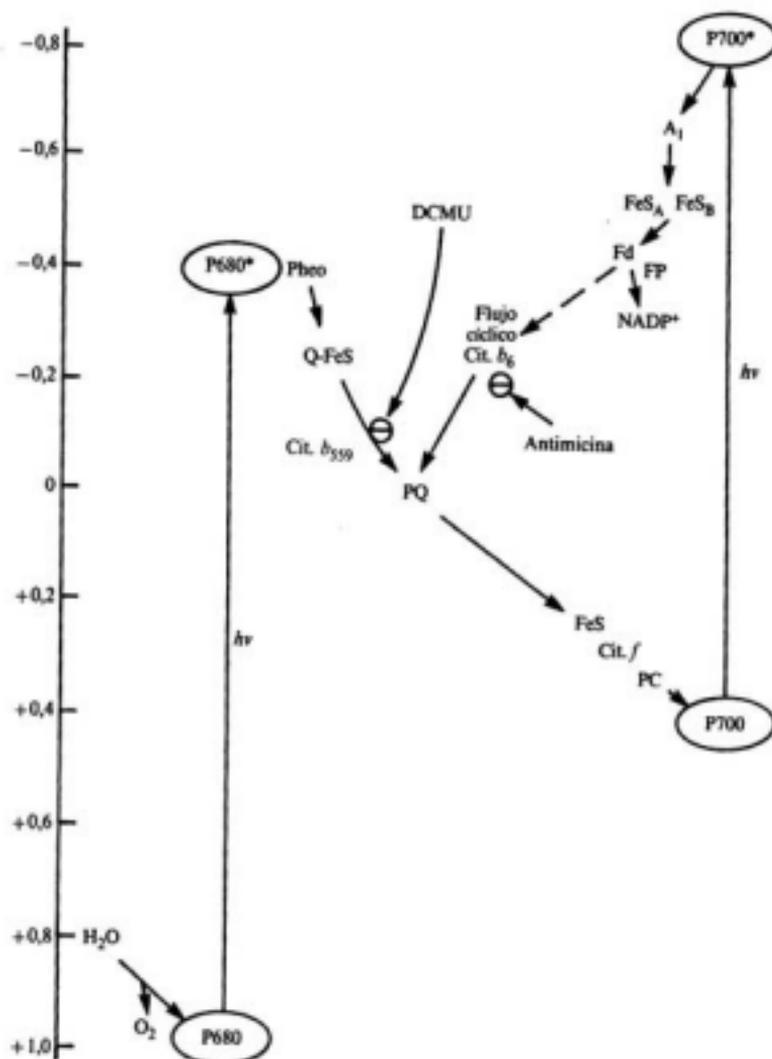


Figura 12.3.—Transporte electrónico fotosintético. El significado de las abreviaturas se explica en el texto.

Los electrones tienden, espontáneamente, a pasar desde los transportadores en forma reducida de bajo potencial redox, a los transportadores en forma oxidada de más alto potencial redox y según la secuencia indicada en la figura 12.3. Por efecto de dos excitaciones luminosas, en su curso desde el agua al  $NADP^+$ , los electrones pueden salvar la diferencia de potencial redox desfavorable entre el par agua/oxígeno y el par  $NADP^+/NADPH$ .

Los componentes P680 y P700 actúan como colectores de las excitaciones de electrones que, por efecto de la iluminación, se producen en los pigmentos de sus respectivos fotosistemas. Los pigmentos que transfieren excitaciones, pero no electrones, reciben el nombre de antena. Los pigmentos colectores excitados, que escribiremos con un asterisco (P700\* y P680\*), al tener el electrón excitado lo pueden perder con más facilidad (son más reductores que los correspondientes pigmentos no excitados). Sólo ellos, P700\* y P680\*, de entre todos los pigmentos, son capaces de perder el electrón excitado, probablemente debido a que su situación en la arquitectura de los tilacoides les permite interactuar adecuadamente con otros transportadores de electrones que no participan en la absorción de la luz. Al perder P700\* o P680\* un electrón, se crea un defecto electrónico que es cubierto por el transportador precedente en la cadena que va desde el agua al NADP\*.

El par agua/oxígeno tiene un potencial redox alto (+0,82 V) y así, requiere un aceptor de electrones de muy alto potencial redox. El P680\* que resulta de la pérdida de un electrón por el P680\* cumple esta condición, el potencial redox del par P680/P680\* es de alrededor de 1 V. La producción de una molécula de O<sub>2</sub> requiere el uso

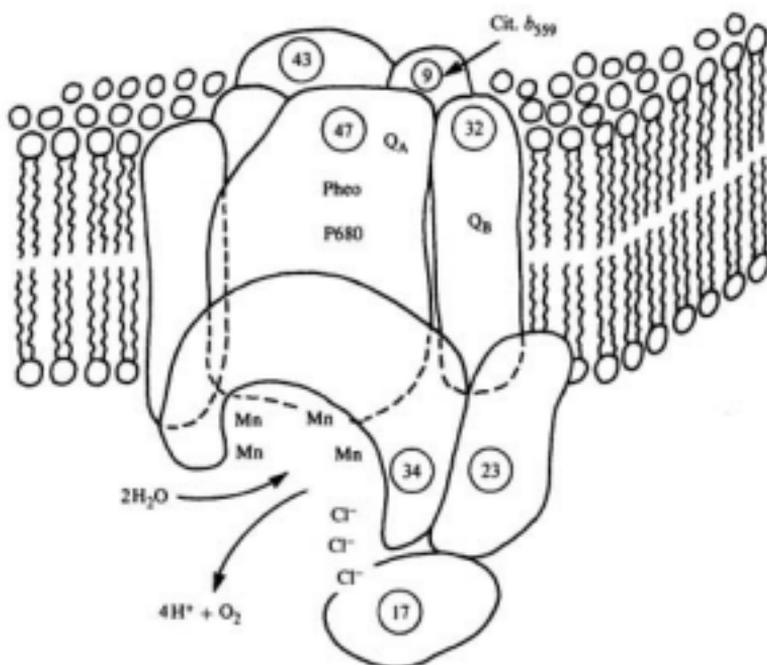


Figura 12.4.-Modelo del complejo que realiza la descomposición del agua. Dentro de círculos se indican las masas moleculares (en miles de daltons) de algunas proteínas. Asociado a la proteína de 47.000 daltons está el P680 y el aceptor feofitina (Pheo). Próximos están: la proteína de 32.000 daltons (responsable de la sensibilidad a DCMU) asociada a quinona y el citocromo b-559.

de dos moléculas de agua y la producción de 4 electrones. En el laboratorio, diversos donadores artificiales de electrones, como la hidroxilamina y la bencidina, se pueden utilizar en lugar del agua en esta etapa. El proceso requiere iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Mn}^{+2}$  y tiene lugar en la cara interna de los tilacoides. Recientemente se han podido identificar diversas proteínas que intervienen en el mismo, así como su localización en los tilacoides, según muestra la figura 12.4. El complejo de iones  $\text{Mn}^{+2}$  sufre cambios de oxidación durante el proceso y asociado a la proteína de 34.000 daltons actúa como donador primario de electrones al  $\text{P680}^*$ .

Se conoce poco de los mecanismos en los centros de reacción de los fotosistemas, en particular de los acontecimientos fotoquímicos cruciales de la separación de cargas. Muchas especulaciones actuales derivan de resultados más concretos con centros de reacción bacterianos que comentaremos en el apartado 12.8. Para el proceso se requiere un alto grado de integridad estructural que asegure que los poderosos oxidantes que se forman ( $\text{P680}^*$  y  $\text{P700}^*$  en plantas) no recaptarán los electrones de los aceptores primarios recién reducidos. En la práctica, esto se asegura tanto por una rápida acción de los donadores primarios de electrones (volviendo a reducir a  $\text{P680}^*$  y  $\text{P700}^*$ ) como por una también rápida retirada de electrones desde los aceptores primarios por otros transportadores.

En el caso del fotosistema II, el centro de reacción incluye clorofilas, entre ellas el  $\text{P680}$ , y feofitina (Pheo) (clorofila sin  $\text{Mg}^{+2}$ ) fuertemente asociada. En este complejo se produce la separación de cargas. Los electrones pasan a un sistema con hierro y quinonas adyacente que actúa como aceptor primario. De él, los electrones pasan a otras quinonas libres que los transfieren a otros transportadores (Fig. 12.5). Asociado a las primeras etapas, hay un citocromo tipo  $b_{559}$  de función aún poco conocida. El DCMU inhibe el transporte de electrones compitiendo con la plastoquinona a nivel de la proteína de 32.000 daltons.

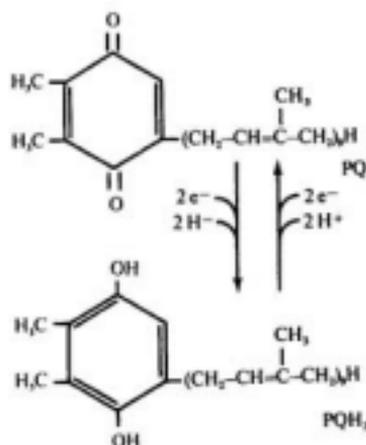


Figura 12.5.-Formas oxidada y reducida de la plastoquinona.

Otros transportadores identificados son proteínas con azufre y hierro no hemínico, citocromo *f* ( $E_0 = +0,365$  V) con máximo de absorción a 553 nm y plastocianina (PC) ( $E_0 = +0,32$  V) que, probablemente, dona electrones directamente al P700 oxidado (P700<sup>+</sup>). La plastocianina es una cuproproteína de color azul. Se ha aislado un complejo de la cadena transportadora de electrones y se han estudiado sus componentes. Se trata del complejo plastoquinol: plastocianina oxidorreductasa que transfiere electrones desde plastoquinona reducida a plastocianina oxidada. Dicho complejo contiene citodromo *b<sub>6</sub>*, citocromo *f* y una proteína con azufre y hierro no hemínico. El complejo incluye cinco polipéptidos: uno de 34.000 daltons, que se supone es citocromo *f*, y otros de 33.000 y 23.500 daltons, que se supone son dos formas de citocromo *b<sub>6</sub>*. Los otros dos polipéptidos (20.000 y 17.500 daltons) podrían estar relacionados con el centro con hierro y azufre.

Se sabe muy poco del centro de reacción del fotosistema I. El P700, que tiene un potencial redox alto (+0,4 V), por excitación pasa a una forma de bajo potencial redox (aproximadamente -0,8 V), por tanto muy reductora, capaz de donar su electrón excitado a un aceptor que parece ser una proteína con hierro y azufre. Con ayuda de sustancias intermedias, el electrón pasa a la ferredoxina (Fd), proteína de bajo peso molecular (11.500 daltons) con dos átomos de hierro unidos a otros dos de azufre. Un hierro de la ferredoxina puede estar como Fe<sup>+2</sup> y como Fe<sup>+3</sup>. En este último caso, muestra dos bandas de absorción intensas a 463 y 420 nm, respectivamente. Es debido a los cambios de oxidación del hierro, que la ferredoxina puede actuar como transportador de electrones, siendo su potencial redox de -0,42 V.

Hasta aquí, todas las etapas de transporte electrónico desde el agua tienen lugar en los tilacoides. La ferredoxina es una proteína soluble, volviendo, una vez reducida, al estroma donde, en reacción catalizada por la flavoproteína (FP), ferredoxina-NADP-oxidorreductasa, pasa electrones al NADP<sup>+</sup>. Éste, con dos electrones y los dos protones producidos en la fotólisis del agua, forma NADPH + H<sup>+</sup> que se utiliza, mayoritariamente, en el llamado proceso oscuro de la fotosíntesis junto con ATP, para convertir CO<sub>2</sub> en hexosas. Como se verá en capítulos posteriores, el NADPH producido se puede utilizar en otros procesos biosintéticos distintos de la formación de hexosas.

Asociado al transporte electrónico desde Pheo al P700, tiene lugar la formación ATP en una forma que se estudiará en el capítulo siguiente.

Un electrón, en su vía desde el agua hasta el NADP<sup>+</sup>, recibe, pues, dos impulsos luminosos, es decir, la formación de un mol de NADPH requiere cuatro moles de fotones o einsteins. En el laboratorio, diversos donadores artificiales de electrones, como el diclorofenol indofenol (DPIP) reducido, pueden donar sus electrones a un intermedio de la cadena transportadora entre Pheo y P700, formándose en este caso NADPH con sólo dos impulsos luminosos y la operación de sólo el fotosistema I. Debe de tenerse en cuenta que, en una reacción distinta, el DPIP oxidado puede actuar como reactivo Hill aceptando electrones. Cuando se usa DPIP como donador de electrones, en realidad se utiliza una mezcla de DPIP y ascorbato, éste rápidamente vuelve a reducir al DPIP que se oxida.

Como se verá en el capítulo siguiente, aparte de la formación de ATP asociada al paso de electrones desde Pheo al P700, y que recibe el nombre de fotofosforilación acíclica, tiene lugar en cloroplastos otra vía de formación de ATP que no utiliza al

fotosistema II. Precisamente se descubrió esta nueva forma de fotofosforilación, porque ocurría en condiciones en que no operaba el fotosistema II por tratamiento con DCMU, o porque se iluminaba con luz de 700 nm. Esta fotofosforilación recibe el nombre de cíclica, puesto que va asociada a un flujo cíclico de electrones sobre el el fotosistema I.

En la figura 12.3 se representan con trazo discontinuo los aspectos específicos del flujo cíclico de electrones y no comunes con el flujo acíclico. En el flujo cíclico, los electrones no van desde Fd hasta el NADP<sup>+</sup>, sino que enlazan con la cadena transportadora que va desde Pheo a P700, probablemente a nivel de cit. *b* o PQ, y vuelven al P700. Es probable que un intermedio sea citocromo *b<sub>6</sub>*, con un máximo de absorción a 564 nm y potencial redox  $-0,06$  V. Un aspecto aún sin aclarar es si el fotosistema I, que se acopla al II en el flujo acíclico de electrones, es el mismo que el que realiza el transporte cíclico de electrones, o este último forma una entidad independiente de aquél.

La orientación de los transportadores de electrones en tilacoides, se ha estudiado por muy diversas técnicas. Algunos de los resultados se muestran esquemáticamente en la figura 12.6. Ya en la figura 12.4 se mostró con más detalle la localización de proteínas relacionadas con la fotólisis del agua.

Queda aún mucho por aclarar en cuanto a los transportadores de electrones en los dos tipos de flujo electrónico fotosintético. La naturaleza de los aceptores primarios de electrones es debatida. Aunque se acepta que el P680 es una molécula de clorofila *a*

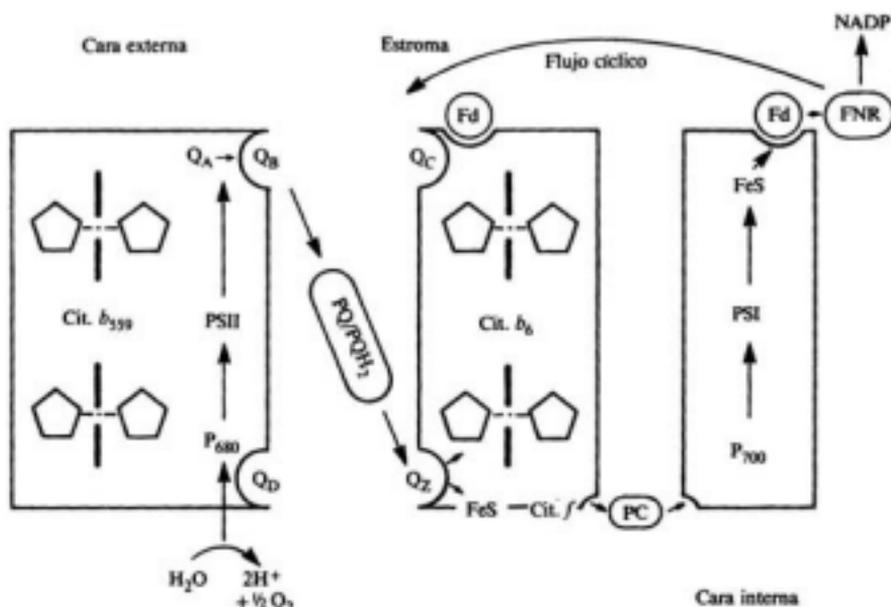


Figura 12.6.—Orientación de los procesos de transporte electrónico en tilacoides (tomado de Cramer et al. TIBS 10: 125-129; 1985).

que forma un complejo con lípidos y proteínas, se ha sugerido que el P700 es en realidad un derivado enólico de la clorofila *a* que resulta de una modificación del grupo cetónico del anillo V. En ambos casos, P680 y P700, se supone que el pigmento capaz de perder electrones una vez excitado, se encuentra formando una pareja de dos moléculas del mismo pigmento. Se ignora el papel de la ubiquinona y de la vitamina K presentes en los cloroplastos. Se conocen diversas formas de citocromo *b* con máximos de absorción a 559 nm, algunas de función aún no aclarada.

Aún dentro de los aspectos pendientes por aclarar, las evidencias en favor del modelo de transporte electrónico representado en la figura 12.3 (también llamado modelo Z) son muchas y proceden de diversas aproximaciones experimentales. En algas se han aislado mutantes defectivos en el fotosistema II y que, por tanto, no pueden realizar la fotosíntesis con agua como donador de electrones. En cambio, pueden realizar fotosíntesis artificialmente con un reductor más energético que el agua, el cual cede sus electrones directa o indirectamente al P700.

Se va conociendo ya el control del flujo fotosintético de electrones. Evidentemente, la disponibilidad de NADP<sup>+</sup> regula la operatividad del flujo acíclico. Quizá la demanda de ATP pueda hacer otro tanto con el flujo cíclico. Puede ocurrir que una válvula de escape a los electrones que no puedan ir al NADP<sup>+</sup>, sea la de una transferencia no enzimática de electrones desde ferredoxina al oxígeno. En cualquier caso, ya hemos mencionado cómo en situaciones de iluminación y no fijación de CO<sub>2</sub> aumenta la fluorescencia de cloroplastos.

Existen evidencias de un control por la iluminación de la actividad ferredoxina: NADP oxidoreductasa. El enzima muestra más afinidad por los sustratos en cloroplastos iluminados, probablemente debido a los cambios de pH que provoca la iluminación. Un nuevo tipo de control es ejercido por las posibilidades de transferencia de excitación electrónica entre los dos fotosistemas, que se estudia en el apartado siguiente.

## 12.6 Propiedades de los dos fotosistemas. Transferencia de excitación entre ellos

De acuerdo con los resultados del efecto Emerson, usando distintas longitudes de onda, parece que el fotosistema I incluye la forma de clorofila *a* que en el apartado 12.3 identificamos como clorofila *a* 695 y quizá también algo de clorofila *a* 683. El fotosistema II incluye, quizá, toda la clorofila *a* 673, quizá algo de clorofila *a* 683 y todos los pigmentos accesorios, incluida la clorofila *b*. Ésta sería la situación al menos cuando los dos fotosistemas están acoplados.

Si se somete un organismo fotosintético a destellos de luz intermitentes (por ejemplo de 10<sup>-5</sup> segundos), seguidos de períodos de oscuridad más prolongados (0,05 segundos o más), se puede conseguir un desprendimiento de oxígeno sólo en el período oscuro. La duración de éste para conseguir el máximo desprendimiento de oxígeno, depende de la temperatura. En estas condiciones, por molécula de oxígeno producida en un destello de luz, se requieren unas 2.000 moléculas de clorofila. Puesto que para producir una molécula de O<sub>2</sub> se requieren al menos 8 fotones (aproximamos con 10 fotones), en las condiciones utilizadas, de un único destello sólo es fijado un fotón por cada 200

clorofilas presentes, por lo que es de suponer que para los otros fotones absorbidos no dé tiempo a que pasen su excitación a P700 o P680, para ser utilizados en el transporte electrónico (éste es mucho más lento). Así, sólo los fotones absorbidos por P700 y P680, capaces de ceder electrones, son utilizados para dar  $O_2$ . Si se supone que los fotosistemas I y II se reparten por igual las moléculas de clorofila, los datos anteriores significan que hay un P700 y un P680 por 400 clorofilas. Es significativo que igualmente otros transportadores electrónicos, como citocromo *f*, plastocianina, etc., están también en una relación 1 a 400 con las clorofilas, lo que indica la existencia de una sola cadena transportadora de electrones enlazando a los dos fotosistemas. De esta integración funcional surge el concepto de unidad fotosintética, formada por un fotosistema I, un fotosistema II y la cadena transportadora de electrones.

Por tratamientos con detergentes, se pueden conseguir preparaciones parcialmente enriquecidas en uno u otro fotosistema, y en este sentido, cada una de ellas sólo realiza funciones propias de uno de los dos fotosistemas.

Al fotosistema I se asignan moléculas de clorofila *a* de carotenoides (probablemente de función protectora), una de P700, una de citocromo *f*, una de plastocianina, dos de citocromo *b<sub>c</sub>*, algunos otros transportadores, lípidos y proteínas. Al fotosistema II se asignan moléculas de clorofila, de carotenoides, el P680, Pheo, plastoquinonas, lípidos, proteínas y algunos otros transportadores, así como  $Mn^{+2}$  unido a proteína.

Se asigna un complejo antena clorofila *a*-proteína al fotosistema I ( $Cl a_1$ ) y otro complejo antena ( $Cl a_2$ ) al fotosistema II. Además, el complejo clorofila *a/b*-proteína (abreviado LHCP: *light harvesting chlorophyll protein*) puede transferir excitaciones tanto al fotosistema I como al II según esté fosforilado o no. La regulación de esta transferencia de excitación (Fig. 12.7) está mediada por los niveles estacionarios de plastoquinona reducida y se basa en las necesidades relativas de ATP y NADPH por los cloroplastos. Así, por ejemplo, una acumulación de NADPH por una mayor demanda relativa de ATP, provoca unos niveles mayores de PQH<sub>2</sub>, que activan a una quinasa que fosforila un residuo de treonina de una proteína de 25.000 daltons del complejo LHCP. A diferencia del complejo no fosforilado, el complejo fosforilado transfiere su excitación preferentemente al P700. De esta manera, al funcionar menos el fotosistema II, se favorece la formación de ATP por flujo cíclico de electrones en detrimento de la formación de NADPH que requiere el funcionamiento de los dos fotosistemas. El resultado es una mayor producción relativa de ATP, de acuerdo con las necesidades de los cloroplastos.

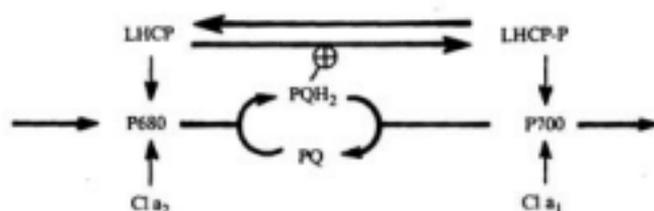


Figura 12.7.—Transferencia de excitaciones y su regulación por plastoquinona reducida. Las transferencias de excitación se representan con trazo fino.

Se ha sugerido que el grado de fosforilación del complejo LHCP puede regular el empaquetamiento de los tilacoides para formar granas. Así, cuando no está fosforilado se favorecería el empaquetamiento de tilacoides, quedando el LHCP próximo al fotosistema II que parece estar exclusivamente en tilacoides granales. En este caso, quinonas móviles en la membrana, asegurarían la transferencia de electrones entre los dos fotosistemas y el complejo plastoquinol: plastocianina oxidoreductasa quedaría próximo al centro de reacción del fotosistema I.

## 12.7. Metabolismo fotosintético del oxígeno

El oxígeno es un agente químico muy reactivo y su continua formación en un ambiente como el de los cloroplastos iluminados, con poderosos agentes reductores y moléculas excitadas, puede dar lugar a muchas reacciones colaterales que finalmente determinan un colapso de la maquinaria fotosintética. Para evitar esta última situación, existen en cloroplastos diversos mecanismos de protección contra los efectos nocivos del oxígeno. Aunque todavía se sabe muy poco de los mecanismos de la fotólisis del agua y del metabolismo posterior del oxígeno, se conocen ya algunos aspectos que conviene resaltar.

La formación del oxígeno tiene lugar en la cara interna de los tilacoides. En ella, una proteína con manganeso capaz de tomar hasta 4 electrones sucesivamente, los toma de dos moléculas de agua y, probablemente a través de otros transportadores, los cede, también sucesivamente, al P680 oxidado (P680<sup>+</sup>). Durante este proceso, hasta el desprendimiento de la molécula de oxígeno, los intermediarios de la fotólisis de las dos moléculas de agua permanecen unidos a la proteína.

El oxígeno puede reaccionar, actuando como aceptor de electrones, con diversos intermedios reducidos de la cadena transportadora de electrones, especialmente con proteínas con hierro y azufre, incluida la ferredoxina. La extensión con que se producen estos procesos no se conoce bien. En cualquier caso, procesos de este tipo consumen poder reductor originado en el transporte electrónico fotosintético, pero, dependiendo del transportador de electrones con que reacciona el oxígeno, pueden permitir la formación de ATP. Estos procesos reciben el nombre de transporte pseudocíclico.

La fotorrespiración que estudiamos en el capítulo 16 es otra importante vía de consumo de oxígeno en muchas plantas, pero al estar más relacionada con el proceso oscuro de la fotosíntesis no la vamos a considerar aquí.

Un aspecto enteramente diferente del metabolismo del oxígeno en los cloroplastos es el que implica la formación de estados excitados o de radicales y peróxidos derivados de la molécula de oxígeno.

En reacciones con el sistema de transporte de electrones asociado al fotosistema I, la molécula de oxígeno puede tomar un solo electrón formando el anión radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Éste puede sufrir una reacción catalizada por superóxido dismutasa:



produciendo agua oxigenada. El agua oxigenada puede ser eliminada por peroxidasas (por ejemplo, asociadas a la oxidación de ascórbico), ya que catalasa parece estar au-

sente de los cloroplastos. De otra forma, el agua oxigenada puede dar lugar al radical  $\text{HO}\cdot$ . Tanto este radical como la misma agua oxigenada y el anión radical superóxido pueden dar lugar a diversas reacciones colaterales que inactivan a los transportadores de electrones y producen reacciones destructivas de peroxidación de lípidos. La actividad superóxido dismutasa, que inicia la destrucción de estos derivados del oxígeno, ha sido encontrada tanto asociada al fotosistema I como al fotosistema II.

Finalmente, se pueden originar estados de excitación singlete y triplete de la molécula de oxígeno por transferencia de excitación desde las moléculas excitadas de clorofila. Como es de esperar, estos estados excitados del oxígeno son mucho más reactivos que la propia molécula en estado fundamental. Así, pueden reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados produciendo fragmentación de la membrana. En este caso, parece que carotenos y  $\alpha$ -tocoferol juegan un importante papel secuestrando estados excitados del oxígeno.

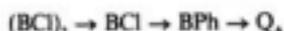
### 12.8. Algunos aspectos del transporte electrónico en bacterias fotosintéticas

Como ya se ha mencionado otras veces, las bacterias fotosintéticas no utilizan agua como donador de electrones. En su lugar, utilizan unos reductores más energéticos como  $\text{SH}_2$ , moléculas orgánicas, etc. De acuerdo con esta situación, las bacterias fotosintéticas carecen de fotosistema II. Presentan sólo fotosistema I que, además, muestra propiedades diferentes del de organismos fotosintéticos capaces de desprender oxígeno. En el capítulo 11 vimos cómo las bacterias fotosintéticas carecen de clorofila *a* y *b* y en su lugar presentan otras clorofilas con máximos de absorción, en general desplazados hacia mayores longitudes de onda.

Las bacterias verdes usan  $\text{SH}_2$ , que pasa a S como donador de electrones y tienen como pigmento principal la clorofila de *Chlorobium*. Son anaerobias estrictas. Las *Thiorhodaceas* pueden usar distintos compuestos azufrados (entre ellos  $\text{SH}_2$ ), que pasan a sulfato, como donadores de electrones; algunas pueden usar también ácidos grasos e hidrógeno como donadores de electrones. Las *Athiorhodaceas* suelen usar en cambio, preferentemente, moléculas orgánicas como donadores de electrones. Estos dos últimos grupos de bacterias, son bacterias purpúreas debido al pigmento accesorio carotenoide.

Alguna forma especial del tipo de clorofila presente es capaz, una vez excitada, de perder electrones de la misma manera que el P700 en vegetales. En bacterias, parece que sólo hay unas 50 moléculas de clorofila presentes, por molécula capaz de perder electrones; ésta, en el caso de *Rhodospirillum* es el llamado P870, una forma especial de bacterioclorofila. En bacterias fotosintéticas, se ha conseguido aislar centros de reacción con moléculas de P870 (o su equivalente), capaces de transferir electrones y sin las otras moléculas de bacterioclorofila (llamadas antena por absorber la luz) que le transfieren excitación. El centro de reacción de *Rhodospseudomonas sphaeroides* es un complejo pigmentos-proteínas con cuatro moléculas de bacterioclorofila, dos de bacteriofeofitina (bacterioclorofila sin  $\text{Mg}^{+2}$ ), una de ubiquinona, un átomo de hierro y tres cadenas polipeptídicas, que hacen en total un peso molecular de 100.000 daltons. Aquí, la ubiquinona parece ser el primer aceptor de los electrones que pasan previamente de bacterioclorofila a bacteriofeofitina. En milisegundos, el complejo (bacterioclorofila)<sub>2</sub> -UQ- interacciona con otros transportadores.

Recientemente se ha estudiado por difracción de rayos X la estructura del centro de reacción de *Rhodospseudomonas viridis*. Éste incluye cuatro moléculas de bacterioclorofila *b* (BChl) (dos de ellas fuertemente asociadas), dos de bacteriofeofitina *b* (BPh), quinonas ( $Q_A$ ,  $Q_B$ ), citocromos, proteína con azufre y hierro y otros polipéptidos. La estructura (Fig. 12.8) está de acuerdo con el acontecimiento primario de separación de cargas según la transferencia de electrones:



El citocromo cede electrones al dímero  $(BChl)_2$ . No se conoce el papel de las moléculas adicionales de bacterioclorofila y bacteriofeofitina.

En algunos casos se han identificado distintos transportadores de electrones, presentando una gran variedad de acuerdo con la variedad de donadores de electrones que se pueden usar.

Evolutivamente, parece lógico pensar que las primeras formas fotosintéticas que aparecieron, contenían un solo fotosistema, equivalente al actual fotosistema I, y eran, por tanto, muy parecidas funcionalmente a las actuales bacterias fotosintéticas. La capacidad de utilizar el agua como donador de electrones, suponía, por la abundancia de este sustrato, una gran ventaja adaptativa que se dio con la aparición del fotosiste-

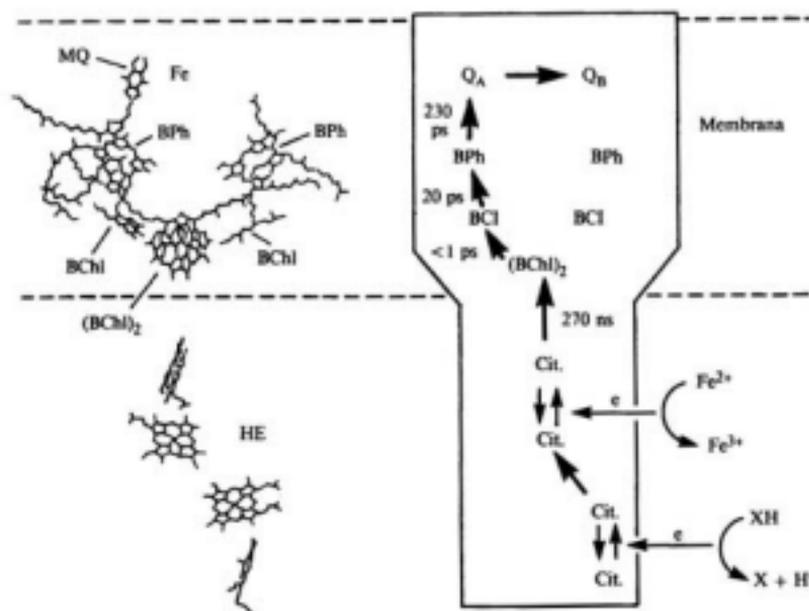


Figura 12.8.—Estructura y procesos de transferencia electrónica en el centro de reacción de *Rhodospseudomonas viridis*. Se indica la vida media de algunas reacciones (adaptado de *Nature*, 315: 278-279, 1985).

ma II. Probablemente, el fotosistema II surgió por diversas mutaciones que afectaron al fotosistema I y que llevaron a la inclusión de nuevos pigmentos accesorios.

Es probable que los primeros organismos fotosintéticos, aunque parecidos a las actuales bacterias fotosintéticas, tuvieran como pigmento principal a la clorofila *a*, lo que implicaría una transición menos brusca hacia el tipo actual de fotosíntesis vegetal. Con la aparición del segundo fotosistema, la mayor competencia de los nuevos organismos fotosintéticos desplazó a los antiguos, de los que sólo sobrevivieron los que desarrollaron nuevos pigmentos que absorben en zonas del espectro infrarrojo no cubiertas por las clorofilas *a* y *b*. Es significativo, en este sentido, la gran variedad de clorofilas bacterianas, así como el hecho de que la clorofila *a* parezca formarse en etapas anteriores de la biosíntesis de aquellas.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BADGER, M. R.: *Photosynthetic Oxygen Exchange*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 27-53.
- BARBER, J. (ed.): *Photosynthesis in Relation to Model Systems*, Elsevier, Amsterdam, 1979.
- BOLTON, J. R., y WARDEN, J. T.: *Paramagnetic Intermediates in Photosynthesis*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 27, 1976, págs. 375-383.
- COGDILL, R. J.: *Photosynthetic Reaction Centers*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 34, 1983, págs. 21-45.
- CRAMER, W. A., y WHITMARSH, J.: *Photosynthetic Cytochromes*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 28, 1977, págs. 133-172.
- DEISENHOFER, J., MICHEL, H., y HUBER, R.: *The Structural Basis of Photosynthetic Light Reactions in Bacteria*, «Trends Biochem. Sci.», vol. 10, 1985, págs. 243-248.
- FOYER, C. H., y HALL, D. O.: *Oxygen Metabolism in the Active Chloroplast*, «Trends Biochem. Sci.», vol. 6, 1981, págs. 188-191.
- GOVINDIEE (ed.): *Photosynthesis*, vol. I, Academic Press, Nueva York, 1982.
- HAEBNEL, W.: *Photosynthetic Electron Transport in Higher Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 35, 1984, págs. 659-693.
- KOK, B.: *Photosynthesis: The Path of Energy*, en *Plant Biochemistry* (ed. por J. Bonner y J. E. Varner), 3.<sup>a</sup> ed., Academic Press, Nueva York, 1976.
- TREIB, A., y AVRON, M. (eds.): *Photosynthesis I*, vol. 5, en *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Springer-Verlag, Berlin, 1977.

## FOTOFOSFORILACIÓN

En el año 1954, Arnon y sus colaboradores en la Universidad de California, descubren que cuando cloroplastos de espinaca aislados se exponen a la luz en presencia de ADP y de fosfato, se forma ATP. La cantidad de ATP producida en tales experimentos era bastante elevada y comparable con la magnitud del flujo electrónico inducido por la luz, por lo que llegaron a la conclusión de que la formación de ATP representaba un mecanismo principal mediante el cual la energía luminosa, absorbida por las clorofilas y pigmentos auxiliares, se conserva mediante su transformación en energía química en los enlaces fosfato-energéticos de la molécula de ATP. Tal proceso recibió el nombre de fosforilación fotosintética, o simplemente fotofosforilación. Este tipo de fosforilación presenta una serie de características únicas, que la distinguen de la fosforilación a nivel de sustrato que tiene lugar en la fermentación, y de la fosforilación oxidativa en la respiración. Estas características son las siguientes:

1. La formación de ATP tiene lugar en las lamelas que contienen clorofila y es independiente de otros sistemas enzimáticos u orgánulos.
2. Ningún sustrato rico en energía distinto de los fotones absorbidos sirve como fuente de energía.
3. No se produce ni se consume oxígeno.
4. La formación de ATP no va acompañada por ningún transporte de electrones que implique la presencia de donadores o aceptores de electrones exógenos.

La formación de ATP inducido por la luz puede expresarse por la siguiente ecuación:

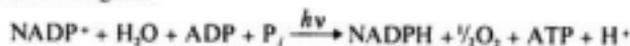


Casi simultáneamente con los trabajos de Arnon, A. W. Frenkel descubre que mediante iluminación de las vesículas membranosas de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*, se producía un proceso de fosforilación muy semejante. Estas observaciones indican que la formación de ATP a partir de ADP y fosfato, es consecuencia del acoplamiento energético de la fotofosforilación al proceso de transporte de electrones fotoinducido, en gran parte del mismo modo que la fosforilación oxidativa está acoplada al transporte electrónico en las mitocondrias.

### 13.1. Fotofosforilación cíclica y no cíclica

El acoplamiento entre fotofosforilación y transporte de electrones fotoinducido, que hoy nos parece tan evidente, era difícil de entender en la época en que se realizaron estos descubrimientos que acabamos de describir. Después de abandonar unos primeros intentos de relacionar la fotofosforilación con una hipotética fotólisis del agua y recombinación de H y OH, la hipótesis que prevaleció fue la de que una molécula de clorofila al absorber un cuanto de luz queda excitada, y es enviado un electrón a un orbital superior, de un nivel energético mayor. Este electrón altamente energético, puede ser entonces transferido a un aceptor de electrones adyacente a la clorofila y que posea un potencial de óxido-reducción fuertemente electronegativo. Esta transferencia del electrón sería el paso crucial en la transformación de la energía luminosa en química. Una vez formado este reductor fuertemente electronegativo, no se necesitaría ningún aporte posterior de energía. Las subsecuentes transferencias del electrón dentro del cloroplasto liberarían energía, ya que se constituiría un flujo de electrones desde un reductor electronegativo hacia aceptores de electrones con potenciales de óxido-reducción mas electropositivos. Se pensó que alguna de estas transferencias de electrones, especialmente aquellas que implicaran la presencia de citocromos, estarían acopladas a la fotofosforilación al final de un ciclo, el electrón regresaría a la molécula de clorofila deficiente en un electrón. Debido a este trayecto cíclico recorrido por el electrón, se denominó a este proceso *fotofosforilación cíclica*.

Un concepto dominante a mediados de este siglo era el de que la reacción de Hill no podía generar reductores fuertes. Sin embargo, este concepto comenzó a cambiar cuando San Pietro y Lang, en 1956, encuentran que incubando durante largo tiempo (60 minutos) concentraciones elevadas de  $\text{NAD}^+$  con concentraciones elevadas de granas, se acumulaban grandes cantidades de  $\text{NADH}$ ; el  $\text{NADP}^+$  era reducido con una intensidad menor que el  $\text{NAD}^+$ . Arnon y sus colaboradores, en 1957, aíslan una proteína soluble de cloroplastos de espinaca que cuando se añadía a bajas concentraciones de granas, catalizaba la fotorreducción del  $\text{NADP}^+$ , siendo el  $\text{NAD}^+$  reducido con una intensidad mucho menor. Esta falta de acuerdo entre qué piridín nucleótido era preferentemente reducido por los cloroplastos, fue resuelta por San Pietro y Lang en 1958 al aislar de cloroplastos un enzima soluble, la piridín nucleótido reductasa fotosintética, que inicialmente catalizaba la fotorreducción tanto de  $\text{NADP}^+$  como de  $\text{NAD}^+$ , pero que al ser purificada sólo reduce al  $\text{NADP}^+$ . En un principio no se tuvo ninguna evidencia experimental que relacionase la fotofosforilación con la reducción del  $\text{NADP}^+$ , es más, se pensaba que ambos procesos eran antagónicos. Fue por ello un hecho totalmente inesperado cuando en 1957 Arnon y sus colaboradores suministran evidencia experimental del acoplamiento entre fotofosforilación y fotorreducción del  $\text{NADP}^+$ . En este caso, y a diferencia de la fotofosforilación cíclica, la formación de ATP estaba acoplada a la transferencia de electrones inducida por la luz desde el agua al  $\text{NADP}^+$  y a una liberación de oxígeno:



El concepto de flujo de electrones aplicado a la fotofosforilación cíclica también es válido en este tipo de fotofosforilación. En este caso, los electrones eliminados de la clorofi-

la son reemplazados por electrones procedentes de agua, con la consiguiente liberación de oxígeno. De esta forma, la luz induce un flujo de electrones desde el agua al  $\text{NADP}^+$  y una fosforilación acoplada a este flujo. A causa de la naturaleza no cíclica de este flujo de electrones, este proceso se denominó *fotofosforilación no cíclica*.

### 13.2. Funcionamiento conjunto de las dos fotofosforilaciones

Antes de que se descubriera la fotofosforilación no cíclica, se consideraba a la cíclica como la única fuente de ATP para la asimilación del  $\text{CO}_2$ ; después de su descubrimiento ya no pudo mantenerse por más tiempo esta idea, al observarse que la fotofosforilación no cíclica producía los tres productos de la fase luminosa de la fotosíntesis: ATP, NADPH y  $\text{O}_2$ . Tres posibilidades son las que hoy en día se contemplan acerca del papel desempeñado por la fotofosforilación cíclica:

1. Que produce ATP para otros procesos distintos a la fijación del  $\text{CO}_2$ .
2. Que suplementa el ATP necesario para fijar el  $\text{CO}_2$ , ya que el producido por la fotofosforilación no cíclica es insuficiente.
3. Que es un artefacto y que la fotofosforilación no cíclica es el único mecanismo productor de ATP fotosintético.

La mayoría de los investigadores han favorecido las posibilidades 1 y 2, sugiriendo que el papel de la fotofosforilación cíclica es el de suministrar ATP cuando la asimilación de  $\text{CO}_2$  se encuentra por una u otra razón disminuida o incluso detenida.

Cuando la estequiometría repetidamente observada de la fotofosforilación no cíclica ( $\text{ATP}/\text{NADPH} = 1$ , ó  $\text{ATP}/2e = 1$ ) se compara con la requerida para la fijación del  $\text{CO}_2$  de  $\text{ATP}/\text{NADPH} = 1,5$  (3 ATP y 2 NADPH por cada molécula de  $\text{CO}_2$ ) se obtiene una clara idea de la necesidad de ATP adicional al producido por la fotofosforilación no cíclica para fijar el  $\text{CO}_2$ . Puede obtenerse evidencia experimental de que el ATP extra puede ser suministrado por la fotofosforilación cíclica, mediante experimentos de fijación de  $\text{CO}_2$  con cloroplastos reconstituídos a los que se adicionan cantidades catalíticas de ADP y  $\text{NADP}^+$  bajo tres condiciones experimentales diferentes:

- a) Con la fase fotoquímica limitada a la fotofosforilación no cíclica.
- b) Con la fase fotoquímica limitada a la fotofosforilación cíclica.
- c) Cuando la fase fotoquímica incluye la fotofosforilación cíclica y no cíclica.

Bajo las condiciones a) y b) la asimilación de  $\text{CO}_2$  queda limitada a la producción de fosfoglicerato, en el caso a) por insuficiencia de ATP, y en el b) por insuficiencia de NADPH; sólo bajo las condiciones experimentales del caso c) cuando ambas fotofosforilaciones actúan conjuntamente y las cantidades de ATP y NADPH son las necesarias, se forman azúcar-fosfatos y, por tanto, la fijación de  $\text{CO}_2$  es completa. Una evidencia adicional en favor de la actuación conjunta de ambas fotofosforilaciones ha sido obtenida recientemente. Arnon y Chain en 1975 encuentran que el cociente  $P/2e$  de la fotofosforilación no cíclica es 1 con ferricianida como aceptor terminal de electrones y en ausencia de ferredoxina, pero con el aceptor fisiológico  $\text{NADP}^+$  y en presencia de ferredoxina obtienen un  $P/2e = 1,5$ . Si inhiben la fotofosforilación cíclica mediante el uso de antimicina A, el  $P/2e$  vuelve a ser de 1. Parece, por tanto, que en presencia de  $\text{NADP}^+$

el flujo no cíclico de electrones equilibra el sistema de los cloroplastos para permitir la operación simultánea del flujo cíclico catalizado también por la ferredoxina. Así, la misma concentración de ferredoxina sirve para ambos tipos de fotofosforilación y la concurrente operación de ambos prevalecerá durante la asimilación del  $\text{CO}_2$  y podrá suministrar el ATP extra que se necesita para dicha asimilación. Sin embargo, cuando la asimilación del  $\text{CO}_2$  queda reducida o interrumpida, la fotofosforilación cíclica puede actuar como generador de ATP celular. Dado que la disminución o interrupción de la asimilación de  $\text{CO}_2$  provocaría una acumulación de NADPH, se ha sugerido la posibilidad de que este compuesto regule el funcionamiento de la fotofosforilación cíclica. De hecho ha sido posible demostrar cómo la adición de NADPH estimula la fotofosforilación cíclica catalizada por ferredoxina (Fig. 13.1). Parece, por tanto, que cuando la asimilación del  $\text{CO}_2$  está disminuida o incluso interrumpida, la fotofosforilación cíclica se comporta como generador de ATP para otras necesidades celulares.

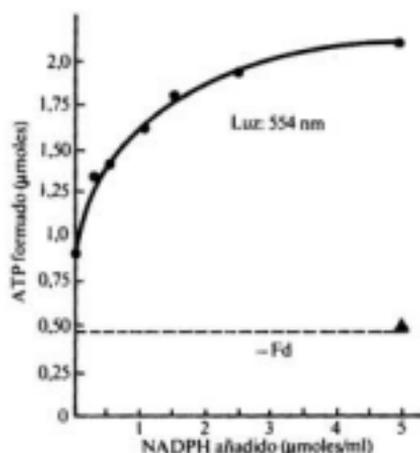


Figura 13.1.—Efecto del NADPH en la fotofosforilación cíclica catalizada por ferredoxina (tomado de D. I. Arnon, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. V, Springer-Verlag, Berlín, 1977).

### 13.3. Acoplamiento entre transporte de electrones y fotofosforilación

En la terminología de fotosíntesis se dice que el transporte de electrones y la fotofosforilación se encuentran acoplados. Podemos considerar dos aspectos de este acoplamiento: no ocurrirá fotofosforilación a menos que tenga lugar un flujo de electrones (una excepción será la obtención de ATP mediante un gradiente iónico). Por la misma razón, no debería existir transporte de electrones a menos que estén presentes el ADP y  $\text{P}_i$  que permitan la fotofosforilación simultánea. En la realidad, con cloroplastos aislados, siempre se detecta una pequeña proporción de transporte de electrones en ausencia de ADP y  $\text{P}_i$  exógeno. La estimulación de este valor basal por la adición de ADP y  $\text{P}_i$

es lo que se conoce como control fotosintético, por analogía con el término control respiratorio, también por ADP en el caso de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Otra medida, aparte del control fotosintético, que da idea de la estrecha realidad de este acoplamiento es el cociente  $ATP/2e$  o ATP formado por cada dos electrones que atraviesan la cadena transportadora de electrones fotosintética. El grado de acoplamiento varía con las condiciones utilizadas para medir la fotofosforilación y sobre todo con el estado en que se encuentren los cloroplastos aislados. Según el esquema de Hill, los cloroplastos aislados pueden agruparse en varios grupos según su estado morfológico. Los cloroplastos con la envuelta externa intacta y con el contenido estromático completo son los llamados del tipo A; aquéllos con una membrana externa recompuesta y que han perdido algo, pero no todo el estroma, son del tipo B; los de matriz de tilacoides sin estroma o envuelta externa son del tipo C; tilacoides desorganizados osmóticamente son del tipo D. Hoy existe gran cantidad de evidencia experimental en la que se demuestra que el grado de empaquetamiento granal influye en la capacidad de los cloroplastos para capturar la luz, sobre todo a bajas intensidades. También, como es muy probable que los granas sean sistemas membranosos continuos con los del estroma, la eficiencia de la transferencia de electrones entre los dos fotosistemas estará muy influenciada por el estado estructural del sistema membranosos.

Al igual que la fosforilación mitocondrial, la fotofosforilación puede resultar desacoplada por ciertos agentes químicos, de modo que el flujo electrónico continúa, pero no tiene lugar fosforilación alguna. Entre los agentes desacoplantes que resultan eficaces por su acción sobre la fotofosforilación se encuentran los iones  $NH_4^+$  y aminos, que no sólo inhiben la formación de ATP, sino que también disipan el gradiente de pH que presumiblemente mediatiza el proceso de conversión de energía. Un número de agentes que permiten el libre intercambio de iones a través de las membranas, los ionóforos, tales como la gramicidina, también desacoplan la fotofosforilación. Tanto la florizina, un glucósido tóxico de la corteza del peral, como el compuesto sintético conocido como Dio-9 inhiben la fotofosforilación por una acción semejante a la de la oligomicina sobre la fosforilación mitocondrial.

### 13.4. Lugares de conservación de la energía

Las dos fotorreacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis generan un potencial químico superior al requerido para la oxidación del agua y la reducción de la ferredoxina. Esta energía adicional puede conservarse en forma de ATP. La energía libre estándar para la conversión de ADP y  $P_i$  en ATP es de, aproximadamente, 7,3 kcal/mol. Sin embargo, en cloroplastos iluminados han podido establecerse valores entre 14 y 15 kcal/mol. Si este potencial químico fuese generado en una reacción de un equivalente, la reacción debería conservar unos 0,66 eV para poder formar una molécula de ATP (1 eV = 23.000 calorías). Si por cada molécula de ATP formada, son dos o tres los equivalentes los que tienen que moverse a través de los lugares de conservación de energía, los valores de energía conservada serían de 0,33 ó 0,22 eV. Una pregunta que permanece aún sin estar perfectamente contestada es en cuáles y en cuántos de los distintos pasos del transporte de electrones fotosintéticos existe una conservación de energía y síntesis de ATP asociados.

Los primeros intentos para determinar, al menos, el número de lugares de conservación de la energía, estuvieron basados en las medidas del cociente  $P/2e$ , es decir, el número de moléculas de ATP formadas por cada par de electrones moviéndose entre el agua y el NADP<sup>+</sup>. Si asumimos, como ocurre en la fosforilación oxidativa mitocondrial, que el movimiento de 2 electrones a través de la cadena transportadora permite la formación de una molécula de ATP, entonces un valor de  $P/2e = 1,0$ , indicaría un lugar de conservación de la energía y un valor de 2,0 indicaría dos lugares.

Las primeras determinaciones del cociente  $P/2e$  dieron valores de 1,0. Según los procedimientos preparativos fueron mejorando, los valores de este cociente fueron aumentando hasta 1,2 y 1,3. Utilizando cloroplastos intactos (tipo A o B) sometidos a choque hipotónico sólo en el último momento, se han obtenido valores de 1,5 y próximos a 2,0. La conclusión que puede sacarse de estos experimentos es que, al menos, existen dos puntos de fotofosforilación entre el agua y el fotosistema I. Conclusión similar puede obtenerse reemplazando el NADP<sup>+</sup> por aceptores de electrones como la benzoquinona o la p-fenilenediamina oxidada, que son reducidos directamente por el fotosistema II. En estos casos, los valores del cociente  $P/2e$  disminuyen a la mitad, indicando que un lugar de conservación de la energía estaría situado antes del fotosistema II y otro después.

Resultados obtenidos recientemente, sobre todo aquellos que incluyen la utilización de inhibidor dibromotimoquinona (DBMIB) que bloquea la oxidación de la plastoquinona, y de aceptores y donadores de electrones lipofílicos que interaccionan con compuestos de la cadena entre las dos reacciones luminosas, han permitido la localización de dos lugares de fosforilación entre el agua y el fotosistema I. El primer lugar se encuentra entre el complejo multienzimático liberador de oxígeno y el fotosistema II,

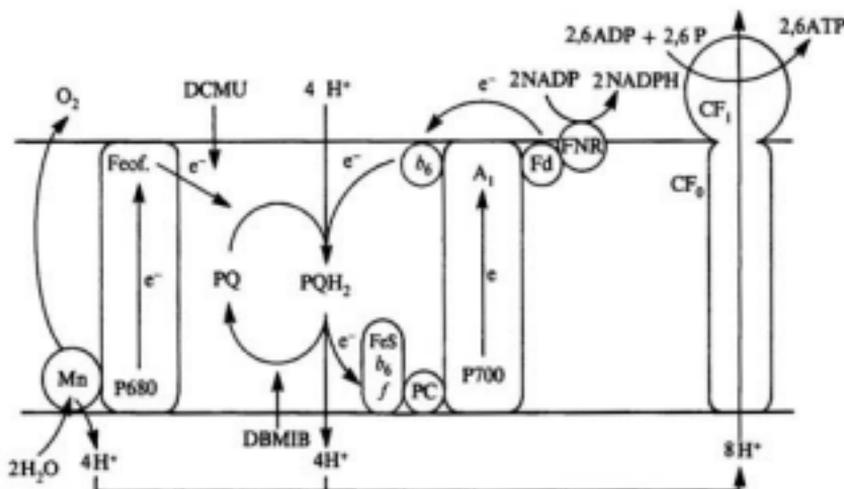


Figura 13.2.—Flujo electrónico fotosintético con indicación de los posibles lugares de conservación de energía y estequiometría de la fase luminosa.

y el segundo entre el primer aceptor de electrones del fotosistema II y el complejo citocromo  $b_6$ -cit.  $f$  (Fig. 13.2). En cuanto al segundo lugar, hay serias dudas sobre a qué clase de flujo electrónico corresponde, ya que es prácticamente imposible distinguir entre lugar de formación de ATP en la ruta cíclica o no cíclica. De acuerdo con la teoría quimiosmótica que estudiaremos más adelante, sólo a nivel de la plastoquinona sería posible la formación de ATP. Se ha especulado mucho sobre la participación o no de la plastoquinona en el trayecto cíclico, y hoy parece bastante claro que si el flujo cíclico de electrones ha de producir un gradiente de protones, es absolutamente imprescindible la participación de la plastoquinona. Por tanto, el flujo cíclico y no cíclico habrán de compartir una serie de transportadores de electrones, pareciendo los más firmes candidatos la ferredoxina, plastoquinona, complejo citocromo  $b_6$ -cit.  $f$ , plastocianina y una proteína Fe-S. El único componente específico de la ruta cíclica podría ser un citocromo  $b_6$ , sensible a la Antimicina A y que actuaría como eslabón entre la ferredoxina y la plastoquinona, los dos puntos de ramificación en la cadena transportadora.

### 13.5. Mecanismo de la fotofosforilación

Podemos distinguir tres fases en el proceso de formación de ATP:

1. Captura de la energía en los complejos de oxidación.
2. Transporte de esta energía hasta los lugares de fosforilación.
3. Utilización de esta energía para sintetizar el ATP.

Se han realizado grandes esfuerzos durante los últimos 25 años para tratar de comprender estos procesos. Como resultado de estos trabajos, se han propuesto tres hipótesis para tratar de explicar el mecanismo del acoplamiento entre transporte de electrones y síntesis de ATP.

En 1953, Slater propone la llamada *hipótesis del acoplamiento químico*, que postula que la reacción de transferencia electrónica productora de energía se acopla a la reacción consumidora de energía en la que se forma ATP a través de un intermediario común rico en energía, y originado por la formación de enlaces químicos entre los transportadores de electrones y las enzimas o incluso los sustratos de la reacción de fosforilación, y posterior oxidación de estos complejos. Este intermediario, rico en energía, sería utilizado posteriormente como reactivo en una segunda reacción en la que se formaría el ATP a expensas del ADP y del fosfato. Esta hipótesis está muy desacreditada, ya que no está apoyada por ninguna evidencia experimental convincente. En 1964, Boyer propone la *hipótesis del acoplamiento conformacional*. Esta hipótesis postula que la energía producida en el transporte electrónico, se conserva en forma de un cambio de conformación provocado en una proteína transportadora de electrones o en la molécula del factor acoplante (factor  $F_1$  de la ATPasa). Dicho estado de conformación de energía elevada, sería el resultado de un desplazamiento dependiente de la energía en el número y en la localización de los enlaces débiles que mantienen la conformación tridimensional de las proteínas. La energía inherente a esta conformación sería empleada en la formación de ATP a partir de ADP y fosfato. Al mismo tiempo, la proteína transpor-

tadora de energía experimentaría una reversión a su estado de conformación original de bajo contenido energético. Al igual que la hipótesis anterior, tampoco ésta posee el apoyo experimental necesario como para pensar que la captura y transmisión de la energía tenga lugar por cambio conformacional en algunas proteínas.

La hipótesis que goza de mayor soporte experimental y aceptación entre los investigadores es la llamada del acoplamiento quimiosmótico o *hipótesis quimiosmótica*, propuesta por Peter Mitchell en 1961. Esta hipótesis niega la existencia de cualquier intermediario químico que acople las reacciones productoras con las consumidoras de energía en la fosforilación. Mitchell propone que el flujo de electrones a través del sistema transportador, conduciría hidrogeniones cargados positivamente, o protones, a través de las membranas de cloroplastos, mitocondrias y células bacterianas. A consecuencia de ello se crearía un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. El gradiente constaría de dos componentes: una diferencia en la concentración de hidrogeniones o pH y una diferencia de potencial eléctrico. La síntesis de ATP se lleva a cabo por un flujo de protones en sentido inverso, a favor de gradiente (Fig. 13.3). Los trabajos realizados durante los últimos 15 años han probado que los postulados básicos de la teoría quimiosmótica son en su mayoría ciertos, aun cuando algunos detalles siguen siendo objeto de grandes controversias.

De acuerdo con la hipótesis quimiosmótica, la membrana constituye una parte inte-

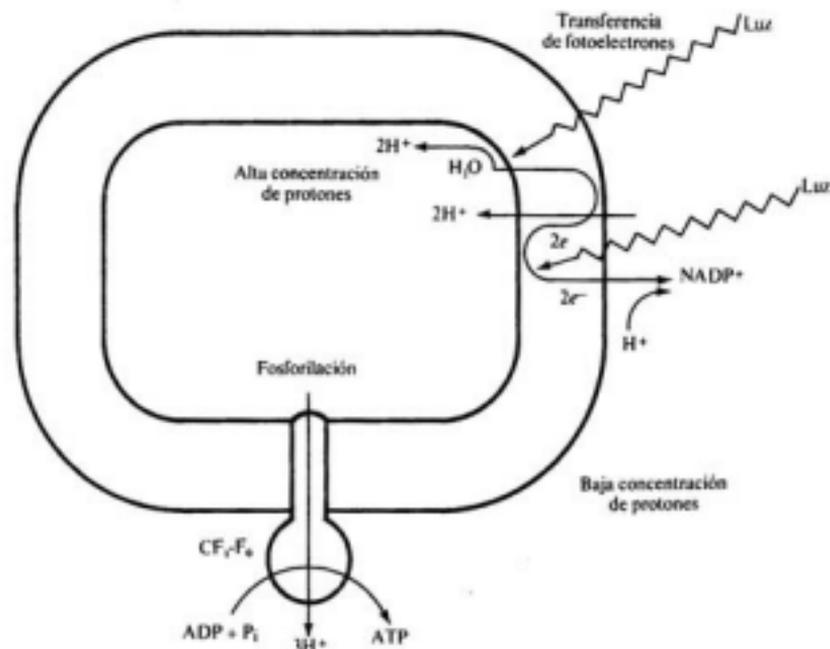


Figura 13.3.—Esquema de la hipótesis quimiosmótica, tal como se supone que funciona en cloroplastos (según P. C. Hinkle y R. E. McCarty, *Cómo fabricar ATP las células*, «Investigación y Ciencias», mayo 1978).

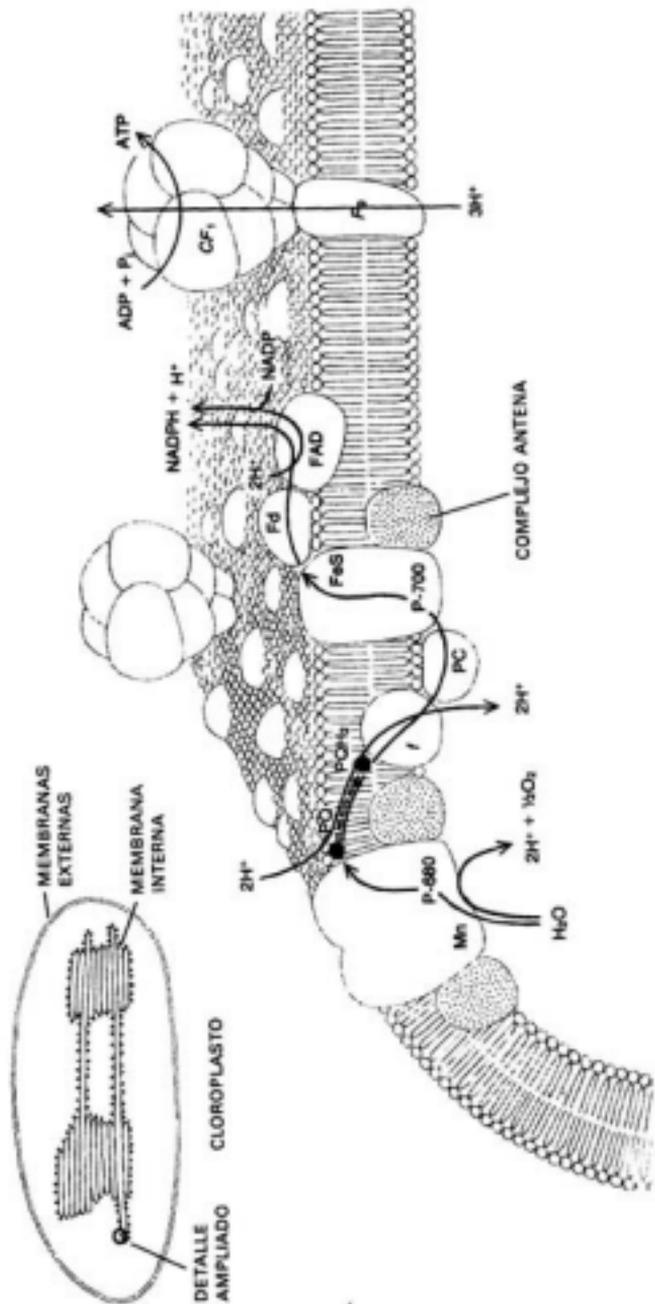


Figura 13.4.—Reconstrucción de la membrana del cloroplasto y situación de los distintos transportadores en la misma (según P. C. Hinkle y R. E. McCarty, *Cómo fabrican ATP las células*, «Investigación y Ciencia», mayo 1978).

gral del mecanismo de acoplamiento y debe hallarse intacta, en forma de vesícula continua cerrada para que se verifique la fosforilación. Los transportadores de electrones embebidos en la membrana deben estar colocados secuencialmente, de tal forma que alternen con transportadores de átomos de hidrógeno. Estos últimos deben estar orientados en la membrana de tal forma, que vengan los electrones de donde vengan, el protón que los complementa debe proceder del exterior de la membrana, y cuando cedan los electrones a un transportador de electrones el protón complementario debe ser liberado en el interior de la membrana. De esta forma, el transporte de electrones a través de la cadena, está acoplado obligatoriamente al transporte vectorial de protones a través de la membrana. En la figura 13.2 puede verse la forma en que tiene lugar el transporte de hidrogeniones en las membranas del cloroplasto. Los primeros protones internos son los liberados a partir de la fotólisis del agua, que constituye el sitio II de conservación de energía. El segundo grupo de protones penetra en el interior durante la reoxidación de la plastoquinona, y representa el sitio I de conservación de energía.

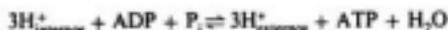
En la figura 13.4 se representa una reconstrucción hipotética de la membrana del cloroplasto basada en pruebas por ahora fragmentarias; sólo se tiene alguna certeza sobre la disposición de la ferredoxina en la parte externa de la membrana y de la plastocianina en la superficie interna; las demás características del modelo, aunque bastante probables, son más especulativas. En este modelo de la membrana interna del cloroplasto puede verse representada la cadena de transferencia electrónica, que al contrario que en mitocondrias, comienza en el agua y termina en el NADPH. En los cloroplastos, también al contrario que en mitocondrias, los protones son transportados al interior a través de la membrana interna y son acumulados dentro. Para que los electrones puedan fluir desde el agua al NADP<sup>+</sup> ha de elevarse la energía libre del estado inicial, lo que se consigue mediante la absorción de la luz por los pigmentos dispuestos en dos fotosistemas. Como ya sabemos, cada fotón absorbido conduce un electrón a través de la membrana interna. Ya sabemos también cómo en las membranas de los cloroplastos este transporte de electrones está acoplado al transporte de protones hacia el interior del cloroplasto. El gradiente de protones, establecido por medio del transporte de electrones, representa un almacenamiento de energía libre que puede recuperarse permitiendo el flujo inverso de protones a través de la membrana, y la energía así liberada, puede provocar la fosforilación del ADP a ATP, así como potenciar otros procesos tales como el transporte activo de ciertos iones (Cl<sup>-</sup> hacia el interior, Mg<sup>++</sup> hacia el exterior). La energía se almacena en el gradiente de protones de dos formas: bajo forma de gradiente de pH creado por la acidificación del interior, y otra, bajo la forma de una diferencia de potencial eléctrico creado por el movimiento neto de las cargas a través de la membrana, quedando más positivo en el interior. Los dos componentes son aditivos y contribuyen a lo que se conoce como fuerza motora de los protones a través de la membrana:

$$\Delta pmf = \Delta pH + \Delta \psi$$

donde pmf es la fuerza motora de los protones (*proton motive force*) y  $\psi$  es el potencial de membrana. Esta pmf es el estado de alta energía que hace posible la síntesis del ATP a través de una ATPasa vectorial reversible, localizada en la membrana interna del cloroplasto. El sentido vectorial lo es fundamentalmente con respecto al movimiento de

protones y de iones hidroxilo implicados en la reacción de deshidratación ( $\text{ADP} + \text{P}_i$ ) que conduce a la formación de ATP. La descarga vectorial de los hidroxilos hacia el interior, y su consiguiente recombinación con los protones para formar agua, «empuja» a la deshidratación enzimática. En dirección contraria hay un bombeo de hidrogeniones hacia el exterior (Fig. 13.5).

Parece necesario el paso de tres hidrogeniones desde el espacio interior del sistema endomembranoso del cloroplasto al estroma para que pueda formarse una molécula de ATP. El proceso puede describirse mediante la ecuación:



El proceso cuya estequiometría puede verse en la figura 13.2, está catalizado por una ATPasa translocadora de protones localizada en las membranas de los tilacoides. La porción expuesta de la superficie y en contacto con el estroma se denomina  $\text{CF}_1$  y se une a un componente hidrofóbico que forma parte de la membrana, denominado  $\text{CF}_0$ , y que sirve como canal de protones. Esta ATPasa consta de 8 subunidades: 5 pertenecientes a  $\text{CF}_1$  y 3 a  $\text{CF}_0$ . Entre las subunidades de  $\text{CF}_0$ , la más pequeña (subunidad III con un peso molecular de 8 KD) es un proteolípido al que se une DCCD (díclohexilcarbodiimida) inhibidor de la síntesis de ATP y del transporte de protones, y que probablemente forma la pared interna del canal de protones. La subunidad II (12,5 KD) parece prevenir la disociación de la estructura hexamérica del proteolípido. La subunidad I (15 KD) parece contener el lugar de unión con el  $\text{CF}_1$ . Las 5 subunidades de  $\text{CF}_1$  son designadas por las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , con un peso molecular de 59, 56, 37, 17,5 y 13 KD, respectivamente. Estudios con rayos X sugieren que  $\text{CF}_1$  presenta una estructura elipsoidal constituido por  $2\alpha$ ,  $2\beta$ ,  $1\gamma$ ,  $1\delta$ ,  $2\epsilon$ . El sitio activo parece localizado en las subunidades  $\beta$ , las  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  tienen papel regulador del proceso y  $\delta$  facilita la unión del complejo  $\text{CF}_1 - \text{CF}_0$ .

No se conoce el mecanismo de síntesis de ATP en el locus activo del complejo  $\text{CF}_1 - \text{F}_0$ . Se han formulado varias hipótesis, pero los estudios del enzima no han proporcionado razones suficientes como para decidir entre ellas. Uno de los hipotéticos mecanismos fue propuesto por Mitchell. Según este esquema, un grupo fosfato se une al enzima

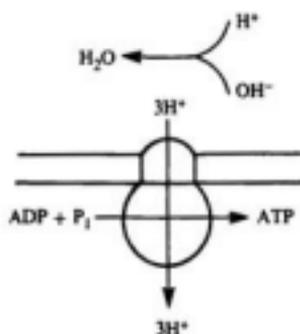


Figura 13.5.—Transporte iónico vectorial en la síntesis de ATP en membranas de cloroplastos.

en el locus activo en la parte  $CF_1$  del complejo, pero cerca del canal de protones. Tres protones impulsados (dos en el caso de mitocondrias) por el canal mediante la fuerza motora de protones atacan uno de los oxígenos del fosfato provocando su pérdida para formar una molécula de agua. El enlace fosfórico libre creado de esta manera, transforma el grupo fosfato en una especie altamente reaccionante que puede enlazarse directamente con el ADP (Fig. 13.6 a).

Varias hipótesis alternativas se han propuesto a ésta que acabamos de describir de las protonaciones de un átomo de oxígeno del fosfato. En las principales, una idea <sup>†</sup>

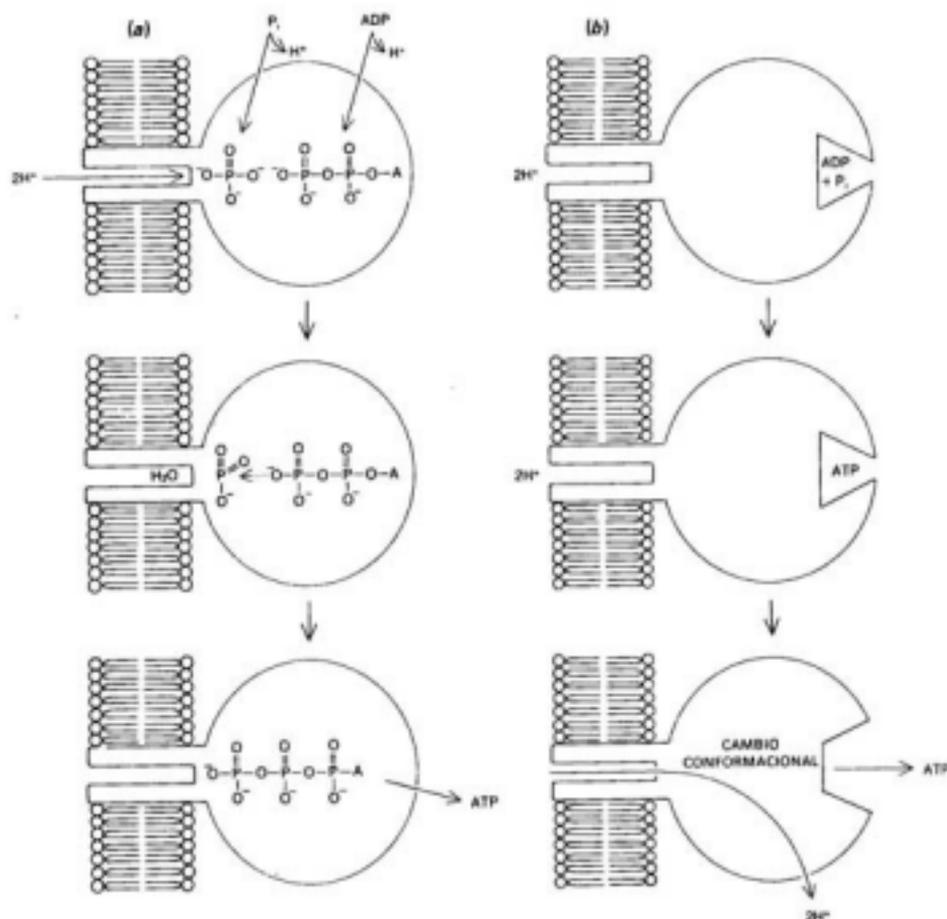


Figura 13.6.—Posibles mecanismos de fosforilación en cloroplastos y mitocondrias. Explicación en el texto (tomado de P. C. Hinkle y R. E. McCarty, *Cómo fabrican ATP las células*, «Investigación y Ciencia», mayo 1978).

común es que el paso de protones por la parte  $CF_1$  o  $F_1$  (en mitocondrias) del complejo podría cambiar la conformación proteica. Boyer propone que los cambios inducidos por protones en la conformación proteica en las proximidades del locus activo, podría dar lugar a la síntesis de ATP. En un mecanismo de este tipo, la separación de la molécula de ATP y el enzima es el paso crucial en donde se requiere la energía (Fig. 13.6 b). Aunque el ADP libre no puede combinarse con el fosfato sin un aporte de energía, la reacción podría tener lugar espontáneamente si ambas moléculas estuvieran ligadas a una proteína. El ATP resultante permanecería unido al enzima y sólo podría separarse con la adición de energía aportada por un cambio conformacional basado en la transferencia de protones. Varios investigadores han observado cambios en la conformación del  $CF_1$  de cloroplastos cuando éstos son iluminados o cuando se crean gradientes de pH momentáneos. También se ha observado que el factor  $CF_1$  posee ADP y ATP fuertemente unidos a él y que el ADP puede intercambiarse por nucleótidos del medio al formarse un gradiente de protones. Todos estos hallazgos pueden interpretarse en el sentido de que los cambios conformacionales pueden desempeñar un papel importante en el mecanismo de fotofosforilación. A pesar de todo ello, sigue siendo la hipótesis quimiosmótica la que goza de una mayor aceptación y apoyo experimental. Los cambios conformacionales son universales en los enzimas y pueden ser propios de su actividad catalítica.

### 13.6. Evidencia experimental en favor del funcionamiento de la hipótesis quimiosmótica en cloroplastos

Es evidente que si pudiera determinarse el pH del interior de los cloroplastos y el del medio exterior y, por consiguiente, comprobar que existe un gradiente de pH, constituiría un fuerte apoyo experimental a la hipótesis quimiosmótica. La miniaturización de los electrodos ordinarios ha permitido medir el pH interno en algunos cloroplastos gigantes y observar cómo éste cambia de 6,2 en oscuridad a 4,6 en la luz. Sin embargo, los mejores resultados se han obtenido a través de métodos indirectos, como la determinación de bases débiles en el interior y exterior de membranas de tilacoides iluminados. Este procedimiento asume que las bases no protonadas pueden atravesar fácilmente la membrana, mientras que las formas protonadas son completamente impermeables. Así, cuando los protones del interior atrapan la base en su forma protonada, la concentración interna será mayor que la externa. También la utilización de bases fluorescentes (9-amino-acridina, atebriina) cuya fluorescencia es amortiguada por las membranas energizadas. Todos estos procedimientos coinciden en indicar el hecho de que tilacoides iluminados bajo condiciones óptimas mantienen un gradiente de pH de 3 a 3,5 unidades más ácido en el interior que en el medio exterior. Además, como era de esperar, el gradiente de pH aumenta al aumentar la intensidad luminosa y el flujo de electrones y disminuye por la acción de los desacopladores. Se ha encontrado también una relación lineal entre el logaritmo de la intensidad de fotofosforilación (desde 1 hasta casi 1.000  $\mu\text{mol/mg}$  clorofila/h) y el gradiente de pH. Este resultado es indicativo de que la fuerza motora de protones puede ser la responsable de la fosforilación en presencia de luz.

También mediante la utilización de microelectrodos ha sido posible obtener señales

relativas al potencial de membrana en cloroplastos. Los resultados obtenidos muestran consistentemente un potencial más positivo en el interior de los tilacoides en la luz que en la oscuridad, oscilando los valores obtenidos entre 5 y 40 mV. Este método tiene la gran desventaja de que es muy difícil la colocación exacta de la punta del electrodo y que pueden originarse bastantes daños en la membrana por la inserción de un objeto extraño como es el electrodo, por lo que los valores obtenidos no serán los que realmente existen. Otra forma de abordar el problema es basándose en el hecho de que las ATPasas contienen también un centro enzimático para la hidrólisis del ATP. Una vez activado este centro por el estado de alta energía y la presencia de compuestos con grupos -SH, permanece activo en la oscuridad mientras se mantenga un suministro adecuado de ATP. Si la actividad hidrolítica representa una reversión del proceso de síntesis de ATP (Fig. 13.6) entonces, según la teoría quimiosmótica, la hidrólisis del ATP debe bombear protones hacia el interior del tilacoide elaborando una fuerza motora de protones de igual forma que lo hace la iluminación. Esta predicción ha podido ser comprobada experimentalmente al medir bajo estas condiciones un aumento de pH en el medio externo. Otro descubrimiento que favorece la hipótesis quimiosmótica, es el realizado por Jagendorf y sus colaboradores, de que un gradiente de pH elaborado artificialmente a través de la membrana del cloroplasto, puede impulsar la fosforilación del ADP en la oscuridad sin que tenga lugar entrada luminosa alguna (Fig. 13.7). Se hace descender el pH de los cloroplastos sumergiéndolos en una solución ácida tamponada a pH 4,0. Posteriormente, los cloroplastos se pasan, siempre en oscuridad, a otra solución tamponada a pH 8,5 conteniendo ADP y fosfato. El gradiente momentáneo de pH que se crea a través de la membrana es capaz de producir una formación súbita de ATP, mientras simultáneamente desaparece el gradiente de pH. Esta formación de ATP en oscuridad es insensible a los inhibidores del transporte de electrones; sin embargo, es sensible a los mismos inhibidores de transferencia de energía y anticuerpo inhibitor del  $CF_1$  que la fosforilación inducida por la luz y el transporte de electrones. Una evidencia experimental en favor de que el gradiente de pH es la fuerza impulsora de la fosforilación, se obtiene por el hecho demostrable de que un salto de cuatro unidades de pH, lo mismo da que sea de 4,0 a 8,0, como de 6,0 a 10,0, es igualmente efectivo en la activación de la ATPasa.

Una de las más importantes pero difíciles tareas al probar el funcionamiento de la hipótesis quimiosmótica, es la de encontrar la exacta estequiometría entre los electrones que pasan por cada sitio de fosforilación, los protones transportados a través de la membrana y las moléculas de ATP formadas. La teoría quimiosmótica tal como fue



Figura 13.7.—Fosforilación del ADP en cloroplastos mediante un gradiente de pH.

propuesta por Mitchell predice unos valores de  $1 \text{ H}^+$  por cada  $e^-$  que pasa por uno de los sitios de fosforilación y de  $2\text{H}^+$  transportados a través de la membrana por cada ATP sintetizado, lo que equivale a un cociente  $P/2e$  de uno en cada sitio de fosforilación. Las determinaciones reales dan valores de  $2\text{H}^+$  por cada electrón que se desplaza desde el agua al fotosistema I, lo que indica dos lugares de liberación de protones. En cuanto a la relación  $\text{H}^+/\text{ATP}$ , es decir, protones que atraviesan la membrana por cada ATP sintetizado, los valores obtenidos oscilan entre 2 y 4, siendo la mayoría los resultados obtenidos próximos a 3, por lo que la evidencia experimental actual parece sugerir que en cloroplastos se necesitan tres protones para que se sintetice una molécula de ATP.

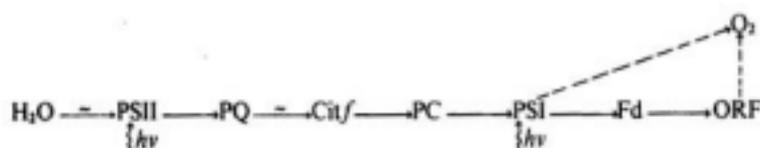
Por último, una prueba crucial para la teoría quimiosmótica es saber si la fuerza motora de protones a través de la membrana, que se crea en la luz, es suficiente como para poder ser responsable de la síntesis de ATP bajo las condiciones de reacción actuales y con los valores estequiométricos establecidos. La energía necesaria para establecer el tercer enlace fosfato y formar ATP a partir de ADP y  $\text{P}_i$  en cloroplastos está comprendida como hemos dicho anteriormente, entre 14 y 15 kcal/mol. Esta energía debe proceder probablemente del paso de tres protones a través de la membrana. Los cálculos realizados sobre la fuerza motora de protones requerida, expresada bien como gradiente de potencial de membrana en mV o como gradiente de pH en unidades de pH, para poder sintetizar una molécula de ATP asumiendo un valor del cociente  $\text{H}^+/\text{ATP}$  de 3, son los siguientes:

$$\Delta\psi \text{ (mV)} = 208; \Delta\text{pH (unidades)} = 3,3$$

Como hemos visto anteriormente al comienzo de este apartado se han detectado gradientes de pH en cloroplastos de hasta 3,5 unidades, por lo que si tres protones cooperan para sintetizar un ATP, el suministro energético es suficiente para poder llevarla a cabo.

### 13.7. Fotofosforilación pseudocíclica

La fotofosforilación cíclica en cloroplastos ha sido estudiada, generalmente, bajo condiciones de anaerobiosis. Tal planteamiento experimental ha sido debido a la necesidad de demostrar la total independencia de la formación de ATP inducida por la luz de la fosforilación oxidativa que tiene lugar en las mitocondrias y que, como es sabido, consume oxígeno. Hoy, aunque no existe ninguna duda de la independencia de estos dos procesos, se siguen utilizando las condiciones de anaerobiosis para distinguir entre fotofosforilación cíclica y fotofosforilación pseudocíclica, en la que el oxígeno en lugar del NADP es el aceptor terminal de electrones. La presencia de esta reacción puede demostrarse fácilmente en cloroplastos rotos controlando la toma de oxígeno inducida por la luz y su control fotosintético por ADP. Esta fotofosforilación requiere la presencia de los dos fotosistemas y de los transportadores de electrones entre ambos, y que son idénticos a los del transporte no cíclico de electrones:



En este esquema permanece aún en duda la participación de la ferredoxina y la de un factor reductor del oxígeno (ORF). Parecen existir también, al igual que en la fotosíntesis no cíclica, dos lugares de conservación de la energía. Es inhibida por inhibidores de la fosforilación. También se inhibe por concentraciones bajas de oxígeno. Es activada por el  $CO_2$  y también si la oxidación del NADPH endógeno se encuentra limitada. En cuanto a su función fisiológica, puede ser la de suministrar ATP para la toma de iones o para la formación de polifosfatos. Su participación mediante el aporte de ATP a la fijación del  $CO_2$ , aunque posible, no ha podido ser por ahora demostrada de forma inequívoca.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- GOVINDJEE (ed.): *Photosynthesis*, vol. I: *Energy Conversion by Plants and Bacteria*, Academic Press, 1982.
- HINKLE, P. C., y McCARTY, R. E.: *Cómo fabrican ATP las células*, «Investigación y Ciencias», mayo 1978.
- JAGENDORF, A. T.: *Photophosphorilation*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, A. Trebst y M. Avron (eds.), vol. 5, Springer-Verlag, Berlin, 1977.
- KUK, B.: *Photosynthesis: The Path of Energy*, en: *Plant Biochemistry*, J. Bonner y J. E. Varner (eds.), Academic Press, Nueva York, 1976.
- MUÑOZ, E., y ANDRÉS, J. M.: *Mecanismo molecular de la transducción de energía*, «Investigación y Ciencias», febrero 1979.
- STROTMANN, H., y BICKEL-SANDKÖTTER, S.: *Structure, Function and Regulation of Chloroplast ATPase*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», 35: 97-120, 1984.
- STUMPF, P. K., y CONN, E. E. (eds.): *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise, volume 8: Photosynthesis*, Academic Press, 1981.
- TREBST, A.: *Energy Conservation in Photosynthetic Electron Transport of Chloroplast*, «Ann. Rev. Plant Physiology», vol. 25, 1974, págs. 423-458.

## ASIMILACIÓN DEL CO<sub>2</sub>. CICLO DE CALVIN

Clásicamente, a los procesos enzimáticos de conversión del CO<sub>2</sub> en carbohidratos, se les denomina colectivamente proceso oscuro de la fotosíntesis, pues pueden realizarse en el laboratorio en ausencia de luz si se suministran los intermedios que se producen en el llamado proceso luminoso, es decir, ATP y NADPH. En la práctica, el llamado proceso luminoso incluye muchas etapas que no implican absorción de energía luminosa ni transferencia de excitación. Sin embargo, los procesos de transferencia electrónica hasta ferredoxina y la fotofosforilación, ocurren tan rápidamente y en tan íntima asociación con los de absorción de luz y transferencia de excitación en los tilacoides, que aunque algo abusivamente, sigue siendo justificada la distinción clásica entre proceso oscuro y luminoso y el papel del ATP y el NADPH como enlace entre ambos procesos.

Todas las etapas de la conversión fotosintética del CO<sub>2</sub> en carbohidratos, ocurren normalmente en el estroma de cloroplastos. Básicamente, se pueden distinguir tres etapas:

- a) Fijación del CO<sub>2</sub>, es decir, su inclusión en algún compuesto orgánico.
- b) Reducción de intermediarios metabólicos.
- c) Reordenación de productos.

Cada etapa puede incluir subetapas de activación o empuje exergónico con ATP. En general, excepto quizás en algunas bacterias, las etapas b) y c) parecen idénticas en todos los organismos fotosintéticos. En cambio, existe un grado significativo de diversidad en el mecanismo usado por las distintas plantas para la etapa a). El mecanismo más extendido para la etapa a), en cuanto a número de especies que lo utilizan, fue descubierto a raíz de una serie de experimentos de Calvin, Benson y Bassham en 1949, que llevaron al descubrimiento de los distintos pasos del proceso total de conversión del CO<sub>2</sub> en carbohidratos. En este capítulo estudiaremos este proceso global, con la vía de fijación descubierta por Calvin y colaboradores, y que llamaremos ciclo de Calvin, mientras que en el siguiente (Cap. 15), estudiaremos otras vías de fijación y otros esquemas propuestos en general. Incluimos en esta misma lección, el estudio de alguna de las principales vías metabólicas que parten del ciclo de Calvin.

### 14.1. Metodología del descubrimiento del ciclo de Calvin

Se suponía, con razón que la conversión de  $\text{CO}_2$  en hexosas, en sacarosa o en almidón, implicaba una serie de intermediarios cuya concentración estacionaria era muy baja. La cuestión era identificar esos intermediarios y establecer la secuencia de los procesos que, implicando a esos intermediarios, convierten las moléculas de  $\text{CO}_2$  en azúcar. Para salvar el problema de la baja concentración de los intermediarios, hacia 1949 se logró disponer  $\text{CO}_2$  marcado radiativamente con el isótopo de carbono de masa 14 daltons ( $^{14}\text{CO}_2$ ). Aquel intermediario que lleve  $^{14}\text{C}$  después de exponer la maquinaria fotosintética al  $^{14}\text{CO}_2$ , se puede detectar sensiblemente por su radiactividad. Por aquella época se desarrolló también la técnica de cromatografía en papel. Con ella, se pueden separar los distintos intermediarios, y cada uno se puede identificar por la posición que ocupa, después de desarrollar la cromatografía en unas condiciones prefijadas y comparar con cromatografías de compuestos patrón.

Si un intermediario está radiactivo porque incluye  $^{14}\text{C}$  procedente del  $^{14}\text{CO}_2$ , en la posición que le corresponde después de la cromatografía habrá radiactividad, y ésta se podrá detectar, por ejemplo, con una película fotográfica sensible, en este caso, a la radiación  $\beta$  emitida por el  $^{14}\text{C}$ . Esta película, después de la exposición, nos dará una imagen de todo el papel de la cromatografía, con manchas de mayor o menor intensidad, y que corresponden a compuestos que contienen  $^{14}\text{C}$ .

Si la exposición del material biológico con capacidad fotosintética al  $^{14}\text{CO}_2$ , ha sido muy corta, sólo aparecerán marcados radiativamente los primeros compuestos intermediarios de la secuencia que conduce desde  $\text{CO}_2$  hasta azúcar. A tiempos mas prolongados, se irán marcando sucesivamente intermediarios posteriores, pudiéndose así establecer la secuencia de los intermediarios. El marcaje radiactivo de los intermediarios, se puede incluso determinar cuantitativamente.

Calvin y sus colaboradores, usaron cromatografía bidimensional en papel para separar los intermediarios. Para mayor facilidad en el laboratorio, realizaron los experimentos con el alga *Chlorella*. A distintos tiempos después de exponerlo al  $^{14}\text{CO}_2$ , tomaban fracciones del cultivo líquido de *Chlorella* y las añadían a etanol de 80 por 100 hirviendo, con lo cual rápidamente mataban las células y paraban el proceso fotosintético. Extraían los metabolitos intermediarios y sometían el extracto a cromatografía.

Según el tiempo durante el cual la suspensión iluminada de *Chlorella* había estado en presencia de  $^{14}\text{CO}_2$ , se encontraban diversos productos marcados radiativamente. Así, al cabo de 1 minuto, un gran número de productos, incluyendo azúcares fosforilados aminoácidos y ácidos orgánicos, tenían marcaje de  $^{14}\text{C}$ . Al reducir el tiempo de exposición al  $^{14}\text{CO}_2$ , se reducía considerablemente el número de productos marcados, y así cuando la exposición duraba sólo 2 segundos, la mayor parte del marcaje radiactivo, aparecía sólo en el ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA). Así, este compuesto era el primer producto que resultaba de la incorporación del  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CO}_2$  en la materia orgánica.

Para identificar al precursor que con  $^{14}\text{CO}_2$  daba 3-PGA marcado, se pensó razonablemente que ese precursor se acumularía en condiciones de iluminación y ausencia de  $\text{CO}_2$ . Entonces se suministró durante algún tiempo  $^{14}\text{CO}_2$  al alga y después se pasó ésta a condiciones de total ausencia de  $\text{CO}_2$ . Evidentemente, la mancha de cromatografía en

que se detectó una más rápida disminución de marcaje, fue en la correspondiente al 3-PGA, puesto que éste rápidamente se transformaba en otros productos y no podía formarse de nuevo. En cambio, en otra posición de la cromatografía, se encontró un aumento de marcaje. Esta otra posición correspondía al compuesto ribulosa-1,5-difosfato (RuDP) que, evidentemente, se acumulaba porque no se podía transformar en 3-PGA al faltar CO<sub>2</sub>. El hecho de que no disminuyera el marcaje de RuDP sino que además aumentara, sugería que éste era formado en un proceso cíclico con productos formados a partir de 3-PGA. Así, en la etapa de fijación del CO<sub>2</sub>, una molécula de éste se combina con una molécula de 5 átomos de carbono, para dar 2 moléculas de 3 átomos de carbono.

Cuando la incubación con <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> se hacía a tiempos cortos, en el 3-PGA sólo aparecía marcaje en el carbono de la posición 1. Pero a tiempos de incubación con <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> más prolongados, aparecía marcaje en otras posiciones del 3-PGA, lo que de nuevo sugería que ocurría un proceso cíclico que acompañaba a la producción fotosintética de hexosas a partir del CO<sub>2</sub>.

#### 14.2. Formulación y funcionamiento del ciclo de Calvin

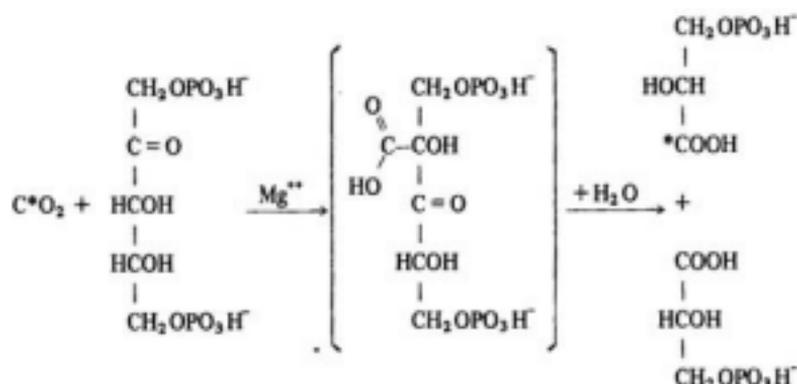
Otros experimentos iniciales para aclarar el mecanismo de formación fotosintética de hexosas a partir de CO<sub>2</sub>, incluyeron: alargamientos sucesivos de los períodos de exposición al <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, para identificar productos formados a partir de 3-PGA, paso a la oscuridad continuando en presencia de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (con lo que se acumularían sustratos de las etapas de reducción y disminuiría RuDP), identificación de algunas actividades enzimáticas, etc.

Con los datos obtenidos, Calvin postuló un ciclo, en cuya operación repetida son utilizadas moléculas de CO<sub>2</sub> y se producen hexosas. Seis moléculas de RuDP con seis de CO<sub>2</sub> se transforman en doce de 3-PGA; estas doce moléculas sufren una serie de transformaciones como resultado de las cuales, se produce una molécula de hexosa y con los treinta átomos de carbono restantes se regeneran otras seis moléculas de RuDP. En la figura 14.1 se representan las transformaciones implicadas en el ciclo de Calvin. Posteriormente a la formulación de este ciclo por Calvin, se demostró la presencia en cloroplastos de todos los enzimas requeridos para su funcionamiento, siendo, por tanto, el ciclo ampliamente aceptado hoy día. En la figura 14.1 hemos representado el ciclo con algunos datos que no surgieron directamente de los experimentos de Calvin, como es el tipo de coenzimas utilizados. Ensayos con otros organismos fotosintéticos demostraron que el ciclo de Calvin es la vía más frecuente para la fijación y reducción del CO<sub>2</sub>. En el capítulo siguiente analizaremos los límites de esta generalización.

Como hemos indicado ya, la primera etapa del ciclo consiste en la fijación del CO<sub>2</sub> sobre la RuDP. Esta reacción (1 en la figura) es catalizada por el enzima ribulosa-difosfato carboxilasa que no es otro que la llamada fracción proteínica 1 de cloroplastos (Cap. 10). Esta proteína, por sí sola, supone aproximadamente un 25 por 100 del total de proteínas de la hoja. El enzima es activado por Mg<sup>++</sup>, es una proteína oligomérica de peso molecular aproximado 550.000 daltons, que consta de ocho subunidades idénticas de alto peso molecular (55.000 daltons) y ocho subunidades de bajo peso molecular (15.000



daltons), también idénticas entre sí. El sustrato de la reacción es el propio CO<sub>2</sub> y no el CO<sub>2</sub>H<sup>-</sup>. La K<sub>m</sub> *in vivo* para el CO<sub>2</sub> es de aproximadamente 15 × 10<sup>-6</sup> M, aunque en ensayos *in vitro* se puede alterar el enzima y dar valores de K<sub>m</sub> más altos. En el proceso de formación del 3-PGA, parece formarse un compuesto intermedio que permanece unido fuertemente al enzima, proponiéndose el mecanismo:

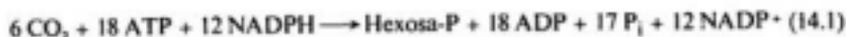


El asterisco indica la posición del carbono procedente del CO<sub>2</sub>. Evidentemente, al principio de exponer la planta al <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, sólo la mitad de las moléculas de 3-PGA están marcadas radiactivamente.

Las dos etapas siguientes del ciclo están catalizadas: ② por la 3-fosfogliceratocinasa y ③ por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Estas etapas equivalen a una reversión de las correspondientes etapas glicolíticas, los enzimas son semejantes a los glicolíticos salvo que el de la reacción ③ usa como piridín nucleótido el NADPH en lugar del NADH. Con la formación del gliceraldehído-3-fosfato (GA-3P) se ha completado la reducción del CO<sub>2</sub> fijado en la etapa ①; todos los carbonos están en el estado de oxidación de azúcares y en realidad, el resto de las etapas consiste sólo en reordenaciones moleculares que utilizando isomerasas (④ y ⑪), una epimerasa (⑫), aldolasas (⑤ y ⑧), transcetolasas (⑦ y ⑩), fosfatasa (⑥ y ⑨) y una kinasa (⑬), producen una hexosa y regeneran seis moléculas de RuDP. Aldolasas y transcetolasas son enzimas poco específicos, por lo que puede que en cada caso sólo exista un enzima para cada tipo de reacción. Los enzimas están en cualquier caso localizados en el estroma de cloroplastos, aunque alguno de ellos también se encuentra en citoplasma. Como veremos más adelante, intermediarios de 3 átomos de carbono pueden atravesar la envoltura de cloroplastos, pasando al citoplasma donde pueden sufrir muchas de las transformaciones indicadas en el ciclo.

El ciclo sólo funciona en el sentido descrito en la figura 14.1, pues hay varias reacciones que son irreversibles en las condiciones presentes en el interior de cloroplastos, estas reacciones son: la catalizada por la RuDP-carboxilasa (①), las catalizadas por las fosfatasa (⑥ y ⑨) y la catalizada por la ribulosa-5-P kinasa (⑬).

El balance del ciclo (en la figura 14.1 se ponen encajadas las sustancias que se consumen o se producen en el ciclo) hasta hexosa fosfato, nos da la reacción global:



en la que no se ha incluido las moléculas de agua.

De acuerdo con la ecuación (14.1), por cada molécula de  $\text{CO}_2$  asimilado, se consumen tres de ATP y dos de NADPH. El producto fructosa-6-fosfato (F6P), puede sufrir diversas transformaciones que analizaremos mas adelante.

La reacción ① constituye la etapa de fijación del  $\text{CO}_2$ . La reacción ③ es la etapa de reducción aunque va precedida de una activación asociada (reacción ②). La etapa de reordenaciones moleculares la constituyen el resto de las reacciones, excepto la ③ que es una reacción de activación previa a la fijación.

### 14.3. Regulación del ciclo de Calvin

El ciclo de Calvin sólo opera en la práctica en condiciones de iluminación, que proporciona ATP y NADPH. El  $\text{CO}_2$  nunca suele faltar y, por tanto, no es normalmente un factor que impida la operación del ciclo. En ausencia de iluminación, disminuyen las concentraciones de ATP y NADPH en cloroplastos, sin embargo, es difícil admitir que disminuyen hasta valores despreciables. En la oscuridad, se producen pequeñas cantidades de ATP y NADPH para mantener un mínimo de estado funcional de los cloroplastos. Probablemente, el ATP y el NADPH se producen en el citoplasma por degradación de reservas de azúcares vía glicolisis y vía hexosa monofosfato o ciclo de las pentosas. Lo que sería fatal para la célula, es que el ciclo de Calvin siguiera operando en la oscuridad con las pequeñas cantidades de ATP y NADPH que se han de producir, pues el proceso equivaldría a un continuo formar y degradar carbohidratos con un balance neto de un alto consumo inútil de ATP. Por estos motivos, no es de extrañar que existan mecanismos reguladores específicos que controlan la operación del ciclo y eviten que opere en la oscuridad. Estos mecanismos actúan conjuntamente con los estequiométricos debidos a la disminución de ATP y NADPH en la oscuridad.

Los mecanismos de control operan principalmente sobre las etapas irreversibles del ciclo, y algunos de ellos se conocen con cierto detalle. Se trata de mecanismos que determinan que el ciclo no pueda operar en la oscuridad.

La actividad ribulosa-difosfato carboxilasa está controlada por luz debido, entre otros motivos, a que el enzima tiene un pH óptimo ligeramente alcalino y requiere  $\text{Mg}^{++}$ . Como se explicó en el capítulo 10, el enzima, aunque adherido a los tilacoides, se encuentra orientado hacia el estroma. Como la iluminación determina una entrada de protones hacia el interior de los tilacoides (Cap. 13), hacia el exterior, en el estroma se produce una subida de pH que activa a la ribulosa-difosfato carboxilasa. La entrada de protones al interior de tilacoides, estimulada por luz, va acompañada de una salida de  $\text{Mg}^{++}$  para contrarrestar en parte el déficit de carga eléctrica, con lo que de nuevo se provoca un aumento de la actividad ribulosa-difosfato carboxilasa. Con un razonamiento inverso, se vería cómo la ausencia de luz determina una disminución de la actividad ribulosa-difosfato carboxilasa. Adicionalmente, el enzima parece existir en una forma activa y otra inactiva, predominando la última en la oscuridad por razones aún no claras.

El balance del ciclo (en la figura 14.1 se ponen encuadradas las sustancias que se consumen o se producen en el ciclo) hasta hexosa fosfato, nos da la reacción global:



en la que no se ha incluido las moléculas de agua.

De acuerdo con la ecuación (14.1), por cada molécula de  $\text{CO}_2$  asimilado, se consumen tres de ATP y dos de NADPH. El producto fructosa-6-fosfato (F6P), puede sufrir diversas transformaciones que analizaremos más adelante.

La reacción ① constituye la etapa de fijación del  $\text{CO}_2$ . La reacción ③ es la etapa de reducción aunque va precedida de una activación asociada (reacción ②). La etapa de reordenaciones moleculares la constituyen el resto de las reacciones, excepto la ③ que es una reacción de activación previa a la fijación.

### 14.3. Regulación del ciclo de Calvin

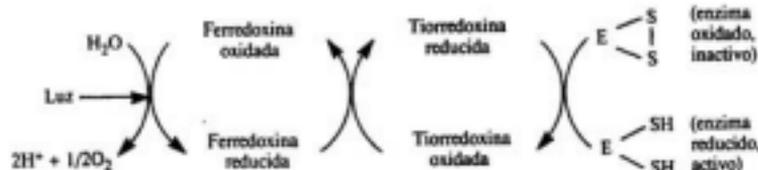
El ciclo de Calvin sólo opera en la práctica en condiciones de iluminación, que proporciona ATP y NADPH. El  $\text{CO}_2$  nunca suele faltar y, por tanto, no es normalmente un factor que impida la operación del ciclo. En ausencia de iluminación, disminuyen las concentraciones de ATP y NADPH en cloroplastos; sin embargo, es difícil admitir que disminuyen hasta valores despreciables. En la oscuridad, se producen pequeñas cantidades de ATP y NADPH para mantener un mínimo de estado funcional de los cloroplastos. Probablemente, el ATP y el NADPH se producen en el citoplasma por degradación de reservas de azúcares vía glicolisis y vía hexosa monofosfato o ciclo de las pentosas. Lo que sería fatal para la célula, es que el ciclo de Calvin siguiera operando en la oscuridad con las pequeñas cantidades de ATP y NADPH que se han de producir, pues el proceso equivaldría a un continuo formar y degradar carbohidratos con un balance neto de un alto consumo inútil de ATP. Por estos motivos, no es de extrañar que existan mecanismos reguladores específicos que controlan la operación del ciclo y eviten que opere en la oscuridad. Estos mecanismos actúan conjuntamente con los estequiométricos debidos a la disminución de ATP y NADPH en la oscuridad.

Los mecanismos de control operan principalmente sobre las etapas irreversibles del ciclo, y algunos de ellos se conocen con cierto detalle. Se trata de mecanismos que determinan que el ciclo no pueda operar en la oscuridad.

La actividad ribulosa-difosfato carboxilasa está controlada por luz debido, entre otros motivos, a que el enzima tiene un pH óptimo ligeramente alcalino y requiere  $\text{Mg}^{++}$ . Como se explicó en el capítulo 10, el enzima, aunque adherido a los tilacoides, se encuentra orientado hacia el estroma. Como la iluminación determina una entrada de protones hacia el interior de los tilacoides (Cap. 13), hacia el exterior, en el estroma se produce una subida de pH que activa a la ribulosa-difosfato carboxilasa. La entrada de protones al interior de tilacoides, estimulada por luz, va acompañada de una salida de  $\text{Mg}^{++}$  para contrarrestar en parte el déficit de carga eléctrica, con lo que de nuevo se provoca un aumento de la actividad ribulosa-difosfato carboxilasa. Con un razonamiento inverso, se vería cómo la ausencia de luz determina una disminución de la actividad ribulosa-difosfato carboxilasa. Adicionalmente, el enzima parece existir en una forma activa y otra inactiva, predominando la última en la oscuridad por razones aún no claras.

Un mecanismo distinto de regulación por luz, es ejercido sobre los enzimas: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,7-difosfatasa, sedoheptulosa-1,7-difosfatasa y ribulosa-5-fosfato kinasa. Todos estos enzimas en su forma activa tienen grupos -SH de cisteína. La forma activa puede pasar a inactiva por oxidación de los grupos -SH a puente disulfuro -S-S-.

Las formas inactivas de estos enzimas pasan a formas activas por reducción de los puentes disulfuros cuando se iluminan cloroplastos. Los electrones, para este proceso de activación enzimática por reducción, vienen en último caso del agua. En efecto, al iluminar y operar el transporte electrónico fotosintético, aumenta la concentración de ferredoxina reducida, que en una reacción catalizada por el enzima ferredoxina-tiorredoxina reductasa, reduce a la tiorredoxina, la cual entonces reduce los puentes disulfuro de los enzimas a grupos -SH. Esquemáticamente, el flujo de electrones es:



La tiorredoxina es una proteína de bajo peso molecular implicada en muchos otros casos de reducción de proteínas y en la síntesis de desoxinucleótidos.

La inactivación de estos enzimas del ciclo de Calvin en la oscuridad, parece utilizar diversos mecanismos según el enzima en cualquier caso, no es tan conocida como la activación. Parece que se puede utilizar: glutatión oxidado, ácido deshidroascórbico o algún otro compuesto oxidado, cuya concentración aumenta al faltar el transporte electrónico fotosintético en la oscuridad, para volver los grupos -SH a puente disulfuro e inactivar los enzimas.

Existen otros mecanismos de regulación por luz, de respuesta más lenta y que pueden implicar procesos de inducción y represión de enzimas. También hay que tener en cuenta los mencionados efectos estequiométricos tanto para ATP y NADPH como para algunos intermediarios. Así, por ejemplo, en la oscuridad disminuye la concentración de ATP, NADPH y RuDP con lo que los enzimas que utilizan estos sustratos operarán más lentamente.

Más independiente de la luz, un importante regulador estequiométrico es el CO<sub>2</sub>, que determina así, en muchos casos, la velocidad de su asimilación en función de su concentración, por el efecto de ésta sobre la actividad ribulosa-difosfato carboxilasa.

#### 14.4. Rutas metabólicas a partir del ciclo de Calvin. Síntesis de sacarosa y almidón y su regulación

A partir de diversos intermediarios del ciclo, pueden partir rutas de biosíntesis de distintos compuestos. A tiempos prolongados de exposición al <sup>14</sup>C<sub>2</sub>, aparece marcaje en aminoácidos, ácidos dicarboxílicos e incluso lípidos. La mayoría de las rutas, no

parecen ser esencialmente distintas de las conocidas en organismos no fotosintéticos, y no las mencionaremos aquí. Sin embargo, en condiciones normales, las **rutas mayoritarias son las que, utilizando el producto fructosa-6-fosfato, llevan a la formación de almidón y sacarosa**. Las estructuras fotosintéticas de plantas superiores orientan la mayor parte de su producción a formar **sacarosa para exportar a estructuras no fotosintéticas**. Otra vía importante puede ser la de acumular, en los mismos cloroplastos, reservas de almidón que, en parte, será degradado en la oscuridad para suministrar carbono y energía a las estructuras fotosintéticas cuando falta la luz. Hay que tener también en cuenta que los cloroplastos (y los plastos en general) son el lugar de síntesis de los ácidos grasos en plantas. Una vía importante en muchos casos, es la de producción de glicolato que analizaremos en el capítulo 16.

Ante la posibilidad de que algunos de los procesos metabólicos derivados del ciclo, no ocurran en los cloroplastos sino en citoplasma, es preciso considerar primero el intercambio de metabolitos entre cloroplastos y citoplasma.

La envoltura de los cloroplastos contiene, entre otras, una permeasa para el transporte de triosas fosfato, 3-PGA y fosfato. Ésta, tiene dos posibilidades funcionales (Fig. 14.2). En una, cataliza un antitransporte de triosas fosfato hacia citoplasma y 3-PGA hacia cloroplastos que tiene como resultado, operando conjuntamente con enzimas citoplásmicos y de cloroplastos, la producción de ATP y de equivalentes de reducción en citoplasma a expensas de su consumo en cloroplastos. En la otra posibilidad funcional, se da un antitransporte de triosa fosfato hacia citoplasma y fosfato hacia cloroplastos. Como en citoplasma se sintetizan F6P y sacarosa a partir de GA-3P, la permeasa asegura la vuelta a cloroplastos del fosfato producido en citoplasma al sintetizarse sacarosa a partir de GA-3P.

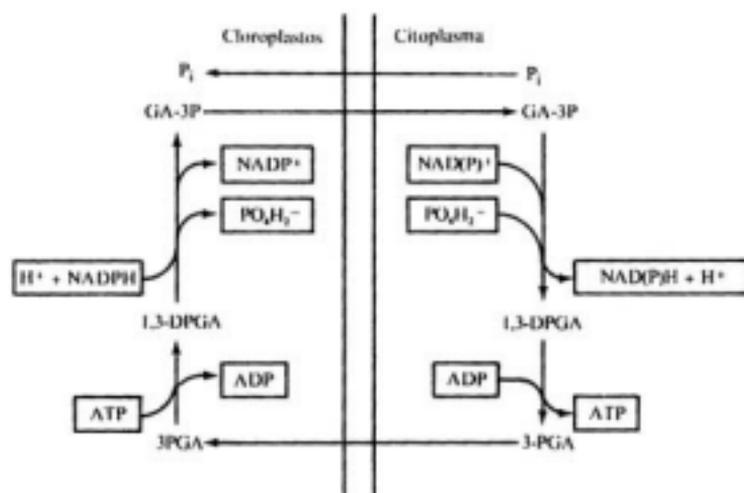


Figura 14.2.—Transporte de equivalentes de reducción desde cloroplastos a citoplasma. Se utilizan las mismas abreviaturas que en la figura 14.1.

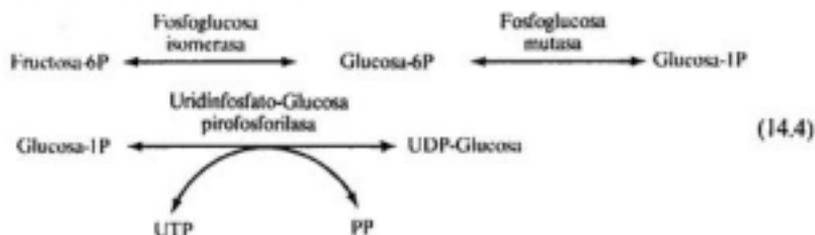
## 14.4.1. Síntesis de la sacarosa

La sacarosa es un disacárido no reductor que resulta de la unión **fructosa-glucosa** por sus carbonos 2 y 1, respectivamente (Fig. 14.3). Es el compuesto que las plantas usan de una forma más generalizada, para transportar reservas de carbono de unas estructuras a otras. La sacarosa es sintetizada vía sacarosa-fosfato según los procesos.

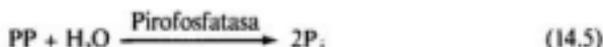


La reacción (14.2) está catalizada por el enzima **sacarosa fosfato sintetasa**. En ciertos casos, ADP-glucosa (adenosín-difosfato glucosa) puede ser sustrato del enzima pero, en general, es mejor sustrato UDP-glucosa (uridín-difosfato glucosa). La reacción (14.2) es fácilmente reversible en condiciones fisiológicas, pero la reacción (14.3) es fuertemente exérgica y el proceso global esta fuertemente desplazado hacia la síntesis de sacarosa.

De los sustratos de la reacción (14.2), la F6P es un producto inmediato del ciclo de Calvin, mientras que UDP-glucosa se forma a partir de otra molécula de F6P según la secuencia de reacciones enzimáticas.



El pirofosfato formado es hidrolizado con una pirofosfatasa:



en una reacción fuertemente exérgica que determina así que el proceso global (14.4) esté fuertemente desplazado hacia la síntesis de UDP-glucosa.

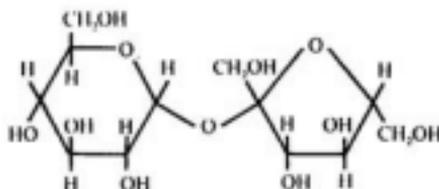
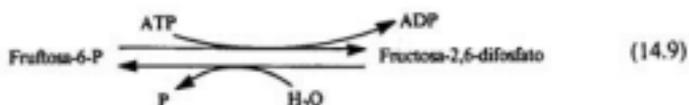


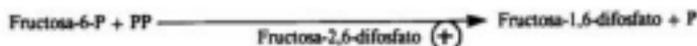
Figura 14.3.—Molécula de sacarosa.



inhibidor potente de la sacarosa fosfato sintetasa. Además, el fosfato hace aumentar los niveles de fructosa-2,6-difosfato. Este último, en citoplasma, es un importante metabolito regulador. Fosfato y F6P activan su síntesis e inhiben su degradación enzimáticas:



mientras que 3-PGA y DHAP tienen el efecto opuesto. La fructosa-2,6-difosfato, en citoplasma, inhibe a la fructosa-1,6-difosfatasa, y por tanto la síntesis de sacarosa, y además activa de una forma compleja la formación de fructosa-1,6-difosfato para glicolisis. En efecto, activa a la pirofosfato:fructosa-6-fosfato fosfotransferasa, enzima encargada de la formación de fructosa-1,6-difosfato en el citoplasma foliar:



Pero además, parece que la fructosa-2,6-difosfato facilita la conversión de este enzima en una fosfofructokinasa mucho más activa:



El modelo de regulación que parece deducirse de estos datos, implicaría que al iluminar las hojas, aumentan los niveles de triosas fosfato y disminuye fosfato libre, con el resultado de que se inhibe la glicolisis y se activa la síntesis de sacarosa en citoplasma al activarse la fructosa-1,6-difosfatasa por la disminución de fructosa-2,6-difosfato. Si la sacarosa se acumula, por exceder su producción a la demanda de los sumideros, por un efecto de retroinhibición se acumulan hexosas monofosfato que provocan un aumento de fructosa-2,6-difosfato que inhibe la síntesis de sacarosa. En estas últimas circunstancias, la glicolisis es inhibida en otras etapas.

#### 14.4.2. Síntesis del almidón

El almidón es la principal forma de reserva de carbono orgánico en la mayoría de las plantas. En los cloroplastos se encuentra en forma de pequeños granos, mientras que en amiloplastos de estructuras no fotosintéticas, se encuentran en forma de grandes granos que en un número pequeño ocupan todo el amiloplasto. Su detección citoquímica se puede realizar fácilmente tiñendo con reactivo Lugol.

Químicamente, el almidón es un polímero de glucosa. Si los residuos de ésta se encuentran unidos exclusivamente por enlaces  $\alpha$ -glucosídicos 1 $\rightarrow$ 4, la estructura resultante se llama *amilosa*. Si adicionalmente hay algunos enlaces  $\alpha$ -glucosídicos 1 $\rightarrow$ 6, tenemos la llamada *amilopectina* (Fig. 14.4). En realidad, esta última es como una cadena de amilosa a la que se unen por enlace glucosídico 1 $\rightarrow$ 6 otras cadenas de amilosa

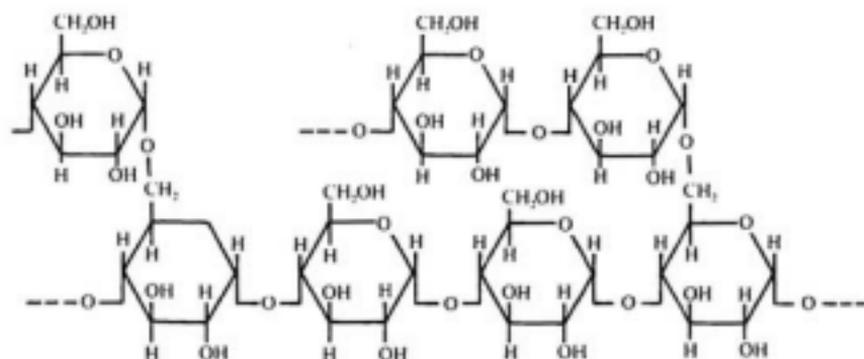
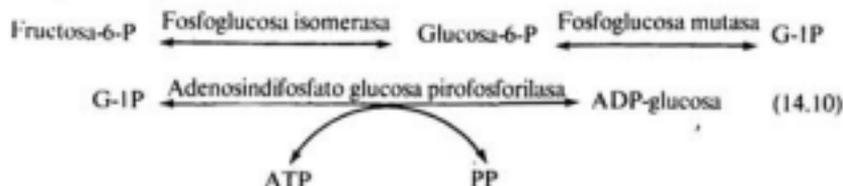


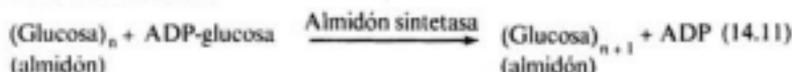
Figura 14.4.—Estructura básica de la amilopectina.

que a su vez pueden estar ramificadas. La proporción de amilosa y amilopectina, varía mucho en el almidón de unas plantas a otras. En general, hay más amilopectina que amilosa, incluso ésta puede faltar. Las moléculas de amilopectina pueden tener entre 2.000 y 200.000 residuos de glucosa. Especialmente los residuos de glucosa en las cadenas con enlace  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4, forman como una hélice con un paso de rosca de seis residuos de glucosa.

La síntesis de almidón en cloroplastos tiene lugar a partir de F6P previo paso a ADP-glucosa según el esquema:



Desde ADP-glucosa, se adicionan residuos de glucosa a una cadena creciente de amilosa por su extremo 4-terminal:



Como para el caso que ya hemos estudiado de la síntesis de sacarosa, la hidrólisis, catalizada por una pirofosfatasa, del pirofosfato producido en la reacción catalizada por la adenosin-difosfato-glucosa pirofosforilasa (secuencia [14.10]), sirve de empuje exergónico al proceso (14.10). Es curioso que mientras la síntesis de sacarosa, requiere que la glucosa este activada en su carbono 1 como UDP-glucosa, la almidón sintetasa utiliza mejor la ADP-glucosa. Las cadenas de amilopectina se forman por acción de transglucosidasas que transfieren regiones de amilosa desde un enlace (1 $\rightarrow$ 4) para formar otro (1 $\rightarrow$ 6).

La posibilidad de que el almidón se pueda sintetizar por acción de la fosforilasa (14.8), no parece muy probable, pues en condiciones fisiológicas, la reacción catalizada por la fosforilasa está fuertemente desplazada hacia el sentido de degradación del almidón.

En estructuras no fotosintéticas el almidón también es sintetizado por acción de la almidón sintetasa. Normalmente, a estas estructuras llega sacarosa que es degradada por acción de sacarosa sintetasa, con lo que se tiene la glucosa ya activada aunque como UDP-glucosa. La conversión de ésta en ADP-glucosa no implica gasto energético. La fructosa producida en la degradación de la sacarosa, puede ir a glicolisis o también a síntesis de almidón. En el último caso el proceso global de conversión de sacarosa en almidón se representa en la figura 14.5. Como se puede ver, la incorporación completa de los dos residuos de la sacarosa en el almidón requiere dos moléculas de ATP, ambas para la activación de la fructosa.

La regulación de la síntesis del almidón en estructuras fotosintéticas, parece estar a nivel del enzima ADP-glucosa pirofosforilasa. Este enzima es activado por altas concentraciones de diversos metabolitos, indicativas de que funciona activamente el ciclo de Calvin. Estos metabolitos son: 3-PGA, FDP, F6P y algunos más. El enzima es, además, fuertemente inhibido por fosfato libre, cuya concentración aumenta en condiciones de oscuridad en que no opera la fotofosforilación. Este mecanismo de regulación es netamente diferente del que opera en la síntesis de glucógeno animal, controlada a nivel de glucógeno sintetasa. La fosforilasa es inhibida por señales indicativas de un alto estado energético celular, como diversos nucleósidos trifosfato. Todos ellos aumentan con la iluminación, evitando así un ciclo inútil de gasto de ATP si operasen simultáneamente almidón sintetasa y fosforilasa. Como se explicó en la regulación de la síntesis de sacarosa, la menor demanda de ésta por los sumideros de la planta, provoca un aumento de la concentración de hexosas fosfato en la célula mesofílica en condiciones de ilumina-

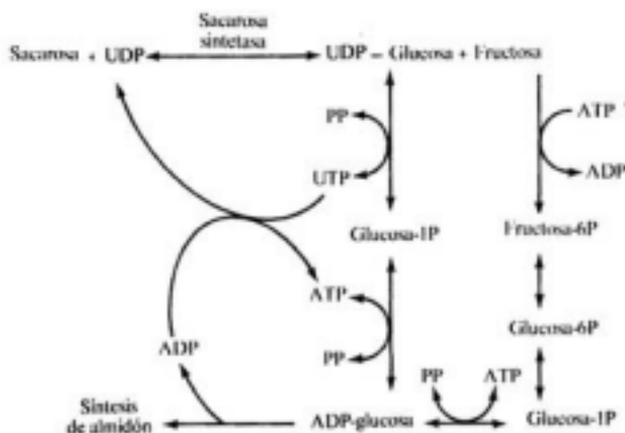


Figura 14.5.—Síntesis de almidón a partir de sacarosa.

ción. En esta situación, con baja concentración de fosfato y alta de hexosas fosfato, se favorece la síntesis de almidón en cloroplastos. Así, la concentración de fructosa-2, 6-difosfato en citoplasma que, como se explicó antes, está afectada por los niveles de fosfato, triosas fosfato y hexosas fosfato, parece jugar un papel clave en la distribución del carbono asimilado entre la síntesis de almidón en cloroplastos y la de sacarosa en citoplasma para su exportación a otras estructuras.

La degradación de almidón en endospermo de semillas, es frecuentemente catalizada por amilasas, pues en general el endospermo no exporta al embrión sacarosa, sino glucosa o maltosa.

En muchas plantas, los polisacáridos de reserva mas importantes, son fructosanos en lugar de almidón. Los fructosanos, resultan de adiciones a una molécula de sacarosa de nuevos residuos de fructosa por enlaces  $\beta(2 \rightarrow 1)$  (*Inulinas* propias de raíces y tubérculos de Compuestas y Campanulaceas) o por enlaces  $\beta(2 \rightarrow 6)$  (*Fleinas*, en hojas, tallos y raíces de muchas gramíneas y algunas otras plantas). La síntesis de estos polisacáridos parece estar catalizada por transfructosidasas, que transfieren el residuo de fructosa de la sacarosa a cadenas crecientes del polisacárido, quedando libre una glucosa por cada residuo de fructosa transferida. La glucosa liberada puede reutilizarse para síntesis de sacarosa, o se puede degradar.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- AKAZAWA, T.: *Polysaccharides*, en: *Plant Biochemistry*, 3.<sup>a</sup> ed. (Ed. por J. Bonner y J. E. Varner), Academic Press, Nueva York, 1976, págs. 381-403.
- BUCHANAN, B. B.; WOLOSIVK, R. A., y SCHÜRMMANN, P.: *Thioredoxin and Enzyme Regulation*, «Trends in Biochemical Sciences», vol. 4, 1979, págs. 93-96.
- CSEKE, C.; BALOGH, A.; WONG, J. H.; BUCHANAN, B. B.; STITT, M.; HERZOG, B., y HELDT, H. W.: *Fructose-2,6-bisphosphate: a regulator of carbon processing in leaves*, «Trends in Biochem. Sci.», vol. 9, 1984, págs. 533-535.
- GIBBS, M., y LATZKO, E. (eds.): *Photosynthesis II. Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 6, Springer-Verlag, Berlín, 1979.
- GOVINDIEE (ed.): *Photosynthesis*, vol. II, Academic Press, Nueva York, 1982.
- HATCH, M. D.: *Photosynthesis: the Path of Carbon*, en: *Plant Biochemistry*, 3.<sup>a</sup> ed. (Ed. por J. Bonner y J. E. Varner), Academic Press, Nueva York, 1976, págs. 779-844.
- HATCH, M. D., y BOARDMAN, N. K. (eds.): *Photosynthesis. The Biochemistry of Plants*, vol. 8, Academic Press, Nueva York, 1981.
- JENSEN, R. G., y BAHR, J. T.: *Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 28, 1977, págs. 379-400.
- KELLY, G. I.; LATZKO, E., y GIBBS, M.: *Regulatory Aspects of Photosynthetic Carbon Metabolism*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 27, 1976, págs. 181-205.
- TURNER, J. F., y TURNER, D. H.: *The Regulation of Carbohydrate Metabolism*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 26, 1975, págs. 159-186.

## OTRAS VÍAS DE FIJACIÓN Y ASIMILACIÓN FOTOSINTÉTICA DEL CO<sub>2</sub>

Aunque el esquema de fijación y asimilación fotosintética del CO<sub>2</sub>, conocido como ciclo de Calvin ha sido demostrado en la mayoría de los organismos fotosintéticos, se ha encontrado una serie de variantes del ciclo que afectan principalmente a la etapa de fijación del CO<sub>2</sub>. Estas variaciones afectan no sólo al mecanismo molecular de la fijación, sino también a los lugares de la planta donde ocurre, y al momento en que ocurren los procesos y tienen profundas implicaciones fisiológicas, y por tanto adaptativas, en las plantas donde se presentan.

En este capítulo estudiaremos variantes del ciclo de Calvin que se presentan, entre otras, en plantas importantes desde el punto de vista económico como son el maíz y la caña de azúcar y en la mayoría de las plantas que desarrollan succulencia. Finalmente, comentaremos otra posible vía de asimilación del CO<sub>2</sub>, que parece operar en ciertas bacterias y que es completamente diferente del ciclo de Calvin. Algunos aspectos fisiológicos de las vías fotosintéticas especiales de plantas que vamos a estudiar aquí, son inseparables de la consideración del fenómeno de la fotorrespiración que estudiamos en el capítulo siguiente. Por este motivo, en el capítulo 16 volveremos sobre el funcionamiento fotosintético de estas plantas, una vez conocida la fotorrespiración.

### 15.1. Plantas con ciclo dicarboxílico C-4

En 1954 Kortschak encontró que cuando se analizaban los primeros productos de fijación fotosintética de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> en la caña de azúcar, éstos no eran moléculas de tres átomos de carbono, como el ácido 3-fosfoglicérico, sino que eran moléculas de cuatro átomos de carbono y, concretamente, ácidos aspártico y málico. Más tarde apareció marcaje en ácido 3-fosfoglicérico y en azúcares. Estos resultados pasaron desapercibidos durante algunos años, hasta que nuevos trabajos más intensos sobre el problema, principalmente por Hatch y Slack, demostraron la importancia de la nueva vía de fijación que comenzó a ser ampliamente aceptada hacia mediados de la década de los sesenta. Las plantas que presentan esta vía de fijación se designan como plantas con fotosíntesis C-4, mientras que las plantas con el esquema de fijación clásico, con un compuesto de tres átomos de carbono como primer producto de fijación, se designan por este motivo plantas con fotosíntesis C-3.

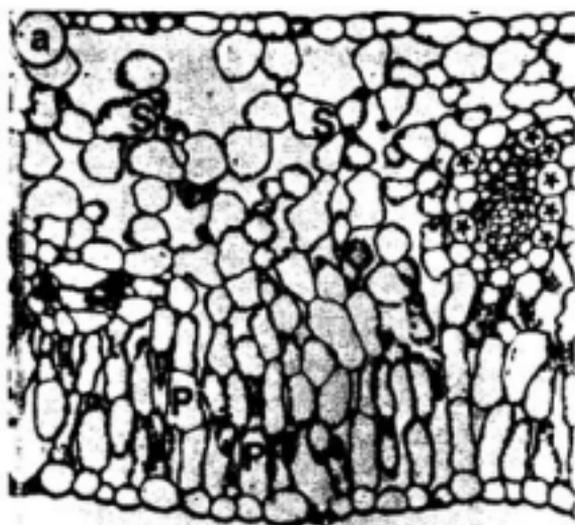
**15.1.1. Anatomía foliar comparada de plantas C-3 y C-4**

Pronto se vio que, salvo raras excepciones, las plantas con fotosíntesis C-4 presentan una anatomía foliar característica que ya era conocida desde primeros de siglo como anatomía foliar en corona, muy frecuente en plantas tropicales.

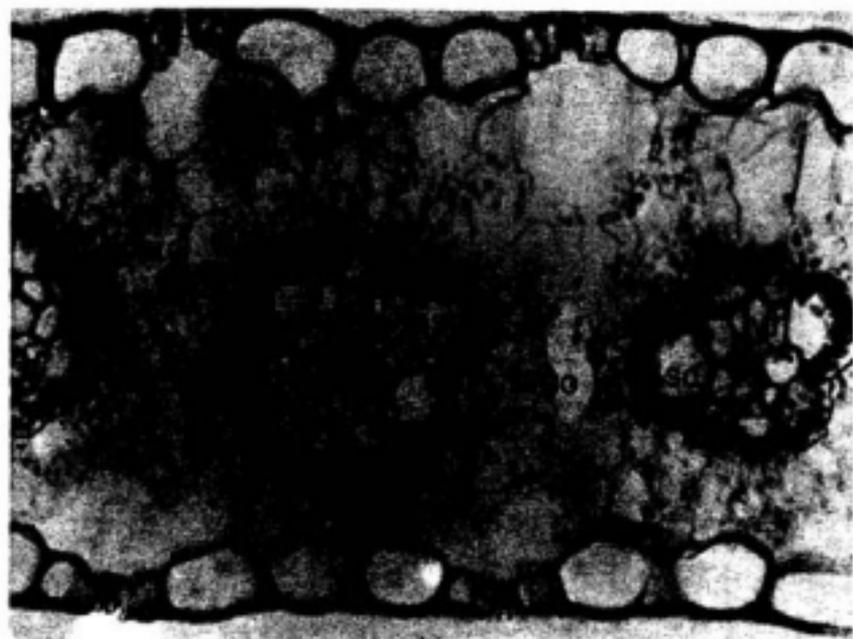
Las plantas C-3 muestran, en general, una anatomía foliar con un mesófilo esponjoso o lagunar en el envés de la hoja, formado por células clorofilicas, aproximadamente isodiamétricas con tamaños típicos de unas 50 $\mu$ , que dejan un abundante espacio aéreo intercomunicado por toda la hoja y conectado con los estomas más abundantes, en general, precisamente en el envés. Hacia el haz de la hoja, entre la monocapa de células epidérmicas y el mesófilo esponjoso, se encuentra una monocapa de células clorofilicas de formas cilíndricas o prismáticas, de manera que el eje de estas células queda perpendicular a la superficie de la hoja, formando lo que se llama el mesófilo en empalizada. Estas últimas células se encuentran estrechamente adosadas unas con otras, sin apenas dejar espacios aéreos. A veces, el mesófilo en empalizada consta de varias capas de células prismáticas en lugar de una monocapa. En cualquier caso, ni estructural ni funcionalmente, se encuentran diferencias entre los cloroplastos de células del mesófilo lagunar y del mesófilo de empalizada.

La anatomía en corona, característica de las plantas C-4, incluye dos tipos de células clorofilicas con disposición foliar distinta de la de plantas C-3 y, como veremos, con morfología de cloroplastos y funciones diferentes. En la figura 15.1 se muestran unas microfotografías con las anatomías foliares características de plantas C-3 y de las plantas C-4. Rodeando a los conductos vasculares foliares de plantas C-4, se encuentra una capa de células clorofilicas grandes que reciben el nombre de células de la vaina. Rodeando a esta monocapa se encuentran, distribuidas radialmente, células clorofilicas más pequeñas llamadas de mesófilo. Estas últimas contienen cloroplastos normales con abundantes grana y que no contienen almidón. Los cloroplastos de células de la vaina son más grandes, acumulan almidón y no contienen, o contienen muy pocos, grana. La proporción relativa de fotosistema II a fotosistema I, es mayor en cloroplastos de células de mesófilo que en los de células de la vaina. Estas últimas, deficientes en fotosistema II, deben tener así más proporción de fotofosforilación cíclica que de flujo acíclico de electrones para dar NADPH. Las células de la vaina contienen abundantes mitocondrias y microcuerpos. Es frecuente encontrar un retículo periférico en los cloroplastos pequeños de las células del mesófilo y a veces también en las de la vaina. Entre las células de la vaina y las células del mesófilo, existen abundantes plasmodemos que aseguran un fácil tráfico de metabolitos entre ellas. En la figura 15.2 se muestran los dos tipos de cloroplastos presentes en maíz, una típica planta C-4.

En las plantas C-3, las células de la monocapa de vaina que rodean los conductos vasculares no son clorofilicas. Tanto para el esquema básico descrito para plantas C-3 como para el de plantas C-4, existen numerosas ligeras variantes en cuya consideración no entramos, pues no afectan a la exposición de los párrafos posteriores sobre los mecanismos fotosintéticos.



C-3



C-4

Figura 15.1.—Microfotografías de cortes de hojas de plantas C-3 y planta C-4. S, mesófilo ligular; P, mesófilo en empalizada; BSC, células de la vaina; MC, células del mesófilo; VT, sistema vascular (tomado de M. Gibbs y E. Litzko, *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 6, Springer-Verlag, Berlín, 1979).



Figura 15.2.—Cloroplastos de mesófilo (M) y vaina (BS) de maíz. PR, retículo periférico; E, envoltura de los cloroplastos; G, grana; T, tilacoides (tomado de H. Smith, *The Molecular Biology of Plant Cells*, Blackwell, Oxford, 1977).

15.1.2. Mecanismo de fijación y asimilación del  $\text{CO}_2$  en plantas C-4

Como ya hemos indicado, el marcaje del  $^{14}\text{CO}_2$  aparece inicialmente en aspartato y malato. Pronto se vio que ambos resultaban de la transformación del oxalacetato, que en realidad era el verdadero primer producto con  $^{14}\text{CO}_2$  fijado, aunque su rápida transformación en aspartato y malato impedía su detección.

En plantas con fotosíntesis C-4, se encuentra algún enzima no detectado en otros organismos. Hay otras actividades enzimáticas frecuentes en otros organismos, que se encuentran en plantas C-4 en valores extraordinariamente altos que sugieren algún papel más específico para ellas en estas plantas. En base a las actividades enzimáticas identificadas en los dos tipos de células fotosintéticas, así como en el orden en que aparecen los compuestos marcados con  $^{14}\text{CO}_2$ , se acepta hoy día un modelo de fijación y asimilación del  $\text{CO}_2$  en que cooperan los dos tipos de células. En la figura 15.3 se representan esquemáticamente las etapas moleculares del proceso global, sobre el cual discutiremos el mecanismo detallado y la contribución funcional de los dos tipos de células.

Globalmente considerada, la operación del mecanismo de fijación y asimilación fotosintética del  $\text{CO}_2$  en plantas C-4, consiste en una fijación inicial del  $\text{CO}_2$  sobre el fosfoenolpirúvico (PEP) (etapa ①), en reacción catalizada por la PEP-carboxilasa para dar oxalacetato en células del mesófilo. En estas mismas células, el oxalacetato se transforma en aspartato y malato que pasan a las células de la vaina. En estas últimas, y por diversos mecanismos, aspartato y malato se transforman en piruvato con liberación, en

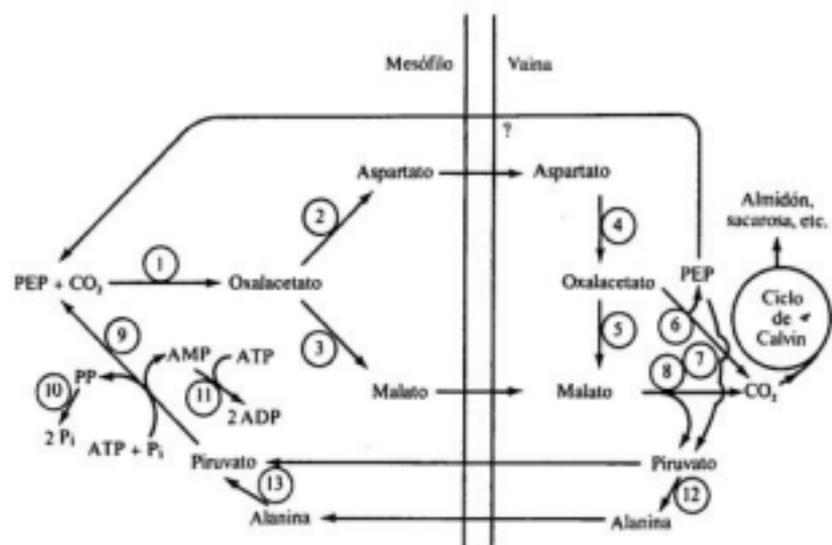
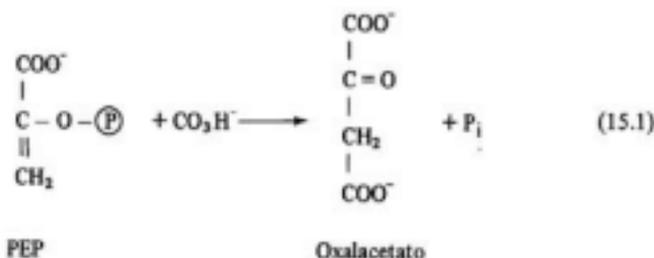


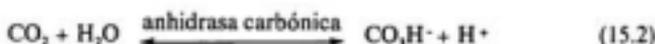
Figura 15.3.—Etapas en el mecanismo de fijación y asimilación del  $\text{CO}_2$  en plantas con fotosíntesis C-4.

cada caso, de una molécula de  $\text{CO}_2$  que se fija sobre ribulosa difosfato para, mediante el ciclo de Calvin, producir azúcares. El piruvato producido vuelve a las células del mesófilo para regenerar PEP en una reacción singular (reacción 9) catalizada por la piruvato-fosfato dikinasa, acoplada a un proceso que, en conjunto, consume dos moles de ATP por mol de piruvato convertido en PEP. Tal como lo hemos representado en la figura 15.3, aparentemente la función de las células del mesófilo es la de, utilizando una serie de procesos bioquímicos, llevar  $\text{CO}_2$  a las células de la vaina donde, por un mecanismo idéntico al de las plantas C-3, es convertido en azúcares. A continuación analizaremos en detalle cada una de las etapas, centrándonos exclusivamente en aquellos aspectos más ampliamente aceptados y sin profundizar en una serie de aspectos más polémicos del esquema propuesto.

Como hemos dicho, la fijación del  $\text{CO}_2$  sobre PEP para dar oxalacetato:



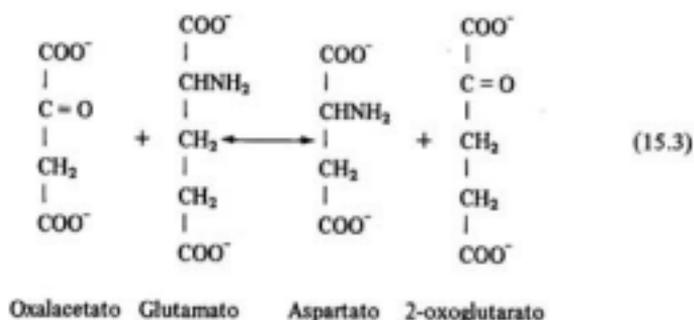
está catalizada por el enzima: fosfoenolpirúvico carboxilasa. A diferencia de la ribulosa-difosfato carboxilasa, que utiliza como sustrato al  $\text{CO}_2$ , el verdadero sustrato de la fosfoenolpirúvico carboxilasa es el bicarbonato  $\text{CO}_2\text{H}^-$ . En ambos casos, la abundante actividad anhidrasa carbónica en estructuras fotosintéticas, asegura un rápido equilibrio  $\text{CO}_2$ -bicarbonato:



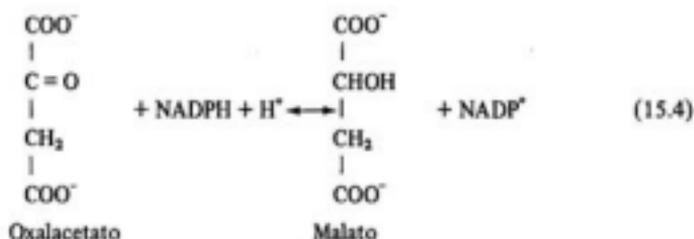
para la utilización en cada caso del verdadero sustrato enzimático.

La fosfoenolpirúvico carboxilasa es particularmente abundante en células del mesófilo de plantas C-4, donde se localiza en el citoplasma, aunque parece ser que, en ciertos casos, puede estar unida a cloroplastos por la cara externa de éstos. La  $K_m$  de fosfoenolpirúvico carboxilasa para el bicarbonato es baja (del orden de mM). Más aún, esta  $K_m$  parece ser dependiente de diversas condiciones de ensayo, lo que sugiere que *in vivo* la afinidad por el  $\text{CO}_2\text{H}^-$  sea aún mayor. En cualquier caso, como se verá en el próximo capítulo, la velocidad de fotosíntesis alcanza su saturación en plantas C-4 a concentraciones de  $\text{CO}_2$  atmosférico mucho más bajas que las correspondientes de plantas C-3. La fosfoenolpirúvico carboxilasa requiere  $\text{Mg}^{+2}$  en su actuación, y como veremos está sometida a control.

El oxalacetato producido en ① (Fig. 15.3) es rápidamente transformado en las células del mesófilo en aspartato (reacción ②), por transaminación con glutamato catalizada por la glutamato: oxalacetato transaminasa:



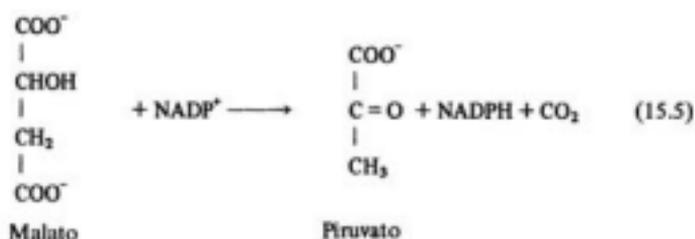
y en malato (reacción ③), por reducción catalizada por una malato deshidrogenasa dependiente de NADP:



La concentración estacionaria de oxalacetato que se alcanza es siempre muy baja, por lo que apenas si puede encontrarse marcaje radiactivo en él, cuando se ensaya fotosíntesis con <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Algunas plantas C-4 forman más aspartato y otras más malato, aunque siempre se forman los dos compuestos. La malato deshidrogenasa dependiente de NADP está en cloroplastos. Glutamato: oxalacetato transaminasa se encuentra en cloroplastos y en citoplasma. En citoplasma también hay una malato deshidrogenasa dependiente de NAD, y se ha sugerido que pueda actuar también para formar malato, usando equivalentes de reducción transferidos de cloroplastos a citoplasma. No se excluye, pues, que malato y aspartato puedan formarse en ambos, citoplasma y cloroplastos de células del mesófilo.

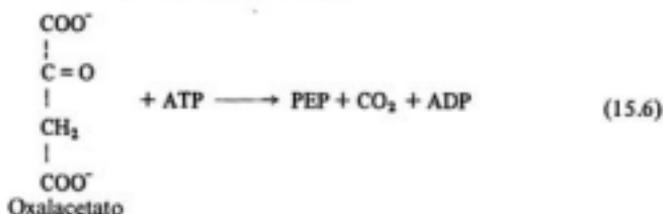
Se acepta hoy ampliamente que el malato y el aspartato formados pasan a las células de la vaina, probablemente via los abundantes plasmodesmos que las conectan con las células del mesófilo.

Las plantas que forman mayoritariamente malato en el mesófilo degradan a éste en la vaina, principalmente en reacción catalizada por el enzima málico dependiente de NADP:



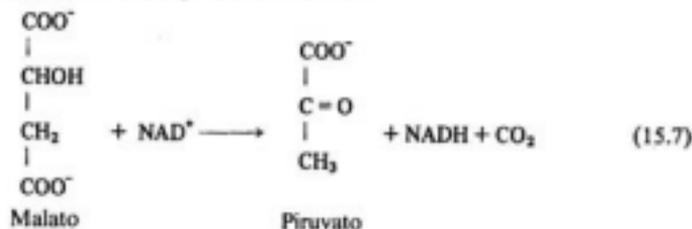
Este proceso ocurre en cloroplastos y proporciona NADPH para su utilización en el ciclo de Calvin, en cloroplastos de la vaina. Malato, transporta a ésta,  $\text{CO}_2$  y equivalentes de reducción producidos en cloroplastos del mesófilo y que en éste pasan al malato por la reacción (15.4).

Las plantas que forman mayoritariamente aspartato en el mesófilo, al pasar éste a la vaina lo transforman en oxalacetato como en la reacción (15.3) (transformación ④ de la figura 15.2), proceso que ocurre en mitocondrias. La formación de  $\text{CO}_2$  a partir de oxalacetato puede ocurrir de dos formas, unas plantas tienen abundante actividad fosfoenolpiruvato carboxikinasa que cataliza la reacción:



No está claro si este proceso ocurre en citoplasma o en cloroplastos de la vaina, hacia donde habría de pasar el oxalacetato producido en ④. El destino del PEP formado en (15.6) es incierto, ya que puede ocurrir que pase a piruvato con piruvato kinasa (quizá en citoplasma de la vaina ⑦) permitiendo recuperar el ATP consumido en (15.6), o que el PEP vuelva directamente al mesófilo.

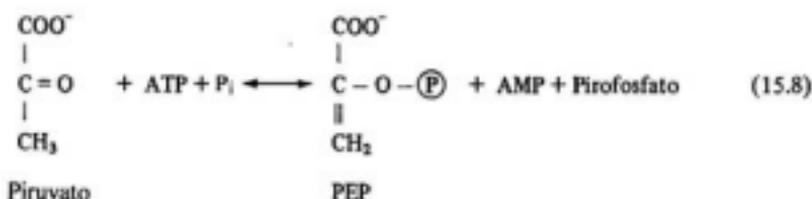
La otra forma por la que el oxalacetato puede dar  $\text{CO}_2$  en la vaina, es previo paso a malato en reacción catalizada por una malato deshidrogenasa mitocondrial dependiente de NAD. El malato formado pasa a piruvato en reacción catalizada por un enzima málico también mitocondrial y dependiente de NAD:



a diferencia del dependiente de NADP (reacción (15.5)), que está localizado en cloroplastos y que funciona en plantas C-4 formadoras de malato. El NADH producido en (15.7) se utiliza en el paso anterior (5) de la figura 15.3).

Cuando el transportador de CO<sub>2</sub> desde el mesófilo a la vaina es aspartato, se forma en su primera transformación en la vaina (4) glutamato a partir de 2-oxoglutarato. Puede ocurrir que el glutamato se transamine en citoplasma con el piruvato producido en (8) para dar alanina y regenerar 2-oxoglutarato, actuando alanina como intermedio de tres átomos de carbono que vuelve al mesófilo donde daría piruvato, pasando su grupo amino a glutamato (13) y de éste a aspartato en el proceso (2). En este caso no ocurriría transferencia neta de equivalentes de reducción de mesófilo a vaina. Son posibles otras alternativas que permiten una transferencia de equivalentes de reducción de mesófilo a vaina, y en realidad el proceso que ocurre no está aún claro del todo.

En cualquier caso, lo más probable es que piruvato, en lugar de PEP, vuelva de una u otra forma al mesófilo, donde regenera PEP en una reacción singular (9), catalizada por el enzima piruvatofosfato dikinasa, localizado en cloroplastos:



En la práctica, la reacción (15.8) está desplazada a la derecha, por la hidrólisis posterior del pirofosfato catalizada por el enzima pirofosfatasa:



la fosforilación del AMP, catalizada por adenilato kinasa:



y la regeneración del ATP a partir de ADP en la fotosfosforilación.

En la figura 15.4 se representa un modelo propuesto de reacciones en la fotosíntesis C-4, con la localización intracelular de las etapas para las distintas variantes funcionales.

En la operación del ciclo dicarboxílico fotosintético C-4, se consumen, pues, dos moles de ATP por mol de CO<sub>2</sub>, por las reacciones (15.8) y (15.10), que hay que sumar a los tres moles de ATP utilizados en el ciclo de Calvin por mol de CO<sub>2</sub>.

La operación del ciclo de Calvin en células de la vaina, permite a éstas acumular almidón y formar sacarosa, que vierte en el sistema vascular para distribuir al resto de la planta.

Se ha demostrado que los cloroplastos de las células de la vaina poseen todos los enzimas necesarios para el funcionamiento del ciclo de Calvin. Se ha sugerido que este ciclo también puede funcionar en células del mesófilo, pero no se ha podido encontrar

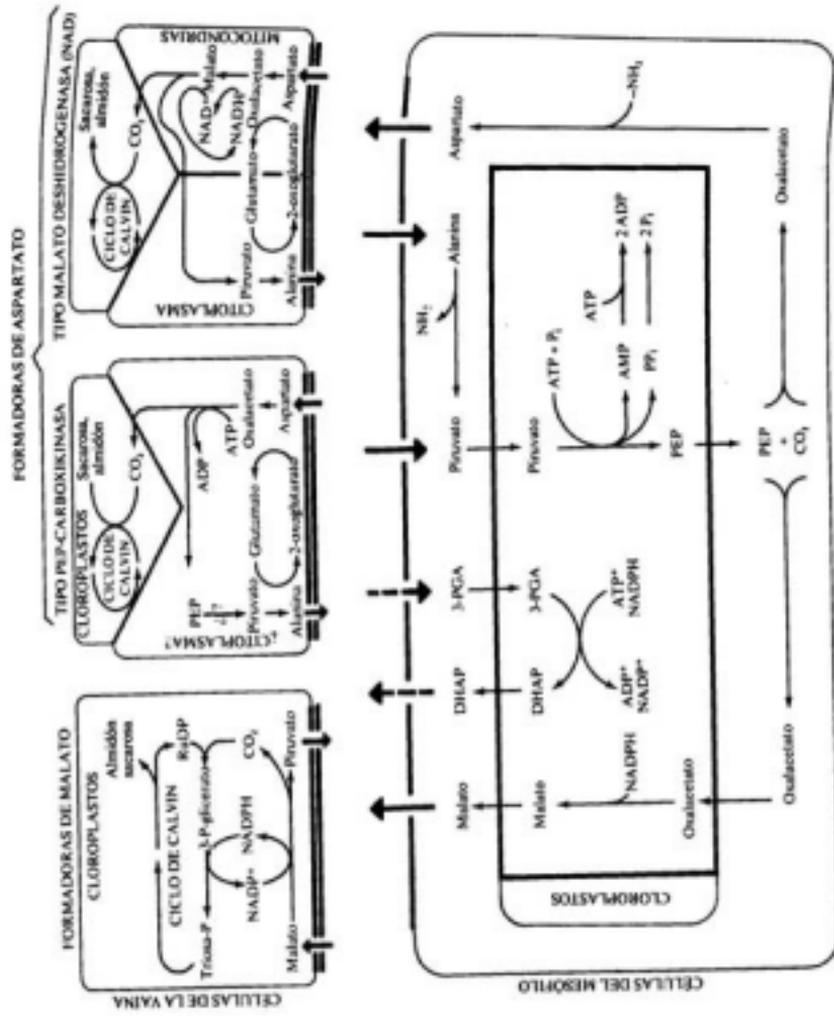


Figura 15.4.—Probable localización intracelular de las etapas en los distintos tipos de fotosíntesis C-4.

en estas últimas algunos de los enzimas claves del ciclo, como es el caso de la ribulosa difosfato carboxilasa.

Por cuanto hemos visto hasta ahora, el mecanismo fotosintético C-4 supone un mayor consumo de ATP por  $\text{CO}_2$  fijado, sin ninguna ventaja aparente. Sin embargo, aun prescindiendo de una serie de consideraciones relativas a la ausencia de fotorrespiración en plantas C-4, y que se verán en el capítulo siguiente, hay unos aspectos que hacen ventajosas a las plantas C-4 en determinados ambientes y que ya podemos abordar.

En primer lugar, está el hecho de la mayor afinidad por el sustrato  $\text{CO}_2$ -bicarbonato, que presentan las plantas C-4 comparado con las C-3. Esta diferencia de afinidad se debe a la diferencia entre los enzimas primarios de fijación de  $\text{CO}_2$  que utilizan ambos tipos de plantas. La mayor afinidad por el sustrato permite a las plantas C-4 realizar la fotosíntesis a una velocidad elevada, aun con bajas concentraciones estacionarias de  $\text{CO}_2$  en los espacios aéreos del mesófilo. Esto permite a las plantas C-4 tener los estomas menos abiertos que una planta C-3 para una misma velocidad fotosintética y, por tanto, reducir sus pérdidas de agua por transpiración. Las plantas C-4 se adaptan, pues, mejor a climas áridos, debido a su menor transpiración. El aumento de temperatura de la planta que llevaría consigo esta menor transpiración (Cap. 5), no es un problema en plantas C-4 como veremos en el capítulo próximo. Las plantas C-4 tienen temperaturas óptimas de crecimiento sensiblemente mayores que las plantas C-3, principalmente debido a la ausencia de fotorrespiración en aquéllas. Se han descrito otras ventajas evolutivas que en principio presentarían las plantas C-4 debido a que no fotorrespiran, y cuya consideración dejamos para el próximo capítulo.

Se piensa también que el mecanismo fotosintético C-4 permite a la planta tener una pequeña reserva de  $\text{CO}_2$  en forma de malato y aspartato, para hacer frente a situaciones de emergencia (como cierre brusco de estomas), en que se corta el suministro de  $\text{CO}_2$  desde la atmósfera. La acumulación de ácidos dicarboxílicos, es una respuesta típica de la planta contra ambientes salinos. Se sugiere así también, que la fotosíntesis de plantas C-4, les permite una mejor adaptación a ambientes salinos. En estos dos últimos aspectos considerados, las plantas C-4 presentan una gran analogía con las plantas de fotosíntesis tipo crasulácea que se verán más adelante.

Las plantas C-4 requieren todas ion  $\text{Na}^+$  como micronutriente esencial, un aspecto que es característico del metabolismo de ácidos dicarboxílicos.

En las células de la vaina parecen funcionar los mecanismos de control de la asimilación del  $\text{CO}_2$ , que con carácter general analizamos en el capítulo anterior. Adicionalmente existen diversos mecanismos de control en células del mesófilo, algunos de ellos bien conocidos. La PEP-carboxilasa presenta propiedades alostéricas, siendo inhibida por ácidos orgánicos dicarboxílicos y otros productos de la fotosíntesis. La malato deshidrogenasa dependiente de NADP se presenta en una forma activa a la luz y otra inactiva en la oscuridad. Ambas formas son interconvertibles, a través de un mecanismo de oxidación-reducción de sus grupos azufrados con tioredoxina, de una forma semejante a como se explicó en el apartado 14.3 para diversos enzimas del ciclo de Calvin. La piruvato fosfato dikinasa, se presenta también en una forma activa a la luz y otra inactiva en la oscuridad. En este último caso, la conversión de una forma en otra, implica reacciones de fosforilación y desfosforilación de un residuo

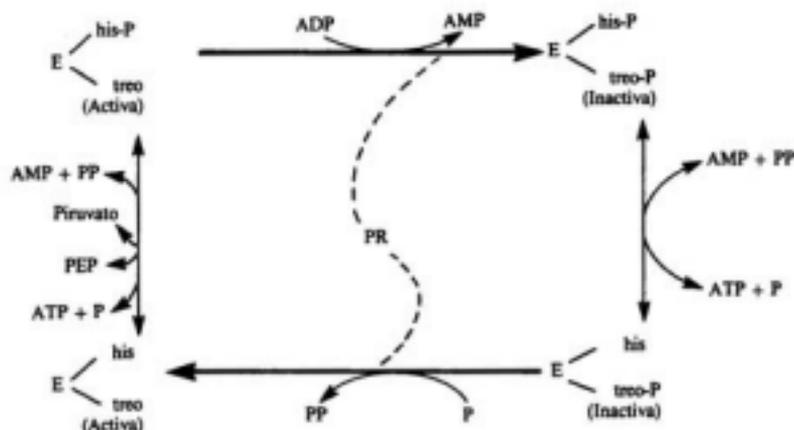


Figura 15.5.-Modelo propuesto para la regulación de la piruvato fosfato dikinasa. Se indican algunas reacciones parciales catalizadas por las dos formas.

de treonina según muestra la figura 15.5. La misma proteína reguladora (PR), cataliza la inactivación, por fosforilación de la treonina con ADP, y la activación, por desfosforilación con fosfato. Este último proceso es inhibido por AMP, ADP y PP, intermediarios cuya concentración disminuye al iluminar. En la figura 15.5, se han mostrado algunas reacciones colaterales del centro de reacción del enzima que implican la fosforilación y desfosforilación de un residuo de histidina. Una de estas reacciones no se afecta por la fosforilación de la treonina, según se muestra en la figura.

Existen otros varios mecanismos que impiden de la operación del ciclo C-4 en la oscuridad, como son la disminución en ésta de los niveles de ATP, NADPH y NADH requeridos en diversas etapas del ciclo. Se ha sugerido también un control por el pH que afecta a la posición de equilibrio de la reacción catalizada por la anhidrasa carbónica (reacción 15.2), y con ello a la proporción de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CO}_2\text{H}$ ; sustratos de ribulosa-difosfato carboxilasa y PEP-carboxilasa, respectivamente.

### 15.1.3. Tipos de plantas C-4

El metabolismo fotosintético ácido dicarboxílico C-4 se ha encontrado en un gran número de especies de diversas familias. Incluso dentro de un mismo género se han encontrado plantas C-3 y plantas C-4.

Dentro de monocotiledóneas se han encontrado abundantes plantas C-4 en el orden Glumifloras, en las familias Gramíneas y Ciperáceas. En dicotiledóneas, fotosíntesis C-4, sólo se ha encontrado en las consideradas más modernas, y concretamente en plantas de:

- Orden Centrospermas, familias Quenopodiáceas, Nictagináceas, Amarantáceas, Aizoáceas y Portulacáceas.

- Orden Geraniales, familia Euforbiáceas.
- Orden Campanuladas, familia Compuestas.
- Orden Gruinales, familia Zigofiláceas.

La fotosíntesis C-4 no se suele encontrar en angiospermas más primitivas, lo que indica que el carácter C-4 es de origen reciente y polifilético. Recientemente, se han encontrado plantas C-4 acuáticas. Es posible que algunas plantas primitivas acuáticas de ambientes con baja concentración de CO<sub>2</sub>, utilicen el mecanismo fotosintético C-4.

Experimentos genéticos con cruce de especies C-3 y C-4 (por ejemplo, cruzando *Atriplex rosea* que es C-4 con *Atriplex patula* que es C-3) indican una segregación independiente de los caracteres estructurales (anatomía en corona) y funcionales (metabolismo ácido dicarboxílico) de las plantas C-4. Más aún, en el género *Mollugo* de la familia Aizoáceas, se encuentran *M. verticillata* que estructural, pero no funcionalmente, es C-4, y *M. cerviana* que es C-4 estructural y funcionalmente. Es significativo que *M. verticillata* presenta valores de fotorrespiración (Cap. 16) intermedios entre los típicos de planta C-3 y planta C-4.

Parece, pues, como si la coincidencia de anatomía foliar y metabolismo fotosintético de ácido dicarboxílico presentara ciertas ventajas funcionales, que hacen que este último sólo se haya desarrollado en plantas con unas posibilidades estructurales de su anatomía foliar complejas, como ocurre en Angiospermas más evolucionadas. Se ha observado también cambios estructurales y funcionales de plantas C-3 a C-4 en ambientes secos y cálidos.

#### 15.1.4. Discriminación isotópica en plantas C-3 y C-4

En el CO<sub>2</sub> atmosférico los porcentajes normales de los distintos isótopos del carbono son: 10<sup>-10</sup> por 100 de <sup>14</sup>C, 1,1 por 100 de <sup>13</sup>C y el resto <sup>12</sup>C. Las reacciones de carboxilación discriminan ligeramente entre los distintos isótopos, principalmente en base a la diferente velocidad de difusión de la molécula que los contiene y su efecto en el mecanismo de carboxilación. Concretamente, la PEP-carboxilasa discrimina menos que la ribulosa difosfato carboxilasa, de manera que en plantas C-4 la desviación de la proporción de fijación de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> respecto de la proporción atmosférica es de sólo - 11 por 1.000, mientras que en plantas C-3, la desviación es de - 27 por 1.000. Estas diferencias de composición isotópica se pueden medir sensiblemente y sirven, así, como un criterio para saber si una planta tiene fotosíntesis C-4 o C-3. En un ejemplo más práctico, dicha discriminación sirve para distinguir azúcar de caña (planta C-4) de azúcar de remolacha (planta C-3) en base a la proporción que contenga de <sup>13</sup>C.

#### 15.2. Fotosíntesis en plantas con metabolismo ácido de Crasuláceas

Muchas especies vegetales tienen hojas carnosas con una baja relación superficie/volumen y son conocidas como plantas suculentas. Como ya mencionamos en el capítulo

lo 5, estas plantas fijan  $\text{CO}_2$  de noche, acumulando grandes cantidades de ácidos orgánicos, principalmente málico. Este metabolismo fue inicialmente estudiado en algunas especies de Crasuláceas, y es comúnmente conocido como metabolismo ácido de crasuláceas, o como se le llama abreviadamente en la literatura anglosajona: CAM (*Crasulacean acid metabolism*). A las plantas que lo poseen las llamaremos plantas CAM.

La operación del mecanismo CAM supone, como veremos, una variante en la forma de operar el ciclo de Calvin y tiene profundas implicaciones en el funcionamiento fotosintético de las plantas que lo poseen.

Aunque normalmente todas las plantas suculentas tienen el metabolismo ácido (son plantas CAM), se conocen algunos casos de plantas suculentas que no son CAM (especialmente en halófitas) y a la inversa.

La anatomía de las plantas suculentas se caracteriza por la ausencia de una capa de células de empalizada bien definida. En su lugar, un mesófilo esponjoso llenó la mayor parte de la estructura fotosintética. Incluso la vaina de células que rodea los conductos vasculares es mesofilica. Las células del mesófilo contienen, además de cloroplastos, grandes vacuolas.

Un gran número de familias incluyen especies CAM. Entre dichas familias se encuentran: Aizoáceas, Cactáceas, Crasuláceas, Cucurbitáceas, Euforbiáceas, Geraniáceas, Labiadas, Liliáceas y Portulacáceas. Incluso existe evidencia de fotosíntesis CAM en algún helecho. No puede, pues, trazarse una idea evolutiva clara sobre la aparición de la fotosíntesis CAM. También es frecuente que plantas C-3 desarrollen estructuras suculentas con fotosíntesis CAM en condiciones de sequía.

Las plantas CAM tienen los estomas abiertos durante la noche, en que fijan el  $\text{CO}_2$  sobre PEP, en reacción catalizada por PEP-carboxilasa, semejante a la que ocurre en plantas C-4 (15.1). También, como en plantas C-4, el oxalacetato formado pasa a málico, en reacción catalizada por una malato deshidrogenasa, pero en este caso dependiente de NADH. El málico se acumula en las vacuolas y parcialmente se transforma en otros ácidos del ciclo de Krebs como cítrico e isocítrico. Como se ve, a diferencia de plantas C-4, el málico se forma en la oscuridad, no a la luz y, además, no se transporta a otras células, sino que se acumula en las vacuolas. El PEP necesario para este proceso nocturno procede de las reservas de almidón, que durante la noche se utilizan, vía glicólisis, para dar PEP y, por tanto, málico.

Durante el día, el málico y los otros ácidos formados salen de la vacuola y dan oxalacetato que por acción de una PEP-carboxikinasa (reacción [15.6]) da PEP y  $\text{CO}_2$ . El PEP formado vía gluconeogénesis regenera almidón y el  $\text{CO}_2$  liberado se fija sobre ribulosa-difosfato, que por el ciclo de Calvin da azúcares. El ATP y el NADPH, requeridos en diversas etapas, son proporcionados por el transporte electrónico fotosintético. En la figura 15.6 se representan esquemáticamente las diversas etapas.

Durante la noche, el NADH producido por glicólisis hasta PEP, se utiliza para producir málico a partir de oxalacetato. El proceso global equivale así a una fermentación. Igualmente, la conversión diurna de los otros tres átomos de carbono del málico, que vía PEP forman almidón, no requiere consumo neto de equivalentes de reducción, aunque sí ATP. La liberación del  $\text{CO}_2$  desde málico con PEP-carboxikinasa, es semejante a una de las vías que se dan en plantas C-4 productoras de aspartato, en lugar de utilizar el enzima málico.

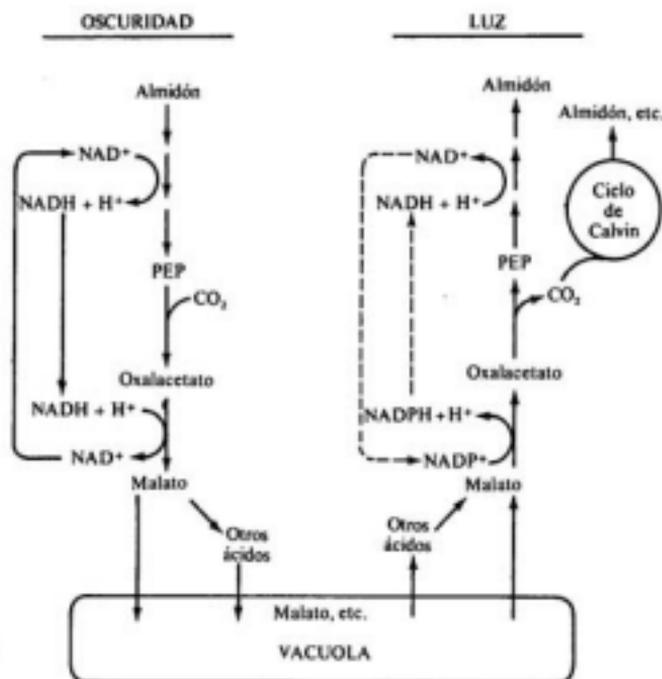


Figura 15.6.—Etapas del metabolismo ácido carboxílico y fotosíntesis en plantas CAM.

La degradación nocturna del almidón hasta gliceraldehído-3-fosfato y 3-fosfoglicerato, parece tener lugar en cloroplastos. Estos dos compuestos pasan al citoplasma donde forman malato. De día, el malato pasa a oxalacetato y éste da  $\text{CO}_2$  de una forma semejante a como sucede en algunas plantas C-4.

Aunque en cuanto a productos intermediarios de fijación de  $\text{CO}_2$  existe una gran similitud entre plantas C-4 y plantas CAM, en cuanto a mecanismo parecen existir diferencias importantes. Mientras que en plantas C-4 la separación espacial de los procesos de carboxilación y descarboxilación requiere un intermediario de bajo peso molecular, transportador de  $\text{CO}_2$ , que migre entre los dos tipos de células, en plantas CAM desaparece la necesidad de ese intermediario transportador. En plantas CAM lo que sucede es una separación temporal entre los procesos de carboxilación y descarboxilación; ahora, en lugar de acumular de día el transportador piruvato (que sería el mecanismo equivalente al de las C-4), acumulan la sustancia a carboxilar en forma de almidón. No pasar el metabolismo por piruvato, supone un ahorro de ATP. De todas formas, el mecanismo CAM tiene una gran similitud con el metabolismo de al menos algunos

tipos de plantas C-4, en especial si en alguno de estos tipos hay realmente transferencia de PEP, entre células de la vaina y células del mesófilo.

En muchas plantas, una vía alternativa al metabolismo diurno del málico (indicado en la figura 15.6) es la descarboxilación del ácido málico catalizada por el enzima málico. Así, para síntesis de almidón, el piruvato probablemente formaría PEP con piruvato fosfato dikinasa, tal como parece ocurrir en la mayoría de las plantas C-4. En estas plantas CAM, el enzima málico responsable de la degradación del ácido málico está localizado en mitocondrias, pero el piruvato resultante no parece ser consumido en mitocondrias, sino que pasa a azúcares en citoplasma.

Como hemos dicho, algunas plantas C-3 pueden pasar a una fotosíntesis CAM en condiciones de deficiencia hídrica. Se ha sugerido que el ácido abscísico, que como vimos en el capítulo 5, cierra estomas y aumenta de concentración en condiciones de déficit hídrico acusado, puede mediar esta transición de fotosíntesis C-3 a fotosíntesis CAM.

Diversos mecanismos de control aseguran este cambio metabólico tan drástico del día a la noche en plantas CAM. Se ha sugerido un control de PEP-carboxilasa por la fluctuación diurna de temperatura. El enzima es, además, inhibido por malato que proporciona un control adicional. A diferencia del enzima de plantas C-4, la PEP-carboxilasa de plantas CAM es poco activa de día, no pudiendo entonces competir con la ribulosa-difosfato carboxilasa por el  $\text{CO}_2$ . Aparte de posibles efectos de luz y temperatura sobre los niveles del enzima, éstos parecen fluctuar, además, según un ritmo endógeno.

Por su anormal ciclo de apertura estomática, las plantas CAM están especialmente adaptadas a climas áridos. Mientras que las plantas C-4 están adaptadas a ambientes de aridez continua a lo largo del día, las plantas CAM parecen mejor adaptadas a ambientes con aridez cíclica diurna, debido a los bruscos cambios de temperatura del día a la noche. Las plantas C-4 parecen, además, adaptadas a ambientes con aridez fluctuante con periodos largos, como ocurre en las zonas tropicales.

### 15.3. Ciclo tricarbóxico reductivo de Arnon. Otras vías de fijación de $\text{CO}_2$

En la mayoría de las bacterias fotosintéticas se ha demostrado el funcionamiento del ciclo de Calvin. Arnon sugirió que en algunas de ellas (*Chlorobium thiosulfatophilum* y *Rhodospirillum rubrum*), también puede operar un ciclo tricarbóxico reductivo, equivalente a una reversión del ciclo de Krebs. Las etapas irreversibles de éste (oxidaciones de  $\alpha$ -cetoácidos) se podrían invertir, con el uso de un reductor más potente que los piridín nucleótidos reducidos. Tal reductor, que debe formarse fotosintéticamente, pudiera ser ferredoxina reducida o alguna estructura parecida. El esquema propuesto para el ciclo se representa en la figura 15.7. Con cuatro etapas de fijación de  $\text{CO}_2$ , produciría oxalacetato que puede ir a síntesis de azúcares vía PEP-carboxikinasa, usando así tres de los cuatro  $\text{CO}_2$  inicialmente fijados. Además, oxalacetato e intermedios del ciclo podrían servir para síntesis de aminoácidos y lípidos.

En organismos heterótrofos y en algunos quimioautótrofos (como ciertas bacterias metanogénicas), se han descubierto recientemente otras vías de fijación de  $\text{CO}_2$  (vía

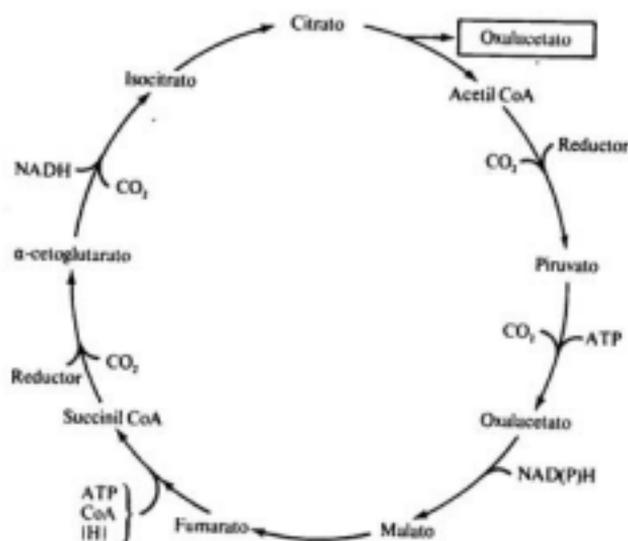


Figura 15.7.—Ciclo tricarboxílico reductivo de Arnon.

glicina o acetil-SCoA). En ningún caso, hasta ahora, se han encontrado estas vías en organismos fotosintéticos. Hay que señalar que diversos quimioautótrofos utilizan el ciclo de Calvin como vía de fijación del  $\text{CO}_2$ .

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- EDWARDS, G. E.; NAKAMOTO, H.; BURNELL, J. N., y HATCH, M. D.: *Piruvato,  $P_2$  dikinase and NADP-malate dehydrogenase in  $C_4$  photosynthesis*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 255-286.
- GIBBS, M., y LATZKO, E. (eds.): *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 6, *Photosynthesis II*, Springer-Verlag, Berlín, 1979.
- GOVINDIEE (ed.): *Photosynthesis*, vol. II, Academic Press, Nueva York, 1982.
- HATCH, M. D., y OSMOND, C. B.: *Compartmentation and Transport in  $C-4$  Photosynthesis*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 3 (Ed. por C. R. Stocking y U. Heber), Springer-Verlag, Berlín, 1976, págs. 144-184.
- KELLY, G. T.; LATZKO, E., y GIBBS, M.: *Regulatory aspects of photosynthetic carbon metabolism*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 27, 1976, págs. 181-205.
- KLUGE, M.: *Metabolism of Organic Acids*, en *Progress in Botany*, vol. 43, Springer-Verlag, Berlín, 1981, págs. 64-73.
- LAETSCH, W. M.: *The  $C-4$  Syndrome: a Structural Analysis*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», volumen 25, 1974, págs. 27-52.
- TING, I. P.: *Crasulacean Acid Metabolism*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 595-622.

## FOTORRESPIRACIÓN

Ya hacia 1920 Warburg encontró que la fotosíntesis medida como  $\text{CO}_2$  asimilado era inhibida por altas concentraciones de  $\text{O}_2$  en la atmósfera. El  $\text{CO}_2$  asimilado, medido en fotosíntesis, es el balance neto entre la asimilación fotosintética de  $\text{CO}_2$  y su producción respiratoria. Es de suponer que la respiración mitocondrial, aunque pequeña, es sensible en hojas iluminadas. Pero mientras que es bien conocido que la velocidad de la respiración mitocondrial está saturada para las concentraciones normales de  $\text{O}_2$  en la atmósfera, aproximadamente el 21 por 100, la inhibición de la fotosíntesis por  $\text{O}_2$  aumenta mucho al aumentar la proporción de  $\text{O}_2$  en la atmósfera por encima de ese 21 por 100. En consecuencia, el  $\text{O}_2$  debe tener algún efecto adicional a la pequeña respiración mitocondrial, por el cual hace que disminuya la fotosíntesis neta. Esta disminución puede ser debida a un proceso respiratorio liberador de  $\text{CO}_2$  e independiente del mitocondrial, y/o a un efecto inhibidor del  $\text{O}_2$  sobre alguna etapa del proceso fotosintético. Como veremos en este capítulo, se dan simultáneamente las dos situaciones. Además, el proceso respiratorio no mitocondrial que consume  $\text{O}_2$  y produce  $\text{CO}_2$  es estimulado por luz, por lo que al fenómeno conjunto se le llama fotorrespiración o respiración dependiente de la iluminación.

Como veremos, la fotorrespiración es importante en plantas C-3 e inexistente o muy pequeña en plantas C-4.

### 16.1. El problema de la medida de la fotorrespiración

Cuando se mide el consumo de  $\text{O}_2$  y la producción de  $\text{CO}_2$  por hojas de una planta C-3 mantenidas en ausencia de  $\text{CO}_2$ , se encuentra que en la oscuridad la velocidad respiratoria se satura ya a bajas concentraciones de  $\text{O}_2$  (10 a 18 por 100). En cambio, en presencia de luz, continúa aumentando la velocidad respiratoria y, además, no se satura por concentraciones de  $\text{O}_2$  ni aun del 50 y 60 por 100. Esta respiración adicional, en presencia de luz, podría ser una medida de la velocidad de fotorrespiración, pero aun así su determinación cuantitativa es difícil, ya que habría de realizarse a tiempos muy cortos para que no se viera afectada por la reutilización fotosintética del  $\text{CO}_2$  producido en fotorrespiración. Éste, hasta salir a la atmósfera externa donde se mide, ha de atravesar el mesófilo clorofílico que lo puede reutilizar. Además, supuesta una competencia entre fotosíntesis y fotorrespiración por la utilización de luz, la medida de fotorrespiración en

una atmósfera exenta de  $\text{CO}_2$ , no tiene por qué ser igual a la que ocurre en las condiciones habituales de fotosíntesis.

Un proceso respiratorio es el inverso de la fotosíntesis, produce  $\text{CO}_2$  y consume  $\text{O}_2$ . Cualquier medida de producción o consumo de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  es, en realidad, la medida de la diferencia entre fotosíntesis y respiración. La medida individual de la variación de cada uno de estos gases, no es posible por los métodos habituales de medida de cambios de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ . Las medidas de fotorrespiración en ausencia de  $\text{CO}_2$  sólo pueden ser indicativas de su valor en condiciones naturales.

Se pueden hacer medidas más complejas y precisas de las magnitudes de fotosíntesis total y fotorrespiración (la diferencia entre ambos es la fotosíntesis neta), con el uso de isótopos radiactivos. Si, por ejemplo, las hojas se mantienen durante un tiempo prolongado en una atmósfera con  $^{14}\text{CO}_2$ , se marcan radiactivamente, almidón, intermediarios del ciclo de Calvin y otros compuestos. Si luego esas hojas se pasan a una atmósfera con  $^{12}\text{CO}_2$  no radiactivo, este último se asimilará por fotosíntesis, pero las hojas, inicialmente, producirán  $\text{CO}_2$  marcado con  $^{14}\text{C}$  procedente del consumo en fotorrespiración de sus reservas marcadas con  $^{14}\text{C}$  resultantes de la exposición anterior. Aunque también dentro de ciertas reservas críticas la medida en estas condiciones de la velocidad inicial de producción de  $^{14}\text{CO}_2$  es una medida de la velocidad de fotorrespiración.

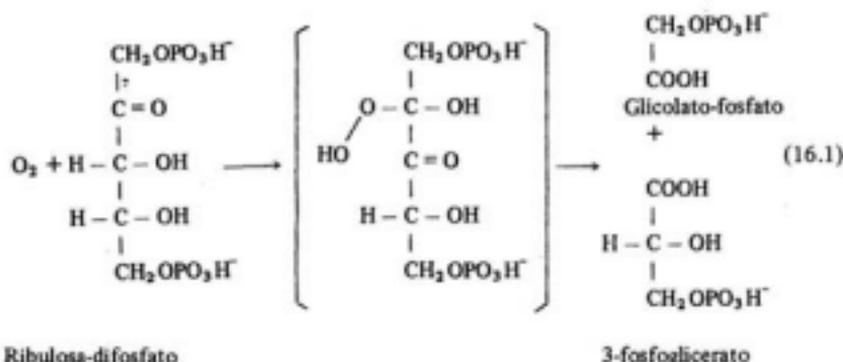
Con las ya descritas y otras aproximaciones experimentales, se estima un valor considerable de la fotorrespiración que, en muchas plantas C-3, puede suponer un 50 por 100 del valor de la fotosíntesis neta. En cambio, en plantas C-4 la fotorrespiración tiene un valor despreciable.

## 16.2. Mecanismos de la fotorrespiración

En la investigación de los mecanismos moleculares responsables de la fotorrespiración pronto resultó evidente que el ácido glicólico ( $\text{CH}_2\text{OH} - \text{COOH}$ ) estaba implicado en algunas etapas de la fotorrespiración. Muchas algas producen en fotosíntesis grandes cantidades de ácido glicólico que expulsan al exterior. En los otros organismos con fotosíntesis C-3, el glicólico sirve como sustrato para la producción fotorrespiratoria de  $\text{CO}_2$ . Durante bastante tiempo fue un enigma el origen fotosintético del ácido glicólico. Ogren y Bowes, en 1971, sugirieron su formación a partir de ribulosa-difosfato con oxígeno. En 1973, Lorimer y Andrews explicaron el origen de la fotorrespiración por una reacción entre ribulosa-difosfato y oxígeno en el centro activo de la ribulosa difosfato-carboxilasa. El glicólico producido es después metabolizado por diversos procesos, algunos aún no bien conocidos, en los que participan diversas estructuras subcelulares y que en lo mejor conocido analizaremos a continuación.

En la figura 16.1 representamos el origen y principales vías del metabolismo posterior del glicólico.

La ribulosa-difosfato carboxilasa, además de catalizar la formación de dos moléculas de 3-fosfoglicerato a partir de una de ribulosa-difosfato y una de  $\text{CO}_2$ , puede admitir  $\text{O}_2$  como sustrato alternativo al  $\text{CO}_2$ . Si es  $\text{O}_2$  el que ataca a la ribulosa-difosfato en el centro activo del enzima, la molécula de ribulosa-difosfato se escinde dando una molécula de glicolato-fosfato y otra de 3-fosfoglicerato, probablemente según el mecanismo:



Se trata de una actividad oxigenasa adicional a la actividad carboxilasa del enzima.

Al glicolato-fosfato formado, pasan los carbonos 1 y 2 de la molécula de ribulosa difosfato. Como en la reacción sólo se forma una molécula de 3-fosfoglicerato, este proceso supone una disminución de intermediarios del ciclo de Calvin y, por tanto, una inhibición del proceso fotosintético de asimilación del  $\text{CO}_2$ . La etapa ① es, pues, una primera forma de inhibición de la fotosíntesis por oxígeno, debido a que compete con el  $\text{CO}_2$  en el centro activo de la ribulosa-difosfato carboxilasa y a que determina una pérdida de átomos de carbono de intermediarios del ciclo de Calvin.

A continuación, también en cloroplastos, el glicolato-fosfato es hidrolizado dando glicolato. El glicolato pasa a peroxisomas, donde en una reacción ③ catalizada por la flavoproteína glicolato oxidasa, se forma ácido glioxílico. En esta reacción se forma además agua oxigenada,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que es descompuesta por catalasa ④, enzima abundante en estas estructuras subcelulares. El glioxalato formado puede volver a cloroplastos donde, en reacción catalizada enzimáticamente ⑤, es reducido de nuevo a glicólico con NADPH producido en el transporte electrónico fotosintético. El glioxalato formado en ③ puede, también en peroxisomas, transaminarse con glutamato ⑥, formando glicina que pasa a mitocondrias. En mitocondrias dos moléculas de glicina forman una de serina ⑦ produciendo  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ . En realidad, se trata de un proceso en el que intervienen dos actividades enzimáticas distintas: una glicina descarboxilasa y una hidroximetiltransferasa, que se encuentran en mitocondrias. La serina formada pasa de nuevo a peroxisomas, donde por transaminación pasa a hidroxipiruvato ⑧. Este último también en peroxisomas es reducido a glicerato ⑨ que es fosforilado ⑩, probablemente en cloroplastos, donde se incorpora al ciclo de Calvin.

De acuerdo con el esquema representado en la figura 16.1, y en cualquier caso utilizando como intermediarios glicolato y glioxalato, dos procesos pueden ser los responsables de la fotorrespiración. En uno de los procesos, glicolato y glioxalato sufren interconversiones cíclicas, de forma que el glicolato se oxida en peroxisomas a glioxalato ③, y en último caso utilizando medio mol de oxígeno (resultado de las etapas ③ y ④) por mol de glicolato. El glioxalato en cloroplastos vuelve a

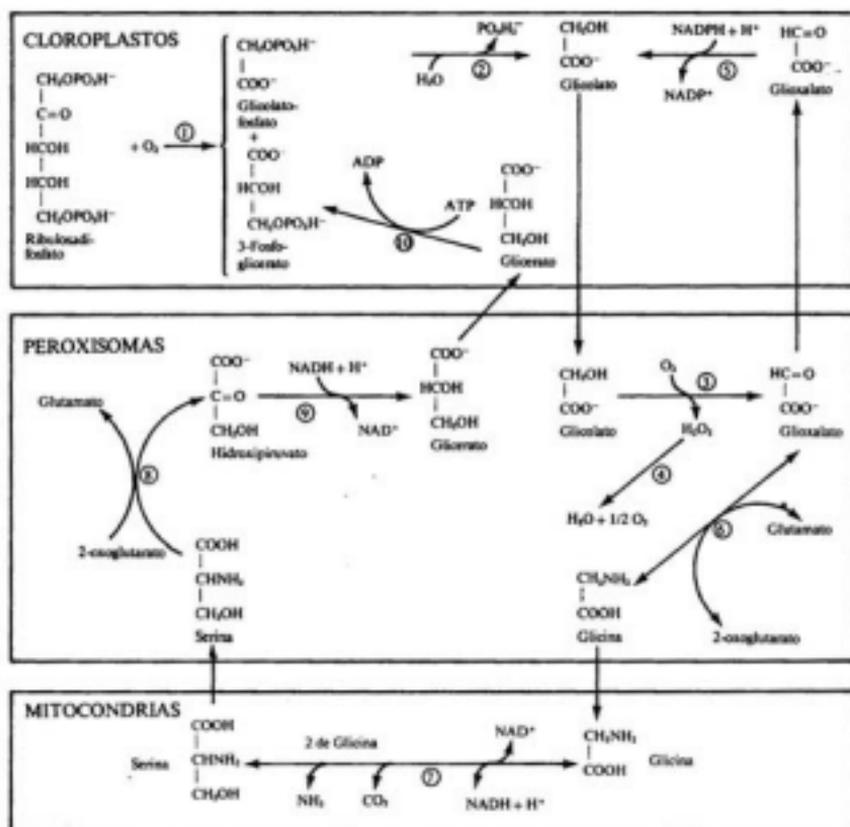


Figura 16.1.—Etapas metabólicas implicadas en la fotorrespiración.

glicolato con NADPH. En conjunto, la operación ciclica de las etapas  $\textcircled{3}$  y  $\textcircled{5}$  supone globalmente el proceso:

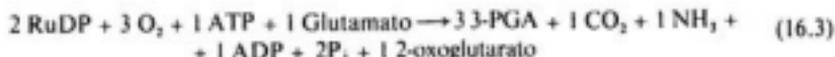


que no es sino el proceso inverso al que ocurre en el transporte electrónico fotosintético. Entonces, este proceso fotorrespiratorio supone una inutilización del NADPH producido en fotosíntesis, y en la medida en que opere el proceso fotorrespiratorio, competirá con la utilización fotosintética del NADPH y determinará una disminución del rendimiento fotosintético. Este primer proceso fotorrespiratorio consume  $\text{O}_2$  pero no produce  $\text{CO}_2$ , por lo que resulta muy difícil determinar su importancia relativa. Puede estar operando desde el momento de iniciar la produc-

ción de  $O_2$  en la fotólisis del agua. El oxígeno tiene un doble efecto sobre la velocidad de este proceso fotorrespiratorio, ya que por una parte es requerido como sustrato en la reacción catalizada por la glicolato oxidasa (3), y por otra, como en todo proceso cíclico, en el ciclo de transformaciones glioxílico ↔ glicólico inherente al proceso, un aumento de concentración de intermedios supone un aumento de la velocidad del proceso. Precisamente, al aumentar la concentración de  $O_2$  debe aumentar la formación del intermedio glicólico y con ello la velocidad del proceso. Por otra parte, la luz es requerida para la formación fotosintética de NADPH utilizado para la operación del ciclo.

El otro proceso fotorrespiratorio requiere un metabolismo ulterior del glioxalato e implica la participación, además de cloroplastos y peroxisomas, de mitocondrias.

Este metabolismo del glioxalato, según las etapas (6), (7), (8), (9) y (10) de la figura 16.1, hasta la formación de 3-fosfoglicerato, supone una producción de  $CO_2$  y  $NH_3$  en la etapa (7). Si no la única, la etapa (7) parece el mecanismo mayoritario de formación del  $CO_2$  fotorrespiratorio. Considerando este proceso fotorrespiratorio desde ribulosa-difosfato hasta 3-fosfoglicerato (etapas sucesivas: 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10), por dos moles de ribulosa difosfato utilizados se consumen 3 moles de  $O_2$  (etapas 1 y 3), corrigiendo esta última con la producción de  $1/2 O_2$  en (4), y 1 mol de ATP, produciéndose 1 mol de  $CO_2$  y 1 mol de  $NH_3$ , con el paso adicional de 1 mol de glutamato a 1 mol de 2-oxoglutarato (de los dos glutamatos usados en (6), uno se recupera en (8)), es decir:



Este ciclo fotorrespiratorio se completa con la conversión de los 3 moles de 3-fosfoglicerato producidos, en 1,5 moles de ribulosa-difosfato vía ciclo de Calvin, lo que requiere 3 moles de NADPH y 4,5 moles de ATP. En conjunto, la operación del proceso fotorrespiratorio del metabolismo del glioxalato vía glicina y serina a 3-fosfoglicerato y ribulosa difosfato, supone un elevado consumo de ATP además de la producción de  $CO_2$  y consumo de  $O_2$ . El balance total hasta esta etapa es aún incierto, pues depende de la vía por la que el  $NH_3$  producido se incorpora en el 2-oxoglutarato para regenerar glutamato, que consume equivalentes de reducción y posiblemente ATP, caso de usar, en un proceso cíclico, los enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintetasa. En cuanto a equivalentes de reducción se necesitan 8 electrones en total para pasar 3 moléculas de 3-PGA a 1,5 de RuDP y una de 2-oxoglutarato o glutamato que dan cuenta de 2 moléculas de  $O_2$  de las 3 que figuran en (16.3), así por mol de  $CO_2$  producido, se consume netamente un mol de  $O_2$ . La producción fotorrespiratoria, y posterior reutilización, del  $NH_3$  es de la mayor importancia cuantitativa. Se estima que la magnitud de este ciclo metabólico del nitrógeno excede con mucho a la magnitud neta de la asimilación del nitrógeno por la planta.

Los dos procesos fotorrespiratorios tienen varias etapas comunes; entre ellas, la catalizada por glicolato oxidasa (3) es inhibida por compuestos análogos estructu-

rales del glicólico, como los ácidos  $\alpha$ -hidroxisulfónicos, que son conocidos inhibidores de la fotorrespiración.

El segundo proceso fotorrespiratorio considerado, via glicina y serina, parece el más importante cuantitativamente, e incluso se duda de la operatividad *in vivo* del primero. Se ha sugerido que el segundo proceso puede ser una vía de formación fotosintética de aminoácidos, pero en la práctica supone un gran desgaste de energía y de intermediarios carbonados de la fotosíntesis.

Por el requerimiento de  $O_2$  en dos etapas, se explica la activación de fotorrespiración por  $O_2$ . Además, también este segundo proceso requiere luz para la formación de poder reductor via transporte electrónico fotosintético, poder reductor utilizado en diversas etapas del ciclo fotorrespiratorio via glicina y serina.

La operación de los dos procesos considerados de fotorrespiración implica la etapa inicial de ruptura con  $O_2$  de la ribulosa-difosfato carboxilasa. Todas las ribulosa-difosfato carboxilasas de diversas fuentes hasta ahora ensayadas tienen, a la vez que actividad carboxilasa, actividad oxigenasa. Parece que esta doble actividad es una característica inherente al centro catalítico del enzima, que no ha podido ser eliminada en la evolución de las plantas, a pesar del efecto perjudicial de la fotorrespiración en el rendimiento fotosintético. Con las técnicas de la ingeniería genética, se están intentando mejorar hoy día las propiedades catalíticas de la ribulosa difosfato carboxilasa.

La regulación de las proporciones relativas de fotosíntesis y fotorrespiración debe ser compleja, y es poco conocida. Hay que tener en cuenta que un exceso de fotorrespiración determina una disminución de ribulosa-difosfato, lo que a la larga determinaría una disminución del proceso de fotorrespiración. Por otra parte, un exceso de luz sobre la velocidad de acceso del  $CO_2$  a la ribulosa-difosfato carboxilasa, determina un aumento de concentración de ribulosa-difosfato que favorece la fotorrespiración.

Es probable que existan otros procesos metabólicos relacionados con fotorrespiración aún poco conocidos. Es bien conocido que el ácido glioxílico con  $H_2O_2$ , en reacción también catalizada por glicolato oxidasa, se oxida a ácido oxálico ( $CO_2H-CO_2H$ ) que se puede descarboxilar a fórmico ( $HCO_2H$ ). En la extensión en que el  $H_2O_2$  producido en ③, no sea descompuesto por la catalasa ④, la formación de ácido fórmico puede ser un proceso adicional de la fotorrespiración. Es poco conocido el metabolismo ulterior del fórmico para el que existen varias posibilidades. Por otra parte, algunas plantas pueden acumular grandes cantidades de oxálico, y una posibilidad es que su origen esté en la fotorrespiración. Es posible que, también via fotorrespiración, se formen pequeñas cantidades de monóxido de carbono,  $CO$ , desde glioxílico y desde fórmico. Se ha sugerido otro origen para el glicólico a partir del complejo glicolaldehído-transcetolasa, intermedio en la reacción de la transcetolasa del ciclo de Calvin, pero no parece muy importante esta vía de formación del glicólico.

### 16.3. Fotorrespiración en distintos tipos de plantas

La fotorrespiración es un fenómeno común en plantas con fotosíntesis C-3. Las plantas C-4 no presentan fotorrespiración. Sin embargo, células clorofílicas de la vaina aisladas de plantas C-4 sí muestran fotorrespiración.

El hecho de que las plantas C-4 no muestren fotorrespiración es, a primera vista, pa-

radójico, y en los últimos años ha dado lugar a diversas teorías para explicarlo. Existen ya una serie de hechos experimentales que parece que permiten comprender por qué las plantas C-4 carecen de fotorrespiración y que pueden explicar, al menos, algunos aspectos de las presiones evolutivas que originaron la aparición de las plantas con fotosíntesis C-4. En primer lugar, parece descartada la presencia de ribulosa-difosfato carboxilasa en células del mesófilo; el enzima carboxilante presente en su lugar en estas células, no cataliza ningún proceso que implique  $O_2$ . Cabe suponer que en las células de la vaina más interiores, la presión parcial de  $O_2$  será baja y éste no podrá competir con el  $CO_2$  tanto como en una célula fotosintética de planta C-3. Pero más aún, aunque se ha visto que las células de la vaina aisladas contienen todos los enzimas y partículas subcelulares implicadas en la fotorrespiración, y de hecho estando aisladas fotorrespiran en una atmósfera normal, cuando el  $CO_2$  no se les suministra como tal, libre en la atmósfera, o como  $CO_2H^-$  en el medio, sino como malato o aspartato, su fotorrespiración se hace despreciable. Parece como si malato y aspartato, al llegar a las células de la vaina, y gracias a las altas actividades descarboxilantes presentes en ésta, dieran lugar a una alta concentración de  $CO_2$  que minimiza la competencia por el  $O_2$  en el centro activo de la ribulosa-difosfato carboxilasa de células de la vaina. Una serie de circunstancias adicionales pueden colaborar en proporcionar una alta concentración de  $CO_2$  en las células de la vaina. En este sentido, quizá el medio ácido que pueda proporcionar málico y aspártico favorece una alta relación  $CO_2/CO_2H^-$  en el equilibrio de la reacción catalizada por la anhidrasa carbónica.

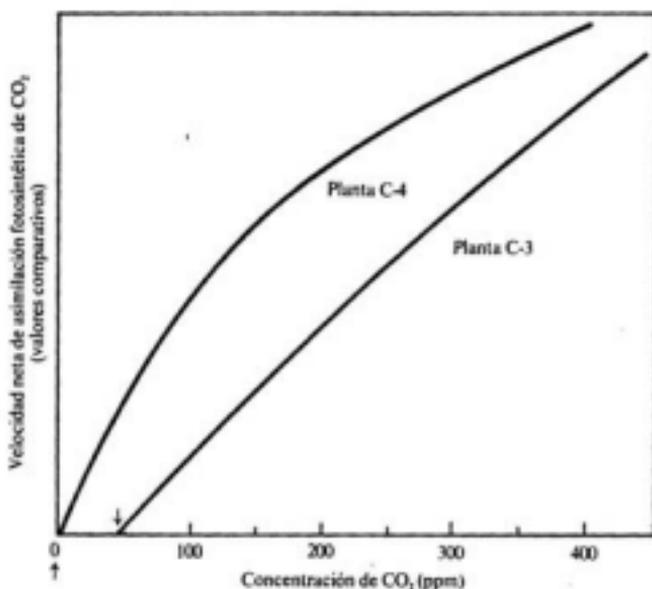


Figura 16.2.—Efecto de la concentración atmosférica del  $CO_2$  sobre la velocidad de fotosíntesis en plantas C-3 y C-4. Las flechas indican los puntos de compensación en uno y otro caso.

Sin descartar totalmente la contribución de otros factores, como es la reutilización por la PEP-carboxilasa de células del mesófilo del  $\text{CO}_2$  que se pudiera formar por fotorrespiración en células de la vaina, parece que, efectivamente, la alta concentración de  $\text{CO}_2$  que se produce en células de la vaina, es un factor fundamental para impedir la fotorrespiración en plantas C-4.

En ausencia de  $\text{CO}_2$ , las hojas lo producen y consumen oxígeno por respiración mitocondrial y, en su caso, por fotorrespiración. Cuando se va aumentando la concentración de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera, la activación del proceso fotosintético da lugar a un consumo del mismo. La velocidad de la fotosíntesis aumenta con la concentración de  $\text{CO}_2$ . Llega un momento en que se equilibran la suma de las velocidades de la producción respiratoria de  $\text{CO}_2$ , con la de su consumo fotosintético. A la concentración de  $\text{CO}_2$  requerido para esta situación se la denomina concentración de punto de compensación, o simplemente punto de compensación (Fig. 16.2). Si se hubiese colocado la planta en una atmósfera cerrada, el consumo fotosintético del  $\text{CO}_2$  determinaría una disminución de la concentración de éste hasta que se alcanza la misma situación del punto de compensación. El punto de compensación de las plantas C-3 se sitúa entre 30 y 70 ppm de  $\text{CO}_2$  en una atmósfera con un 21 por 100 de  $\text{O}_2$ . Debe recordarse que la atmósfera normal contiene unas 300 ppm de  $\text{CO}_2$ . Las plantas C-4 muestran un punto de compensación entre 0 y 10 ppm de  $\text{CO}_2$ .

Existe igualmente un punto de compensación luminosa, esto es, intensidad de luz, para la que se equilibran fotosíntesis y respiración. En este caso, las plantas C-4 alcanzan su punto de compensación a unos 100 lux, mientras que las C-3 lo alcanzan entre 1.000 y 5.000 lux. Hay que tener en cuenta que la luz también activa la fotorrespiración en plantas C-3, por lo que requerirán más luz para el punto de compensación. En cuanto a condiciones para saturación de la velocidad de fotosíntesis, veremos en el capítulo siguiente cómo las plantas C-4 alcanzan la saturación a más bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  y a más altas intensidades luminosas que las C-3. Incluso a las máximas intensidades de radiación solar en la superficie de la Tierra muchas plantas C-4 no alcanzan el máximo de fotosíntesis.

Como ya hemos visto, la PEP-carboxilasa tiene más afinidad por su sustrato carboxilante que la ribulosa-difosfato carboxilasa, lo que explica que la velocidad de fotosíntesis se satura por  $\text{CO}_2$  a más bajas concentraciones en plantas C-4 que en plantas C-3. Teniendo en cuenta que los dos enzimas carboxilantes usan distinto sustrato carboxilante,  $\text{CO}_2$  o  $\text{CO}_3\text{H}^-$ , para comparar las afinidades por sus respectivos sustratos hay que considerar la proporción de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  a  $\text{CO}_2$  en el equilibrio de la reacción catalizada por la anhidrasa carbónica (reacción [15.2]). Dicho equilibrio depende del pH, y en condiciones fisiológicas la relación  $\text{CO}_3\text{H}^-$  a  $\text{CO}_2$ , puede tener un valor de 20. En cuanto al efecto de la iluminación hay que tener en cuenta que ésta, en plantas C-3, al activar la fotorrespiración puede anular los efectos estimuladores sobre fotosíntesis.

Ambas, fotorrespiración y respiración mitocondrial, aumentan progresivamente con la temperatura incluso a temperaturas de 40 y 50° C. En cambio, la fotosíntesis total alcanza su máximo a temperaturas más bajas según se verá en el capítulo siguiente. Al aumentar la temperatura en los márgenes de la biosfera, aumenta más rápidamente

la velocidad de respiración que la velocidad de fotosíntesis. En consecuencia, las plantas C-4 presentan un óptimo de fotosíntesis neta a temperaturas (30 a 40°C) sensiblemente más altas que las plantas C-3 (15-25°C).

Otra consecuencia de la diferencia entre plantas C-3 y C-4, en cuanto a la presencia de fotorrespiración en las primeras, es que la productividad por hectárea sea sensiblemente mayor en plantas C-4 que en plantas C-3.

Las algas, aunque realizan una fotosíntesis tipo C-3, presentan puntos de compensación de  $\text{CO}_2$  bajos. En muchos casos, en algas, más que una producción fotorrespiratoria de  $\text{CO}_2$ , lo que ocurre es una excreción al medio de glicolato y otros compuestos orgánicos derivados de su metabolismo. En algunas algas, se ha demostrado la existencia de un transporte activo de  $\text{CO}_2$  a la célula. Probablemente, este mecanismo, al acumular  $\text{CO}_2$  en la célula, permite lograr una relación  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  alta en el centro activo de la ribulosa difosfato carboxilasa, lo que determinaría bajas velocidades de fotorrespiración.

Es difícil estimar la presencia o no de fotorrespiración en plantas CAM. Existen en éstas los enzimas y estructuras que participan en fotorrespiración y es muy probable que funcione ésta, aunque el hecho de que los estomas estén cerrados cuando la planta se ilumina puede reducir el efecto del  $\text{O}_2$ .

#### 16.4. Fotorrespiración y evolución de los distintos tipos de fotosíntesis

Difícilmente cabe atribuir una función en la planta a la fotorrespiración. A pesar de que las plantas puedan hacer un uso de algún aspecto de la fotorrespiración, ésta en conjunto parece ser negativa para el aprovechamiento fotosintético de la luz por la planta, o al menos la fotorrespiración no parece proporcionar ninguna ventaja para la planta.

La idea más aceptada hoy día es que en la atmósfera primitiva en que aparecieron los primeros organismos fotosintéticos, no había apenas oxígeno y en consecuencia la fotosíntesis no se veía disminuida por la fotorrespiración. Fue precisamente la acción de los organismos fotosintéticos la que determinó un aumento de la concentración de  $\text{O}_2$  en la atmósfera, hasta que se equilibraron los procesos fotosintéticos con los respiratorios de los organismos aerobios que surgieron con la presencia creciente de  $\text{O}_2$ .

Lo que en principio no era un problema, con el aumento de  $\text{O}_2$  en la atmósfera significó una disminución sustancial de la eficacia fotosintética. Sólo en este contexto, y con una gran diversidad ya existente de plantas, fue significativa una presión evolutiva para reducir la fotorrespiración. El desarrollo de la fotosíntesis C-4, permitió a las plantas que la lograron ciertas ventajas selectivas, al menos en zonas de elevada temperatura ambiental, en que la fotorrespiración es importante y es grande la diferencia de la velocidad de fotosíntesis neta entre plantas C-4 y C-3. Frecuentemente climas calurosos y secos, e incluso a veces también ambientes salinos, van unidos, lo que confirió a las plantas C-4 ventajas selectivas, al menos en estos ambientes, que permitieron su desarrollo. De todas formas, en zonas más templadas o frías y húmedas no se dieron motivos para un desplazamiento importante de plantas C-3 por plantas C-4.

En cualquier caso, parece que el aumento de la concentración de oxígeno en la atmósfera se dio muy tempranamente en la Tierra, mientras que se supone que la

aparición de la fotosíntesis C-4 es reciente. Probablemente, altas concentraciones de CO<sub>2</sub> atmosférico en el pasado, no hicieron necesaria la aparición de la fotosíntesis C-4.

Según algunos autores, la similitud metabólica entre plantas CAM y células oclusivas (Cap. 5), sugiere que aquella procedió de una extensión al mesófilo de las características metabólicas de las células oclusivas. Ligeras modificaciones del metabolismo fotosintético CAM y cambios morfológicos en las hojas, serían así el origen de la fotosíntesis C-4. En este sentido, el origen de los acontecimientos evolutivos en el metabolismo fotosintético radicaría en una adaptación a ambientes secos. Aunque, posteriormente, adaptaciones a bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> llevaron a otras formas de fotosíntesis.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- ANDREWS, T. J., y LORIMER, G. H.: *Photorespiration-still Unavoidable?* «FEBS letters», volumen 90, 1978, págs. 1-9.
- BLACK, C. C.: *Photosynthetic Carbon Fixation in Relation to Net CO<sub>2</sub> Uptake*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 24, 1973, págs. 253-286.
- GOVINDIEE (ed.): *Photosynthesis*, vol. II. Academic Press, Nueva York, 1982.
- JENSEN, R. G., y BAHR, J. T.: *Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 28, 1977, págs. 379-400.
- KELLY, G. I.; LATZKO, E., y GIBBS, M.: *Regulatory Aspects of Photosynthetic Carbon Metabolism*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 27, 1976, págs. 181-205.
- GIBBS, H. y LATZKO, E. (eds.): *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 6, *Photosynthesis II*. Springer-Verlag, Berlin, 1979.
- LAETSCH, W. M.: *The C-4 Syndrome: A structural analysis*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», volumen 25, 1974, págs. 27-52.
- OGREN, W. L.: *Photorespiration: Pathways, Regulation and Modification*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 35, 1984, págs. 415-442.
- SCHNARRENBERGER, C., y FOCK, H.: *Interaction among Organelles Involved in Photorespiration*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 3 (Ed. por C. R. Stocking y U. Heber), Springer-Verlag, Berlin, 1976, págs. 185-234.

## FACTORES QUE REGULAN LA FOTOSÍNTESIS Y RENDIMIENTO FOTOSINTÉTICO

La atmósfera terrestre es un medio muy oxidante debido a su elevado contenido en oxígeno (21 por 100); y este alto porcentaje de oxígeno que hace posible la vida sobre la tierra, tiene su origen en el proceso de la fotosíntesis. Al mismo tiempo, mediante la fotosíntesis, se fija  $\text{CO}_2$  atmosférico y se produce materia orgánica. En la tabla 17.1 se dan algunos valores de producción de materia orgánica, principalmente en forma de celulosa, y procediendo todo ello del  $\text{CO}_2$  atmosférico a pesar de su baja concentración (320 ppm, o sea, 0,032 por 100 en volumen).

Naturalmente que no todas las plantas tienen la misma eficiencia a la hora de transformar el  $\text{CO}_2$  atmosférico en materia orgánica. Aparte de las diferencias que puede haber en función de los variados factores que afectan a la fotosíntesis, y que veremos más adelante, existen también variaciones en la eficiencia fotosintética entre las distintas especies. Así, aquellas que no fotorrespiran, o que tienen unos valores muy bajos de fotorrespiración, serán más eficientes que las que fotorrespiran, aunque puede haber excepciones, como el caso del girasol, que aunque es una planta que fotorrespira, tiene una gran eficiencia fotosintética (Tabla 17.2).

TABLA 17.1  
Producción primaria neta en varios ecosistemas

Ecosistema	Área $\text{km}^2 \times 10^6$	Productividad media $\text{g} \times \text{m}^{-2} \times \text{año}^{-1}$	Producción neta $\text{Tm} \times \text{año}^{-1} \times 10^6$
Bosques tropicales .....	24,5	3.800	93.100
Bosques templados .....	12,0	2.500	30.000
Bosque boreal .....	12,0	800	9.600
Monte bajo .....	8,5	700	6.000
Sabana .....	15,0	900	13.500
Praderas .....	9,0	600	5.400
Tundra .....	8,0	140	1.100
Desiertos .....	42,0	40	1.670
Tierras cultivadas .....	14,0	650	9.100
Aguas terrestres .....	4,0	1.185	4.500
Océanos .....	361,0	152	55.000
<b>TOTAL .....</b>	<b>510,0</b>	<b>333</b>	<b>170.000</b>

TABLA 17.2

Fotosíntesis neta en hojas aisladas de algunas especies con elevada iluminación y a 300 ppm de CO<sub>2</sub>

Especie	Fotosíntesis neta mg CO <sub>2</sub> × dm <sup>-2</sup> × h <sup>-1</sup>
Maíz .....	46-63
Caña de azúcar .....	42-49
Girasol .....	37-44
<i>Typha latifolia</i> .....	44-69
Tabaco .....	16-21
Remolacha azucarera .....	24-28
Trigo .....	17-31
Alubias .....	12-17
Roble .....	10

Tomado de Zelitch, I., *Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity*, Academic Press, Nueva York, 1971).

### 17.1. Concepto de factor limitante

Los primeros investigadores que realizaron trabajos para estudiar la influencia que ejercían los factores ambientales sobre la fotosíntesis, intentaban determinar para cada factor que estudiaban sus puntos cardinales, es decir, el mínimo, el óptimo y el máximo (Fig. 17.1). Sin embargo, se encontraron con que no era posible dar unos valores deter-

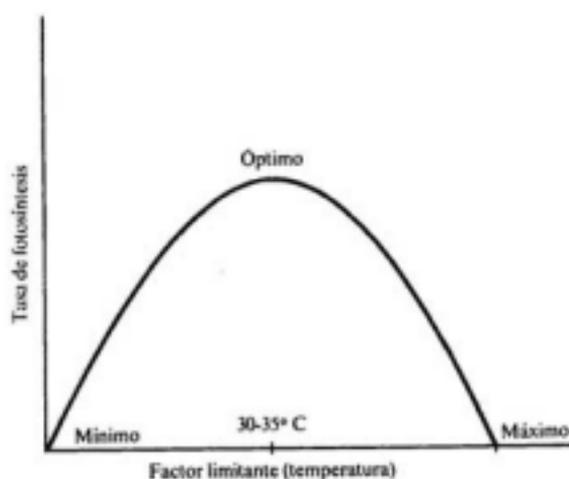


Figura 17.1.—Puntos cardinales de la intensidad fotosintética frente a la temperatura.

minados a esos puntos, ya que dependía de la situación del resto de las condiciones ambientales, por lo que había que estudiarlos en relación unos con otros.

Aunque en 1843 Justus von Liebig ya había propuesto la ley del mínimo, según la cual, cuando un proceso es regulado por una serie de factores la tasa total del proceso está limitada por el factor más lento, Blackman, a partir de esto, formuló su principio de los factores limitantes. Según este principio, la tasa de fotosíntesis está limitada por uno sólo entre todos los factores que pueden actuar a un mismo tiempo, siendo proporcional a la cantidad de ese factor, pero cesa la proporcionalidad cuando otro factor se hace limitante (Fig. 17.2).

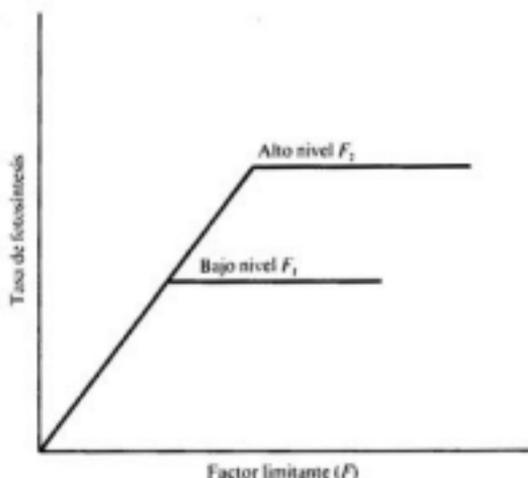


Figura 17.2.—Respuesta de la tasa de fotosíntesis frente a un factor limitante aplicado a dos niveles diferentes.

El principio de los factores limitantes en la realidad experimental no es tan tajante como lo propuso Blackman. El cese de la correlación no es brusco, hay una disminución gradual, pudiendo ocurrir que dos o más factores actúen como limitantes o que no haya una influencia simultánea en todas las células o en todos los cloroplastos de una misma célula.

## 17.2. Factores que influyen sobre la fotosíntesis

En la ecuación general de la fotosíntesis podemos apreciar todos los parámetros que pueden influir sobre la intensidad fotosintética, pero además de esos existen otros dos factores que no aparecen de forma explícita, pero que también pueden influir sobre la

tasa de fotosíntesis, y que son la temperatura y los nutrientes. Todo este conjunto de factores que influyen sobre la reacción fotosintética podemos dividirlos en dos grupos.

Los inherentes a la planta, sobre los cuales poco podemos hacer y los procedentes del medio ambiente, que son quizá los que más nos interesan, pues también son los que más marcada influencia ejercen. De los factores ambientales, los que más hacen sentir sus efectos, cuando hay déficit de los mismos, son, sin lugar a dudas, el agua, la temperatura y los nutrientes minerales. No tenemos más que repasar en qué zonas del globo existe mayor o menor productividad; en los desiertos, precisamente por falta de agua, apenas hay vegetación, aunque haya abundancia de nutrientes y temperatura adecuada, mientras en los ecosistemas con abundancia de agua la productividad es muy grande. Las bajas temperaturas también afectan negativamente la productividad fotosintética. No tenemos más que pensar en la vegetación que crece en las zonas frías del globo (tundras alpinas o árticas). El efecto negativo de la baja concentración de nutrientes puede observarse en los océanos, donde la productividad por unidad de superficie en general es baja, a pesar de que no hay ni falta de agua ni la temperatura supone ningún obstáculo para el crecimiento, sino todo lo contrario. En este caso, el factor limitante lo constituyen los nutrientes, ya que la mayor parte de los organismos marinos al morir, se depositan en el fondo del océano, arrastrando consigo las sales minerales que los integran. Así, mientras el fondo de los océanos es rico en fosfatos, nitratos y otros nutrientes, la superficie se ve empobrecida en ellos. Resulta, por tanto, que la mayor parte de los océanos son auténticos desiertos fotosintéticos, por carencia de nutrientes, excepto cuando un flujo de corrientes hace ascender nutrientes del fondo y entonces hay un incremento enorme del fitoplanctón oceánico.

Vamos a considerar cada uno de los factores que pueden afectar a la fotosíntesis, comenzando por los factores ambientales.

### 17.2.1. Influencia de la luz

Del total de energía luminosa que llega al límite de la atmósfera, y que es del orden de  $0,47\text{J} \times \text{cm}^{-2} \times \text{min}^{-1}$ , no todo llega a la superficie de la tierra, ya que parte es absorbido por las partículas que existen en la atmósfera, por el vapor de agua y por el  $\text{CO}_2$ , de tal forma que  $0,31\text{J} \times \text{cm}^{-2} \times \text{min}^{-1}$  se abren paso hasta la superficie terrestre. De esta cantidad de energía, un 52 por 100 corresponde a longitudes de onda del infrarrojo y un 4 por 100 al ultravioleta, por tanto utilizable fotosintéticamente entre 400 y 700 nm llega aproximadamente un 44 por 100, es decir, que para la fotosíntesis disponemos de  $0,14\text{J} \times \text{cm}^{-2} \times \text{min}^{-1}$  ó  $42 \times 10^4 \text{ erg} \times \text{seg}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$ .

En verano,  $1 \text{ cm}^2$  de superficie recibirá, al cabo del día, de 100 a 170J de luz fotosintéticamente activa, y esta cantidad dependerá, naturalmente, de las condiciones climatológicas, de la localización y variará con la época del año. De este total, una hoja puede absorber el 85 por 100, según su estructura, y el resto es transmitido a hojas inferiores o es reflejado. Del total de energía que absorbe una hoja, aproximadamente un 95 por 100 se pierde como calor, de tal forma que, en el mejor de los casos, sólo un 5 por 100 es utilizado normalmente en fotosíntesis.

17.2.1.1. **Plantas de sol y plantas de sombra**

Hemos definido ya lo que era el punto de compensación para la luz. Si tratamos de determinar este valor en diferentes plantas, nos encontramos con que hay diferencias de unas a otras, independientemente de cuál sea el mecanismo de fijación del  $\text{CO}_2$ . Nos encontramos con especies que tienen tasas fotosintéticas muy bajas en iluminación intensa, en comparación con aquellas que aumentan considerablemente al aumentar la intensidad luminosa. Además, las primeras alcanzan la saturación de luz mucho antes, con valores muy bajos llegan al punto de compensación y, por último, tienen tasas fotosintéticas mayores a intensidad luminosa más baja que las otras especies. Esto hace que las plantas que presentan las características descritas puedan crecer en lugares donde las otras, de mayor punto de compensación, no podrían por ser muy baja la intensidad luminosa que incide sobre las hojas. Estas plantas son las denominadas plantas de sombra.

Esta situación que se da en algunas especies, puede darse entre hojas de una misma especie, es decir, puede haber diferencias entre una hoja expuesta al sol (hoja de sol) y una hoja situada en la zona más umbrófila de la planta (hoja de sombra). Esto se traduce en diferencias anatómicas e incluso, dentro de ciertos límites, en diferencias metabólicas. Las hojas de sombra suelen tener mayor área y son más delgadas que las de sol, teniendo estas células en empalizada más largas, incluso presentando a veces una capa adicional más (Fig. 17.3). Las hojas de sombra presentan más clorofila por unidad de

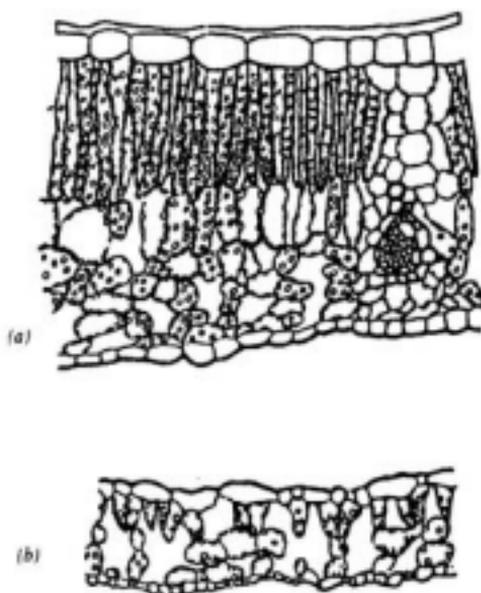


Figura 17.3.—Sección transversal de una hoja de sol (a) y una hoja de sombra (b).

peso pues sus cloroplastos poseen más grana que los de las hojas de sol. Por otra parte, su contenido en proteínas del estroma es menor, por lo que parece como si las hojas de sombra favorecieran la biosíntesis de pigmentos captadores de energía, además de que estos cloroplastos, en una reacción fototrópica, se orientan en las células de forma que pueden aprovechar al máximo la poca luz que les llega.

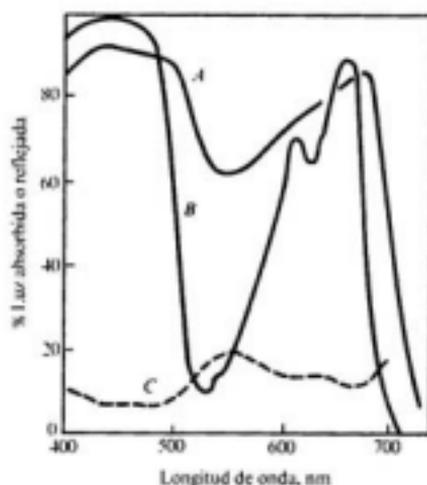


Figura 17.4.—Espectro de absorción de la luz en una hoja (A). Absorción de la luz por una solución de clorofila (B). Reflexión de la luz en una hoja (C).

Si observamos el espectro de absorción de una hoja verde y lo comparamos con el espectro de absorción de la clorofila extraída, se puede apreciar que la hoja absorbe mucha más radiación verde que la solución de clorofila (Fig. 17.4). Este fenómeno es debido a la presencia de pigmentos accesorios y a la organización de la clorofila en la lamela cloroplástica, por lo que podemos ver que la luz verde es importante fotosintéticamente. Así, las plantas del sotobosque reciben una gran cantidad de radiación en forma de luz verde, ya que el azul y el rojo han sido retenidos por las hojas superiores. Vemos, por tanto, que prácticamente todas las radiaciones pueden ser aprovechadas por la fotosíntesis aunque la eficiencia puede ser muy distinta. Una idea de la eficiencia de cada longitud de onda, la tenemos en el rendimiento cuántico, que es el cociente entre el número de moléculas de  $\text{CO}_2$  consumido o de  $\text{O}_2$  desprendido y el número de cuantos absorbidos. La eficiencia fotosintética puede expresarse mediante el cociente entre la energía almacenada en forma de materia orgánica producida y la energía luminosa absorbida.

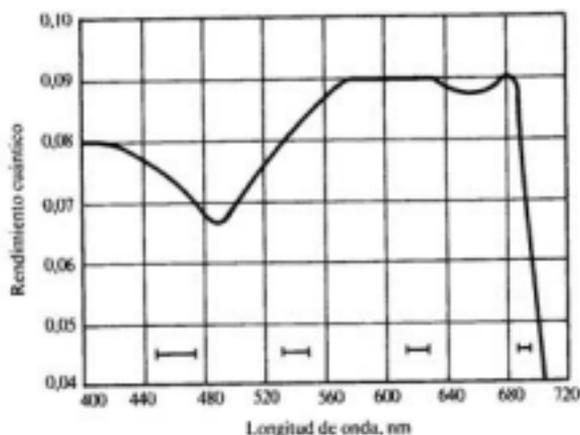


Figura 17.5.—Rendimiento cuántico para el alga *Chlorella*. Se señala cómo la luz absorbida por los pigmentos accesorios también es útil en la fotosíntesis.

El rendimiento cuántico es bajo en los extremos del espectro de absorción. Un rendimiento cuántico bajo es reflejo de una baja tasa de fotosíntesis (Fig. 17.5). Si se representa la tasa de fotosíntesis frente a longitudes de onda de la misma intensidad obtenemos un espectro de acción. El espectro de acción varía de unos organismos a otros, en función de su dotación de pigmentos accesorios (Fig. 17.6).

#### 17.2.1.2. Intensidad luminosa

Si ningún otro factor actúa como limitante, a medida que aumenta la intensidad luminosa, aumenta el valor de la tasa fotosintética en forma logarítmica (Fig. 17.7), hasta que se alcanza la saturación, la cual varía según las especies.

El punto de compensación a la luz también varía y lo hace en función de diversos factores: contenido en clorofila, grosor de la hoja, apertura estomática, tasa de respiración o fotorrespiración y el tipo de reacción de carboxilación.

En luz muy intensa, la fotosíntesis puede ser inhibida, bien por cierre de estomas, respiración acelerada, o fotooxidación del aparato fotosintético. La luz muy intensa puede producir un aumento de la transpiración y, por tanto, una pérdida de la turgencia y cierre de los estomas. Además se calientan las hojas produciendo un aumento de la respiración y si la temperatura aumenta en exceso puede producirse una inactivación de enzimas.

La fotooxidación de la clorofila o solarización, producida por iluminación intensa es consecuencia de la excitación excesiva de moléculas de clorofila que no pueden ceder electrones a la cadena transportadora, pues ésta no puede aceptar más, y como conse-

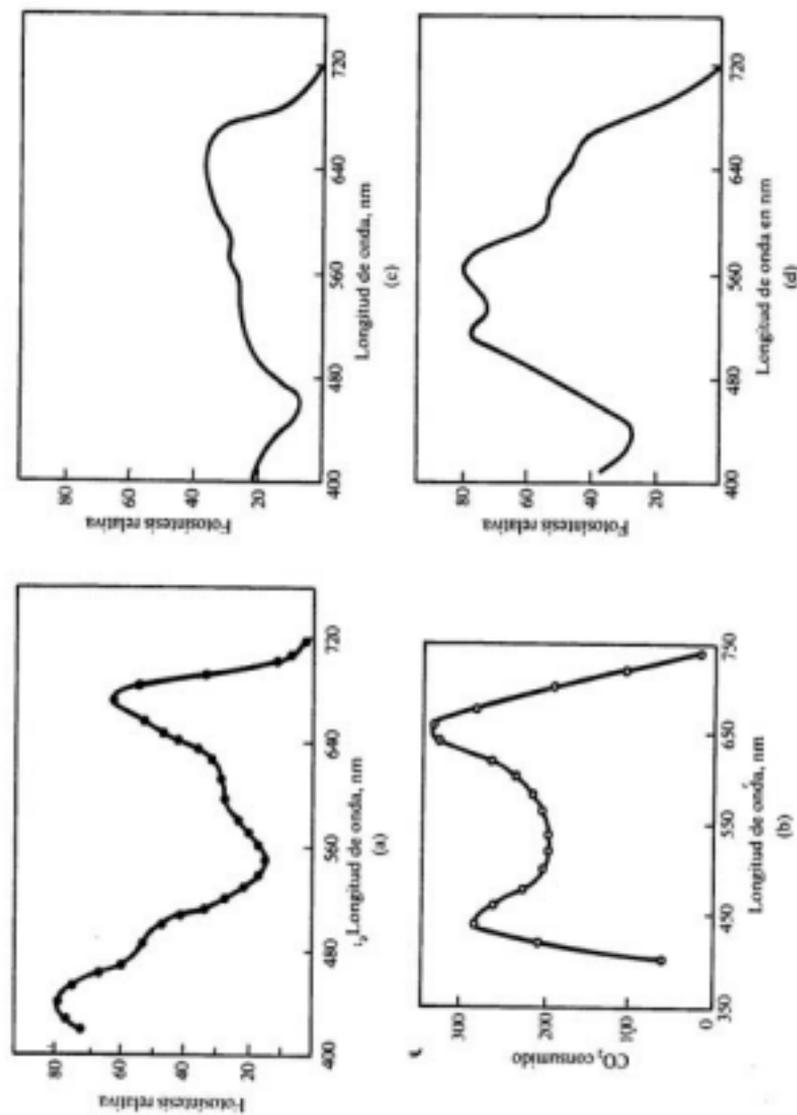


Figura 17.6.—Espectro de acción de: (a) *Ulva laevissima* (alga verde); (b) Trigo; (c) *Porphyra perforata* (alga roja); (d) *Schizymenia pacifica* (alga roja).

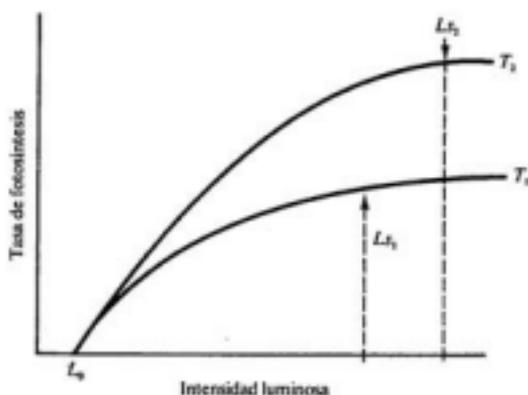


Figura 17.7.—Variación de la fotosíntesis en función de la intensidad luminosa.  $T_1$  y  $T_2$  son dos temperaturas diferentes.  $L_q$  indica el valor del punto de compensación y  $L_{t_1}$  y  $L_{t_2}$  las intensidades de saturación a  $T_1$  y  $T_2$ .

cuencia, hay una decoloración de la clorofila, siendo inactivados algunos enzimas importantes. La clorofila en la planta goza de una protección contra la inactivación causada por la luz debido a la presencia de ciertas proteínas y, sobre todo, de los carotenoides.

El achacar a los carotenoides un papel protector de la clorofila, se basa en resultados obtenidos por diversos investigadores que encontraron que los carotenoides pueden oxidarse a la luz formando epóxidos que posteriormente se reducen en una reacción oscura catalizada por una desepoxidasa. La clorofila activada al absorber la luz, puede combinarse con oxígeno, formando un complejo que puede desembocar en la fotooxidación de la clorofila. Sin embargo, el complejo clorofila-oxígeno puede ser desactivado por un carotenoide que se oxidaría a la forma epóxido y luego en la oscuridad se regeneraría de nuevo el carotenoide (Fig. 17.8).

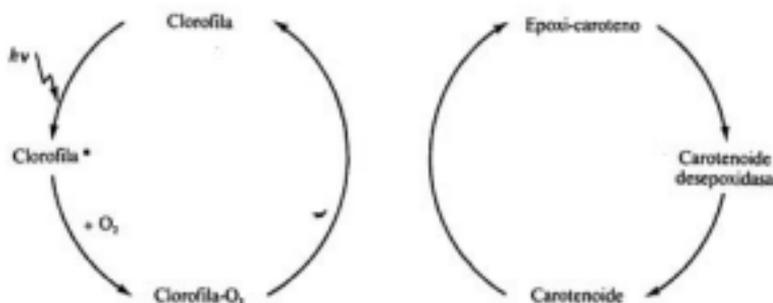


Figura 17.8.—Esquema en que se representa el papel protector de los carotenos sobre la fotooxidación de la clorofila.

### 17.2.1.3. Duración de la iluminación

La iluminación continua afecta a la fotosíntesis, tras varios días, a una intensidad por encima del punto de saturación; sin embargo, a intensidades por debajo del punto de saturación no hay daño aparente.

La influencia de la luz continua parece que depende de la calidad de la luz suplementaria que suele contener radiaciones UV. Si se eliminan estas radiaciones, el crecimiento es normal. Lo que se desconoce es la razón metabólica para que estas longitudes de onda actúen como inhibidores, ya que un período oscuro aumenta este efecto perjudicial de la luz.

### 17.2.2. Influencia del anhídrido carbónico

El contenido de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera no es constante. Por ejemplo, desde que comenzó el uso masivo de combustibles fósiles, dicho contenido ha pasado de 300 a 320 ppm, por lo que la tasa de aumento puede fijarse en 0,7 ppm por año. Que este aumento sea tan pequeño indica la existencia de un efecto tampón, que en gran parte se realiza en los océanos, ya que en ellos hay un equilibrio entre el  $\text{CO}_2$  atmosférico y los carbonatos disueltos. Por otra parte, la concentración de  $\text{CO}_2$  sobre una cosecha puede oscilar entre el día y la noche; así, en un campo de maíz, puede pasar de 260 ppm en el día cuando las plantas sintetizan, a 440 ppm cuando sólo hay respiración. Vemos, por tanto, que existe una variación diurna en la fotosíntesis influida por el anhídrido carbónico.

Hemos visto, al principio de este capítulo, que existe una variación en la tasa de fotosíntesis de diferentes especies. Normalmente estos valores se calculan a concentraciones normales de  $\text{CO}_2$  y alta intensidad luminosa. Si estas medidas se hacen a concentraciones elevadas de  $\text{CO}_2$ , las diferencias disminuyen considerablemente (Tabla 17.3). Excepto cuando los estomas se cierran, como puede ser a causa de una sequía, un aumento de la concentración de  $\text{CO}_2$  en el aire viene acompañado de un aumento de la fotosíntesis.

Por el contrario, bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  influyen desfavorablemente sobre la fotosíntesis, pudiendo hacerse la situación muy crítica para la supervivencia de las plan-

TABLA 17.3

Efecto de la concentración de  $\text{CO}_2$  sobre la fotosíntesis neta expresado en  $\text{mg} \times \text{dm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$

Plantas	Concentración de $\text{CO}_2$ en ppm			
	150	300	600	1.000
Maíz .....	27	47	74	92
Tabaco .....	10	24	48	69

tas y sobre todo para las del tipo C-3. Ya hemos visto que las plantas C-4 y C-3 tienen puntos de compensación diferentes. Si colocamos una planta de cada tipo en un compartimento estanco, la concentración de  $\text{CO}_2$  en el recinto irá disminuyendo paulatinamente debido a la fotosíntesis que realizan las plantas, pero al llegar al punto de compensación de la planta C-3 este valor en la concentración de  $\text{CO}_2$  se rebajará aún más, pues la planta C-4 puede seguir fotosintetizando con el  $\text{CO}_2$  que se desprende de la respiración y de la fotorrespiración de la planta C-3, así ésta acabará muriendo mucho antes de que lo haga la C-4.

Se producen situaciones de deficiencia de  $\text{CO}_2$  cuando las hojas están expuestas a una luz intensa y no hay corrientes de aire, ya que en estas condiciones la capa de aire limitante ofrece una gran resistencia a la difusión. Sin embargo, cualquier pequeña brisa que disminuya el espesor de esta capa, aumenta nuevamente la intensidad fotosintética. Naturalmente, en estas condiciones nos encontramos con diferente comportamiento entre las hojas de sol y las de sombra, pues en las primeras sí se planteará situación de déficit de  $\text{CO}_2$ , mientras que esto no ocurrirá en las segundas. Hay situaciones en que puede presentarse una deficiencia de  $\text{CO}_2$ , por ejemplo, en cosechas crecidas en invernadero, sobre todo en invierno, cuando dichos invernaderos tienen que mantenerse cerrados, por lo que a las cosechas se les abona con  $\text{CO}_2$  procedente de botellas a presión.

El poder beneficioso del enriquecimiento de  $\text{CO}_2$  en los invernaderos puede proceder del efecto inhibitorio del mismo sobre la actividad ribulosa difosfato oxigenasa y la consiguiente inhibición en la formación de ácido glicólico, sustrato de la fotorrespiración, con lo que la inhibición de la fotorrespiración podría reportar un beneficio fotosintético.

Aunque la toxicidad del  $\text{CO}_2$  no se comprende bien, a concentraciones superiores a 10.000 ppm algún proceso sufre un bloqueo que acarrea una disminución de la fotosíntesis (inhibición de la oxidación del citocromo b, cierre de estomas antes de que se produzcan efectos tóxicos u otros que no se conocen).

### 17.2.3. Influencia de la temperatura

Los límites de temperatura entre los cuales puede realizarse la fotosíntesis son muy amplios, desde los líquenes antárticos que pueden fotosintetizar a  $-18^\circ\text{C}$ , con un valor óptimo a  $0^\circ\text{C}$ , hasta bacterias que pueden realizar la fotosíntesis a  $70^\circ\text{C}$ . En plantas superiores se alcanzan óptimos que pueden oscilar entre  $25$  y  $35^\circ\text{C}$ .

En general, las especies que crecen en climas cálidos soportan mejor las temperaturas altas que las que crecen en climas templados o fríos, siendo la temperatura óptima del orden de la temperatura media diaria a la cual crece la planta normalmente.

Es frecuente que las plantas del tipo C-4 tengan un óptimo más alto que las del tipo C-3, y como ya hemos visto en el capítulo anterior, esta diferencia está controlada por la fotorrespiración. La temperatura afecta principalmente las reacciones bioquímicas que llevan a la reducción del  $\text{CO}_2$  con lo que, al aumentar la temperatura, normalmente aumenta la tasa de fotosíntesis hasta el cierre de los estomas o la desnaturalización de las proteínas (inactivación de enzimas). Sin embargo, al aumentar la temperatura aumenta la respiración y es aún mayor la influencia sobre la fotorrespiración; recuerde-

mos que los valores de  $Q_{10}$  de fotosíntesis, respiración y fotorrespiración son, respectivamente, 1,2, 2,3 y 1,8. Por otra parte, las temperaturas altas afectan a la apertura de los estomas y a la solubilidad del oxígeno que aumenta más que la del  $\text{CO}_2$ , lo que hace que la influencia de la temperatura sobre la tasa de fotosíntesis entre las temperaturas de 15 y 30° C no se haga sentir. Debemos hacer notar que las plantas C-4 sí muestran variaciones frente a la temperatura, alcanzando el óptimo de fotosíntesis entre 30 y 40° C.

#### 17.2.4. Influencia del oxígeno

El efecto Warburg es la inhibición de la fotosíntesis por el oxígeno. En 1920, Warburg encontró que la tasa de fotosíntesis en *Chlorella* disminuía al aumentar la concentración de  $\text{O}_2$ , y que a 21 por 100 de  $\text{O}_2$  se obtenía un valor que era el 65 por 100 del máximo. Este efecto es anulado en parte por el  $\text{CO}_2$ , de tal manera que si la concentración de éste aumenta, el efecto inhibitorio es menor. Por otra parte, parece estar íntimamente asociado con la fotorrespiración, aunque conviene tener en cuenta que parte del fenómeno puede ser achacado a la inhibición por el  $\text{O}_2$  de ciertos enzimas del ciclo de reducción del carbono, del transporte fotosintético de electrones o de la fosforilación (Tabla 17.4), aunque la inhibición observada en estos enzimas no es suficiente para justificar el efecto total medido, por lo que cabe asegurar que el papel inhibitorio del oxígeno sobre la asimilación de anhídrido carbónico se hace principalmente a través de la fotorrespiración.

#### 17.2.5. Influencia del agua

Para penetrar en la hoja, el  $\text{CO}_2$  necesita que los estomas estén abiertos estando regulada dicha apertura por el contenido en agua de las células guarda; por tanto, una disminución suficiente del contenido relativo de agua cerrará los estomas y disminuirá la fotosíntesis.

TABLA 17.4

Efecto de la concentración de  $\text{O}_2$  sobre la fotosíntesis neta en hojas de varias especies situadas en atmósfera de 300 ppm y alta intensidad luminosa

Especies	T en °C	Fotosíntesis neta mg $\text{CO}_2$ dm <sup>-2</sup> x h <sup>-1</sup>	
		21%	2%
Cebada .....	22	28	40
Trigo .....	25	17	23
Girasol .....	30	37	53
Tabaco .....	30	17	24
Remolacha .....	25	25	35
Maíz .....	30	49	52
Caña de azúcar .....	26	52	52

El efecto de la hidratación varía de unas especies a otras. Así, en hojas de maíz que no han llegado a la marchitez, la inhibición de la fotosíntesis es del 80 por 100 cuando la de la transpiración sólo llega al 60 por 100 en comparación con plantas bien hidratadas. Esto nos indica que la sequía afecta más a las resistencias internas a la difusión del  $\text{CO}_2$  que la difusión a través del estoma propiamente.

Vamos a considerar a continuación los factores internos.

#### 17.2.6. Control metabólico de la fotosíntesis

Es evidente que una secuencia de procesos enzimáticos puede ser regulado por un mecanismo de retrocontrol, es decir, que productos finales de la reacción pueden actuar sobre etapas iniciales o intermedias, regulando así la pauta del proceso general. Sin embargo, existe otra posibilidad de regulación de una serie de reacciones que puede ejercerse mediante lo que se denomina carga de energía. Este mecanismo explica la acción de moléculas modificadoras como los adenín nucleótidos, que actuarían modificando ciertas enzimas, probablemente al alterar la conformación proteica de éstas y, como consecuencia, variando la afinidad de las enzimas por el sustrato.

La reacción  $\text{AMP} + \text{ATP} = 2 \text{ADP}$  está catalizada por una adenilato-kinasa. La carga de energía se calcula sumando el doble de la concentración de ATP a la de ADP y dividiendo por el doble de la suma de concentraciones de  $\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP}$ .

Aunque la mayor parte de los estudios en este campo se han realizado sobre enzimas aisladas, en trabajos con hojas de espinaca se observó que la fijación de  $\text{CO}_2$  es inhibida por el AMP, probablemente por inhibición de la reacción ribulosa-5-fosfato kinasa al disminuir la carga de energía.

Asimismo se ha demostrado que la luz puede estimular ciertas reacciones enzimáticas asociadas con la fotosíntesis, como la catalizada por la ribulosa-difosfato carboxilasa o la fosfopiruvato sintetasa. Otro caso en que la luz puede jugar un papel importante es sobre el ciclo de las pentosas fosfato, haciendo que actúe como oxidativo (respiración) o reductivo (fotosíntesis). Vemos, por tanto, que pequeños cambios pueden alterar las vías metabólicas en la célula y que no es necesario recurrir a los mecanismos de retrocontrol para regular los procesos metabólicos. Probablemente estos últimos no tengan ni siquiera oportunidad de actuar, pues los productos finales en gran parte se acumulan en la vacuola, se hacen insolubles como en el caso del almidón o son transportados a otros lugares de la planta.

#### 17.2.7. Transporte de hidratos de carbono

La tasa con que se movilizan los productos de la fotosíntesis también puede ser un mecanismo de control interno. Se ha comprobado que al eliminar alguno de los sumideros que tiene la planta, como tubérculos o frutos, se detecta a los pocos días una inhibición de la fotosíntesis en las hojas próximas al órgano eliminado y que normalmente exportarían los productos fotosintetizados a ese órgano. Las especies que tienen una tasa fotosintética elevada también tienen una tasa elevada de transporte, quizá para mantener valores altos en la fijación de  $\text{CO}_2$ .

El retirar las espigas de maíz ocasiona un 25 por 100 de inhibición en el consumo de  $\text{CO}_2$  a los siete días y un 75 por 100 a los once días en comparación con plantas normales. El retirar los frutos del tomate acarrea un aumento de la concentración de azúcar en las hojas y una disminución de la fotosíntesis.

#### 17.2.8. Influencia de los nutrientes

La fotosíntesis produce del 90 al 95 por 100 del peso seco de una planta y del 5 al 10 por 100 restante lo constituyen las cenizas y el nitrógeno. Por tanto, las deficiencias minerales, bien directa o indirectamente, afectarán a la fotosíntesis. Hemos visto (Cap. 8) que los primeros síntomas de casi cualquier deficiencia es la pérdida de clorofila y consiguiente alteración en la estructura del cloroplasto.

La deficiencia en nitrógeno causa una disminución en la tasa de asimilación del  $\text{CO}_2$ ; hojas situadas en una atmósfera con 2 por 100 de nitrógeno fijaban el  $\text{CO}_2$  a razón de  $8,5 \text{ mg} \times \text{dm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ ; si se colocan en una atmósfera con un 5 por 100 de nitrógeno, la tasa de fijación del  $\text{CO}_2$  pasa a ser de  $15 \text{ mg de } \text{CO}_2 \times \text{dm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ . Puesto que una proporción de la proteína foliar radica en el cloroplasto, el aumento de nitrógeno se refleja en una mejor dotación y actividad enzimática en los cloroplastos, aunque un exceso de  $\text{NH}_4^+$  produce síntomas análogos a los de deficiencia, e inhibe la fotosíntesis en hojas intactas.

En general el aparato fotosintético de plantas deficientes en algún elemento presenta anomalías que no tienen gran especificidad.

#### 17.2.9. Edad de la hoja

La capacidad de fotosíntesis de una hoja aumenta al ir desarrollándose la nueva hoja, hasta que llega un momento, cuando ésta alcanza la madurez o incluso un poco antes, en que la tasa de fotosíntesis comienza a disminuir. Naturalmente, las hojas viejas pierden su clorofila y, por ello, la capacidad de fotosíntesis. Incluso plantas de hoja perenne, suelen perder capacidad fotosintética con la edad.

#### 17.2.10. Regulación genética

La fotosíntesis también está regulada por el control genético y comienzan ya a acumularse conocimientos e información acerca de la naturaleza de estos controles. El vigor híbrido, o heterosis, resultante del cruzamiento ha sido observado en la fotosíntesis de híbridos de maíz (Tabla 17.5). También se encontró heterosis en la asimilación de  $\text{CO}_2$  y aumento de peso seco en hojas de maíz tras un cruzamiento y un doble cruzamiento, y el correspondiente aumento en la producción de grano en estas combinaciones.

Se conocen mutantes que han sufrido alteraciones en la estructura del cloroplasto, en la síntesis de clorofila y en la de los carotenoides, así como en la cadena transportadora de electrones y en enzimas del ciclo de fijación del  $\text{CO}_2$ . Estos mutantes no han

TABLA 17.5

Diferencias entre variedades de maíz en los valores de fotosíntesis neta medida a 300 ppm de CO<sub>2</sub>

Variedades	Punto de compensación CO <sub>2</sub> en ppm	Fotosíntesis neta mg CO <sub>2</sub> × dm <sup>-2</sup> × h <sup>-1</sup>
Maíz (W22 × NY821) .....	11 ± 1	75 ± 2
Maíz (W22) .....	25 ± 1	45 ± 3
Maíz (NY821) .....	20 ± 1	63 ± 2
Maíz (Pa83) .....	13 ± 1	85 ± 3
Maíz (Wf9) .....	23 ± 2	28 ± 2

podido ser utilizados en la mejora de la fotosíntesis, habiendo sido muy útiles, sin embargo, para conocer el valor de estos aspectos alterados sobre la fotosíntesis al ser eliminados.

Aunque los cruzamientos e híbridos obtenidos han llevado a una mayor productividad, y, portanto, a una mayor tasa de fotosíntesis, la siguiente etapa será determinar cuáles son las reacciones enzimáticas concretas que permiten aumentar esta productividad. En concreto, una disminución de la fotorrespiración, así como un aumento del número de estomas y de su apertura son algunos de los caminos por donde debe dirigirse la mejora genética de plantas a fin de aumentar su eficacia fotosintética.

### 17.3. Tasa de fotosíntesis y producción de una cosecha

El problema de aumentar la productividad de las cosechas es de transcendental importancia para la supervivencia de la humanidad. La eficiencia de la fotosíntesis es, como máximo, del 22 por 100 en el margen de la luz visible, y no es fácil aumentarla. En realidad, este rendimiento sólo se consigue a intensidades luminosas relativamente bajas, nunca con luz intensa. Al considerar la luz que puede utilizar una cosecha por unidad de superficie cultivada, nos encontramos con que difícilmente se alcanza esta eficiencia del 22 por 100. Muchas plantas solamente aprovechan entre el 1 y el 2 por 100 de la luz fotosintéticamente activa a lo largo de toda su época de crecimiento, almacenándolo en forma de hidratos de carbono. Las deficiencias en el rendimiento de la fotosíntesis se deben, en parte, a alguno de los factores que hemos estudiado, pero es que además hay que considerar que una planta no aprovecha al máximo durante todo su crecimiento la energía que incide sobre la plantación, pues mientras no cubra toda la superficie con sus hojas, gran parte de ella se perderá. Finalmente debemos considerar que las plantas respiran durante las 24 horas del día y la fotosíntesis sólo afecta a una parte de ese ciclo, produciéndose, por tanto, una pérdida de energía almacenada que es empleada en hacer funcionar una serie de procesos metabólicos.

La productividad de una cosecha vendrá determinada por la integración de todos

los factores que afectan a la fotosíntesis, pero también habrá que considerar la influencia de los tejidos que no fotosintetizan y la distribución de los productos formados, según que vayan dirigidos o no hacia el órgano que recogemos como cosecha.

De todas formas, y como ya hemos visto al principio, la productividad varía con el tipo de planta de que se trate. En la tabla 17.2 pueden verse algunos ejemplos.

Para el agricultor es mucho más importante la productividad total que la eficiencia, por lo que interesa que la cosecha cubra pronto la superficie del suelo y así interceptar más cantidad de luz. La respuesta de una plantación en bloque frente a la luz, es un problema de ecofisiología de máxima importancia. Si observamos la figura 17.9, veremos que en las plantas C-4 no parece haber efecto de saturación de la luz, mientras que en plantas C-3 si lo hay, aunque los valores son mayores que los que se alcanzan en una hoja aislada. La explicación de esta discrepancia está en que en un dosel foliar las hojas superiores absorben la mayor parte de la luz incidente, dejando pasar muy poco a las hojas más internas. Al aumentar la intensidad luminosa, las hojas superiores pueden saturarse y se transmite y refleja más luz a las inferiores. Como consecuencia, una cosecha o un bloque raramente reciben suficiente luz como para saturar la fotosíntesis.

El área foliar de una cosecha se relaciona con la absorción de luz y con el potencial fotosintético de esa cosecha. La relación entre el área foliar (por una sola cara) de la cosecha y el área de suelo que cubre la plantación, es denominada índice de área foliar (LAI). Un LAI mayor que 1 indica que el área foliar total de la cosecha es mayor que el suelo en que crece. No significa que todo el suelo esté cubierto de «verde», ya que las hojas pueden estar superpuestas y crecer verticales. En la figura 17.10 se representa la relación entre absorción de luz fotosintéticamente activa y el LAI; a mayor LAI, mayor

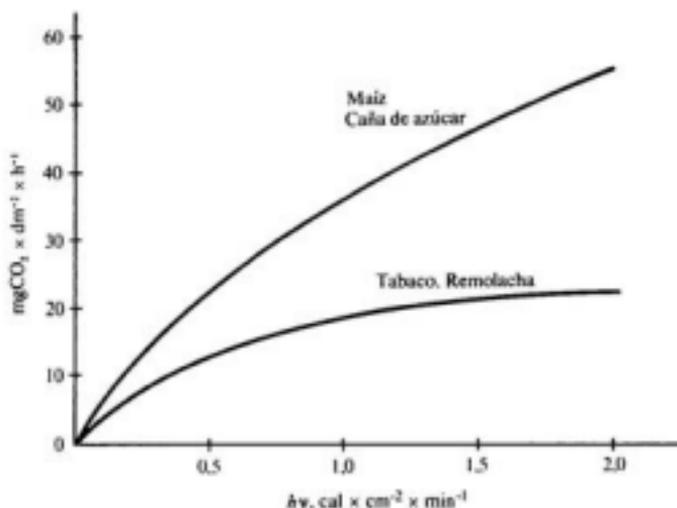


Figura 17.9.—Efecto de la intensidad luminosa sobre especies que fotorrespiran y que no fotorrespiran.

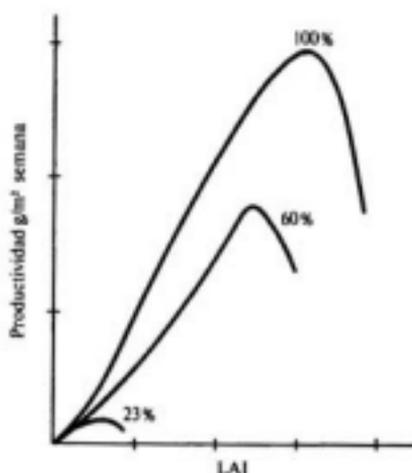


Figura 17.10.—Relación entre el LAI y productividad fotosintética de una plantación de girasol a diferentes valores de la intensidad de iluminación solar máxima.

aprovechamiento de la energía incidente, siendo más eficiente que una monocapa de hojas. Sin embargo, se alcanza un punto en que al aumentar el LAI no hay mayor productividad fotosintética (Fig. 17.10) ya que puede existir mucho sombreado mutuo al aumentar más el área, con lo que no puede haber aumento en la tasa de fotosíntesis a no ser que aumente la intensidad de iluminación. La eficiencia en la conservación de energía aumenta al aumentar el LAI. Sin embargo, se utilizan con menor eficiencia intensidades luminosas elevadas al aumentar el LAI. De hecho, a bajas intensidades luminosas los valores de eficiencia fotosintética son mayores que a intensidades luminosas elevadas, en parte porque las hojas inferiores se mueren. Estas hojas sombreadas tienen una tasa de respiración menor que las hojas expuestas de la misma planta, lo cual es una gran ventaja, pues las pérdidas que ocasionan serán menores en el balance general.

La eficiencia con que se aprovecha la energía fotosintéticamente activa depende no sólo de la intensidad luminosa, sino de toda la serie de factores que hemos considerado en este capítulo; y hemos dicho ya que esta eficiencia no es muy grande. En condiciones óptimas, un rendimiento cuántico de 8 corresponde a una eficiencia fotosintética de un 12 por 100. Suponiendo que la cantidad de radiación solar incidente es de  $137\text{J} \times \text{cm}^{-2} \times \text{día}^{-1}$ , y que un 44 por 100 es útil fotosintéticamente, es decir,  $60\text{J} \times \text{cm}^{-2} \times \text{día}^{-1}$ , si toda es absorbida, un 12 por 100 será capaz de aprovecharlo la planta como energía química, lo que hace unas  $72 \times 10^3\text{J} \times \text{m}^{-2} \times \text{día}^{-1}$ .

Por otra parte, y según la ecuación general de la fotosíntesis, sabemos que para formar 30 gr de materia orgánica ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), hacen falta  $27 \times 10^3\text{J}$ . La cantidad de energía absorbida puede producir:  $72 \times 30/27 = 80$  gr de materia orgánica  $\times \text{m}^{-2} \times \text{día}^{-1}$ , que es mucho más de lo que se alcanza incluso en las cosechas más eficientes como puede

ser la caña de azúcar o el maíz, que pueden llegar a producir 50 gr de materia orgánica  $\times m^{-2} \times día^{-1}$ . Naturalmente, en nuestro cálculo no hemos tenido en cuenta las pérdidas ocasionadas por la respiración, que podrían ser de una tercera parte aproximadamente, con lo que nos quedaría una producción teórica de 54 gr de materia orgánica  $\times m^{-2} \times día^{-1}$ , que es un valor próximo al encontrado en la práctica. Las diferencias que existen entre el valor teórico y el que se mide en muchas plantas se deben principalmente a las pérdidas debidas a la respiración y fotorrespiración más que a la eficiencia fotoquímica. La eficiencia máxima diaria de conversión de energía luminosa en una plantación de maíz es casi del 5 por 100, sin tener en cuenta las pérdidas debidas a la respiración. Si se consideran éstas a lo largo de 24 horas, el rendimiento es casi del 3 por 100.

Como ya hemos dicho anteriormente, la eficiencia de la conversión de energía luminosa es mayor a bajas intensidades luminosas. De aquí que la eficiencia fotoquímica no está relacionada directamente con la productividad, puesto que ésta aumenta grandemente al aumentar la intensidad de la irradiación que conlleva una disminución en la eficiencia fotoquímica.

#### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- DEVLIN, R. M., y BARKER, A. V.: *Photosynthesis*, Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York, 1971.
- GAFFRON, H.: *Energy Storage: Photosynthesis*, en: *Plant Physiology a Treatise*, vol. 1B. (Ed. F. C. Steward), Academic Press, Nueva York, 1960.
- SALISBURY, F. B., y ROSS, C. W.: *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, Inc., Belmont, California, 1978.
- ZELITCH, I.: *Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity*, Academic Press, Nueva York, 1971.

## REDUCCIÓN DEL NITRÓGENO

### 18.1. El ciclo del nitrógeno y las plantas

La fuente más abundante de nitrógeno disponible en nuestro planeta es la atmósfera, en donde se encuentra en forma de gas  $N_2$  en una proporción aproximada al 80 por 100 de la composición total de gases. Salvo algunas excepciones, que trataremos en este capítulo, las plantas son incapaces de captar directamente este  $N_2$  gas y de incorporarlo a sus estructuras y metabolismo. Más bien, la planta capta el nitrógeno del suelo, por absorción por las raíces en forma iónica, preferentemente como *nitrato* ( $NO_3^-$ ), y menos frecuentemente como *amonio* ( $NH_4^+$ ).

Químicamente, el nitrógeno es un elemento que ocupa una posición adyacente al átomo de carbono en la tabla periódica, con un peso atómico ligeramente superior, aunque de propiedades muy distintas. El N puede encontrarse en distintos estados de oxidación en los compuestos químicos, que oscilan de +5 a -3. No obstante, como molécula de  $N_2$ , es un compuesto extraordinariamente inerte. De aquí la importancia que adquieren los mecanismos de su fijación biológica. Se ha cifrado en  $2 \times 10^4$  megatoneladas anuales el valor total de la incorporación al reino vegetal de este elemento, por lo que representa el cuarto elemento en importancia cuantitativa en la composición de las plantas (C, O, H y N).

En la figura 18.1 se representa esquemáticamente el ciclo del N en la naturaleza y se señala la participación decisiva de determinados microorganismos y de las plantas en la dinámica de este recambio de materiales. En un análisis somero del esquema, puede observarse la participación de los microorganismos en el proceso de fijación biológica (fijación por bacterias libres o por bacterias en simbiosis con las plantas) y en los procesos de descomposición de la materia orgánica y de la oxidación del  $NH_4^+$  a  $NO_3^-$  por las bacterias nitrificantes. A su vez, el  $NO_3^-$  pasa a ser la fuente principal de nutrición del N para las plantas en donde, en gran proporción, experimenta un proceso de reducción asimiladora de  $NO_3^-$  a  $NH_4^+$  que está ligada fundamentalmente al proceso fotosintético. A nivel ecológico tienen también significación otros componentes del ciclo, como las bacterias desnitrificantes o la reducción desasimilatoria de los nitratos.

De esta breve visión de conjunto del ciclo ya se desprende el carácter *autótrofo* de la nutrición nitrogenada de las plantas, como más adelante analizaremos con más detalle, frente a la nutrición *heterótrofa* de los animales y del hombre. De este modo, las plantas no sólo aseguran la síntesis de materia orgánica carbonada a partir del C inorgá-

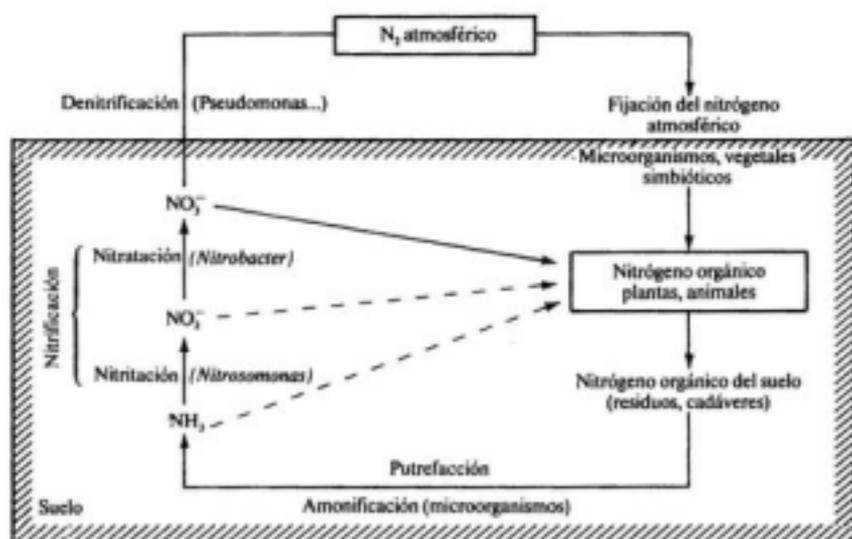


Figura 18.1.—Ciclo del nitrógeno.

nico ( $\text{CO}_2$ ), sino que su capacidad es más amplia, y entre otros elementos afecta también a la reducción e incorporación a la materia orgánica del nitrógeno inorgánico (fundamentalmente,  $\text{NO}_3^-$ ).

## 18.2. Fijación biológica del nitrógeno

El balance del ciclo del N se mantiene esencialmente por el proceso de aporte que representa la fijación biológica del  $\text{N}_2$  atmosférico. Para esta fijación se han dado distintas estimaciones y puede evaluarse en un valor aproximado del orden de  $175 \times 10^6$  toneladas por año.

En estos procesos de fijación biológica del  $\text{N}_2$  intervienen distintos tipos de organismos. La tabla 18.1 muestra los principales tipos de agentes biológicos capaces de fijar  $\text{N}_2$ .

El principal papel en la fijación simbiótica del  $\text{N}_2$  corresponde a las leguminosas. Se ha estimado que son responsables de fijaciones del orden de  $80 \times 10^6$  toneladas de nitrógeno por año. Generalmente, la bacteria que entra en simbiosis corresponde a distintas especies características del género *Rhizobium*. Más desconocidas son las fijaciones simbióticas en plantas no leguminosas (angiospermas y gimnospermas). Se supone que en las angiospermas no leguminosas, el endosimbionte puede ser un actinomiceto, mientras que en algunas gimnospermas se trata de cianofíceas. En todo caso, se trata siempre de la simbiosis entre organismos eucariotas (plantas superiores) y procariotas (bacterias o algas azules).

TABLA 18.1  
Agentes biológicos que fijan el  $N_2$

- A) Agentes simbióticos fijadores de  $N_2$
1. Plantas leguminosas más bacterias de nódulos radiculares (guisante, judía, trébol, soja, etc.).
  2. Plantas no leguminosas, angiospermas (aliso, *Ceanothus*, *Myrica*, *Parshia*, etc.).
- B) Agentes no simbióticos fijadores de  $N_2$
1. Algas verde-azules (*Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Mastigocladus*, etc.).
  2. Levaduras (*Rhodotorula* sp.).
  3. Bacterias.
    - a) Aerobias (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, etc.).
    - b) Facultativas (*Bacillus*, *Klebsiella*, etc.).
    - c) Anaerobias
      - No fotosintetizadoras (*Clostridium*, *Desulfonbri*, *Methanobacterium*, etc.).
      - Fotosintetizadoras (*Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Chlorobium*, *Rhodomicrobium*).

(Tomado de R. H. Burris, en: *Plant Biochemistry*, J. Bonner y J. E. Varner (eds.), Academic Press, Nueva York, 1976.)

Menos significativo es el aporte neto debido a la fijación por bacterias libres. Las algas verde-azules (cianofíceas) poseen un gran valor adaptativo frente a muy diversas variantes edáficas y climáticas. Así, son de gran significación para la colonización de terrenos en condiciones muy desfavorables o extremas, debido a que su autotrofia para el  $CO_2$  y el  $N_2$  atmosférico permite reducir al mínimo la necesidad de aporte nutritivo por el suelo.

### 18.2.1. Proceso fisiológico de la infección/simbiosis y nodulación en las leguminosas

La simbiosis entre las especies de *Rhizobium* y las plantas leguminosas empieza como una verdadera infección de las bacterias comprendidas en la rizosfera de la planta. Este primer estadio se manifiesta rápidamente por una típica curvatura y distorsión de los pelos radiculares. El grado de distorsión de los pelos radiculares depende de la planta, de la variedad de *Rhizobium* y de la posición de las raíces. La infección generalmente se restringe a las zonas de las raíces con pelos deformados. Los primeros síntomas de la infección se manifiestan por una mancha hialina o hinchazón de la pared celular del pelo radicular, con incremento de la corriente citoplasmática. A las tres horas suele hacerse visible un tubo de infección que crece y progresa a una velocidad aproximada de  $7 \mu\text{m/h}$ . El núcleo y nucléolo crecen en tamaño y se sitúan a la cabeza del tubo o filamento. Muchas de estas infecciones abortan, pero algunas avanzan hacia la base del pelo radicular, dirigiéndose hacia las células del parénquima cortical de la raíz. Por rotura del tubo de infección penetran las bacterias en las células corticales en donde inducen una formación tumoral conocida por nódulo radicular, en la que proliferan por división las bacterias. La forma de los nódulos es característica de la planta huésped más que de la especie de *Rhizobium* y depende de la pauta de actividad meris-

temática. Estos nódulos normalmente presentan colores rosados o rojo-pardos debido a la presencia de *leghemoglobina*. A la altura de la segunda o tercera capa externa de las células del parénquima cortical, el tubo de infección puede ya iniciar el proceso de división celular que conduce a la formación del nódulo (*Ornithoporus sativus*) o, en otros casos, en las capas más internas de la corteza, en la vecindad de la endodermis (*Pisum sativum*). Hay discrepancias sobre si las divisiones celulares que inician los nódulos corresponden al periciclo (con lo que el nódulo sería análogo a una raíz lateral) o, más bien, la mayoría de nódulos, se formarían en las células de la corteza. En casos más raros, el nódulo puede formarse en la parte interna de la estela o cilindro central de la raíz.

Un hecho distintivo de la mayoría de células en donde se desarrolla la nodulación es un incremento en su ploidía y una síntesis incrementada de ciertas hormonas como el IAA. Se supone que el IAA segregado por el propio *Rhizobium* puede jugar un papel desde la fase inicial de incurvación de los pelos radiculares y en la infección, migración del tubo de infección y formación y establecimiento del nódulo. En los nódulos los *Rhizobium* proliferan como *bacteroides* de formas alargadas y pleomórficas que contienen normalmente el enzima nitrogenasa y no crecen en los medios de cultivo conocidos.

Se considera que existen interacciones específicas planta-*Rhizobium* que empiezan en la rizosfera y operan durante la infección inicial de la raíz, en la liberación de los *Rhizobium* a las células huésped, en el desarrollo de los bacteroides y en la síntesis de la nitrogenasa.

Diversos factores fisiológicos pueden modificar la iniciación y desarrollo de la nodulación. En general, la disponibilidad de nitrógeno soluble por la planta (nitratos y amonio) decrece o inhibe la nodulación de las leguminosas. Se señalan distintas respuestas frente a las variaciones de temperatura y luz.

Se han descubierto «receptores» específicos que permiten reconocer a cada especie de planta la bacteria que puede entrar en simbiosis. Así, en el caso del trébol la adhesión de *Rhizobium trifolii* a los pelos radiculares ha podido ser comprobada por empleo de colorantes fluorescentes unidos a los polisacáridos de la cápsula bacteriana. Al parecer, la *trifolina* es la proteína que enlaza a la bacteria específicamente al pelo radicular (Dazzo y Hubbell, 1974). Recientemente se ha prestado fuerte atención a las *lectinas* (fitohemoaglutininas) en el reconocimiento celular.

### 18.2.2. Proceso biológico de la reducción del nitrógeno atmosférico

La gran estabilidad de la molécula biatómica del  $N_2$  determina su «inercia» química y explica la dificultad y costes del proceso de reducción. En el laboratorio o en la industria, el hombre consigue la reducción del  $N_2$  a  $NH_3$  con catalizadores de Fe y Mo a elevadas temperaturas ( $400^\circ C$ ) y a altas presiones (20 MPa), por el procedimiento de Haber-Bosch.

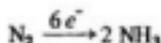
En la naturaleza, la fijación biológica por bacterias libres o en simbiosis con plantas, representa el mecanismo más significativo de reducción del  $N_2$  a amoníaco, muy por encima del obtenido técnicamente por el hombre. Los seres vivos capaces de fijar el  $N_2$  no escapan tampoco a estas necesidades energéticas; en ellos únicamente varían las

condiciones y los mecanismos moleculares por los que desarrollan enzimáticamente el proceso de reducción. El enzima responsable de este proceso biológico es la *nitrogenasa* y requiere, aparte de poder reductor, energía en forma de gasto de ATP. Se ha calculado que esta necesidad energética mínima es de 12 a 15 moles de ATP por mol de  $N_2$  reducido. Puesto que para la fijación del  $N_2$  se requieren seis electrones, se puede así establecer con carácter general, para la reducción biológica del  $N_2$ , la reacción:



A pesar de la mayor significación biológica de la fijación por bacterias simbióticas, el conocimiento de las características de la nitrogenasa ha venido sobre todo del estudio de las bacterias libres (*Klebsiella*, *Clostridium* y *Azotobacter*). No obstante, es general la presencia de la nitrogenasa para todos los organismos con capacidad de fijación del  $N_2$ , y no parece haber diferencias significativas de una especie a otra. Del estudio de la nitrogenasa en sistemas acelulares, y por aplicación de microscopía electrónica, se considera que la nitrogenasa está constituida por dos fracciones o componentes: una Mo-Fe-proteína de un peso aproximado de 200.000 daltons (componente I) y una Fe-proteína de unos 60.000 daltons (componente II) extremadamente sensible al  $O_2$ . El componente I está integrado por cuatro subunidades proteicas, posiblemente agrupadas en dos pares ligeramente diferentes, con un total de 2 átomos de Mo, 24-32 átomos de Fe y 24 átomos lábiles de S. El componente II está constituido por dos subunidades aparentemente iguales de proteína y lo integran 4 átomos de Fe y 4 átomos lábiles de S. En el *complejo enzimático de la nitrogenasa* actualmente, debido a que la Mo-Fe-proteína es la que propiamente cataliza la reducción del  $N_2$ , se tiende a llamar *nitrogenasa* al componente I y *nitrogenasa-reductasa* al componente II (Fe-proteína). Ni el componente I ni el componente II, aisladamente, pueden catalizar la fijación del  $N_2$ , sino que se requiere su ensamblaje para la operatividad de la reducción biológica. La nitrogenasa es *inactivada* por el  $O_2$ . En la fijación simbiótica la *leghemoglobina*, sintetizada en los nódulos y a la que se han ido adscribiendo funciones muy diversas e incluso dudosas, parece que podría evitar esta inactivación por su gran afinidad de captación del  $O_2$ . En las algas verde-azules se localiza en los *heterocistos*, muy pobres en  $O_2$  por carencia del fotosistema II de la fotosíntesis.

Es aún muy difícil dar una visión de detalle de la operación de conjunto de la nitrogenasa. Las necesidades energéticas son llenadas por el ATP y el poder reductor proviene de la *ferredoxina* o de la *flavodoxina*. Así pues, en los organismos con capacidad fotosintetizadora, la fotosíntesis suministra el ATP y la *ferredoxina* reducida. No se conoce con exactitud la función del ATP y de cada subunidad en el proceso de reducción, aunque se sabe que ocurre la reducción directa del



o, al menos, sin intermediarios aparentes. Se supone que la secuencia de procesos ocurre según el esquema de la figura 18.2a.

La *ferredoxina* o la *flavodoxina* reducen en primer lugar al componente II, que por activación con ATP reduce posteriormente al componente I. El centro activo

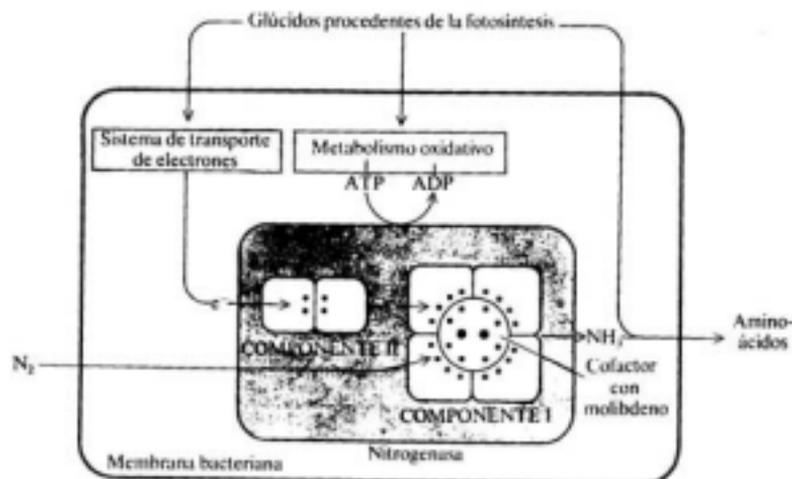


Figura 18.2a.—Mecanismo de la reducción del  $N_2$  a  $NH_3$  por medio de la nitrogenasa (tomado de W. J. Brill, «Investigación y Ciencias», mayo 1977).

de la reducción del  $N_2$  a  $NH_3$  reside en el componente I. Se cree que el Mo (metal de transición) juega un papel clave en este último proceso.

Recientemente se han sugerido esquemas más detallados que el de la figura 18.2a. Como muestra de uno de ellos, véase el mecanismo propuesto por Postgate en la figura 18.2b. Según este mecanismo, el ATP y el Mg se unen a la Fe-proteína reducida (KP2\*); entonces el complejo Fe-proteína-MgATP adquiere un potencial muy bajo ( $\sim -490$  mV) y la capacidad única para poder reducir a la Mo-Fe-proteína (KP1). Se acomplejan las dos proteínas; la segunda lleva ya el  $N \equiv N$ ; hay una transferencia de electrones de KP2\* a KP1. En este momento tiene lugar posiblemente la hidrólisis del ATP. Finalmente los electrones son transferidos de la Mo-Fe-proteína al  $N \equiv N$ , liberándose finalmente  $2NH_3$ . La Mo-Fe-proteína se reoxida al ceder electrones y comienza de nuevo el ciclo. Obsérvese la versatilidad de sustratos ( $N_2$ ,  $CH \equiv CH$ ,  $2H^+$ , etc.) que pueden ser reducidos y, entre ellos, la capacidad de reducir iones hidrógeno ( $2H^+$ ) a hidrógeno gas ( $H_2$ ) que conduce a un desprendimiento obligado de  $H_2$  en la fijación biológica del  $N_2$ . El mismo modelo hace patente que la Fe-proteína o *nitrogenasa-reductasa* es la encargada de recoger el poder reductor y la energía, mientras que la Mo-Fe-proteína o *nitrogenasa* recoge y reduce al sustrato. Indudablemente, nuevos avances traerán pronto una visión más exacta del mecanismo de la nitrogenasa.

En resumen, de acuerdo con Postgate *et al.* (1981), se pueden establecer como características básicas de la nitrogenasa:

1. Necesidad de un sistema específico de transporte de electrones con flavodoxina y/o ferredoxina como dador de electrones a las proteínas de la nitrogenasa.
2. Necesidad de gasto de ATP durante la fijación del  $N_2$  con valores tan sor-

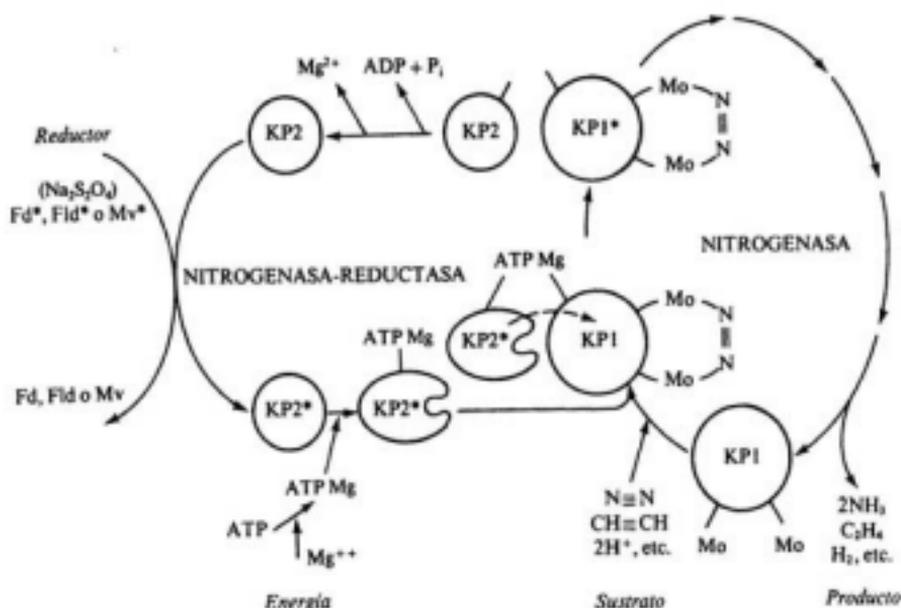


Figura 18.2b.—Mecanismo de la nitrogenasa (según Postgate). El complejo enzimático de la nitrogenasa se compone de dos partes: la Fe-proteína (KP2) o *nitrogenasa-reductasa*, que recoge el poder reductor y la energía, y la Mo-Fe-proteína (KP1) o *nitrogenasa* (terminal) que recoge y reduce al sustrato. Fd = Ferredoxina; Fld = Flavodoxina; Mv = Metilviológeno; \* = estado reducido. (Para detalles, véase en el texto.)

prendentes de 2 a 2,5 moléculas de ATP hidrolizadas por electrón transferido por el enzima al sustrato.

3. Necesidad de incorporar Fe y S a varias de las proteínas del sistema nitrogenasa, además de incorporar Mo a la proteína terminal.
4. Obligación de desprendimiento de  $H_2$  en la fijación del  $N_2$ .
5. Necesidad de excluir al  $O_2$  de las proteínas de la nitrogenasa.
6. Necesidad de restringir la síntesis de nitrogenasa a las situaciones en que sea rentable (por ejemplo, en ausencia de  $N_2$  fijado) y practicable (baja o nula presión de  $O_2$ ).

El descubrimiento de que ciertas especies de *Rhizobium* son capaces de fijar el  $N_2$  en estado libre (asimbiótico) es un nuevo indicio en favor de un mecanismo general de la fijación del  $N_2$  por organismos libres o en simbiosis.

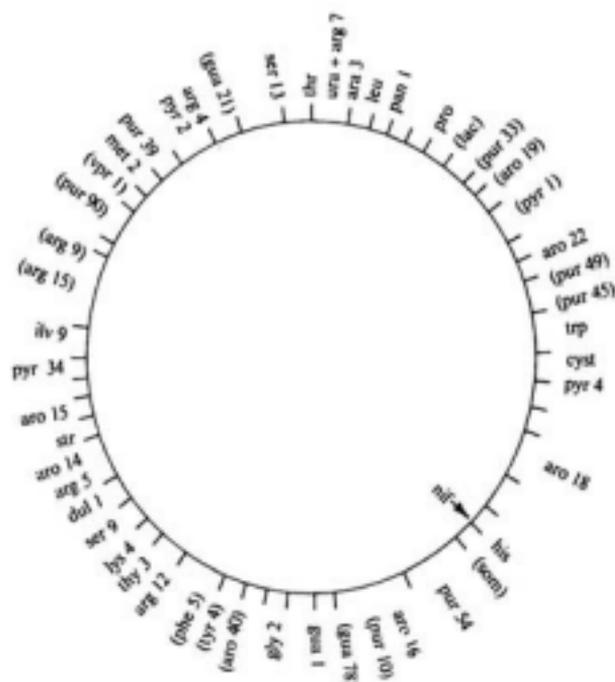


Figura 18.3.—Mapa genético de *Klebsiella pneumoniae* y localización de los genes *nif* (tomado de Streicher y Valentín, en: *A Treatise on Dinitrogen Fixation*, R. W. F. Hardy y W. S. Silver (ed.), John Wiley and Sons, Nueva York, 1977).

### 18.2.3. Alcance fisiológico de algunos conocimientos genéticos

Los genes-*nif* son los genes responsables de la fijación del nitrógeno (del inglés, «dinitrogen fixation genes»). La figura 18.3 muestra un mapa genético de *Klebsiella pneumoniae* con la localización de los genes *nif*. *Klebsiella* es una bacteria relacionada con *Escherichia coli* que tiene la capacidad de fijar libremente el  $N_2$  atmosférico y con la que se han obtenido manipulaciones genéticas prometedoras. En efecto, se ha conseguido la transferencia, a través de un plásmido, de los genes *nif* de *Klebsiella* a *Escherichia coli* (Fig. 18.4). Como consecuencia de esta transferencia *Escherichia* adquiere la capacidad de expresión genética de esta información y de sintetizar a la nitrogenasa. No obstante, la falta de protección de la nitrogenasa en *Escherichia coli* frente al  $O_2$  determina su inactivación. Experiencias parecidas se han realizado con *Salmonella typhimurium* o con *Klebsiella aerogenes*, que normalmente no fijan  $N_2$ .

Actualmente de los genes *nif* de *Rhizobium* se conocen al menos 17 genes que incluyen genes estructurales para las subunidades de la nitrogenasa, genes regulado-

res y genes para la síntesis del cofactor de Mo. Asimismo, la extraordinaria labilidad de la nitrogenasa ha determinado también el estudio de los genes de protección frente al  $O_2$  y de los genes *hup* (hydrogen uptakes) de aprovechamiento del  $H_2$ . En este último caso, dado el alto coste energético de la fijación simbiótica del  $N_2$  en las cepas carentes de los genes *hup*, se podría mejorar la eficiencia energética y la productividad por introducción de los genes *hup* por medio de plásmidos. De este modo, las bacterias que poseen genes *hup* son capaces de sintetizar el enzima hidrogenasa que cataliza la disociación del  $H_2$  en  $H^+$  y  $e^-$ , los cuales de nuevo están disponibles para la fijación del  $N_2$  por la nitrogenasa. En este sentido se disponen ya de experimentos prometedores, sobre todo con *Rhizobium japonicum*, de indudable importancia para la productividad de las cosechas de soja.

Un paso más allá en este tipo de estudios de ingeniería genética sería la *transgenosis* (transducción de DNA bacteriano a una célula eucariota con incorporación de la información a un cromosoma y efectividad de la expresión génica) de los genes *nif* a plantas de cultivo, en las que en muchas ocasiones el factor nutritivo limitante es la disponibilidad de N. Se ha pensado que los cereales (por ejemplo, trigo o maíz) podrían así elevar extraordinariamente su productividad y rendimiento. En este sentido, véanse también las posibilidades que ofrecen los protoplastos (Cap. 27). Por el momento, este tipo de estudios se ve limitado todavía por las dificultades técnicas de la manipulación genética con células eucariotas. Recientemente se ha conseguido la transferencia de los 17 genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae* a levaduras. Este resultado es destacable, pues se trata ya no de células procariotas (como las bacterias), sino eucariotas, más cercanas a la organización de las plantas superiores. No obstante, no se ha conseguido aún la expresión de los genes *nif* insertados.

Otras aplicaciones fisiológicas de avances genéticos es la obtención de mutantes de *Azotobacter* que pueden fijar  $N_2$  en presencia de nitrato, e incluso excretan amoníaco al medio. La selección genética puede resultar también provechosa por obtención de asociaciones de *Rhizobium*-leguminosas en las que la nitrogenasa no disipe energía para la producción de  $H_2$ , como es ya conocido para el frijol chino y para el aliso.

### 18.3. Reducción asimiladora de los nitratos

Si bien la mayoría de las plantas carecen de la capacidad de aprovechar directamente el  $N_2$  atmosférico, en cambio, sí son capaces de reducir el nitrato, la forma de N principal de absorción por las raíces, hasta el nivel de  $NH_4^+$  y de su incorporación a la materia orgánica. Por este proceso autótrofo las plantas pueden sintetizar, a partir de la forma inorgánica oxidada del  $NO_3^-$ , el nitrógeno reducido de los diferentes compuestos orgánicos (aminoácidos, ácidos nucleicos, alcaloides, etc.).

El proceso de reducción de los nitratos está acoplado a una necesidad de aporte de poder reductor que puede enlazar directamente con la fotosíntesis en los tejidos verdes de la planta o estar acoplado al suministro energético de las mitocondrias en los tejidos donde aquella no es operativa (por ejemplo, en las raíces).

Cabe distinguir dos procesos distintos de reducción de los nitratos: la reducción *asimiladora* de los nitratos y la reducción *no asimiladora* de los nitratos. En el primer

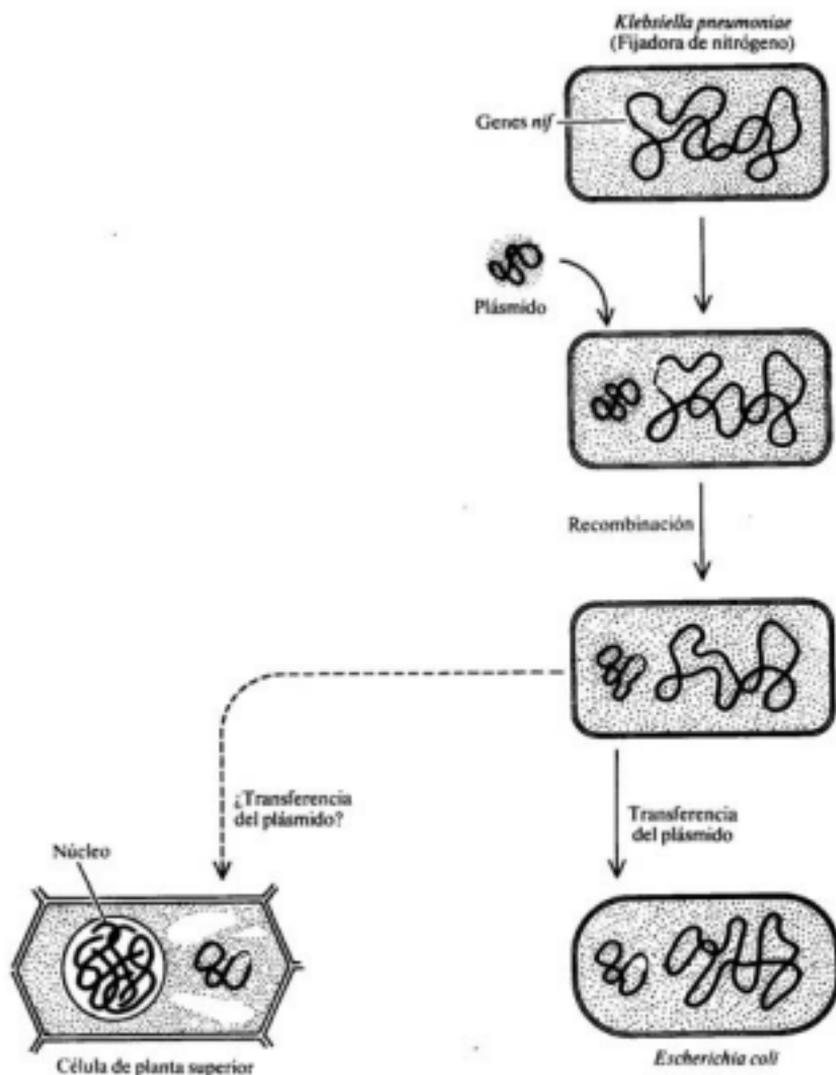
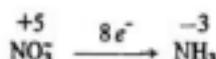


Figura 18.4.—Experiencias de manipulaciones genéticas. Transferencia, a través de un plásmido, de los genes *nif* de *Klebsiella* (bacteria con capacidad de fijar el  $N_2$  atmosférico) a *Escherichia coli* que adquiere la capacidad de expresión génica de esta información (codificación de la información y síntesis de la nitrogenasa). Un paso hipotético más allá es la *transgénesis* (transducción de DNA bacteriano a una célula eucariota —por ejemplo, trigo o maíz—, con incorporación de la información a un cromosoma y efectividad de la expresión génica (tomado de W. J. Brill, «Investigación y Ciencias», mayo 1977).

caso, que es el característico de las plantas, la reducción de los nitratos corresponde a un proceso *anabólico* en el que se aprovecha el proceso reductor para la biosíntesis de compuestos orgánicos. En cambio, la reducción no asimiladora más bien es una vía *catabólica* o desasimilatoria, en la que el  $\text{NO}_3^-$ , en condiciones anaerobias, sustituye al  $\text{O}_2$  como aceptor final de electrones en una cadena de transporte de electrones (nitrato reductasa respiratoria). Este tipo de respiración por nitratos es más típica de las bacterias y juega un papel en el proceso desasimilatorio de desnitrificación ( $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ ) en el ciclo del N. Lógicamente no es necesario resaltar la función ecológica que juega la reducción asimiladora de los nitratos por las plantas en el ciclo global del N.

A pesar de la importancia evidente de la fotosíntesis del N, hasta hace relativamente poco no ha merecido la atención que desde sus inicios ha recibido la fotosíntesis del C. El hecho que el C represente normalmente el elemento cuantitativamente más significativo del aprovechamiento fotosintético, no debe hacer olvidar el carácter limitante que muchas veces tiene la nutrición nitrogenada para la productividad de las plantas y las necesidades crecientes en la alimentación proteica, impuesto por la evolución demográfica y la necesaria racionalización y valor nutritivo equilibrado de las dietas alimenticias.

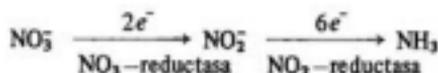
El proceso reductor de los nitratos requiere de ocho electrones.



En un principio, se consideró que esta reducción ocurría en una serie de pasos parciales, deducidos más bien bajo un criterio puramente químico, que transcurría con reducciones parciales con  $2e^-$ . En efecto, la primitiva hipótesis de Meyer y Schultze (1894) estableció cuatro pasos parciales con la participación de  $2e^-$  en cada uno de ellos



Como consecuencia de ello las investigaciones se dirigieron hacia la caracterización de cada uno de los sistemas enzimáticos responsables de estos pasos intermedios. Los resultados contradictorios obtenidos y, sobre todo, un estudio y planteamiento más crítico del problema ha permitido deducir que, en realidad, la secuencia de pasos se reduce a dos, una primera reducción que requiere  $2e^-$  y cataliza la reducción del  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  mediante la *nitrato reductasa* y un segundo proceso de reducción directa del  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_3$ , catalizado por la *nitrato reductasa* y que requiere del aporte de  $6e^-$ :



### 18.3.1. Reducción del nitrato a nitrito

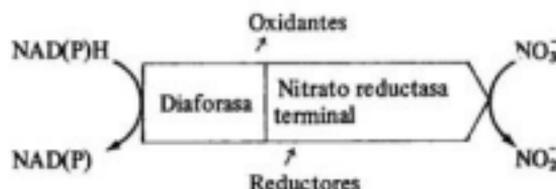
En las células eucariotas (hongos, algas verdes y plantas superiores) la *nitrato reductasa* cataliza la reducción del nitrato a nitrito utilizando el poder reductor de los piridín nucleótidos reducidos NADH/NADPH



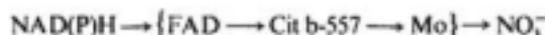
En las levaduras, la nitrato reductasa es más específica de NADPH, mientras que en las células eucariotas con capacidad fotosintetizadora dependen fundamentalmente de NADH, aunque puede ser efectivo el NADPH si está presente una NADPH fosfatasa que transforma el NADPH a NADH.

Se han obtenido distintas estimaciones del peso molecular para la nitrato reductasa purificada de distintas fuentes (*Thalassiosira*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Zea*). En general, los valores oscilan de 190.000 (*Aspergillus*) a 500.000 daltons (*Chlamydomonas*). Según la mayoría de las evidencias, se trata de una molibdo-flavo-hemoproteína.

La nitrato reductasa muestra una composición y mecanismo complejo. En la mayoría de los casos, *in vitro* se pueden distinguir dos actividades distintas: actividad deshidrogenasa (*diaforasa*) de reducción por NAD(P)H de distintos aceptores de 1 y 2e<sup>-</sup> (citocromo c, ferricianuro, colorantes como el DCPIP) y la *nitrato reductasa terminal* por la que se opera la reducción del nitrato por flavin-nucleótidos reducidos o por viológeno, independientemente de la actividad de los piridín nucleótidos. Ambas actividades parciales del complejo de la nitrato reductasa responden muy diferentemente a inhibidores selectivos (Losada, 1979).



*In vivo*, se cree que el mecanismo de la reducción del nitrato por NAD(P)H va en el sentido



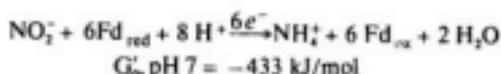
En las cianofíceas (algas verde-azules) se trata de una Fd-NO<sub>3</sub>asa, en la que el dador fisiológico de electrones es la ferredoxina reducida.

### 18.3.2. Reducción del nitrito a amoníaco

El producto de la reacción catalizada por la nitrato reductasa, el nitrito, es reducido a amonio por medio de la actividad del enzima *nitrito reductasa*, en un paso metabólico

que requiere  $6e^-$ . Se han observado diferencias en la nitrito reductasa de las bacterias y hongos y el enzima correspondiente de las algas y hojas de las plantas superiores, en relación con el dador fisiológico de electrones. En las bacterias y hongos la nitrito reductasa es dependiente de NAD(P)H, mientras que en los organismos y tejidos con capacidad fotosintetizadora el dador natural de electrones es la ferredoxina reducida ( $Fd_{red}$ ).

La ferredoxina: nitrito reductasa de diversos organismos presenta un peso molecular del orden de 60.000 a 70.000 daltons y parece estar constituida por un único polipéptido con aproximadamente 600 aminoácidos. Este enzima se muestra inactivo, si en lugar de la  $Fd$  se le suministra los piridín o flavin nucleótidos como reductores inmediatos. La reacción de la ferredoxina: nitrito reductasa, puede formularse



En la constitución de este enzima forman parte varios átomos de Fe (espinaca), pero, a diferencia del enzima dependiente de NAD(P)H de los organismos sin capacidad fotosintetizadora, no contiene ningún grupo flavínico. Murphy y sus colaboradores han identificado en la nitrito reductasa de espinaca un grupo prostético hemo, el *sirohemo*, con una banda Soret de baja longitud de onda, que previamente se había demostrado como componente del enzima sulfito reductasa. Se considera que de los átomos de Fe de la molécula de la nitrito reductasa de espinaca, uno forma parte del sirohemo y los otros se agrupan con sulfuros lábiles en un centro Fe-sulfuro («cluster»  $4Fe-4S$ ). De este modo se supone que la cadena de transporte de electrones desde la  $Fd_{red}$  al nitrito puede ser



### 18.3.3. Localización celular y subcelular del sistema reductor de los nitratos

La reducción de los nitratos puede ocurrir en la planta tanto en los tejidos verdes (hojas) como en células sin capacidad fotosintetizadora (raíces). En el primer caso, que normalmente es el prioritario, va ligado al aprovechamiento del poder asimilador de la fotosíntesis, por lo que cabe hablar de la fotosíntesis del N. En los tejidos sin cloroplastos funcionales, la reducción de los nitratos va acompañada de un incremento respiratorio.

Más controvertida es la situación intracelular de la nitrato reductasa y de la nitrito reductasa. Mientras no parece haber duda que la nitrito reductasa es un enzima principal o parcialmente del estroma del cloroplasto que puede operar en presencia de la luz (fotosíntesis del N), no hay la misma evidencia para el caso de la nitrato reductasa. Para este último enzima, se citan distintas localizaciones considerándose, en la mayoría de los casos, como un enzima citoplasmático. Otras veces se ha descrito su presencia en microcuerpos e incluso en los cloroplastos. Una proposición sugestiva, relativamente bien fundada, establece su localización en la membrana externa del cloroplasto tanto en las plantas C-3 como en las C-4 (Caps. 14 y 15).

Los estudios de la distribución diferencial de la nitrato reductasa y de la nitrito reductasa en distintas especies de plantas C-4 han demostrado la localización preferente de estas enzimas en los cloroplastos de las células del mesófilo.

En las algas procariotas verde-azuladas ambos enzimas se hallan asociados con las partículas clorofílicas.

#### 18.3.4. Reducción fotosintética del nitrato

Las algas procariotas verde-azuladas son los sistemas mejor estudiados, por el momento, respecto a la reducción fotosintética del nitrato. En estas algas, la nitrato reductasa y la nitrito reductasa se encuentran en estrecha relación con el sistema lamelar fotosintético. En distintas experiencias con *Anabaena* y *Anacystis* se han aislado fracciones particuladas en las que ocurre la fotorreducción del nitrato a nitrito, dependiente de Fd. No obstante, ambos tipos de partículas no presentaban actividad del fotosistema II y, por ello, eran incapaces de usar el agua como dador de electrones. En su lugar se empleó como dador artificial de electrones para el fotosistema I el ascorbato-indofenol.

El equipo de Losada ha conseguido el acoplamiento de la reducción de los nitratos con la fotólisis del agua en partículas pigmentadas de *Anacystis nidulans* obtenidas por métodos de disrupción celular suave. Los resultados obtenidos indican que se desprende un átomo de O por molécula de nitrato reducida a nitrito y que se desprenden cuatro átomos de O en la reducción completa a amonio.

Resultados similares se han obtenido en un sistema reconstituido de grana de espinaca y nitrato reductasa y nitrito reductasa dependiente de Fd de *Anacystis*.

En las plantas superiores, los resultados son más contradictorios. Hay acuerdo prácticamente unánime de que la *nitrito reductasa* es un enzima del estroma del cloroplasto

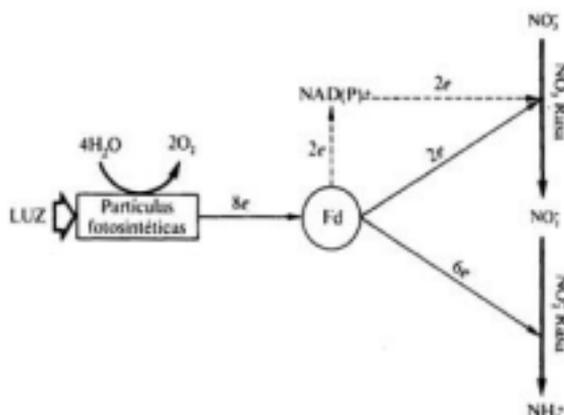


Figura 18.5.—Reducción fotosintética del nitrato (tomado de Losada y Guerrero, en: *Photosynthesis in Relation to model Systems*, J. Barber (edit.), Elsevier, Amsterdam, 1979).

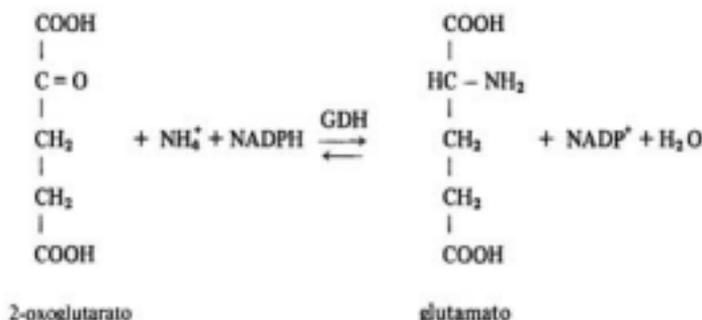
ligado, a través de la  $Fd_{red}$ , con las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis. Más problemática es la generalización del hecho para la nitrato reductasa para la que, la mayoría de los autores, más bien le adscriben una localización citoplasmática o, a lo sumo, en la membrana externa del cloroplasto. En tal caso se ha propuesto que la formación del poder reductor de  $NAD(P)H$  para la reducción del nitrato a nitrito es indirecta, por medio de la formación de compuestos carbonados reducidos (por ejemplo, triosa-fosfatos) que serían oxidados por  $NAD(P)$  en el citoplasma.

En la figura 18.5 se representa esquemáticamente un diagrama de la reducción fotosintética del nitrato a amonio acoplado con la oxidación del agua a  $O_2$  (fotosíntesis del N). Mientras que en las algas procariotas la nitrato- y nitrito reductasas son dependientes de  $Fd_{red}$ , en las plantas eucariotas la nitrato reductasa es dependiente de  $NAD(P)H$  y acepta electrones indirectamente desde la  $Fd_{red}$  al  $NAD(P)H$ .

#### 18.4. Asimilación del amonio en las plantas

En los sistemas vivos se han descrito diversas posibilidades de asimilación del amonio a compuestos orgánicos: aminación reductiva de cetoácidos, formación de amidas del ácido glutámico y del ácido aspártico, aminación directa del fumarato y síntesis del carbamoil fosfato. En las plantas, una vez que el  $NO_3^-$  ha sido reducido a  $NH_4^+$ , no parece que sean igualmente operativas cada una de estas vías, según se deduce del estudio de los sistemas enzimáticos *in vivo* y de la evaluación cinética de las transformaciones metabólicas a partir de precursores marcados.

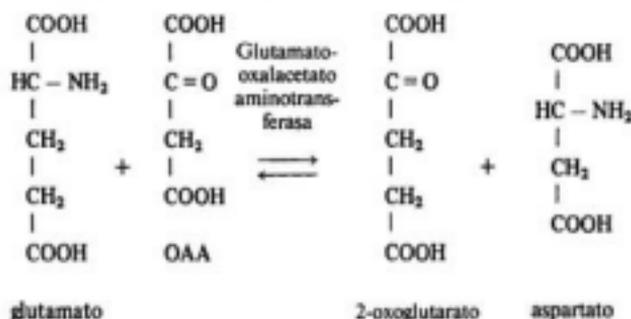
En un principio se creyó que en las plantas el compuesto clave para la incorporación del  $NH_4^+$  a la materia orgánica era el 2-oxoglutarato que por aminación reductiva originaría el glutamato. La reacción es catalizada por el enzima *glutamato deshidrogenasa* (GDH) dependiente de  $NADP$ .



Estudios a nivel subcelular indican tanto una localización cloroplástica como en el citoplasma de la GDH. La GDH del cloroplasto es dependiente de  $NADPH$ , mientras que

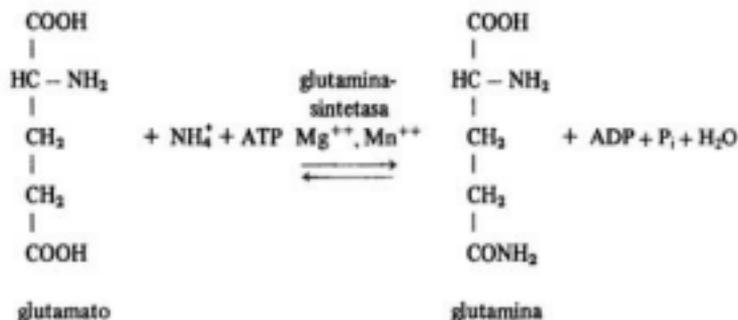
la de localización mitocondrial está ligada a NADH. Una fuerte objeción a este camino metabólico es la baja afinidad del enzima para el  $\text{NH}_4^+$  ( $K_M$  alta) y que las altas concentraciones de amonio requeridas para una actividad óptima del GDH están por encima de los valores normales de la planta e incluso pueden ya ser tóxicas.

De acuerdo con esta interpretación inicial, el paso siguiente, una vez sintetizado el glutamato, sería la formación del aspartato, alanina y otros aminoácidos por transaminación del grupo amino desde el glutamato a distintos cetoácidos, reacciones que son catalizadas por *aminotransferasas* específicas. Así, la *glutamato-oxalacetato aminotransferasa* cataliza la reacción de transferencia del grupo amino al oxalacetato (OAA) desde el glutamato actuando como coenzima el *piridoxalfosfato*



Idénticamente, la *glutamato-piruvato aminotransferasa* cataliza la síntesis de la alanina. Ambos enzimas se han localizado en el cloroplasto.

Otro enzima cloroplástico, la *glutamina sintetasa* (*L-glutamato-amonio ligasa*, GS), de acuerdo con la interpretación primitiva, catalizaría una posterior incorporación de  $\text{NH}_4^+$  al glutamato, por un proceso de amidación que requiere del aporte energético de ATP:

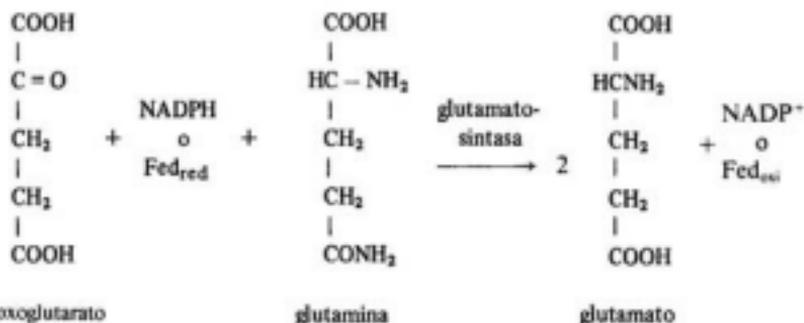


La glutamina sintetasa posee una mayor afinidad por el  $\text{NH}_4^+$  que la GDH (casi tres veces superior), de aquí la rapidez de su incorporación, una vez el  $\text{NH}_4^+$  ha sido absorbido o formado por la planta. Igualmente se ha supuesto que la glutamina sintetasa pudie-

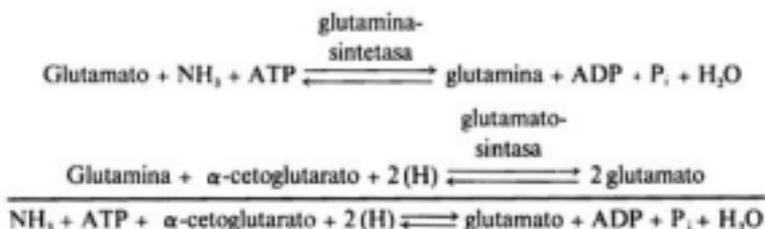
ra tener, junto a su papel en la asimilación del  $\text{NH}_4^+$ , una función detoxificadora del cloroplasto, ya que el  $\text{NH}_4^+$  *in vitro* desacopla la fotofosforilación.

Recientemente, el descubrimiento de la *glutamato sintasa* (*glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferasa, oxirreductasa NADP*, GOGAT) en extractos de plantas ha llevado a la conclusión de la existencia de una ruta alternativa como vía principal de la asimilación del amonio por las plantas. Esta ruta alternativa combina la acción de la *glutamina sintetasa* y de la *glutamato sintasa*, de forma que, en conjunto, resulta la síntesis neta de una molécula de glutamato, a la par que soslaya la dificultad de asimilación de las bajas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  de la GDH que, en esta ruta, sería sustituida por la glutamina sintetasa, mucho más efectiva para la fijación primaria del  $\text{NH}_4^+$ .

La glutamato sintasa se presenta en dos formas distintas en los tejidos vegetales. En los tejidos no verdes el enzima está ligado a NAD(P)H. Por el contrario, en los tejidos fotosintéticos la  $\text{Fd}_{\text{red}}$  es el dador fisiológico de electrones.



De acuerdo con esta vía alternativa de la asimilación del  $\text{NH}_4^+$ , el primer aceptor del  $\text{NH}_4^+$  no es el 2-oxoglutarato, sino el *glutamato* y el primer compuesto orgánico al que se fija el  $\text{NH}_4^+$  no es el glutamato sino la *glutamina*, por acción de la glutamina sintetasa. A su vez, la glutamina pasa a ser el dador de grupos aminos para la síntesis del glutamato, por la reacción catalizada por la glutamato sintasa. De esta forma, la célula vegetal obviaría los altos requerimientos de  $\text{NH}_4^+$ , que son precisos para la GDH, y por la acción conjunta de la GS y GOGAT el resultado neto es el mismo que la reacción catalizada por la GDH, es decir, la producción de glutamato aunque por estar implicada GS requiere el gasto de ATP.



## 18.4.1. Localización de la asimilación del amonio en la planta

La incorporación del  $\text{NH}_4^+$  a los compuestos orgánicos ocurre tanto en las raíces como en los tejidos con capacidad fotosintética. En el primer caso va ligado al metabolismo energético de las mitocondrias y en el segundo permite el acoplamiento directo del poder asimilatorio (poder reductor) de la fotosíntesis. En cloroplastos intactos ha podido ser demostrada la actividad de aminación reductiva (GDH) y la vía alternativa del sistema GS/GOGAT. Recientemente también se ha comprobado en las raíces y en cultivos de tejidos la presencia, además de la GDH, de la GS y GOGAT, de forma que se cree que estas enzimas son de significación general en la asimilación del amonio en las plantas y no limitado exclusivamente a las células con capacidad fotosintética. Más lógico es, pues, pensar, de acuerdo con Leech y Murphy, que puedan predominar diferentes modos de síntesis de glutamato en las distintas condiciones celulares o ambientales o quizá bajo diferentes condiciones de déficit de nitrógeno. La presencia de altos niveles de GDH en la raíz sugiere que esta enzima pueda jugar un papel importante en la asimilación del amonio en este órgano de la planta.

En la figura 18.6 se muestra esquemáticamente la cooperación estrecha entre el cloroplasto y el citoplasma en la asimilación del amonio y el acoplamiento de la fotosíntesis a los procesos enzimáticos de incorporación del  $\text{NH}_4^+$  a los aminoácidos. Se indican, asimismo, la procedencia de los compuestos carbonados que intervienen en la asimilación del amonio.

La asimilación del amonio en los nódulos radiculares parece seguir las mismas vías que acabamos de reseñar. En los bacteroides de diversos nódulos se han podido localizar bajos contenidos de GS, GOGAT y GDH que inicialmente hicieron creer que eran insuficientes para la proporción en que ocurre la asimilación del  $\text{NH}_4^+$ . No obstante,

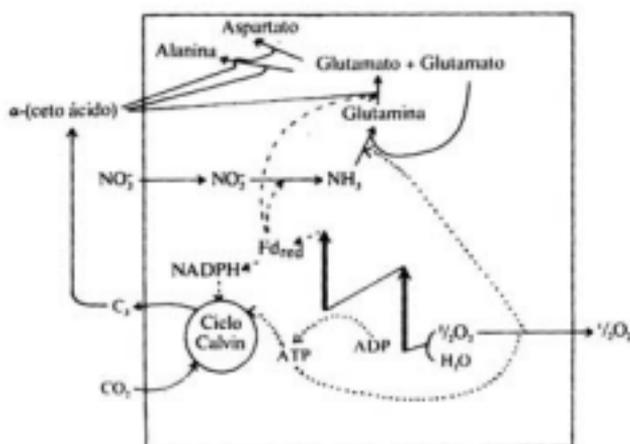


Figura 18.6.—Mecanismo cooperativo entre el cloroplasto y el citoplasma en la asimilación fotosintética del amonio (tomado de Lea y Millin, en: *Photosynthesis II. Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, volumen 6. M. Gibbs y E. Latzko (edit.), Springer-Verlag, Berlín, 1979).

también se ha comprobado la actividad GOGAT y GS en la fracción de la planta de los nódulos, actividad que se incrementaba a lo largo del desarrollo de los nódulos de altramuz. Estos resultados parecen así sugerir que el amonio excretado por el bacteroide es asimilado a compuesto orgánico por el sistema GS/GOGAT de la planta.

### 18.5. Control de la asimilación del N por la planta

Aunque se disponen de muchos datos sobre la regulación genética de los distintos enzimas que participan en la reducción y asimilación del N, no puede darse, con carácter general, una interpretación de conjunto válida.

Normalmente se considera que la *nitrogenasa* es reprimida o inhibida en presencia de otras fuentes de nitrógeno distintas al  $N_2$  (así,  $NO_3^-$  o  $NH_4^+$ ). Mientras esto parece el caso para la nitrogenasa de las bacterias libres y de las algas verde-azuladas, la situación es menos cierta con respecto a la asociación *Rhizobium*-leguminosa, en donde ya se conocen variedades específicas de *Rhizobium* que no son reprimidas por otros compuestos de N.

Quizá el enzima que ha recibido más atención sea la *nitrito reductasa*, para la que se describen distintas posibilidades de control a diferentes niveles. Una de ellas es la regulación del proceso previo de la *absorción* del nitrato por la planta. Se supone que esta absorción se realiza por un proceso activo que requiere de energía metabólica y para el que hay evidencias de que el nitrato actúa como inductor del sistema de absorción. Esta regulación previa es importante, puesto que se cree que la intensidad de absorción de nitrato es un factor esencial en la regulación de la asimilación del nitrato. Beevers y Hageman consideran que la *nitrito reductasa* es el enzima limitante de la reducción de los nitratos, siendo aquí el puesto clave de control de la incorporación del nitrógeno reducido a la planta.

En la mayoría de las especies estudiadas de plantas crecidas en ausencia de nitrato se encuentran bajos niveles de *nitrito reductasa*. Por transferencia a un medio con nitratos ocurre un rápido incremento del nivel del enzima, del que se desconoce con exactitud el mecanismo molecular, pero para el que se supone una *síntesis de novo* del enzima. Además de este control *positivo* de los niveles de *nitrito reductasa* por inducción por el sustrato, puede ocurrir un control *negativo*, por represión o por inhibición del enzima por los productos de la asimilación del nitrógeno (amonio, amidas y aminoácidos).

Otro hecho a destacar son las observaciones con plántulas de algodón en las que se presenta una sensibilidad diferencial de la raíz y la parte aérea de la planta para la represión de la *nitrito reductasa* por compuestos aminados. La represión de la *nitrito reductasa* por los productos de la asimilación del nitrato podría ser así un mecanismo de control de la contribución relativa de la raíz y la parte aérea en el proceso global de la asimilación de los nitratos por las plantas, interpretación que, además, está de acuerdo con las observaciones de que la parte aérea sea el sitio principal de asimilación en condiciones de alto suministro de nitrato.

Diversos factores fisiológicos (luz,  $O_2$ ,  $CO_2$ , temperatura, etc.) influyen la asimilación de los nitratos. De ellos quizá el más significativo sea la regulación por la luz. La luz

parece ser un requerimiento necesario para la síntesis de la nitrato reductasa en los tejidos con capacidad fotosintética. Se han descrito interacciones con ritmos circadianos y la participación de fitohormonas y del sistema fitocromo. La forma inactiva de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* y de hojas de espinaca es activada por la luz azul y no por la luz roja, con lo que se ha sugerido que el grupo prostético flavínico sea el fotorreceptor para la modulación por la luz de la actividad de la nitrato reductasa.

Mucho menos se conoce sobre la regulación de los enzimas de la asimilación del amonio por las plantas. En estudios realizados con *Lemna minor* se ha comprobado una regulación concurrente de la glutamina sintetasa y de la glutamato deshidrogenasa y la regulación paralela de la nitrato reductasa y la glutamina sintetasa. Esta pauta de control se interpretó como un elemento común de control, principalmente la glutamina, que reprimiría a la nitrato reductasa y glutamina sintetasa e induciría a la glutamato deshidrogenasa. En efecto, esta regulación concurrente de la glutamina sintetasa y de la glutamato deshidrogenasa es de interés en relación con la disponibilidad de amonio: a bajos niveles de amonio los niveles de glutamina sintetasa serían altos y bajos los de la GDH; a altos valores de amonio, sería alto el nivel de GDH y bajo el de GS.

Se conoce también la existencia de una modulación de la actividad enzimática, sobre todo referida a la glutamina sintetasa, por retroinhibición por aminoácidos.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BAUER, W. D.: *Infection of Legumes by Rhizobia*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 32, 1981, páginas 407-449.
- BEEVERS, L., y HAGEMAN, R. H.: *Nitrate Reduction in Higher Plants*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 20, 1969, págs. 495-522.
- BEEVERS, L.: *Nitrogen Metabolism in Plants*, Edward Arnold, Londres, 1976.
- BOTTE, H., y TREBST, A.: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur*, Springer-Verlag, Berlin, 1981.
- BRILL, W. J.: *Fijación biológica del nitrógeno*. «Investigación y Ciencia», mayo, 1977, páginas 44-54.
- BURNS, R. G., y HARDY, R. W. F.: *Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants*, Springer-Verlag, Berlin, 1975.
- BURRIS, R. H.: *Nitrogen Fixation*, en: *Plant Biochemistry*, edit. J. Bonner y J. E. Varner, Academic Press, Nueva York, 1976, págs. 887-908.
- DAVIS, L. C.: *Limiting Factors in Nitrogen Fixation*. «What's New in Plant Physiology», volumen 11, 1980, págs. 41-44.
- DILWORTH, M. J.: *Dinitrogen Fixation*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 25, 1974, págs. 81-114.
- GIBBS, M., y LATZKO, E. (edit.): *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 6, *Photosynthesis II*, Springer-Verlag, Berlin, 1979.
- GIBSON, A. H., y JORDAN, D. C.: *Ecophysiology of Nitrogen-Fixing Systems*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vol. C: *Physiological Plant Ecology III* (Edit. O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond y H. Ziegler), Springer-Verlag, Berlin, 1983, págs. 301-390.

- HARDY, R. W. F., y SILVER, W. S.: *A Treatise on Dinitrogen Fixation*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1977.
- HEWITT, E. J.: *Assimilatory Nitrate-Nitrite Reduction*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 26, 1975, páginas. 73-100.
- HEWITT, E. J.; HUCKLESBY, D. P., y NOTTON, B. A.: en *Plant Biochemistry*, edit. J. Bonner y J. E. Varner, Academic Press, Nueva York, 1976, págs. 633-681.
- LAUCHLI, A., y BIELESKI, R. L. (eds.): *Inorganic Plant Nutrition. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vols. 15A y 15B. Springer-Verlag, Berlín, 1983.
- LEE, J. A., y STEWART, G. R.: *Ecological Aspects of Nitrogen Assimilation*, en: *Advances in Botanical Research*, vol. 6, ed. H. W. Woolhouse, Academic Press, Londres, 1978, págs. 2-43.
- LUSADA, M., y GUERRERO, M. G.: *The Photosynthetic Reduction of Nitrate and its Regulation*, en: *Photosynthesis in Relation to Model Systems*, J. Barber (ed.), Elsevier, Amsterdam, 1979, págs. 365-408.
- OAKS, A., y HIREL, B.: *Nitrogen Metabolism in Roots*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 345-365, 1985.
- POSTGATE, J. R.: *Nitrogen Fixation*, Edward Arnold, Londres, 1978.
- POSTGATE, J. R.: *The Fundamentals of Nitrogen Fixation*, Cambridge University Press, Cambridge, 1982.
- SCHMIDT, E. L., y BOHLOOL, B. B.: *The Role of Lectins in Symbiotic Plant-Microbe Interactions 658-677*, en *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 13, B. W. Tanner y F. A. Loewus (eds.), Springer-Verlag, Berlín, 1981.
- SEQUEIRA, L.: *Plant-Bacterial Interactions*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vol. 17: *Cellular Interactions* (Edit. H. F. Linskens y J. Heslop-Harrison), Springer-Verlag, Berlín, 1984, págs. 187-211.
- SHANMUGAM, K. T.; O'GARA, F.; ANDERSEN, K., y VALENTINE, R. C.: *Biological Nitrogen Fixation*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 29, 1978, págs. 263-276.
- SPRENT, J. I.: *Nitrogen Fixation*, en: *Advanced Plant Physiology* (Edit. M. B. Wilkins), Pitman, Londres, 1984, págs. 249-276.
- STEWART, F. C., y BIDWELL, R. G. S. (eds.): *Plant Physiology. A Treatise*, vol. VIII: *Nitrogen Metabolism*, Academic Press, Londres, 1983.
- STEWART, G. R., y RHODES, D. R.: *Control of Enzyme Levels in the Regulation of Nitrogen Assimilation*, en: *Regulation of Enzyme Synthesis, and Activity in Higher Plants*, edit. H. Smith, Academic Press, Londres, 1977, págs. 1-22.
- STUMPF, P. K., y CONN, E. E. (eds.): *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*, vol. 5: *Amino Acids and Derivatives* (Edit. B. J. Mifflin), Academic Press, Nueva York, 1980.
- VERMA, D. P. S.: *Plant-Rhizobium Interactions in Symbiotic Nitrogen Fixation*, en: *The Molecular Biology of Plant Development* (Edit. H. Smith y D. Grierson), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982, págs. 437-466.
- WALLSGROVE, R. M., y LEA, P. J.: *Photosynthetic Nitrogen Metabolism* en: *Photosynthetic Mechanisms and the Environment* (Edit. J. Barber y N. R. Baker, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985, págs. 389-418.

## REDUCCIÓN ASIMILADORA DEL SULFATO

### 19.1. El ciclo del azufre y las plantas

Generalmente, el azufre entra en las vías de biosíntesis en los niveles de oxidación del  $\text{SO}_4^{2-}$  (+ 6) y del  $\text{S}^{2-}$  (- 2). A diferencia de los animales, la capacidad de reducir compuestos de azufre está ampliamente extendida entre las bacterias y las plantas. Así, mientras los mamíferos son incapaces de reducir el sulfato a sulfuro para la biosíntesis de los aminoácidos azufrados (cisteína y metionina) y de cofactores como la biotina, tiamina, ácido lipoico y coenzima A (nutrición heterótrofa), las plantas y la mayoría de las bacterias son capaces de vivir a expensas del sulfato como única fuente de azufre e incorporarlo, por un proceso previo de reducción a nivel de sulfuro, a compuestos orgánicos (nutrición autótrofa del S).

Por analogía con la terminología empleada con la reducción de los nitratos, se distingue también entre la *reducción asimiladora de los sulfatos* y la *reducción no asimiladora de los sulfatos*.

Se entiende por *reducción asimiladora de los sulfatos* al proceso de reducción en pequeña escala del sulfato necesario para la biosíntesis de compuestos orgánicos con azufre reducido. Por el contrario, la reducción no asimiladora de los sulfatos es un proceso de transformación en gran escala del sulfato a iones sulfuro cuya finalidad es el suministro de energía.

La reducción asimiladora del sulfato es una propiedad de la mayoría de bacterias, hongos, levaduras, algas y plantas superiores, mientras que la reducción no asimiladora del sulfato se limita a ciertas bacterias anaerobias obligadas (por ejemplo, *Desulfovibrio*) en las que el sulfato sustituye al  $\text{O}_2$  como aceptor terminal de electrones en la respiración celular (metabolismo energético).

En la figura 19.1 puede observarse la importancia central de las bacterias y las plantas en el ciclo del S en la biosfera y su significación ecológica, debido a la incapacidad de los animales para realizar estas biosíntesis y, por tanto, su estrecha dependencia de la vida de las plantas. En este sentido recuérdese que la metionina es un aminoácido *esencial* para los animales. El carácter cíclico se cierra por la posibilidad de que los compuestos reducidos de azufre sirvan como dadores de electrones para procesos de *respiración aerobia* o *anaerobia* y en la *fotosíntesis* de determinadas bacterias (tiroidobacteriales).

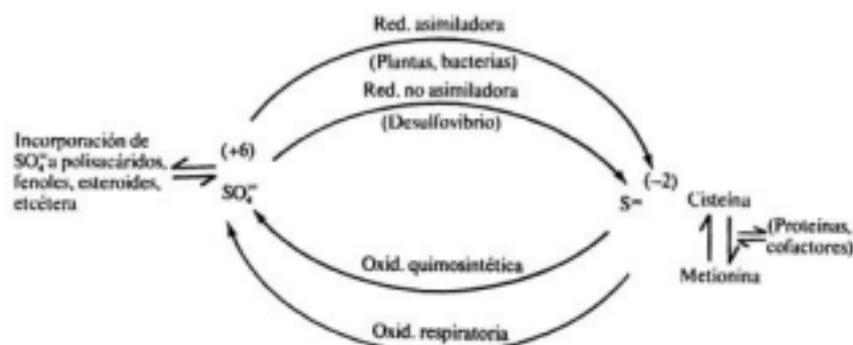


Figura 19.1.—Procesos fisiológicos del ciclo del azufre en la biosfera.

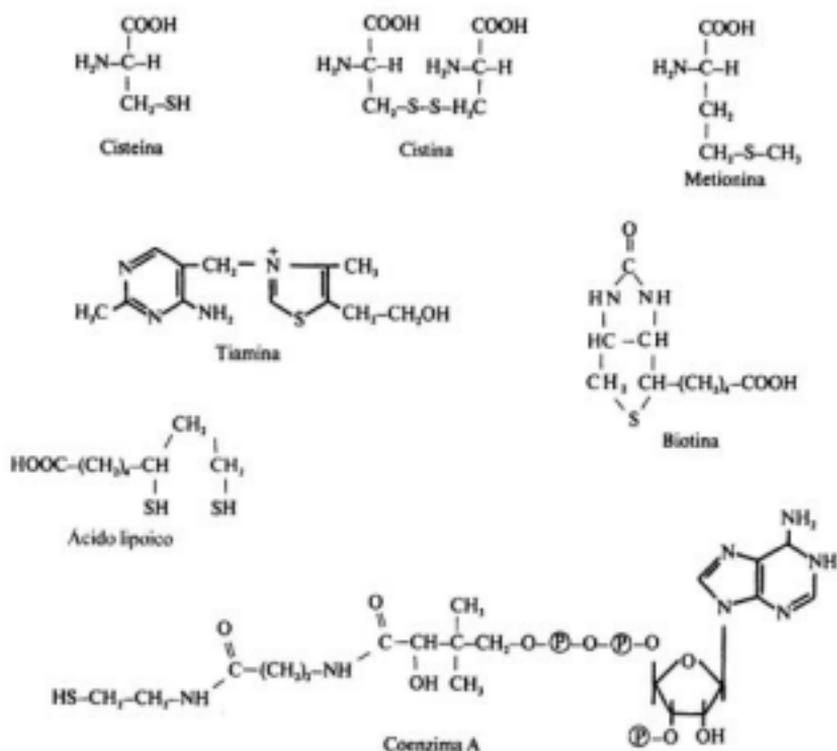


Figura 19.2.—Algunos compuestos orgánicos de la planta que contienen S.

### 19.2. Absorción y transporte del sulfato por las plantas

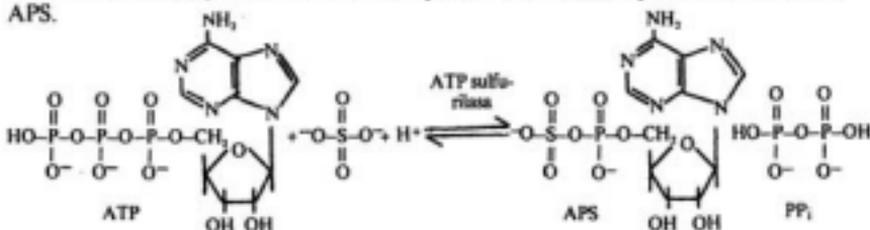
La principal forma disponible de S para las plantas son los sulfatos. Una pequeña parte de ellos se incorporan, sin ningún cambio de óxido-reducción, a distintos compuestos orgánicos (polisacáridos, esteroides, fenoles, sulfolípidos, etc.) o libre, como tal ion inorgánico, puede contribuir a la regulación osmótica celular. No obstante, la mayoría de compuestos de S de la planta sufren cambios de óxido-reducción y se incorporan a compuestos orgánicos (cisteína, metionina, ácido lipoico, glutatión, biotina, CoA, tiamina, etc.) (Fig. 19.2).

La raíz es el órgano principal de absorción de los sulfatos desde donde alcanzan la vía del xilema (Cap. 6) y son transportados al resto de la planta. Se cree que la absorción de los sulfatos es un proceso *activo*. El  $\text{SO}_2$  atmosférico (agente contaminante cada vez más frecuente) puede ser captado directamente por las hojas a través de los estomas y se ha comprobado su transporte por el floema, de forma que se ha postulado que el  $\text{SO}_2$  puede así alcanzar a las raíces desde su penetración por las hojas.

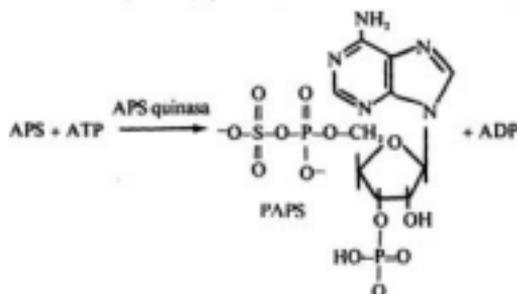
### 19.3. Activación del sulfato

El sulfato es un compuesto relativamente poco reactivo. Por ello, el metabolismo del sulfato requiere previamente de su activación biológica. Este proceso de activación del sulfato es común tanto a los microorganismos y plantas como a los animales.

En un primer paso, el sulfato reacciona con el ATP para formar el adenosina-5'-fosfosulfato (APS). Esta reacción es catalizada por el enzima *ATP sulfurilasa* (ATP: sulfato adenilil transferasa) y transcurre con un equilibrio desfavorable para la formación de APS.



La posterior activación de APS se consigue por la acción del enzima *APS quinasa* (adenosina-5'-sulfatofosfato quinasa) que cataliza la reacción irreversible



El pirofosfato producido en la primera reacción es hidrolizado por acción de la *pirofosfatasa inorgánica*



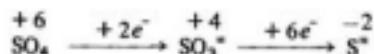
Por acción acoplada de las tres reacciones se consiguen las condiciones termodinámicas y de equilibrio necesarias para la acumulación del *sulfato activo* o 3'-fosfo-adenosina-5'-fosfosulfato (PAPS), pues si bien la primera reacción requiere de energía, la segunda y la tercera son exergónicas y, al mismo tiempo, favorecen el equilibrio hacia la derecha, por separación de los productos de la primera reacción (APS y PP<sub>i</sub>).

La formación de PAPS representa así una vía común presente tanto en animales como en vegetales. Para un metabolismo anabólico posterior, los animales no disponen de los sistemas enzimáticos para la reducción del sulfato a nivel de sulfuro y su incorporación a compuestos orgánicos. Sólo es común en *animales* y *vegetales* la utilización de PAPS para procesos de incorporación del *sulfato* a compuestos orgánicos, preferentemente en forma de ésteres, por la actividad de las *sulfotransferasas*. En las plantas se forman, por este mecanismo, ésteres sulfato, por ejemplo, del tipo de colina-sulfato, flavonoides-sulfato, polisacárido-sulfatos y glicósidos de aceite de mostaza.

#### 19.4. Reducción asimiladora del sulfato

El estudio de la reducción asimiladora del sulfato ha recibido una atención posterior al de la fijación y reducción del CO<sub>2</sub> y del nitrato, lo que unido a la diversidad de estados de valencia del S y a la facilidad de sus interconversiones químicas ha determinado que actualmente el conocimiento sobre el metabolismo de la reducción del sulfato esté por debajo del de la reducción asimiladora del nitrato y aun mucho más inferior al de la fijación y reducción del CO<sub>2</sub> por las plantas. No obstante, los resultados de varios equipos de investigación permiten ya elaborar una visión de conjunto que, a grandes rasgos, tiene muchas semejanzas con la del nitrato.

En primer lugar, la reducción del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a nivel de S<sup>0</sup> requiere del aporte de 8 electrones en dos pasos de reacción que utilizan 2 y 6 electrones, respectivamente, al igual que ocurre con la reducción del nitrato (Cap. 18).



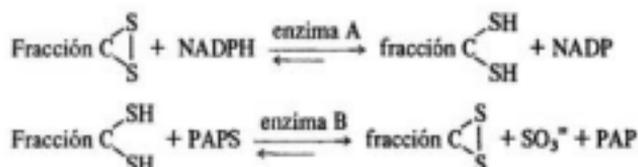
En un análisis más detallado de cada uno de los pasos aparecen claramente algunas diferencias respecto a la reducción del nitrato:

1. El sulfato debe ser «activado» previamente (gasto energético de ATP).
2. Los dos pasos de reducción del sulfato y sulfito no transcurren en forma libre, sino unido a una molécula portadora.

### 19.4.1. Reducción del «sulfato activo»

En un principio se creyó que existían ligeras diferencias en el proceso de la reducción del sulfato en las bacterias y hongos, por una parte, y en las plantas superiores, por otra. Esta diferencia se centraba en la forma de «sulfato activo» que sufría el proceso de reducción. Estudios no concordantes entre extractos de bacterias y levaduras y del alga *Chlorella* y plantas superiores parecían indicar que las plantas carecían, al menos de una forma significativa, del enzima APS quinasa, por lo que la reducción en bacterias y hongos partiría de PAPS mientras que en las plantas APS sería el «sulfato activo» para la reducción, representando PAPS sólo una vía lateral del metabolismo. Aunque estudios posteriores parecían indicar un carácter más general de PAPS como forma del «sulfato activo» que experimenta el proceso de reducción, de nuevo las evidencias experimentales indican que PAPS es el sustrato para la reducción del sulfato en organismos heterótrofos (levaduras, *Escherichia coli* y otras bacterias) y en algunas algas verde-azules, mientras que en la mayoría de organismos con capacidad fotosintética (algunas algas verde-azules, todas las algas eucariotas y las plantas superiores) ocurre a partir de APS. Aunque en vista a estos resultados se desconoce la significación funcional de PAPS, éste puede ser reducido por las plantas, previa hidrólisis a APS.

En estudios realizados con levaduras, según Wilson, se requieren dos enzimas (A y B) y una proteína portadora con grupo disulfuro (fracción C) para la reducción de PAPS a sulfito unido, actuando NADPH como suministrador del equivalente de reducción.

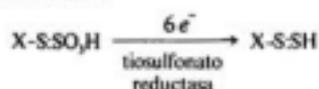


El enzima A, de acuerdo con el grupo de Wilson, es una flavoproteína que acopla la oxidación del NADPH con la reducción del grupo disulfuro de la fracción C a ditiol. El enzima B correspondería a la PAPS reductasa que cataliza la reducción de PAPS a sulfito unido. De este modo, el enzima A se parece al grupo de las piridín nucleótido disulfuro óxidorreductasas (tioredoxina reductasa, glutathion reductasa y lipoamida deshidrogenasa) en los cuales participa el proceso de transferencia de electrones, el disulfuro de una cisteína y un compuesto flavínico.

Mucho más complejos son los resultados obtenidos con experimentos con *plantas o cloroplastos*. En las plantas, el aceptor del sulfato se representa por el portador endógeno X-SH que ha sido identificado como sulfito unido, X-S:SO<sub>3</sub>H, en los cloroplastos. En el aceptor sería reducido primero el grupo disulfuro a tiol por el NADPH, operando una *sulfotransferasa* en la formación del sulfito unido (grupo prostético unido al enzima) desde APS (o PAPS).

## 19.4.2. Reducción del sulfito

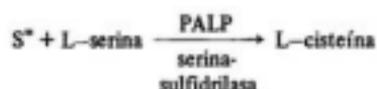
Se considera que la «sulfito reductasa» es más bien una *tiosulfonato reductasa* (o sulfito-unido reductasa), pues muchas evidencias experimentales indican una reducción del sulfito unido y no de sulfito libre.



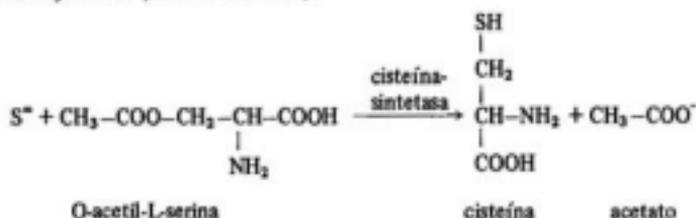
Se trata de una reducción directa, sin pasos intermedios en los estados de valencia del azufre, y que requiere de 6 electrones, al igual que la nítrito reductasa que opera la reducción del nítrito a amonio y la nitrogenasa que cataliza la reducción del N<sub>2</sub> atmosférico a amonio (Cap. 18). Otra propiedad común entre estos enzimas es que la «sulfito reductasa» utiliza también el equivalente de reducción de la ferredoxina reducida. Además, la sulfito reductasa de *Escherichia coli* ha sido identificada como un «sirohemo», otro rasgo en común con la nítrito reductasa.

## 19.4.3. Incorporación del azufre reducido a compuestos orgánicos

La *cisteína* es el compuesto orgánico de entrada del azufre reducido. En un principio se creyó que la *serina* era el aceptor del S<sup>-</sup> en una reacción catalizada por el enzima *serina sulfidrilasa* actuando como cofactor el piridoxalfosfato (PALP).



Más recientemente se ha comprobado que la *O-acetilserina* es mucho más activa que la serina en la formación de cisteína tanto en microorganismos como en las plantas, así como se ha identificado el enzima que cataliza la reacción correspondiente, la *O-acetil L-serina-sulfidrilasa* (cisteína sintetasa).



En realidad, la transferencia del sulfuro «unido» requiere la rotura reductiva del enlace azufre-azufre del persulfuro. De acuerdo con Schwenn y Trebst, el proceso transcurre del siguiente modo:



El portador, en estado oxidado, debe de nuevo ser reducido para poder servir como aceptor del grupo sulfuro en la formación del «sulfito unido», para lo cual se requieren 2 electrones que podrían ser suministrados por el NADPH del cloroplasto.

En la figura 19.3 se representa una adaptación del esquema global propuesto por el equipo de Trebst para los pasos de la activación del sulfato, su reducción en forma «unida» hasta el nivel de sulfuro y su incorporación a la materia orgánica en forma del aminoácido cisteína.

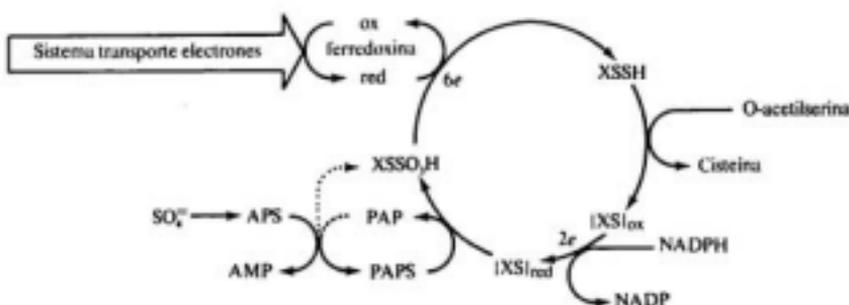


Figura 19.3.—Esquema global de la «activación» y reducción del sulfato y de su incorporación, como grupo tiol, a compuestos orgánicos (cisteína) (según Schwenn y Trebst: *The Intac Chloroplast*, J. Barber (edit.), Elsevier, Amsterdam 1976).

Una vez sintetizada la cisteína las plantas son capaces de sintetizar a partir de ella el aminoácido *metionina* y los distintos compuestos orgánicos azufrados del metabolismo primario (biotina, ácido lipoico, tiamina, CoA, etc.) y secundario (glicósidos-S, antibióticos-S, etc.).

Se han propuesto dos mecanismos alternativos para la biosíntesis de la metionina:

- Por transulfuración inicial del sulfuro a cisteína y luego transferencia a la homocisteína y metionina vía la cistationina, o
- Por sulfurilación directa a la O-acetil-L-homoserina, para sintetizar homocisteína y metionina. En las plantas, la transulfuración parece ser el mecanismo primario de biosíntesis de la metionina a partir del sulfuro inorgánico. Es decir, en una cadena de reacciones en el sentido



Un tratamiento más detallado del metabolismo de los aminoácidos y compuestos orgánicos con S en las plantas cae fuera de los límites impuestos a este manual. Para una profundización del tema se aconseja la consulta de obras más especializadas (por ejemplo, ver Wilson y Reuveny, 1976).

Como ya hemos indicado anteriormente, los animales únicamente son capaces de formar el sulfato activo (PAPS), pero no disponen de los mecanismos de reduc-

ción a sulfito y sulfuro y de la incorporación del sulfuro a compuestos orgánicos (cisteína). Este carácter heterótrofo de los animales se manifiesta por el carácter de aminoácido esencial de la metionina (incapaz de ser sintetizada por el organismo animal y debe ser suministrada en la dieta) y un mecanismo distinto de biosíntesis de la cisteína, en el sentido inverso que las plantas, desde la metionina a la cisteína.

#### 19.4.4. Localización celular y subcelular de la reducción del sulfato

No se disponen de muchos conocimientos sobre las distintas posibilidades de localización celular y subcelular de la reducción asimiladora del sulfato en las plantas. Se supone que este proceso metabólico puede ocurrir tanto en las raíces como en las hojas. En todo caso, precisa de una conexión con el metabolismo energético (necesidad de ATP) y de la disponibilidad de equivalentes de reducción (NADPH, ferredoxina reducida).

Al descubrirse que la luz influía en la reducción del sulfato en hojas seccionadas pronto fue objeto de una intensa investigación la localización subcelular de este mecanismo. Fruto de estos estudios ha sido la comprobación de que los cloroplastos disponen de los sistemas enzimáticos responsables de la activación, reducción y asimilación del sulfato, en experiencias realizadas con sistemas acelulares y con cloroplastos «reconstituidos». Por utilización de isótopos marcados,  $^{35}\text{S}$ , se ha podido demostrar igualmente a partir de los datos cinéticos obtenidos una secuencia de transformaciones del sulfato prácticamente idéntica a la discutida anteriormente para la reducción asimiladora del sulfato y la formación de la cisteína y metionina:



en donde P(2) corresponde a un compuesto de un pico de elución por identificar y «X» al portador endógeno al que se une el sulfato a un grupo sulfidrilo. De acuerdo con estos datos, el equipo de Trebst ha establecido, como hipótesis de trabajo, que el APS es el primer compuesto marcado de la reducción asimiladora del sulfato que es transformado a PAPS y a expensas de éste se forma concomitantemente una tercera sustancia desconocida, situada en el pico 2 de elución. De estas evidencias se supone que PAPS transfiere su grupo sulfato al grupo sulfidrilo del portador endógeno X, formándose así el sulfito unido, X-S:SO<sub>3</sub>H. El paso siguiente de reducción a la luz del sulfito unido, X-S:SO<sub>3</sub>H, a sulfuro unido, X-S-SH (persulfuro) consume 6 electrones procedentes de la ferredoxina reducida. Se supone que la cisteína se forma a partir de este sulfuro unido. Adicionalmente, en el proceso global de la reducción, se requieren otros 2 electrones en forma de NADPH, presumiblemente para la reducción de la forma oxidada del portador endógeno. Como vemos, el punto más crítico de esta hipótesis es la participación o no de PAPS, tal como hemos discutido en 19.4.1.

#### 19.4.5. Reducción fotosintética del sulfato

Los experimentos con cloroplastos, rotos o reconstituidos, y el estudio de los sistemas enzimáticos del cloroplasto o de homogeneizados de hojas y algas, así como las investigaciones sobre la influencia de la luz y de la fotosíntesis, permiten ya establecer que la reducción asimiladora de los sulfatos es uno más de los procesos fotosintéticos que ocurren en el seno del estroma de los cloroplastos (fotosíntesis del S).

De acuerdo con estas ideas, el esquema global de la figura 19.3 operaría en el seno del cloroplasto, en el que se han aislado los sistemas enzimáticos y metabolitos intermedios y en el que el aporte energético (ATP) y de equivalentes de reducción ( $Fd_{red}$ ) provendría directamente del acoplamiento con el proceso primario o lumínico de la fotosíntesis.

De forma sumaria, el acoplamiento entre el proceso primario de la fotosíntesis (formación del poder asimilador: ATP y NADPH y  $Fd_{red}$ ) y la fijación y reducción del sulfato, se considera que ocurre según el esquema de la figura 19.4, en donde

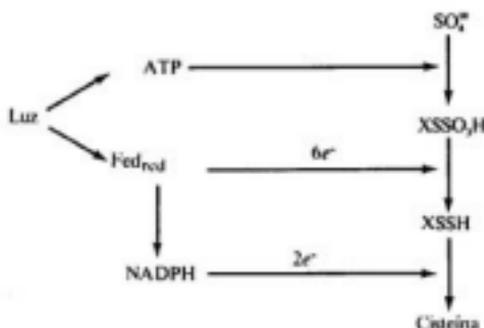


Figura 19.4.—Esquema del acoplamiento entre el proceso primario de la fotosíntesis y la fijación y reducción del sulfato (reducción fotosintética del sulfato por las plantas).

puede observarse que el equivalente de reducción es suministrado bien directamente por la ferredoxina reducida o bien, indirectamente, a partir de ella por formación del piridín nucleótido reducido, NADPH.

#### 19.5. Mecanismo de la regulación de la reducción asimiladora del sulfato

Los bajos niveles de cisteína y metionina en las plantas, comparado con los de otros aminoácidos, sugieren un estrecho control del metabolismo que conduce a estos aminoácidos. Se dispone de dos aproximaciones distintas a este tema. En una de ellas se estudian los efectos de los aminoácidos con S en las actividades *in vitro* de los enzimas *serina transacetilasa* y *O-acetil serina sulfidrilasa* que no muestran ningún mecanismo de inhibición por retroacción, ni por la serina ni por la metionina.

En otro tipo de estudios se han observado los efectos de la deficiencia de azufre en los niveles de estas enzimas como posibles indicadores de mecanismos de represión o desrepresión. Los resultados obtenidos tampoco son esclarecedores.

Más recientemente, en estudios realizados con *Lemna minor*, se ha observado que ni el sulfato ni el sulfuro están implicados en la regulación de la adenosina-5'-fosfosulfato sulfotransferasa (APS Tasa), aunque la cisteína sí puede ser un regulador probable. Experimentos realizados con bacterias (*Salmonella typhimurium*) demuestran la represión por cisteína de los enzimas de la reducción asimiladora del sulfato.

En resumen, a pesar de las evidencias experimentales de que se dispone sobre la regulación por represión por producto final de la biosíntesis de los enzimas o por inhibición de su actividad en el campo de las bacterias, todavía no puede darse una visión coherente de los mecanismos que regulan la reducción asimiladora del sulfato en las plantas.

#### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BOTHE, H., y TREBST, A. (eds.): *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur*, Springer-Verlag, Berlín, 1981.
- BRUNOLD, C., y SCHMIDT, A.: *Regulation of Sulfate Assimilation in Plants*, «Plant Physiol.», volumen 61, 1978, págs. 342-347.
- LÄUCHLI, A., y BIELESKI, R. L. (eds.): *Inorganic Plant Nutrition*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vols. 15A y 15B, Springer-Verlag, Berlín, 1983.
- RENNENBERG, H.: *The Fate of Excess Sulfur in Higher Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 35, 1984, págs. 121-153.
- RICHMOND, D. V.: *Sulfur Compounds*, en: *Phytochemistry*, vol. 3, *Inorganic Elements and Special Groups of Chemicals*, Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York, 1973, páginas 41-73.
- ROY, A. B., y TRUDIGER, P. A.: *The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulphur*, Cambridge University Press, 1970.
- SCHIFF, J. A., y HODSON, R. C.: *The Metabolism of Sulfate*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 24, 1973, págs. 381-414.
- SCHMIDT, A., y SCHWENN, J. D.: *On the Mechanism of Photosynthetic Sulfate Reduction*, Proc., 2nd Int. Cong. Photosynthesis (Forti, G., Avron, M., y Melandri, A., eds.), Junk, La Haya, 1971, págs. 507-517.
- SCHMIDT, A.: *Photosynthetic Assimilation of Sulfur Compounds*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 6, *Photosynthesis II* (M. Gibbs y E. Latzko, eds.), Springer-Verlag, Berlín, 1979, págs. 481-496.
- SCHWENN, J. D., y TREBST, A.: *Photosynthetic Sulfate Reduction by Chloroplasts*, en: *The Intact Chloroplast*, J. Barber (ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1976, páginas 315-334.
- THOMPSON, J. F.: *Sulfur Metabolism in Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 18, 1967, páginas 59-84.
- WILSON, L. L. G., y RELUVENY, Z.: *Sulfate Reduction*, en: *Plant Biochemistry*, 3.ª ed., J. Bonner y J. E. Varner (eds.), Academic Press, Nueva York, 1976, págs. 599-632.

**V**

**Respiración**



## RESPIRACIÓN Y MITOCONDRIAS VEGETALES

La obtención de energía químicamente utilizable ocurre en la mayoría de los organismos mediante los mismos procesos bioquímicos, ya se trate de una célula vegetal, animal o bacteriana. Las células vivas respiran continuamente absorbiendo  $O_2$  y eliminando  $CO_2$  en volúmenes casi iguales. El proceso global de la respiración consta de un conjunto de reacciones de óxido-reducción mediante las cuales ciertos compuestos como carbohidratos, grasas, ácidos orgánicos, y más raramente proteínas, son oxidados hasta transformarse en  $CO_2$ . Al mismo tiempo, el oxígeno absorbido es reducido hasta formar agua. La reacción general de la respiración, utilizando glucosa como sustrato respiratorio es la siguiente:  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energía}$  (686 kcal/mol de glucosa). Parte de esta energía se libera como calor y parte queda atrapada en la molécula de ATP que puede ser utilizada posteriormente en muchos procesos esenciales de la vida vegetal. Asimismo, muchos compuestos intermediarios en el proceso de degradación de los sustratos respiratorios pueden servir de punto de partida para la síntesis de muchos compuestos vegetales esenciales para su vida.

Fue Ingen-Housz en 1779 quien hizo el descubrimiento de que las plantas verdes en la oscuridad «viciaban» el aire de la misma forma que los animales, es decir, respiraban. A Ingen-Housz se debe también la idea, que ha llegado hasta nuestros días, de que las plantas de interiores en la oscuridad envenenan el aire y que por ello las plantas y flores deben ser eliminadas de los dormitorios durante la noche.

Al contrario que los animales vertebrados, las plantas se han desarrollado sin formar órganos especiales para el intercambio gaseoso y sin pigmentos transportadores de  $O_2$  y  $CO_2$ . Las plantas terrestres que viven en una atmósfera gaseosa, han desarrollado sistemas de espacios aéreos intercelulares que son continuos desde los estomas y lenticelas hasta cada célula viva de las que forman una planta. El intercambio de gases tiene lugar por difusión a través de estos espacios aéreos en respuesta a gradientes de concentración. Así, en la superficie de una célula que está respirando la concentración de oxígeno es inferior que en el aire, mientras que la de dióxido de carbono es superior.

En la figura 20.1 puede verse un esquema general del proceso respiratorio, así como su localización intracelular. Mediante la glucólisis, localizada en el citoplasma, la glucosa es transformada en piruvato que ya dentro de la mitocondria se transforma en acetil-CoA. A partir de aquí las subsiguientes reacciones del ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones se encuentran localizadas en el interior de la mitocondria.

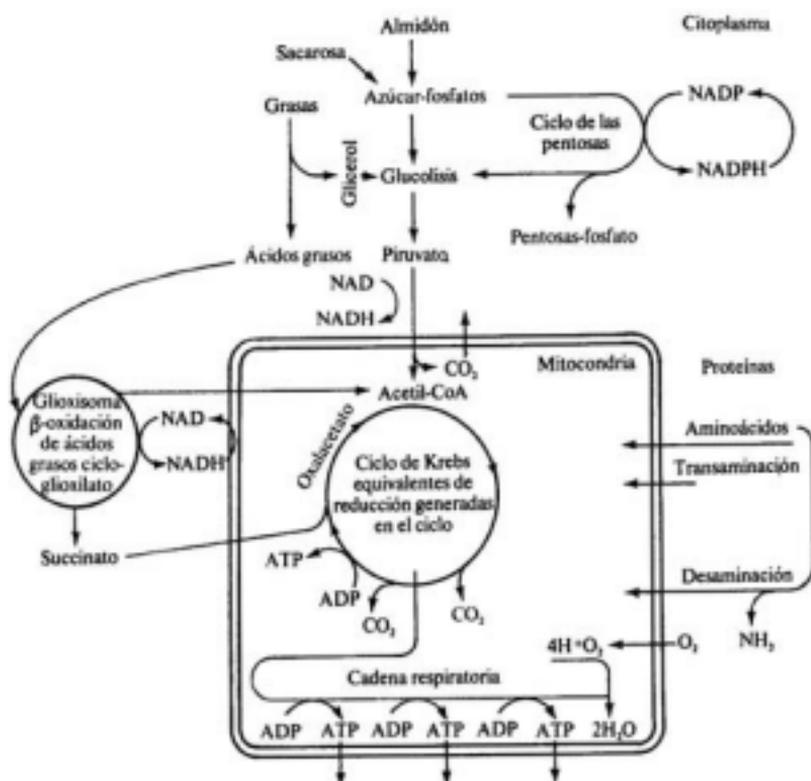


Figura 20.1.-Esquema de algunos procesos del metabolismo energético celular (modificado de W. D. Bonner, Jr.).

## 20.1. Cociente respiratorio

Mediante la determinación del cociente respiratorio, que no es más que la relación existente entre el CO<sub>2</sub> liberado en el proceso y el O<sub>2</sub> consumido

$$QR = \frac{\text{CO}_2 \text{ liberado}}{\text{O}_2 \text{ consumido}}$$

se pueden hacer, dentro de ciertas limitaciones, deducciones sobre el sustrato utilizado en el proceso respiratorio. Si el sustrato respiratorio es un carbohidrato y es oxidado completamente, el volumen de CO<sub>2</sub> liberado es igual que el del O<sub>2</sub> consumido, con lo que el cociente respiratorio será la unidad. Valores inferiores a la unidad y alrededor de

0,7 pueden indicar que el sustrato respiratorio son grasas. Veamos el ejemplo de la oxidación del ácido oleico:



$$QR = \frac{18}{25,5} = 0,71$$

Valores superiores a la unidad pueden indicar que son ácidos orgánicos dicarboxílicos los que proporcionan el sustrato para la respiración. Sin embargo, estos datos hay que tomarlos con cierta precaución, ya que en un determinado momento varios tipos de sustancias pueden estar siendo utilizadas simultáneamente como sustratos respiratorios, de tal forma que el *QR* que se obtenga sea sólo un valor intermedio, dependiendo éste de la contribución respiratoria de cada sustrato y de su contenido relativo de carbono, hidrógeno y oxígeno.

## 20.2. Determinación de la respiración

El método más frecuentemente utilizado para la determinación del intercambio gaseoso respiratorio, es el método manométrico. Se basa en el respirómetro desarrollado por Warburg en 1926 y que no es más que una modificación de los aparatos ideados por Barcroft y Haldane en 1902, o por Brodie en 1910. El respirómetro está basado en el principio de que a una temperatura constante y a un volumen de gas constante, cualquier cambio en la cantidad del gas puede determinarse por cambios en su presión. El aparato tal y como se representa en la figura 20.2 consiste de un frasco, a veces equipado con uno o más brazos laterales, unido a un manómetro que contiene un líquido de densidad conocida, la llamada «solución de Brodie». El frasco está inmerso en un baño de agua a temperatura constante, y entre las diferentes lecturas todo el sistema se somete a una agitación, para facilitar el intercambio gaseoso. El oxígeno consumido por el material biológico colocado en el frasco, causa un cambio de la presión que origina un ascenso de la solución de Brodie en el lado cerrado del manómetro y un descenso en el abierto. Entonces, como se muestra en la figura 20.3, se ajusta de nuevo el volumen del gas en el lado cerrado (a 250 mm que era la altura que alcanzaba la solución de Brodie en el lado cerrado al comenzar el experimento) y se lee el descenso producido en el lado abierto y que será proporcional al oxígeno consumido por el material biológico en el frasco. Para evitar las interferencias producidas por la liberación de  $\text{CO}_2$ , en el pocillo central del frasco se introduce un cilindro de papel de filtro impregnado de  $\text{KOH}$  que absorberá todo el  $\text{CO}_2$  producido. Para determinar la cantidad de  $\text{CO}_2$  producido hay que realizar dos medidas manométricas; una, como acabamos de describir, en presencia de  $\text{KOH}$  y otra en ausencia del mismo. En la primera se determinará la cantidad de oxígeno absorbido, en la segunda, el conjunto de  $\text{CO}_2$  liberado y de  $\text{O}_2$  absorbido, por diferencia entre las lecturas de los dos manómetros se podrá calcular la cantidad de  $\text{CO}_2$  desprendido.

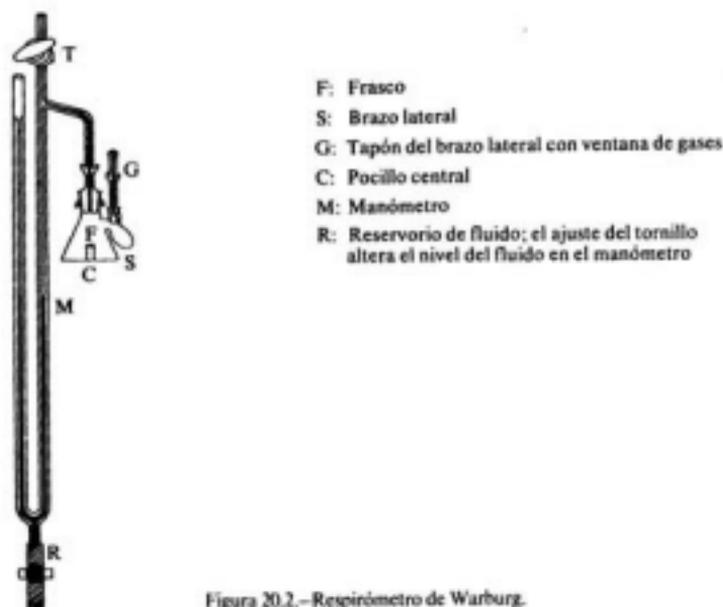


Figura 20.2.—Respirómetro de Warburg.

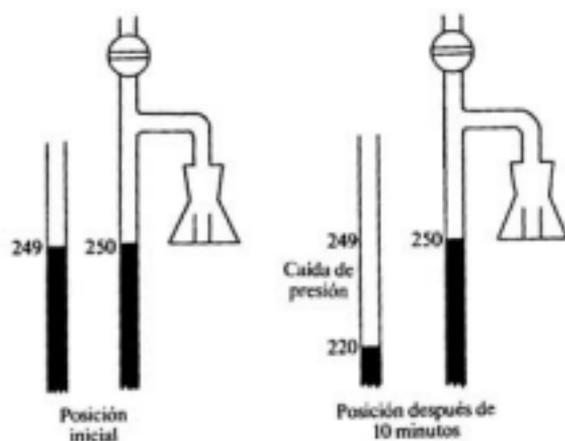


Figura 20.3.—Diagrama ilustrando la determinación del cambio de presión.

La relación entre la cantidad de gas absorbido o liberado y las lecturas en mm de los manómetros viene dada por la siguiente expresión:

$$x = hk$$

donde:

$x$ : Cantidad de gas intercambiado.

$h$ : Alteración en la lectura en el lado abierto del manómetro.

$k$ : Constante que es característica de cada frasco y que se calcula de acuerdo a:

$$k = \frac{V_x \cdot 273/T + V_f/\alpha}{P_0}$$

siendo:

$V_x$ : Volumen de la fase gaseosa del frasco incluyendo las conexiones de los tubos hasta el punto de referencia (250 mm en el lado cerrado del manómetro).

$V_f$ : Volumen del fluido añadido.

$T$ : Temperatura del baño en grados absolutos (273 + temperatura en °C).

$\alpha$ : Coeficiente de solubilidad del gas en el líquido presente en el frasco.

$P_0$ : Presión estándar, 760 mm de mercurio o 10.000 mm de líquido de Brodie.

Como unidades de referencia para las mediciones de intercambio gaseoso se utilizan los pesos fresco y seco del material a investigar.

Pueden realizarse estudios más profundos de la respiración observando el trayecto seguido por los átomos de carbono de algunos compuestos específicos con la ayuda de  $^{14}\text{C}$ . Esta técnica se utiliza bajo dos principios: por un lado se investiga la formación de  $^{14}\text{CO}_2$  por el material bajo estudio; por otro lado se analiza la aparición y distribución del  $^{14}\text{C}$  en productos intermedios y finales. Este método puede presentar serios problemas de interpretación de los resultados obtenidos debido a procesos cíclicos, a una fijación repetida del  $^{14}\text{CO}_2$ , al intercambio isotópico, etc.

### 20.3. Glucolisis y fermentación

La glucolisis es la secuencia de reacciones que convierte la glucosa o glucosa-1-fosfato, procedente de la degradación fosforolítica del almidón, en piruvato con la producción concomitante de ATP. La glucolisis, que tiene lugar en el citoplasma celular, es la primera de las tres fases principales de la respiración; siguen a continuación el ciclo de Krebs y el proceso de transporte de electrones, mecanismos ambos localizados en la mitocondria. Bajo condiciones aerobias, el piruvato entra en la mitocondria y es oxidado completamente hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Bajo condiciones anaerobias, el piruvato puede transformarse en lactato o etanol mediante sendos procesos fermentativos, en los cuales no se produce una oxidación total del combustible, como ocurre en la respiración. Ambos procesos, glucolisis y fermentación, están estrechamente relacionados, ya que, como se puede ver en la figura 20.4, todas las reacciones de la glucolisis son parte de la fermentación. Podemos considerar que la glucolisis desempeña tres funciones importantes para el metabolismo vegetal: en primer lugar, está la formación de moléculas que pueden ser utilizadas como punto de partida para sintetizar componentes necesarios del vegetal; así, a partir del ácido fosfoenolpirúvico pueden sintetizarse aminoácidos aromáticos como fenilalanina y tirosina, que a su vez sirven como precursores de la ligni-

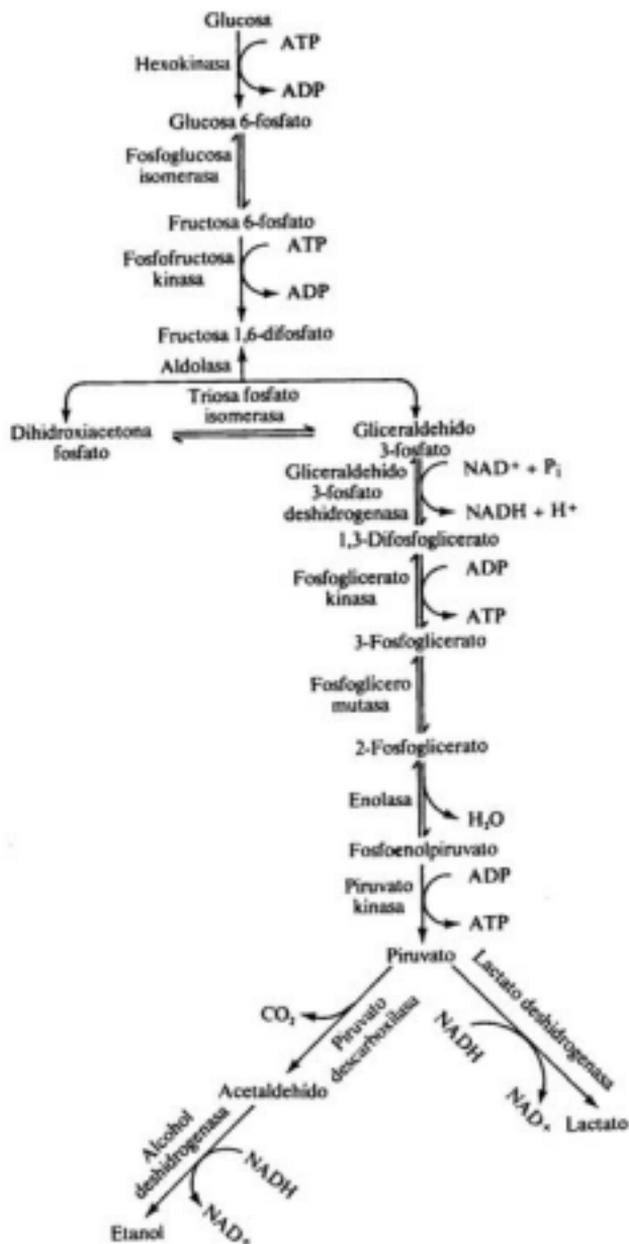


Figura 20.4.—Glucólisis y fermentación.

na (Cap. 2), a partir de las hexosas fosfatos se forman los precursores de los componentes de la pared celular, etc. En segundo lugar, durante la glucólisis se produce almacenamiento de energía en forma de ATP. En la tabla 20.1 pueden verse los pasos en los que durante la glucólisis se consume o se forma ATP, y cómo el balance final da una ganancia neta de 2 ATP. Por último, una tercera función esencial de la glucólisis es la formación de NADH durante la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato en 1-3 difosfoglicerato. Por tanto, la reacción neta de la transformación de glucosa en piruvato es:

TABLA 20.1

Consumo y producción de ATP durante la glucólisis

Glucosa $\longrightarrow$ Glucosa-6-P .....	-1 ATP
Fructosa-6-P $\longrightarrow$ Fructosa-1,6-PP .....	-1 ATP
2, 1-3 difosfoglicerato $\longrightarrow$ 2, 3 fosfoglicerato .....	+2 ATP
2, fosfoenolpiruvato $\longrightarrow$ 2, piruvato .....	+2 ATP
<b>TOTAL</b> .....	<b>+2 ATP</b>



Así, pues, se generan dos moléculas de ATP y una de NADH. Dado que el citoplasma celular contiene sólo una cantidad limitada de NAD y que la glucólisis quedaría detenida en el momento en el que el piridin nucleótido estuviera todo en forma reducida, es lógico suponer que deben existir algunos mecanismos para reoxidar el NADH formado. En condiciones aerobias el NADH penetrará en las mitocondrias y será reoxidado por el sistema transportador de electrones, produciéndose ATP, como veremos mas adelante. Bajo condiciones anaerobias, la reoxidación se realiza por las reacciones catalizadas por los enzimas alcohol y láctico deshidrogenasas. La presencia de estos dos enzimas ha sido demostrada en plantas superiores, y bajo determinadas condiciones, como la de raíces de plantas que viven en suelos encharcados, lo que hace difícil el acceso del oxígeno a la raíces, o en semillas en que las envueltas seminales son impermeables al paso de oxígeno, su actividad es bastante elevada.

La reacción neta de la fermentación alcohólica es la siguiente:



Ni el NAD<sup>+</sup> ni el NADH aparecen en esta ecuación, ya que el acetaldehído se reduce hasta etanol de tal forma que se regenera NAD<sup>+</sup> que es inmediatamente utilizado en la reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Así, pues, no se produce óxido-reducción neta en la conversión de glucosa en etanol. La reacción neta de la fermentación láctica es:



Al igual que en la fermentación alcohólica, no existe óxido-reducción neta. La producción de ATP durante la glucólisis es un acontecimiento importante, ya que va a permitir

que los organismos anaerobios completen sus ciclos biológicos a expensas exclusivamente de esta energía.

#### 20.4. Mitocondrias vegetales

Las mitocondrias son orgánulos del tamaño de una bacteria que se encuentran en el citoplasma de todas las células eucarióticas aerobias. Son los centros de la respiración celular y donde tiene lugar la mayor producción de energía en forma de ATP, para todas las necesidades celulares. La mayoría de lo que hoy conocemos sobre estructura y función de las mitocondrias, se ha adquirido gracias a estudios realizados fundamentalmente con mitocondrias animales, habiéndose aplicado estos conocimientos a mitocondrias vegetales, y aunque en muchos aspectos bioquímicos el comportamiento es similar en todos los tipos de mitocondrias, esto no quiere decir que no existan algunas diferencias notables entre mitocondrias vegetales y animales. Por ejemplo, las mitocondrias vegetales pueden oxidar el NADH exógeno debido a que la membrana externa es permeable a este piridin nucleótido (ver mas adelante). Muchas mitocondrias vegetales, son relativamente insensibles al cianuro, debido a que presentan una ruta alternativa a la normal de los citocromos para el transporte de electrones. Por otra parte, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos se encuentra localizada en mitocondrias animales, mientras que en vegetales esta ruta metabólica se encuentra en los glioxisomas.

El número de mitocondrias por célula varía, dependiendo del organismo y del tipo de célula estudiada. Así, el alga flagelada *Micromonas* posee una única mitocondria, mientras que la ameba *Chaos chaos* posee cerca de medio millón. Las células vegetales suelen poseer unas 200 mitocondrias aunque se han llegado a detectar hasta 2.000 en los elementos inmaduros del metaxilema en brotes jóvenes de maíz.

##### 20.4.1. Estructura

Aunque las mitocondrias pueden ser observadas con el microscopio óptico, no fue hasta la introducción de la microscopia electrónica cuando pudo estudiarse con detalle su estructura. En la figura 20.5 puede verse cómo la mitocondria consta de un sistema membranoso doble, con la membrana externa más o menos lisa y la interna, que sufre una serie de invaginaciones formando las llamadas crestas. Las dos membranas muestran mediante tinción positiva y observación posterior en microscopio electrónico, la clásica estructura tripartita descrita por Roberston, que es la que muestran todas las membranas biológicas. Esta estructura puede interpretarse como una bicapa lipídica con las cadenas de ácidos grasos fuertemente hidrofóbicas orientadas hacia el interior de la bicapa. Las proteínas de la membrana pueden formar interacciones flojas o fuertes con la bicapa lipídica y tales interacciones son necesarias para la funcionalidad específica de las membranas. Las que forman una interacción floja y que tendrán sus cadenas laterales hidrófilas expuestas, se encuentran en la superficie de la bicapa lipídica, son fácilmente extraíbles de la membrana, el ejemplo mejor conocido es el citocromo c. Las segundas, en las que probablemente serán las cadenas laterales hidrofóbicas las expuestas, quedan embebidas en la bicapa lipídica y son extraídas con mayor dificultad. Protei-

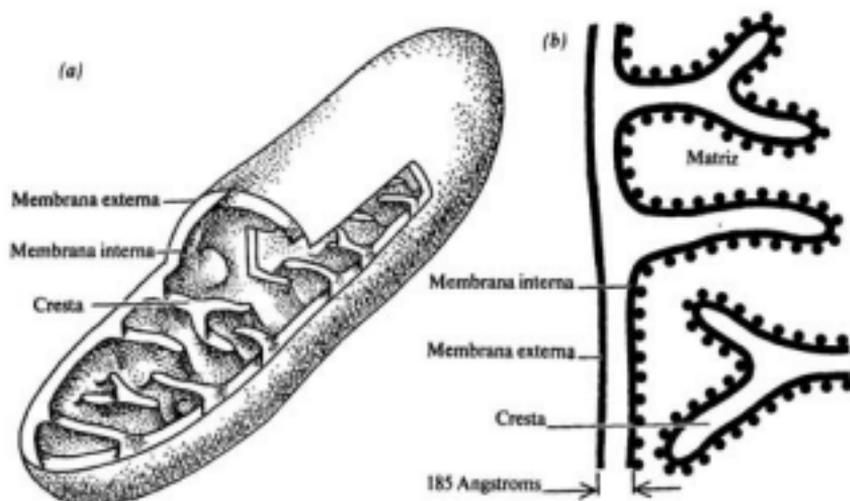


Figura 20.5.—Estructura de la mitocondria.

nas tales como los citocromos  $a$  y  $a_3$ , flavoproteínas como la NADH deshidrogenasa y succínico deshidrogenasa son buenos ejemplos de proteínas fuertemente unidas a la membrana y que penetran la bicapa lipídica.

#### 20.4.2. Propiedades y composición de las membranas

El estudio de las propiedades de las membranas externa e interna de las mitocondrias se ha visto facilitado por el desarrollo de métodos que permiten la separación de las dos membranas. Existen fundamentalmente dos métodos para separar las membranas. El primero implica un hinchamiento del orgánulo suspendido en un tampón hipotónico que provoca la ruptura de la membrana externa, mientras que la interna expande sus invaginaciones pero sin romperse. Un tratamiento posterior con sacarosa para aumentar la molaridad del medio provoca una contracción de la membrana interna que puede ser separada de la externa por un tratamiento ultrasónico suave. Por último, los dos sistemas membranosos pueden separarse por centrifugación en un gradiente de densidad. El segundo método está basado en que un tratamiento con el detergente digitonina, a baja concentración, rompe la membrana externa que se separa fácilmente de la interna. El efecto selectivo de la digitonina se cree que es debido a la interacción entre el detergente y los esteroides más abundantes en la membrana externa. En las membranas obtenidas por cualquiera de los dos métodos puede observarse, por coloración negativa, cómo la externa aparece siempre delgada y lisa, mientras que la membrana interna aparece más gruesa y cubierta por unas vesículas pedunculadas conocidas como las subunidades de la membrana interna. Cuando se descubrieron, se las consideró como el lugar donde se encontraba la cadena respiratoria; subsecuentes estudios

han demostrado que constan de una proteína de peso molecular de 360.000 que no contiene componentes de la cadena transportadora de electrones. La proteína es capaz de hidrolizar el ATP, y se considera actualmente que se trata de la enzima responsable de la síntesis del ATP que tiene lugar durante la fosforilación oxidativa. Todas las ATPasas de membrana parecen ser notablemente similares en mitocondrias, bacterias y cloroplastos. Destacan en las microfotografías electrónicas como cuerpos globulares que sobresalen de la superficie de la membrana. La parte más prominente designada como  $F_1$  (factor de acoplamiento 1) es una proteína soluble compuesta de cinco tipos de subunidades, algunas de las cuales se presentan repetidamente.  $F_1$  se engancha a la membrana por medio de otro conjunto de proteínas designado como  $F_0$  (factor de acoplamiento 0) incluido en la membrana y que parece que la atraviesa totalmente.  $F_1$  puede desprenderse fácilmente de la membrana, pero  $F_0$  sólo queda libre cuando la membrana es destruida mediante detergentes. El sistema completo enzimático se denomina complejo  $F_1F_0$ .

Los dos sistemas de membranas no sólo difieren en sus propiedades morfológicas, sino también en sus propiedades físicas y químicas. Estudios de permeabilidad iónica de las mitocondrias han demostrado que la membrana interna de la mitocondria presenta una permeabilidad muy limitada para la mayoría de las sustancias, con la excepción de moléculas no cargadas y de pesos moleculares inferiores a 150. La mayoría de las moléculas de interés fisiológico están ionizadas y tienen que atravesar la membrana con la ayuda de transportadores específicos. Por el contrario, la membrana externa es más permeable, permitiendo el paso de sustancias tanto cargadas como no cargadas, con pesos moleculares por debajo de 10.000. De esta forma, la membrana externa permitirá que la concentración de moléculas de bajo peso molecular sea igual en el citoplasma que en el espacio intermembranal, mientras que retendrá a los enzimas de peso molecular superior, dentro de sus respectivos compartimentos. Esta propiedad de la membrana externa es de gran importancia para determinar el tipo de interacciones que se establecen entre las mitocondrias y el citoplasma. Otra diferencia física entre las dos membranas es su densidad, ya que la membrana externa tiene una densidad de 1,13 mientras que en la interna es de 1,21.

La composición química de los dos sistemas membranosos también es diferente. En cuanto a la proteína, se estima que el 4 por 100 del total se encuentra en la membrana externa, el 21 por 100 en la interna y el 67 por 100 en la matriz. Aproximadamente el 27 por 100 de peso seco de la mitocondria son lípidos, de los cuales más del 90 por 100 están en forma de fosfolípidos. Los fosfolípidos principales son: fosfatidil-colina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol. La proporción de este último es casi insignificante en la membrana externa. Sin embargo, la concentración de fosfatidilinositol y esteroides es más abundante en la membrana externa.

#### 20.4.3. Aislamiento y purificación

El procedimiento básico para el aislamiento de mitocondrias parte de la homogenización del material en soluciones isotónicas frías de manitol o sacarosa que contengan un agente reductor suave, EDTA y albúmina de suero bovino. El agente reductor se requiere para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos; el EDTA, como agente

quelante que es, elimina cualquier ion metálico pesado que pueda estar presente, y la albúmina de suero bovino se combina con los ácidos grasos que aparecen después de la rotura celular. Este medio de homogenización suele estar tamponado a pH 7,2. Una vez homogenizado el tejido, se filtra a través de varias capas de gasa y la suspensión resultante se somete a una centrifugación diferencial. La fracción mitocondrial después de lavada varias veces en el medio isotónico se suspende en un pequeño volumen de este medio isotónico. Esta fracción de mitocondrias lavadas se somete, para su purificación, a un gradiente discontinuo de sacarosa preparado en un tubo de centrifuga mediante la deposición de estratos de sacarosa de diferente molaridad, en la parte superior del gradiente se coloca la suspensión de mitocondrias lavadas; después de centrifugar, las mitocondrias purificadas se depositarán en el estrato de sacarosa que corresponde a su densidad (Fig. 20.6).

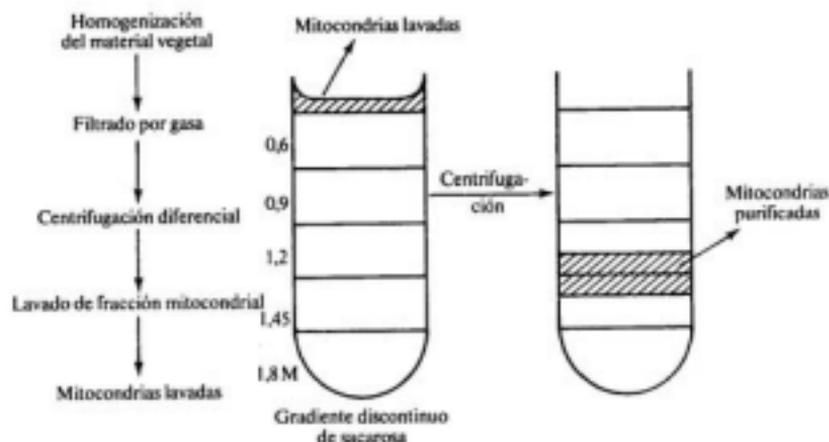


Figura 20.6.—Aislamiento y purificación de mitocondrias.

#### 20.4.4. Determinación de la actividad respiratoria en mitocondrias aisladas

La actividad respiratoria de las mitocondrias aisladas, medida como su capacidad para consumir oxígeno, se determina generalmente mediante la utilización de un sensor polarográfico de oxígeno tipo Clark. Todo el sistema consta, en primer lugar, de una membrana de un material especial ajustada al extremo del sensor y que lo aísla del medio ambiente. Esta membrana es permeable a los gases y permite que éstos entren en el interior del sensor. Este sensor funciona cuando se le aplica un determinado voltaje polarizante; en este momento, el oxígeno que penetró a través de la membrana reacciona con un cátodo de platino provocando un flujo de corriente entre este cátodo y un ánodo de plata. Este flujo de corriente que se genera es proporcional a la cantidad de oxígeno a la que se encuentra expuesta la membrana. Por tanto, lo que en realidad está

midiendo el sensor es la presión de oxígeno; como el oxígeno es consumido inmediatamente en el cátodo se asume que la presión de oxígeno en el interior de la membrana es cero, por lo que puede considerarse que la fuerza que provoca la difusión de oxígeno a través de la membrana es proporcional a la presión absoluta del oxígeno fuera de la

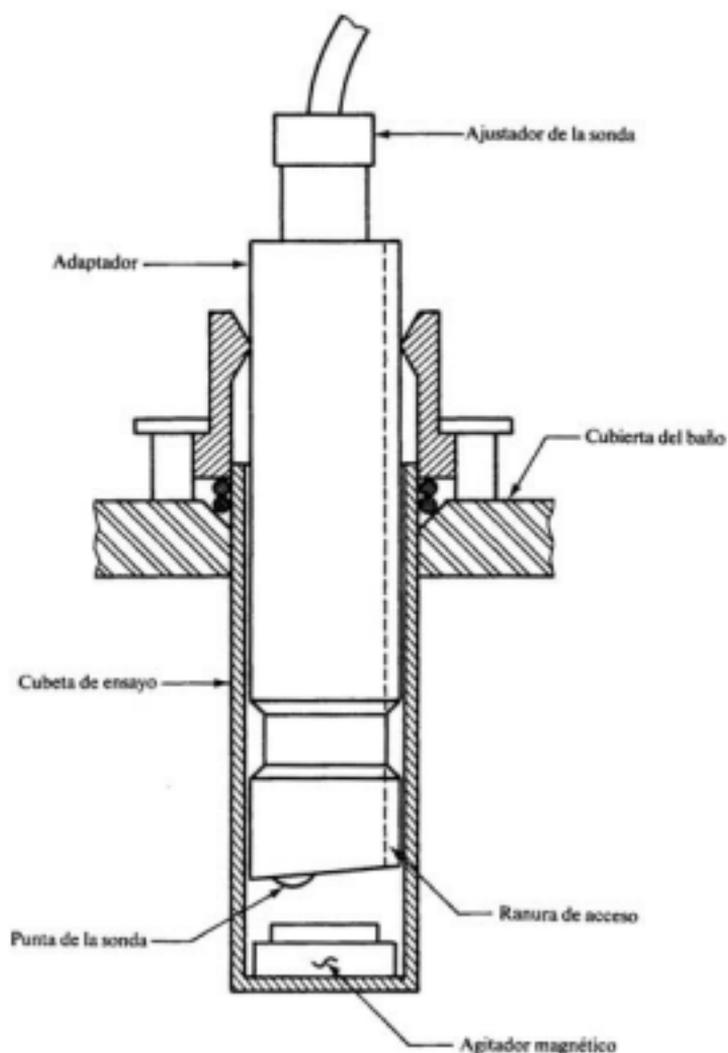


Figura 20.7.—Esquema del sensor utilizado para medir el consumo de oxígeno.

membrana. Si la presión de oxígeno aumenta, mayor será la cantidad de este gas que difunda a través de la membrana y mayor será el flujo de corriente que se genere en el sistema. La difusión a través de la membrana es directamente proporcional a la presión, y la relación oxígeno-flujo de corriente es estequiométrica, es decir, existe una relación lineal entre presión externa de oxígeno y flujo de corriente. El sensor se ajusta mediante un adaptador en una cubeta que contiene la suspensión de mitocondrias y una pastilla de agitación magnética para mantener homogénea la suspensión. La temperatura se mantiene constante mediante un baño de circulación externa (Fig. 20.7). Los sustratos, ADP, inhibidores, etc., se añaden a la suspensión a través de una pequeña ranura que queda entre el sensor y la cubeta. Los resultados se expresan en  $\mu$  moles de oxígeno consumido por minuto y por mg de proteína mitocondrial. La cantidad de oxígeno consumida se calcula a partir del trazado desarrollado sobre el papel del registrador.

Una suspensión de mitocondrias, en un medio convenientemente tamponado e isotónico, y en presencia de un sustrato respiratorio adecuado, presenta una determinada velocidad en el consumo de oxígeno. La adición de ADP causa un inmediato aumento en la velocidad. La duración de este incremento depende de la cantidad de

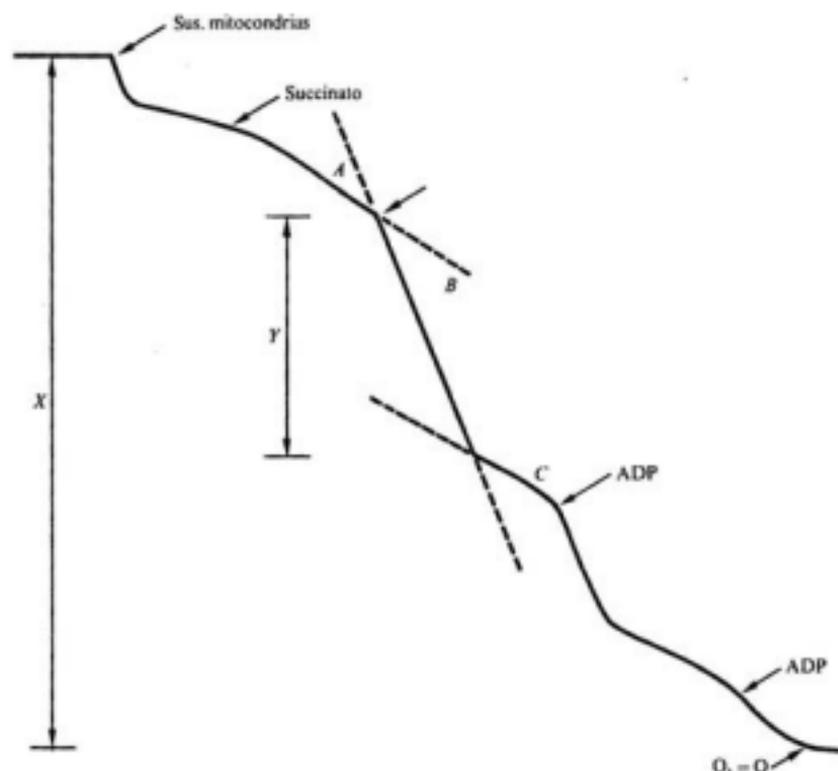


Figura 20.8.—Trazado descrito en el papel del registrador conectado al sensor polarográfico de oxígeno.

ADP añadido, ya que la concentración de oxígeno utilizado es proporcional a la cantidad de ADP fosforilado a ATP. La relación ADP/O se puede calcular directamente a partir del trazado descrito en el papel registrador (Fig. 20.8). La distancia *Y* se determina contando el número de divisiones que van desde el punto de intersección de las líneas *A-B* y de las líneas *B-C*. La distancia *X* (determinada contando el número de divisiones del papel del registrador) representa el contenido total de oxígeno en el medio de reacción. Con estos datos se puede calcular la cantidad de oxígeno consumido durante el período estimulado por el ADP, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{O}_2 \text{ contenido en el medio de reacción}}{X \text{ divisiones}} \cdot Y \cdot 2 = \text{microátomos de O}_2 \text{ consumido}$$

$$\text{Relación } \frac{\text{ADP}}{\text{O}} = \frac{\text{micromoles de ADP añadido}}{\text{microátomos de O}_2 \text{ consumido}}$$

El control respiratorio puede definirse como la relación existente entre la velocidad respiratoria en presencia de ADP (estado 3), que en la figura 20.8 sería la distancia *Y* y la velocidad que se obtiene cuando el ADP se agota (estado 4), que en la figura 20.8 correspondería a la zona *C* del trazado. En la tabla 20.2 se expresan, de acuerdo con Bonner, los diferentes términos que se utilizan para denominar los diferentes estados de la mitocondria.

TABLA 20.2

Diferentes estados de la mitocondria (según W. D. Bonner Jr.)

Estado	O <sub>2</sub>	ADP	Sustrato	Velocidad respiratoria	Factor limitante
2	Presente	Ausente	Ausente	Muy lenta	Sustrato
Sustrato	Presente	Ausente	Presente	Bastante lenta	Desconocido
3	Presente	Presente	Presente	Muy rápida	Transp. elect.
4	Presente	Ausente	Presente	Lenta	ADP
5	Ausente	Presente	Presente	Nula	Oxígeno

### 20.5. Ciclo de Krebs

Este ciclo debe su nombre al bioquímico inglés H. A. Krebs, quien en 1937 propuso esta secuencia cíclica de reacciones para explicar la degradación del piruvato. Se denomina también ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbóxicos y se encuentra localizado en el interior de las mitocondrias.

La descarboxilación oxidativa del piruvato, producido en la glucólisis, para formar acetil CoA y que tiene lugar en la matriz mitocondrial, es el eslabón entre la glucólisis y el ciclo de Krebs



La reacción está catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa.

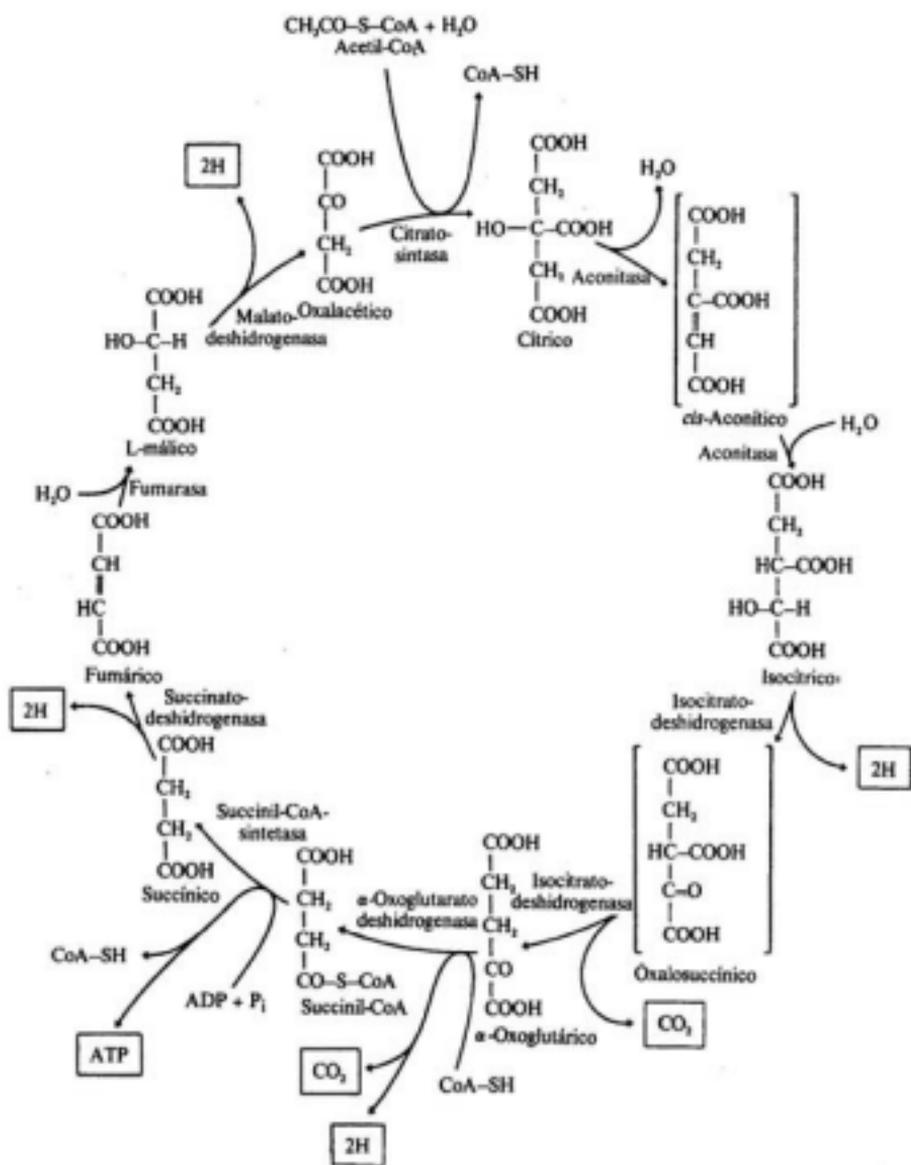
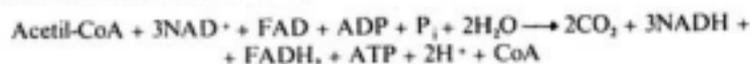


Figura 20.9.—Ciclo de Krebs (Lehninger, A.: *Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., Nueva York).

En el ciclo, tal como se muestra en la figura 20.9, un compuesto de cuatro átomos de carbono, el oxalacetato se condensa con el acetilo para dar lugar a un ácido tricarbóxico de seis carbonos, el citrato. Mediante la descarboxilación oxidativa de un isómero del citrato se forma un compuesto de cinco átomos de carbono, el  $\alpha$ -cetoglutarato que vuelve a descarboxilarse oxidativamente para dar un ácido de cuatro átomos de carbono, el succinato, que regenerará de nuevo al oxalacetato. De esta forma, dos átomos de carbono entran en el ciclo como una unidad acetilo y dos átomos dejan el ciclo como dos moléculas de  $\text{CO}_2$ . Dado que el  $\text{CO}_2$  está más oxidado que el grupo acetilo, deben existir algunas reacciones de óxido-reducción en el ciclo. De hecho, existen cuatro de tales reacciones. Tres iones hidruro, seis electrones, por tanto, son transferidos al  $\text{NAD}^+$  y un par de átomos de hidrógeno (dos electrones) al FAD que producirán un total de once moléculas de ATP en la cadena de transporte de electrones. Además, se forma un enlace fosfato de alta energía en cada vuelta del ciclo. La reacción neta es:



Considerando que por cada molécula de glucosa se forman dos de piruvato y, por consiguiente, dos de acetil-CoA, habría que multiplicar esta reacción y la anterior catalizada por la piruvato deshidrogenasa, por dos.

Como resumen final, podemos considerar que el ciclo de Krebs cumple tres funciones principales en plantas: producción de donadores de electrones como el NADH y el  $\text{FADH}_2$  que, al ser posteriormente oxidados en la cadena transportadora de electrones, darán lugar a la formación de una considerable cantidad de energía. Síntesis directa de una cantidad limitada de ATP y por último formación de esqueletos carbonados que pueden ser utilizados en la síntesis de aminoácidos, mediante su aminación correspondiente con el amoníaco formado como producto final en la reducción de los nitratos (Cap. 18).

## 20.6. Organización y operación de la cadena de transporte de electrones

Todos los equivalentes de reducción originados en la glucólisis o ciclo de Krebs van a ser oxidados en la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Esta cadena consta de una serie de transportadores de electrones que, mediante reacciones de óxido-reducción, van a llevar los electrones hasta el último aceptor de los mismos, el  $\text{O}_2$ , formándose agua como producto final. El transporte de electrones tiene lugar a favor de un gradiente electroquímico, es decir, los electrones son cedidos por transportadores con potencial redox mas elevado. En este transporte a favor de gradiente electroquímico, tiene lugar una considerable liberación de energía, parte de la cual quedará atrapada en los enlaces fosfato mediante la correspondiente fosforilación del ADP. Los principales componentes de la cadena de transporte de electrones se han identificado, bien por su características espectrales, bien por reacciones características. En la figura 20.10 se representa la organización de la cadena respiratoria, y podemos ver que está formada por flavoproteínas, proteínas conteniendo hierro y azufre similares a la ferredoxina, ubiquinona, citocromos tipo *b*, citocromos tipo *c* y citocromos tipo *a*.

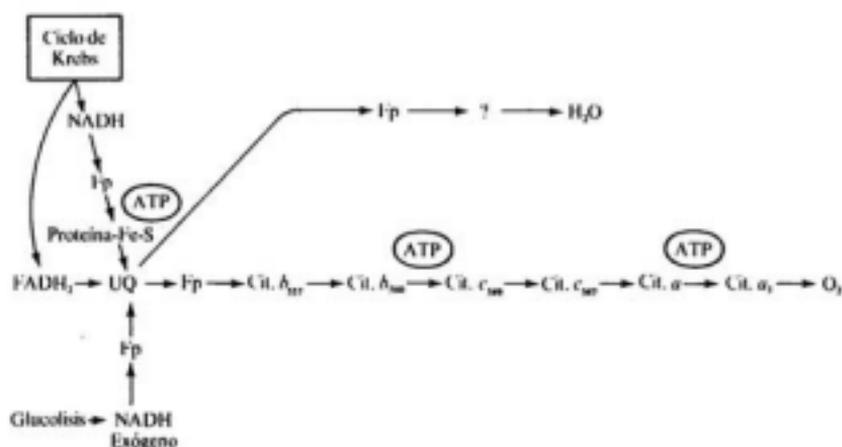


Figura 20.10.—Representación de la cadena de transporte de electrones y ruta alternativa residente al cianuro, en mitocondrias vegetales.

Las determinaciones cuantitativas de cada uno de los componentes de la cadena de transporte señalan que todos ellos aparecen en proporciones casi constantes, lo que se toma como indicación de que todos los componentes están asociados estructuralmente, formando algún tipo de unidad funcional. Como resultado de los intentos realizados para aislar tal unidad funcional, se han conseguido aislar cuatro complejos separados, tratando las membranas internas de la mitocondria con desoxicolato, cloruro potásico, y sulfato amónico. Cada uno de estos complejos consta de dos o más componentes de la cadena respiratoria y una cantidad considerable de lípidos. Ha sido imposible separar muchos componentes de la cadena respiratoria, de elementos estructurales de la membrana, que parecen ser necesarios para mantener a los componentes de la cadena, en la configuración correcta que les permite reaccionar a unos con otros. En la figura 20.11 pueden verse esquematizados los cuatro complejos que se aíslan siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. La mayoría de la ubiquinona y del citocromo *c* apare-

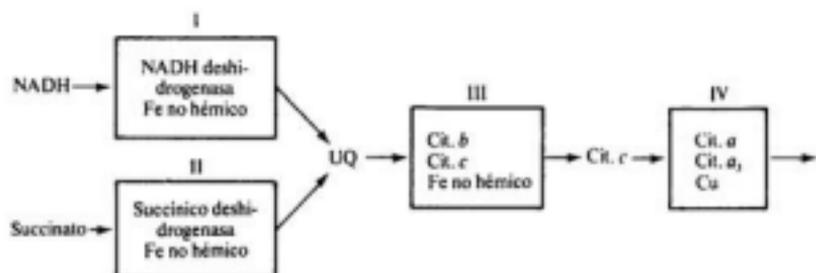


Figura 20.11.—Posible ordenación de los cuatro complejos aislados de la membrana interna mitocondrial. I: NADH-UQ reductasa. II: Succinato-UQ reductasa. III: UQ-citocromo *c* reductasa. IV: Citocromo *c* oxidasa.

cen fuera de estas unidades estructurales y podrían actuar como componentes móviles encargados de transportar electrones entre los cuatro complejos. Si los cuatro complejos se mezclan en proporciones estequiométricas con ubiquinona y citocromo *c* y se elimina el desoxicolato por diálisis, es posible la reconstrucción de una cadena funcional, lo que no se consigue, sin embargo, es el acoplamiento a la formación de ATP.

Recientemente se ha sugerido la posible existencia en mitocondrias vegetales de tres «pools» de ubiquinona con la posibilidad de distintas conexiones entre ellos y que serían responsables de toda una serie de situaciones distintas observadas en células vegetales en relación con la organización del sistema de transporte de electrones (Fig. 20.12a). Las conexiones 1 y 2 estarían siempre presentes en mitocondrias vegetales y son responsables de las oxidaciones de malato, NADH y succinato sensibles al cianuro y la antimicina. También serían responsables de la oxidación del malato sensible a la rotenona y de la oxidación del NADH insensible a la antimicina. Existe aun otra vía para la oxidación del NADH que sobrepasa el lugar sensible a la antimicina (ver 20.7). Ésta sería una situación general que se da en todas las mitocondrias sensibles al cianuro. Cuando, además, existen las conexiones 3 y 4, todas las oxidaciones de sustratos muestran varios grados de resistencia al cianuro, ya que los electrones pueden ser canalizados a través de la ruta alternativa.

Contrariamente a lo que ocurre en mitocondrias animales, las vegetales muestran

Membrana externa

Espacio intermembranal

Membrana interna

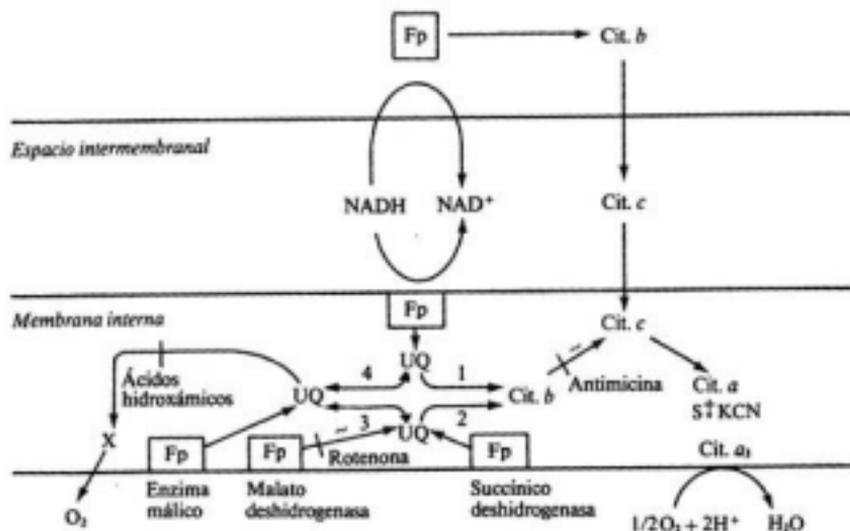


Figura 20.12a.—Organización de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias vegetales. Posible localización de los distintos «pools» de ubiquinona (tomado de P. Rustin, F. Moreau y C. Lance: «Plant Physiol.», 66: 457-462, 1980).

el hecho único de ser capaces de oxidar el malato y el NADH de formas distintas, reduciendo el número de lugares de fosforilación (evitando pasar por los lugares de fosforilación). De esta forma son capaces de oxidar malato y NADH sin aumentar el potencial de fosfato en la célula. Esto puede ser de gran utilidad en plantas que tengan necesidad de eliminar un exceso de poder reductor (intensidad glicolítica elevada) o utilizar grandes cantidades de malato en periodos cortos de tiempo (plantas CAM).

## 20.7. Organización de los sistemas de NADH-deshidrogenasa

La capacidad de las mitocondrias vegetales para oxidar el NADH exógeno se creyó, en un principio, que era debida a la entrada de este NADH exógeno en la matriz mitocondrial y su consiguiente oxidación por las deshidrogenasas internas. Sin embargo, la evidencia experimental acumulada durante los últimos años ha demostrado que el NADH exógeno y el endógeno son oxidados por sistemas de NADH deshidrogenasa diferentes. Así, se ha observado que el NADH exógeno es oxidado más rápidamente por mitocondrias intactas y que el cociente P/O es superior con NADH endógeno. Este resultado, junto con el hecho observado de que compuestos tales como el amital, rotenona y piericidina A que bloquean la cadena transportadora de electrones, inmediatamente antes del primer lugar de formación de ATP, inhiben la oxidación del NADH endógeno pero no tienen ningún efecto en la oxidación del NADH exógeno, ha dado lugar a la sugerencia de que el NADH exógeno es oxidado por una deshidrogenasa que envía los electrones a la cadena transportadora después del primer lugar de formación de ATP. Dado que la oxidación, tanto del NADH exógeno como endógeno es igualmente sensible a la antimicina A que bloquea la cadena respiratoria a nivel del segundo lugar de formación de ATP, se supone que ambos sistemas comparten una ruta común desde la ubiquinona al oxígeno.

Mediante la utilización de algunos productos, como el ferricianuro potásico, que no puede atravesar la membrana interna mitocondrial y, por tanto, sólo puede aceptar electrones a partir de componentes situados por fuera de la superficie de la membrana interna, y mediante el aislamiento de la membrana externa, ha sido posible localizar en mitocondrias vegetales dos sistemas de NADH deshidrogenasa capaces de oxidar el NADH exógeno. Uno de ellos localizado en la membrana externa (Fig. 20.12b) y que normalmente no suministra equivalentes reductores a la cadena respiratoria, salvo que se añade también citocromo *c* exógeno; en este caso, la deshidrogenasa catalizará una citocromo *c* NADH reductasa, resistente a la antimicina A por medio de una flavoproteína y citocromo  $b_{558}$ . Este sistema presenta una relación ADP/O de uno. La mayoría del NADH exógeno es oxidado por un sistema asociado con la membrana interna mitocondrial (Fig. 20.12) que parece ceder los electrones a la ubiquinona, ya que es resistente a la piericidina y sensible a la antimicina A y presenta una relación ADP/O de dos.

Por lo que respecta a la oxidación del NADH endógeno, toda la evidencia parece indicar que este es oxidado por un sistema sensible a la piericidina y la rotenona con una relación ADP/O de tres (Fig. 20.12b). Sin embargo, también se ha encontrado en mitocondrias vegetales un sistema de NADH deshidrogenasa que oxida el NADH endógeno y que presenta una relación ADP/O de dos (Fig. 20.12b) ya que es capaz de ceder los electrones directamente a la ubiquinona. No se conoce muy bien por ahora,

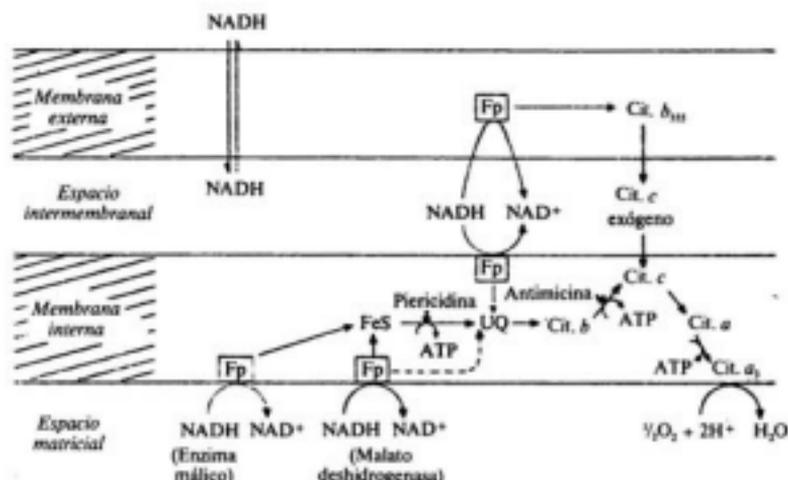


Figura 20.12b.—Sistemas de NADH-deshidrogenasa en mitocondrias vegetales (según J. M. Palmer).

cuál puede ser el posible papel fisiológico de todos estos sistemas de NADH deshidrogenasa. En el caso de los sistemas externos, pueden desempeñar algún papel en la oxidación del NADH presente en el citoplasma. Los sistemas internos parecen estar asociados con las diferentes deshidrogenasas dependientes de NAD.

## 20.8. Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa es el proceso por el que se forma ATP, cuando se transfieren los electrones desde el NADH o FADH<sub>2</sub> al O<sub>2</sub> mediante una serie de transportadores de electrones. Fue Lehninger quien, entre los años de 1949 y 1951, aportó las pruebas experimentales de que el transporte electrónico desde el NADH hasta el oxígeno es la fuente directa de la energía utilizada para la fosforilación acoplada del ADP. Incubando anaeróbicamente NADH puro con mitocondrias tratadas con agua (necesario para hacer a las mitocondrias permeables al NADH) fosfato y ADP en ausencia de intermediarios del ciclo de Krebs, el NADH se oxidaba a NAD<sup>+</sup> a expensas del oxígeno molecular y simultáneamente se formaban tres moléculas de ATP a partir de ADP y fosfato.

La fuerza directriz de la fosforilación oxidativa es el potencial de transferencia de electrones del NADH. El cambio en el potencial redox entre el NAD<sup>+</sup> y el oxígeno molecular es de 1,14 voltios ya que el potencial redox del NAD<sup>+</sup> es de -0,32 voltios y el del oxígeno de +0,82 voltios. La energía libre de oxidación que se libera en la transferencia de 2e desde el NADH al O<sub>2</sub> viene dada por:

$$G^{\circ} = -2 \times 23,062 \times 1,14 = -52,6 \text{ kcal/mol}$$

Dado que para la formación de una molécula de ATP se requieren unas 7,3 kcal/mol, la cantidad total de toda la energía liberada en la transferencia de  $2e$  que queda atrapada en enlaces fosfato ricos en energía será de:  $3 \times 7,3 = +21,9$  kcal/mol, por lo que el rendimiento será alrededor del 42 por 100.

### 20.8.1. Lugares de formación de ATP

Acabamos de ver, cómo durante el transporte de electrones tiene lugar una fosforilación acoplada al mismo que produce tres moléculas de ATP. Durante los últimos años se ha realizado una gran cantidad de trabajo para tratar de localizar estos tres puntos de formación de ATP. El lugar 1 parece estar entre el NADH y la ubiquinona; el lugar 2 entre el complejo de citocromo *b* y citocromo *c* y el tercer lugar entre el citocromo *c* y el oxígeno. Estos sitios han sido identificados experimentalmente por varios procedimientos:

- a) *Comparación del rendimiento de ATP por la oxidación de varios sustratos.* La oxidación del NADH endógeno produce 3 ATP mientras que la oxidación del succinato produce sólo 2 ATP, ya que los electrones del  $FADH_2$  entran en la cadena respiratoria por la ubiquinona, que está a un nivel de energía mas bajo que el lugar primario de fosforilación. Cuando se utiliza el sustrato artificial ascorbato, solamente se forma 1 ATP, ya que los electrones entran a nivel del citocromo *c* que está a un nivel de energía mas bajo que el lugar 2 de fosforilación. Las relaciones P/O para el NADH, succinato y ascorbato serán de 3, 2, 1, respectivamente.

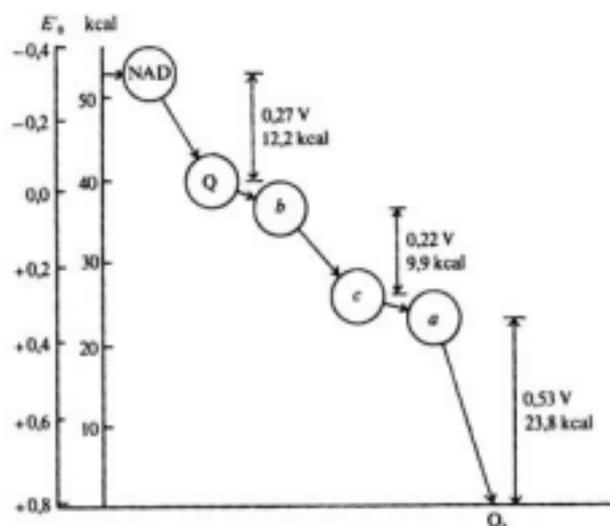


Figura 20.13.—Disminución de la energía libre en la cadena de transporte de electrones.

- b) *Cálculos termodinámicos.* La figura 20.13 muestra que existen en la cadena respiratoria tres zonas en las que se producen descensos relativamente grandes de energía libre, cada uno de los cuales es lo suficientemente importante, al menos teóricamente, como para aportar la energía necesaria para la formación de ATP. Los descensos de energía libre de otras reacciones de transferencia electrónica parecen ser demasiado pequeños para mantener la síntesis de ATP bajo condiciones estándar.
- c) *Inhibición específica del flujo de electrones.* La rotenona, piericidina y amital, inhiben específicamente la transferencia de electrones desde el NADH deshidrogenasa a la ubiquinona, lo cual impide la síntesis de ATP en el lugar 1. Por el contrario, estos inhibidores no inhiben la oxidación del succinato puesto que los electrones de este sustrato entran en la cadena por la ubiquinona. La antimicina A inhibe el flujo de electrones entre el complejo de citocromo *b* y el citocromo  $c_{540}$ , lo que previene la síntesis de ATP en el lugar 2. Este bloqueo puede sobrepasarse por la adición de ascorbato que reduce directamente al citocromo *c*, con lo que los electrones fluyen entonces desde el citocromo *c* hasta el oxígeno, con la síntesis correspondiente de ATP en el lugar 3. Por último, el flujo de electrones puede bloquearse entre los citocromos *a* y  $a_3$ , y el oxígeno por el cianuro y la azida, inhibiendo la fosforilación en el lugar 3.

### 20.8.2. Mecanismo de la fosforilación oxidativa

A pesar de los muchos trabajos realizados durante los últimos 25 años, no se tiene aún una imagen molecular detallada del mecanismo por el que la energía de óxido-reducción del transporte electrónico se convierte en la energía del enlace fosfato del ATP. Tres son las hipótesis que han obtenido una mayor atención: la del *acoplamiento químico*, la del *acoplamiento conformacional* y la del *acoplamiento quimiosmótico*. De los aspectos teóricos de las tres hipótesis ya se escribió ampliamente en el capítulo 13, por lo que no insistiremos de nuevo sobre ellos. Nos centraremos exclusivamente en la hipótesis quimiosmótica que es la que en el momento actual goza de una mayor aceptación. La hipótesis quimiosmótica, propone que el acontecimiento primario conservador de energía es el movimiento de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Esta membrana debe hallarse intacta en forma de una vesícula continua cerrada para que se realice la fosforilación oxidativa. Así, el gradiente de protones resultante y el potencial de membrana dirigen la síntesis de ATP. Una característica especial de la hipótesis quimiosmótica, es la de que los transportadores de electrones en la cadena respiratoria deben estar organizados vectorialmente, es decir, que están orientados con respecto a las dos caras de la membrana interna mitocondrial, de tal forma que el flujo electrónico a través de la cadena respiratoria da, como resultado, la liberación unidireccional de  $H^+$ , quedando acumulados los protones en la cara exterior de la membrana interna que, en consecuencia, quedará cargada positivamente (Fig. 20.14). La energía libre almacenada en tal gradiente es una función de la concentración relativa de  $H^+$  a través de la membrana y se le denomina fuerza motora de protones. Hoy en día, se considera que 2 iones  $H^+$  son bombeados fuera de la mitocondria por cada par de electro-

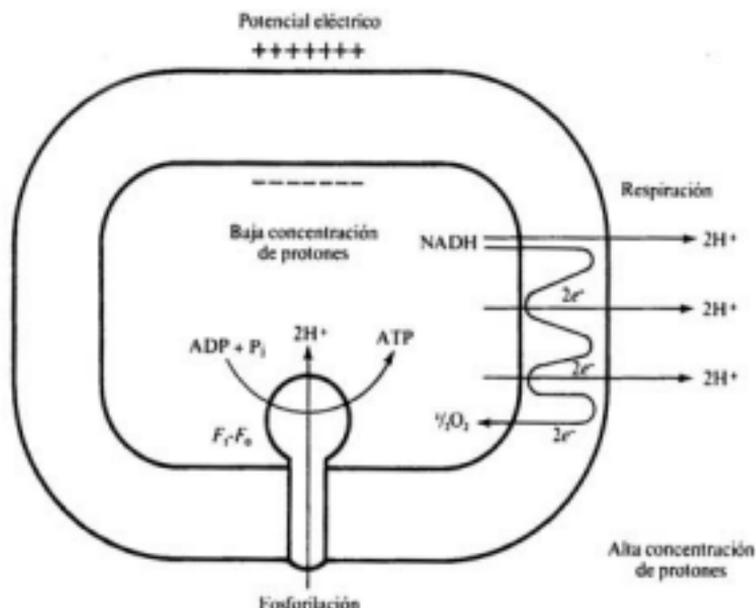


Figura 20.14.—Esquema de la hipótesis quimiosmótica tal como se supone que funciona en mitocondrias (según P. C. Hinkle y R. E. McCarty, «Investigación y Ciencia», mayo 1978).

nes que pasan a través de cada centro conservador de energía, lo cual quiere decir que por cada par de electrones que son transportados desde el NADH al  $O_2$  saldrán fuera de la mitocondria 6 iones  $H^+$ . En la figura 20.15 se representa un esquema hipotético pero basado en resultados experimentales sobre la posible localización de los componentes de la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial. Según este esquema, el NADH cede dos electrones y un protón al flavin mononucleótido (FMN), otro protón es captado del medio interno, de tal manera que la forma reducida de la molécula  $FMNH_2$  tiene dos átomos de hidrógeno. Los protones son expulsados, y los electrones retornan a la superficie interna de la membrana a través de una proteína con azufre y hierro. Posteriormente, los electrones son cedidos a dos moléculas de ubiquinona que adquieren un protón y da lugar a la forma semiquinona ( $QH^{\cdot}$ ). A diferencia de los otros componentes de la cadena respiratoria, tal como vimos en la figura 20.11, la ubiquinona es un componente móvil que puede transportar electrones entre los complejos estables. Por un mecanismo aún desconocido pero que puede implicar la captación de dos electrones procedentes del citocromo *b* y de dos protones procedentes del interior de la mitocondria, se forma la hidroquinona ( $QH_2$ ). Cada hidroquinona cede un electrón al citocromo  $c_{550}$  y libera al exterior el protón correspondiente. Los dos electrones restantes son devueltos al ciclo por medio del citocromo *b* y se liberan los dos protones restantes. Por último los dos electrones cedidos al citocromo *c*, atraviesan los citocromos  $c_{540}$ , citocromo *a* y citocromo  $a_3$  hasta alcanzar el oxígeno, que con dos protones capturados

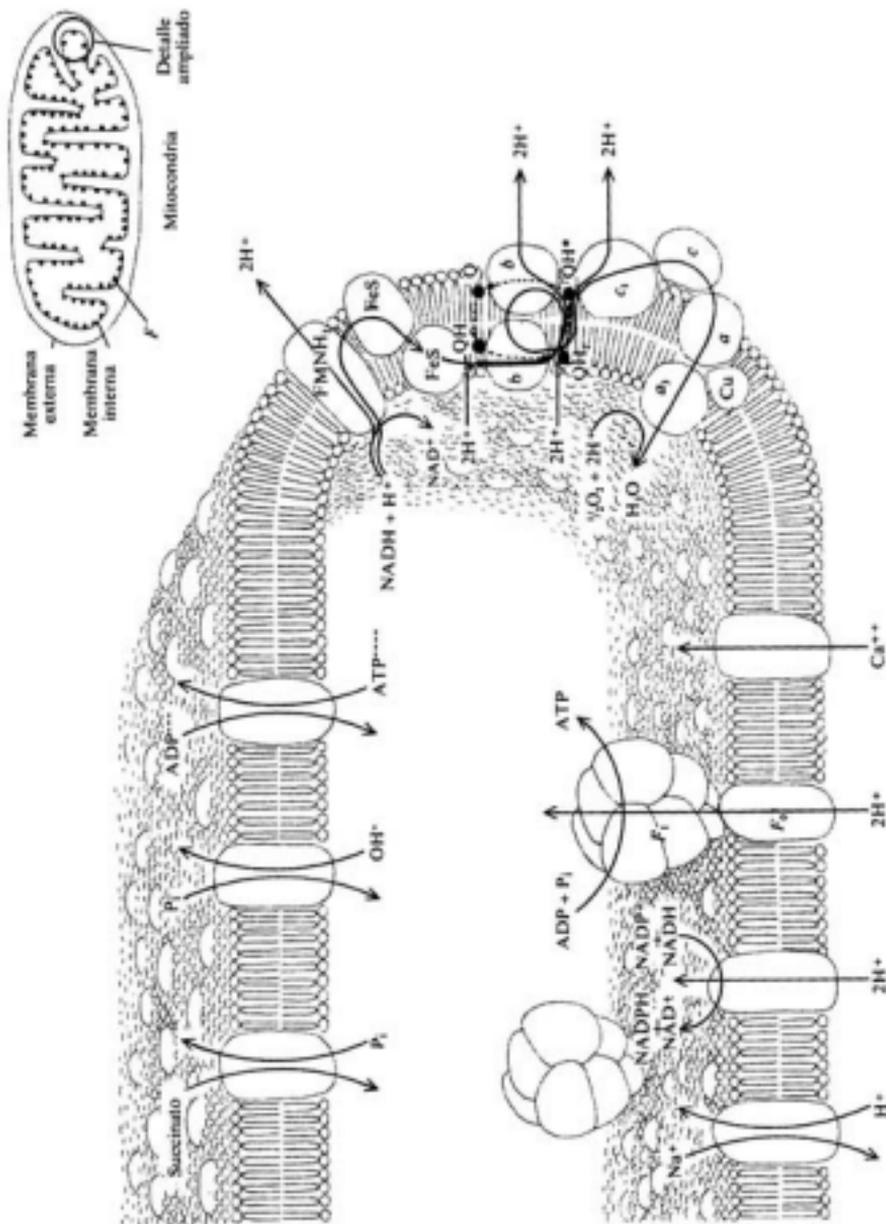


Figura 20.15.—Reconstrucción de la membrana de la mitocondria y situación hipotética de los distintos transportadores en la misma (según P. C. Hinkle y R. E. McCarty, «Investigación y Ciencias», mayo 1978).

del medio interno de la mitocondria se reduce a agua. El transporte de protones a través de la membrana se completa con el complejo  $F_1-F_0$ . En las mitocondrias, se orienta de forma que las prominencias sobresalgan hacia la matriz interior de la superficie interna de la membrana. Está comprobado que por cada dos protones que penetran, siguiendo un gradiente de concentración, se combina una molécula de ADP con fosfato inorgánico, formando ATP y  $H_2O$ . El  $OH^-$  de este agua es atraído hacia la región rica en  $H^+$ , mientras que el  $H^+$  del agua es atraído hacia la región de pH elevado en la matriz. Esta eliminación de agua es la que permite que tenga lugar la síntesis de ATP. Esta reacción es reversible y, en circunstancias apropiadas, el complejo  $F_1-F_0$  puede disociar moléculas de ATP y utilizar la energía desprendida para bombear protones hacia el exterior de la mitocondria.

No se conoce el mecanismo de síntesis de ATP en los locus activo del complejo  $F_1-F_0$ . Se han propuesto dos hipótesis, de las cuales ya hablamos en el capítulo 13 al estudiar el mecanismo de la fotofosforilación (Fig. 13.7). Estas hipótesis son las de la protonación o método directo propuesto por Mitchell, o el de los cambios inducidos por protones en la conformación proteica en las proximidades del locus activo. Dado que los mecanismos teóricos de estas dos hipótesis fueron tratados en el capítulo 13, no volveremos a insistir sobre ellos y les recomendamos lean lo expuesto en aquel capítulo.

## 20.9. Rendimiento energético del proceso respiratorio

Una vez conocido el mecanismo de la glucólisis, ciclo de Krebs y cadena de transporte de electrones, podemos calcular cuántos ATP se forman en la oxidación completa de la glucosa. La reacción total es la siguiente:



La relación P/O es de tres, puesto que se forman 36ATP y se consume 12 átomos de oxígeno. Si comparamos esta ecuación con la general que expusimos en la introducción del tema, vemos que hay una diferencia de 36 moléculas de agua que son las que se forman al sintetizarse las 36 moléculas de ATP. De estas 36 moléculas de ATP, 32 se formarán por fosforilación oxidativa. En la tabla 20.3 podemos ver un esquema del rendimiento energético de la respiración celular.

La eficiencia total de la generación de ATP es alta, ya que la oxidación de la molécula de glucosa produce 686 kcal. y la energía libre almacenada en 36ATP es de 263 kcal. Por tanto, la eficiencia termodinámica de la formación de ATP a partir de la glucosa es del 38 por 100 bajo condiciones estándar.

## 20.10 Respiración resistente al cianuro

Una diferencia importante entre mitocondrias animales y vegetales, es que estas últimas pueden poseer dos rutas separadas para el transporte de electrones, la que podemos considerar normal y que acabamos de estudiar y otra ruta alternativa, caracterizada por su parcial o total insesibilidad al cianuro. Durante los últimos años se han

TABLA 20.3

Rendimiento energético de la respiración celular

Reacción implicada	ATP producido/ molécula de glucosa
<i>Glucólisis (citoplasma)</i>	
Fosforilación de la glucosa .....	- 1
Fosforilación de la fructosa-6-fosfato .....	- 1
Defosforilación de 2 moléculas de 1-3, DPG .....	+ 2
Defosforilación de 2 moléculas de fosfoenolpiruvato .....	+ 2
<i>Ciclo de Krebs (mitocondria)</i>	
Paso de 2 moléculas de succinil-CoA $\rightarrow$ 2-ácido succínico .....	+ 2
<i>Fosforilación oxidativa (mitocondria)</i>	
2 NADH formados en el citoplasma procedentes de la glucólisis (el NADH exógeno produce una relación P/O de dos) .....	+ 4
2 NADH en la decarboxilación oxidativa del piruvato .....	+ 6
2 FADH <sub>2</sub> en el ciclo de Krebs .....	+ 4
6 NADH en el ciclo de Krebs .....	+ 18
TOTAL .....	+ 36

realizado gran cantidad de estudios para tratar de aclarar el punto de ramificación de la ruta alternativa, la naturaleza de la misma y el producto final formado. Respecto al punto de ramificación entre la ruta normal y la resistente al cianuro, todos los resultados experimentales parecen indicar que se encuentra antes del citocromo *b*, considerándose a la ubiquinona como el punto más probable de ramificación (Fig. 20.10). Respecto a su naturaleza, podemos decir que, en contra de lo que se creyó en un principio, ninguno de los citocromos conocidos forma parte de esta ruta alternativa; una flavoproteína con un potencial medio podría ser el primer componente de la ruta. El hecho de que los ácidos hidroxámicos que son agentes quelantes de metales, particularmente del hierro, sean unos inhibidores potentes de la ruta alternativa hace suponer la participación en la ruta de alguna ferroproteína no hémica. Respecto al producto final, también existe cierta controversia sobre si es el agua o el peróxido de hidrógeno; resultados recientes, parecen apuntar hacia el agua como producto final de la transferencia de electrones a través de la ruta alternativa. Respecto a la relación entre esta ruta y la conservación de energía, parece obvio suponer que si se ramifica a nivel de la ubiquinona incluya, por lo menos, el lugar primario de formación de ATP. Estudios realizados utilizando succinato o malato como sustratos respiratorios, parecen confirmar esta suposición, ya que con succinato la relación ADP/O es de 0 y con malato es de uno. El resto de la energía de oxidación se pierde en forma de calor.

Durante algún tiempo se ha dado por firmemente establecido que esta ruta no era más que una ramificación de la ruta respiratoria normal que acepta electrones de la ubiquinona. Sin embargo, es interesante señalar que todas las mitocondrias que contienen esta ruta resistente al cianuro, también presentan un alto grado de resistencia a la rotenona, sugiriendo que los electrones pueden ser transferidos desde el sustrato al oxígeno por una cadena redox totalmente separada de la ruta respiratoria normal, y que tal como se representa en la figura 20.16 pueden conectarse por medio de la ubiquinona.

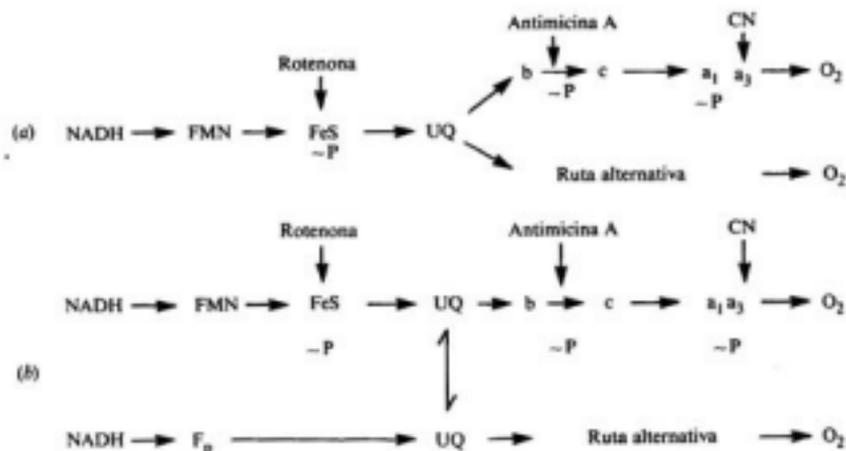


Figura 20.16.-Esquema mostrando las dos posibilidades (a) y (b) de funcionamiento de la respiración resistente al cianuro.

A pesar de la presencia casi general de esta respiración resistente al cianuro en plantas superiores, muy poco es lo que se conoce sobre su posible función fisiológica, si exceptuamos su efecto termogénico en los espádice del género *Arum*. Este efecto consiste en un aumento en la temperatura de hasta 10 grados con respecto al medio ambiente durante la floración y polinización. Este aumento en la temperatura, se consigue por el hecho mencionado anteriormente, de que casi toda la energía de oxidación se libera en forma de calor. Otra posible función fisiológica podría ser la de mantener una oxidación continua del NADH formado por el ciclo de Krebs en condiciones en las que la concentración de ATP sea elevada. Así, al ser oxidado a través de la ruta alternativa no se incrementa de forma considerable la cantidad de ATP.

### 20.11. Ciclo de las pentosas fosfato

La mayoría de las células poseen otra ruta distinta de la glucólisis y ciclo de Krebs para la degradación de la glucosa. Tal ruta se conoce con el nombre de ciclo de las pen-

tosas fosfato o desviación del monofosfato de hexosa. Esta es una ruta multifuncional, especializada para efectuar algunas funciones importantes, como son la de generar potencial de reducción en el citoplasma en forma de NADPH, la conversión de hexosas en pentosas, particularmente la ribosa-5-fosfato necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos y, por último, la eritrosa-4-fosfato formada en el ciclo se utiliza para la síntesis de lignina y otros compuestos aromáticos. Las reacciones de este ciclo se encuentran localizadas en el citoplasma y también en los cloroplastos, aunque aquí sólo es funcional en oscuridad y todos los enzimas han sido purificados y ampliamente estudiados. Varios de los componentes del ciclo de las pentosas fosfato se encuentran también en el ciclo de Calvin, aunque en este caso las reacciones tienen lugar en el interior de los cloroplastos.

La ruta, como puede verse en la figura 20.17, comienza con la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato, formándose el ácido 6-fosfogluónico, que es decarboxilado oxidativamente formándose ribulosa-5-fosfato. El paso final en la síntesis de la ribosa-5-fosfato es la isomerización de la ribulosa-5-fosfato. Las reacciones precedentes suministran dos NADPH y una ribosa-5-fosfato por cada molécula de glucosa-6-fosfato oxidada. Posteriormente la ribosa-5-fosfato es convertida en gliceraldehído-3-fosfato y fructosa, 6-fosfato por la transcetolasa y la transaldolasa. En el conjunto de estas reacciones se forman dos hexosas y una triosa a partir de tres pentosas.



La ruta de las pentosas fosfato puede servir también para efectuar la oxidación completa de la glucosa-6-fosfato a  $\text{CO}_2$  con una reducción simultánea del  $\text{NADP}^+$  a NADPH mediante una secuencia de reacciones en la que seis moléculas de glucosa-6-fosfato se oxidan para dar seis moléculas de ribulosa-5-fosfato y seis de  $\text{CO}_2$ ; después, cinco moléculas de glucosa-6-fosfato se regeneran a partir de las seis moléculas de ribulosa-5-fosfato. La ecuación global es:



anulando los términos comunes se tiene:



Así pues, la glucosa-6-fosfato puede ser oxidada completamente a  $\text{CO}_2$  con la consiguiente generación de NADPH.

## 20.12. Factores que afectan a la respiración

Muchos son los factores ambientales que de forma directa o indirecta pueden afectar la intensidad respiratoria en los vegetales. Entre los factores más importantes se encuentran la disponibilidad de sustratos respiratorios adecuados, el oxígeno y la temperatura.

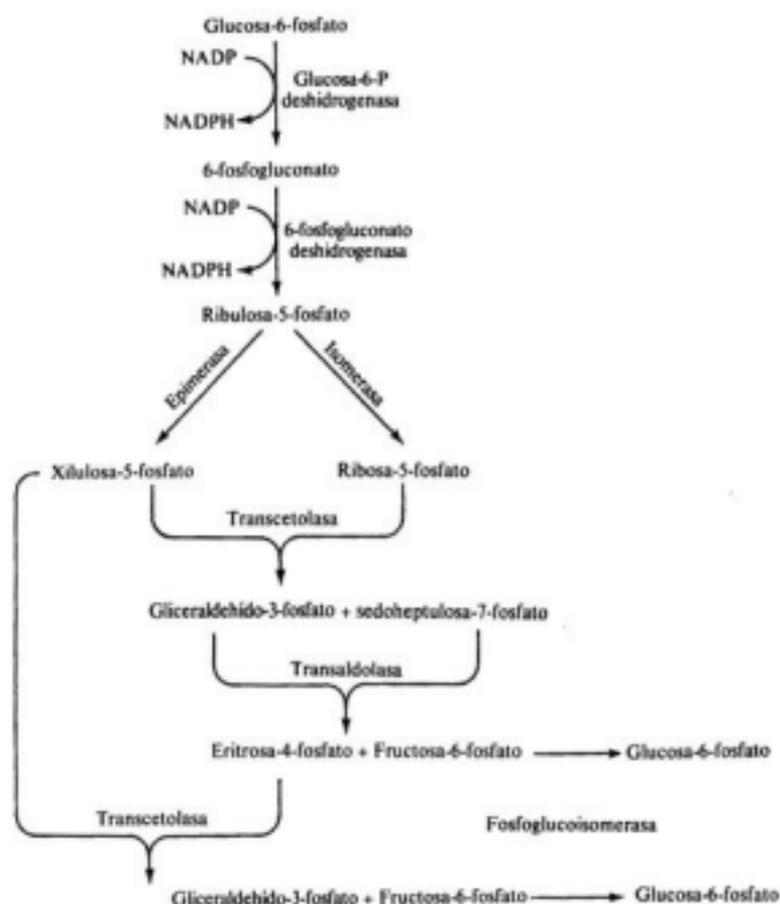


Figura 20.17.—Representación esquemática del ciclo de las pentosas-fosfato.

### 20.12.1. Disponibilidad de sustrato

Para que la respiración celular pueda realizarse, es necesaria la presencia de un sustrato respiratorio, por lo que es evidente que un vegetal u órgano vegetal que se encuentre deficitario en sus reservas de carbohidratos y lípidos respirará con una intensidad menor que aquel otro que tenga sus reservas en niveles óptimos. De hecho, plantas que presentan deficiencia en azúcares aumentan su intensidad respiratoria si se les suministran estos azúcares exógenamente. Otro ejemplo puede ser el caso de las hojas de sombra, que generalmente respiran más lentamente que las hojas expuestas a intensidades luminosas más elevadas. En casos de extrema carencia, tanto de carbohidratos como de

lípidos, incluso las proteínas pueden ser oxidadas; en primer lugar, son hidrolizadas en aminoácidos, que son desaminados y los esqueletos carbonados son metabolizados a través del ciclo de Krebs.

### 20.12.2. Disponibilidad de oxígeno

Es evidente que la disponibilidad de oxígeno puede afectar profundamente la intensidad respiratoria. Sin embargo, la importancia de su influencia sobre la respiración va a variar mucho con las distintas especies vegetales y con los distintos órganos de una misma planta. Así, podemos ver cómo las variaciones que puede sufrir el contenido de oxígeno en el aire son demasiado pequeñas como para afectar la intensidad respiratoria de hojas y tallos. Sin embargo, en otros órganos como raíces, tallos subterráneos y semillas, el acceso del oxígeno a los tejidos puede verse seriamente afectado, de tal forma que la respiración en estos órganos puede ser en algunos momentos anaerobia, y si las condiciones desfavorables se mantienen por largo tiempo pueden acabar muriendo.

Un efecto muy interesante del oxígeno sobre la respiración celular es el llamado *efecto Pasteur*, descubierto por este investigador durante sus investigaciones sobre los procesos de fermentación en la fabricación del vino, y que consiste en que el consumo de glucosa en la respiración puede ser inhibido por el oxígeno. Muchas células vegetales pueden encontrarse en diversas fases de su ciclo biológico bajo condiciones de anaerobiosis. Recuérdense que la utilización anaerobia de la glucosa registra solamente la formación neta de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa, mientras que la oxidación aerobia libera 36 moléculas de ATP; por tanto, una misma célula en condiciones anaerobias precisa  $36/2 = 18$  veces más glucosa para producir ATP a la misma velocidad que lo haría aeróbicamente. Por tanto, en presencia de oxígeno esa célula necesitará consumir menos glucosa para producir energía, es decir, como si el consumo de glucosa fuese inhibido por la presencia de oxígeno. Este proceso parece estar regulado, fundamentalmente, por el enzima alostérico fosfofructokinasa. Aunque este enzima requiere ATP para su funcionamiento, su actividad es inhibida por concentraciones elevadas de ATP, mientras que por otra parte es activado por fosfato. Cuando el oxígeno es abundante, se forman grandes cantidades de ATP por la fosforilación oxidativa, la relación ATP/P es elevada, la fosfofructokinasa es inhibida y la glucólisis queda bloqueada. Cuando hay deficiencia de  $O_2$ , la relación ATP/P disminuye y el enzima es activado aumentando el consumo de glucosa. Un ejemplo muy claro de efecto Pasteur lo tenemos durante la germinación de semillas de garbanzo. Durante las primeras horas, el metabolismo respiratorio es anaerobio debido a que la testa es impermeable al oxígeno; durante esta fase, la actividad de los enzimas glucolíticos es elevada, así como el contenido en etanol; a partir de las 18 horas de germinación, momento en que tiene lugar la ruptura de la testa por la radícula, el oxígeno penetra libremente y se observa un descenso brusco en la actividad glucolítica.

### 20.12.3. Temperatura

Todos los procesos fisiológicos catalizados por enzimas están fuertemente influenciados por la temperatura, presentando todos ellos una temperatura mínima, óptima y máxima. Para la mayoría de las especies vegetales el  $Q_{10}$  (relación existente entre la intensidad de un determinado proceso a una temperatura determinada y ese mismo proceso a una temperatura de 10°C menos) para la respiración entre 5°C y 25°C, es de 2,0 a 2,5. Aumentos posteriores de la temperatura hasta 30 ó 35°C siguen produciendo aumentos en la intensidad respiratoria, pero el  $Q_{10}$  comienza a disminuir. Por encima de 40°C la intensidad respiratoria también disminuye, debido a la desnaturalización de las proteínas enzimáticas.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BONNER Jr., W. D.: *Mitochondria and Plant respiration*, en: L. P. Miller (ed.) *Phytochemistry*, volumen III, Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York, 1973.
- DOUCE, R. (ed.): *Higher Plant Cell Respiration*, «Encyclopedia of Plant Physiology», vol. 18, Springer-Verlag, 1985.
- HINKLE, P. C., y McCARTY, R. E.: *Cómo fabrican ATP las células*, «Investigación y Ciencia», mayo 1978.
- LEE, D. C.: *Plant Mitochondria*, en: H. Smith (ed.) *The molecular biology of Plant cells*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1977.
- PALMER, J. M.: *Structures Associated with Catabolism*, en: M. A. Hall (ed.) *Plant Structure Function and Adaptation*, The MacMillan Press Ltd., Londres, 1976.
- PALMER, J. M.: *The Organization and Regulation of Electron Transport in Plant Mitochondria*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 27, 1976, págs. 133-157.
- PALMER, J. M. (ed.): *The Physiology and Biochemistry of Plant Respiration*, Cambridge University Press, 1984.
- SALISBURY, F. B., y ROSS, C. W.: *Plant Physiology*, 2.ª ed., Wadsworth Publishing Company Inc., Belmont, 1978.
- SOLOMOS, T.: *Cyanide-Resistant Respiration in Higher Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», volumen 28, 1977, págs. 279-297.
- STUMPF, P. K., y CONN, E. E. (eds.): *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise, volume 2: Metabolism and Respiration*, Academic Press, 1980.



# VI

**Crecimiento y  
desarrollo**



## CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CRECIMIENTO

Generalmente, se tiene una idea más o menos correcta de lo que es el crecimiento: sabemos que una planta crece, porque desde que germina la semilla hasta el momento en que nosotros la observamos como planta adulta, ha experimentado una serie de cambios que nos llevan a afirmar que la planta ha crecido. Sin embargo, si nos fijamos más detalladamente, observaremos que paralelamente al aumento en tamaño ha habido un cambio de forma, han aparecido nuevos órganos, en definitiva, podemos afirmar que ha habido un proceso de diferenciación.

En el desarrollo de una planta hay una serie de cambios de forma y tamaño, los segundos fácilmente detectables y cuantificables, que serían los que corresponden al crecimiento, mientras que aquellos cambios cualitativos que acompañan a nuevas propiedades morfológicas y funcionales caerían dentro del ámbito de la diferenciación, que trataría de explicar el porqué una célula, de pronto, o a lo largo de una serie de procesos, se transforma en otra u otras con una misión definida y distinta a la primera. Este conjunto de fenómenos que contribuyen a lo que se denomina el desarrollo de una planta, no son procesos separables, es decir, crecimiento y diferenciación son las dos caras de una misma moneda.

Sin embargo, en aras de una mayor simplicidad en la exposición de un problema, ya de por sí bastante complejo, en este capítulo vamos a considerar solamente los aspectos que conciernen al crecimiento, dejando para más adelante el estudio de la diferenciación.

### 21.1. Concepto de crecimiento

Nos quedamos, pues, en principio, con la idea de que crecimiento puede definirse como un aumento de tamaño. Sin embargo, esto no es totalmente correcto, un cristal crece, y lo hace mediante la aposición de materia preformada que se ordena espontáneamente en función de que así logra su estado más probable de equilibrio. En el crecimiento biológico, el mecanismo es mucho más complejo. El ser vivo, en nuestro caso la planta, toma del medio una serie de sustancias que tiene que transformar y convertir en sus propios constituyentes, moléculas de estructuras complejas y en principio muy diferentes de las que toma del medio. Estas transformaciones pueden ser un resultado del crecimiento y, como consecuencia, se crea un orden a partir del desorden, es decir,

aumenta la energía libre, la entropía se reduce localmente de tal forma que no puede compararse el crecimiento inorgánico al del ser vivo.

En los capítulos anteriores se han estudiado algunos aspectos del metabolismo de las plantas y sabemos que, como consecuencia de este metabolismo, la planta obtiene una ganancia de energía y de materia orgánica; y esta energía y esta materia orgánica, bajo la forma que sea, los utiliza la planta en su crecimiento, es decir, la planta entera o alguno de sus órganos aumenta de peso.

Sin embargo, hay que tener cuidado con este aumento de peso, pues si nosotros pesamos un tejido o una planta, podemos comprobar que, efectivamente, ha experimentado un aumento de peso, pero si en vez de determinar el peso fresco, lo que determinamos es el peso seco, podemos observar diferencias sustanciales, hasta el punto de que no haya crecimiento, sino simplemente ganancia en agua, lo cual no puede considerarse como crecimiento.

Por otra parte, un aumento en peso seco puede ser conseguido por acúmulo de una sustancia, sin que en realidad haya crecimiento, lo que nos lleva a la conclusión de que la definición de crecimiento tiene que ser algo más precisa y basada en un parámetro con mayor significación biológica que los hasta ahora mencionados. Podemos definir el crecimiento como la síntesis de protoplasma que normalmente viene acompañada de un cambio de forma y un aumento irreversible de la masa de un organismo vivo, órgano o célula. El aumento de la masa total puede ser mucho mayor que el aumento en la masa de los componentes protoplásmicos propiamente dichos.

El crecimiento se manifiesta como un aumento irreversible de la masa de un organismo vivo, órgano o célula. El aumento de la masa debe ser permanente, con lo que eliminamos de esta definición la variación de volumen debida a fenómenos osmóticos. Debemos hacer constar que puede darse crecimiento sin que aumente el tamaño, pero sí el número de células. También puede haber crecimiento con aumento de tamaño pero disminución del peso seco, como en el caso de una plántula originada a partir de una semilla, en la etapa previa a que la plántula pueda realizar la fotosíntesis. Por último, podemos tener aumento de peso seco sin que haya crecimiento, como es el caso de una hoja que puede aumentar de peso durante el día al acumular productos de la fotosíntesis.

## **21.2. Crecimiento de la célula vegetal**

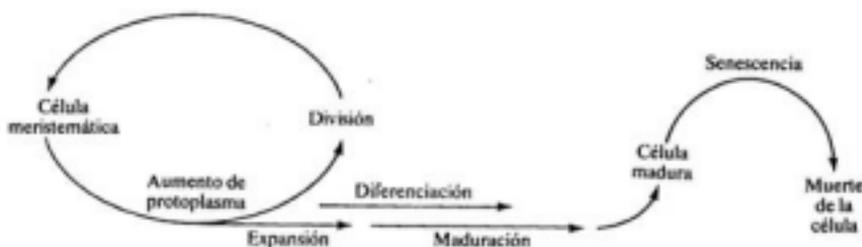
En el capítulo 2 se han visto los mecanismos que regulan el crecimiento de la célula vegetal. En principio podemos afirmar que las células de las plantas, incluso de las plantas superiores, pueden crecer, potencialmente, de forma indefinida, incluso pueden aislarse células de órganos y manifestar totipotencia análoga a la del cigoto del que derivan originalmente.

En el caso de cultivo de callos o células aisladas, la capacidad de división indefinida se pone claramente de manifiesto, el crecimiento consiste en un aumento del número de células y del volumen de las mismas sin que haya diferenciación. Un ejemplo aún más claro lo tenemos en la reproducción vegetativa en que un clon puede multiplicarse indefinidamente; sin embargo, cada organismo independiente, acabará envejeciendo y

muriendo. Este es el precio que las células somáticas y órganos deben pagar por su papel en la complejidad y división del trabajo dentro del cuerpo de la planta vascular.

Podemos preguntarnos ahora si todas las células de la planta tienen la misma capacidad de crecimiento. La respuesta inmediata es que no. Conviene señalar que en las plantas superiores, sólo algunas células, que constituyen los tejidos denominados meristemas, gozan de esta propiedad. Estos meristemas se distribuyen en los ápices de tallos y raíces y en el denominado tejido cambial; en los primeros produce el crecimiento en longitud, mientras que en el segundo induce el crecimiento en grosor. En monocotiledóneas, los meristemas se localizan en la base de la hoja y en los entrenudos, además de en el ápice de las raíces.

En un meristemo no sólo se producen procesos de división celular y posterior alargamiento de las nuevas células formadas, sino que también pueden ocurrir procesos de diferenciación celular que llevarán a la aparición de nuevos órganos u *organogénesis*; el crecimiento de un órgano viene acompañado de la aparición de nuevos tejidos o *histogénesis*. Por tanto, vemos que el mantener la separación entre crecimiento y diferenciación exige un esfuerzo de nuestra parte para considerarlos como dos abstracciones separadas, que en la realidad se presentan unidas.



### 21.3. Cuantificación del crecimiento

Decíamos anteriormente que, en principio, cualquier parámetro nos vale para expresar la tasa de crecimiento, podemos expresar variaciones de longitud, si se trata de medir el crecimiento de una plántula, o podemos medir variaciones de diámetro si queremos medir el crecimiento del tronco de un árbol. Los sistemas de medida pueden ser tan sencillo como los empleados por Sachs y que todo el mundo conoce e incluso ha puesto en práctica. La técnica consiste en hacer unas marcas en el tejido cuya elongación queremos medir a intervalos constantes y al cabo del tiempo determinar la desviación que han experimentado esas marcas. Un sistema análogo puede utilizarse para medir crecimiento en superficie.

Por las razones apuntadas en párrafos anteriores, estas medidas no serían las más idóneas para determinar el crecimiento, ya que lo correcto sería expresar el crecimiento en función del aumento de protoplasma, pero esto es difícil de realizar y además sería

un proceso destructivo. Por tanto, hay que recurrir a métodos más manejables y que resulten más o menos proporcionales a la formación de nuevo protoplasma.

Quizá, entre los parámetros de utilización posible, el más significativo sea el peso seco ya que el agua es eliminada al realizar las medidas, y hemos visto que la presencia del agua puede falsear mucho los resultados, sobre todo al estudiar la germinación de las semillas y las primeras etapas del crecimiento de la plántula. Sin embargo, la determinación del peso seco tiene el inconveniente de que se destruye el tejido u órgano que se estudia. Por el contrario, la determinación del peso fresco es mucho más fácil, no daña al tejido, aunque si se trata de determinaciones realizadas en órganos, éstos deben separarse de la planta.

En el caso de que se trate de medir el crecimiento en un cultivo de células en suspensión, habrá que recurrir a los parámetros utilizados en microbiología como son: volumen de empaquetamiento, es decir, volumen de células en un volumen determinado de suspensión; tasa de respiración, que estará en función del número de células; o cantidad de nitrógeno proteico, que nos dará una idea de la cantidad de protoplasma existente.

Mediante cualquiera de los procedimientos citados tendremos una medida de la variación ( $\Delta y$ ), que podemos expresarla por unidad de tiempo, con lo que tendremos la velocidad de crecimiento ( $\Delta y/t$ ). Podemos también expresarlo como crecimiento relativo si el crecimiento absoluto lo comparamos con la cantidad del parámetro que se considera en el tiempo cero o tiempo en que se comienza el experimento ( $\Delta y/y$ ). Otros términos que suelen emplearse son velocidad de crecimiento relativo o tasa de crecimiento relativo ( $\Delta y/y \Delta t$ ).

Por cualquiera de los sistemas que empleemos, se obtiene una curva denominada sigmoide (Fig. 21.1) en la que podemos distinguir tres zonas; una primera zona (I) logarítmica donde el crecimiento sigue la tasa del interés compuesto. Una segunda zona (II) de crecimiento rápido, pero lineal; y por último una tercera zona (III) en que el crecimiento se hace mucho más lento, hasta que por fin cesa totalmente. La curva que se obtiene es la que Sachs denominó gran período o gran curva de crecimiento.

Esta curva, mediante la cual representamos el crecimiento, es una curva teórica que se da en algunos casos, pero muy poco frecuente; lo normal es que se obtengan aproximaciones a la misma. En muchos casos la fase lineal prácticamente no existe, pasándose de la fase logarítmica a la de senescencia casi sin interrupción.

En el caso de frutos de hueso, nos encontramos con una doble curva (Fig. 21.2), una primera parte sigmoide con un período de senescencia y a continuación un período de crecimiento logarítmico correspondiente a una segunda curva sigmoide.

En otros casos, y si se representa crecimiento en forma del peso fresco, al final se observa un ligero descenso (Fig. 21.3), debido a los procesos degradativos de la senescencia y al consumo de reservas o a la excreción de minerales u otras sustancias al suelo.

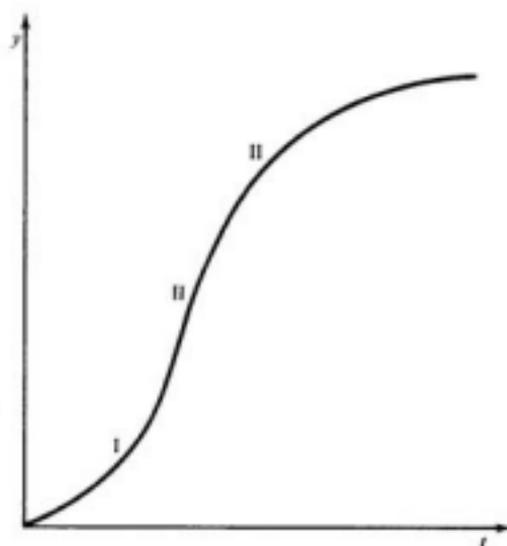


Figura 21.1

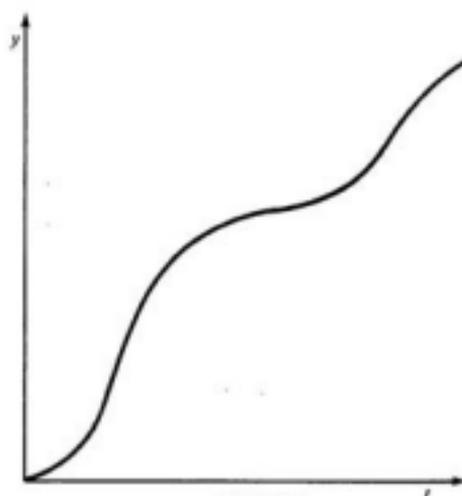


Figura 21.2

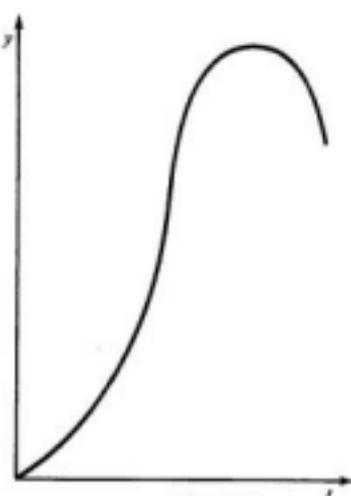


Figura 21.3

#### 21.4. Expresión matemática del crecimiento

Las curvas de crecimiento que se obtienen experimentalmente pueden representarse mediante una fórmula matemática, es decir, mediante modelos que facilitan la reali-

zación de comparaciones entre los diversos materiales que se estudian o las diferentes condiciones experimentales que afectan ese crecimiento.

El caso más simple y que sólo sería aplicable a una parte de la curva sigmoide real que se obtiene, sería el intentar representar el trozo de la curva sigmoide (Fig. 21.4) alrededor del punto de inflexión mediante la ecuación de una recta  $y = at + b$ . En esta expresión,  $y$  sería el parámetro medido al tiempo  $t$ ,  $b$  el parámetro medido al tiempo cero,  $a$  sería la tasa de crecimiento o elongación por unidad de tiempo, es decir,  $dy/dt$ .

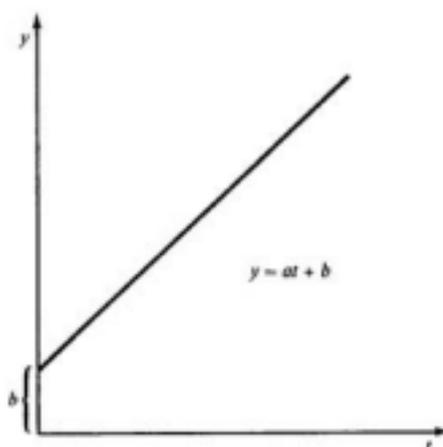


Figura 21.4

Esta fase lineal sólo tiene interés cuando el vegetal presenta crecimiento lineal constante, pero suele ser de muy corta duración en el total del periodo de crecimiento que se considere. Así, por ejemplo, en el sistema radicular un ápice puede crecer en forma lineal, pero como se están formando continuamente nuevos ápices, la tasa de elongación del sistema total no puede expresarse mediante una relación lineal.

Puesto que la ecuación de una recta no nos sirve para satisfacer todas las condiciones de la curva sigmoide que se obtiene en la realidad, se han aplicado otras expresiones matemáticas que intentan ajustarse lo más posible a la curva real. De esta forma se han llegado a desarrollar expresiones bastante complejas, pero aquí, en aras de una mayor sencillez y comprensión del problema que se está tratando, bastante complejo en sí, nos limitaremos a citar algunas de las expresiones más sencillas y al mismo tiempo más útiles para fines prácticos.

Blackman y Gregory propusieron una nueva fórmula matemática como expresión del crecimiento. Esta expresión sólo se refiere a una parte de la curva, por lo que no vale para explicar todo el proceso; sin embargo, es fácilmente comprensible. Considera que en la primera parte de la curva sigmoide el crecimiento sigue la ley del interés compuesto, en que los intereses se van acumulando al capital, para a su vez pro-

ducir más intereses. En el caso de una planta, el embrión representaría el capital inicial, mientras que el interés vendría dado por la eficiencia fotosintética, es decir, la relación que exista entre procesos anabólicos y catabólicos.

Esta situación es la que se representa en la figura 21.5. La expresión matemática sería:

$$y = y_0 e^{rt}$$

que es la fórmula del interés compuesto. En este caso,  $y$  representa el peso de la planta al cabo de un tiempo  $t$ ,  $y_0$  representa el peso del embrión,  $r$  es la tasa de crecimiento. Esta expresión puede ponerse de forma más manejable tomando logaritmos, resultando:

$$\ln y = \ln y_0 + rt$$

o en logaritmos decimales

$$2,3 \lg y/y_0 = rt$$

Si representamos  $\lg y$  frente a  $t$  obtenemos una línea recta como la de la figura 21.6.

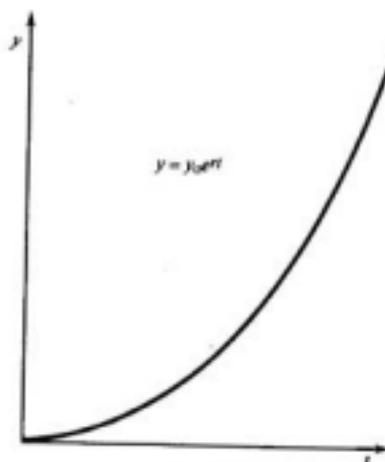


Figura 21.5

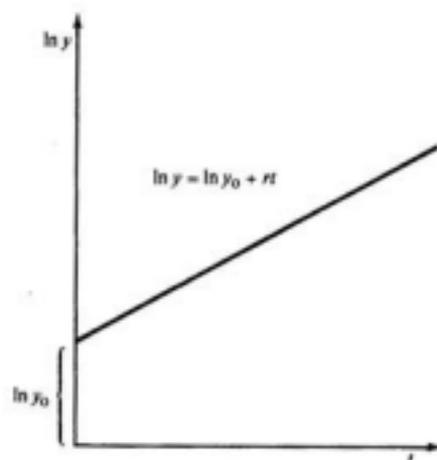


Figura 21.6

La velocidad de crecimiento  $dy/dt$  puede calcularse de la expresión  $y = y_0 e^{rt}$  y será igual a

$$v = dy/dt = y_0 r e^{rt} = ry$$

De aquí se deduce la tasa de crecimiento relativa

$$r = \frac{v}{y}$$

que es un valor constante. Esta expresión puede ponerse en la forma:

$$r = \frac{1}{y} \frac{dy}{dt} = \frac{\ln y_2 - \ln y_1}{t_2 - t_1}$$

donde  $y_2$  e  $y_1$  representan el peso seco de la planta a los tiempos  $t_2$  y  $t_1$ , respectivamente.

En el desarrollo de muchos sistemas se encuentra un crecimiento exponencial, pero solamente durante un período de tiempo determinado en el desarrollo del organismo. El aumento del número de células o de su tamaño en cada instante, es proporcional al número de células en división o en elongación. En el organismo joven, la proporción de células con relación al organismo entero es prácticamente constante, pero a medida que las células se diferencian y que los órganos se desarrollan, aparecen nuevas ramificaciones con nuevos meristemos y nuevas zonas de elongación.

Debemos señalar aquí, que Blackman y Gregory llegaron a definir una serie de conceptos muy útiles para el estudio del crecimiento de las plantas; y éstos son la denominada Relación de área foliar (LAR en la terminología anglosajona) que se expresa mediante la expresión:

$$A = \frac{F_1 + F_2}{G_1 + G_2}$$

donde  $F$  es el área foliar y  $G$  el peso, indicando los subíndices dos tiempos diferentes. Es, por tanto, la relación entre el área foliar y el peso seco de la planta, normalmente de la parte aérea.

Otra expresión es la tasa neta de asimilación (NAR en la literatura anglosajona) que es la tasa de aumento de peso seco por unidad de tiempo y por unidad de área foliar, y puede expresarse:

$$T = \frac{(G_2 - G_1)(\ln F_2 - \ln F_1)}{(F_2 - F_1)(t_2 - t_1)}$$

Ya hemos visto cual es la representación del crecimiento que obtenemos en un intervalo de tiempo suficientemente largo. Se trata de una curva sigmoide, y las dos expresiones matemáticas que hemos utilizado hasta ahora, sólo nos sirven para representar una pequeña parte de dicha curva.

Esta curva (Fig. 21.7) nos muestra que el crecimiento primero es lento, pero luego se acelera, ralentizándose nuevamente y por fin cesa, e incluso en la senescencia puede haber pérdida de masa viva. Esta secuencia de acontecimientos queda plenamente justificada si pensamos que en la planta joven el aumento de masa significa un aumento de puntos de crecimiento y de área fotosintética, el potencial de crecimiento aumenta al aumentar la masa. Sin embargo, no todo el tejido neoformado presenta capacidad de crecimiento, ni todo él tiene capacidad de fotosíntesis, haciéndose cada vez mayores las dificultades de aprovisionamiento de sustancias nutritivas, tanto para la planta en general como para cada uno de sus órganos. El suelo alrededor de la misma se empobrece en agua y nutrientes, las distancias a recorrer desde los órganos absorbentes a los órganos asimiladores y a los lugares de utilización son cada vez mayores. Por otra parte, pueden desencadenarse procesos tóxicos que llevan a la senescencia de la planta y, por último, a su muerte.

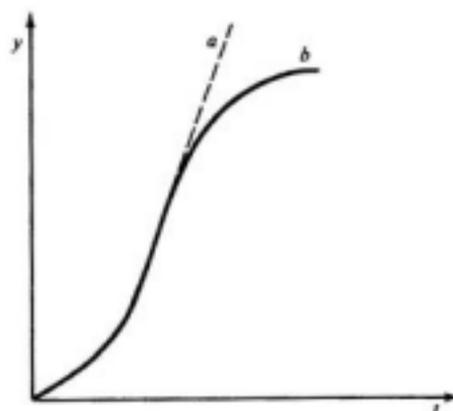


Figura 21.7

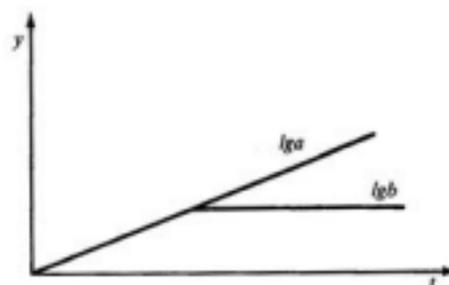


Figura 21.8

Todos estos datos han llevado a considerar la necesidad de otras formulaciones que se adapten mejor a la curva sigmoide obtenida experimentalmente. Una primera aproximación la tenemos si consideramos que la tasa de crecimiento relativa  $r$  no es un valor constante y que disminuye con el tiempo (Fig. 21.8). Analíticamente podemos expresarlo como

$$r = c(a - y)$$

donde  $c$  es una constante y  $a$  el valor límite que puede tomar  $y$ , tenemos entonces

$$r = \frac{dy}{y dt} = c(a - y)$$

o, lo que es lo mismo,

$$\frac{dy}{y(a - y)} = c dt$$

integrando esta expresión entre los tiempos  $t_2$  y  $t_1$  obtenemos:

$$\ln \frac{y}{a-y} = k(t_2 - t_1)$$

Cuando  $t_2 = t_1$ :

$$\ln \frac{y}{a-y} = 0$$

por tanto, en este caso:  $y = a - y$ , es decir,

$$y = a/2$$

Tenemos, entonces, que  $t_1$  representa el tiempo necesario para alcanzar la mitad del valor máximo de  $a$ , cualquiera que sea el parámetro que se utilice.

Esta ecuación representa una curva sigmoide simétrica alrededor del punto de inflexión, siendo la disminución de la tasa de crecimiento tras el crecimiento exponencial igual a la de aumento antes de llegar a este punto.

La velocidad de crecimiento viene dada por:

$$v = \frac{dy}{dt} = ky(a - y)$$

que variará de acuerdo con el binomio  $y(a - y)$ , aumentando hasta que  $y = a/2$ , y luego disminuyendo de acuerdo con la forma de la curva sigmoide.

Aunque en algunos casos esta ecuación describe la secuencia del crecimiento casi perfectamente, sin embargo, no nos sirve de mucho. El crecimiento no está regulado por una única reacción, sino que está influido más o menos directamente por todas las reacciones metabólicas de las células. Por tanto, el que podamos expresar el crecimiento en algunos casos, mediante la misma fórmula que una reacción monomolecular, no significa nada. En la reacción autocatalítica la tasa aumenta al principio porque cuanto más producto se forma, más catalizador hay, luego la reacción disminuye al faltar el sustrato. En el caso del crecimiento, la primera parte de la curva podría interpretarse en los mismos o parecidos términos, aumentan los enzimas que catalizan las reacciones de crecimiento, aunque la ralentización del proceso no es por falta de sustrato, sino por una compleja serie de factores que nada tienen que ver con la reacción autocatalítica.

Se han propuesto otras formulaciones o modelos matemáticos; no obstante, debemos hacer constar que en los vegetales, donde la influencia de diversos factores, que consideraremos más adelante, es tan importante, los modelos matemáticos sólo poseen un valor indicativo general y aunque se han dado modelos más perfectos que los citados, ninguno de ellos puede abarcar en una sola fórmula la historia total de una planta, y se pueden obtener mejores resultados prácticos si se divide la vida total de una planta en períodos que se tratan independientemente, o investigando sistemas más simples, como puede ser el crecimiento de algún órgano aislado.

## 21.5. Regulación del crecimiento

Hemos establecido, que para que podamos hablar de crecimiento, es necesario que haya aumento de protoplasma, por lo que nos encontramos que todo lo que pueda influir sobre la formación del protoplasma afectará, en definitiva, al crecimiento.

En primer lugar, tenemos que decir que una planta es como es, es decir, como todas las de su especie, gracias a su dotación genética. La célula que se divide dará lugar a un primordio y los primordios a estructuras con homologías de acuerdo con su origen y desarrollo controlado. Los estímulos externos e internos convergen sobre las células en formación, condicionando su comportamiento en términos de modelos de crecimiento. Si la información genética a disposición de las células meristemáticas es la misma, la morfogénesis plantea el problema de los medios por los cuales la expresión de la potencialidad genética innata es prescrita por los factores que operan durante el crecimiento, aunque sean factores exteriores.

Por esto, mientras no actuemos sobre los genes constituyentes poco podremos hacer para variar las características de una planta. Podremos mejorar la productividad o, lo que es lo mismo, algún aspecto del crecimiento, actuando sobre algún factor externo, pero siempre tendremos un límite que vendrá fijado por la dotación genética de esa planta. Hoy día, es posible actuar sobre esos genes y se han mejorado las características de crecimiento y productividad de muchas plantas de aplicación en agricultura, siendo éste un campo que está abierto a un desarrollo sorprendente por la potencialidad que existe en la obtención de nuevas variedades de plantas.

A pesar de lo dicho, hay que reconocer que los factores externos ejercen una fuerte influencia sobre el crecimiento, y como decíamos al principio de este apartado, todo lo que influya sobre la formación de nuevo protoplasma, afectará de forma directa al crecimiento.

Existe una energética del crecimiento en estrecho contacto con la respiración, y, más concretamente, un aumento de la temperatura estimula ambos fenómenos. La disminución de la concentración de oxígeno tiene el efecto inverso, cesando el crecimiento cuando se alcanza un 1 por 100 de oxígeno en la atmósfera. Además, las sustancias inhibitoras de la respiración también actúan bloqueando o inhibiendo el crecimiento. Por otra parte, hay que hacer notar que aquellas partes de la planta que presentan mayor tasa de crecimiento son las mismas que tienen unos valores de respiración más elevados. Por tanto, todo lo que afecte a la respiración afectará, como es lógico, al crecimiento.

La temperatura actúa estimulando el crecimiento hasta un cierto límite y luego actúa como inhibidor. El papel regulador de la temperatura sobre el crecimiento puede considerarse que se realiza a través de la regulación de reacciones enzimáticas que directa o indirectamente intervienen en el proceso.

Ya hemos mencionado, al hablar del rendimiento fotosintético, que la luz también influye, ejerciendo un papel indirecto a través de la regulación de la fotosíntesis. Pero, además, la luz ejerce una influencia directa, así en las plantas etioladas los entrenudos crecen exageradamente, y, sin embargo, las hojas apenas crecen. En medios anisótropos, la luz influirá más sobre una parte u otra del vegetal y tendremos así respuestas de crecimiento orientadas que resultan en los fototropismos.

El crecimiento está en relación estrecha con la nutrición. Todo lo que suponga una mejora de ésta se traducirá en un mayor crecimiento. Éste está influido por los iones minerales, el agua y, como ya hemos visto, por los factores ambientales. Pero además del C, del O<sub>2</sub> y del H<sub>2</sub>, otros elementos participan de forma activa en la nutrición de la planta y, por tanto, también ejercerán alguna influencia sobre el crecimiento. Consideremos el papel del N como constituyente de las proteínas y de todos los elementos que participan en mayor o menor grado en la regulación de tantos procesos metabólicos que hemos estudiado en otros capítulos. Y aunque en muchos casos no se conoce el papel exacto de alguno de estos elementos, sabemos que influyen de forma notable sobre el crecimiento.

Sin embargo, todos estos factores que acabamos de mencionar no son toda la historia, ya que hay otros que están más específicamente unidos con el crecimiento y cuyo descubrimiento ha sido el origen de un poderoso desarrollo de la fisiología vegetal. En las plantas superiores, una característica propia es no ser rígidas en la forma, como sucede con los animales superiores. No obstante, a pesar de la falta de rigidez, las plantas mantienen una cierta coordinación entre los distintos órganos, de tal forma que existe un crecimiento equilibrado de los mismos. Esta coordinación del crecimiento la realizan unas sustancias que por analogía a las sustancias encargadas de la coordinación en los animales se les denominó hormonas vegetales, aunque debemos dejar bien claro que el concepto de hormona vegetal no es exactamente el mismo que el de hormona animal. En sucesivos capítulos iremos estudiando las hormonas de los vegetales detalladamente. Por último, debemos añadir que hoy el concepto de hormona se engloba en uno más amplio que es el de reguladores del crecimiento y en este grupo se incluyen no sólo las hormonas, sino también sustancias que actúan como inhibidores del crecimiento, así como las vitaminas tan necesarias para el bienestar del hombre como para el buen crecimiento y desarrollo de las plantas.

## 21.6. Ritmos de crecimiento

Cuando estudiamos el crecimiento de una planta, podemos encontrarnos curvas de crecimiento con dos máximos, uno en primavera, luego una ralentización y otro máximo en otoño. O bien tasas de crecimiento rápido durante el día y lentas durante la noche. Pero además existen ritmos sin enlace aparente con el medio, ya que muchos vegetales mantenidos en un medio constante presentan periodos sucesivos de actividad y reposo.

Los ritmos anuales son consecuencia del ciclo de las estaciones y juegan un papel importantísimo en el crecimiento de las plantas relacionándose, en general, con procesos fisiológicos definidos de la planta. Así, durante la floración suele haber una ralentización del crecimiento e incluso se detiene durante la fructificación.

En la naturaleza, a la curva de crecimiento, se le superponen ciertas fluctuaciones, que en algunos casos son impuestas por variaciones en las condiciones ambientales. Cuando se hacen medidas a intervalos cortos puede apreciarse una ritmicidad en el crecimiento, análoga a la que se observa en otros muchos procesos metabólicos, que al menos en parte son controlados por la variación día-noche y en parte por un reloj bioló-

gico de naturaleza desconocida. Estos ritmos diurnos del crecimiento pueden presentar uno o varios máximos y mínimos en la tasa de crecimiento. En raíces de varias especies se han detectado de 2 a 4 máximos en un periodo de 24 horas.

La curva sigmoide representa el crecimiento de una planta anual, pero en plantas perennes representa el crecimiento de un año. Para plantas de clima templado, esta expresión es sólo el crecimiento de un período relativamente corto de tiempo que abarca la primavera y principios de verano. El hecho de que el crecimiento no se prolongue más adelante aunque las condiciones climatológicas sean adecuadas, nos indica la existencia de un mecanismo interno de control, ya que en algunos casos hay una segunda época más corta de crecimiento.

En climas tropicales húmedos, donde las condiciones ambientales son más constantes, el crecimiento tiene lugar a lo largo de todo el año, pero en las plantas individuales puede presentarse una época de crecimiento rápido y otra de crecimiento lento, con una periodicidad que se mide en meses, e incluso distintas ramas de una misma planta pueden presentar esta periodicidad de acuerdo con su ritmo interno.

#### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- EVANS, G. C.: *The Quantitative Analysis of Plant Growth*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.
- LEOPOLD, A. C., y KRIEDEMANN, P. E.: *Plant Growth and Development*, 2.<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill Book Company, Nueva York, 1975.
- RICHARDS, F. J.: *The Quantitative Analysis of Growth, en: Plant Physiology, a Treatise*, (Ed. F. C. Steward) Academic Press, Nueva York, 1969.
- STEWART, F. C.: *Growth and Organization in Plants*, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Mass., 1968.
- STREET, H. E.: *The Physiology of Flowering Plants*, 2.<sup>a</sup> ed., Edward Arnold, Londres, 1976.

El descubrimiento de las sustancias reguladoras del crecimiento fue precedido de una serie de publicaciones independientes y bastante separadas en el tiempo. En 1758 Duhamel de Monceau observó que cuando se eliminaba un anillo de corteza en un tronco, en la parte superior se producía un hinchamiento y se formaban raíces, pero nada de esto ocurría en la parte inferior del anillo. Posteriormente Sachs, para justificar estas observaciones, propuso que las sustancias formadoras de raíces eran producidas en las hojas y se desplazaban de forma basipétala en los tallos. Pasarían cincuenta años hasta que se asociara de forma clara la formación de raíces con la existencia de fitohormonas.

En otra línea de investigaciones, y en una obra publicada en 1880 con el título de *El poder de movimiento en las plantas*, Francis y Charles Darwin demostraron que el ápice del coleóptilo de las gramíneas era el responsable de que las plántulas se curvaran hacia la luz. Si el ápice estaba descubierto había curvatura, y, por el contrario, si estaba cubierto con un material opaco, no la había (Fig. 22.1). De aquí concluyeron que:

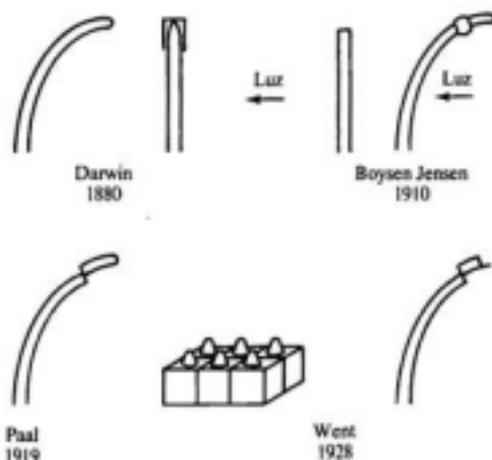


Figura 22.1.—Esquema resumen de los hitos más importantes en el descubrimiento de las auxinas.

«cuando las plantas están expuestas a iluminación lateral, alguna influencia se transmite desde la parte superior a la inferior, haciendo que ésta se curve». En 1910 Boysen Jensen corta el ápice de un coleóptilo y observa que el coleóptilo decapitado no se curva, y sin embargo, al reemplazar el ápice, uniéndolo al coleóptilo mediante un bloque de agar o gelatina, hay curvatura del mismo; esto llevó a pensar que probablemente el estímulo era de naturaleza química. En 1919 Paal decapitó coleóptilos y volvió a colocar los ápices de forma asimétrica, observando que el coleóptilo se curvaba incluso en la oscuridad. Propuso que había una sustancia estimulante del crecimiento excretada por el ápice y que se difundía de forma simétrica en oscuridad, pero que al iluminar lateralmente se distribuía de forma asimétrica, haciendo que creciera más la zona oscura que la iluminada. La idea de que el control del crecimiento era realizado por una sustancia que se distribuía de forma asimétrica y producida en el ápice del coleóptilo fue confirmada por Soding en experimentos en que media el crecimiento lineal de coleóptilos cuando tenían o no el ápice.

La siguiente etapa en esta línea de investigación era, naturalmente, tratar de aislar y caracterizar la sustancia responsable de este fenómeno. Fue Went, en 1928, quien logró aislarla, al cortar los ápices de los coleóptilos y colocarlos sobre bloques de agar. Posteriormente, estos bloques los colocaba asimétricamente sobre coleóptilos decapitados, con lo que obtenía en éstos una curvatura, y el ángulo de curvatura era proporcional al número de ápices depositados sobre el bloque y al tiempo de permanencia. Pudo así comprobar, que en el ápice de un coleóptilo se produce el doble de esta sustancia en la parte oscura que en la iluminada y Dolk demostró que si un coleóptilo se coloca horizontalmente, la parte inferior contenía más de esta sustancia de crecimiento, casi el doble, que la parte superior.

Kogl y Haagen Smith propusieron la palabra *auxina* para designar la sustancia o sustancias que resultaban activas en el ensayo desarrollado por Went, encontrando que un compuesto muy activo era la orina humana. De ésta se aisló una sustancia con gran actividad en el bioensayo puesto a punto por Went; esta sustancia era el ácido 3-indolacético (AIA) que también se aisló de levaduras y de cultivos de *Rhizopus stolonatus*. Posteriormente, se aisló de granos de maíz, de coleóptilos de avena y de varios tejidos y es la auxina por antonomasia, aunque otros compuestos indólicos o el ácido fenilacético también se encuentran entre las auxinas de plantas superiores.

### 22.1. Extracción y valoración de auxinas

Para poner de manifiesto la presencia de auxinas en un tejido, se utilizan una serie de ensayos biológicos basados, la mayor parte, en la propiedad que tienen las auxinas de favorecer la elongación celular.

El primer problema que hay que abordar cuando intentamos valorar el contenido auxínico de un tejido, es la extracción de las auxinas contenidas en ese tejido. Los trabajos de Thimann pusieron de manifiesto que las auxinas se encuentran en la planta en tres formas: una de fácil extracción por métodos de difusión, otra algo más difícil de extraer, que requiere el empleo de disolventes orgánicos y, por último, una tercera forma de

auxina, cuya extracción requiere métodos energéticos, como puede ser hidrólisis con NaOH, IN, o el empleo de enzimas proteolíticas.

De aquí surgió el concepto de auxina ligada, de tal forma que ésta sería la auxina fisiológicamente activa, mientras que la auxina que se extrae por difusión sería el exceso que se encuentra en equilibrio con la auxina combinada. El hecho de que haya diversos grados de auxina, extraíble por solventes directamente o mediante hidrólisis previa, hace pensar que la auxina combinada puede encontrarse en dos o más formas activas en que la molécula de AIA estaría unida a péptidos de cadena suficientemente larga para hacerla insoluble o incluso asociada también a glúcidos.

Las auxinas se extraen normalmente con mezclas de agua y metanol o acetona y metanol, tras eliminar el solvente más volátil mediante evaporación a presión reducida y posterior fraccionamiento en diversos solventes como éter etílico o acetato de etilo. Se procede a una purificación mediante alguna de las técnicas cromatográficas, mientras que al principio eran las de papel y capa fina, hoy se utiliza la cromatografía gas líquido o la cromatografía de líquido de alta presión. En estas técnicas no siempre puede utilizarse directamente la mezcla extraída, sino que hay que ir a la obtención de derivados metilados o sililados. Mediante estas técnicas no sólo se logra la obtención de las auxinas puras, sino que en muchos casos pueden servir para su identificación y cuantificación, sobre todo la asociación de cromatografía de gases con la espectrometría de masas.

Debido a la baja concentración en que se encuentran las auxinas en los tejidos vegetales, durante muchos años los ensayos biológicos eran el único medio satisfactorio de realizar un análisis cuantitativo de las auxinas, ya que la sensibilidad de estos métodos es grande; sin embargo, tienen el inconveniente de ser inespecíficos dentro del grupo y poco exactos. A pesar de estos inconvenientes, y dado el elevado costo de la instrumentación analítica, aún se siguen y seguirán usando.

El bioensayo más antiguo es el propuesto por Went, o test de curvatura del coleóptilo de avena. En este ensayo se coloca el bloque de agar con la auxina a valorar, asimétricamente sobre el coleóptilo decapitado. Se mide el grado de curvatura del coleóptilo que es proporcional a la concentración de auxina en el bloque hasta un cierto valor máximo (Fig. 22.2a). Este bioensayo, que es de una gran especificidad para el AIA, tiene el inconveniente de que necesita realizarse en condiciones muy controladas para obtener resultados fiables. Existe un bioensayo en que también se mide curvatura y que ha sido puesto a punto por Van Overbeek y Went; consiste en hacer un corte longitudinal en un trozo de tallo de guisante, dejando las dos mitades unidas por la base; estas secciones de tallo así preparadas se incuban en la solución de auxina y se desarrolla una curvatura hacia el interior, que es proporcional al logaritmo de la concentración de auxina en la solución (Fig. 22.2d). Este test responde ante una gran variedad de auxinas y ha sido muy utilizado en el estudio de las auxinas sintéticas.

Los bioensayos más utilizados son, sin duda, los basados en medir el crecimiento en longitud de un tejido que puede ser un segmento de tallo de guisante o de coleóptilo de avena, trigo o incluso un segmento de raíz. La respuesta en estos ensayos en que se mide incremento de longitud es proporcional al logaritmo de la concentración de auxina, aunque si se eligen las condiciones adecuadas puede tenerse una respuesta lineal (Fig. 22.2b, c). Tienen la ventaja de poder realizarse en solución.

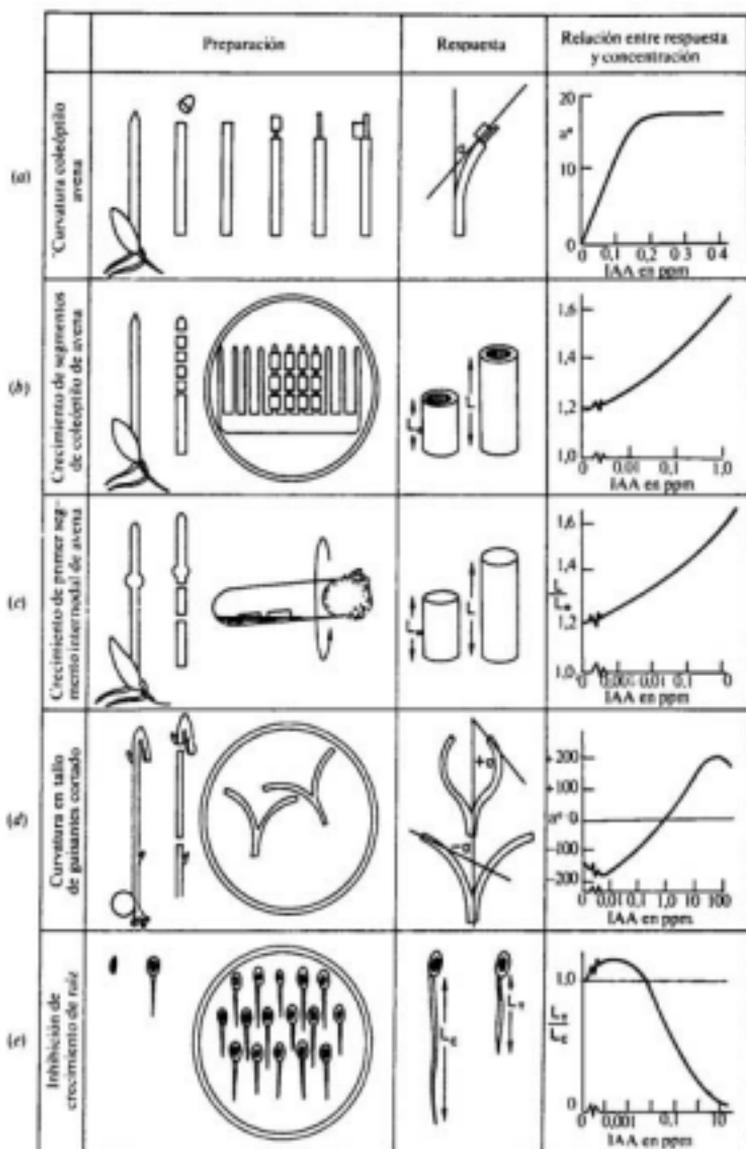


Figura 22.2.—Esquema en que se representan los detalles más importantes de los diferentes métodos de valoración biológica de las auxinas (Audus, 1972).

En vez de coleóptilos pueden utilizarse segmentos de mesocotilo que son mucho más sensibles a bajas concentraciones de AIA. Las plántulas deben crecer en completa oscuridad, ya que el crecimiento del mesocotilo está influido por el pigmento fitocromo. Trozos de tallos de guisantes etiolados se comportan de forma parecida. Se emplean los 10-20 mm de la zona de elongación del cuarto internodo. Estos segmentos dejan de crecer a las 16 h y son menos sensibles para bajas concentraciones de auxina. El incremento es proporcional al logaritmo de la concentración de auxina.

La inhibición de elongación de las raíces también puede servir para valorar auxinas. Las plántulas (trigo, melón) se colocan sobre la solución a valorar, procurando que las raíces queden sumergidas, midiéndose la elongación a las 24 h (Fig. 22.2e). El ensayo es bastante errático para auxinas sintéticas, probablemente porque el efecto de las auxinas es indirecto y es el etileno producido por las raíces el verdadero causante de la inhibición, como veremos más adelante.

También se emplean ensayos que miden el crecimiento isodiamétrico de células, como puede ser el crecimiento de trozos de tubérculo de patata, pero son mucho menos sensibles. Existen otros bioensayos basados en controlar algunos de los procesos que son regulados por las auxinas, por ejemplo, el desarrollo de frutos partenocárpicos en tomate, ganancia de agua en tejidos de alcachofa, inducción de la formación de raíces laterales, etc. Pero estos métodos han sido poco utilizados y salvo en casos específicos carecen de interés general.

La puesta a punto de técnicas inmunológicas para el análisis de hormonas vegetales es el desarrollo más prometedor que ha ocurrido desde la introducción de la espectrometría de masas. El radioinmunoensayo y enzaimunoensayo, que han demostrado su gran utilidad en bioquímica clínica, pueden ser aplicados al estudio de las hormonas vegetales: aunque estas moléculas no sean propiamente antigénicas, sin embargo, si se asocian con una proteína antes de inyectarlas en el animal huésped, entonces son capaces de inducir la formación de anticuerpos de especificidad y sensibilidad variable, habiéndose llegado a la producción comercial de algunos de ellos, concretamente para el AIA. Convenientemente utilizado, el inmunoensayo puede llegar a sustituir a los tradicionales bioensayos, ya que salvo el contador de centelleo no requiere un equipo muy sofisticado.

## 22.2. Curva óptima de crecimiento

En todos los experimentos de elongación, el incremento del crecimiento aumenta al aumentar la concentración de auxina, hasta un cierto valor máximo. En este punto hay una inflexión y al aumentar la concentración, la elongación disminuye. La curva que resulta es frecuente en muchos tipos de experimentos con plantas y animales, en especial con el efecto de ciertos medicamentos. En el caso de las auxinas, la toxicidad se alcanza a 25-50 mg/l, pero depende del pH, del efecto tampón, del tiempo de experimentación y de la presencia de ciertos iones.

La primera parte de la curva puede expresarse como

$$E + A = EA$$

por tanto, hay crecimiento. Si hay exceso de auxina



y en este caso no hay crecimiento. Aunque no se puede demostrar que el mecanismo de funcionamiento de las auxinas sea éste, las curvas óptimas son de interés porque diferentes órganos tienen una diferente posición del mismo (Fig. 22.3).

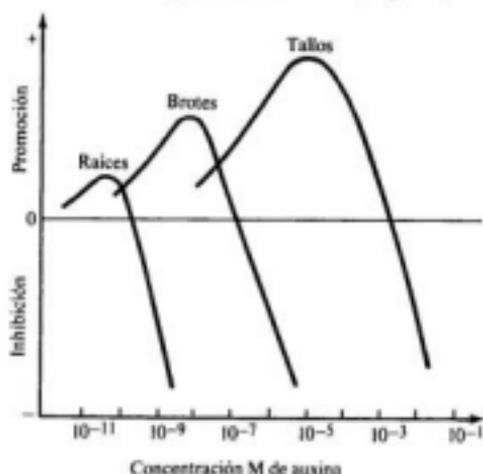


Figura 22.3.—Representación esquemática de la respuesta de crecimiento de raíces, brotes y tallos frente a concentraciones crecientes de auxina.

### 22.3. Localización de la auxina

Tras los primeros trabajos de identificación del AIA, al mejorar las técnicas de análisis y valoración, pudo acometerse el estudio del contenido de AIA en diferentes tejidos vegetales. Así se cita la presencia de AIA en angiospermas (raíces de maíz, tallos de avena y óvulos de algodón), en gimnospermas (*Picea* y *Pinus*) y en briófitas como *Marchantia*.

Podemos apreciar que las auxinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Las cantidades de auxina, o mejor de AIA que se detectan, oscilan entre 1 y 100  $\mu$ g por kg de peso seco aunque con las modernas técnicas de extracción y corrección de las pérdidas los valores máximos encontrados en algunos tejidos pueden ser del orden de 300  $\mu$ g por kg.

Naturalmente, no todos los órganos tienen cantidades iguales de auxina. Mediante el test de epicótilo de guisante se estudió el contenido en auxina a lo largo de la plántula de trigo y se observó que existía un alto contenido en el ápice del coleóptilo que luego va disminuyendo a medida que se desciende a lo largo del mismo, alcanzándose el mínimo en la base y un incremento a medida que nos acercamos al ápice de la raíz, aunque el contenido de AIA que se alcanza en este punto es mucho menor que el que existe en el ápice del coleóptilo (Fig. 22.4).

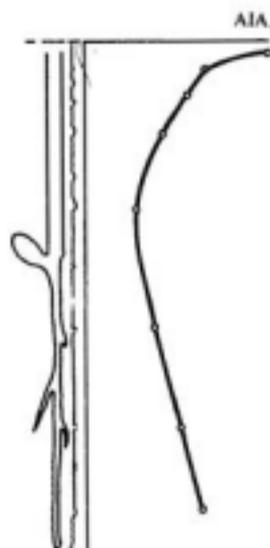


Figura 22.4.—Distribución de la auxina en una plántula de avena (unidades arbitrarias).

Aunque hasta ahora nos hemos referido al AIA como la auxina, debemos señalar que no es la única auxina que se encuentra en las plantas; se ha detectado la presencia de ácido 3-indolpropiónico y ácido 3-indolbutírico. De semillas de guisante se aisló el éster metílico del ácido 4-cloro-3-indolacético con una gran actividad auxínica, así como el ácido libre. Se han citado en la literatura otros compuestos con actividad auxínica, aunque parece que su actividad depende de la posibilidad de que sean transformadas por el tejido en AIA:

*Indol acetaldehído:* Identificado en plántulas etioladas y en presencia de aldehído deshidrogenasa se transforma en AIA.

*Ácido indol pirúvico:* Identificado en extractos de semillas de maíz, hojas y raíces, puede transformarse en AIA de forma espontánea o en reacción enzimática.

*Indol acetónitrilo:* También de amplia distribución aunque parece que no se encuentra libre en las plantas, sino formando parte del glucósido glucobrasicina, del que se libera por la enzima myrosinasa, muy frecuente en las crucíferas. Sólo ejerce acción de auxina en ciertas plantas, aquellas que poseen el enzima nitrilasa capaz de convertirlo en AIA.

*Indol-3-etanol:* Parece que su actividad depende de la presencia de un enzima capaz de oxidarlo a AIA.

Hoy día hay pruebas claras de que existen sustancias que sin poseer anillo indólico, como todas las que hemos visto hasta ahora, poseen actividad auxínica. Se ha demostrado que el *ácido fenilacético* es una de ellas, habiéndose detectado en tomate, tabaco, girasol, guisante, cebada y maíz, así como en algunas algas marinas.

## 22.4. Biosíntesis de la auxina

En los primeros años del estudio de la auxina, se vio que en los cultivos de *Rhizopus solinus* podía aumentarse la producción de AIA si se enriquecía el medio con peptona. Posteriormente pudo demostrarse que este aumento de síntesis de AIA era consecuencia del enriquecimiento del medio en el aminoácido triptófano que se convertía en AIA. Desde entonces se ha demostrado claramente que el triptófano es el precursor del AIA. Las vías de síntesis del AIA se basan en la evidencia obtenida a partir de la presencia de intermediarios y su actividad biológica y el aislamiento de enzimas capaces de convertir *in vivo* estos intermediarios en AIA. Así se han podido establecer cuatro vías de biosíntesis que son:

- a) *Vía del ácido indolpirúvico* (Fig. 22.5a). Aunque debido a su inestabilidad el ácido indolpirúvico es difícil de aislar a partir de tejidos vegetales, sin embargo, si se ha podido aislar indolacetaldehído.

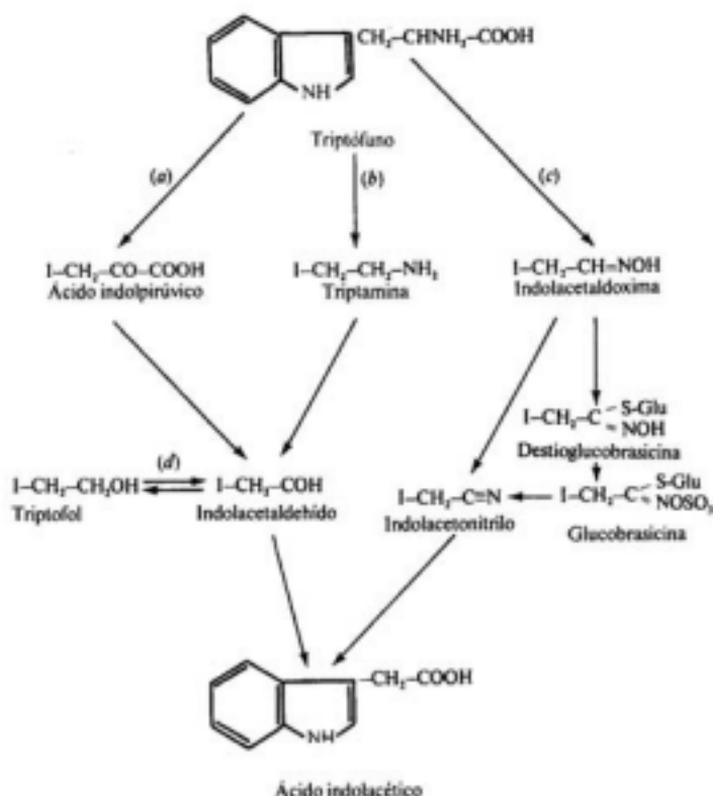


Figura 22.5.—Rutas biosintéticas del ácido indol-3-acético en plantas. a) vía del ácido indolpirúvico; b) vía de la triptamina; c) vía de la indolacetaldoxima; d) vía del triptofol.

La primera etapa del proceso, esto es, la formación del ácido indolpirúvico a partir del triptófano es catalizada por una aminotransferasa inespecífica, que también puede utilizar ácidos glutámico y aspártico y aminoácidos aromáticos como donadores del grupo amino. El segundo enzima sería ácido indolpirúvico descarboxilasa, aislada y purificada de varios materiales. El último enzima en esta vía biosintética que catalizará el paso de indolacetaldehído a AIA no es siempre la misma, ya que hay diferentes enzimas según la especie. En plántulas de alubia mungo actúa la indolaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD, mientras que en coleótilos de avena es una oxidasa que difiere completamente del enzima de alubia mungo, pues su pH óptimo es distinto, no depende del NAD como cofactor y es insensible a las radiaciones. Podemos concluir que, aunque debido a su gran inestabilidad no ha sido posible demostrar que el ácido indolpirúvico es un intermediario en la biosíntesis del AIA, existen otras pruebas que lo confirman.

En las demás rutas biosintéticas que vamos a citar, el intermediario también resulta inestable. Todo esto hace que se considere esta ruta como la más importante en la biosíntesis del AIA. Incluso en el caso de plantas de tomate donde coexisten dos rutas biosintéticas hay pruebas que confirman que la ruta predominante en la biosíntesis del AIA es la del ácido indolpirúvico.

- b) *Vía de la triptamina* (Fig. 22.5b). La triptamina se ha detectado en algunas plantas y también se ha demostrado que tras un período de latencia es activa en el test de curvatura de *Avena* y de elongación de segmentos. Por otra parte, los tallos de tabaco pueden convertirla en AIA.

La primera etapa en esta cadena de reacciones es la descarboxilación del triptófano a triptamina catalizada por la triptófano descarboxilasa, es un enzima muy específico que actúa sobre la forma L-triptófano y no sobre la D-triptófano. Se ha encontrado en algunos tejidos como: tallos de tomate, de cebada, brotes de tabaco e hipocótilo de calabaza; y en tallos de tomate puede separarse de la triptófano aminotransferasa. En tallos de cebada, pero no en las raíces, se encuentra la triptamina y la triptófano descarboxilasa y los niveles de ambas aumentan a partir de la primera semana de crecimiento de la plántula. La desaminación oxidativa de la triptamina la realiza una aminooxidasa, se han aislado aminooxidases en plántulas de guisantes y calabaza, todas ellas poco específicas.

- c) *Vía de la indolacetoxima* (Fig. 22.5c). Esta vía es característica de la familia Brassicaceae. En el género *Brassica* se encuentra indolacetónitrilo, indolacetaldoxima y glucobrasicina. Estas tres sustancias son activas en promover el crecimiento en varios bioensayos. Se ha demostrado que estos tres compuestos pueden formarse *in vivo* a partir de  $^{14}\text{C}$ -triptófano en el género *Brassica*, también pueden convertir  $^{14}\text{C}$ -indolacetónitrilo en AIA. En todas las plantas ensayadas se demostró que indolacetaldoxima se convierte en AIA, mientras que en otros casos indolacetaldoxima puede convertirse en destioglucobrasicina y glucobrasicina.

El enzima que cataliza *in vivo* el paso de triptófano a indolacetaldoxima no ha sido aislado, pero *in vitro* puede actuar la peroxidasa de rábano. El paso de indol-

acetaldoxima a indolacetonitrilo es catalizado por la indol-3-acetaldoxima hidrolasa, aislada de hojas de platanera. El enzima nitrilasa convierte el indolacetonitrilo en AIA y se ha encontrado en la familia Crucíferas y Musáceas aunque no es muy específica. La conversión de glucobrassicina en AIA es catalizada por mirosinasa, aunque quizá esta transformación es poco importante, ya que el enzima es activo a pH de 5.2.

- d) *Vía del triptofol*. Es una modificación de la vía del indolpirúvico, y el triptofol aparece como una reacción lateral transitoria (Fig. 22.5d), es una vía poco importante, ya que aparece en muy pocas especies.

El triptofol se ha aislado en diversos tejidos y es activo en algunos bioensayos. Se ha demostrado la transformación de triptófano en triptofol y la conversión de éste en AIA. La reducción del indolacetaldehído a triptofol se realiza por una alcohol deshidrogenasa en presencia de NADH. La oxidación irreversible de triptofol a indolacetaldehído se realiza de forma aeróbica por una triptofol oxidasa y agua oxigenada.

En cuanto a la biosíntesis del ácido fenilacético, hay pruebas de que se origina a partir de fenilalanina y probablemente las vías de biosíntesis sean análogas a las descritas para la transformación del AIA, vía indolpirúvico y triptamina (Fig. 22.6).

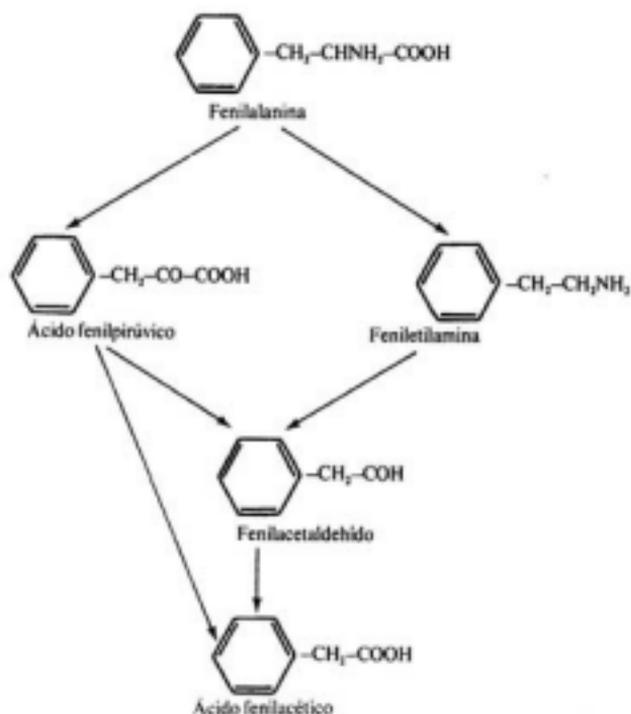


Figura 22.6.-Rutas biosintéticas del ácido fenilacético.

Queda por definir en qué órgano o tejido se lleva a cabo la biosíntesis de las auxinas en condiciones naturales. Aunque se han realizado diversos estudios sobre la distribución de auxina en la planta (Fig. 22.4), hay que hacer notar que lo que se mide en un momento dado es el balance entre síntesis, metabolismo y transporte tanto de entrada como de salida. También conviene añadir que el hecho de que un órgano sea capaz de sintetizar AIA a partir de triptófano sólo nos dice que ese sistema tiene capacidad de llevar a cabo esa transformación en las condiciones del experimento. Mediante distintas líneas de evidencia se ha podido llegar a sugerir cuáles son los órganos o tejidos más probables en llevar a cabo la síntesis de AIA en la planta.

Sin duda, en el ápice del coleótilo de las gramíneas se sintetiza AIA. Como ya hemos visto el máximo contenido de esta hormona se localiza en el ápice y puede establecerse un gradiente hacia la base. Se han hecho objeciones a esta hipótesis, como que la auxina que hay en el ápice no se sintetiza *in situ*, sino que procede de las semillas y es transportada al ápice, a donde se desplaza por el xilema. Esto se apoya en que en el líquido de gutación de coleótilos decapitados se detecta AIA. Sin embargo, la capacidad de los coleótilos para convertir <sup>14</sup>C-triptófano en AIA hace pensar que los coleótilos son capaces de sintetizar su propia auxina.

En tallos de diferentes especies se ha encontrado AIA, así como en cambium, xilema y floema de *Acer*, *Fraxinus* y *Populus*. Se piensa que el AIA del tallo está en tránsito procedente de otros lugares de síntesis, aunque algo puede sintetizarse *in situ* y probablemente esta capacidad será mayor en tallos jóvenes que en viejos.

La producción de auxina se sugiere que puede estar ligada al cambium de tal forma, que la autólisis del contenido celular de células de xilema en diferenciación libera triptófano que es convertido en AIA.

En hojas se ha encontrado AIA y parece que su contenido decrece con la edad, aunque puede haber un nuevo aumento en tejido senescente, probablemente a causa del aumento de triptófano como consecuencia de la proteólisis. Si se añade <sup>14</sup>C-triptófano a hojas, son capaces de transformarlo en AIA, aunque sean más eficientes las hojas más jóvenes.

No podemos dejar de considerar la posibilidad de que los altos niveles de AIA en tejidos jóvenes puede ser consecuencia de la presencia de sustancias protectoras que eviten su oxidación, como veremos más adelante.

Las semillas en desarrollo son un importante centro de producción de AIA, como se ha demostrado en semillas de maíz, que alcanzan su máximo cuando aún están como leche y al madurar el AIA forma ésteres con el mio-inositol. En óvulos de algodón también se han medido cantidades elevadas de AIA.

En frutos, el contenido en AIA aumenta unos días después de la polinización, alcanzándose un máximo; así en fresas se pasa de 3,6 mg de AIA a 127 mg de AIA por fruto a los 12 días de la polinización e iguales máximos se encontraron en manzanas, uvas, tomates y otros.

En raíces se ha detectado AIA, aunque no hay aún certeza de su síntesis *in situ* y parece más bien que se encuentra AIA procedente de las partes aéreas. Se ha visto que en raíces de maíz hay más en la estela que en el córtex y más contenido aún en la cofia.

Podemos concluir que el lugar más importante de síntesis de hormonas son: las hojas jóvenes en expansión, el tejido cambial, los ovarios inmaduros y semillas en des-

arrollo. Sin embargo, otros tejidos también tienen la capacidad de sintetizar AIA (hojas maduras, tallos y raíces).

Se ha propuesto una hipótesis basada en que los sitios de síntesis activa de auxinas están asociados con la muerte de las células, ya sea durante la diferenciación vascular, la digestión del endospermo o la senescencia de las hojas. Según esto, el triptófano es el factor limitante para la síntesis de auxinas y el nivel del triptófano en células vivas es normalmente demasiado bajo para que haya síntesis. Al morir la célula, se libera triptófano mediante autólisis de las proteínas, lo que hace que aumente la concentración de triptófano y así pueda llevarse a cabo la síntesis de AIA.

## 22.5. Transporte del AIA y auxinas sintéticas

Como hemos dicho en el capítulo anterior, una hormona se caracteriza por moverse en el organismo desde un punto de síntesis hasta su lugar de acción. A pesar de algunas objeciones que fueron hechas entonces, lo que está claro es que existe un movimiento de la auxina a través del organismo; este desplazamiento de un lugar a otro se denomina «transporte» de la auxina, aunque los mecanismos que participan en este proceso no nos sean totalmente conocidos.

El transporte de auxinas puede estudiarse mediante diversas técnicas consistentes, en general, en aplicar una auxina exógena natural o sintética, marcada o no, a una planta intacta o a un segmento de coleóptilo, tallo o raíz y medir el tiempo que tarda esa auxina en recorrer una distancia.

Los métodos más adecuados son aquellos que utilizan moléculas marcadas, ya que una de las precauciones que debe tenerse en cuenta al realizar este tipo de estudios es mantener el nivel de auxina en el tejido dentro de los márgenes fisiológicos, pues el emplear concentraciones elevadas de auxina puede introducir artefactos que modifiquen o alteren la vía normal del transporte.

Básicamente todas las técnicas se basan en los trabajos de Went. Consiste en colocar un bloque de agar donador que contiene auxina en un extremo del tejido, y un bloque de agar aceptor en el otro, pudiéndose medir el contenido de agar en el bloque aceptor a diferentes intervalos de tiempo. Así se han podido establecer valores que oscilan desde los 15-20mm/h para AIA aplicado en hojas maduras de *Vicia*, hasta los 2,2mm/h para segmentos de raíces de *Lens* o los 14mm/h de secciones de coleóptilo de avena. Otras auxinas presentarán en los mismos tejidos distintas velocidades de transporte.

El transporte de auxinas ha sido medido y estudiado en diferentes tipos de tejidos y de estos estudios ha podido llegarse a la conclusión de que la velocidad de transporte es:

- Independiente de la longitud del tejido.
- Independiente de la concentración de auxina en el bloque donador, lo que a su vez nos indica que no se trata de un proceso de difusión.
- Varia con la edad y tipo de tejidos, es mayor en coleótilos de maíz a 25°C (15 mm/h) que en raíces (5 mm/h). En coleótilos, varía del ápice (parte joven) a la base (parte vieja).

- d) También está influido por la temperatura: así el AIA en segmentos de raíces de maíz, se mueve a 0,2 mm/h a 1°C y a 8 mm/h a 31°C.

La peculiaridad más notable del transporte auxínico es que se realiza de forma polar, es decir, en un segmento de tallo irá siempre en dirección basipétala, en un segmento de raíz irá en dirección acropétala (es decir, se movería hacia el ápice de la raíz). La polaridad del transporte de la auxina fue puesta de manifiesto por Went en coleóptilos de avena (Fig. 22.7). Posteriormente se demostró en otros tejidos, tanto de tallos como de raíces.

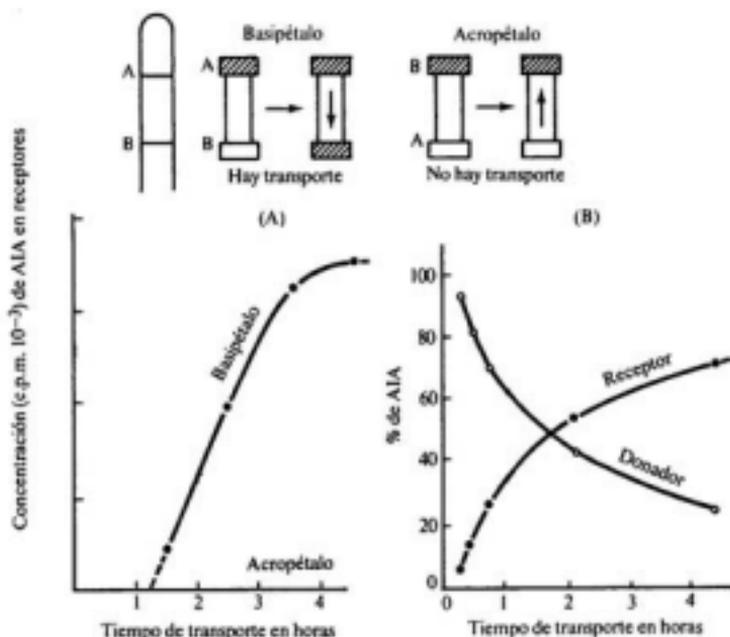


Figura 22.7.—La técnica utilizada por Went, consiste en colocar los segmentos en que se va a estudiar el transporte entre dos bloques de agar, uno donador, que contiene la auxina y otro receptor que recogerá la auxina transportada. (A) Acumulación de AIA en el bloque receptor en los dos tipos de transporte, utilizando segmentos de peciolo de *Phaseolus vulgaris*. (B) Variación de la concentración de AIA en los bloques donador y receptor en función del tiempo. Tras el punto de intersección, el transporte se hace en contra de un gradiente.

En plantas intactas, la dirección de movimiento parece que depende de la zona de aplicación de la hormona, y se realiza desde el lugar de aplicación, que se puede considerar como una *fuentes*, hasta un lugar de consumo o *sumidero*. Así, si se aplica una auxina en hojas adultas, el transporte se realiza por el floema e irá a donde vaya el producto de la fotosíntesis que esa hoja exporta a través del floema.

Debido a la inadecuación de las técnicas utilizadas, hasta el momento no ha sido

tarea fácil el determinar cuál es la vía en que tiene lugar el transporte de auxinas. La evidencia más clara, aunque indirecta, proviene de los trabajos de Sheldrake sobre segmentos de plantas de tabaco y parece claro que el transporte se realiza mediante células asociadas con el floema interno y células próximas al cámbium. Las células de xilema maduro y del parénquima xilemático y las células del floema maduro son incapaces de transportar la auxina.

Se puede concluir que en segmentos aislados de tallos y raíces el transporte polar aparece asociado con áreas no xilemáticas del tejido vascular. En tallos hay evidencia de que las células cribosas del floema no participan, y en tallos leñosos el transporte puede realizarse en el cambium.

En plantas enteras, hay pruebas de que cuando se aplican auxinas marcadas a brotes u hojas jóvenes el transporte se localiza en la región cambium-floema, pero las células del floema no parece que participen en el proceso. Sin embargo, cuando se aplica en hojas maduras, el transporte se realiza muy probablemente en los tubos del floema, como se demuestra en autorradiografías de plántulas de guisantes al aplicar  $^{14}\text{C}$ -AIA.

De todas formas, como veremos más adelante (Cap. 29), el transporte de la auxina está fuertemente influenciado por la luz y la gravedad, y, por tanto, la respuesta fototrópica y geotrópica será justificada por este transporte asimétrico de la auxina.

En resumen podemos decir que la auxina se desplaza en la planta predominantemente en sentido descendente, aunque pueda haber una fracción que lo haga hacia arriba e incluso puede ser distribuida lateralmente por efecto de la luz o la gravedad. ¿Qué mecanismo regula estos desplazamientos? Aun partiendo de la misma observación: que la polaridad aumenta al aumentar la longitud del segmento, se ha abordado el problema desde dos puntos de vista contrapuestos:

- a) Propuesto por De la Fuente y Leopold. Existe un transporte metabólico, aunque no se trata de un transporte contra gradiente, siendo la polaridad la resultante de pasar la auxina por numerosas células donde cada una de ellas transporta un poco más hacia abajo que hacia arriba.
- b) Defendida por McCready. El transporte basipétalo sería metabólico, mientras que el acropétalo se realiza por difusión, de tal forma que la cantidad de auxina que llega a los bloques receptores apicales refleja la diferencia entre lo que llega al bloque por difusión y lo que ha sido desplazado hacia abajo por el transporte basipétalo. Puesto que lo que llega a los receptores apicales es inversamente proporcional a la longitud a recorrer, aumentando el recorrido (longitud del segmento) aumentará la velocidad del transporte.

El transporte metabólico se inhibe en atmósfera de nitrógeno, por 2,4-dinitrofenol e incluso es reducido por bajas temperaturas. Mientras que el transporte acropétalo no se ve afectado por estos factores (Fig. 22.8).

La etapa activa metabólica de este transporte basipétalo parece que se sitúa en la membrana plasmática y según se pudo demostrar en coleóptilos de maíz, en la parte baja del plasmalema. Lo que llevó a la conclusión, a Goldsmith y Ray, de que el transporte de auxinas es debido a una secreción metabólica polar de auxina localizada en la membrana plasmática basal de cada célula. El transporte de auxina requerirá, por tanto:

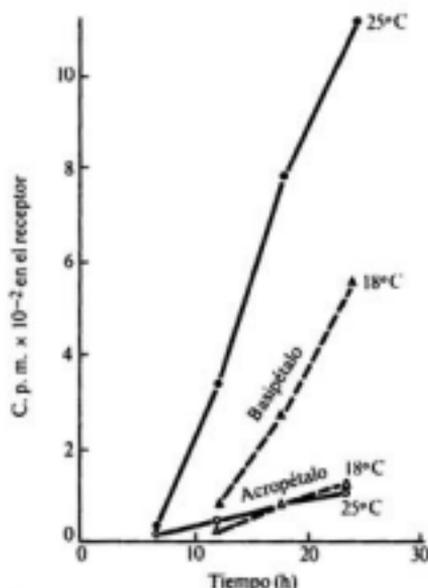


Figura 22.8.—Influencia de la temperatura sobre el transporte acropétalo y basipétalo en segmentos de peciolo de *Phaseolus vulgaris*.

1. Toma de la auxina a través del plasmalema apical.
2. Difusión hacia abajo a través de la célula, pudiendo ser a través de la vacuola o a lo largo de las membranas celulares.
3. Secreción activa a través del plasmalema basal y en lugares específicos.

## 22.6. Degradación del AIA

La concentración de auxina en las plantas puede regularse no sólo por su velocidad de síntesis, sino por la de los mecanismos de inactivación; de hecho, está claramente demostrado que el AIA es inactivado fácilmente por casi todos los tejidos vegetales, siguiendo distintas vías catabólicas.

La degradación enzimática del AIA puede realizarse mediante AIA-oxidasa que cataliza la ruptura del AIA con desprendimiento de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$ . Sin embargo, es difícil separar la actividad AIA-oxidasa de la actividad peroxidasa, así en semillas de garbanzo existen algunos isoenzimas que presentan al mismo tiempo actividad AIA-oxidasa y peroxidasa mientras hay otros que sólo presentan una de las dos (Fig. 22.9), por lo que no es fácil identificar AIA-oxidasa con peroxidasa. No es posible conseguir la peroxidación total del AIA con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ausencia de  $\text{O}_2$ , siempre se necesita  $\text{O}_2$ . La adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al medio de reacción no siempre aumenta la tasa de degradación del AIA, debido a que la preparación del enzima posee la capacidad de generar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  necesario para la acción peroxidasa; lo que sí es necesario añadir

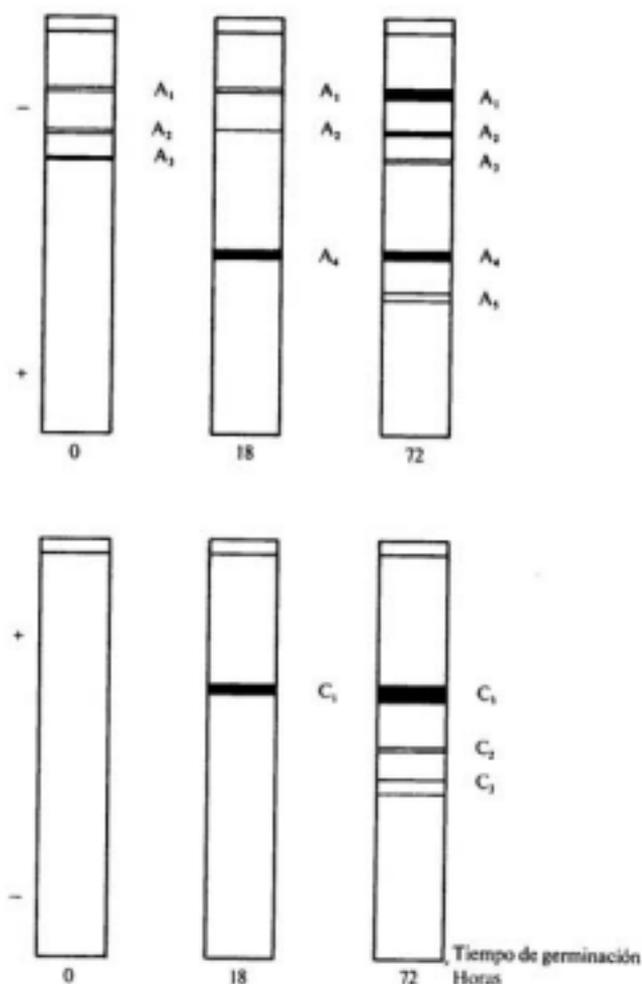


Figura 22.9.—Isoenzimas anódicas y catódicas con actividad peroxidasa y con actividad ácido indolacético oxidasa de extractos de semilla de *Cicer arietinum*, L. procedentes de periodos de 0, 18 y 72 horas de germinación.

como cofactor al medio de reacción es manganeso, y la actividad puede potenciarse en presencia de monofenoles e inhibirse si en el medio de reacción existen orto y para-dihidroxifenoles o polifenoles.

A pesar de los numerosos datos que se han acumulado sobre la degradación enzimática del AIA, el proceso aún no se conoce bien. Uno de los primeros productos formados «in vitro» es el 3 metilen-2-oxindol que probablemente pase a 3-metil-2-oxindol; si la preparación de AIA-oxidasa contiene citocromo oxidasa, el producto de

la reacción es indol-3-aldehído, mucho más estable que los oxindoles. Pero ni estas observaciones, ni el papel de los fenoles naturales han sido encuadrados en la fisiología del proceso, aunque es muy probable que los compuestos fenólicos naturales actúen como modificadores o reguladores de la actividad AIA-oxidasa de las plantas.

La degradación mediante oxidación enzimática del AIA puede ejercer un papel regulador del nivel de auxinas en las plantas. Existen varias pruebas que así parecen demostrarlo, por ejemplo, al aumentar la edad de los tejidos, aumenta también la actividad AIA-oxidasa, hay una relación inversa entre la tasa de crecimiento y el contenido de AIA-oxidasa en distintos órganos, y, por último, en raíces hay muy poco AIA y valores muy altos de actividad AIA-oxidasa; sin embargo, aún no se ha podido demostrar la importancia fisiológica de tales correlaciones.

El AIA también puede destruirse mediante fotooxidación y así sucede cuando en solución acuosa se expone a la luz, pero la presencia de muchos pigmentos naturales y sintéticos acelera esta oxidación, sobre todo si se ilumina con luz azul; esto llevó a pensar que pigmentos de las plantas que absorben en esta región riboflavina y violoxantina, serían capaces de energizar la destrucción del AIA. Los productos de la oxidación del AIA «in vitro» serían 3 metilen-2-oxindol, indolacetaldehído y productos de la ruptura del anillo pirrólico 2-formamidoacetofenona y 2-aminoacetofenona, los dos primeros se encuentran normalmente en las plantas y al 3 metilen-2-oxindol se le atribuyó esta actividad reguladora del crecimiento, pero hoy no está claro que tenga tal función.

A veces la inactivación del AIA puede lograrse mediante conjugación del AIA con otras moléculas como azúcares o aminoácidos. Se ha detectado en plantas el ácido indol-3-acetil L-aspartico. En otros tejidos cuando se aplica AIA exógeno se detecta indol-3-acetil glucosa. En semillas de maíz se ha detectado la conjugación de AIA con mioinositol, y así se detectó AIA-mioinositol arabinósidos y AIA-mioinositol galactósidos. También puede haber conjugación entre el AIA y proteínas.

## 22.7. Auxinas sintéticas

Tras el descubrimiento del AIA por Kögl y sus colaboradores en 1934, se pensó que si una estructura tan simple era capaz de producir respuestas tan notables sobre el crecimiento, tendría que haber más compuestos con propiedades análogas; muchos investigadores comenzaron a ensayar diferentes moléculas para ver si tenían las propiedades descritas para el AIA, y así pronto se descubrió que también era capaz de favorecer el crecimiento de las células el ácido indenoacético, el ácido 2-benzofuranacético, el ácido 3-benzofuranacético, el naftalenacético y una serie de compuestos de los que unos cuantos aparecen en la figura 22.10.

Posteriormente, se vio que otros compuestos que poseían anillo indólico también resultaban activos, como el ácido 3-indolpirúvico y el ácido 3-indolbutírico, algunos derivados del naftaleno como el ácido naftil 1-acético y el ácido naftoxi 2-acético. Por último, el descubrimiento de que algunos ácidos fenoxiacéticos tenían actividad llevó al descubrimiento del 2,4-diclorofenoxiacético con una gran actividad auxínica. A partir de aquí se desarrolló una amplia gama de moléculas con **actividad herbicida**, como el

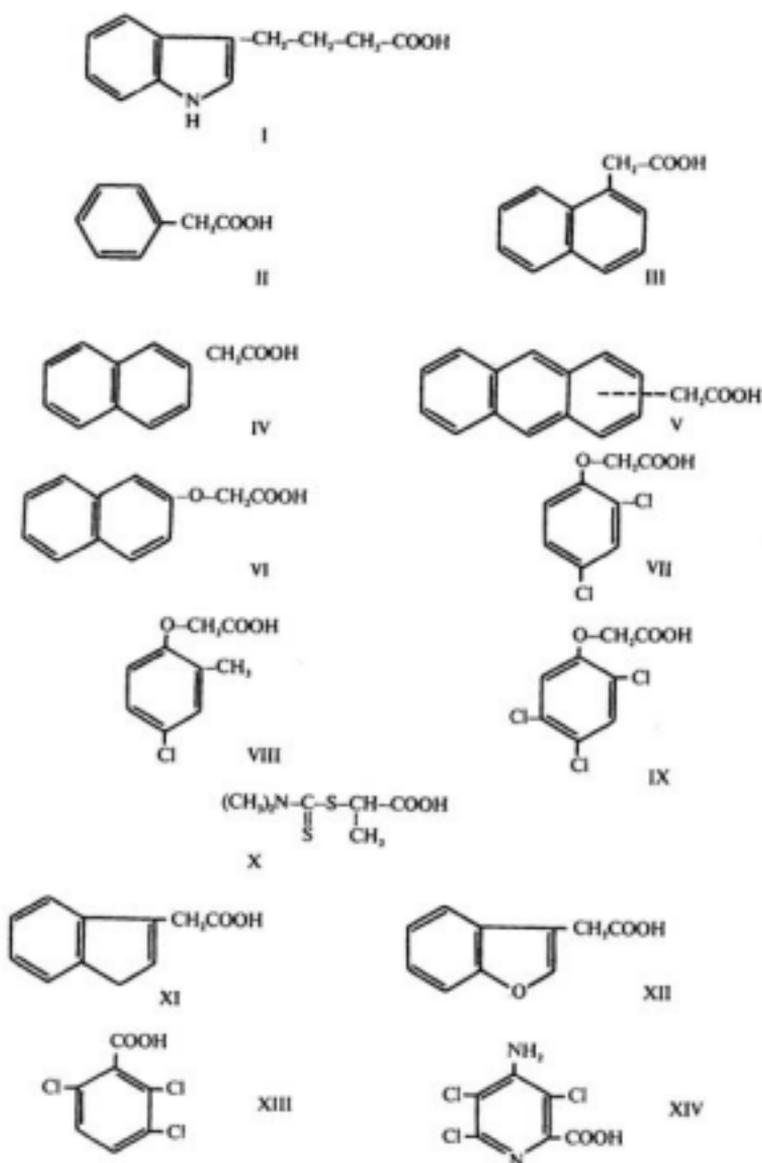


Figura 22.10.—Estructura de algunas moléculas con actividad auxínica: I: ácido indol 3-butírico; II: ácido fenil acético; III: naftil 1-acético; IV: naftil 2-acético; V: antril acético; VI: naftoxi 2-acético; VII: 2,4-dicloro fenoxi acético; VIII: 2-metil, 4-cloro fenoxi acético; IX: 2,4,5-tricloro fenoxi acético; X: N,N-dimetil 2-metil ditió carbamato; XI: ácido inden-3 acético; XII: ácido benzofuran-3-acético; XIII: ácido 2,3,6-triclorobenzoico; XIV: ácido 4-amino-3,5,6-tricloro picolínico.

MCPA (ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético) y el 2,4,5-T (2,4,5-triclorofenoxiacético) utilizado con gran prodigalidad durante la guerra de Vietnam por los invasores norteamericanos.

El hecho de que moléculas aparentemente tan dispares mostraran un mismo tipo de actividad, llevó a muchos investigadores a buscar cuáles eran los puntos comunes en todas las moléculas que resultaban activas, llegando a la conclusión de que una molécula, para tener actividad auxínica, debería reunir las siguientes características:

1. Tener en su estructura un anillo en que exista al menos un doble enlace.
2. Poseer una cadena lateral que acabase en un grupo carboxilo u otro grupo fácilmente convertible en carboxilo.
3. Entre el anillo y el grupo carboxilo de la cadena lateral deberá haber al menos un átomo de carbono.
4. Debería existir una cierta disposición espacial del grupo carboxílico con respecto al anillo.

Sin embargo, al probarse actividad auxínica en compuestos derivados del ácido benzoico y naftoico que no poseían cadena lateral, obligó a modificar estas ideas, y más todavía cuando se vio que moléculas que no poseían anillo, como algunos derivados de ditio-carbamato, mostraban elevada actividad auxínica.

En principio se propuso que una molécula era activa cuando podía unirse a un sustrato específico por dos puntos, el doble enlace del anillo y el grupo carboxílico. Claro que, al ver que moléculas como el ácido indol-3-isobutírico era inactiva, se propuso un mecanismo que requiriera tres puntos de enganche, siendo el tercero un H del grupo metileno. Sin embargo, ya hemos dicho que moléculas sin cadena lateral como el 2,3,6-triclorobenzoico o incluso 2,5 y 2,6-diclorobenzoico son activas.

Por otra parte, se han hecho multitud de sustituciones en fenoxiderivados benzoicos y fenilacéticos; así, al introducir halógenos como en el 2,4-D hay actividad, si se introducen hidroxilos desaparece. El ácido 2-cloro o 6-cloro indolacético es mucho más activo que el AIA. Sin embargo, el 5-hidroxi o el 7-hidroxi apenas tienen actividad. El grupo metilo da actividad, aunque menos que el cloro; así, el 2-metil-4-cloro fenoxi acético (MCPA) es activo.

Pero no sólo tiene importancia el tipo de sustituyente, sino también su presencia en la molécula: así, el 2,4-D es muy activo, mientras que el 3,5-D no tiene ninguna actividad, el 2,4,5-T es el más activo tras el 2,4-D; sin embargo, el 2,4,6-T no tiene casi actividad. No cabe atribuir esta actividad a impedimentos estéricos, ya que mayor tendría que ser en el caso de 2,3,6-triclorobenzoico por no tener cadena lateral y, sin embargo, es tan activo como el AIA. Además, hay que tener en cuenta ciertos isómeros como en el caso del ácido *cis*-cinámico que posee algo de actividad, mientras que la forma *trans* es completamente inactiva. También hay diferencias en isómeros ópticos como en el caso del indol-isopropiónico o 2,4-diclorofenoxipropiónico ya que las formas D son activas y las L no lo son.

La hipótesis más reciente propuesta para explicar el mecanismo de acción de las auxinas, dice que la actividad auxínica de una molécula depende de la presencia de una carga fraccional positiva en el anillo, situada a una distancia de 0,55 nm de la carga

negativa del grupo carboxilo (Fig. 22.11). Hoy día esta distancia se considera incorrecta, ya que determinaciones más exactas dan valores de 0.50 nm.

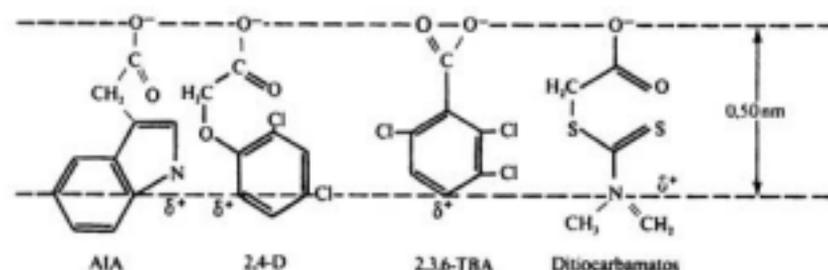


Figura 22.11.—Teoría de Thimann en que se demuestra la existencia de cargas separadas por una distancia de 0,55 nm en las moléculas con actividad auxínica.

Esta distancia de 0.50 nm entre la carga positiva y negativa se da siempre entre los compuestos con actividad auxínica, sean indólicos, fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos, incluso en la auxina sin anillo carboximetildimetil-ditiocarbamato, puede adoptar una configuración plana que recuerda a un anillo y en esta situación el átomo de N toma una ligera carga positiva situada a 0.50 nm del grupo carboxilo.

Cabe pensar que la molécula activa se unirá iónicamente al receptor en la célula vegetal, que poseería una distribución de cargas situadas a la misma distancia.

Existen pruebas de que la auxina se une efectivamente a receptores situados en membranas celulares, aunque quizá existan varios tipos de receptores para una misma molécula y el problema requiera más investigación y más esfuerzo.

## 22.8. Receptores de las auxinas

Hemos visto en el apartado anterior que una molécula que tiene actividad auxínica presenta una cierta configuración espacial. El hecho de que tenga que existir una separación de cargas tan concreta para que haya actividad, el que el 2,4-D sea una auxina fuerte y su isómero el 2,6-D sea casi inactivo, o las diferencias de actividad entre los isómeros ópticos, ha llevado a la búsqueda de receptores específicos de auxinas en la célula vegetal tan precisos que sólo cabe pensar en una proteína. El problema está en la localización subcelular de esos receptores.

Cualquier sistema receptor debe cumplir una serie de condiciones como son: elevada afinidad con un rango de saturación compatible con la actividad fisiológica conocida, relación entre el grado de afinidad de las diversas hormonas y su actividad fisiológica, la unión auxina-receptor deberá ser reversible y de capacidad limitada y, el criterio más difícil de establecer, como consecuencia de la unión se obtendrá una respuesta específica.

Dos son los posibles lugares de localización de un receptor: o unido a una membrana, o en forma soluble, bien en el citoplasma o en el núcleo.

Aunque se han empleado distintos tejidos vegetales, el material más estudiado en busca de un receptor unido a membranas ha sido el coleóptilo de maíz. Los primeros estudios se realizaron con el ácido naftilftalámico, un potente inhibidor sintético del transporte de auxinas. Se vio que había una correlación muy estrecha entre receptores y contenido de membranas plasmáticas y, además, el lugar de unión, por tanto el receptor, no era el mismo que los del AIA, ANA o 2,4-D, pues estas moléculas no competían con el ácido naftilftalámico por el lugar de unión.

Llegándose a la evidencia de que existen tres fracciones membranosas con capacidad de ligar auxinas. Estas fracciones son el retículo endoplásmico (receptor I), el tonoplasma (receptor II) y la membrana plasmática (receptor III). Para el receptor I la constante de afinidad frente a ANA es 0,5-07  $\mu\text{M}$  y la afinidad del receptor frente a varias auxinas y compuestos relacionados, guarda bastante paralelismo con la actividad promotora del crecimiento de los mismos. A pesar de que en coleóptilos de maíz el retículo endoplásmico es el receptor mayoritario en el control de la acción de la auxina sobre el crecimiento, en otros tejidos ha sido difícil demostrar esa afinidad específica del retículo endoplásmico y, por tanto, no puede generalizarse que el receptor I sea el punto central para la acción de las auxinas.

El receptor III asociado a la membrana plasmática, presenta diferencias respecto al receptor I: mayor constante de afinidad, valores de pH óptimo muy amplios, entre 4 y 5,5, mientras que en el receptor I el pH óptimo es 5,5. Este receptor III se ha interpretado recientemente no como un verdadero receptor, sino como un sistema de transporte mediado hacia el interior de vesículas de la membrana plasmática. La aplicación de inhibidores del transporte (ácido naftilftalámico o 2,3,5-triyodobenzoico) incrementa la acumulación de AIA en el interior de las vesículas, inhibiendo un transportador específico de la salida de aniones auxínicos; esto podría servir como justificación del papel de los inhibidores del transporte *in vivo*.

La búsqueda de receptores hormonales está forzada por la necesidad de encontrar un receptor subcelular primario que, como consecuencia de la unión, conduzca a los efectos fisiológicos observados producidos por la hormona. Hay evidencias indirectas que apoyan la existencia de tal receptor, entre las que podemos citar:

- a) La buena correlación existente entre la unión con el receptor y el paralelismo entre estructura y actividad sobre el crecimiento.
- b) La inhibición por luz roja de la elongación de mesocótilo de maíz viene acompañada de una reducción de la sensibilidad a la auxina y una disminución del número de receptores en el retículo endoplásmico.
- c) Inhibidores naturales de la afinidad de la auxina por el receptor (por ejemplo, las benzoxazolininas) muestran una inhibición paralela del crecimiento inducido por la auxina.

A pesar de esto y otras evidencias, aún queda por saber cuál es la naturaleza de las consecuencias bioquímicas o fisiológicas de la unión de la auxina con su receptor que nos expliquen los efectos observables de la hormona.

En cuanto a la presencia de receptores solubles, dos son las posibilidades, una pro-

teína receptora en el núcleo, encontrada en endospermo de coco y que en presencia de AIA y otros factores era capaz de duplicar la síntesis de RNA como resultado de la iniciación de cadena y dando lugar a nuevas clases de RNA, la otra sería una proteína receptora en los cromosomas, extraída de cromatina de coco y que actuaría como aceptor del complejo AIA-proteína receptora del núcleo, desencadenando así la transcripción genética específica. Sin embargo, los datos experimentales, tanto en cuanto a las técnicas empleadas como a la discusión de los resultados, hacen que hoy por hoy la existencia de estos receptores esté sometida a una amplia discusión.

## 22.9. Mecanismo de acción

Cuando a un tejido le suministramos auxina, pueden observarse a lo largo del tiempo una serie de respuestas, algunas se observan en periodos de tiempo que pudiéramos denominar cortos, inferiores a 15 minutos, y para poder observar otros hay que dejar que transcurran periodos de tiempo más largos. Se supone que las primeras transcurren antes de que sea posible una activación genética primaria por efecto de la auxina, en los segundos cabe la activación genética y hay datos suficientes para pensar que efectivamente así sucede.

Las denominadas respuestas rápidas transcurren en un tiempo menor que el necesario para que haya transcripción, traducción y acción del enzima formado. Una de estas respuestas rápidas es la de crecimiento de secciones de coleóptilo.

Cuando se aplica auxina a un tejido con capacidad de respuesta de crecimiento hay un periodo de latencia de duración variable antes de que aumente la tasa de crecimiento. Tras ese periodo, que puede oscilar entre 6 y 15 minutos, la velocidad de crecimiento aumenta rápidamente durante 10-20 minutos y posteriormente puede haber un periodo de disminución llegándose a un mínimo de 10-20 minutos después del máximo; posteriormente, la tasa de crecimiento puede hacerse estable o alcanzar un segundo máximo.

El periodo de latencia varía de unos tejidos a otros, también se ve afectado por la concentración de auxina aplicada, disminuyendo al aumentar la concentración de auxina o también se acorta al aumentar la temperatura, pudiendo llegar a eliminarse el periodo de latencia combinando temperatura elevada y alta concentración de auxina, aunque también puede atribuirse este efecto al bajo pH de la solución de auxinas.

### 22.9.1. Efecto sobre los ácidos nucleicos y proteínas

Para mantener un crecimiento continuado es necesario la síntesis de RNA y proteínas, pero además está demostrado que las auxinas pueden estimular la síntesis de proteínas y RNA en tejidos en crecimiento. La regulación de la síntesis de proteínas a través de la síntesis de ácidos nucleicos puede hacerse de varias formas. Así, se ha observado que en cultivo de médula de tabaco, el crecimiento aumenta al añadir AIA y que este aumento es precedido de un aumento proporcional de RNA; el máximo de este aumento se consigue a la concentración de AIA que produce un crecimiento máximo. Por otra parte, con la aplicación de cloranfenicol se ha visto que la inhibición en la incorporación de leucina en proteínas está directamente relacionada con la inhi-

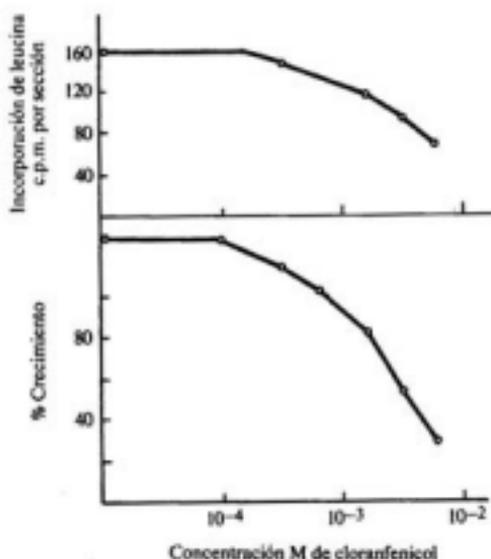


Figura 22.12.—Gráficas en que se muestra la correlación que existe entre la inhibición de la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -leucina y del crecimiento en coleóptilos de avena tratados con cloranfenicol.

bición del crecimiento (Fig. 22.12). Hay otras pruebas de que el AIA produce un incremento en la síntesis de RNA, por ejemplo, la incorporación de  $\text{PO}_4^{32}$  en RNA.

La incorporación de nucleótidos marcados en ácidos nucleicos es estimulada por AIA y por 2,4-D. Estos datos nos indican que la regulación de las auxinas puede tener lugar a través de la regulación de la síntesis de RNA y, por tanto, de la síntesis de proteínas. De hecho, se ha visto que de los distintos tipos de RNA, en todos ellos se observa aumento por influencia de la auxina, especialmente en la fracción ribosómica (Fig. 22.13). Ésta debe ser la fracción implicada en el proceso de crecimiento, ya que al añadir 5-fluoracilo, se sigue observando crecimiento, hay aumento de la síntesis de la fracción ribosómica y se inhibe la síntesis de las demás fracciones; la fracción ribosómica es la que tiene el m-RNA, lo que nos dice que la inhibición de crecimiento por inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos será posible si afectan a esta última fracción de m-RNA. Estos dos hechos llevaron a proponer una hipótesis de activación genética; según esto, la auxina desreprimía ciertos genes, cuya expresión era necesaria para el proceso de extensión, y se traducía en la aparición de proteínas y RNA específicos, fundamentalmente RNA ribosomal, aunque también se detectaron cambios en el m-RNA y t-RNA. Sin embargo, hay una serie de trabajos de Key y colaboradores en que se emplean inhibidores específicos de la síntesis de RNA y encuentra que, aun inhibiendo la síntesis de RNA, el crecimiento no se ve afectado; sin embargo, sí se inhibe cuando se aplica actinomicina D que inhibe la síntesis de DNA.

Algunos otros resultados contradictorios o de difícil interpretación llevaron a re-

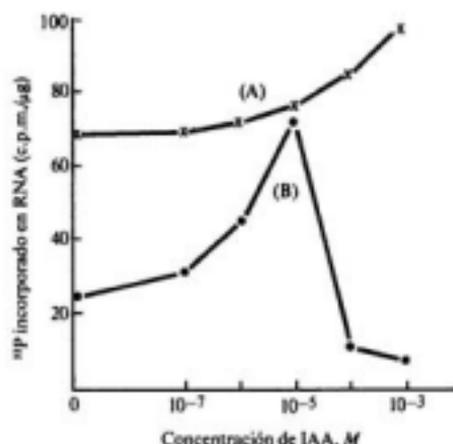


Figura 22.13.—Influencia de la auxina sobre la incorporación de  $^{32}\text{P}$ , en RNA en secciones de entrenudos de guisantes (A) Incorporación al total de RNA. (B) Incorporación en una fracción de RNA insoluble en lípidos (los valores que se representan son 10 veces mayores que los medidos).

considerar la teoría de la activación genética, y quizá lo más importante sea que al interpretar la cinética del crecimiento, sería necesario que la vida media de las proteínas o RNA inducido por las auxinas fuera de 2-3 minutos; por otra parte, durante el período de latencia casi nunca se observa aumento en la síntesis de proteínas o RNA. Esto llevó a plantear nuevos puntos de vista sobre el crecimiento, y se piensa que las auxinas más que iniciar nuevas vías de desarrollo, lo que hacen es desbloquear algunas vías preexistentes.

Muchas son las actividades enzimáticas que varían durante el crecimiento producido por la aplicación de auxinas tanto las degradadoras como sintetizadoras de la pared celular (ver capítulo 2); sin embargo, su importancia es dudosa ante los experimentos cinéticos del crecimiento.

Se ha propuesto la existencia de una proteína limitante del crecimiento, ya que los inhibidores de la síntesis de proteínas podían inhibir el crecimiento casi inmediatamente, cosa que no hacían los inhibidores de la síntesis del RNA. Esta proteína tendría que ser o una proteína estructural que se incorpora a alguna fracción celular o que sufriera cambios de una forma inactiva a una forma activa.

#### 22.9.2. El efecto ácido de crecimiento

El tratamiento de un tejido a pH bajo puede estimular la elongación durante un corto período de tiempo, de unos 30 minutos, y un período de latencia muy corto menor de 1 minuto, y a diferencia del crecimiento inducido por las auxinas no es sensible a los inhibidores metabólicos, aunque por lo demás, la tasa de crecimiento es

comparable a la de la auxina. El hecho de que ambas tasas de crecimiento presenten un  $Q_{10}$  análogo y afecten de forma similar a la extensibilidad de la pared, junto con el hecho de que las auxinas inducen una bomba de protones, llevó a proponer como mecanismo de acción de las auxinas la activación de una bomba de protones; sin embargo, esta hipótesis presenta algunas inadecuaciones con ciertos datos experimentales, por ejemplo, el crecimiento inducido por la auxina no viene acompañado de una caída del pH, en otro caso la caída del pH se observa una vez comenzado el crecimiento e incluso Cleland en algún experimento observa la caída del pH antes de comenzar el crecimiento. En el capítulo 2 se ha visto cuál es la influencia del pH sobre la pared celular y, por tanto, no vamos a insistir más sobre el tema.

Hemos visto que un posible receptor de auxinas estaría situado en el plasmalema, se ha propuesto por Morré y colaboradores que las membranas plasmáticas de células de soja contienen un factor regulador que es liberado específicamente por las auxinas y que estimula la actividad RNA polimerasa. Esta interacción auxina plasmalema podría transmitirse al núcleo al liberar un receptor que interacciona con una RNA polimerasa específica. Como consecuencia se alteraría la transcripción de DNA y se producirían cambios cualitativos y cuantitativos en la síntesis de RNA. Podría darse un paso más y suponer que la interacción de la auxina con el receptor libera  $H^+$  del plasmalema en la pared celular, y como consecuencia del descenso del pH se produce la relajación de la pared.

El retículo endoplasmático (RE) en células de coleóptilo de maíz ha sido citado como lugar de localización de un receptor muy afín para la auxina; según esto, Ray propone un modelo para explicar la acción de la auxina, en el que la acción primaria se ejercería en el retículo endoplasmático. Al combinarse la auxina con el receptor se induce el transporte de  $H^+$  desde el citoplasma a los espacios interiores de las cisternas del retículo endoplasmático. Una vez en el interior de las cisternas los  $H^+$  serían transportados junto con las proteínas excretadas por el retículo endoplasmático, probablemente mediante el aparato de Golgi. La relación entre los efectos rápidos que causa la auxina y aquellos que se realizan a más largo plazo puede explicarse a través de una estimulación de la síntesis de proteínas como consecuencia de una mayor secreción de proteínas al lumen del retículo endoplasmático y cuyo transporte estaría acoplado a la secreción de  $H^+$  a través de las mismas membranas. Aunque esta interpretación se vería complicada con la extrusión simultánea de Ca, regulada por la auxina y a la que nos referiremos con más detalle en el capítulo 26.

## 22.10. Funciones de la auxina

Aunque en el estudio de cada uno de los procesos fisiológicos que iremos abordando en los siguientes capítulos se hará especial mención al papel que juegan las auxinas y naturalmente las restantes sustancias reguladoras, vamos a hacer un pequeño resumen a título de anticipo del papel que estas sustancias juegan a lo largo de la vida de la planta, en los distintos procesos por los que atraviesa.

Como ya hemos visto en el capítulo 2, las auxinas participan de forma muy directa en el crecimiento celular. Una aplicación de esta propiedad de las auxinas la hemos

estudiado en los diferentes ensayos biológicos utilizados para detectar y valorar las auxinas.

En algunos tejidos las auxinas controlan la división celular, como sucede en el cambium. Si a tallos decapitados de *Coleus* se les aplica AIA, el número de elementos de xilema que se forman es proporcional a la cantidad de AIA aplicado.

El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos fue posible gracias a la acción de las auxinas sobre la división celular. Así, un trozo de zanahoria colocado en un medio de cultivo sin auxina, sufre unas cuantas divisiones y se muere, pero si se añade AIA a una concentración de  $10^{-4}$ M, se dividen las células de forma rápida y puede durar muchos años. En otros casos, es necesaria la presencia de otras hormonas para garantizar una división celular continuada. Sin embargo, conviene llamar aquí la atención sobre los cultivos de tejidos adaptados: son aquellos cultivos que tras varias transferencias en un medio con auxina, se hacen frágiles y semi transparentes a la vez que son capaces de sintetizar su propia auxina.

El proceso de rizogénesis está íntimamente relacionado con la división celular, siendo práctica normal en horticultura, y sobre todo en los viveros, aplicar hormonas a los esquejes para favorecer el enraizamiento.

Hay otros procesos de correlación como la dominancia apical o procesos de abscisión en que también las auxinas juegan un papel importante y que en los capítulos correspondientes se estudiará con el suficiente detalle.

## 22.11. Efecto de estímulos ambientales y hormonales sobre el nivel de auxinas

Tanto la luz como la gravedad (Cap. 29) tienen un fuerte efecto sobre el transporte lateral del AIA y, por tanto, sobre la distribución de la auxina en la planta. Otros factores ambientales, como la temperatura y la sequía, pueden influir notablemente sobre los niveles de auxina. Así, por ejemplo, si sometemos una planta de trigo de invierno a temperaturas bajas durante 40 días, el contenido de AIA-oxidasa se hace 10 veces mayor, como consecuencia, el nivel de AIA será bajo, aunque no se han realizado medidas directas. La carencia de agua parece disminuir el contenido de AIA, pues cuando a las plantas de trigo sometidas a sequía se les pulveriza AIA, el crecimiento se acelera considerablemente. También parece que la sequía inhibe el transporte polar de AIA ( $2-14^{\circ}\text{C}$ ).

Existen más datos sobre la influencia de otras hormonas, que sobre la influencia de las condiciones ambientales. No obstante, debemos resaltar que muchos de los datos obtenidos se refieren más bien a cambios de actividad AIA-oxidasa que a medidas directas del contenido de AIA.

La influencia que ejercen las hormonas sobre las auxinas puede ser porque actúan sobre su transporte, síntesis, conjugación u oxidación de las mismas. Por ejemplo, la aplicación de AIA exógeno parece que actúa mediante un retrocontrol a través de la síntesis, conjugación u oxidación, regulando la formación de enzimas implicadas en cada uno de estos procesos.

La aplicación de giberelinas acarrea un aumento en el contenido de auxinas, como se ha demostrado en gran número de especies. Sin embargo, el efecto sobre la AIA-oxi-

dasa varía en las especies; así, aumenta AIA-oxidasa al aplicar giberelinas a plántulas de trigo o callo de tabaco, disminuye en el caso de plántulas de calabaza y no causa ninguna influencia en girasol o *Cofeas*. Por tanto, la regulación de AIA no es a través de su oxidación. Aunque parece que las giberelinas actúan aumentando la síntesis de auxinas, el mecanismo mediante el cual se consigue tal efecto nos es desconocido.

Con un efecto estimulante sobre el contenido auxínico actúan también las citoquininas, probablemente no por atraer auxinas desde otros lugares de la planta a la zona de aplicación de la citoquinina, sino por estimular su síntesis. Por otra parte, cultivos de callo de tabaco pueden crecer en un medio carente de auxina si se les añade una concentración elevada de citoquinina, identificándose en dichos callos auxina, con lo que parece claro que los callos pueden sintetizar su propio AIA. También pueden influir las citoquininas disminuyendo la tasa de conjugación de AIA exógeno, manteniendo un alto nivel de ácido libre en el tejido. Incluso la presencia de ciertos isoenzimas AIA-oxidasa o peroxidasa puede verse afectada por la aplicación de citoquininas exógenas, aunque este proceso es complejo y no siempre puede relacionarse con los niveles internos del AIA endógeno.

El etileno actúa reduciendo los niveles de auxina en varias plantas, aunque se piensa que podría ser a través de la activación de AIA-oxidasa no hay pruebas suficientes en este sentido.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- AUDUS, J. L.: *Plant Growth Substances*, vol. 1, *Chemistry and Physiology*, Leonard Hill, Londres, 1972.
- COHEN, J. D., y BANDURSKI, R. S.: *Chemistry and Physiology of Bound Auxins*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», 33:403-430, 1982.
- LESHEM, Y.: *The Molecular and Hormonal Basis of Plant Growth Regulation*, Pergamon Press, Oxford, 1973.
- SCHNEIDER, E. A., y WIGHTMAN, F.: *Metabolism of Auxin in Higher Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», núm. 25, 1974, págs. 467-513.
- SCHNEIDER, E. A., y WIGHTMAN, F.: *Auxins*, en: *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise*, vol. 1, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978.
- STODDART, J. L., y VENIS, M. A.: *Molecular and Subcellular Aspects of Hormone Action*, en: *Hormonal Regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlin, 1980.
- THIMANN, K. V.: *The Auxins*, en: *Physiology of Plant Growth and Development*, McGraw-Hill, Londres, 1969.
- WEILER, E. W.: *Immunoassay for Plant Growth Regulators*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», 35:85-95, 1984.
- ZERONS, M., y HALL, M. A.: *Molecular Effects of Hormone Treatment on Tissue*, en: *Hormonal Regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlin, 1980.

## GIBERELINAS

El descubrimiento por los japoneses de unas sustancias con propiedades reguladoras del crecimiento, fue consecuencia del estudio de la enfermedad del arroz causada por el hongo *Gibberella fujikuroi* (Saw) Wr (estado imperfecto: *Fusarium moniliforme* Shuld) denominada *bakanae*. Las plántulas de arroz atacadas por la enfermedad eran largas, delgadas y más pálidas que las sanas; las plantas adultas atacadas eran más altas que las sanas y frecuentemente no producían frutos. La idea de Sawada de que los síntomas que aparecían en las plantas podían ser debidas a una sustancia excretada por el hongo fue confirmada en 1926 por Kurosawa. Posteriormente, diversos trabajos llevaron al aislamiento, a partir del filtrado en que crecía el hongo, de esta sustancia a la que se denominó *Giberelina A*.

Estos trabajos permanecieron ignorados en el mundo occidental a causa de la segunda guerra mundial; y no fue hasta los años cincuenta en que, casi simultáneamente, investigadores americanos e ingleses identificaron una sustancia a la que denominaron *Giberelina X* los americanos y *Ácido giberélico* los ingleses, siendo aceptado universalmente esta segunda denominación. Difería de la giberelina A de los japoneses, porque ésta resultó ser una mezcla de, al menos, 3 compuestos. Posteriormente se fueron aislando otras sustancias de estructura y propiedades parecidas, hasta llegar a más de 70 giberelinas conocidas hoy día (Fig. 23.2).

Las giberelinas son diterpenoides ácidos derivados del hidrocarburo diterpenoide tetracíclico ent-kaureno (I). Casi la mitad de las giberelinas conocidas poseen los 20 átomos de carbono de su precursor y tienen la estructura (II); el resto han perdido el átomo de carbono número 20 durante su biosíntesis, por lo que tienen sólo 19 átomos de carbono (III). En principio, podemos clasificar las giberelinas en dos grandes grupos: giberelinas con 20 átomos de carbono y giberelinas con 19 átomos de carbono. La numeración de los átomos de carbono es la que se da en la figura 23.1. Como la nomenclatura sistemática correcta, de acuerdo con las normas IUPAC, es muy engorrosa, se nombran con la expresión abreviada  $GA_n$ ,  $GA_m$ , ...,  $GA_p$ , donde el subíndice sólo indica el orden de su descubrimiento.

Las giberelinas no sólo se encuentran libres, sino también formando glucósidos, principalmente  $\beta$ -D-glucosil éteres, formado por un radical glucosilo unido al grupo  $3\beta$ -hidroxilo. También puede haber esterificación por glucosa del carboxilo C-7 como en  $GA_7$ -glucosil éster. Estos compuestos tienen significación metabólica como veremos más adelante. También se han caracterizado derivados acetilados y propilados como  $GA_7$ -acetil y  $GA_7$ -propil éster.

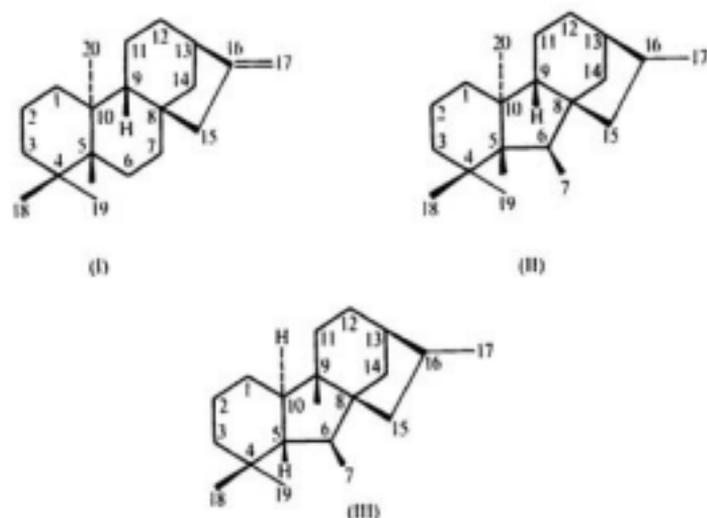


Figura 23.1.—Estructura fundamental del precursor de las giberelinas, ent-kaurano (I) y de los dos grupos de giberelinas: de 20 átomos de carbono ent-giberelano (II) y de 19 átomos de carbono ent-20-norgiberelano (III).

TABLA 23.1

Géneros en que se ha demostrado la presencia de algunas giberelinas

GA <sub>1</sub>	GA <sub>3</sub>	GA <sub>7</sub>
<i>Giberella fujikuroi</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Althea rosea</i> <i>Cucumis sativus</i> <i>C. melo</i> <i>Corylus avellana</i>	<i>G. fujikuroi</i> <i>Pharbitis nil</i> <i>C. sativus</i> <i>C. melo</i> <i>Pinus attenuata</i>	<i>G. fujikuroi</i> <i>Pirus malus</i> <i>P. attenuata</i> <i>Echinocystis macrocarpa</i>
GA <sub>20</sub>	GA <sub>29</sub>	GA <sub>28</sub>
<i>P. coccineus</i> <i>Calonyction aculeatum</i> <i>P. nil</i>	<i>P. vulgaris</i> <i>Pisum sativum</i>	<i>E. macrocarpa</i> <i>Cucurbita maxima</i>

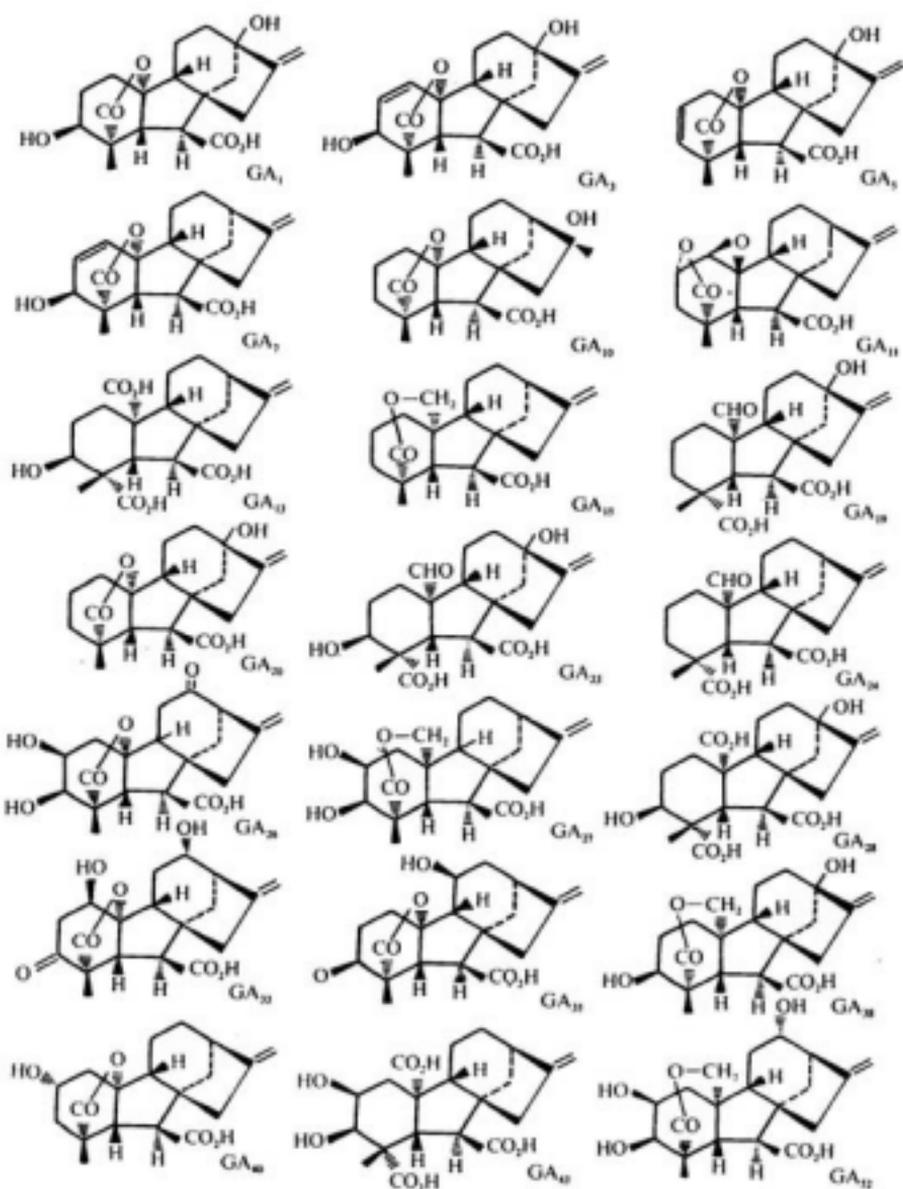


Figura 23.2.—Estructura de algunas giberelinas.

### 23.1. Localización y extracción

Naturalmente, las primeras giberelinas fueron encontradas en el hongo *Giberella*, de las cuales 13 son exclusivas del mismo, hay unas nueve que se han encontrado en el hongo y en plantas superiores y más de 29 solamente en plantas superiores, sin que pueda hablarse de grandes diferencias entre las de uno u otro origen, aunque quizá cabe señalar que las de plantas superiores muestran mayor variabilidad en la hidroxilación. Se han descrito giberelinas en más de 30 especies de Angiospermas y Gimnospermas (Tabla 23.1). Existen muchos casos en que se habla de actividad tipo giberelina, al ser ésta detectada solamente por ensayos biológicos, pero sin que hayan podido ser identificadas las estructuras moleculares. Esto hace pensar que su presencia es universal en las plantas superiores. La presencia de giberelinas no se circunscribe al hongo *Giberella* y a las plantas superiores, sino que también se han aislado de otros hongos, bacterias y algas.

Se ha detectado actividad giberelina en tallos y raíces, hojas, flores, brotes, frutos y semillas, e incluso en polen y cloroplastos aislados. En general, los tejidos vegetativos poseen unos  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso fresco, menos que los reproductores (estambres y semillas inmaduras) que pueden alcanzar  $10.000 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso fresco. Sin embargo, como veremos más adelante, el contenido en giberelinas varía en relación con el crecimiento, edad de la planta, floración, desarrollo del fruto, dormición y germinación de las semillas.

La extracción se realiza a partir de un macerado de planta o a partir del medio donde crece el hongo. Se procede a una extracción con mezclas hidroalcohólicas y tras evaporar el solvente orgánico se realiza una partición con acetato de etilo a diferentes valores de pH. De esta forma, al acetato de etilo pasan todas las giberelinas presentes en el extracto, excepto aquellas que se encuentran como glucósidos y los ésteres glucosídicos más polares (los de  $\text{GA}_1$  y  $\text{GA}_{10}$ ). También puede haber alguna dificultad en extraer  $\text{GA}_{20}$ ,  $\text{GA}_{28}$ ,  $\text{GA}_{41}$  y  $\text{GA}_{19}$ , aunque todas ellas pueden extraerse a partir del residuo acuoso con butanol. Mediante este procedimiento puede obtenerse una extracción que represente entre el 40 y el 80 por 100 de las giberelinas endógenas, dependiendo del cuidado de la técnica desarrollada y de la pureza de los solventes.

El extracto así obtenido hay que purificarlo posteriormente mediante técnicas de cromatografía en papel, capa fina o columna, sobre todo si quieren valorarse mediante ensayos biológicos. La mejor técnica para la separación de las giberelinas es la cromatografía de gases de los ésteres metílicos o trisilil metil ésteres. Esta técnica en conexión con la espectrometría de masas se utiliza para la identificación de las giberelinas.

### 23.2. Valoraciones biológicas

Gran parte de los avances realizados en el conocimiento de las giberelinas se basan en los resultados obtenidos con los ensayos biológicos. Aunque se han desarrollado técnicas muy sofisticadas para el análisis y estudio de las giberelinas, un aspecto tan importante como el saber si una molécula es activa o no, y en qué procesos, sólo podrá determinarse mediante ensayos biológicos. Los ensayos biológicos bien realizados e interpre-

tados son y serán un instrumento excelente para seguir avanzando en el estudio de estos compuestos. Vamos a describir brevemente alguno de los más usuales, de los cuales damos un resumen esquemático en la figura 23.3.

- a) *Crecimiento del internudo de guisante enano.* El material es fácil de conseguir. Se aplica la solución de giberelinas en la axila de la hoja que nace en el tercer entrenudo en plantas que tengan 5 días. A los 4 días de aplicar la solución problema, se mide la distancia que hay entre el tercer y sexto entrenudos. El ensayo en total dura 9 días y se pueden detectar cantidades de  $5 \times 10^{-3}$  a  $5 \mu\text{g}$  de ácido giberélico por mililitro.
- b) *Crecimiento de la vaina de hoja de maíz enano.* Puede conocerse con certeza el material genético que se emplea, pero es más difícil de obtener. La solución se aplica en la especie de copa que forma la hoja al romper el coleóptilo a los 7 días de sembrado. Siete días más tarde se mide la longitud de las vainas de las dos primeras hojas, desde el nudo de coleóptilo hasta la posición de la ligula en la base de la hoja. El ensayo en total dura 14 días y su sensibilidad es del orden de  $2 \times 10^{-3}$  a  $2,0 \mu\text{g}$  por planta.
- c) *Crecimiento de hipocótilo de lechuga.* Las plantas de lechuga de 2 días, se colocan sobre la solución nutritiva que contiene la giberelina a valorar, midiéndose la elongación del hipocótilo al cabo de 3 días. El test dura en total 5 días.
- d) *Crecimiento de la base de la hoja de avena.* Los trozos de la base de hojas tomadas de plantas de 4 días se colocan sumergidos en la solución a valorar. A las 24 horas se mide el incremento en la longitud que han experimentado.
- e) *Endospermo de cebada.* En este método se determinan los azúcares reductores producidos por la acción de las giberelinas, a través de la producción de  $\alpha$ -amilasa, sobre el endospermo de cebada. Tiene la ventaja de ser un método rápido (2 días) y muy sensible, detectándose de  $10^{-4}$  a  $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ . Se emplean semillas de cebada en que se ha eliminado el embrión y estos trozos se colocan sobre la solución a valorar. Los azúcares liberados se valoran por un método de detección de azúcares. Hay que tener cuidado con las contaminaciones durante el período de incubación.
- f) *Senescencia de hojas.* Se colocan flotando sobre la solución a valorar discos cortados de hojas (*Rumex* o *Taraxacum*). Se mide el contenido en clorofila al cabo de 5 días. Se detectan cantidades del orden de  $10^{-4}$  a  $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ .

Una precaución que hay que tener con los ensayos biológicos utilizados en el estudio de giberelinas, es que en las mezclas de composición desconocida, es decir, cuando se determina actividad tipo giberelina, o actividad giberelina, es imposible medir cantidades absolutas ya que la relación dosis respuesta es diferente para cada giberelina. Por eso los valores de actividad giberelina se dan como valores absolutos del parámetro que se mide (por ejemplo, porcentaje de crecimiento con respecto al control, unidades de actividad  $\alpha$ -amilasa) o se relacionan éstos con una curva patrón obtenida con  $\text{GA}_3$  y se expresa como equivalentes de  $\text{GA}_3$ .

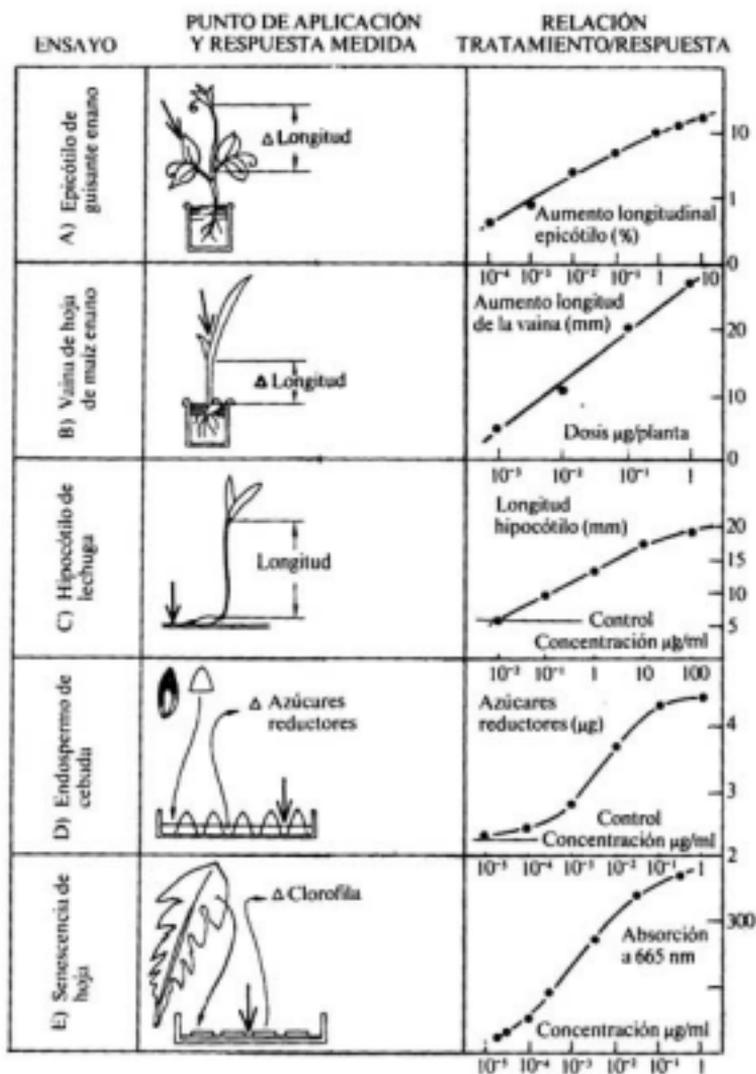


Figura 23.3.-Esquema en que se representan los ensayos biológicos más utilizados en la valoración de gibberelinas. Para detalles, ver texto (Audus, L. J.: *Plant Growth Substances*, Leonard Hill, Londres, 1972).

Aunque en principio no hay razón para que no puedan aplicarse a la valoración de giberelinas las técnicas de inmunoensayo, existe el inconveniente del elevado número de compuestos que constituyen este grupo de hormonas y la dificultad de obtenerlos mediante síntesis. Sin embargo, a medida que se logran métodos de síntesis mejores y más eficientes, las giberelinas podrán ser valoradas mediante estas técnicas, al igual que otras hormonas vegetales.

### 23.3. Relación estructura-actividad

Aunque no todas las giberelinas descubiertas han sido sometidas a estudios en que se trate de relacionar su estructura con la actividad desarrollada en una serie de ensayos biológicos, gracias a los trabajos de Crozier y sus colaboradores, pueden establecerse algunas conclusiones en esta línea de investigación.

En general, las giberelinas con 19 átomos de carbono son más activas que aquellas que poseen 20 átomos de carbono en su molécula. Dentro de las de 19 carbonos es a su vez mayor en las hidroxiladas en 3 $\beta$ , 3 $\beta$ -13 e insaturadas en 1,2 siendo éstas las de mayor actividad. Las hidroxiladas en 2 $\beta$  pierden actividad y es posiblemente un mecanismo de inactivación la formación de estos derivados. Las giberelinas con 20 carbonos que tienen una función  $\delta$ -lactona en el anillo A o un grupo aldehído en el C-20 muestran mayor actividad. Si están metiladas o tienen un grupo carboxilo, son casi inactivas, probablemente porque al formarse el enlace  $\delta$ -lactona en C-20 puede facilitar que se desprenda este carbono, transformándose en una giberelina de 19 átomos de carbono, aunque no existen pruebas que apoyen esta hipótesis.

Sin embargo, conviene no perder de vista la especificidad del ensayo utilizado. Así, en el ensayo realizado con arroz enano, responden mejor las giberelinas C-20, mientras que responden muy mal en el de endospermo de cebada o en el de hipocótilo de lechuga. La sensibilidad frente a las giberelinas del ensayo de aleurona de cebada y el de guisante enano dependen más de la hidroxilación en 3 $\beta$  que cualquiera de los otros utilizados. El ensayo de hipocótilo de calabaza es muy específico y no responde a las giberelinas hidroxiladas en 13, excepto a la GA<sub>32</sub> y frente a ésta sólo en concentraciones elevadas.

Ningún derivado de síntesis presenta, hasta la fecha, mayor actividad que las giberelinas naturales y todas las particularidades estructurales citadas ( $\delta$ -lactona, hidroxilo en 3 $\beta$  e insaturación 1-2) son necesarias para que haya actividad, ya que cualquier alteración de la molécula lleva a la pérdida o disminución de la misma.

### 23.4. Biosíntesis de las giberelinas

La vía biosintética que lleva desde la formación del ácido mevalónico a la de las giberelinas es larga y compleja, por lo que no es extraño que aún queden puntos oscuros, aunque los primeros pasos se han estudiado y se conocen perfectamente los enzimas que los regulan (Fig. 23.4).

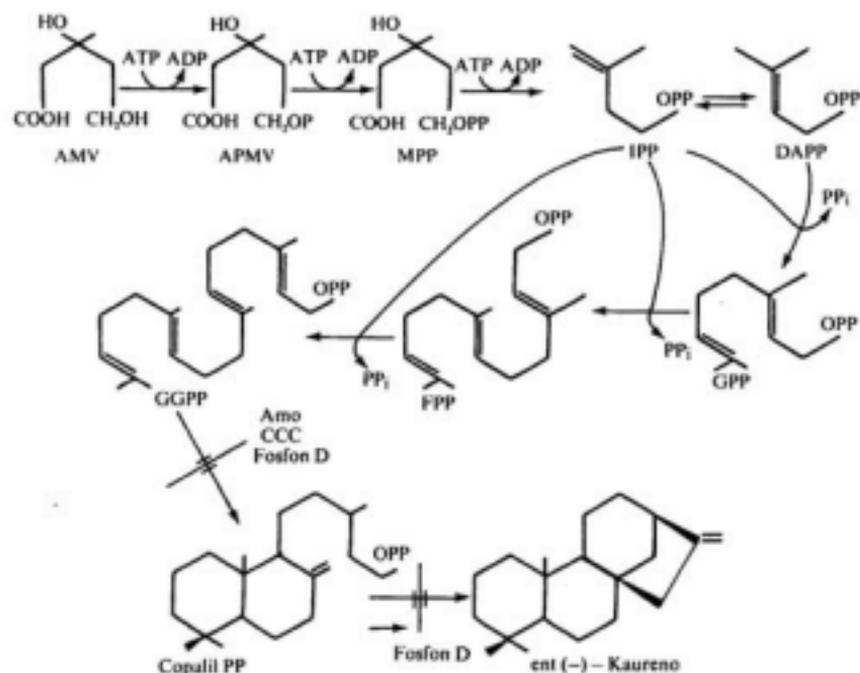


Figura 23.4.—Ruta biosintética de las giberelinas desde ácido mevalónico (AMV) hasta la formación de ent (-)-kaureno. APMV: Ácido fosfo mevalónico. MPP: Mevalonil pirofosfato. IPP: Isopentil pirofosfato. DAPP: Dimetil alil pirofosfato. GPP: Geranyl pirofosfato. FPP: Farnesil pirofosfato. GGPP: Geranyl geranyl pirofosfato. Se señala el posible lugar de acción de los inhibidores del crecimiento.

Los datos que se conocen acerca de esta vía biosintética proceden en primer lugar de los estudios realizados con el hongo *Giberella fujikuroi* que es capaz de incorporar acetato, ácido mevalónico y otros precursores en giberelinas. También se han empleado cultivos de células libres de *Echinocystis macrocarpa*, *Cucurbita maxima*, *Ricinus communis*, *Pisum sativum*, *Zea mays*, *Lycopersicon esculentum*, etc.

La vía biosintética de las giberelinas propiamente dicha, puede considerarse que no comienza hasta la formación del trans-geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). El resto, desde la formación del ácido mevalónico, corresponde a vías biosintéticas comunes a la formación de esteroides e isoprenoides y otros compuestos de gran importancia. La primera etapa es la activación del ácido mevalónico para dar ácido mevalónico pirofosfato; esta reacción es catalizada por el ácido mevalónico quinasa que requiere para su actividad ATP y  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ . A continuación vendrá la formación de GGPP que se hace a expensas de isopentil pirofosfato (IPP) y dimetil alil pirofosfato (DMAPP) y se realiza en tres etapas catalizadas todas ellas por la GGPP-sintetasa: en la prime-

ra se forma geranil pirofosfato (GPP), en la segunda farnesil pirofosfato (FPP) y por último GGPP. La actuación de este enzima necesita  $Mn^{2+}$  para tener actividad máxima. Si en vez de  $Mn^{2+}$  se adiciona al medio de reacción  $Mg^{2+}$  se favorece la actividad de la FPP-sintetasa que cataliza la formación de FPP a partir de IPP.

En células libres de plántulas de guisante o calabaza, una relación alta  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$  favorece la formación de GGPP sobre FPP o farnesol. La actividad GGPP-sintetasa está asociada, al menos en parte, a los cloroplastos, pues fragmentos de cloroplastos lavados estimulan la formación de GGPP a partir de ácido mevalónico en presencia de enzimas del sobrenadante que catalizan las otras etapas. El hecho de que no se obtenga GGPP se debe a la elevada actividad fosfatasa asociada a las membranas cloroplásticas.

La formación de ent-kaureno a partir de GGPP se demostró en *Gibberella*, en células libres de *Echinocystis*, de *Cucurbita maxima* y en plántulas etioladas de *Ricinus communis* y en semillas de tomate en germinación. La reacción se hace en dos etapas, siendo el paso intermedio la formación del copalil pirofosfato; posteriormente, la reacción es catalizada por la kaureno sintetasa y es activada por  $Mg^{2+}$ . La ciclación de

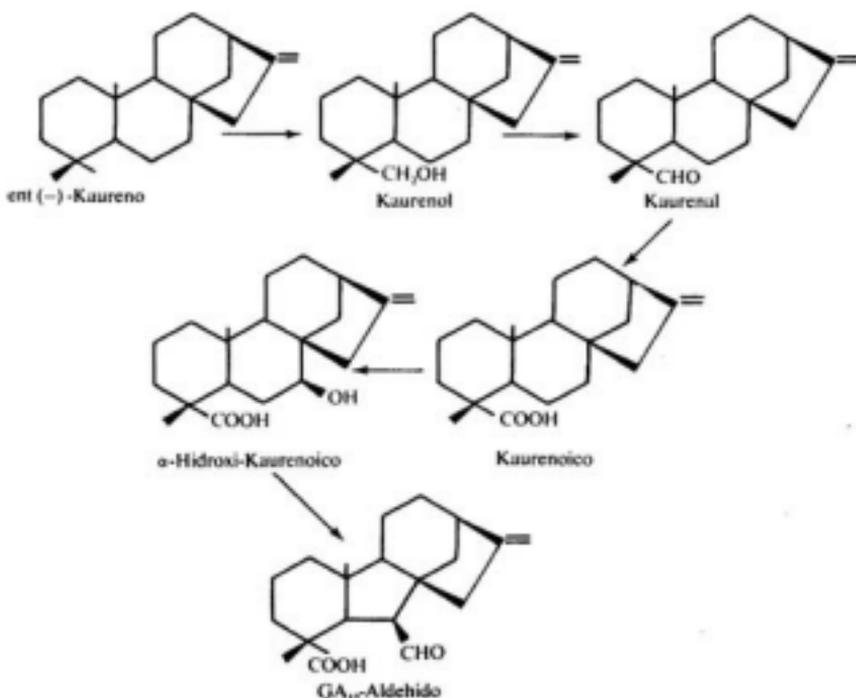


Figura 23.5.-Biosíntesis de las giberelinas, desde la formación ent(-)-kaureno hasta el aldehído de la  $GA_{12}$ .

GGPP a ent-kaureno se hace en dos etapas, pasando en la primera el GGPP a un biciclo intermedio, el copalil pirofosfato (CPP), y de éste pasa a ent-kaureno. El enzima que cataliza esta transformación es la ent-kaureno sintetasa en la cual se distinguen dos actividades, la A que cataliza el paso de GGPP a CPP y la B que cataliza el paso de CPP a ent-kaureno. Ambas parecen estar en distintos centros activos de la enzima o del complejo enzimático y necesitan  $Mg^{2+}$  para tener actividad máxima.

La biosíntesis de ent-kaureno puede inhibirse por una serie de compuestos clasificados como retardantes del crecimiento, pues su aplicación produce plantas enanas: AMO 1618, CCC (cloruro de 2, cloroetil trimetil amonio) y Fosfon D (cloruro de tributil-2,4-diclorobenzil fosfonio). Esta inhibición tiene lugar en el paso de GGPP a ent-kaureno y concretamente el paso de GGPP a CPP. La transformación de CPP a ent-kaureno es menos sensible a la acción de los retardantes del crecimiento.

A partir del ent-kaureno, la secuencia de reacciones se representa en la figura 23.5. Hay en primer lugar una oxidación del ent-kaureno a ent-kaurenol, luego a ent-kaurenal y por último a ácido ent-kaurenoico, éste es hidroxilado y se forma el ácido 7  $\alpha$ -hidroxikaurenoico; este compuesto tiene un recambio muy rápido y apenas se acumula. Por tanto, su detección es muy difícil y rápidamente se transforma en el aldehído de  $GA_{12}$ , al perder el C-7 por oxidación y contraer el anillo.  $GA_{12}$  aldehído será el primer producto de la biosíntesis de las giberelinas y a partir de este compuesto se formarán todos los demás (Fig. 23.6).

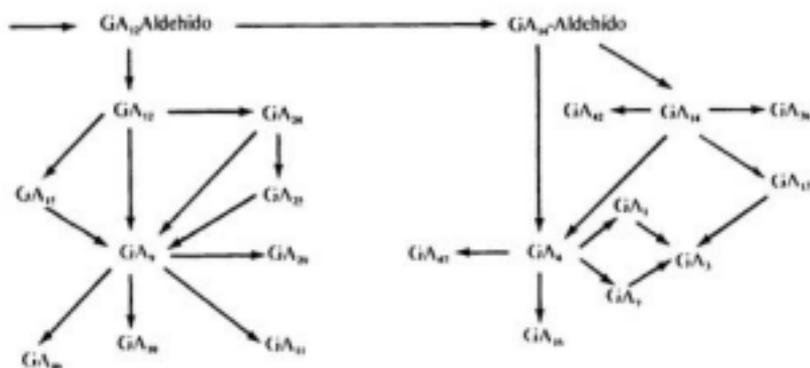


Figura 23.6.—Biosíntesis de giberelinas a partir de  $GA_{12}$ -aldehído en el hongo *Gibberella fujikuroi*. El paso de  $GA_{12}$ -aldehído a  $GA_{20}$ -aldehído se realiza mediante una hidroxilación en posición 3 $\beta$ .

La pérdida del átomo de C-20 para formar giberelinas de 19 átomos de carbono, no se sabe cómo se realiza, ya que no se han aislado intermediarios con un grado de oxidación superior al metileno.

### 23.4.1. Regulación de la biosíntesis de giberelinas

Se conoce muy poco acerca de cómo se regula la biosíntesis de giberelinas. Los candidatos más firmes a ejercer algún papel en esta regulación son la ciclación de GGPP para formar ent-kaureno y los mecanismos de desactivación de las giberelinas mediante la hidroxilación en posición  $2\beta$  y posterior glucosilación. Además, el hecho de que las giberelinas se sintetizan, al menos en parte, en el cloroplasto ha llevado a muchos investigadores a plantearse el problema de la compartimentalización en la regulación de los niveles de giberelinas y a estudiar el papel del fitocromo en este proceso, aunque también hay factores, como veremos más adelante, que influyen sobre los niveles de giberelinas, tales como luz, temperatura y otras hormonas.

Hemos dicho que la ciclación puede ser un punto de control y lo puede ser a nivel de la actividad A de la ent-kaureno sintetasa, puesto que se ha visto que la carencia de actividad ent-kaureno sintetasa está asociada muchas veces a la carencia solamente de la actividad A.

La hidroxilación en  $2\beta$  probablemente tiene lugar en todas las plantas superiores. Esta reacción no es reversible y acarrea una disminución o pérdida de la actividad biológica, pudiendo servir como medio de regular el nivel de giberelinas biológicamente activas.

La unión de giberelinas con glucosa es el derivado más común, formándose éteres glucosídicos en que la giberelina se une al azúcar a través de un grupo hidroxilo, o bien formándose ésteres en que los azúcares se unen a la giberelina por el carboxilo en 7. No obstante, en todos los casos se forma O- $\beta$ -D-glucopiranosil éteres o ésteres. Pueden actuar como almacenadores, ya que siempre se localizan en semillas maduras. Al germinar estas semillas se producirá la hidrólisis de los mismos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en algunos casos además de formarse el glucoderivado, puede producirse una hidroxilación en  $2\beta$ , con lo que habría pérdida de actividad, como ya hemos dicho anteriormente y, por tanto, no se trataría de un almacenamiento de giberelinas activas.

A medida que crece la plántula, ésta pierde la capacidad de hidrolizar las giberelinas glucosil ésteres o éteres, por lo que parece más probable que la forma de almacenamiento sea el éster más que el éter. Aún no hay suficiente evidencia en favor de que los ésteres glucosídicos regulen el nivel de giberelinas durante la maduración y germinación de las semillas.

Otro sistema de control en la biosíntesis de giberelinas es la compartimentalización de la misma en un orgánulo y donde las giberelinas serían liberadas bajo su regulación. Estos orgánulos serían los plastos, en los que se ha demostrado la existencia de giberelinas, y en ellos se realiza alguna de las etapas de su biosíntesis. Además, hay trabajos indicando una influencia del fitocromo sobre el nivel de giberelinas que pueden extraerse de los cloroplastos.

Hoy sabemos que las primeras etapas de la biosíntesis de giberelinas tienen lugar en los plastos. La membrana cloroplástica es impermeable al ácido mevalónico, por lo que el cloroplasto tiene que sintetizarlo.

No se ha demostrado la conversión de ácido mevalónico a ent-kaureno en plastos, puesto que la ácido mevalónico kinasa se pierde al extraer en medio acuoso. Sin embargo, en medio no acuoso se demuestra esta actividad en los cloroplastos, por lo que éstos

podrán formar a partir de ácido mevalónico el ent-kaureno y el paso a ent-7- $\alpha$ -hidroxi kaurenoico. No hay evidencia de que la biosíntesis de giberelinas esté reducida solamente a estos órganos.

Parece que la luz roja aumenta las giberelinas extraíbles de etioplastos y este efecto se revierte con luz del rojo lejano. Sin embargo, este efecto puede ser debido a un control de pasos específicos de la ruta biosintética de las giberelinas, liberación de giberelinas ligadas, aumento de la permeabilidad de la membrana o combinación de las tres posibilidades.

#### 23.4.2. Lugares de síntesis de giberelinas

Se producen giberelinas en ápices de tallos y raíces, en hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras y embriones en germinación. Quizá haya otros tejidos u órganos capaces de sintetizar giberelinas como es el caso ya citado de los cloroplastos.

Parece que las giberelinas se producen cuando se necesitan, ya que en semillas en germinación hay un aumento brusco que luego va descendiendo, probablemente por inactivación, una vez que no son necesarios los niveles elevados de hormona.

#### 23.5. Transporte de las giberelinas

Las giberelinas en aplicación foliar se desplazan junto con los productos de la fotosíntesis en el floema, aunque puede haber desplazamiento en el xilema probablemente por desplazamiento radial desde el floema al xilema. Las giberelinas endógenas se encuentran tanto en el floema como en el xilema, y a diferencia de lo que sucedía en el caso de las auxinas, no existe transporte polar de las giberelinas. El transporte de giberelinas en *Salix viminalis*, *Ulmus glabra* y *Acer platanoides* se ha demostrado que tiene lugar en forma de conjugados, lo que nos indica que las giberelinas conjugadas también se desplazan libremente en la planta.

Debemos hacer notar que en trabajos recientes con peciolo jóvenes de *Coleus*, que sí responden a la acción de las giberelinas, se ha estudiado el transporte en distancias cortas y se ha podido observar la existencia de un transporte polar muy similar al del AIA en el mismo sistema. La giberelina aplicada en el bloque donador, se recoge, aparentemente inalterada, en el bloque receptor al igual que le sucedía a la auxina.

#### 23.6. Papel fisiológico de las giberelinas

Al tratar en el capítulo anterior este tema en relación con las auxinas, decíamos que había que considerar el hecho de que cuando añadimos una de estas sustancias de forma exógena, la respuesta que obtenemos no será la fisiológica, sino una respuesta en general supraóptima. Además, en el caso de añadir una giberelina específica, ésta a lo sumo coincidirá con una de las naturales que contiene la planta. Por tanto, si un proceso no responde a la adición de giberelina exógena, no puede decirse que no es regulado

por giberelinas, pues puede suceder que no le apliquemos la giberelina específica que regula el proceso. Así, por ejemplo, la GA<sub>1</sub> hace florecer a las plantas de *Silene*, pero, sin embargo, GA<sub>3</sub> no ejerce ningún efecto sobre la floración de dichas plantas. Existen ensayos biológicos que resultan específicos en la detección de actividad de determinadas giberelinas, pudiendo utilizarse como sistema inicial de identificación (Tabla 23.2).

TABLA 23.2  
Actividades relativas de algunas giberelinas

	GA <sub>1</sub>	GA <sub>2</sub>	GA <sub>3</sub>	GA <sub>4</sub>	GA <sub>5</sub>	GA <sub>6</sub>	GA <sub>7</sub>	GA <sub>8</sub>	GA <sub>9</sub>
Endospermo de cebada .....	++++	++++	++++	+++	++	++	+++	+	+
Guisante enano .....	+++	++	++++	+++	+++	++	+++	+	++
Hipocótilo de lechuga .....	+++	++	+++	++	++	++	++++	+	+++
Hipocótilo de calabaza ....	++	++	++	+++	+	+	++++	0	+++
Floración de silene .....	0		0	0	0		+		
Floración de Myosotis .....	+		0	0	0		+	0	

Una forma de estudiar la acción fisiológica de las giberelinas, sería utilizar plantas o partes de plantas en que el nivel de las mismas estuviera reducido; como consecuencia, el proceso que se trata de estudiar se encontraría inhibido y al añadir giberelinas exógenas se obtendría una respuesta normal. Este método no ha dado resultados para el estudio de las giberelinas, ya que las regiones de una planta que responden a las giberelinas, también son capaces de producirla en muchos casos.

Un método muy útil para el estudio de la actividad fisiológica de las giberelinas es utilizar plantas que presenten un bloqueo genético en la biosíntesis de las mismas. Estas plantas con frecuencia son enanas. Pero hay que tener la seguridad de que el enanismo que se produce es debido al bloqueo de la biosíntesis de giberelinas y no a otras causas, como la presencia de inhibidores o la falta de capacidad para responder a las giberelinas. De ahí que previamente haya que comprobar cuál es el nivel de giberelinas endógenas en la planta objeto del estudio.

Existe un procedimiento de reducir el nivel de giberelinas endógenas artificialmente en una planta, mediante el empleo de sustancias retardantes del crecimiento, por medio de un grupo de sustancias que causan enanismo al aplicarlo a las plantas, entre las que cabe citar: CCC, Amo 1618, Fosfon D y B995, cuyas fórmulas se representan en la figura 23.7. A primera vista queda claro que no existe ninguna semejanza entre ellos, ni tampoco con las giberelinas. Para algunos de ellos se ha demostrado su capacidad de actuar como inhibidores de la biosíntesis de las giberelinas, el enanismo que producen puede invertirse mediante la aplicación de giberelinas. Existen plantas que no responden al tratamiento con alguno de estos retardantes, siendo debido este fracaso a que la sustancia no penetra bien en la planta o a procesos de destrucción de la misma en el interior, que la planta pone en marcha como medida de detoxificación.

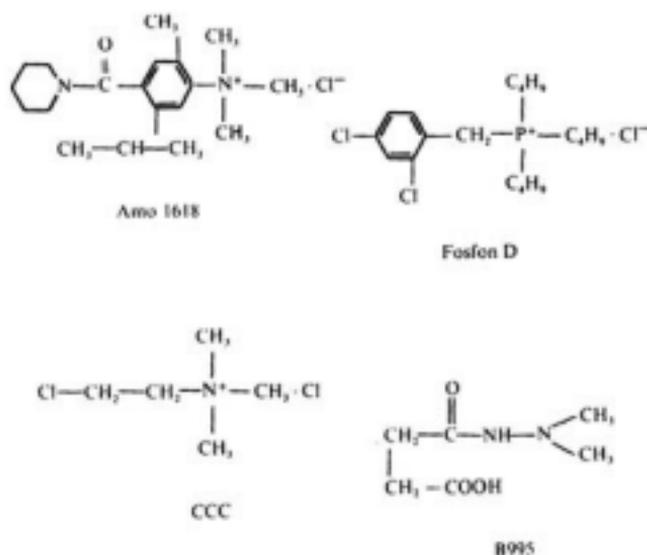


Figura 23.7.—Estructuras de inhibidores sintéticos del crecimiento que actúan sobre la biosíntesis de giberelinas.

Los cambios en el tamaño de las plantas producidos al aplicar giberelinas, hace que nos planteemos la cuestión de si estos resultados son cambios en el número de células, en el tamaño de las mismas o combinación de ambos. Hoy está perfectamente demostrado que el último caso es la consecuencia del tratamiento con giberelinas. La influencia de las giberelinas sobre el crecimiento puede efectuarse a través de cada una de las regiones del tallo que contribuyen al crecimiento longitudinal: el meristemo apical, el subapical y la zona de elongación. El meristemo apical, parece que funciona independientemente de la presencia o no de giberelinas, la actividad mitótica es exactamente igual en plantas enanas o normales y la aplicación a plantas de crisantemos de CCC o Amo 1618 no afecta al meristemo apical, aunque produzcan enanismo.

A veces el meristemo apical, o sea, los brotes, pueden quedar en estado de dormición que puede romperse, como en el caso del melocotonero, mediante la aplicación de giberelinas. Por otra parte, la ruptura de la dormición en condiciones naturales viene acompañado de un aumento de giberelinas endógenas, aunque otras sustancias pueden jugar un importante papel en la regulación del proceso (Cap. 32).

En el meristemo subapical la actividad mitótica si está regulada por el nivel de giberelinas. En estudios realizados con beleño se observó que esta planta en estado vegetativo está al estado de roseta, el tallo es corto, porque no existe actividad en los meristemas subapicales. Al aplicar giberelinas, el meristemo subapical se activa, se dividen las células y el tallo crece. Esto se denomina caulescencia, precede a la floración

(Cap. 31) y en circunstancias naturales viene acompañado de un aumento del contenido en giberelinas.

Sobre la elongación celular, la influencia de las giberelinas no es tan clara, siendo el suyo un papel más bien secundario, correspondiendo el papel más importante a las auxinas, ya que en trozos de tallo, donde cabe esperar que el contenido en giberelinas sea muy bajo, éstas no ejercen ninguna influencia sobre la elongación de los mismos.

Las giberelinas no ejercen ninguna influencia sobre el crecimiento de las raíces, probablemente por carecer éstas de un meristemo subapical. Sin embargo, inhiben el enraizamiento de estaquillas, así como algunos casos de nodulación radicular. Sobre el crecimiento de las hojas algún papel deben jugar las giberelinas, aunque no está claro cuál es, existe el dato experimental de que al iluminar hojas etioladas se registra un considerable aumento en el contenido de giberelinas en las mismas. Por otra parte, las plantas enanas no presentan ningún retraso en la expansión de sus hojas, aunque sabemos que el contenido en giberelinas puede estar considerablemente disminuido.

Otros muchos procesos están influidos, al menos en parte, por las giberelinas, como, por ejemplo, la germinación de semillas de cereales (Cap. 33), el crecimiento de los frutos (Cap. 34), la floración (Cap. 31) y otros que se irán viendo con más detalle en los capítulos correspondientes.

### 23.7. Mecanismo de acción de las giberelinas

Podemos suponer a la vista de la poca flexibilidad que permite la estructura de las giberelinas, que éstas para ser activadas deben acoplarse a un receptor subcelular; la estabilidad y orientación de la asociación giberelina-receptor depende de las cargas de ambos componentes. Así es necesario un grupo carboxilo ionizable en posición 7, ya que si este carboxilo se metila la actividad disminuye considerablemente, lo que implica a su vez la existencia de una carga positiva en el lugar de acción. La existencia del anillo lactónico y de una situación concreta del anillo D son esenciales para el correcto acoplamiento de la hormona en el receptor.

La estrecha relación estructural que presentan las giberelinas respecto a las hormonas esteroídicas animales sugiere que su mecanismo de acción podría ser análogo. Por tanto, si en animales la hormona se une a un receptor específico, un comportamiento similar cabría esperar de las giberelinas. En este caso haría falta una proteína transportadora que se uniera a la hormona y le permitiera atravesar la membrana celular, una vez en el interior de la célula se fijaría a una proteína receptora, y la asociación hormona-receptor pasaría al interior del núcleo donde alteraría la síntesis de RNA.

Se ha buscado una proteína receptora en el citoplasma capaz de ligar específicamente a GA<sub>1</sub> y aunque no hay pruebas concluyentes, parece que a falta de más datos cinéticos y físicos podría atribuirse a los GAs un comportamiento análogo al de las hormonas esteroídicas.

Sin embargo, tampoco puede desecharse la existencia de receptores solubles y aunque no hay evidencia directa de acumulación en el núcleo de radiactividad suministrada por GAs marcadas, hay datos que permiten atribuir a las GAs un papel regu-

lador de la transcripción, aumentando en un 90 por 100 la velocidad de incorporación de un precursor marcado de RNA en entrenudos de guisante. Estos hechos vienen apoyados por el aumento de la actividad RNA polimerasa en plantas tratadas con GA<sub>3</sub>. Pero el sistema que más evidencia ha producido en favor de una influencia de los GAs a nivel de transcripción es sin duda el de las células de aleurona de semillas de cebada. Tras 4 horas de aplicar GA<sub>3</sub> se detecta un aumento en la incorporación de nucleósidos en diferentes formas de RNA. Mediante técnicas de inmunoprecipitación se ha detectado e identificado un solo polipéptido con propiedades análogas a  $\alpha$ -amilasa. Estos datos son la prueba más consistente del papel de las GAs en la regulación de la transcripción y que se expresa como un aumento del m-RNA de la  $\alpha$ -amilasa. Este aumento de m-RNA puede ser a causa de una menor degradación, un aumento de la capacidad de traslación del m-RNA para  $\alpha$ -amilasa o síntesis de nuevas moléculas de m-RNA.

De todas formas, no conviene perder de vista que debido al retraso entre la aplicación de la GA y la obtención del máximo de respuesta no puede asegurarse que ésta sea la respuesta primaria a la GA, otros acontecimientos pueden ocurrir previamente a la influencia sobre la transcripción.

Otro posible lugar de acción primaria de los GAs sería sobre la organización de las membranas. En efecto, cuando se tratan células con GAs se observa de forma muy destacada el retículo endoplasmático, tanto el liso como el rugoso, en relación con las células no tratadas, que pueda atribuirse o a un aumento del retículo endoplasmático o a un cambio en la organización de membranas preexistentes. Se ha observado como consecuencia de la adición de GAs aumento de la síntesis de algunos constituyentes de membranas como lecitina, o mayor tasa de incorporación de colina-C<sup>14</sup> en retículo endoplasmático, así como un estímulo en la formación de polisomas y del número de ribosomas por célula. Todos estos datos indican que GA<sub>3</sub> puede regular la formación de polisomas y de retículo endoplasmático rugoso, ya sea a consecuencia de la transcripción o por influencia directa sobre los mismos orgánulos. Sin embargo, parece que el aumento de membrana y retículo endoplasmático rugoso en células de aleurona de semillas de cebada como consecuencia de aplicar GA<sub>3</sub> son efectos secundarios derivados de un aumento de producción de RNA.

Cabe citar otra posibilidad, y es la interacción de GAs con las membranas celulares a través de un receptor localizado sobre las mismas; los estudios realizados en busca de este posible mecanismo de acción se han realizado fundamentalmente con membranas artificiales, esto es, liposomas producidos mediante la dispersión de fosfolípidos en un medio acuoso y que encierran en su interior un marcador, bien sea un azúcar o un colorante. Se ha observado que en presencia de GA<sub>3</sub> la desorción del trazador del interior de los liposomas aumenta proporcionalmente a la concentración de GAs presente. Un comportamiento análogo ha sido demostrado para las hormonas esteroidicas. Las GAs y hormonas esteroidicas, y a diferencia de los detergentes, no ocasionan una rotura completa de las membranas liposómicas.

La explicación al papel de estos compuestos en la alteración de la permeabilidad de los liposomas puede buscarse en que se inserten en la matriz formada por fosfolípidos y colesterol que presentaría una gran ordenación, de tal forma que estas moléculas al introducirse entre ellos producirían discontinuidades y, por tanto, se alteraría la

permeabilidad de la membrana. Sin embargo, y a pesar de lo atractivo que resulta la existencia de un receptor de membrana para explicar el mecanismo de acción de las GAs, aún no se han obtenido resultados concluyentes; por otra parte, el fracaso que ha supuesto la detección de receptores proteicos, no quiere decir que no haya que seguir investigando en este sentido.

### **23.8. Influencia de los factores ambientales y otras hormonas sobre las giberelinas**

De los factores ambientales, el de más clara influencia es la luz. Las giberelinas se oponen a la inhibición del crecimiento del tallo causada por la luz en guisantes, alubias, calabazas y otras plantas. Por otra parte, se había visto que en guisantes, el enanismo era consecuencia de la luz, pues cuando las plantas crecían en la oscuridad, todas lo hacían igual, sin que se manifestaran los síntomas de enanismo. Sin embargo, cuando se analizan los niveles de giberelinas en distintas plantas, y se trata de cuantificar las diferencias entre variedades enanas o normales, o entre plantas crecidas en la luz o en oscuridad, los resultados que se encuentran resultan muy conflictivos.

Donde se tienen resultados más uniformes es cuando se estudia la influencia de la irradiación en periodos cortos con luz roja, ya que al extraer giberelinas se obtiene un aumento considerable de su actividad. Este aumento producido por la luz roja, es probablemente causado por el fitocromo (Cap. 30) al liberar las giberelinas de las membranas a que se encuentran ligadas, como se demostró en experimentos realizados con preparaciones de membranas de distinto origen. A mayor abundamiento, el aumento de giberelinas puede inhibirse iluminando con luz del rojo lejano.

Otro aspecto de la luz que influye sobre el contenido de giberelinas es el fotoperíodo (Cap. 31) y así se ha visto que las giberelinas pueden sustituir el fotoperíodo en las plantas de día largo, lo que llevó a pensar que un efecto del día largo sería incrementar la síntesis de giberelinas y efectivamente así se ha demostrado en algunas especies.

Otro factor ambiental que también ejerce una importante influencia sobre el contenido de giberelinas es la temperatura, cuya influencia se ha estudiado en relación con la ruptura del período de dormición en semillas (estratificación) y en la inducción de la floración (vernalización). En ambos casos, la aplicación de giberelinas puede sustituir el tratamiento por el frío, que aumenta el contenido de giberelinas.

En cuanto a la influencia de otras hormonas, debemos repetir lo que decíamos al hablar de las auxinas: el problema de la interrelación hormonal es muy complejo y hay pocos estudios concluyentes que nos indiquen la influencia de otras hormonas sobre los niveles de giberelinas. Parece que las citoquininas retardan la senescencia (Cap. 35) precisamente por impedir la desaparición de las giberelinas, como se ha demostrado con hojas de trigo tratadas con citoquininas en las que el nivel de giberelinas es mayor que el de las no tratadas.

Otra hormona a la que se le atribuye un papel de inhibidor de la biosíntesis de las giberelinas es el ácido abscísico (Cap. 26), ya que se ha observado que este compuesto es capaz de inhibir el aumento de giberelinas que acompaña a las plantas de espinacas sometidas a días largos. De todas formas, si la luz lo que ocasiona es la liberación de

giberelinas unidas a membranas, el ácido abscísico más que actuar sobre la biosíntesis lo haría sobre la permeabilidad de la membrana.

El concepto de interacción hormonal aún sigue poco claro y será preciso más experimentación, más teorías y su posterior confirmación o refutación para avanzar en este campo de estudio tan sumamente atrayente.

---

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- AUDUS, L. J.: *Plant Growth Substances*, vol. 1, *Chemistry and Physiology*. Leonard Hill, Londres, 1972.
- CLELAND, R. E.: *The Gibberellins*, en: *Physiology of Plant Growth and Development* (Ed. por M. B. Wilkins) McGraw-Hill, Londres, 1969.
- GRAEBE, J. E., y ROPERS, H. J.: *Gibberellins*, en: *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*, vol. 1 (Ed. por D. S. Letham, P. B. Goodwin y T. J. W. Higgins) Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978.
- HEDEN, P.; McMILLAN, J., y PHINNEY, B. O.: *The Metabolism of the Gibberellins*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», núm. 29, 1978, págs. 149-192.
- JONES, R. L.: *Gibberellins: their physiological role*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», núm. 24, 1973, páginas 571-598.
- LESHEM, Y.: *The Molecular and Hormonal Basis of Plant Growth Regulation*, Pergamon Press, Oxford, 1973.
- RAILTON, I. D.: *Aspects of Gibberellin Biosynthesis in Higher Plants*, «S. Afr. J. Sci.», núm. 72, 1976, págs. 371-377.
- STODDART, J. L., y VENES, M. A.: *Molecular and Subcellular Aspects of Hormone Action*, en: *Hormonal Regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlín, 1980.
- ZERONI, M., y HALL, M. A.: *Molecular Effects of Hormone Treatment on Tissue*, en: *Hormonal Regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlín, 1980.

## CITOQUININAS

En los capítulos precedentes hemos hablado de dos tipos de hormonas que actúan sobre la elongación celular. Vamos a dedicar éste a un grupo de sustancias denominadas citoquininas que regulan la división celular.

Ya en el año 1913, Haberlandt encontró que de los tejidos floemáticos difundía una o unas sustancias capaces de inducir la división celular en el tejido parenquimático de patata. Esto hizo que se confirmara la idea de Wiesner, expuesta en 1892, de que tenía que existir en las plantas un sistema que controlase la división celular. Posteriormente, el mismo Haberlandt observó que cuando se colocaban células machacadas alrededor de una herida se aumentaba la división celular alrededor de la misma, efecto que desaparecía cuando se procedía al lavado de la herida retirando los restos celulares colocados sobre ella.

Como consecuencia de los estudios sobre cultivos de tejidos y los problemas que se planteaban, Skoog observó que los segmentos de tallo de *Nicotiana tabacum* variedad Wisconsin número 38, que incluían corteza, vasos y médula, no crecían bien en un medio simple y necesitaban añadirle una auxina para que hubiera alargamiento y proliferación de la médula. Por otra parte, si se colocaba la médula aislada y se añadía auxina, se observaba un enorme alargamiento de las células sin que, por el contrario, se observara división de las mismas. Sin embargo, cuando la médula se ponía en contacto con tejido vascular, podía observarse de nuevo división celular. Estos resultados llevaron a la búsqueda de una sustancia responsable de la inducción de la división celular que actuara de la misma forma que lo hacía la sustancia desconocida del tejido vascular.

Se encontró que la leche de coco, extracto de malta, extracto de levadura y DNA sometido al autoclave, presentaban elevada actividad como inductores de la división celular. Del producto de someter al autoclave DNA de esperma de arenques, se obtuvieron los primeros cristales de una sustancia que inducía división celular. Este producto era activo a concentraciones bajísimas de  $10^{-9}$  M. Por su acción sobre la citocinesis se le denominó kinetina o quinetina (quizá en una traducción más correcta debería denominarse cinetina). La quinetina o 6-furfuril amino purina se vio que era un derivado de la purina (Fig. 24.1).

Poco después del descubrimiento de la quinetina se sintetizaron un gran número de compuestos con propiedades análogas. Se demostró que la cadena lateral de la quinetina podía sustituirse, dando compuestos con una actividad igual o mayor

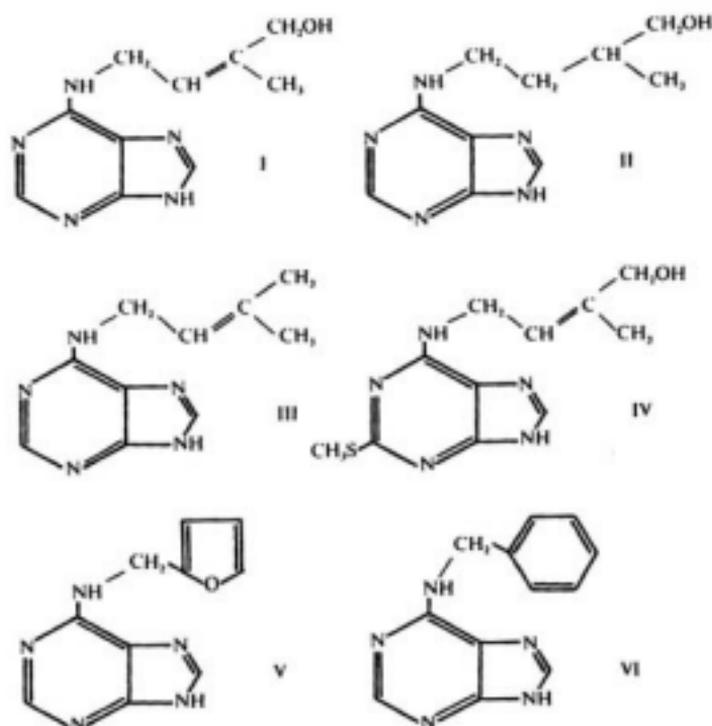


Figura 24.1.—Estructura de algunas citoquininas naturales (I: Zeatina, II: Dihidrozeatina, III: Dimetilalil adenina, IV: Metil zeatina) y de síntesis (V: Quinetina, VI: Benzil adenina).

de la que posee la quinetina. Sin embargo, alteraciones en la parte adenínica de la molécula reducían la actividad o la anulaban.

Existen algunos compuestos que, sin ser del grupo de las citoquininas, presentan propiedades de tales en algunos bioensayos. Puede pensarse que estos compuestos actúen como precursores de la formación de adenina que sería el único núcleo activo. De esta forma, se establece una relación entre estructura y actividad en las citoquininas, en que para ser activas sería necesario la presencia de un grupo hidrofílico muy específico (adenina) y otro grupo lipofílico con poca o nula especificidad.

### 24.1. Citoquininas naturales

Durante mucho tiempo se dudó de la existencia de citoquininas en las plantas, a pesar de que había muchos datos y observaciones que presagiaban su existencia. En la

leche de coco existen sustancias con actividad citoquinina, ya que citoquinina y leche de coco son equivalentes para mantener el crecimiento de muchos cultivos de tejidos. Sin embargo, hay ciertos cultivos de tejidos que al cabo de cierto tiempo son capaces de desarrollarse en ausencia de citoquininas o de auxina o incluso de ambas a la vez; estos son los cultivos acostumbrados, que sólo necesitan un medio básico para desarrollarse, pues son capaces de autoabastecerse de estas sustancias hormonales.

Además de en la leche de coco, se encontró actividad citoquinina en jugo de tomate, extractos de flores, en raíces, tubérculos y nódulos radiculares; en exudados de xilema y floema también se ha detectado la presencia de citoquininas. En general, una buena fuente de citoquininas la constituyen los frutos y las semillas inmaduras, observándose en éstas un aumento durante la germinación. De semillas de maíz logra aislar Miller una citoquinina que era una adenina sustituida en el grupo amino 6, con una cadena lateral insaturada y que tras cristalización y estudio de sus propiedades por Letham se le denominó Zeatina.

En hidrolizados de t-RNA de plantas, animales o microorganismos se encuentran citoquininas. Parece que están asociadas con t-RNA específicos, constituyentes de una pequeña proporción del total de t-RNA. Estos t-RNA se asocian con algunos codones que empiezan por U. Sin embargo, estos datos no demuestran que la actividad promotora del crecimiento de las citoquininas se relacione con su presencia en este t-RNA.

El aislamiento de las citoquininas se hace mediante técnicas análogas a las descritas para otras hormonas, es decir, extracción con mezclas hidroalcohólicas y partición en solventes seguido de una posterior purificación de los extractos mediante cromatografía en papel, capa fina o columna. La identificación se hace mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas.

Además de la Zeatina, citada anteriormente, otras sustancias con actividad citoquinina fueron aisladas en otras plantas, aunque hasta la fecha la de distribución más universal sea ésta. Se conocen hoy un gran número de compuestos con actividad citoquinina, de algunos de los cuales damos su fórmula química en la figura 24.2.

## 24.2. Acción fisiológica de las citoquininas

Como ya hemos visto, las citoquininas estimulan la división celular en cultivos de tejidos vegetales no meristemáticos. Si un cultivo de médula de tabaco crece en presencia de AIA, hay algo de mitosis, pero apenas existe división celular, formándose células binucleadas. Al añadir una citoquinina hay un aumento de la mitosis acompañado de citocinesis (Fig. 24.2). Algo parecido sucede también en raíces de guisantes de olor, induciendo la división en células maduras de la corteza radical que normalmente duplicarían sus cromosomas, pero nunca con división. Se ha observado que las citoquininas pueden iniciar la mitosis en la radícula de semillas no germinadas de lechuga. Sin embargo, hasta que no se demuestre que las citoquininas naturales regulan la división celular, cabe pensar que la división celular puede ser solamente una respuesta a un proceso más fundamental del mecanismo de acción de las citoquininas.

Las citoquininas estimulan el alargamiento de células en discos de hojas etioladas, cuyo efecto no podía ser causado con auxina, e incluso lograban alargar células de hojas

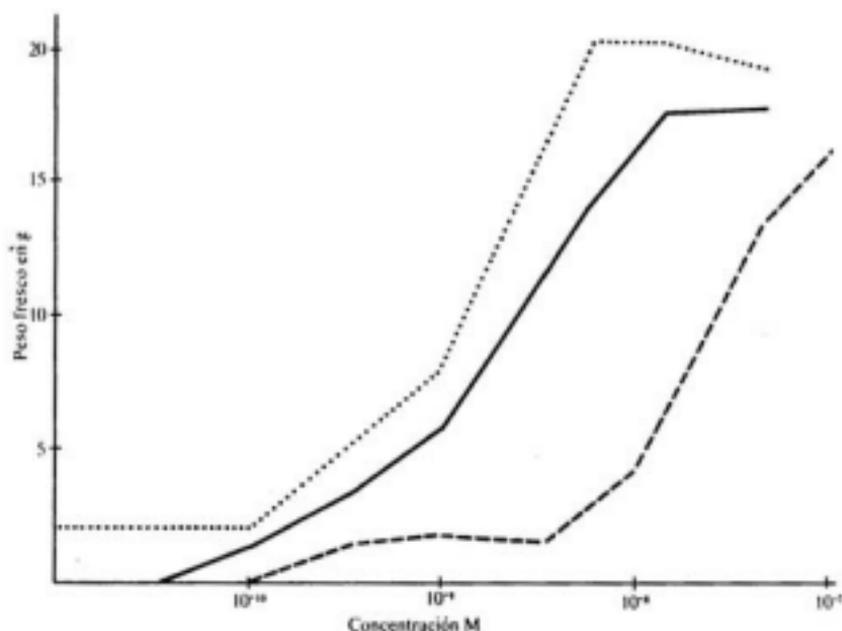


Figura 24.2.-Influencia de distintas citoquininas sobre el crecimiento de callo de tabaco. .... Zeatina.  
 — Dimetil alil adenina. — Quincetina.

desarrolladas. Se ha demostrado esta acción de las citoquininas sobre raíces de tabaco, donde las células pueden aumentar hasta cuatro veces su volumen inicial. Aunque inhiben la elongación de las secciones de tallo de guisante, favorecen el ensanchamiento de las células, ocasionando aumento del diámetro de las secciones y, como consecuencia, un aumento del peso fresco y del peso seco sin que exista alargamiento.

Las citoquininas también ejercen una acción morfogénica, ya que inducen la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos en condiciones apropiadas. Cuando se cultivan segmentos de tallo de tabaco, y se añade AIA al medio en una concentración de 5 µg/l, se inhibe la formación de brotes que aparecen normalmente en un medio control. Este efecto inhibitorio de la auxina podía invertirse añadiendo citoquininas. Sin embargo, debe existir un balance entre las cantidades de ambas hormonas. Así, 2 mg/l de AIA y 0,02 mg/l de quincetina añadidos al medio donde crece la médula de tabaco, hacen que ésta prolifere de forma indiferenciada. Al aumentar la cantidad de quincetina con respecto a la de auxina, se induce la formación de brotes, que pueden desarrollarse y dar lugar a la formación de una plántula. Por el contrario, si la relación entre quincetina y auxina disminuye, lo que se logra es favorecer la diferenciación de raíces.

En general las citoquininas exógenas inhiben la elongación del eje principal de las

raíces. Esto parece una paradoja, pues como veremos más adelante, las raíces son el lugar de síntesis de las citoquininas, la explicación puede radicar en que la aplicación exógena crea niveles supraóptimos que resultan inhibidores. A veces las citoquininas estimulan la formación de raíces laterales a las mismas concentraciones que inhiben el crecimiento de la raíz principal.

Existe otra amplia gama de procesos en que las citoquininas actúan influyendo sobre procesos de diferenciación, como pueden ser: maduración de proplastos en cloroplastos, inducción de la partenocarpia en frutos, inducción de la floración en plantas que normalmente requieren frío o días largos para florecer.

Las citoquininas pueden sustituir a la luz roja para romper el reposo de semillas de lechuga o actuar como sinergistas de la luz cuando ésta actúa estimulando la germinación (Fig. 24.3). También pueden interrumpir el período de dormición en brotes de *Vitis* y en *Lemma minor*.

Otra actividad de las citoquininas es la capacidad que poseen de retrasar la senescencia, como demostraron Richmond y Lang, al retrasar el tiempo de desaparición de la clorofila en hojas de *Xanthium* y la degradación de las proteínas que acompaña el envejecimiento. A la vista de estos datos, parece que las citoquininas participan en procesos de envejecimiento en condiciones naturales, ya que está perfectamente demostrado que participan como agentes movilizadores, dirigiendo el movimiento de numerosas

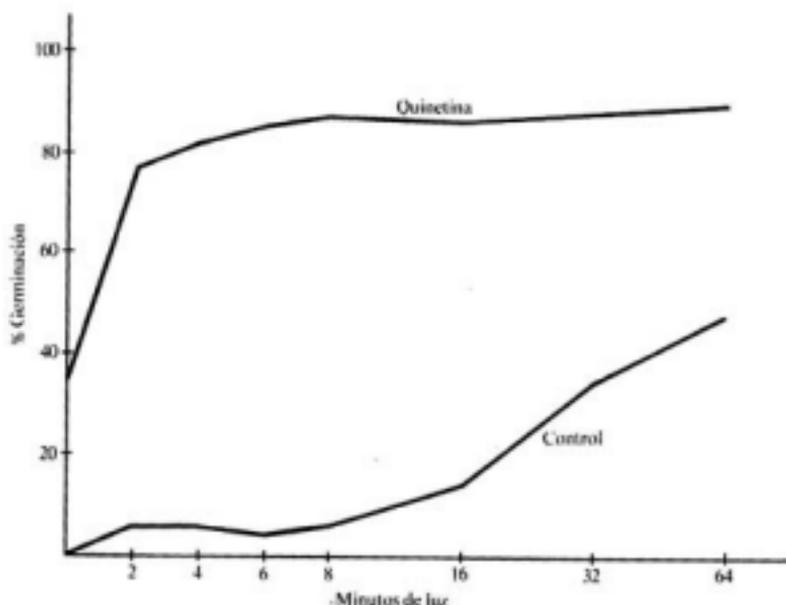


Figura 24.3.—Estimulación de la germinación de semillas de lechuga por la luz en presencia y en ausencia de quinetina.

sustancias hacia las áreas de la planta donde se aplican. Así, al aplicar una gota de citoquinina en una hoja, puede observarse cómo un aminoácido marcado o cualquier otra molécula marcada y aplicada en un lugar a cierta distancia del depósito de citoquininas, se dirige a lo largo de los conductos de la hoja hacia el punto de aplicación de la citoquinina (Fig. 24.4). Pueden, así, las citoquininas atraer a sustancias de muy diversas características, incluso auxinas. Esto podría servir para justificar su papel como retardadores de la senescencia. Sin embargo, en estudios realizados en discos de hoja de *Xanthium*, las citoquininas retrasan la senescencia aunque no haya sustancias que movilizar. En estos experimentos se comprobó que la relación RNA/DNA, o proteínas/DNA, aumentaba, por lo que cabe deducir que las citoquininas pueden inhibir la senescencia al mantener en funcionamiento la maquinaria sintetizadora de proteínas mediante la regulación de la síntesis de RNA.

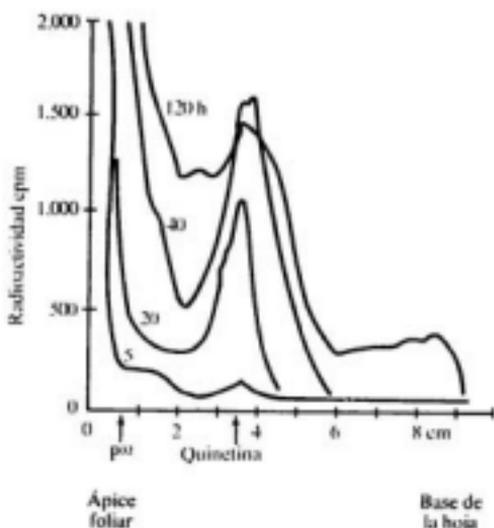


Figura 24.4.—Movilización de  $P^{32}$  aplicado en el ápice de una hoja de maíz, hacia la zona donde se aplicó quinetina (las flechas indican las zonas de aplicación).

Las citoquininas ejercen una extensa gama de acciones, en las que ha sido difícil hallar una relación fundamental. Así, por ejemplo, previenen los efectos tóxicos de ciertos agentes fitopatógenos. También influyen sobre la actividad de ciertas enzimas, aumentando la actividad RNA-sintetasa en discos de hojas y disminuyendo la actividad ribonucleasa y algunas enzimas de la vía de las hexosas monofosfato.

Las citoquininas causan una reducción del contenido en alcaloides en plantas del género *Datura*, regulan el nivel de escopoletina y escopolina en cultivos de tejidos de

tabaco, aumentan la producción de antocianinas en pétalos de *Impatiens balsamina*. Algunos de estos procesos se verán con más detalle en posteriores capítulos.

### 24.3. Transporte de las citoquininas en la planta

Las citoquininas se mueven poco o nada en las plantas. Así, al añadir aminoácidos u otras moléculas marcadas éstas se desplazan hacia el lugar de aplicación de la citoquinina y se acumulan en sus proximidades. Al estudiar la dominancia apical, también veremos que las citoquininas son prácticamente inmóviles.

Sin embargo, la presencia de citoquininas en el xilema y en el floema de las plantas, indica que estas hormonas se transportan a través de ambos tejidos. En el jugo xilemático se identificó zeatina, zeatina ribósido y dihidrozeatina, aunque parece que la forma más adecuada para el transporte sea como ribósido de zeatina, ya que es responsable de la mayor parte de actividad medida en los bioensayos. Los niveles de citoquininas en los exudados radiculares fluctúan en función del estado de desarrollo de la planta, la estación y las condiciones ambientales en que se encuentra.

En algunos casos, como demostró Osborne, en segmentos de peciolo, al aplicar 6-benzilaminopurina, se detecta un movimiento polar en sentido basipétalo y este movimiento se incrementa en presencia de AIA, variando, además, dicho movimiento en función de la edad de los tejidos y de la concentración de AIA. Posteriormente se demostró que el movimiento de las citoquininas era basipétalo en segmentos de peciolo e hipocótilos y acropétalo en segmentos de raíces. De todas formas, los diferentes investigadores no están de acuerdo acerca de este tipo de movimiento y hay quien lo pone enteramente en duda.

Hemos visto que las citoquininas aplicadas a hojas ejercen un efecto localizado, a no ser que se pongan en contacto con una vena principal. Entonces hay desplazamiento en el sistema vascular hacia la zona distal con respecto al punto de depósito de la hormona, lo que nos indica que hay transporte en la corriente transpiratoria. La existencia de este transporte también se pone de manifiesto porque se absorben fácilmente por las raíces y se desplazan a través de la planta por la corriente transpiratoria, llegando hasta las hojas. En este sentido, se puede aportar los resultados obtenidos al trabajar con plantas de girasol, en que el exudado del xilema mantiene un contenido alto de citoquininas durante varios días, sugiriendo que las citoquininas son producidas continuamente en las raíces y son transportadas por el xilema al tallo y resto de la planta.

Recientemente se han encontrado citoquininas en el jugo del floema de diversas plantas, aunque no han sido identificadas, bien pudiera que se tratara de zeatina, zeatina ribósido y zeatina glucósido. El transporte de citoquininas en el floema puede ser tanto de órgano a órgano como de raíz a tallo o viceversa; cabe entonces la posibilidad de un reciclado o circulación de citoquininas. Aquellas que son producidas en la raíz (zeatina y su ribósido) son transportadas a lo largo del xilema hacia las hojas donde se acumulan en primavera y principios de verano. Cuando la hoja alcanza su máximo desarrollo, estas citoquininas son metabolizadas y los metabolitos (glucósidos de citoquininas) son exportados vía floema a otros órganos, probablemente a los frutos.

Vemos, por tanto, que el movimiento de citoquininas en la planta no es sólo un transporte de la raíz al tallo a lo largo del xilema, sino que hay una redistribución amplia por la planta, implicando al floema en este proceso.

#### 24.4. Valoración biológica de las citoquininas

Como ya hemos visto al tratar de las auxinas y giberelinas, la detección, purificación y en último término la caracterización química de las citoquininas, se basa en la sensibilidad y especificidad de los ensayos biológicos. Vamos a considerar algunos de los más importantes.

El primero de los ensayos utilizados fue, naturalmente, el basado en la proliferación de tejido parenquimático de médula de tallo de tabaco tal como lo describió Miller. El procedimiento consiste en cultivar fragmentos estériles de médula en un medio básico adicionado de sustancias orgánicas y vitaminas. En este medio el cultivo de callo responderá a la aplicación de citoquininas, pudiéndose obtener resultados al cabo de 3 ó 4 semanas. El parámetro que se utiliza para determinar la cantidad de citoquininas presente es la medida del peso fresco, siendo el método lineal entre las concentraciones de 1 a 15  $\mu\text{g/l}$ . Este bioensayo es muy sensible y pueden detectarse concentraciones del orden de  $5 \times 10^{-11}$  M.

No sólo puede utilizarse médula de tabaco para valorar citoquininas. Otros autores han utilizado callos producidos a partir de haba de soja y tejido floemático de raíz de zanahoria. En éste se observa un aumento del peso fresco y del número de células como respuesta a la aplicación de citoquininas, además la sensibilidad del método puede mejorarse si se omiten algunas vitaminas del medio de cultivo.

Basándose en el hecho de que las citoquininas pueden actuar como estimulantes del crecimiento de hojas, en contra de la acción inhibitoria de las auxinas, se pueden utilizar discos de hojas de plantas etioladas que se colocan flotando sobre la solución de citoquininas a valorar a una temperatura e iluminación constante. Al cabo de 2 ó 3 días se observa que los discos que estaban sobre la solución de citoquininas han aumentado de diámetro o de peso en relación con aquellas que flotan en la solución control. El incremento de peso se ha visto que es proporcional al logaritmo de la concentración de citoquinina ensayada entre 0,003 a 1,0  $\mu\text{g/l}$ . Las especies utilizadas en este ensayo pueden ser *Phaseolus vulgaris* o *Raphanus sativus*.

Otro material muy utilizado en la valoración de las citoquininas son las frondes de *Lemna minor*. Se mide la expansión de la fronde en presencia de citoquininas, comparándola con un control preestablecido. La ventaja de este método es que la respuesta es prácticamente lineal y proporcional a la concentración de citoquinina desde 0,05  $\mu\text{M}$ , en vez de medir ganancia en peso fresco de las frondes, puede usarse el aumento del número de frondes, aunque naturalmente este ensayo sería más largo y, por tanto, con más posibilidades de verse afectado por problemas de contaminación.

Las citoquininas son capaces de retrasar el amarilleamiento de las hojas cuando llega la época de envejecimiento, si se aplican a la superficie foliar. Esto es lo que se denomina efecto Richmond y Lang, que es un fenómeno que puede utilizarse como método de valoración. El procedimiento consiste en envejecer en la oscuridad hojas de la planta en que se realice el ensayo (*Xanthium pennsylvanicum* o *Taraxacum dens leonis*), hasta que comience el amarilleamiento. De estas hojas se cortan discos que se colocan durante 48 horas a flotar sobre la solución a valorar. Mientras que los discos que se colocan

en el control se vuelven completamente amarillos, los que flotan sobre la solución de citoquininas retienen aún el color verde al final del ensayo. La cuantificación del ensayo se realiza extrayendo y midiendo la clorofila de los discos. Al igual que los casos anteriores, se establece una relación proporcional entre contenido en clorofila y el logaritmo de la concentración de la solución a valorar.

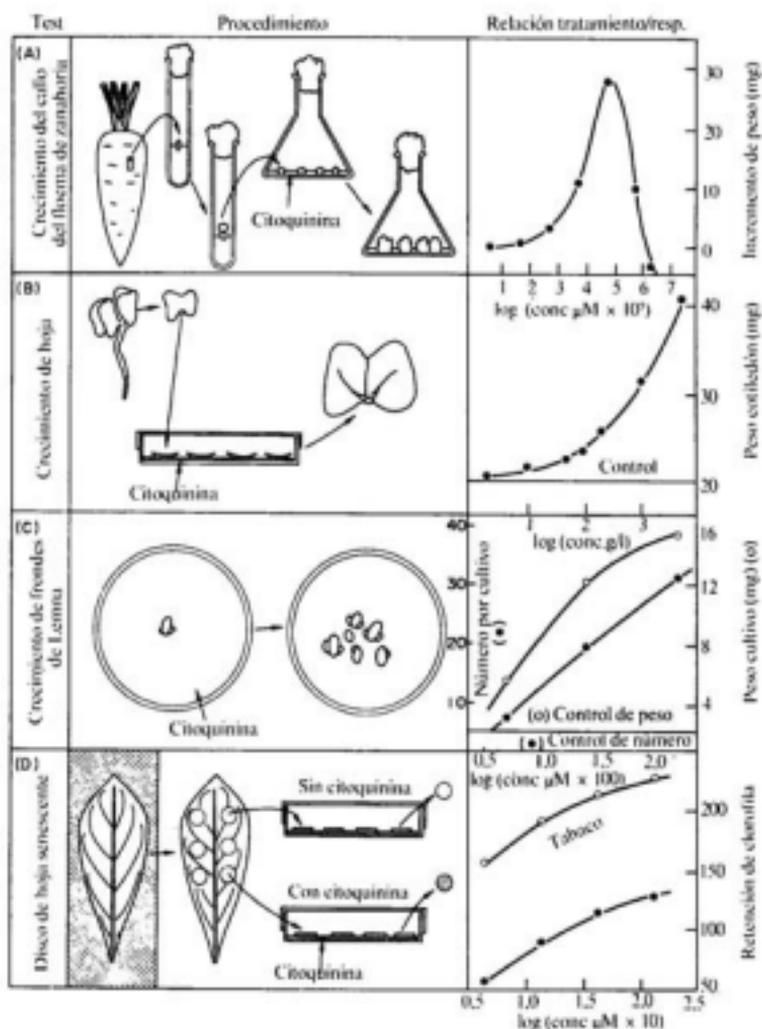


Figura 24.5.—Representación esquemática de los principales métodos biológicos de valorar citoquininas (Audas, L. J.: *Plant Growth Substances*, Leonard Hill, Londres, 1972).

La producción de betacianina por especies del género *Amaranthus*, concretamente se utiliza *Amaranthus caudatus*, está regulada por la luz; las plantas iluminadas producen betacianina y las que crecen en la oscuridad no lo hacen. Sin embargo, la síntesis de betacianina en la oscuridad puede lograrse mediante la aplicación de citoquininas, y más aún si se adiciona al medio el aminoácido tirosina como sustrato. Este fenómeno ha sido utilizado como método de valoración de citoquininas, ya que es muy específico y de gran sensibilidad, pudiendo detectarse concentraciones del orden de  $3 \times 10^{-7}$  M.

En la figura 24.5 presentamos un resumen esquemático de algunos de los métodos más usuales en la valoración biológica de las citoquininas.

Algunas citoquininas pueden valorarse mediante técnicas de inmunoensayo y, así, existen preparados comerciales de citoquininas y sus derivados glucosilados que permiten un análisis rápido, sensible y específico de las mismas. En el futuro es de esperar que este tipo de ensayo pueda extenderse a todas las citoquininas y a sus derivados, con lo cual se tendrá un método específico de valoración.

#### 24.5. Relación entre estructura y actividad

Al descubrirse la actividad biológica de la 6-furfuril amino purina, se sintetizaron un gran número de compuestos análogos en busca del mismo tipo de actividad. Se ha visto así que son muchos los compuestos que presentan actividad citoquinina, no pudiendo establecerse una relación muy directa entre estructura química concreta con la especificidad de la actividad que se ensaya. Por otra parte, la actividad de un compuesto, muchas veces, depende del tipo de ensayo sobre el que se utilice.

Además, se ha demostrado la existencia de compuestos, que sin tener anillo purínico, poseen actividad citoquinina, siendo los más activos los derivados de la fenilurea como N',N'-difenilurea o derivados nitrados o clorados de la misma. Además existen otros compuestos con débil actividad citoquinina (Fig. 24.6).

Quizá resulte más interesante para estos estudios el descubrimiento de sustancias con carácter de antagonistas de las citoquininas, debido a la ayuda que pueden prestar a la hora de dilucidar el mecanismo de acción de las mismas. Los primeros antagonistas encontrados eran derivados de la benzilurea que antagonizaban a las citoquininas en el test de retención de clorofila, descubriéndose posteriormente otros. Dado que, como hemos visto, estructuras no relacionadas pueden producir una misma respuesta específica, nos encontramos con que, al igual que con las auxinas, no hay ninguna especificidad entre la estructura y la respuesta que producen. Por otra parte, la fuente más interesante de información procederá de los trabajos que se realicen empleando las sustancias antagonistas, ya que resultarán un instrumento muy importante en el estudio de la respuesta fisiológica de las citoquininas.

#### 24.6. Biosíntesis de las citoquininas

Todos los datos que se poseen hoy día, indican que las citoquininas se sintetizan en los ápices radicales. Así, hemos visto que se detectan en el contenido de los tubos del

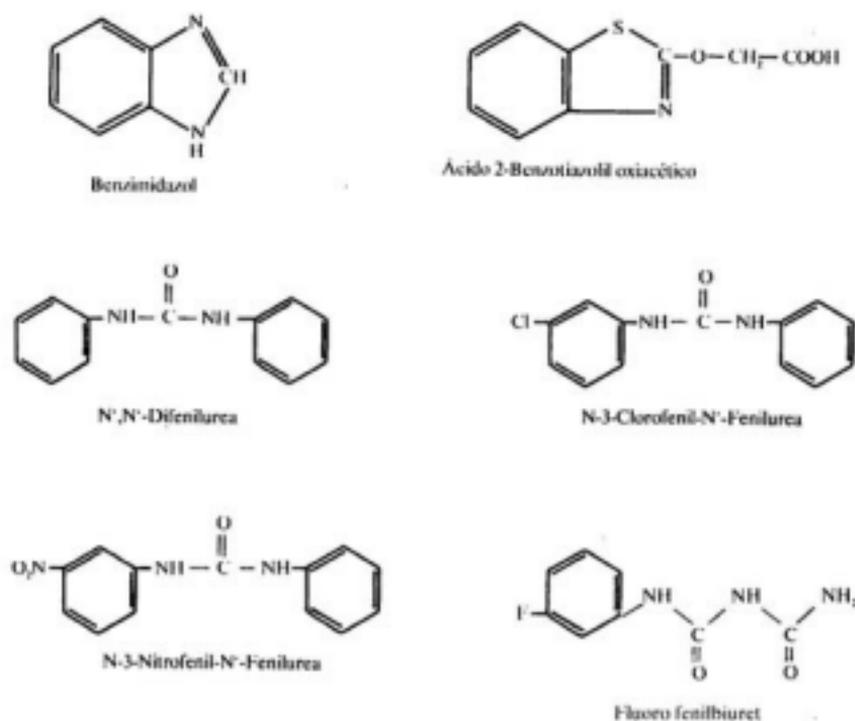


Figura 24.6.—Estructura de algunos compuestos que sin poseer anillo purínico presentan actividad citoquinina.

xilema y que su nivel disminuye si se someten las raíces a situaciones de adversidad o a bajas temperaturas.

Por otra parte, la cantidad de citoquininas que se extraen de los ápices es mayor que la que se extrae de zonas más próximas a la raíz. En estaquillas o plántulas, las citoquininas exógenas pueden, en algunos casos, sustituir a la raíz en la inducción del crecimiento o en algunas otras respuestas fisiológicas. Cuando se cultivan ápices de raíces de arroz en condiciones estériles, en el medio de cultivo aparecen citoquininas. Vemos, por tanto, que las raíces además de su papel como puerta de entrada a la planta del agua y nutrientes, tienen un papel importante como suministradores de citoquininas al tallo.

Sin embargo, no es esta toda la historia, y hay pruebas de que se pueden sintetizar citoquininas en otros lugares de la planta. Se ha visto que hay plantas capaces de desarrollar frutos, aunque se corten las raíces de la base del tallo, lo que nos indica que el desarrollo de los frutos o incluso de las semillas que encierra no depende del suministro de citoquininas que pueden realizar las raíces, puesto que no existen en este caso. Parece que el lugar donde puede realizarse esta síntesis de citoquininas es en las semillas en

desarrollo, ya que presentan una gran actividad citoquinina cuando se valoran los extractos de las mismas. Por otra parte, se ha demostrado que frutos partenocárpicos de tomate tienen un desarrollo más lento que frutos con semillas y, además, tienen un contenido en citoquininas mucho más bajo.

En semillas en germinación se encuentra también un alto contenido en citoquininas, y parece que es el eje embrionario el responsable de esta síntesis, ya que éste puede ser reemplazado por citoquininas en la promoción de algunas actividades enzimáticas, cosa que no se consigue con otras hormonas. Sin embargo, el que estos tejidos sean lugar de síntesis activa de citoquininas, debe tomarse aún con ciertas reservas, ya que bien pudiera suceder que se tratara de citoquininas almacenadas y liberadas posteriormente. Se cree que sólo el ápice radicular sintetiza citoquininas de forma activa.

#### 24.6.1. Rutas biosintéticas

Se tienen bastantes datos acerca de la biosíntesis de las citoquininas aisladas a partir de t-RNA. Sin embargo, existe muy poca información en cuanto a la biosíntesis de citoquininas libres. Se pensó que su origen sería el t-RNA, pero para ello sería necesaria una hidrólisis del t-RNA hasta el nivel de mononucleótido para liberar la actividad citoquinina. Esto sería posible en células senescentes, pero no en células vivas y activas. Además, se ha visto que la actividad citoquinina en ápices radiculares de guisantes es del orden de 25 veces la actividad citoquinina de t-RNA, lo cual sólo se podría conseguir con un recambio muy rápido del t-RNA. Por otra parte, si el origen de las citoquininas libres fuera éste, habría mayor abundancia de aquellas que integran la molécula del t-RNA y, sin embargo, no ha sido encontrada ninguna de ellas en forma libre. Aunque existen más pruebas que lo apoyan, creemos que éstas son suficientes para deducir que hay una vía de biosíntesis de citoquininas libres, distinta de la que siguen las del t-RNA, desconociéndose por el momento cuál es la ruta biosintética que lleva a la formación de citoquininas.

Recientemente se ha citado por Burrows la posibilidad de una síntesis *de novo* de citoquininas libres en semillas de *Lupinus luteus* y hojas de *Populus robusta*. Las citoquininas encontradas eran dihidrozeatina y  $N^6$ -(2-hidroxibenzil) adenosina, que no se encuentran formando parte del t-RNA siendo, además, difícil imaginar un mecanismo simple que permita la transformación de la cadena isopentenilo lateral de las citoquininas presentes en t-RNA, en una cadena lateral aromática como es el caso de  $N^6$ -(2-hidroxibenzil) adenosina. Aunque no cabe descartar la contribución que puede tener un recambio rápido del t-RNA en la formación de las citoquininas libres.

Si las citoquininas se sintetizan *de novo*, hay que plantear el problema de cuál o cuáles son los precursores. En principio, éstos podrían ser adenina, adenosina y ácido mevalónico, aunque éste cabe rechazarlo en el caso de las citoquininas con anillo lateral. Como ha señalado Wareing, el problema de la biosíntesis de citoquininas es complejo no sólo por las bajas concentraciones en que se encuentran, sino por el papel central de la adenina en el metabolismo, con lo que el introducir adenina marcada como precursor sólo nos llevará a que una fracción pequeñísima de la misma sea incorporada en citoquininas endógenas.

### 24.6.2. Inactivación de las citoquininas

Por ahora se consideran tres posibilidades para la metabolización de las citoquininas:

- a) Que sean metabolizadas durante su utilización al ser unidas o incorporadas a otras moléculas.
- b) Que sean destruidas por procesos catalíticos.
- c) Que sean convertidas a formas inactivas de almacenamiento de donde pueden ser convertidas de nuevo en formas activas.

Esta última posibilidad es la que más atención está recibiendo hoy día, ya que una vez que se aplican las citoquininas exógenas, desaparecen rápidamente como citoquininas libres y lo que sí permanece durante mucho tiempo son los 7-glucósidos y 9-glucósidos. Los 7-glucósidos son metabolitos muy estables, pueden ser formas de almacenamiento, aunque no se conoce exactamente su papel. También pueden ser las citoquininas ligadas básicamente inactivas y así ha sido afirmado por algunos investigadores.

Puede darse una degradación de las citoquininas a adenina y adenosina, siendo ésta inhibida por el ABA, aunque quizá éste fuera el mecanismo de acción de este compuesto, obstaculizar la degradación de la citoquinina. En esta vía degradativa se ha aislado la enzima que cataliza la degradación de citoquinina a adenina y adenosina, se describe como una citoquinina-oxidasa por necesitar oxígeno.

### 24.7. Mecanismo de acción de las citoquininas

Cuando Skoog realizó sus estudios sobre la influencia de las hormonas en la síntesis de DNA y división celular, observó que aun cuando las auxinas eran necesarias para que hubiera mitosis y síntesis de DNA, mitosis y citoquinesis sólo se producían cuando había niveles adecuados de citoquininas. Esto, junto con el hecho de que las citoquininas naturales son derivados de la purina y, por tanto, relacionados con los ácidos nucleicos, concentró los esfuerzos de los investigadores en explicar su mecanismo de acción mediante la influencia que podrían ejercer sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos y síntesis de proteínas.

Al igual que las demás hormonas, las citoquininas son capaces de estimular la síntesis de RNA y de proteínas. Sin embargo, se observó que en ciertas especies de RNA de transferencia se localizaban citoquininas situadas adyacentes al anticodon del RNA transferidor de serina y de tirosina. Se demostró que la presencia de una molécula citoquinina en el t-RNA adyacente al anticodon permitiría mantener el ordenamiento espacial correcto del t-RNA e impedir así la posibilidad de que un triplete incorrecto de nucleótidos sea reconocido en el codon de m-RNA en el ribosoma, de aquí que haya ganado muchos adeptos la hipótesis de un efecto regulador de las citoquininas en la traslación mediante el t-RNA.

Sin embargo, se han levantado últimamente ciertas objeciones a esta teoría, a causa de la imposibilidad de que una citoquinina se incorpore intacta en RNA, ya

que la modificación de las bases que lo integran tendría que realizarse después de establecida la estructura primaria de los polinucleótidos, lo que implicaría que la cadena lateral se incorporaría a posteriori.

Además, en el t-RNA de maíz se encuentra la forma *cis*-zeatina, mientras que la citoquinina natural es *trans*-zeatina, lo que la hace un candidato improbable para la síntesis de t-RNA.

La argumentación más convincente en contra de la hipótesis propuesta, proviene del estudio de la velocidad de incorporación de citoquininas marcadas al t-RNA, obteniéndose unas tasas de incorporación muy bajas que no permiten justificar que el proceso sea la base del efecto regulador de las citoquininas.

Existe otra posible vía de actuación de las citoquininas y es que se unan a la cromatina del núcleo. Se observó que cromatina extraída de plantas tratadas previamente con citoquininas, mostraba una mayor actividad template, suponiendo que esto sería consecuencia de la interacción de la cromatina con la citoquinina y no de cambios en la actividad RNA polimerasa o algún otro sistema. Si se demuestra la unión citoquinina cromatina esto podría ser la base de un control directo de la transcripción por parte de las citoquininas, aunque la experimentación actual va en el sentido de un control de la traslación más que de la transcripción. Se ha investigado la unión específica de citoquininas a proteínas ribosomales, aunque no se conoce la importancia biológica de estas proteínas, pero su interés es grande porque una unión de las citoquininas a proteínas ribosomales supondría un control de la traslación en la síntesis proteica. La relación entre citoquininas y los flujos de Ca en la célula pueden explicar el mecanismo de acción de este grupo de hormonas, como veremos más adelante (Cap. 26).

#### **24.8. Papel de los derivados glucosídicos de las citoquininas**

Los glucósidos de citoquininas son muy abundantes en las plantas y se han encontrado en prácticamente todos los órganos excepto en exudados de xilema. Parece que la capacidad de formar glucósidos se da en todos los tejidos y se desarrolla cuando las citoquininas libres alcanzan niveles muy altos casi tóxicos o no son necesarias para el crecimiento del órgano en cuestión, con lo que cabe atribuirles a estos glucósidos un papel de almacenamiento, ya que en las hojas, por ejemplo, cuando el nivel de glucósidos es elevado, no se observa ninguna de las respuestas típicas de citoquininas, lo que indica que realmente estos compuestos se hallan almacenados como derivados inactivos. Lo que queda por dilucidar, si también pueden actuar como reservas de citoquininas que pueden ser exportados a otros lugares, y si este transporte es del glucósido o de la molécula de citoquinina previamente hidrolizada, aunque el hecho de que en el líquido floemático se encuentren glucósidos hace pensar que se desplazan en la planta como tales.

Vemos, por tanto, que todas las plantas son capaces de metabolizar las citoquininas sintetizadas principalmente en las raíces y quizá la formación de glucósidos sea un mecanismo regulador de las mismas, ya que si el compuesto resulta menos activo que el aglucón, muchas respuestas de crecimiento pueden ser controladas de forma

reversible por la  $\beta$ -glucosidasa que sería responsable de la producción de la citoquinina activa.

#### 24.9. Factores que influyen sobre la actividad citoquinina

La influencia de la luz roja se traduce en un aumento rápido del nivel de citoquininas, probablemente por liberación de formas inactivas, aunque no puede descartarse una biosíntesis muy rápida. Sin embargo, parece que la reversibilidad por el rojo lejano no es tan concluyente y faltan datos experimentales suficientes.

La temperatura es otro factor que afecta el nivel de citoquininas. La estratificación de las semillas (Cap. 33) trae consigo un aumento de las mismas en las semillas tratadas. El nivel de citoquininas en el xilema, procedentes de las raíces, también está sometido a la influencia de la temperatura, siendo en general mayor a bajas temperaturas.

En semillas de *Spergula arvensis*, la ruptura de la dormición se consigue mediante tratamiento con etileno y parece que el proceso está controlado por el fitocromo. Cualquiera de estos tratamientos ocasiona un aumento de la actividad citoquinina. Igual aumento se observa al tratar semillas de lechuga con ácido giberélico para romper la dormición de las mismas. En respuesta al inhibidor del crecimiento CCC se obtiene un aumento del contenido en citoquininas.

El aumento en la concentración de oxígeno en la atmósfera hace que éste difunda mejor hacia el embrión de *Leucadendron daphnoides* y promueve la germinación, que se acompaña de un aumento de actividad citoquinina que se detecta antes de que pueda observarse germinación aparente.

El nitrato potásico, o el sulfato amónico aplicado al suelo aumenta el contenido en citoquininas en hojas y xilema de plantas de arroz. Por otra parte, la carencia de fósforo acarrea una disminución.

En general, las condiciones de stress (sequía, inundación, salinidad, bajo pH, etc.) acarrearán una reducción de los niveles de actividad citoquinina en tejidos y jugo xilemático.

#### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- AUDUS, L. J.: *Plant Growth Substances*, vol. 1, *Chemistry and Physiology*. Leonard Hill, Londres, 1972.
- BURROWS, W. J.: *Mechanism of Action of Cytokinins. Commentaries in Plant Science*. «Curr. Adv. in Plant Sci.», núm. 21, 1975, págs. 837-847.
- HALL, R.: *Cytokinins as a Probe of Developmental Processes*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», número 24, 1974, págs. 415-444.
- LEOPOLD, A. C., y KRIEDEMANN, P. E.: *Plant Growth and Development*, McGraw-Hill, Nueva York, 1975.
- LETHAM, D. S., y PALNI, L. M. S.: *The Biosynthesis and Metabolism of Cytokinins*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», 34:163-197, 1983.

- STODDART, J. L., y VENIS, M. A.: *Molecular and Subcellular Aspects of Hormone Action*, en: *Hormonal regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlín, 1980.
- VAN STADEN, J., y DAVEY, J. E.: *The Synthesis, Transport and Metabolism of Endogenous Cytokins*, «Plant, Cell and Environment», núm. 2, 1979, págs. 93-106.
- ZERONI, M., y HALL, M. A.: *Molecular Effects of Hormone Treatment on Tissue*, en: *Hormonal Regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlín, 1980.

## ETILENO

El etileno es el compuesto orgánico insaturado más sencillo. Es un gas en condiciones fisiológicas de temperatura y presión, producto natural del metabolismo vegetal que influye sobre el crecimiento de las plantas en cantidades pequeñísimas, siendo sus efectos no sólo interesantes bajo el punto de vista del investigador, sino que tienen importancia comercial.

Aunque ya se sabía que los frutos maduros podían acelerar la maduración de otros frutos próximos, fue Cousins el que primero apuntó la posibilidad de que fuera debido a la producción de una sustancia volátil producida por los frutos maduros; y así demostró que las naranjas maduras aceleraban la maduración de plátanos situados en un mismo recipiente. Trabajos posteriores realizados en varios laboratorios llevaron a identificar esta sustancia como etileno ( $\text{CH}_2 = \text{CH}_2$ ) y precisamente se la denominó hormona de la maduración. Al introducirse técnicas de análisis más finas, como la cromatografía de gases, se comprobó que el etileno no era producto de frutos solamente, sino que se identificó como un producto natural de toda la planta. En este capítulo estudiaremos el etileno como una hormona en general, dejando su papel en la maduración para el capítulo 34 donde se estudiará con más detalle.

Los descubrimientos que llevaron a considerar el etileno como una hormona vegetal se remontan a 1878 en que Wiesner estudia las curvaturas y nutaciones producidas en los tallos de algunas plántulas, observando que aquellas que crecían en oscuridad, muchas veces, en vez de hacerlo verticalmente con geotropismo negativo, tomaban una posición horizontal. En 1884 Molish habla del efecto que el gas del alumbrado y el humo producen en la respuesta geotrópica de las raíces. Este hecho pasa desapercibido y en 1901 Neljubow demuestra que la orientación horizontal observada por Wiesner era debida a la presencia de gas del alumbrado en el laboratorio, identificando etileno y acetileno como los componentes activos, siendo el etileno el más potente y característico en los síntomas producidos, es decir, reducción de la elongación, aumento de la expansión radial del tallo y orientación horizontal. Estos síntomas se conocieron desde entonces como la respuesta triple de las plantas leguminosas frente al etileno.

### 25.1. Valoración del etileno

Aunque los métodos biológicos nos dicen si hay o no etileno, no sirven para cuantificar el compuesto. Pueden ser útiles en muchos casos, si se utilizan con las debidas pre-

cauciones; así, la respuesta triple de Neljubow o bioensayos basados en la aceleración de la abscisión de peciolos o inducción de epinastia se utilizan aún. Sin embargo, para hacer análisis cuantitativos hay que recurrir a métodos físicos, siendo el más utilizado la cromatografía de gases, siempre que se disponga de procedimientos adecuados para recoger el gas.

La mayor cantidad de etileno se produce en órganos senescentes o en maduración, o en tejidos en división o expansión, obteniéndose valores que pueden llegar a ser de 50 a 100  $\text{nl} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ . En tejidos maduros la producción es baja, menor de 0,1  $\text{nl} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ , aunque depende de las condiciones en que se encuentra el tejido como veremos más adelante. En frutos se ha determinado la producción de etileno a lo largo de su desarrollo. En función de los valores que se miden pueden dividirse en dos grandes grupos: frutos climatéricos que son aquellos que presentan un considerable aumento en la producción de etileno al iniciarse la maduración y frutos no climatéricos en que el máximo en la producción de etileno se alcanza en las primeras etapas de expansión del fruto y al llegar a la maduración sólo hay un pequeño aumento (Fig. 25.1).

En hojas, el etileno se produce en grandes cantidades durante el período de expansión y disminuye a niveles muy bajos una vez alcanzado el máximo desarrollo. Al igual que en el caso de los frutos, las hojas pueden dividirse en dos grupos: las que producen mucho etileno en la senescencia y aquellas otras en que apenas hay aumento con relación a lo que produce la hoja madura. La senescencia de los pétalos también va acompañada de un aumento en la producción de etileno (Fig. 25.2). Otros órganos de la planta también producen etileno, como los brotes y el garfio apical de plantas etioladas, e incluso en las raíces se produce etileno, pero en cantidades muy pequeñas del orden de 0,1 a 0,3  $\text{nl} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ .

## 25.2. Biosíntesis

Hasta la fecha no ha sido posible obtener etileno en sistemas libres de células. Se ha investigado la capacidad que tienen los protoplastos para producir etileno, y se ha visto que aun cuando ésta es nula nada más realizar su obtención, a medida que transcurre el tiempo de cultivo parece existir una correlación entre producción de etileno y regeneración de la pared. Con métodos suaves de lisis se ha visto que los protoplastos producen etileno desde el momento de su preparación. Estos y otros resultados apoyan la hipótesis de que el sistema productor de etileno se localiza en la superficie de la membrana plasmática.

El precursor del etileno en todos los tejidos de plantas superiores es la metionina. En la conversión de metionina a etileno, el carbono 1 produce  $\text{CO}_2$ , el carbono 2 da ácido fórmico y los carbonos 3 y 4 producen etileno. Sin embargo, el S es retenido en el tejido, lo que es muy importante dadas las bajas concentraciones de metionina en los tejidos, ya que si no fuera reciclado podría llegar a ser limitante. La metionina se convierte en metiltioadenosina y su producto de hidrólisis, la metiltiorribosa. Metiltioadenosina es reciclada para formar nuevamente metionina vía metiltiorribosa, metabolitos de S-adenosilmetionina (SAM). Los pasos que van desde SAM a etileno fueron demostrados por Admas y Yang con tejido de manzana, comparando el metabolismo

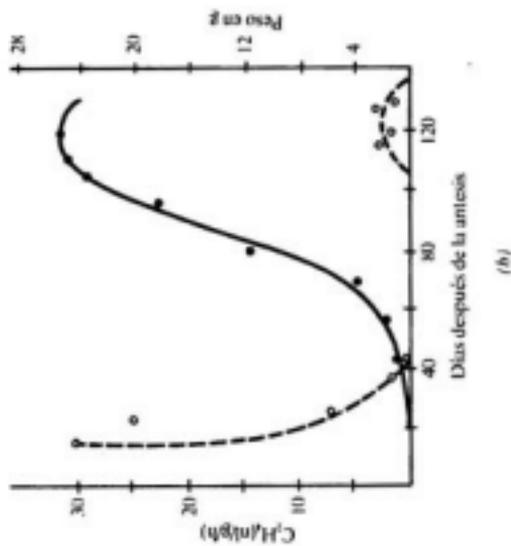
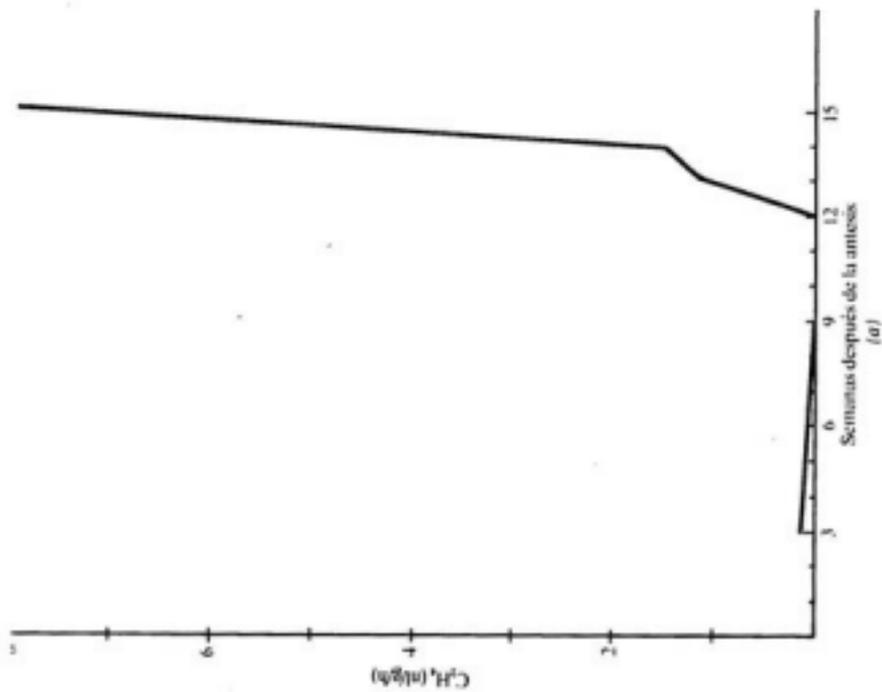


Figura 25.1.—Relación entre producción de etileno y desarrollo del fruto: a) climatérico y b) no climatérico.

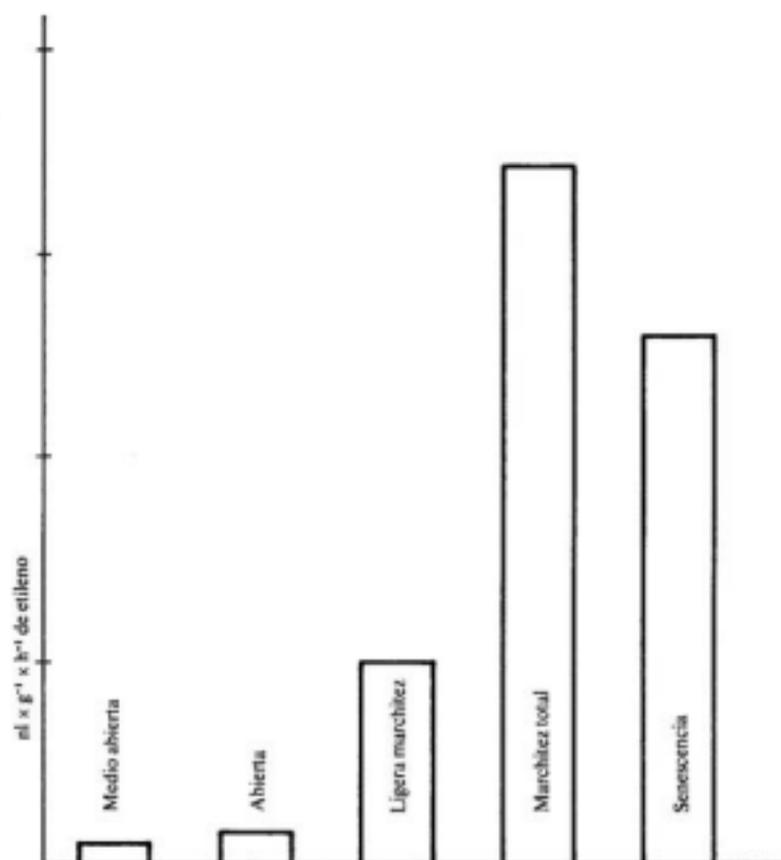


Figura 25.2.—Producción de etileno en flores de *Ipomoea* a lo largo de su desarrollo.

de la metionina en aire y en atmósfera de nitrógeno. En el aire la metionina se convertía en etileno, mientras que en atmósfera de nitrógeno se convertía en metiltiorribosa y un compuesto identificado como 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC); en presencia del aire el ACC pasaba rápidamente a etileno, indicando que el ACC es un intermediario en la conversión de ACC a etileno y que necesita del oxígeno para su conversión. La secuencia que puede establecerse en la biosíntesis del etileno será: metionina, SAM, ACC, etileno. Estos autores también observaron que aminoetoxivinil glicina (AVG) bloqueaba el paso de SAM a ACC. La adición de ACC incrementaba la producción de etileno, pero se inhibía completamente en condiciones de anaerobiosis y era insensible a la inhibición causada por AVG.

Tras conocerse la ruta biosintética del etileno se pudo demostrar que un extracto celular de tomates era capaz de convertir SAM a ACC y metiltioadenosina; el enzima

podía ser inhibido por AVG. Posteriormente se demostró que ACC sintasa es un enzima de piridoxal, ya que el piridoxal fosfato en bajas concentraciones lo activa.

La conversión de SAM a ACC se consigue mediante  $\gamma$ -ciclación. La conversión de ACC a etileno no ha sido posible *in vitro*, el enzima implicado está asociado a la membrana, es muy lábil y se desorganiza fácilmente, sin embargo, lo que sí está claro es que la reacción necesita oxígeno, es inhibida por Co, temperaturas superiores a 35 °C, luz y agentes desecoplantes como el dinitrofenol.

Se ha descrito recientemente por Konze y Kende que se puede producir etileno cuando a homogenados de tallo de guisante se les suministra ACC; este sistema se caracteriza por su dependencia del oxígeno, insensibilidad a AVG e inhibición por cianuro, EDTA y  $\text{CoCl}_2$ . Al intentar purificar el enzima, éste perdía actividad, pudiendo restaurarla añadiendo parte de las fracciones finales del eluido de la columna. Sin embargo, no ha sido posible purificar el enzima y tampoco ha sido posible localizar exactamente su situación en la célula, aunque, como ya hemos dicho, parece situarse en la membrana plasmática. Se ha propuesto una explicación que justificaría esta situación. El ACC sintetizado en el citosol por la ACC sintasa es oxidado en la superficie interior de la membrana plasmática, liberando protones al citosol. De esta forma la generación de etileno a partir del ACC podría asociarse con un flujo electrogénico de protones en el interior de la célula, si el enzima se sitúa de forma asimétrica en la membrana plasmática.

### 25.3. Mecanismo de acción del etileno

Se han ensayado análogos del etileno, comparando su actividad con la del etileno, observándose que ninguno de ellos es tan activo como el etileno, variando de 1/100 de actividad para el propileno a 1/29.000 para el aleno.

Burg y Burg (1967) citan una serie de características que debe reunir una molécula para presentar actividad, aunque sea muy débil, del tipo de las que posee el etileno: a) debe existir un doble enlace adyacente del carbono terminal; este doble enlace es más activo que el triple enlace y el enlace sencillo es inactivo; b) al aumentar la longitud de la cadena disminuye la actividad; c) el carbono terminal debe ser electrofílico y las sustituciones en esta posición que causen deslocalización de los electrones, reducen la actividad fisiológica, aunque también puede verse afectada por factores estéricos.

Recientemente Hall y sus colaboradores han publicado resultados de sus trabajos que contribuyen de modo importante a comprender el comportamiento del etileno y describen un sistema que tiene las propiedades deseables de un receptor del etileno. Se vio que muchas plantas eran capaces de compartimentalizar el etileno; en algunas, como en *Vicia*, era consecuencia de su oxidación a óxido de etileno, mientras que en *Phaseolus* era debida a la presencia de un receptor con gran afinidad por el etileno, como se demostró al comprobar que la afinidad de los análogos del etileno por este receptor era paralela a su actividad biológica. Se ha sugerido que el metabolismo del etileno y su mecanismo de acción pueden estar íntimamente relacionados y así la similitud entre la afinidad del etileno por su receptor en *Phaseolus* y por su sistema de

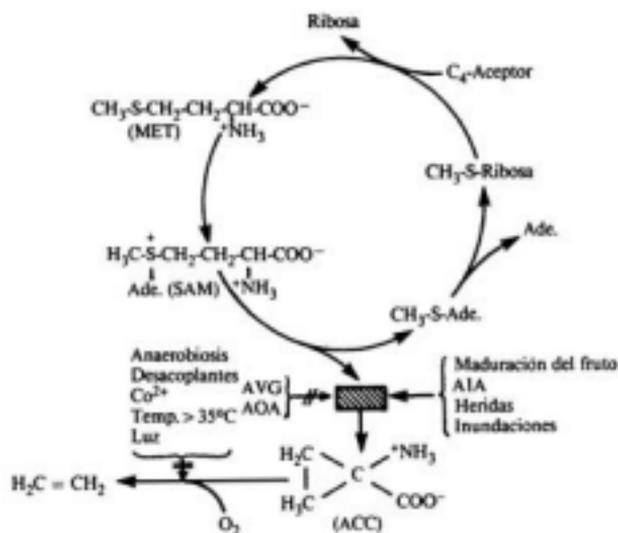


Figura 25.3.-Regulación de la biosíntesis del etileno. La producción de etileno es inhibida por AVG (aminoeto-xivilglicina), AOA (ácido aminoosiacético), anaerobiosis, desajustes de plantas, cobalto, temperatura superior a 35 °C y por la luz, y es estimulada en la maduración del fruto, mediante la adición de AIA, por las heridas y en el encharcamiento de las raíces.

oxidación en *Vicia* podrían representar diferentes manifestaciones de un sistema común implicado en la regulación de la respuesta de las plantas frente al etileno.

#### 25.4. Acción fisiológica del etileno

Además de la «respuesta triple» que hemos mencionado anteriormente, en plantas más viejas el etileno produce una serie de efectos variados como pueden ser: epinastia, abscisión de hojas, maduración y senescencia de flores y frutos y otros efectos asociados con maduración y envejecimiento. Todas estas respuestas vemos que están asociadas con el crecimiento y, por tanto, cabe pensar que habrá una interacción entre el etileno y las demás hormonas.

Los cambios morfológicos asociados con la acción del etileno pueden deberse a que éste actúa sobre la división celular, expansión celular y transporte de auxina. En guisantes etiolados el etileno influye sobre el garfio apical deteniendo la división celular y la síntesis de ADN; esto ocurre a concentraciones de 50 ppm e incluso a concentraciones mil veces menores. Inhibe la división celular en un 20 por 100. En ápices de tallo y a concentraciones de 0,1 ppm o superiores el etileno inhibe la división celular, lo que explica su papel de inhibidor del crecimiento. Existen, por el contrario, ciertos tejidos cuya división está estimulada por la auxina, como puede ser la formación de raíces adventicias, en que el etileno no causa ningún efecto. Esto nos indica que el etileno puede influir de forma diferente sobre diferentes células y tejidos.

Esto llevó a Osborne a clasificar las células en tres tipos según como respondieran al etileno o a la auxina. Las **células tipo I** eran estimuladas a alargarse por la auxina, pero no por el etileno; a este tipo pertenecen las células en elongación de plántulas terrestres. Las **células del tipo II** son aquellas que se expanden en respuesta al etileno, pero no responden frente a la auxina; a este grupo corresponden las células de la zona de abscisión y las de frutos en desarrollo. Las **células del tipo III** responden tanto frente a la auxina como frente al etileno alargándose y engrosando; a este tipo corresponden las plántulas de arroz y otras plantas acuáticas. Esta clasificación quizá sea una excesiva simplificación, ya que las interacciones hormonales son mucho más complejas. En esta clasificación debería incluirse en ellas a las giberelinas y citocininas e incluso el ácido abscísico, además de las auxinas y el etileno. Sin embargo, debemos considerar que cuando el etileno estimula la elongación (plantas acuáticas), la auxina y el anhídrido carbónico incrementan el efecto del etileno, que es lo contrario de lo que hacen las auxinas y el anhídrido carbónico frente al etileno en plantas terrestres, donde en realidad se contraponen a la acción del etileno. También está claro que, en contraste con el efecto normal de interferencia del etileno en el transporte de AIA en plantas terrestres, el transporte de auxinas en secciones de peciolo de ciertas plantas acuáticas es aumentado por el etileno.

## 25.5. Efecto de estímulos hormonales y ambientales sobre la producción de etileno

Se ha estudiado el efecto de ciertos factores hormonales y ambientales sobre la producción de etileno. Parece que el propio etileno es capaz de regular su propia biosíntesis actuando sobre la formación de ACC y su posterior conversión a etileno a través de la síntesis de ACC sintasa y del enzima formador de etileno.

La regulación de la biosíntesis de etileno por las auxinas se ha demostrado en hipocótilos de alubia, en que la presencia de auxina es un requisito necesario para la conversión de metionina a etileno, pero no para la conversión de ACC a etileno. La etapa en que las auxinas o el AVG controlan la biosíntesis de etileno es en el paso de SAM a ACC, probablemente mediado por un incremento de ACC sintasa causada por la auxina. La bencilaminopurina también incrementa la síntesis de etileno, pero parece que no es incrementando la formación de ACC, sino facilitando el aporte de ACC al lugar de síntesis del etileno. Por su parte, el ácido abscísico inhibe la síntesis de etileno e inhibe la formación de ACC-sintasa mediada por la auxina.

La influencia de la luz sobre la formación de etileno se logra a través de una disminución de la conversión de ACC a etileno, probablemente mediado por el  $\text{CO}_2$ , ya que éste es un promotor de la tasa de síntesis de etileno. Como el efecto del  $\text{CO}_2$  sobre la inhibición del etileno causada por la luz en hojas es rápido y reversible, parece que el  $\text{CO}_2$  ejerce su efecto regulando la actividad del enzima que cataliza el paso de ACC a etileno.

La producción de etileno puede incrementarse por diferentes situaciones de stress. La inundación de las raíces produce una situación de anaerobiosis que estimula la síntesis de etileno en los tallos, induciendo respuestas tales como epinastia, formación

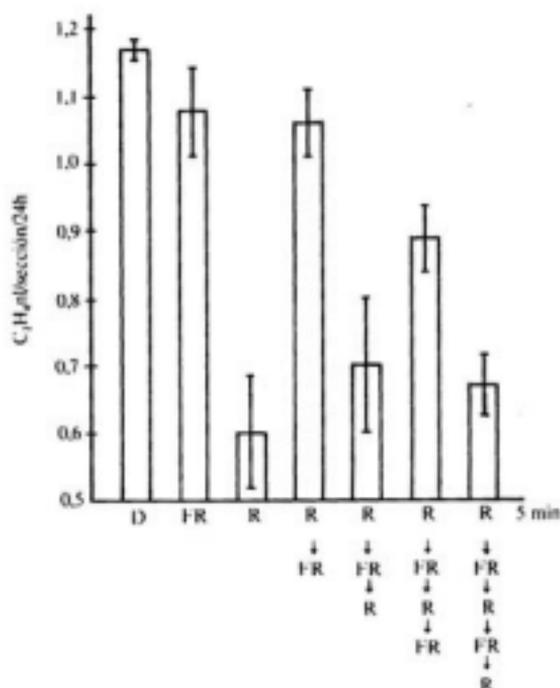


Figura 25.4—Inhibición de la producción de etileno en segmentos de coleóptilo de arroz expuestos a luz roja 5 min (R) y a luz del rojo lejano 5 min (FR).

TABLA 25.1

Producción de etileno en respuesta a la aplicación de AIA en secciones subapicales de tallos etiolados de guisante. Las medidas se hacen ocho horas después de iluminar 5 minutos con luz roja y se recoge el etileno desprendido durante 4 horas en oscuridad.

Concentración de AIA	Etileno producido en nl/g/h	
	Oscuridad	Luz
0	0,30	0,15
$10^{-7}$	0,32	0,19
$2 \times 10^{-7}$	0,47	0,30
$10^{-6}$	0,82	0,56
$10^{-5}$	2,60	1,04

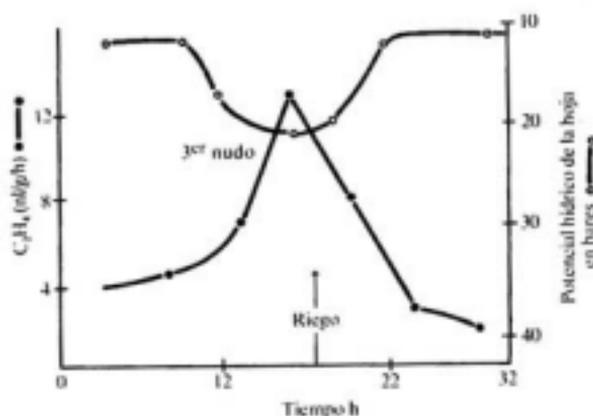


Figura 25.5.—Producción de etileno por peciolo de algodón en distintos potenciales hídricos.

de raíces adventicias y senescencia. En estas condiciones se ha medido un incremento en el contenido de ACC en las raíces y en el contenido del xilema de plantas de tomate y se ha llegado a la conclusión que no sólo se inhibe la conversión de ACC a etileno, sino que se estimula la biosíntesis de ACC. En algunos casos se ha detectado una acumulación de malonal ACC por mecanismo de retirar de las raíces el exceso de ACC.

Los déficits hídricos estimulan la producción de etileno, midiéndose un incremento de ACC a causa de una síntesis *de novo* de ACC sintasa, ya que la aplicación de cicloheximida inhibe la producción de etileno y de ACC.

La producción de etileno de un tejido puede incrementarse mediante herida causada por medios físicos o químicos y en todos los casos el mecanismo parece ser idéntico, un incremento de la actividad ACC sintasa, lo que lleva a una acumulación de ACC y un aumento de la producción de etileno.

## 25.6. El etileno como hormona

De todas las hormonas vegetales, la más notable es, sin lugar a dudas, el etileno. El hecho de ser un gas, la diferencia claramente entre todas las demás, tanto animales como vegetales. En algunos aspectos cabe considerar el etileno como una feromona, ya que el producido en una planta puede afectar el crecimiento de otras encerradas en el mismo recinto. Sin embargo, a diferencia de las feromonas, el etileno, en interrelación con otras hormonas determina el crecimiento y desarrollo de los individuos que lo producen. Aunque conocemos bastante bien los efectos causados por el etileno, poco se sabe acerca de su lugar de acción en la célula. El que se puedan distinguir tipos de células con distinta respuesta frente al etileno, hace aún más interesante el estudio de esta hormona.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- LIEBERMAN, M.: *Biosynthesis and Action of Ethylene*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», núm. 30, 1979, páginas 533-594.
- OSBORNE, D. J.: *Ethylene and Target Cells in the Growth of Plants*, «Sci. Prog. Oxf.», núm. 64, 1977, págs. 51-63.
- OSBORNE, D. J.: *Ethylene*, en: *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise*, vol. 1 (Ed.: Letham, Goodwin y Higgins), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978.
- STODDART, J. L., y VENIS, M. A.: *Molecular and Subcellular Aspects of Hormone Action*, en: *Hormonal Regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlin, 1980.
- YANG, S. F., y HOFFMAN, N. E.: *Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», 35:155-189, 1984.
- ZERONI, M., y HALL, M. A.: *Molecular Effects of Hormone Treatment on Tissue*, en: *Hormonal Regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlin, 1980.

## ÁCIDO ABSCÍSIKO Y OTROS INHIBIDORES

Al aplicar las técnicas de cromatografía en papel y posteriormente proceder a la valoración biológica de los cromatogramas obtenidos, en el estudio de las sustancias reguladoras del crecimiento existentes en extractos de plantas, se observó que estos cromatogramas presentaban siempre una zona de inhibición del crecimiento, de naturaleza desconocida, a la que se denominó «inhibidor  $\beta$ ». Sin embargo, no había acuerdo entre los diferentes investigadores a la hora de caracterizar la naturaleza de este inhibidor.

Carns y sus colaboradores en Estados Unidos, investigando las auxinas del fruto del algodón, encontraron una sustancia antagonista del AIA y observaron que esta sustancia promovía la abscisión. En 1963 Addicot logró su aislamiento y le dio el nombre de Abscisina II. Paralelamente a estos estudios Wareing, en Gales, descubrió una sustancia en las hojas de algunos árboles de hoja caduca, a la que denominó Dormina, que causaba inhibición del crecimiento e inducía el reposo. Pronto se vio que Dormina y Abscisina II eran la misma sustancia y se le denominó a este compuesto Ácido Abscísico (ABA), cuya estructura química se representa en la figura 26.1.

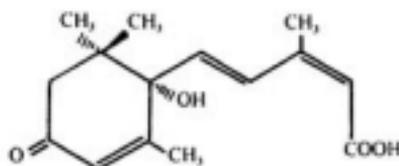


Figura 26.1.—Configuración absoluta del Ácido (+)(S) Abscísico (ABA).

Su estructura fue propuesta por Ohkuma y colaboradores en 1965 y confirmada por el equipo de Cornforth en el mismo año mediante síntesis. Esta sustancia se vio que era el constituyente mayoritario del «inhibidor  $\beta$ ».

Posteriormente se aisló ABA de otros muchos vegetales y, mediante técnicas adecuadas de identificación, se llegó a la conclusión de que el ABA que se encuentra en la naturaleza es el enantioisómero (+)-ABA. Mediante procedimientos de síntesis se obtiene el racémico ( $\pm$ )-ABA y con él se trabaja. Hay que tener en cuenta que la actividad de ambos enantioisómeros no es igual.

El ABA reúne todas las condiciones necesarias para ser una hormona, aparte de su efecto inhibitorio sobre el crecimiento cuando se aplica a plantas intactas y antagonizar la acción de hormonas promotoras del crecimiento, ejerce una gran variedad de efectos sobre el metabolismo vegetal, como veremos más adelante.

### 26.1. Valoración del ABA

Los métodos biológicos más usuales se basan en la capacidad inhibitoria del crecimiento que posee el ABA. Entre los más utilizados se encuentra el de secciones de coleóptilo, tal como se describió para auxinas, pero midiendo la inhibición del crecimiento en vez del estímulo; no obstante, debemos señalar que el crecimiento de los coleóptilos puede ser inhibido por un gran número de compuestos además del ABA.

Se ha utilizado también la inhibición de la germinación de semillas, o mejor de embriones aislados, ya que el ensayo se hace en menos tiempo. En este método se inhibe tanto la división como el alargamiento celular, a diferencia del de coleóptilo en que solamente se inhibe el alargamiento.

Pueden utilizarse una serie de bioensayos basados en la medida de algún proceso regulado por el ABA, como la inhibición de la multiplicación de frondes de *Lemna* o la de la síntesis de  $\alpha$ -amilasa, o su influencia sobre el grado de apertura de estomas. Pero al igual que en el caso de otras hormonas, el método que parece más prometedor para la valoración del ABA es el inmunoensayo, y ya se encuentran en el comercio reactivos de anticuerpos monoclonales para su realización.

Existen métodos físicos, como puede ser espectroscopia en el ultravioleta, cromatografía de gases asociado a espectrometría de masas, medida de la dispersión óptica rotativa y otros que bien por separado o en asociación de unos con otros sirven para identificar con certeza y cuantificar correctamente el ABA.

### 26.2. Localización

Puede decirse que se encuentra en todas las especies tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, incluso se ha encontrado en gimnospermas y helechos. En plantas superiores se aisló ABA de hojas, frutos, semillas, brotes, raíces y tallos, en exudados de floema y xilema. La cantidad que se detecta es variable, del orden de  $3\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso fresco en una planta acuática, a  $20.000\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso fresco en brotes de *Xanthium*, aunque los valores más frecuentes están entre 20 y  $100\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso fresco; sin embargo, en un órgano esta cantidad no permanece constante a lo largo de su desarrollo (Fig. 26.2).

### 26.3. Acción fisiológica

El ácido abscísico ya hemos dicho que acelera la senescencia en las hojas de las plantas. Cuando se aplica a discos de hojas de rábano acelera poco la senescencia y

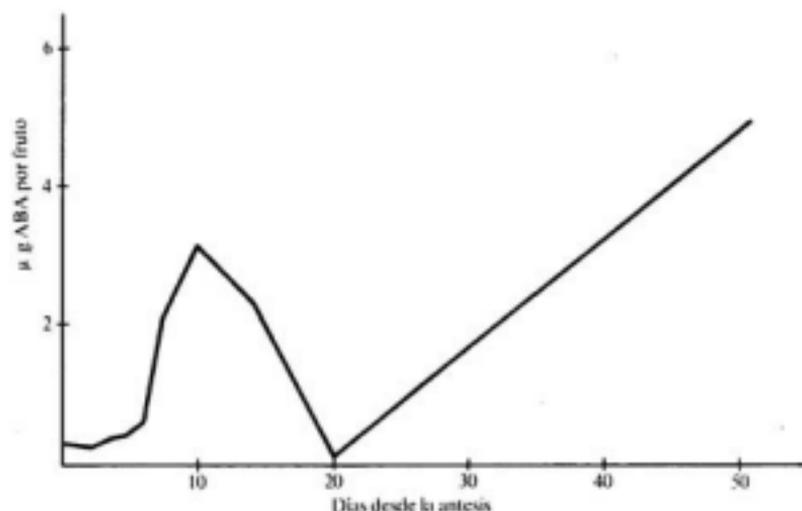


Figura 26.2.—Variación del contenido de ABA en frutos de algodón.

pérdida de clorofila y, sin embargo, en presencia de citocininas, que retardan la pérdida de clorofila, el ABA se sobrepone a los efectos de la citocinina y hace que la clorofila se degrade.

La dormición causada por el ABA ha sido estudiada por Wareing en brotes vegetativos de árboles de hoja caduca. Demostró que la cantidad de ABA en las hojas aumentaba al acercarse el otoño y acortarse los días. La aplicación exógena de ABA a las hojas detiene el crecimiento de los brotes e induce las características morfológicas del reposo. En los brotes aislados de patata la aplicación de 0,006 ng de ABA son capaces de prolongar el estado de reposo indefinidamente. También inhibe la germinación de muchas semillas: rosal, albaricoque, ciertas gramíneas, etc. En el albaricoque se encuentra en la cubierta seminal y en la rosa en el fruto, lo que apoya la hipótesis de que el ABA tiene una función hormonal en la prolongación del reposo en estas dos especies.

En todos los casos estudiados el ABA retarda o inhibe el crecimiento. Al principio estos efectos fueron observados como interacción con la acción estimulante de otras hormonas: auxinas, giberelinas y citocininas. Sin embargo, trabajando con embriones y tallos de árboles caducifolios pudo demostrarse que la acción inhibitoria era independiente de la existencia de hormonas estimulantes. Parece que el ABA es el componente más activo del complejo «inhibidor  $\beta$ ».

Sobre plantas de día corto aumenta la floración, pero hay que aplicarlo frecuentemente y en concentraciones elevadas. Sin embargo, en plantas de día largo no tiene ningún efecto. Probablemente actúa indirectamente sobre la floración, al retardar el crecimiento vegetativo. Igual puede ser explicada su acción en el manzano ya que al encontrarse en las hojas maduras, reduce el crecimiento vegetativo.

#### 26.4. Mecanismo de acción del ácido abscísico

Poco se ha estudiado la presencia de receptores para el ABA, aunque se han realizado numerosos ensayos con análogos estructurales, no hay resultados convincentes debido a los inconvenientes de utilizar bioensayos largos; sin embargo, parece muy probable la necesidad de un receptor al que se acomoda la molécula de forma muy precisa, y no tenemos más que pensar que el paso de  $\Delta^2$ -cis-ABA a  $\Delta^2$ -trans-ABA hace que virtualmente desaparezca la actividad y en bioensayos rápidos el enantioisómero (+)-ABA es más activo que el (-)-ABA. En algunos experimentos realizados con membranas preparadas a partir de hojas de alubias demuestra que el ABA se une de forma saturable, probablemente con las membranas plasmáticas, pero aún no hay suficientes pruebas sobre la especificidad de tal unión.

Los efectos que causa en la planta el ABA son variados. En general el ABA actúa inhibiendo el crecimiento y anula el efecto estimulante causado por la auxina en secciones de coleóptilo al cabo de pocos minutos; por otra parte, el cierre de estomas tras la aplicación de ABA también es una respuesta rápida. Estas respuestas rápidas hacen pensar que el ABA actúa independientemente de la secuencia ácidos nucleicos proteínas.

Hay inhibición del crecimiento a más largo plazo que si viene acompañada de inhibición de la síntesis de proteína. Este efecto podría ser causado a través de la demostrada estimulación que causa el ABA sobre la actividad ribonucleasa, lo que acarreará menores niveles de RNA y consecuentemente disminución de la tasa de síntesis de proteínas y del crecimiento. Hay discrepancias con esta observación y consisten en que en coleóptilos el aumento de la actividad ribonucleasa se observa a las 8 horas; sin embargo, la inhibición del RNA total se aprecia ya a las 3 horas. Ante estos resultados hay que pensar que el mecanismo primario no es el aumento de síntesis o de actividad RNasa.

El papel inhibitorio del ABA también se manifiesta en su efecto antagonista de las GAs en la inducción de la actividad  $\alpha$ -amilasa de la capa de aleurona. Parece que este efecto es muy específico no afectando ni a la actividad de otros enzimas, ni a la síntesis de proteínas totales e inhibiendo muy ligeramente la síntesis de ARN; este efecto de ABA es revertido por las citoquininas, pero no sabiendo cómo puede ejercer su efecto el ABA, también se ignora el papel de las citoquininas. Una posibilidad es que el ABA regule los niveles de especies determinadas de m-RNA.

#### 26.5. Biosíntesis del ABA

La formación del ABA se hace siguiendo la regla del isopreno. Es un compuesto derivado del ácido mevalónico por una serie de reacciones enzimáticas bien conocidas y que va uniendo precursores isoprenoides para formar compuestos de C-10, C-15, C-20, etc. La molécula del ABA consta, por tanto, de 3 restos isoprenoides. El hecho de que la molécula del ABA se parezca al esqueleto terminal de los carotenoides C-40 hace pensar en la existencia de una vía biosintética común para ambos compuestos. Queda por dilucidar si el ABA procede en todo o en parte de la ruptura de un carotenoide o bien se llega por síntesis directa propia, con la intervención de una serie de

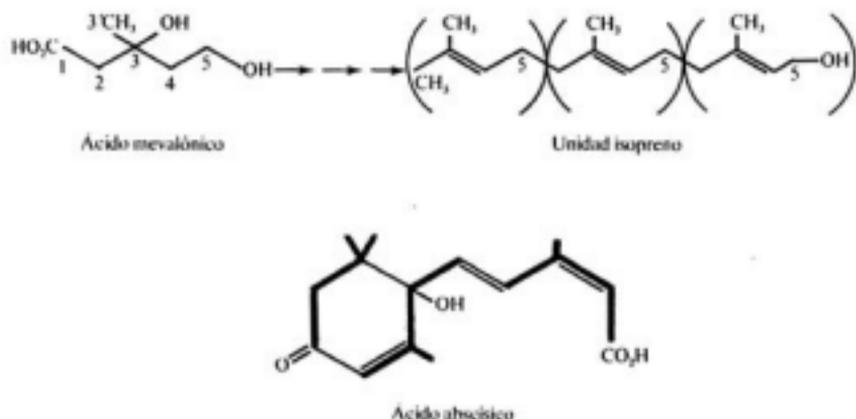


Figura 26.3.—Esquema de las etapas que llevarían a la formación del ácido abscísico. Se señalan con trazo más grueso las unidades isopreno que integran la molécula de ABA.

intermediarios de 15 átomos de carbono. Sin embargo, lo que no admite duda es que procede del ácido mevalónico (Fig. 26.3).

La biosíntesis se realiza en frutos, semillas, raíces, hojas y tallos, con lo que su síntesis está ampliamente distribuida. En hojas se produce un aumento considerable de ABA como respuesta a la sequía, produciéndose, asimismo, algo de aumento en tallos y raíces, mientras que los frutos no modifican su contenido en ABA en respuesta a la sequía.

Se ha observado que la incorporación de ácido mevalónico en ABA en hojas es muy pequeña, del mismo orden que la incorporación en moléculas de carotenoides. Por otra parte, la incorporación de ácido mevalónico en esteroides es considerable; este hecho, junto con la similitud del esqueleto carbonado y la relación biogenética que existe con los carotenoides, llevó a pensar que la biosíntesis del ABA al igual que la de los carotenoides se hacía en los cloroplastos.

Con cloroplastos fraccionados, ya que la membrana cloroplástica es impermeable al ácido mevalónico, se ha visto que el ácido mevalónico- $^{14}\text{C}$  se incorpora en ABA- $^{14}\text{C}$ . Se observó también que esta incorporación no sólo se podía realizar en cloroplastos, sino que otros plastos eran capaces de realizar la biosíntesis del ABA. El hecho de que el ABA se sintetice en cloroplastos puede ser una explicación para la presencia de cloroplastos en las células guarda de los estomas, con lo que podrían funcionar como proveedores de ABA en la reacción del estoma frente a la sequía.

La degradación del ABA se produce mediante la formación, en primer lugar, de un éster glucosídico que se encuentra normalmente al añadir ABA-exógeno a un tejido y que mediante hidrólisis produce el ácido libre. Otro producto de la degradación del ABA es el ácido faseico, posteriormente este compuesto se transforma en el ácido dihidrofaseico que posteriormente puede aparecer en forma conjugada (Fig. 26.4).



Figura 26.4.—Degradación del ácido abscísico.

## 26.6. Transporte del ABA

Hay respuestas del ABA que se obtienen en menos de 10 minutos, como es el caso del cierre de estomas cuando el ABA se aplica en la corriente transpiratoria. Por tanto, para llegar a las células guarda, el ABA tuvo que atravesar varias células en este intervalo de tiempo. Se ha detectado ABA tanto en el floema como en el xilema, aunque puede ser sintetizado en muchos lugares como ya hemos visto anteriormente, desplazándose también con gran facilidad a toda la planta. Cuando se mide el transporte, en secciones de tejidos, se observa que en el caso de tallo presenta una ligera polaridad, menor que la del AIA y sólo en tejidos jóvenes, se calculó la velocidad de transporte en 24-36 mm/h, algo más rápido que la del AIA (4-9 mm/h) en dirección basipétala y, naturalmente, en dirección acropétala el movimiento es mucho más rápido que el del AIA. El transporte en este tipo de tejidos parece que se hace mediante un mecanismo activo, ya que por ser las secciones muy cortas no funcionan los tubos cribosos. En secciones de raíces y en los 15 mm apicales el ABA se transporta de forma basipétala, como se verá más adelante (Cap. 29).

En plantas intactas, al aplicar ABA-<sup>14</sup>C en hojas se encuentra una amplia distribución del mismo por toda la planta, tanto hacia arriba de la hoja como hacia abajo. La forma en que se transporta bien pudiera ser como un éster glucosídico que puede hidrolizarse fácilmente al salir de la planta, y por eso se obtiene ABA libre.

## 26.7. Influencia de factores ambientales sobre el contenido en ABA

Ya hemos mencionado el efecto de la sequía sobre el aumento del nivel de ABA en plantas, que puede llegar a ser del orden de 40 veces el contenido normal (Fig. 26.5). El encharcamiento de las raíces, el frío y ciertas alteraciones patológicas también estimulan la producción de ABA. La luz influye sobre el contenido en ABA. Así, en plantas de *Xanthium* iluminadas con y sin suplemento de luz del rojo y rojo lejano, se observó que las plantas suplementadas no se ramificaban y los brotes tenían un alto contenido de ABA; sin embargo, las plantas no suplementadas se ramificaban y tenían mucho menos ABA.

### 26.8. Otras hormonas vegetales

Se observó que las plantas que crecían en la luz tenían niveles superiores de inhibidores que aquellas que crecían en la oscuridad, y, además, el espectro de acción de la respuesta fototrópica era parecido al espectro de absorción de los carotenoides. En 1970 Taylor descubrió un inhibidor de carácter neutro que se obtenía mediante fotólisis de carotenoides, y concretamente a partir de la violoxantina pudo caracterizarse este compuesto al que se denominó Xantoxina.

Este compuesto resultó ser una mezcla de dos isómeros *cis* y *trans* (Fig. 26.6). Sólo el isómero *cis* es activo como inhibidor, incluso en algunos ensayos es más potente que el ABA. Se ha demostrado mediante Xantoxina-2-<sup>14</sup>C que este compuesto es metaboli-

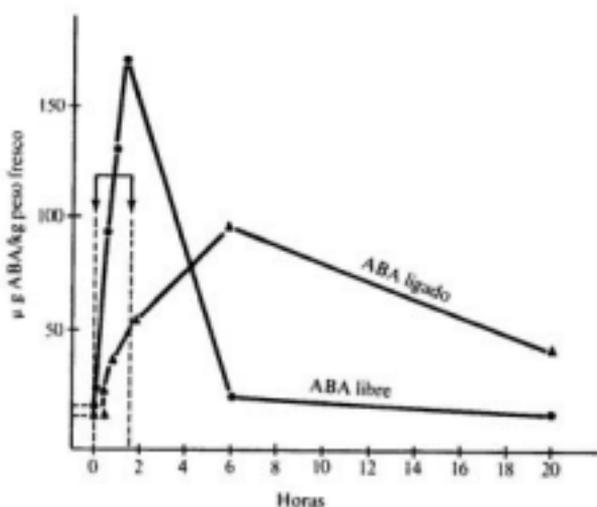


Figura 26.5.—Aumento del contenido en ABA como respuesta a la sequía en hojas de *Phaseolus vulgaris*. Las plántulas se sometieron a bajo potencial hídrico durante 90 min, y luego se dejaron recuperar.

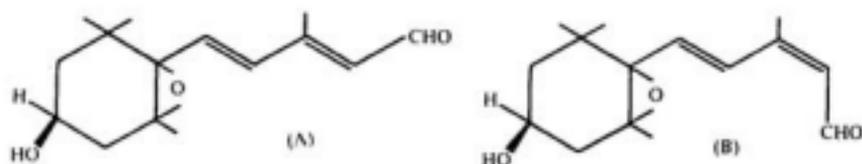


Figura 26.6.—Estructura de 2-*trans*-Xantoxina (A) y 2-*cis*-Xantoxina (B).

zado a ABA rápidamente, e incluso se detecta ácido faseico. El descubrimiento de la Xantosina deja abierta la posibilidad de que el ABA se forme, al menos en parte, a partir de carotenoides, concretamente de la violoxantina, siendo la Xantosina un intermediario en la secuencia de reacciones que tendría lugar mediante catálisis enzimática.

Del descubrimiento del ABA y Xantosina ha surgido una nueva teoría para explicar alguna de las respuestas antes atribuidas al AIA. Así, la curvatura del coleóptilo de avena hacia la luz, que se explicaba como un desplazamiento de la auxina, podría ser causada por la producción de más inhibidor en la parte iluminada que en la oscura. Esta idea viene apoyada en que la violoxantina es el carotenoide mayoritario en los coleóptilos de avena, y también porque es el pigmento que tras ser expuesto a la luz, da el mayor efecto inhibidor sobre la germinación de algunas semillas.

Se han descubierto, y se citan en la literatura, algunas sustancias, unas reales como las brasicinas y otras más o menos imaginarias como la rizocalina o caulocalina y florígeno, a las que se le atribuyen determinados efectos fisiológicos, pero que aún no han sido aisladas e identificadas, por lo que aunque se les atribuyan propiedades reguladoras, mientras no se confirmen experimentalmente habrá que aceptar su existencia con muchas reservas.

### 26.9. Otros reguladores del crecimiento

Además de las principales hormonas ya citadas, existen otros muchos compuestos naturales que influyen sobre el crecimiento de las plantas a muy bajas concentraciones. Estos compuestos podemos agruparlos de la siguiente manera:

- a) Compuestos producidos por plantas inferiores que regulan su desarrollo, en general la reproducción sexual.
- b) Compuestos producidos por microorganismos que estimulan el crecimiento de plantas superiores.
- c) Compuestos presentes en plantas superiores, pero que afectan su crecimiento cuando se aplican de forma exógena.

En este tercer grupo, probablemente ninguno de los compuestos que se incluyen en él ejerce ningún tipo de regulación del crecimiento en la planta intacta y en condiciones normales, como es el caso de las sustancias fenólicas ampliamente distribuidas en las plantas superiores donde parece difícil que ejerzan alguna acción reguladora *in vivo*. Sin embargo, si actúan cuando se aplican de forma exógena, aunque esto no quiere decir que los compuestos endógenos actúen de la misma manera.

Cabría considerar en este apartado otras sustancias que afectan al crecimiento como las fitoalexinas o las vitaminas cuya importancia en la regulación del crecimiento es bien conocida, pero en aras de la brevedad no nos detendremos en ellas y citaremos sólo de pasada algunas de las más interesantes.

*Grupo A:* Podemos citar los ácidos trispóricos, aislados del hongo *Mucor mucedo* (Fig. 26.7), que regulan el crecimiento en aproximación (zygotropismo) de dos zigóforos compatibles en distancias de hasta 2 mm de separación.

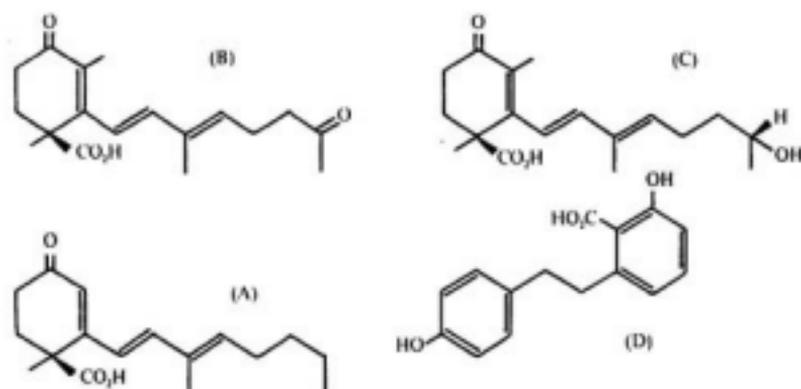


Figura 26.7.—Estructura de los ácidos trisporicos (B, C y A) y del ácido lunularico (D).

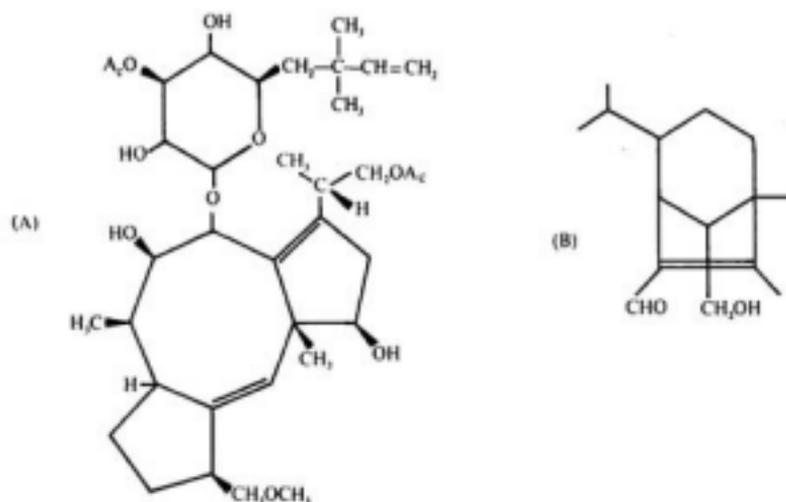


Figura 26.8.—Estructura de la Fascicoccina (A) y Helminthosporol (B).

En algas se han aislado los factores quimiotácticos, que sirven para que el gameto femenino atraiga al masculino en *Ectocarpus siliculosus* (alga parda) o el que segregan los huevos de *Fucus serratus* para atraer al espermatozoide. De *Lunularia cruciata* se aisló el ácido lunularico (Fig. 26.7). Este inhibidor es el responsable de la dormición inducida por el fitocromo en días largos y parece que este compuesto juega en las plantas inferiores el mismo papel que el ABA en plantas superiores.

**Grupo B:** El hongo patógeno *Helminthosporium sativum* produce un metabolito denominado Helminthosporol, que es un sesquiterpeno (Fig. 26.8) y del cual existen otros compuestos relacionados. Su acción es parecida a la de las giberelinas pero mucho menos efectiva que la  $GA_3$ , y se cree que está basada en el parecido con los anillos C y D de las giberelinas.

Los almendros y melocotoneros son atacados por un hongo que marchita las hojas y deshidrata los tallos, el *Fusicoccum amygdali*, que produce una toxina denominada Fusicoccina (Fig. 26.8). En todas las plantas ensayadas produce marchitamiento. Promueve el alargamiento celular en gran variedad de tejidos ensayados, incluso en raíces intactas de lechuga, y expansión de discos de hojas. Todos estos efectos vienen acompañados de una disminución del pH del medio, debido a una salida de  $H^+$  y absorción de cationes. El efecto sobre el alargamiento podría ser debido a esta disminución del pH que aflojaría los enlaces interfibrilares de la pared celular. La fusicoccina estimula la apertura de los estomas debido a la entrada de  $K^+$  del citoplasma de las células guarda. Influye sobre otros muchos procesos fisiológicos como, entre otros, en la germinación.

El hongo *Aspergillus niger* produce una sustancia denominada Malformina, que es un péptido cíclico y causa malformaciones en tallos y peciolo de varias especies. Puede actuar inhibiendo o estimulando la elongación en plantas.

**Grupo C:** Este grupo incluye una gran variedad de compuestos. Quizá el más numeroso esté constituido por los compuestos fenólicos en que se incluyen los ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos), las cumarinas y los flavonoides (Fig. 26.9).

Los ácidos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Su estudio como reguladores del crecimiento parte del hecho de que el 2,4-diclorofenol y algunos otros monofenoles sencillos promovían la oxidación del AIA *in vitro*, por lo que existía la posibilidad de que los fenoles naturales actuaran de la misma forma *in vivo*.

Los ácidos fenólicos pueden encontrarse como ácidos libres o como ésteres glucosídicos o formando glucosidos. El contenido de fenoles en las plantas varía a lo largo del crecimiento, como se ha demostrado en plántulas de trigo, variando también el contenido en frutos de manzano a lo largo de su desarrollo y también durante la germinación de semillas. Cuando se hacen extracciones en busca de sustancias reguladoras del crecimiento, a veces, se localizan en los cromatogramas zonas inhibitorias que son causadas por los ácidos fenólicos como pueden ser el ácido salicílico (I), o el ácido p-cumárico (IV).

Las relaciones entre los fenoles naturales y el crecimiento inducido por el AIA en secciones de coleóptilo, entrenudos o hipocótilos pueden ser muy variadas, pudiendo actuar como sinergistas o antagonistas del AIA en ensayos de curvatura de avena. En general, los orto dihidroxi o trihidroxi fenoles (ácido cafeico [VI], ácido clorogénico [VIII], ácido gálico [III]) aumentan la acción del AIA, mientras que los monofenoles (ácido p-cumárico) antagonizan al AIA, aunque puede haber excepciones. Por ejemplo, el ácido p-hidroxibenzoico (II) inhibe el crecimiento de secciones del primer entrenudo de *Avena* y promueve el crecimiento de secciones de coleóptilos a bajas concentraciones, con o sin AIA con el que actúa de forma sinérgica.

Parece que la explicación del mecanismo de acción de los ácidos fenólicos hay que

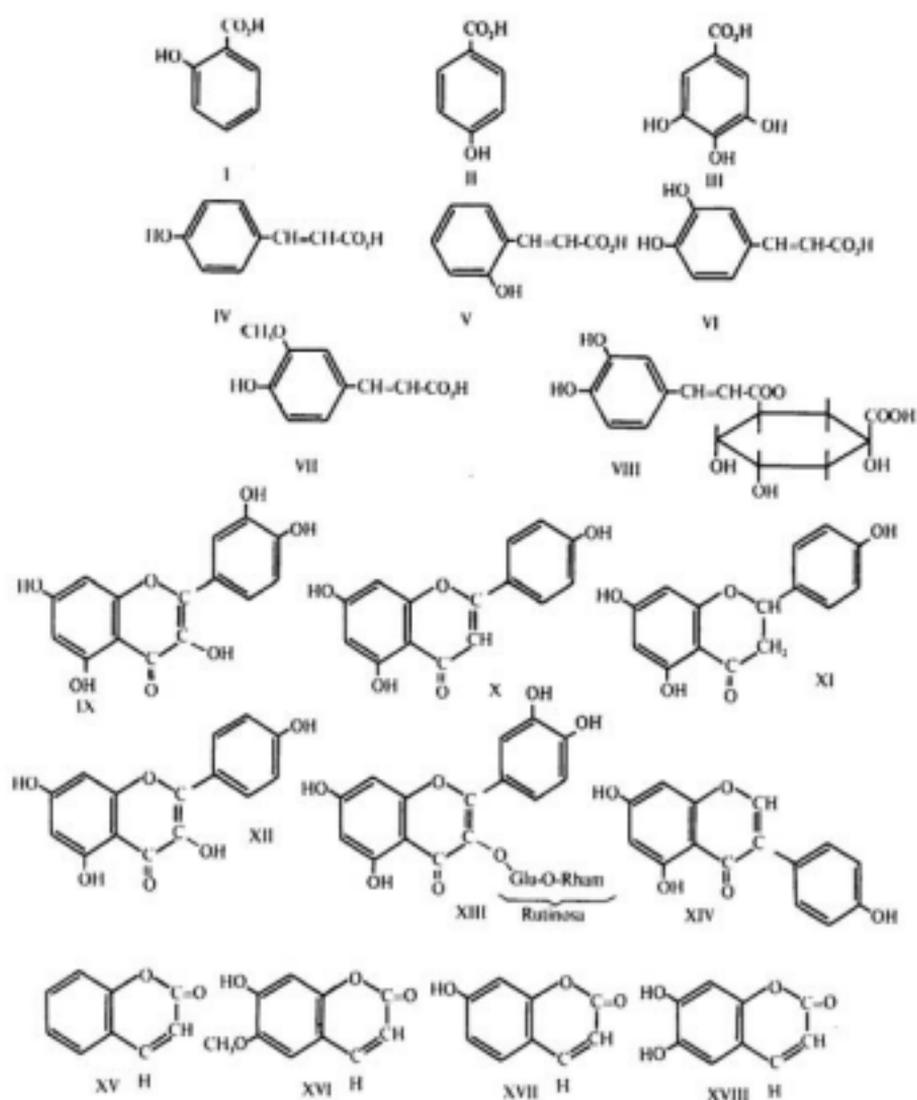


Figura 36.9.-Estructura de algunos compuestos fenólicos con actividad reguladora del crecimiento.

buscarla en cómo actúan estos compuestos con respecto a la AIA-oxidasa. Aquellos que inhiben el crecimiento lo hacen porque descarboxilan el AIA y, por el contrario, los que lo estimulan impiden la descarboxilación del AIA.

No está claro que los ácidos fenólicos endógenos actúen como lo hacen cuando se aplican *in vitro*, aunque hay datos que apuntan en el sentido de que pueden actuar de la misma manera, y se habla de protectores de la auxina que lo hacen inhibiendo la AIA-oxidasa. Estos protectores pueden ser desde compuestos fenólicos simples (ácido clorogénico, ácido cafeico o ácido ferúlico [VII]) hasta complejos de fenol y proteínas de elevado peso molecular.

Hay otras respuestas frente a los ácidos fenólicos que no son consecuencia de su acción sobre el sistema AIA-oxidasa. Así, algunos compuestos, como el ácido cafeico, son capaces de promover la germinación de semillas a concentraciones muy bajas, mientras que el ácido ferúlico o el ácido o-cumárico (V) inhiben la germinación. Algunos taninos hidrosolubles actúan como verdaderos antagonistas del ácido giberélico. Otros, como el ácido p-cumárico y ácido p-hidroxibenzoico, pueden promover el enraizamiento de estaquillas inducido por auxinas.

No sólo la actividad AIA-oxidasa puede estar influida por la presencia de fenoles. Se ha demostrado que tanto el ácido cafeico como el ácido clorogénico inhiben la oxidación del glutatión catalizado por la peroxidasa. Asimismo, el control que la luz ejerce sobre los niveles de fenilalanina-amonioliasa también está regulado, al menos en parte, por los fenoles.

Los flavonoides pueden considerarse dentro del grupo de las sustancias fenólicas. Su contenido en tejidos vegetales está fuertemente influido por factores ambientales y hormonales. El etileno, por ejemplo, aumenta la biosíntesis de antocianos inducida por la luz en plántulas de *Sorghum vulgare*, y el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) inhibe la síntesis de quercetina (IX) en hojas maduras de guisante crecidas a la luz. La quinetina estimula la formación de antocianos en plántulas de *Brassica oleracea* crecidas a la luz, y si se aplican durante 15 minutos, la respuesta es parecida a la que producen 5 minutos de luz roja, y lo que es más curioso, el efecto de la quinetina es anulado al exponer el tejido a luz del rojo lejano. El ABA actúa sinérgicamente con la sacarosa, aumentando fuertemente el nivel de fenoles totales y de antocianos en la hoja de parra. El fotoperíodo y las deficiencias nutritivas también influyen sobre el contenido de flavonoides.

Se ha observado en frutos de tomate un aumento considerable del contenido de naringenina (XI) durante la maduración, sin que haya un cambio apreciable en la cantidad de fenoles totales. Este aumento de naringenina viene acompañado de un aumento en la producción de etileno al iniciarse el período climatérico. Las hojas, a medida que van alcanzando la madurez, muestran una disminución en el contenido de quercetina y un aumento en el de kempferol (XII).

Los flavonoides se localizan en etioplastos de plantas etioladas de *Avena sativa*. Al madurar las hojas se localizan en la vacuola y pared celular, pero no se encuentra en los cloroplastos. En general se encuentran en forma de glucósidos.

Al igual que los ácidos fenólicos, pueden influir sobre la actividad AIA-oxidasa, así se ha visto que los 3',4'-dihidroxi-flavonoides (quercetina y rutina [XIII]) inhiben el enzima, mientras que los 4'-hidroxi-flavonoides (apigenina [X] y naringenina) lo esti-

mulan. Un grupo hidroxilo en posición 7 del anillo A aumenta fuertemente la actividad enzimática.

Estos hechos hacen pensar que el papel de los flavonoides *in vivo* sea regular la AIA-oxidasa. Al iluminar brotes de guisante con luz roja se inhibe la actividad AIA-oxidasa, que se estimula al iluminar con luz del rojo lejano. Se vio que la inhibición venía acompañada del aumento de un inhibidor, que en realidad resultó ser una mezcla de quercetina y kempferol y otros compuestos derivados de los mismos.

La producción de etileno (ver Cap. 25) también está influida por los compuestos fenólicos a través del sistema peroxidasa que cataliza la formación de etileno. Se ha sugerido que la formación de compuestos fenólicos por la luz roja suprime la producción de etileno y, por tanto, la apertura del garfio apical.

Los flavonoides inhiben la producción de ATP en mitocondrias, concretamente lo hacen quercetina y kempferol, que resultan muy eficientes, actuando sobre el mecanismo de fosforilación y no sobre el transporte de electrones. En cloroplastos los flavonoides causan la inhibición de la fotofosforilación cíclica y acíclica. Quercetina disminuye considerablemente la tasa de la reacción de Hill en cloroplastos aislados, a concentraciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  M estimula la fotofosforilación, pero a concentraciones más elevadas la inhibe.

Los flavonoides, al igual que los ácidos fenólicos, influyen sobre el crecimiento causado por el AIA en secciones de entrenudos de avena, algunos aumentando la respuesta como quercetina, y otros inhibiéndola como apigenina, genisteína (XIV) y naringenina. Esta influencia puede ejercerse a través del sistema AIA-oxidasa ya que algunos flavonoides inhiben la elongación de secciones de coleóptilos de avena. En cromatogramas ensayados por este método se ha visto que algunas zonas causantes de potente inhibición, lo eran debido a la presencia de naringenina-7-glucósido.

Ciertas antocianinas son capaces de estimular el crecimiento de raíces de plántulas de trigo, e incluso se contraponen a la inhibición causada por la auxina. Floretina y naringina también estimulan el crecimiento de raíces, especialmente en presencia de auxinas, habiéndose observado que esta capacidad de estimular el crecimiento de raíces guardaba relación con la capacidad de desacoplar la fosforilación oxidativa, aunque no aparecía tal correlación con los efectos que ejercía sobre la AIA-oxidasa. En cultivos de tejidos de manzana, se ha visto que la floridzina promueve el crecimiento de ápices de tallo, sugiriéndose la posibilidad de que sea la propia floridzina endógena la que regule este proceso en las plantas. Algunos flavonoides retardan la senescencia de las hojas, como sucede en el caso de la quercetina, mientras que otros, por el contrario, sólo lo hacen de forma sinérgica con las citoquininas.

Cuando se compara el comportamiento de los compuestos fenólicos con la hormona inhibidora por antonomasia, el ABA, se obtienen consecuencias muy interesantes. Se ha sugerido que el ABA puede regular la biosíntesis del ácido cinámico y de los inhibidores fenólicos, puesto que al aplicarlo de forma exógena aumenta la actividad fenilalanina-amonio-liasa (PAL). Además, tanto el ABA como los inhibidores fenólicos, inhiben la germinación de semillas, actúan inhibiendo el crecimiento de secciones de coleóptilos y ambos promueven el enraizamiento de esquejes, aunque en general el ABA es activo a concentraciones mucho más bajas. Sin

embargo, conviene señalar que los compuestos fenólicos parecen actuar a través de la regulación de AIA-oxidasa y, por tanto, de los niveles de AIA en el tejido, mientras que el ABA puede influir sobre los niveles de giberelinas. Probablemente la explicación haya que buscarla en que el ABA actúa a nivel de translación, regulando la síntesis enzimática, mientras que los fenoles actuarían directamente sobre el enzima.

Sin embargo, conviene señalar que aunque los compuestos fenólicos, cuando se aplican de forma exógena, actúan de la forma descrita, no hay pruebas de que los fenoles endógenos actúen de la misma manera y, por tanto, no puede generalizarse sobre los mecanismos de acción de los mismos.

La cumarina (XV) y sus derivados presentes en plantas son considerados como inhibidores, aunque también pueden ejercer un papel estimulante en numerosas etapas del desarrollo a concentraciones fisiológicas. No se puede afirmar, al igual que se dijo para los flavonoides, que las cumarinas endógenas jueguen un papel regulador análogo al que poseen cuando se aplican de forma exógena.

Las cumarinas se encuentran ampliamente distribuidas, aunque en general la presencia de una cumarina particular se circunscribe a una o unas pocas familias. Así la cumarina se encuentra en Leguminosas y Gramíneas, la escopoletina (XVI) se encuentra más ampliamente distribuida, pero predomina su presencia en las Solanáceas. El contenido en cumarinas de una planta puede variar en respuesta a la infección o a situaciones de adversidad o bien como consecuencia de la aplicación de otros reguladores del crecimiento.

Las cumarinas inhiben la acción de la auxina en el ensayo de curvatura de tallos de guisante y en el de elongación de segmentos de coleóptilos de avena. Tanto la Cumarina como la Escopoletina ejercen una acción inhibitoria en diversos sistemas incluso en la germinación de semillas de lechuga, donde sus efectos se parecen a la dormición natural de algunas variedades, incluso en el hecho de ser anulada por la luz roja.

Hemos dicho anteriormente que las cumarinas pueden, en algunos casos, ejercer una acción estimulante; y así la umbeliferona (XVII) estimula la formación de raíces en esquejes de alubia y la cumarina estimula la germinación y crecimiento de plántulas de cebada a concentraciones bajas, del orden de 0,3  $\mu$ M.

Al poseer algunas cumarinas grupos hidroxilo, pueden influir sobre la oxidación del AIA; así, el derivado metilado de la umbeliferona promueve la oxidación del AIA y la escopoletina la inhibe. Este último compuesto modifica la peroxidasa de rábano produciendo una forma estable del enzima que es menos activo en reacciones con el oxígeno molecular y AIA. Aunque no hay pruebas definitivas de que las cumarinas actúen regulando la oxidación del AIA, la inhibición del crecimiento en radículas de calabaza por la cumarina viene acompañada de un aumento de actividad AIA-oxidasa y peroxidasa en los extractos de tejidos.

Se ha estudiado la relación entre la estructura y la actividad de las cumarinas, concretamente en la inhibición de la germinación, y se ha visto que la cumarina es más activa que los compuestos naturales umbeliferona, esculetina (XVIII) y escopoletina. La inhibición de la germinación que causa la cumarina se puede anular aplicando giberelinas, con lo que se piensa que las cumarinas en realidad son anti-

giberelinas, debido a la similitud entre la parte de la molécula giberelina con el enlace lactona. En este sentido, la 3,4-dihidroxicumarina se ha visto que interacciona con giberelina en tal forma que hace pensar en la existencia de competencia por el mismo centro activo.

Poliaminas es un grupo de compuestos como la putrescina, cadaverina, agmatina u homoagmatina, que derivan de aminoácidos y se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas. Pueden encontrarse libres o conjugadas con ácidos cinámicos o con ácidos grasos.

Dado que la presencia de estos compuestos en las plantas es sensible a la luz absorbida por el fitocromo y a algunas hormonas como giberelinas y citoquininas, se pensó en ellas como mensajeros secundarios o transductores de estímulos extracelulares. Además se vio que podrían participar directamente en procesos de senescencia y crecimiento. Así, la aplicación exógena de poliaminas a hojas de avena retrasaba el envejecimiento de las mismas al inhibir la degradación de la clorofila y el descenso neto de proteínas a través de la inhibición del incremento en la síntesis de ribonucleasas y proteasas. Por otra parte, la senescencia viene acompañada de unos bajos niveles de putrescina y otras poliaminas, tanto en hojas intactas como en hojas aisladas.

Se ha encontrado una correlación muy estrecha entre el contenido de poliaminas y las tasas de crecimiento; así, en tubérculos de *Elianthus tuberosus*, se observó que cuando los tubérculos están dormidos existe un nivel muy bajo de poliaminas, AIA y citoquininas y cuando se aplican poliaminas exógenas las células de los tubérculos son capaces de crecer y multiplicarse sin tener que añadir otros reguladores del crecimiento. Participan en otros procesos de crecimiento como la formación y germinación de semillas y la formación de tubérculos. Durante el crecimiento de plántulas de *Phaseolus vulgaris*, el contenido de poliaminas disminuye en los cotiledones, a medida que aumente en los tallos en crecimiento.

Un papel importante de las poliaminas es en la obtención de protoplastos, evitando su plasmolisis durante los procesos de obtención de los mismos; este papel puede lograrse mediante dos mecanismos: bien por estabilizar las cargas negativas de la membrana mediante unión superficial, o influyendo directamente sobre la biosíntesis y degradación de los ácidos nucleicos. En relación con esto no debemos dejar de considerar la relación de las poliaminas con el etileno, ya que éstas interfieren de forma muy activa con la biosíntesis de etileno inhibiendo el paso de SAM a ACC y estimulando la incorporación de metionina en espermidina. Frente a condiciones de elevada concentración salina, las células reaccionan aumentando su contenido en poliaminas, produciéndose este fenómeno principalmente en las raíces. En otros muchos procesos se ha visto que las poliaminas participan de forma más o menos directa, como en la fertilización, floración y fructificación, aumentando la productividad tanto en número de frutos como en el peso de los mismos.

Aunque aún no se ha dilucidado con claridad cuál es el mecanismo de acción de las poliaminas, se cree que actúan uniéndose al DNA y estabilizando la molécula contra las situaciones que llevarían a su desnaturalización, favoreciendo y acelerando la transcripción del DNA.

Puede concluirse que las poliaminas constituyen un nuevo grupo de reguladores naturales en plantas o, al menos, cumplen la mayoría de los requisitos necesarios para

ser consideradas como tales, presentando además la ventaja de no tener efectos paralelos negativos, por lo que podrían desbancar en un futuro próximo la utilización de los reguladores clásicos en agricultura.

La necesidad de encontrar un mensajero secundario que sirviera para explicar el mecanismo de acción de las hormonas vegetales comenzó con la búsqueda de AMP-cíclico, sin que hasta el momento pudiera demostrarse fehacientemente su presencia en las plantas.

Hemos dicho que las poliaminas podrían jugar este papel de mensajero secundario, pero recientemente se han encontrado pruebas de la existencia, en células vegetales, de una proteína, la calmodulina, capaz de formar complejos con el Ca y actuar realmente como un mensajero secundario en el mecanismo de acción de las hormonas vegetales, al igual que actúa en células animales.

En plántulas de guisante se vio que la adición del complejo Ca-calmodulina activaba NAD-kinasa y se demostró que la afinidad del complejo por el enzima era mucho mayor que la de este complejo por otros enzimas animales. Se ha estudiado la distribución de la calmodulina en células vegetales y se cree que su distribución es muy amplia, tanto en el citosol como en cloroplastos o en el núcleo asociado a la cromatina.

Cada día hay más datos experimentales que atribuyen al complejo Ca-calmodulina una función intermediaria entre el mecanismo de acción primario de las hormonas vegetales y la expresión de sus efectos morfológicos. Así, la elongación de coleóptilos inducida por AIA se retrasa con inhibidores de la acción de la calmodulina: en general, los inhibidores de la calmodulina en altas concentraciones retrasan o anulan las respuestas morfológicas de las auxinas, giberelinas y citokininas, mientras que a bajas concentraciones tienen un efecto estimulador. Los avances que se produzcan en esta línea de investigación pueden llevar a una teoría unificadora para explicar el mecanismo de acción de las hormonas, teniendo en cuenta que hay gran número de datos experimentales que implican al Ca en la acción de las hormonas vegetales.

#### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- LETHAM, D. S.: *Naturally-Occurring Plant Growth Regulators other than the Principal Hormones of Higher Plants*, en: *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise*, vol. I (Ed.: Letham, Goodwin y Higgins), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978.
- MILLBORROW, B. W.: *Abscisic Acid*, en: *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise*, vol. I (Ed.: Letham, Goodwin y Higgins), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978.
- SMITH, T. A.: *Polyamines*, «Ann Rev. Plant Physiol.», 36:117-143, 1985.
- STODDART, J. L., y VENIS, M. A.: *Molecular and Subcellular Aspects of Hormone Action*, en: *Hormonal Regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlin, 1980.
- WALTON, D. C.: *Biochemistry and Physiology of Abscisic Acid*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», 31:453-489, 1980.
- WAREING, P. F.: *Abscisic Acid as a Natural Growth Regulator*, «Phil. Trans. R. Soc. Lond.», B, número 284, 1978, págs. 483-498.
- ZERONI, M., y HALL, M. A.: *Molecular Effects of Hormone Treatment on Tissue*, en: *Hormonal Regulation of Development I*, ed. J. MacMillan, Springer-Verlag, Berlin, 1980.

## DIFERENCIACIÓN

El sistema pluricelular del que se componen la mayoría de las plantas, procede inicialmente de una única célula (cigoto o espora) que por división celular (mitosis y citocinesis) y diferenciación, origina los distintos fenotipos celulares (por ejemplo, células del parénquima, colénquima, floema, xilema, etc.). Si se tiene en cuenta el mecanismo molecular de la replicación del DNA (formación de dos «réplicas» idénticas en la fase S del ciclo celular, las futuras cromátidas hermanas) y la separación de estas cromátidas hermanas en la división celular por mitosis, se comprende que es de prever que, al menos la mayoría de las células del conjunto pluricelular de la planta, sean *totipotentes*, es decir, llevan «idéntica» información genética.

El estudio de la diferenciación se ha mostrado especialmente fructífero en el campo de las plantas ya que, en el estado actual de conocimientos, permite una aproximación experimental más efectiva que, en general, con los sistemas pluricelulares animales. En este sentido, existen todo un conjunto de evidencias experimentales que confirman la totipotencia celular de las plantas pluricelulares. Estas evidencias se basan fundamentalmente en experimentos de regeneración con plantas, en cultivos de tejidos vegetales, experiencias con protoplastos vegetales y en el análisis citológico y molecular de distintas fases o pautas de diferenciación en el proceso del desarrollo de distintas especies vegetales.

### 27.1. Bases experimentales de la diferenciación

#### 27.1.1. Regeneración y diferenciación en cultivo de tejidos

En las plantas se halla ampliamente extendida la capacidad de regeneración de órganos o partes perdidas del vegetal e, incluso, la posibilidad de originar una planta entera a partir de la parte seccionada. Este fenómeno juega un papel decisivo en la propagación vegetativa de las plantas (esquejes, obtención de poblaciones clónicas, etc.) y ha aportado muchos datos experimentales para el establecimiento de una teoría de la diferenciación.

Un ejemplo clásico de regeneración en las cormofitas es la regeneración de raíces y yemas adventicias a partir de hojas seccionadas de *Begonia rex*. Un estudio histológico

del proceso demuestra que las nuevas plantas se originan a partir de una célula epidérmica que se desdiferencia a célula embrionaria, entra en división y diferencia una nueva planta completa.

Desde el punto de vista del análisis experimental del proceso, el *cultivo de tejidos* ha jugado un papel clave. Estas técnicas de cultivo de tejido, a partir de un explante, fundamentalmente se pueden adscribir a dos tipos distintos:

- a) *Cultivo en suspensión celular*, en donde en un medio nutritivo líquido se consiguen células aisladas y algunos agregados celulares.
- b) *Cultivo en medios nutritivos sólidos en agar*, en los que se logra un crecimiento compacto indiferenciado (callo) o distintos grados de histogénesis y organogénesis, según sean las condiciones hormonales del medio.

Ya en 1937 Nobécourt obtuvo cultivo de callos a partir de tejidos de raíz de zanahoria (*Daucus carota*) en medio sólido, observando, posteriormente, la formación espontánea de raíces por el cultivo. En 1952 Steward logró inducir una proliferación activa de explantes de las raíces, al someterlos alternadamente a un medio líquido de leche de coco y exposición al aire. En 1958 obtuvo plantas normales cuando los agregados liberados al medio desde el explante eran transferidos a la superficie de un medio sólido de agar. Este tipo de experiencias nos demuestra la *formación de embrioides en cultivo de células somáticas* en los que se ha roto su pauta de desarrollo normal por alteración de sus interacciones con las células vecinas y por modificaciones nutritivas y hormonales de los medios de cultivo. Actualmente, estos experimentos se han podido realizar con éxito en otras especies vegetales (*Atropa belladonna*, *Ranunculus sceleratus*, *Asparagus officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Cichorium endiva*, *Petroselinum hortense*, entre otras). Pero se debe a Vasil y Hildebrandt (1965) la demostración más precisa de que a partir de «una» célula somática aislada se puede diferenciar una planta entera, en experimentos con callo de parénquima de tabaco en el que por micromanipulación al microscopio de disección transplantaron las células separadas del callo a un medio de cultivo adecuado. Las plantas así obtenidas, transplantadas a tierra, florecieron y fructificaron normalmente.

### 27.1.2. Formación de embrioides haploides a partir de microsporas

Las experiencias del apartado anterior demuestran la totipotencia de las células del esporofito. Un paso más allá lo representan los experimentos de *androgénesis* o capacidad de desarrollo de una planta a partir del grano de polen (gametofito).

*In vivo*, como resultado de la meiosis en las células madre del polen, se forman tetradas de polen que eventualmente se liberan en forma de microsporas. En éstas, por la primera división mitótica, se forman una célula vegetativa grande y otra célula generativa menor. A partir de ésta, por división, se forman los espermatozoides.

Aunque la androgénesis, en un medio de cultivo, se puede inducir en el estadio de tetradas o en el del polen binucleado, no obstante, el momento más adecuado es en la fase anterior de microsporas. La androgénesis puede ocurrir por un mecanismo directo o indirecto. En la *androgénesis directa* las microsporas se comportan como un cigoto y

sufren una embriogénesis parecida a la que ocurre *in vivo*. Por el contrario, en la *androgénesis indirecta* en lugar de ocurrir la embriogénesis de las microsporas, éstas se dividen para formar un callo. Posteriormente el callo se diferencia para formar embriones, o raíces y callo, bien en el mismo o en diferente medio. Por uno u otro mecanismo se originan plantas haploides, algo más pequeñas que los esporofitos normales, que llegan a florecer aunque no forman semillas.

La embriogénesis a partir de microsporas ya se ha podido conseguir con mayor número de especies y va adquiriendo cada vez más importancia en el estudio de la mejora genética de las plantas y en el campo de la investigación básica de la Fisiología Vegetal. Así, por esta técnica, se pueden obtener clones homocigóticos diploides si se hace un tratamiento previo con colchicina e incluso preparar fácilmente mutantes recesivos cuya manifestación fenotípica aparece rápidamente por su naturaleza haploide o por su autodiploidía conseguida experimentalmente. Genéticamente son mucho más interesantes las plantas obtenidas por androgénesis directa que por la indirecta, ya que las primeras son uniformemente haploides mientras que en el segundo caso se presentan también células diploides y triploides debido, seguramente, a la frecuencia con que ocurren endomitosis.

### 27.1.3. Protoplastos y diferenciación celular

Otra aproximación experimental que últimamente se ha mostrado muy fructífera, tanto en el terreno de la diferenciación que ahora nos ocupa, como en otros procesos de tipo fundamental y aplicado de la Fisiología Vegetal, ha sido el estudio de los protoplastos vegetales. Se entiende por tales a las células privadas de su pared celular. Aunque los protoplastos vegetales fueron aislados por primera vez hace escasamente veinte años, actualmente se disponen de este tipo de experiencias con gran número de especies de plantas.

Para su aislamiento frecuentemente se parte de la hoja, aunque han sido aislados de casi todas las partes de la planta (raíces, hojas, nódulos radiculares, coleóptilos, frutos, pétalos, tubérculos, endospermo, capa de aleurona, tumores de agalla de cuello, polen y cultivo de callos). La pared celular puede separarse mecánicamente. No obstante, normalmente se utilizan procedimientos de tipo enzimático, por medio de celulasas y pectinasas, en células ligeramente plasmolizadas en un medio hipertónico. El método enzimático ofrece las ventajas, frente al mecánico, de que se pueden obtener protoplastos en mayor proporción, que no se rompen las células y de que es menor la rotura osmótica.

Todavía más reciente es la obtención del fenómeno de la *fusión celular* con protoplastos vegetales. Los protoplastos pueden fusionarse espontáneamente durante su aislamiento, o dicha fusión puede ser inducida por exposición a condiciones especiales (solución de  $\text{NO}_3\text{Na}$  o de polietilenglicol). En el caso de fusión celular de protoplastos del mismo origen, se obtiene una célula homocariótica con dos núcleos. Por suspensión mixta de protoplastos de dos especies distintas, con un aglutinante adecuado (nitrito sódico, polietilenglicol, métodos inmunológicos, etc.) se puede obtener una célula con los dos núcleos (*heterocarión*), produciéndose así un verdadero *híbrido somático* por un

proceso de hibridación parasexual. El primer híbrido somático amfidiploide así obtenido fue entre *Nicotiana glauca* y *Nicotiana glauca*. Este híbrido somático, llevado a un medio nutritivo adecuado (sin hormonas), no sólo regenera rápidamente su pared celular y entra en división celular (mitosis), sino que inicia su diferenciación formándose tallos que por injerto, sobre una o la otra especie, hacen posible que el híbrido florezca y fructifique.

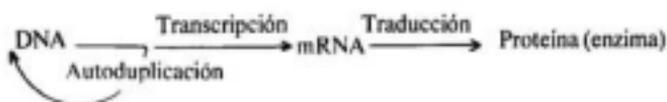
Uno de los problemas mayores de los estudios de hibridación somática reside en la necesidad de disponer de «marcadores» adecuados para establecer la verdadera identidad de un «híbrido somático». La dificultad reside en la detección de las células híbridas debido a su escasa presencia. Para ello no son suficientes las características fenotípicas (por ejemplo, color, tamaño y forma) y pueden emplearse diversos marcadores bioquímicos o genéticos (por ejemplo, la pauta de isoenzimas, cariotipo, número de cromosomas, capacidad biosintética, pigmentos, resistencia a drogas, medios nutritivos selectivos, variaciones genéticas, autotrofia a metabolitos, sensibilidad a la luz, etc.).

Las experiencias con protoplastos vegetales son potencialmente de gran interés para la investigación en Fisiología Vegetal. En primer lugar, han demostrado la totipotencia de los protoplastos aislados, a partir de los cuales puede regenerarse una planta completa y han permitido la obtención de «híbridos somáticos» interespecíficos de propiedades muy parecidas al de los híbridos sexuales (Fig. 27.1) y una potencialidad muy superior de obtención, que en el caso de estos últimos es muy laboriosa. Al tratarse de células desnudas privadas de su pared celular, permiten un acceso más fácil para las manipulaciones genéticas y la transformación celular.

Entre las potencialidades a señalar en este campo de la ingeniería genética, está la posibilidad teórica de conseguir la transferencia a protoplastos vegetales de cloroplastos de especies activas fotosintéticamente o de genomas seleccionados como los genes *nif* (Cap. 18), responsables de la codificación del enzima nitrogenasa, a especies vegetales (por ejemplo, cereales); también la transferencia de núcleos, cromosomas, mitocondrias, etc. No obstante, debe tenerse en cuenta que la ingeniería genética con las plantas superiores es mucho más difícil que con las bacterias y fagos, entre otras razones porque la mayoría de caracteres de las plantas superiores están determinados por una dotación compleja de genes. Otra consecuencia, de no menor importancia que la anterior, es que las técnicas de modificación genética se pueden aplicar a la investigación básica de la diferenciación celular y de la regulación de las relaciones núcleo-citoplasma en la estructura y función celular.

## 27.2. Mecanismo de la diferenciación

Según el dogma central de la biología molecular, la información genética se halla codificada en la secuencia de nucleótidos que componen al DNA, en donde reside, así, la base química de la herencia. Teniendo en cuenta las propiedades autocatalítica y heterocatalítica del DNA el flujo de la información genética puede establecer la relación:



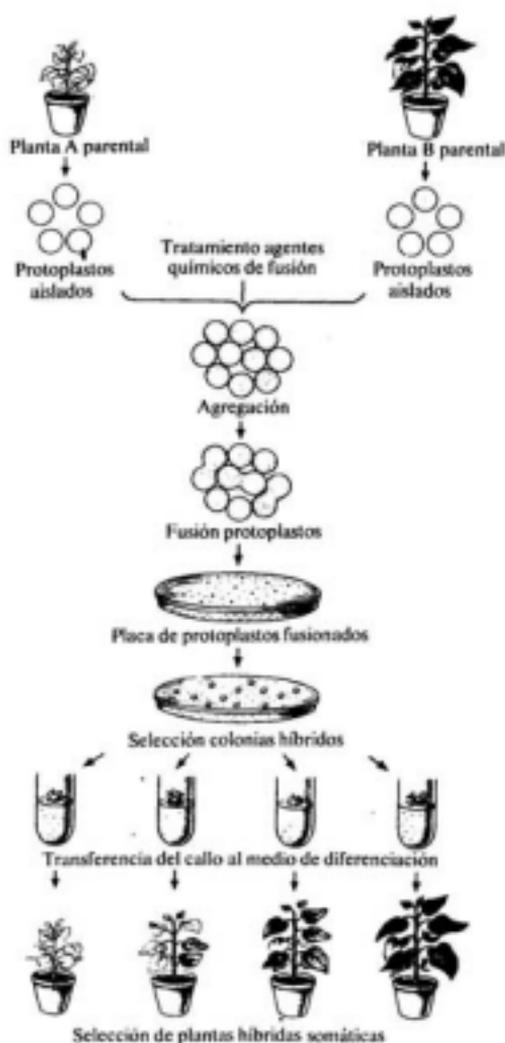


Figura 27.1.—Experiencias de «fusión celular» de protoplastos vegetales que permiten la obtención de «híbridos somáticos» interespecíficos (tomado de Y. P. S. Bajaj, en: *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. J. Reinert e Y. P. S. Bajaj (edit.) Springer-Verlag, Berlín 1977).

en el que se representa la *propiedad heterocatalítica* por la que mediante la transcripción de la secuencia de nucleótidos codificada en el DNA a la de los nucleótidos complementarios del mRNA específico en el núcleo, seguido de su migración al citoplasma

y ribosomas, determina la pauta de traducción de la secuencia de nucleótidos del mRNA a una secuencia específica de aminoácidos (proteína específica), procesos que, representados en su forma más sencilla, componen la *expresión génica*. La capacidad del DNA de dar réplicas idénticas o *autoduplicación*, previamente a la división celular (mitosis o meiosis), corresponde a la denominada *propiedad autocatalítica*.

En el apartado anterior nos hemos ocupado de la descripción de distintas experiencias de regeneración con plantas en las que a partir de una o varias *células adultas diferenciadas*, por cambio en sus interacciones con las células vecinas en que normalmente se desarrollan en su ciclo ontogénico, se lograba su *desdiferenciación* o *rediferenciación* a célula embrionaria seguido de la formación de un embrión y la diferenciación de una planta adulta normal. Estos resultados confirman el carácter *totipotente* de la mayoría de células que integran el sistema pluricelular que compone a la planta y suministran una fuerte evidencia experimental para una teoría del mecanismo molecular de la diferenciación. Según estas evidencias experimentales, la diferenciación no se debe a una pérdida o cambio irreversible del número de genes, sino que todas las células (con algunas excepciones como los elementos de los tubos cribosos, las traqueidas y los vasos adultos) mantienen la totalidad del patrimonio genético (totipotencia).

Del análisis de la expresión génica en el dogma central del DNA, si se excluye, de acuerdo con la evidencia anterior, la pérdida de genes, se hace patente, al menos en el estado actual de conocimientos, que el mecanismo molecular de la diferenciación se basa, muy probablemente, en una *regulación de la actividad de los genes*. Esta regulación puede lograrse en tres niveles distintos: en la *transcripción*, en la *postranscripción* (bien en la *traducción* o por regulación de la *estructura y actividad de las proteínas*) y en la *autoduplicación*.

En los genomas eucariotas de las células vegetales se sabe de la existencia de *redundancia génica* o *DNA repetitivo*, es decir, de la presencia de diversas copias de un mismo gen que codifican la misma información. Los hallazgos experimentales de que se dispone hablan más bien de un papel secundario de esta *regulación por amplificación génica*, de forma que sólo sería importante en determinadas fases del desarrollo celular, como, por ejemplo, en la síntesis de rRNA en células jóvenes observable incluso, a veces, citológicamente, como sucede en los cromosomas plumulosos de oocitos de anfibios.

Se cree que el papel central del mecanismo de regulación génica sería de acuerdo con la *teoría epigenética* o de la *regulación diferencial de la actividad de los genes* y sería regido por la interacción de factores citoplasmáticos (intra- o intercelulares) con el genoma celular constante. El resultado serían cambios *potencialmente reversibles* de la actividad génica. Cabría, pues, pensar en una *regulación diferencial de la transcripción* (síntesis diferencial de mRNA específicos), de una *regulación diferencial de la traducción* (síntesis diferencial de proteínas específicas) o de una *regulación diferencial de la estructura y actividad de las proteínas (enzimas)*.

Antes de entrar en la discusión general del control de la actividad genética, es necesario considerar algunos conocimientos sobre la estructura y función del genoma de las células eucariotas. El análisis molecular de la genética se ha desarrollado fundamentalmente a partir de experiencias genético-bioquímicas con bacterias y fagos. En el control de la actividad génica de los microorganismos (procariotas) participan varios tipos de genes: los *genes estructurales*, que codifican la información a ser traducida, los *genes*

*operadores*, que forman una unidad funcional (*operón*) que permite o impide la transcripción de los genes estructurales y los *genes reguladores* que controlan, a distancia, la actividad de los anteriores. Jacob y Monod, en los años sesenta, desarrollaron una teoría de la regulación de la actividad genética de las bacterias que se basa en un *control negativo*, a través de un *repressor* sintetizado a distancia por un gen regulador. Por unión del repressor al gen operador se bloquea la actividad genética (transcripción) de los genes estructurales que integran al operón. En presencia de un «efector» adecuado, por ejemplo un metabolito, por cambio alostérico del repressor, se logra su inactivación o activación, según los casos y, por tanto, el desbloqueo del gen operador (activación de la expresión génica) o el bloqueo del mismo (represión de la expresión génica) (Fig. 27.2). Posteriormente se ha comprobado la posibilidad de que coexistan mecanismos de regulación por *control positivo*, es decir, el producto de la actividad del gen regulador no es un repressor, sino una sustancia activadora sobre el operón facilitando la acción de la RNA-polimerasa, enzima responsable de la transcripción.

La mayor complejidad del genoma de la célula eucariota, para el que se calcula un tamaño de 100 a 1.000 veces el de los procariotas, con gran cantidad de DNA repetitivo (partes no informativas o genes redundantes) y la asociación del DNA con gran canti-

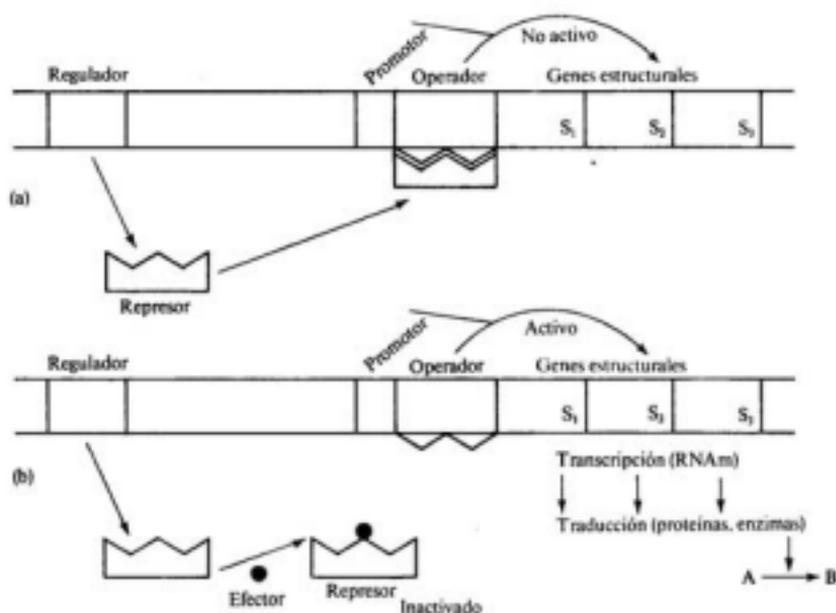


Figura 27.2.—Control de la expresión génica. En la teoría de Jacob y Monod, referida a procariotas (bacterias), se establece un control *negativo* por medio de un *repressor*, sintetizado por el gen regulador, que bloquea (reprime) al operador e impide la transcripción de los genes estructurales (a). Por adición de un *efector*, que actúa como inductor (por ejemplo, la lactosa en *E. coli*) se produce la desrepresión genética que posibilita la operación de la RNA-polimerasa que cataliza la transcripción (b).

dad de proteínas (histonas y proteínas ácidas) en la cromatina, tan diferente del modelo del cromosoma bacteriano, no permite, sin más, una generalización de la teoría de Jacob y Monod. Diversos autores (Davidson, Britten, Georgiev, Schnarrer, etc.) han tomado como base esta teoría y han desarrollado modelos de regulación más complejos, aplicables como posibles mecanismos en las células eucariotas y en los que, como era razonable esperar, además del control de la transcripción descrito para los procariotas pueden ocurrir controles génicos más complicados, posiblemente con intervención de las proteínas cromosómicas (histonas y proteínas ácidas).

Un estudio en profundidad de estos mecanismos cae fuera de los límites de este tratado, por lo que nos limitaremos a comentar sólo alguno de ellos entre los más corrientemente considerados. Para un estudio más detallado del tema se aconseja al lector la consulta de literatura más especializada, que se especifica en la bibliografía. El modelo de Georgiev sugiere que las secuencias repetidas de DNA pueden tener una función reguladora y que la naturaleza repetitiva del DNA regulador resulta de la presencia de una serie de sitios de unión para los efectores. Asimismo, este modelo implica la regulación, además de la transcripción y traducción, de pasos intermedios (regulación en cascada, en el modelo de Scherrer y Marcaud). No todo el DNA es informativo y en una «unidad de transcripción» son transcritas una larga secuencia no informativa junto con la región propiamente informativa. De aquí que no corresponda al mRNA propiamente dicho, sino a un *mRNA precursor* o también llamado mRNA nuclear heterogéneo (hnRNA). El paso siguiente se conoce como *maduración* o *procesado* del mRNA. En un primer paso ocurre la unión de un poliadenilato al extremo 3' (parte informativa) del mRNA precursor, seguido de la asociación de proteínas al mRNA precursor. Distintas exo- y endonucleasas son las encargadas de separar los nucleótidos de la parte no informativa. La parte informativa, unida aún a proteínas, abandona el núcleo hacia el citoplasma en donde puede ser utilizado el mRNA en los polisomas para la biosíntesis de proteínas o permanecer almacenado como ribonucleoproteidos a los que se denominan *informosomas*.

Todos estos modelos presuponen que el DNA debe hallarse «libre» en el momento de la transcripción y la función reguladora de las proteínas de la cromatina. Inicialmente, las evidencias apuntaban un papel clave de las histonas en el control de la regulación de la actividad génica. Tanto por experiencias en sistemas exentos de células, como en estudios *in vivo*, se comprobó que la eliminación de las histonas de la cromatina inducía la actividad genética y su adición la represión genética. Un estudio detallado de los diferentes tipos de histonas pronto hizo surgir dudas dado su escaso número y poca especificidad. En efecto, las histonas muestran una heterogeneidad muy limitada. Se suelen clasificar en cinco grupos distintos H (H1, H2A, H2B, H3, H4) con pesos moleculares de 11.000 a 22.000 daltons. El carácter básico de las histonas es debido a su alto contenido en arginina y lisina. Su escasa especificidad se deduce fácilmente de la poca variabilidad de los distintos tipos de histonas y de la misma histona para diferentes especies. Así, las histonas H3 de ternera, cerdo y rata son idénticas y sólo se diferencian de la H3 de guisante por dos sustituciones en la secuencia de aminoácidos.

Recientemente se tiende a creer que más significativa es la participación en dicha regulación, seguramente por un mecanismo de desrepresión, de la fracción proteica no histónica de la cromatina (*proteínas ácidas*), adscribiendo a las histonas más bien una función estructural en la cromatina (*estructura del nucleosoma*).

En 1979 Britten y Davidson han propuesto un modelo en el que el control de la expresión génica no sería debido a la regulación de la actividad o represión selectiva de los genes estructurales. Se basan en el hecho de que de la gran diversidad de copias simples de RNA nuclear, presentes con carácter general en las distintas células, sólo una fracción muy pequeña de ellas se halla en el mRNA del citoplasma y, además, su presencia es variable en las distintas células. De acuerdo con ello, el núcleo celular diferenciado incluiría no sólo un genoma completo (totipotente), sino que también la transcripción de los genes sería general, estableciéndose la regulación de la expresión génica por la variación en el número y tipos de mRNA que sobreviven, son procesados en el núcleo y, por transporte, alcanzan el citoplasma. Estos autores postulan que precursores de mRNA de genes estructurales se hallarían protegidos de la degradación por formación de dúplex de RNA-RNA con secuencias transcritas de genes no estructurales. De acuerdo con este modelo, la supervivencia de algunos mRNA en determinados tipos celulares dependería de la producción de genes no estructurales de regulación específica. Se trata de un típico mecanismo de regulación postranscripcional a nivel del procesado en el núcleo.

En el mismo orden de ideas, pero con otro tipo de experimentos, se poseen evidencias de interacciones mutuas núcleo-citoplasma en el proceso molecular de la diferenciación. Así se sabe que los procesos de *división desigual* del citoplasma juegan un papel importante en el origen de la heterogeneidad celular en las plantas, tal como se ha podido comprobar para el desarrollo de los estomas y la formación de los pelos radiculares en las gramíneas (monocotiledóneas) (Cap. 4.2). Por este mecanismo se llegaría a un gradiente citoplasmático con respecto a distintos componentes celulares y a un entorno citoplasmático diferente en los núcleos hijos que regularía la diferenciación selectiva de las dos células hijas.

En estudios de regeneración, enucleación y transplante de núcleos entre especies iguales o distintas del género *Acetabularia*, alga sifonal formada por una única célula en la que el núcleo se localiza en un rizoides basal que a través de un pedúnculo acaba en la parte superior en un sombrerillo de morfogénesis específica, se ha podido comprobar que la morfogénesis de *Acetabularia* depende de la presencia de un mRNA estable de vida larga. Estas evidencias se han conseguido por varios métodos. Así, en una célula enucleada de *Acetabularia* que ya no transcribe RNA, por el contrario, continúa todavía sintetizando proteínas durante varios meses, incluso aunque se añada un inhibidor de la síntesis de mRNA (actinomicina D), pero no si se adiciona un inhibidor de la síntesis de proteínas (puromicina o cicloheximida). En otro tipo de experiencias, si se secciona el sombrerillo de *Acetabularia* el núcleo presente en la parte basal (el propio núcleo o, por enucleación y transplante, el de otra especie) es capaz de regenerar la morfogénesis «específica» del sombrerillo de acuerdo con el núcleo presente.

Muy ligado al hipotético mecanismo molecular de la regulación génica se sitúa la posible participación como «efectores» de determinados mensajeros químicos (fitohormonas). En los capítulos precedentes (22-26) se han considerado con carácter general los cinco tipos actualmente bien definidos de hormonas vegetales. La inespecificidad de acción de las hormonas vegetales hace pensar que el control de la actividad génica más que de las hormonas depende de sustancias que presentan potencialmente una mayor especificidad de acción (proteínas o RNA). Se disponen ya de

algunas evidencias en células vegetales, como ya se ha podido comprobar para las células animales, que la especificidad de acción hormonal de una célula blanco pueda depender de receptores proteicos específicos.

En todo caso, a pesar de los evidentes avances en este campo, todavía se nos escapa el mecanismo fino de fondo de la regulación de la actividad genética en las células eucariotas y la naturaleza y mecanismo de los factores que actúan como efectores en esta regulación en distintos niveles de la actividad genética diferencial en el proceso de la diferenciación celular.

### 27.3. Transformaciones tumorales

Si, como hemos visto, nuestro conocimiento sobre los factores que determinan los distintos fenotipos celulares en el proceso de la diferenciación es muy rudimentario, se comprende la dificultad aún mayor en el estudio de estos mismos procesos en las condiciones «anormales» que determinan la formación de tumores vegetales. En las plantas se suele distinguir entre los tumores con crecimiento limitado de los de crecimiento ilimitado.

Un *tumor de crecimiento limitado* corresponde a una anomalía de crecimiento localizada, producida por hipertrofia e hiperplasia y que se debe en gran parte a la acción de un parásito. Un caso típico de estos tumores son las agallas. En cambio, los *tumores de crecimiento ilimitado*, o verdaderos tumores de las plantas, se caracterizan por un crecimiento desordenado y no inhibido, sin un adecuado mecanismo de control por parte de la planta. De aquí que se les pueda considerar como *cáncer vegetal*.

El estudio de la transformación de la célula vegetal normal a célula tumoral es objeto, cada día, de mayor atención por la importancia que representa el conocimiento de los factores y mecanismos de esta transformación para el establecimiento de una teoría de los procesos de la diferenciación celular y por la significación aplicada que estos conocimientos podrían tener en el problema general del cáncer y del control celular.

#### 27.3.1. Agallas

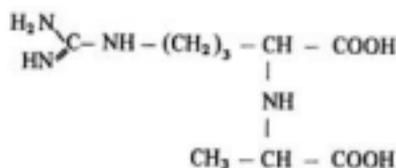
Se trata de un caso típico de tumor de crecimiento limitado que se traduce en anomalías en la formación de tejidos. El factor de transformación procede de insectos (avispa y mosquitos) que por deposición de sus huevos en las plantas (normalmente en las hojas u órganos jóvenes) inducen el crecimiento en extensión y por división celular. Su morfogénesis se manifiesta por una formación histoiide, conocida por *agalla* y su *especificidad* es atribuible al insecto. Se conocen más de 15.000 tipos de agallas que se pueden caracterizar por su forma, color, tamaño, posición y constitución interna. Las agallas provocadas por himenópteros son uno de los ejemplos más demostrativos de la complejidad de este tipo de tumores vegetales.

Se desconoce el mecanismo por el que a partir de la inducción por el parásito se origina la formación de la agalla en la planta, aunque se supone que se precisa *continuamente* la acción morfogenética del parásito sobre la agalla, pues por muerte de éstos

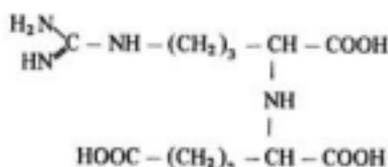
cesa el desarrollo de las agallas. Tampoco se conoce la naturaleza de las sustancias químicas que, cedidas por el insecto, determinan el desarrollo de la agalla. Entre las posibles especulaciones sobre esta naturaleza se citan desde aminoácidos a virus. Otro hecho a destacar es que en cultivo de tejidos, las células de agalla se muestran como células vegetales normales. De aquí que la formación de una agalla no se la considere como un cambio permanente heredable, sino como una modificación.

### 27.3.2. Agallas de corona

La agalla de corona es un tipo de cáncer vegetal (tumor de crecimiento ilimitado) cuyo agente inductor es una bacteria, el *Agrobacterium tumefaciens*. En sentido estricto no se trata de agallas, sino de excrecencias amorfas que por encontrarse en muchas especies en el cuello (zona de tránsito entre el tallo y la raíz) recibieron la denominación original, con la que aún se las conoce, de agallas de corona o cuello (*crown-gall*). Como mínimo, 93 familias de dicotiledóneas y gimnospermas son susceptibles de transformación por *Agrobacterium*. En cambio, raramente se presentan en las plantas monocotiledóneas. Previa a la transformación tumoral se precisa de una herida en la planta por la que penetra la infección por *A. tumefaciens*. La bacteria permanece en los espacios intercelulares de la planta y ejerce su acción por medio de un «principio inductor de tumores» (PIT) responsable de la transformación de la célula normal a tumoral. Se cree que para las relaciones entre la bacteria y las células de la planta es necesaria la unión a determinados lugares susceptibles a la tumoración de la célula vegetal, de naturaleza desconocida, para los que parecen esenciales las características de la pared celular de la bacteria. No obstante, hay varias hipótesis, según las cuales podría tratarse de una parte de la pared celular de la planta, del plasmalema o, incluso, del interior de una célula destruida de la herida. Una vez en contacto las agrobacterias con las células condicionadas ocurre el proceso de la inducción del tumor. Se ha comprobado, en estudios con diferentes especies de plantas, que heridas infectadas a 25-28° C originan con facilidad tumores, mientras que a 32° C no ocurre la transformación tumoral. Por transformación de una célula normal se obtiene una célula tumor cambiada estable que transfiere sus propiedades a las células hijas. El hecho de que los cambios estables en la información genética generalmente significan cambios en el DNA celular, ha determinado una intensa investigación del metabolismo del DNA en el transcurso del proceso de la transformación tumoral. Las mediciones en el curso de la transformación de los niveles de DNA y RNA y de la acción de los inhibidores, evidencian su participación en la inducción tumoral. Se ha correlacionado la virulencia del *Agrobacterium* con la presencia de un plásmido grande (plásmi-



octopina



nopalina

do Ti de  $96-156 \times 10^6$  daltons) en el que residirían los genes responsables del carácter oncogénico, así como la información genética de cambios metabólicos que presenta la célula transformada. Entre estas características metabólicas diferenciales de la célula tumor frente a la célula normal vegetal están la autotrofia, en cultivo de tejidos, para determinadas fitohormonas (auxina y citoquininas) y la producción de metabolitos no presentes normalmente en la célula vegetal, las opinas, como la octopina y la nopalina, que corresponden a fallos del sistema enzimático de la arginasa que, en lugar de la conversión de la arginina a ornitina y urea, conduce a la formación de este tipo de metabolitos extraños. En los tumores de agalla de cuello, por lo general se presentan alternativamente octopina, nopalina o agropina (junto con agrocinoquinas), creyéndose que el mecanismo metabólico que conduce a ellas es catalizado por deshidrogenasas dependientes de NAD o NADP.

Como ya hemos indicado, la transformación de una célula normal a célula tumor significa el tránsito de un estado estable a otro también estable. Espontáneamente las células normales, por división celular, originan siempre células normales, mientras que las células hijas de la célula tumor son tumorales. Aunque en algunos casos se ha descrito que el estado de tumor, bajo condiciones controladas, puede revertir al estado normal y a la inversa, la mayoría de evidencias indican que la reversión fenotípica del estado de tumor a tejidos normales se debería a la pérdida ocasional o a la segregación del T-DNA (segmento del plásmido Ti presente en las células vegetales transformadas a tumor) o a que las células transformadas pudieran participar en la meiosis y el T-DNA fuera totalmente eliminado en este paso. Otras especies de *Agrobacterium* poseen también esta capacidad de producir tumores en las plantas. *A. rhizogenes*, por medio del plásmido Ri, induce la formación tumoral denominada «hairy roots» (raíz pilosa) que provoca una gran abundancia de raíces, mientras que *A. rubi* induce la formación de agallas («cane gall») idénticas a las del «crown gall» (agallas de cuello) pero producidas principalmente en las partes aéreas.

Es de destacar la significación ecológica de este tipo de parasitismo para *Agrobacterium*, pues le ofrece una gran ventaja competitiva sobre otros organismos del suelo, sobre los cuales puede utilizar selectivamente las «opinas» producidas por la planta huésped (colonización genética). Asimismo, las opinas inducen la transferencia por conjugación del plásmido Ti a otras cepas de *A. tumefaciens* que les faltaba, de forma que así también estas cepas utilizan la opina como fuente de N y C.

Actualmente es objeto de gran interés el uso de los plásmidos Ti en la ingeniería genética de las plantas, pues se pueden insertar genes potencialmente deseables en la región apropiada del plásmido Ti que así sirve de vehículo para adicionar información genética en plantas de importancia agrícola (ver sección 27.4).

### 27.3.3. Virus del tumor de las heridas

Se trata de un tumor producido por un virus en una compleja interacción entre el virus, la planta que sufre la transformación tumoral y un insecto vector (*Agallia cons-tricta*). El virus del tumor de las heridas fue descubierto por L. M. Black y su presencia se ha detectado en más de 43 especies de 20 familias de dicotiledóneas. Un rasgo carac-

terístico de las plantas atacadas por este virus es el engrosamiento irregular de los nervios de las hojas y la presencia de tumores en las raíces, más raramente en el brote.

En la nomenclatura clásica se conoce a este virus como *Aureogenus magnivena*. Actualmente se le sitúa entre los *Reoviridae* por su contenido en RNA, la simetría de la cápside, la ausencia de cubierta y el número de capsómeros. Su diámetro es de 70-80 nm y su cápside posee simetría cúbica (icosaedro). Su peso molecular es de  $68 \cdot 10^6$  daltons que corresponde al 22 por 100 en RNA y al 78 por 100 de proteínas. Su RNA es de doble cadena con un contenido de C + G del 38 por 100 y su cápside se compone de 92 capsómeros de 7-7,5 nm de diámetro.

El virus del tumor de las heridas se localiza en el citoplasma de las células tumorales, en donde se replica. No obstante, no es necesaria su presencia para el mantenimiento del estado tumoral, pues la pérdida del virus en células tumorales en cultivo *in vitro* no determina la pérdida de las propiedades tumorales. Las evidencias experimentales de que se dispone indican que unos pocos cistrones del virus codifican las proteínas que pueden interferir con la regulación de la división de las células en muchas especies vegetales, sobre todo en plantas situadas en condiciones precarias o desfavorables.

Todavía no se conoce el mecanismo básico por el que la infección por el virus provoca la transformación tumoral. Aunque ocasionalmente se hayan obtenido vástagos normales a partir de una planta infectada, no hay evidencias consistentes, por el momento, de que el tejido transformado pueda revertir a normal.

#### 27.3.4. Tumores genéticos

Los tumores genéticos se producen en híbridos interespecíficos y son atribuibles a una determinada constitución genética. Para la mayoría de los tumores genéticos o falta una demostración clara de la participación decisiva del genoma en la formación del tumor o no está comprobado el carácter tumoral.

Entre los géneros en los que se ha comprobado frecuentemente tumores genéticos están: híbridos de *Brassica* (raíces), *Bryophyllum* (tallo), *Datura* (embrión), *Lilium* (plántulas), *Lycopersicum* (nervios foliares), *Pharbitis* (plántulas), *Phycomitrium-Funaria* (esporangio).

El caso mejor conocido de tumores genéticos son los híbridos interespecíficos dentro de las especies del género *Nicotiana*, que se originan espontáneamente en distintos órganos de la planta, sobre todo en la fase de floración. Por el contrario, la generación parental de estos híbridos carece de tumores. A estos tumores de los híbridos de *Nicotiana* se les considera como verdaderos tumores de origen genético.

No todos los híbridos del género *Nicotiana* forman regularmente tumores, sino que del estudio de 300 combinaciones distintas de híbridos solamente un 10 por 100 de combinaciones presentó poblaciones con el 100 por 100 de formación de tumores. Otro hecho a destacar es que se han obtenido híbridos tumorales por medios somáticos. Así por fusión celular de protoplastos de hojas de *Nicotiana glauca* y *Nicotiana langsdorffii*. También en el caso de los tumores genéticos está alterado el metabolismo celular de ciertos aminoácidos y presenta autotrofia para ciertas fitohormonas (auxina y citoquininas).

El análisis experimental de las condiciones del desarrollo permite deducir, bajo condiciones adecuadas, la conversión del tejido tumoral a crecimiento normal, por lo que parece que el estado tumoral es reversible.

Un aspecto importante de las experiencias con tumores genéticos, desde el punto de vista de la formación de estos tumores, es la participación del genoma en el establecimiento de la tumoración y el influjo de las fitohormonas en la inducción y crecimiento del tumor. Así, parece decisiva, en la transformación del estado de célula normal a célula tumor, una caída local de las proporciones de auxina/citoquinina.

#### **27.4. Perspectivas y aplicaciones a la biotecnología vegetal**

La producción vegetal es uno de los factores limitantes, a nivel mundial, tanto en el campo de la alimentación como de otras materias primas y de la energía. A pesar de que se han conseguido avances importantes con las técnicas de la mejora genética clásica y la adecuada aplicación de fertilizantes, plaguicidas y herbicidas, se requieren nuevas perspectivas de estudio científico para conseguir avances superiores, más rápidos, económicos y efectivos. Entre estos nuevos enfoques ocupa actualmente un lugar preeminente el estudio, para su adecuada aplicación o corrección, de los factores que pueden restar productividad a las plantas: fotorrespiración de las plantas C-3, eficiencia y adaptación fotosintética, fijación del N<sub>2</sub> atmosférico por nuevas plantas, tolerancia o resistencia a la salinidad, *stress* hídrico y bajas temperaturas, resistencia de las plantas de cosecha a los herbicidas, mejora cualitativa y cuantitativa de las proteínas de reserva, frutos, resistencia a enfermedades de las plantas, etc.

Los conocimientos actuales de la Fisiología Vegetal, en el campo de la nutrición y regulación del crecimiento de las plantas, han permitido desarrollar diferentes técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* que, sobre todo por la utilización de protoplastos y fusión celular (sección 27.1.3), han posibilitado no sólo la obtención de líneas clónicas bien reguladas, sino también especies híbridas nuevas (híbridos somáticos) que sortean las dificultades de la reproducción sexual clásica, la exploración de la variación somaclonal y la obtención de plantas libres de infecciones víricas, entre otros resultados.

Un paso más central representa el conocimiento molecular de los genes responsables de los diferentes procesos metabólicos y del control del crecimiento y desarrollo de las plantas, los mecanismos de regulación de estos genes y la posibilidad de su modificación, o *manipulación genética*, para obtener cultivos en condiciones de óptima eficacia y producción. Como ya hemos señalado (sección 27.2), la genética de los organismos eucariotas (y aún más la de las plantas respecto a los animales), por su mayor complejidad o retraso de estudio, no tiene el grado de elaboración de los conocimientos genéticos de la célula procariota. No obstante, las plantas juegan actualmente ya un papel importante en el campo de la *biotecnología* o *ingeniería genética*.

En la sección 27.3.2 hemos visto que *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, por mediación de los plásmidos Ti y Ri, son los causantes, en muchas especies de plantas dicotiledóneas, de la formación de los tumores de agalla de cuello o de raíz pilosa. Estas especies han recibido fuerte atención en la biotecnología vegetal por ser, de forma natural, sistemas de transferencia génica horizontal entre procariotas y eucariotas. Es decir, los

plásmidos Ti y Ri ofrecen nuevas perspectivas de futuro como vectores naturales de genes de interés potencial para la manipulación genética de las plantas por el hombre. En efecto, ya se han introducido transposones y otros fragmentos de DNA foráneo en la parte de DNA del plásmido Ti que se integra covalentemente en el genoma nuclear de la célula vegetal, el T-DNA. Asimismo, el conocimiento actual de los mapas genéticos de los plásmidos Ti ya permite conocer los loci donde se sitúan diferentes tipos de genes (oncogenicidad, síntesis de opinas, catabolismo de opinas, sensibilidad a la agrocina, transferencia conjugativa del plásmido Ti, catabolismo de la arginina y ornitina). Un hecho importante en estos estudios de manipulación genética es la posibilidad no sólo de insertar genes nuevos, sino también conseguir la delección o inactivación de los oncogenes (aunque manteniendo la infectividad) para obtener una planta en la que no sólo puedan expresarse las nuevas posibilidades génicas, sino que además no aparezca la transformación tumoral. El T-DNA y otros DNA foráneos parecen bastante estables en la célula transformada, incluso después de perder los genes de la oncogenicidad durante la diferenciación, tanto en la mitosis como en la meiosis.

Para que un gen pueda funcionar bien requiere no sólo la codificación de la secuencia para su proteína, sino también elementos de control para regular su expresión. Una aproximación útil ha sido insertar los genes foráneos en la secuencia de las opinas y usar así las regiones del promotor, que normalmente regulan la síntesis de las opinas, para controlar la expresión de los genes foráneos. De este modo, en experimentos con *Phaseolus vulgaris* (judía) se insertó el gen que codifica para la proteína de reserva, la faseolina, en un plásmido Ti de octopina (pTi 15955) y se usó este plásmido construido para la transformación en plantas de girasol. Las células tumor resultantes fueron capaces de transcribir RNA y traducir polipéptidos de faseolina.

Otros procedimientos alternativos conseguidos son la transformación de protoplastos vegetales con DNA de plásmidos Ti y la introducción del DNA de plásmidos Ti por medio de liposomas.

Las dificultades en el uso de un vector natural relativamente grande, como son los plásmidos Ti (unos 130 Md), ha llevado a estrategias de reducción de su tamaño, reteniendo su infectividad, pero conservando sólo un mínimo de funciones vitales (mini Ti), aunque con resultados no muy satisfactorios. Otras vías alternativas son la utilización de «vectores intermediarios», con los cuales se puede introducir una secuencia específica de DNA en un sitio predeterminado de la región T de un plásmido Ti completo.

Los cereales y otras especies de gramíneas forman el grupo de plantas más importantes desde el punto de vista económico. No obstante, ya hemos indicado que la utilización de *Agrobacteria*, como vector natural de genes para las plantas, se restringe a las dicotiledóneas y no afecta a las monocotiledóneas. Desde 1984 se han detectado productos específicos de la transformación por *A. tumefaciens* (opinas) en ciertas especies de monocotiledóneas y líneas de células transformadas estables en *Asparagus officinalis*.

Otras posibilidades, potencialmente menos versátiles por el momento, son la utilización, como vectores naturales de genes, de virus de DNA de doble cadena (virus del mosaico de la coliflor, CaMV) o los virus gemini de DNA monocatenario (así, el virus del mosaico de la judía). En estos casos se explota el DNA del virus para transportar DNA exógeno a las células vegetales huéspedes, sin que, a diferencia de los plásmidos

de los *Agrobacteria*, haya integración genómica de este DNA, que se replica así independientemente del genoma del huésped.

Los orgánulos con DNA (cloroplastos y mitocondrias), que tienen capacidad de replicar autónomamente su DNA, son vectores potenciales de DNA que requieren aún de mayor investigación. Igualmente sólo se empiezan a conocer las posibilidades de los *transposones* o «genes saltadores» en el campo de la biotecnología vegetal.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BEIDERBECK, R.: *Pflanzenamoren*, Ulmer, Stuttgart, 1977.
- BINNS, A. N.: *The Biology and Molecular Biology of Plant Cells Infected by «Agrobacterium tumefaciens»*, «Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology», vol. 1, 1984, págs. 133-160.
- BRITTEN, E. H., y DAVIDSON, R. J.: *Regulation of Gene Expression: Possible Role of Repetitive Sequences*, «*Science*», 204, 1979, págs. 1052-54.
- BRYANT, J. A. (edit.): *Molecular Aspects of Gene Expression in Plants*, Academic Press, Londres, 1976.
- CHILTON, M. D.: *Agrobacterium Ti Plasmids as a Tool for Genetic Engineering in Plants*, en: *Genetic Engineering of Osmoregulation* (Edit. D. W. Rains, R. C. Valentine y A. Hollaender), Plenum, Nueva York, 1980, págs. 23-31.
- COCKING, E. C.: *Plant Cell Protoplast-Isolation and Development*, «*Ann. Rev. Plant Physiol.*», volumen 23, 1972, págs. 29-50.
- DEL CAMPO, F. F., y DIEZ, J. L.: *Control de la expresión génica*, en: *Biología celular y molecular* (C. Vicente, Coord.), Blume, 1979, págs. 235-319.
- DIXON, R. A.: *Plant Cell Culture*, IRL Press, Oxford, 1985.
- EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V., y YAMADA, Y.: *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 1: *Techniques for Propagation and Breeding*, MacMillan Publishing, Nueva York, 1983.
- GALBRAITH, D. W., y MAUCH, T. J.: *Somatic Hybridization of Higher Plants*, «*What's New in Plant Physiology*», 11, 1980, págs. 21-24.
- GRIERSON, D., y COVEY, S.: *Plant Molecular Biology*, Blackie, Glasgow, 1984.
- HESLOP-HARRISON, J.: *Differentiation*, «*Ann. Rev. Plant Physiol.*», vol. 18, 1967, páginas 325-348.
- HOWELL, S. H.: *Plant Molecular Vehicles: Potential Vectors for Introducing Foreign DNA into Plants*, «*Ann. Rev. Plant Physiol.*», vol. 33, 609-650, 1982.
- LIPPINCOTT, J. A., y LIPPINCOTT, B. B.: *The Genus Agrobacterium and Plant Tumorigenesis*, «*Ann. Rev. Microbiol.*», vol. 29, 1975, págs. 377-405.
- LIPPINCOTT, J. A., y LIPPINCOTT, B. B.: *Morphogenic Determinants as Exemplified by the Crown-gall Disease*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 4, Ed. R. Heitefuss y P. H. Williams, Springer-Verlag, 1976, págs. 356-388.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A., y MCKEE, R. A.: *Principles of Plant Biotechnology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1985.
- MARTIN, CL.: *Cultivo de plantas en probeta*, «*Mundo Científico*», núm. 44, 1985, págs. 161-169.

- NAGATA, T.: *Fusion of Somatic Cells*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vol. 17. *Cellular Interactions* (Edit. H. F. Linskens y J. Heslop-Harrison), Springer-Verlag, Berlín, 1984, págs. 491-507.
- NESTER, E. W.; GORDON, M. P.; AMASINO, R. M., y YANOFSKY, M. F.: *Crown Gall: A Molecular and Physiological Analysis*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 35, 1984, págs. 387-413.
- RAGHAVAN, V.: *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*, Academic Press, Nueva York, 1976.
- RIVES, M.: *La mejora de las plantas*. «Mundo Científico», núm. 38, 1984, págs. 760-773.
- SCANDALIOS, J. G.: *Molecular Genetics of Plants*, en: «Advances in Genetics», vol. 22, Academic Press, Londres, 1984.
- SHELL, J.: *The Ti-Plasmids of Agrobacterium Tumefaciens*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vol. 14B: *Nucleic Acids and Proteins in Plants II* (Edit. B. Parthier y D. Boulter), Springer-Verlag, Berlín, 1982, págs. 455-474.
- SMITH, H., y GRIERSON, D.: *The Molecular Biology of Plant Development*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982.
- SPIKER, S.: *Plant Chromatin Structure*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 235-253.
- STANGE, L.: *Plant cell differentiation*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 16, 1965, págs. 119-140.
- WALBOT, V., y CULLIS, C. A.: *Rapid Genomic Change in Higher Plants*. «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 367-396.
- WAREING, P. F., y PHILLIPS, I. D. J.: *Growth and Differentiation in Plants*, Pergamon Press, Oxford, 1981.

## MORFOGÉNESIS

El término morfogénesis, en sentido literal, se refiere al origen de la forma de los seres vivos; el término forma, debe entenderse no sólo como la morfología externa de una planta, sino como su organización completa, que comprende distintos niveles perfectamente distinguibles unos de otros (nivel celular, nivel de tejidos, nivel de órganos, etc.). Sin embargo, el estudio de la morfogénesis, no sólo implica los cambios observables en la forma y en la estructura, sino también los procesos que controlan el desarrollo de los órganos y tejidos. Por todo ello podemos definir la morfogénesis, como el conjunto de los fenómenos relativos a la diferenciación y desarrollo de los tejidos y órganos vegetales. En el momento presente los conocimientos que poseemos sobre las bases moleculares de la morfogénesis son muy fragmentarios y sabemos muy poco sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos que regulan, por ejemplo, la iniciación y desarrollo de las hojas o la diferenciación vascular. En este capítulo vamos a estudiar en primer lugar los aspectos histológicos y morfológicos de la formación de los órganos vegetales, y en segundo lugar estudiaremos lo que hoy se conoce sobre la posible regulación hormonal de estos procesos.

### 28.1. Polaridad

Un hecho que resulta evidente es el de que todas las especies vegetales muestran una forma característica. Dentro de las distintas formas, todas constan de un eje longitudinal que sirve de soporte a órganos laterales tales como hojas o flores. A lo largo de este eje pueden apreciarse notables diferencias, siendo los dos extremos completamente diferentes. En otras palabras, el eje está diferenciado en tallo y raíz. A este respecto se puede decir que el eje longitudinal muestra polaridad. Se podría definir la polaridad como cualquier situación en la que los dos extremos o superficies de un sistema viviente son diferentes. La polaridad del eje longitudinal de los vegetales se observa fundamentalmente como diferencias morfológicas, pero no hay que desconocer que también existen diferencias fisiológicas entre los extremos de un órgano. Aunque la polaridad axial es uno de los hechos más sobresalientes en un vegetal, no hay que olvidar que existen otras formas de polaridad, como la dorsiventralidad de las hojas o la polaridad radial de cuerpos esféricos, como el alga *Chorella* o una manzana.

### 28.1.1. Determinación de la polaridad

La polaridad del eje longitudinal de las plantas superiores está ya determinada desde la primera división desigual que sufre el cigoto. Como ya sabemos, el extremo radicular de un embrión se dirige siempre hacia el micropilo del óvulo, mientras que el futuro tallo se aleja de él. De esta forma la orientación del eje de polaridad en los embriones parece determinado por las condiciones prevaletentes en el saco embrionario, es decir, la polaridad de la futura planta está predeterminada por la polaridad de los tejidos de la planta materna.

Sin embargo, la polaridad del cigoto no está predeterminada en plantas inferiores tales como el género de alga parda *Fucus*, cuyos huevos no están inicialmente polarizados. El huevo esférico fertilizado muestra pronto polaridad, ya que en uno de los lados comienza a crecer el futuro extremo rizoidal, antes incluso de que tenga lugar la primera división. Puede demostrarse que la polaridad del huevo fecundado de *Fucus* puede ser inducida por la luz; así, si el huevo se expone a iluminación desigual en los lados opuestos, el menos iluminado se transforma en el futuro extremo rizoidal. La luz tiene un efecto similar en la determinación de la polaridad de las esporas de *Equisetum*, donde la orientación de la primera pared celular forma ángulo recto con la dirección de la luz incidente. Otros factores que pueden influir en la inducción de la polaridad en huevos y esporas incluyen gradientes de pH, CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.

### 28.1.2. Persistencia de la polaridad

Una vez que la polaridad ha sido inducida en un organismo, bien sea un embrión, planta con flores, huevo fertilizado de *Fucus* o una spora de *Equisetum*, es muy difícil o casi imposible revertirla. Este hecho queda muy bien ilustrado en los experimentos de regeneración en plantas con flores. Si tomamos trozos de tallo de sauce (Fig. 28.1) y lo suspendemos en una atmósfera húmeda, desarrollarán raíces adventicias en el extremo inferior y yemas en el superior. Similarmente, si tomamos segmentos de raíces de achicoria o diente de león y las plantamos en suelo húmedo o arena, las raíces se desarrollarán fundamentalmente en el extremo inferior y las yemas en el superior. Así, aunque el trozo de tallo de sauce y aún menos los trozos de raíz, no muestran ninguna diferenciación morfológica entre los extremos superior e inferior, es evidente que estos órganos poseen una marcada polaridad fisiológica que afecta el modelo de regeneración de yemas y raíces. Esta polaridad es inherente a los tejidos mismos y no depende de la gravedad, iluminación u otras condiciones externas, como se demuestra invirtiendo la colocación de los segmentos de tallo de sauce, que seguirán formando raíces en el extremo originalmente inferior, aunque ahora se encuentre en la posición superior, y yemas en el extremo originalmente superior. Lo mismo ocurre con los segmentos de raíces de achicoria. La polaridad fisiológica parece estar construida en los mismos tejidos. Se podría pensar que se debe a gradientes de metabolitos u otras sustancias a lo largo del tallo o raíz, pero no debe ser así, ya que la polaridad persiste desde una estación a la siguiente, a través incluso de un período de dormición en el que la actividad metabólica es muy escasa, de tal forma, que es poco probable que persistan los gradientes de metabolitos. Es posible que el enraizamiento de los segmentos implique un gradiente de hormona de crecimiento dentro del tallo,

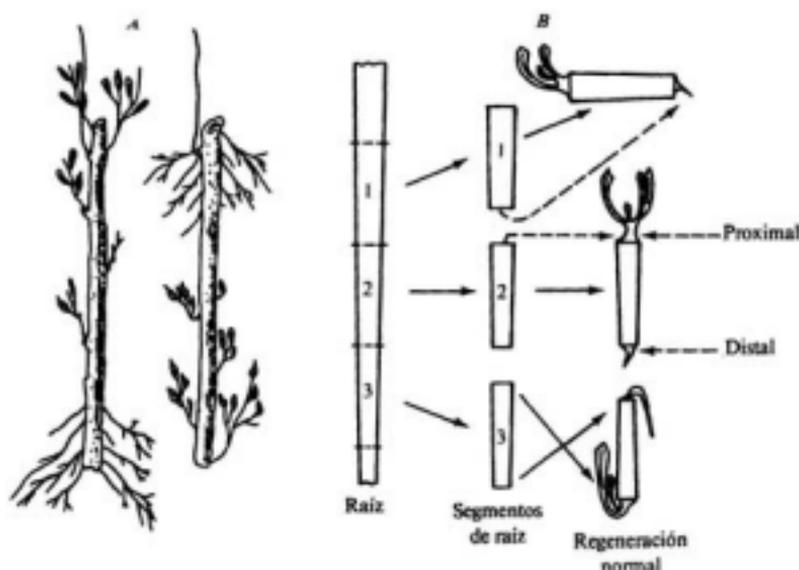


Figura 28.1.—(A) Polaridad de regeneración en tallo de sauce. Izquierda: estacilla suspendida en atmósfera húmeda en su orientación normal. Derecha: estacilla tratada de forma similar, pero en posición invertida. Las raíces crecen en el extremo morfológicamente inferior y los brotes en el extremo morfológicamente superior, independientemente de la orientación. (B) Polaridad de regeneración en segmentos de raíz de *Taraxacum* y *Cichorium*. Los brotes se desarrollan en el extremo proximal y las raíces en el distal independientemente de la orientación (tomado de Wareing y Phillips, *Growth and Differentiation in Plants*, 3.ª ed.).

pero este gradiente sería uno de los resultados de la polaridad de los tejidos y no su causa.

### 28.1.3. Polaridad celular

Hemos visto cómo un trozo de tallo muestra polaridad de regeneración con una tendencia a formar yemas en el extremo superior y raíces en el extremo inferior. Si tal tallo se divide en dos, cada mitad se comporta de forma similar y el proceso puede incluso repetirse con piezas muy pequeñas de tallo. Si fuera posible llevar este proceso al límite, deberíamos concluir que cada célula individual exhibe polaridad y de hecho hay evidencia de que éste es el caso. El alga verde filamentosa *Cladophora* muestra la misma polaridad que el cuerpo vegetal, es decir, en el extremo basal forma un rizoides. Si las células de un filamento de *Cladophora* se plasmolizan de tal forma que los protoplastos se separan de las paredes celulares (esto rompe las conexiones protoplasmáticas entre las células) y son entonces deplasmolizadas, cada célula subsecuentemente regenera un nuevo filamento desarrollando un rizoides en el extremo basal de la célula. Este experimento suministra clara evidencia de la polaridad de células individuales de *Cladophora*. Evidencia comparable con células de plantas superiores es más di-

fácil de obtener, aunque hay evidencia indirecta que apoya esta hipótesis, tal como la aparición de divisiones celulares desiguales que veremos más adelante.

#### 28.1.4. Bases estructurales y moleculares de la polaridad

En los apartados anteriores se ha presentado una serie de datos que parecen sugerir lo siguiente:

1. La polaridad de los tejidos de tallo y raíz es muy estable y no es fácilmente reversible.
2. La polaridad persiste incluso después de periodos de dormición, cuando la actividad metabólica es muy baja.
3. La polaridad de un tejido refleja aparentemente la polaridad de células individuales.

Con esta base, se ha sugerido que deben existir algunas bases estructurales permanentes para la polaridad celular. La observación de que una pieza de tallo puede dividirse en otras más pequeñas y cada una muestra la misma polaridad de regeneración, recuerda a un imán que puede ser similarmente dividido y cada pieza se transforma en un pequeño imán. En un imán cada átomo de hierro posee polaridad magnética y los átomos quedan alineados durante el proceso de magnetización de tal forma que los polos norte y sur de cada átomo quedan orientados a lo largo de la barra de imán. Por analogía, podemos postular que cada célula de órganos polarizados, tales como tallos, contiene moléculas polarizadas (posiblemente moléculas alargadas con grupos químicamente diferentes en ambos extremos) que están orientadas a lo largo del eje de cada célula formando un citoesqueleto. Como la orientación de estas moléculas no es destruida por la ciclosis parece que este citoesqueleto se encuentra localizado en las capas extremas del citoplasma, donde la ciclosis, probablemente, no tiene lugar. Ha sido sugerido que este citoesqueleto podría consistir en moléculas fibrosas de proteína orientadas longitudinalmente, aunque por ahora los intentos realizados para demostrarlo no han tenido éxito. Es interesante el que las únicas estructuras linealmente orientadas que se conocen en las capas más externas del citoplasma, los microtúbulos, están formando ángulos rectos con los ejes de polarización en tallos y raíces.

Los estudios con cigotos de *Ficus* mencionados anteriormente, han abierto una vía para comprender las bases moleculares de la polaridad. Este huevo, inicialmente apolar, comienza un crecimiento polarizado 24 h después de la fertilización. La fase inicial de la polaridad parece ser debida a una distribución desigual del calcio citoplasmático entre los dos polos del cigoto. Debido a que el calcio es un ión relativamente inmóvil en el citoplasma, se crea una diferencia eléctrica entre los dos polos, lo que conduce a una distribución asimétrica de componentes citoplasmáticos que, sin duda, tendrá efectos en la activación o concentración de enzimas u hormonas, así como en el desarrollo y función de estructuras celulares. En condiciones normales esta distribución asimétrica de calcio puede ser inducida por gradientes luminosos, tal como se indicó en el apartado 28.1.1.

### 28.1.5. División celular polarizada

Los planos de la división celular durante el desarrollo de un órgano desempeñan un papel muy importante en la determinación de su forma y tamaño final. Puede comprobarse que sin divisiones celulares orientadas no existe forma organizada en ningún vegetal, caso que ocurre en los cultivos de callo de tejido en los que el plano de división celular es al azar, siendo los tejidos resultantes masas estructuralmente desorganizadas y sin ninguna forma característica. Así, las divisiones celulares polarizadas dan al vegetal su forma tridimensional. En el desarrollo de entrenudos, la mayoría de las divisiones celulares están orientadas de tal forma que los husos acromáticos mitóticos están en paralelo con el eje del entrenudo; consecuentemente, el entrenudo crece principalmente en longitud y mucho menos en diámetro. En frutos de calabaza de diferente forma, se ha demostrado que en los alargados las divisiones en las que el huso acromático está orientado en paralelo al eje longitudinal son mucho más frecuentes que las divisiones en las que el huso está en otros planos, mientras que en frutos redondeados, las divisiones en un plano particular no predominan.

Parece que el eje de polaridad del órgano entero tiene una fuerte influencia en el plano de división celular, afectando la orientación del huso acromático. La regulación de este fenómeno es aún desconocida, pero se ha visto que parece estar determinado por la banda de microtúbulos que aparece en el citoplasma antes de la profase, en el plano de la futura placa ecuatorial. La polaridad no sólo es importante en la determinación de la forma de los vegetales, sino que también es importante para otros aspectos de la diferenciación y morfogénesis.

### 28.1.6. División celular asimétrica

Otro aspecto de la importancia de la polaridad en la diferenciación y morfogénesis puede verse en el caso de las divisiones celulares desiguales o asimétricas. Ya sabemos que la primera división del óvulo fertilizado en las angiospermas es frecuentemente desigual, como resultado de la polarización del citoplasma celular. En este caso la división desigual es el primer acontecimiento en la historia de la nueva planta, pero las divisiones asimétricas son también frecuentes en estados posteriores de la diferenciación.

En la epidermis radicular de algunas plantas como *Phleum pratense*, los pelos radicales proceden de células formadas como resultado de una división desigual de ciertas células epidérmicas. Estas células tienen sus ejes principales paralelos al eje de la raíz y su citoplasma es más denso en el extremo apical. La mitosis aparece y se forma la pared celular transversal en una posición que da lugar a una célula hija más pequeña con citoplasma denso y a otra célula mayor con citoplasma menos denso. Los pelos radicales se forman sólo a partir de las células más pequeñas. Una situación similar se da en la formación y desarrollo de las células estomáticas (Fig. 28.2). Aquí también, ciertas células epidérmicas de la hoja en desarrollo muestran divisiones asimétricas, dando una célula pequeña con citoplasma denso en un extremo y otra célula mayor en el otro. La célula más pequeña se transforma en la célula madre estomá-

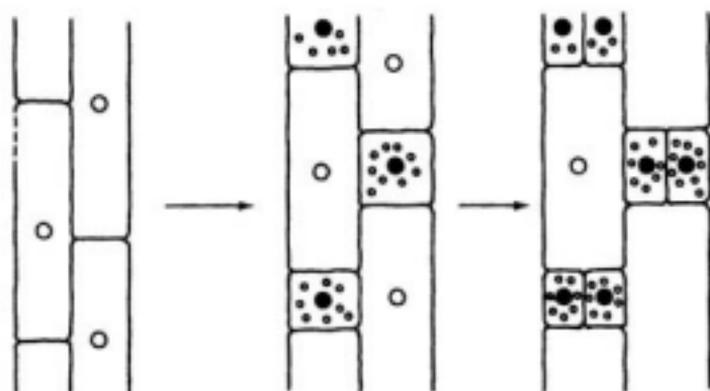


Figura 28.2.— División asimétrica en la formación de las células estomáticas en una hoja de monocotiledónea. Las células epidérmicas experimentan una división desigual resultando una célula más pequeña, la célula madre estomática en la que se desarrollarán cloroplastos y otra célula de mayor tamaño. La célula madre sufre otra división en ángulo recto con el plano de la primera división resultando dos células hijas idénticas que se transformarán en las células estomáticas (tomado de Wareing y Phillips, *Growth and Differentiation in Plants*, 3.ª ed.).

tica que sufre otra división formando ángulo recto con la primera y las dos células hijas que se forman, idénticas, darán lugar a las células estomáticas.

El hecho de que la división asimétrica esté precedida por diferencias polarizadas en el citoplasma queda bien ilustrado en el desarrollo de los granos de polen, en los que el huso está orientado de tal forma que un núcleo hijo pasa al extremo de la célula en el que el citoplasma es más denso y se transforma en el núcleo generativo, mientras que el otro núcleo hijo se traslada a la región de la célula con citoplasma menos denso y se transforma en el núcleo vegetativo.

En los casos citados de división asimétrica, la diferenciación citoplasmática, en más y menos densa, es anterior al ciclo mitótico. En otros casos, sin embargo, esta diferenciación citoplasmática es posterior a la mitosis, obteniéndose entonces después de la división celular dos células cuantitativamente idénticas. En las etapas posteriores, una de ellas perderá la mayor parte de los orgánulos citoplasmáticos, incluso el núcleo, mientras que la otra procederá como una célula normal, manteniendo todos sus orgánulos y procediendo a una diferenciación estrictamente metabólica sin alterar la estructura celular. Un ejemplo muy claro es el representado por la evolución conjunta de los elementos floemáticos y las células acompañantes. Ambas células derivan de una primera división de una célula madre de naturaleza cambial, por mitosis, que proporciona dos células idénticamente dotadas. Siguiendo un proceso de elongación celular idéntico para ambas células, el elemento que va a diferenciar un elemento floemático muestra una pérdida progresiva de orgánulos celulares, mientras que la célula acompañante se transforma en una célula normal (ver Cap. 7).

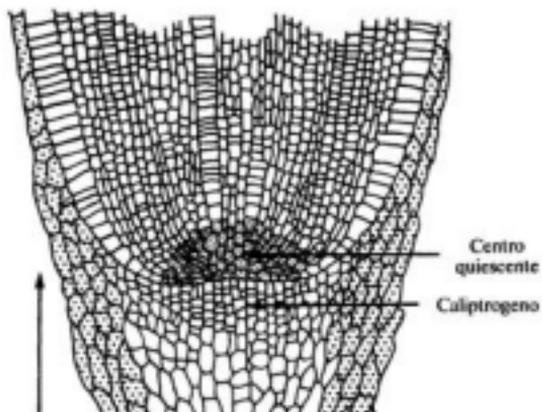


Figura 28.3.—Arriba: Sección longitudinal de la raíz de maíz mostrando la posición del centro quiescente. Abajo: Autorradiografía en una raíz de *Sinapis* en la que se observa también la localización del centro quiescente por la falta de incorporación de timidina marcada en los núcleos de sus células (tomado de P. F. Wareing e I. D. J. Phillips, *The Control of Growth and Differentiation in Plants*, 2.ª ed., Pergamon Press, Oxford, 1978).

## 28.2. Formación de la raíz

Todas las células de las raíces se desarrollan a partir de un meristemo, que desde el punto de vista funcional puede ser considerado como formado por dos meristemas opuestos que rodean a una zona con una actividad meristemática casi nula, el llamado centro quiescente. Las células de estos dos meristemas opuestos muestran un crecimiento fuertemente polarizado. Las células del meristemo que se encuentran por debajo del centro quiescente y que darán lugar a la caliptra, crecen en sentido acropétalo. La división celular cesa tan pronto como éstas alcanzan cierta distancia del centro quiescente, continuando después el crecimiento exclusivamente por elongación celular. Las células del meristemo que se encuentran por encima del centro quiescente y que darán lugar a la epidermis radicular, corteza y estela, tienden a crecer en filas radiales. La zona de división celular puede extenderse más de un milímetro desde la punta de la raíz: por encima de esta zona, el crecimiento tiene lugar por elongación celular. Clowes y Juniper en 1968 muestran en un elegante experimento cómo los núcleos de las células que muestran síntesis de DNA incorporan en esta molécula el precursor de su síntesis  $^3\text{H}$ -timidina; de esta forma se demuestra también la existencia del centro quiescente (Fig. 28.3). El centro quiescente es un depósito de células relativamente resistentes a la destrucción debido a su inactividad, en él pueden ocurrir divisiones ocasionales y puede convertirse en un centro activo cuando son dañadas las células iniciales. La función del centro quiescente es por ahora desconocida, aunque se ha sugerido por algunos autores que puede ser el lugar de la síntesis de auxinas.

Las células iniciales y la primera generación de células hijas, son células no vacuolizadas y con unos procesos muy activos de división celular; según nos alejamos de las células iniciales la vacuolización aumenta, las divisiones celulares son menos frecuentes y comienza la elongación celular. En las raíces de muchas especies, como por ejemplo el trigo, el crecimiento está perfectamente separado en regiones de división celular y de elongación celular; en otras, como, por ejemplo, en *Fagus sylvatica* existe aún división celular en células que están comenzando el proceso de vacuolización.

Los límites del cilindro vascular, córtex y epidermis, comienzan a ser reconocibles a una cierta distancia de las células iniciales apicales. Las distintas zonas pueden distinguirse por el tamaño de las células y por los planos de división; las células de las capas más internas del córtex tienden a desarrollarse mediante divisiones periclinales (eje del huso mitótico perpendicular a la superficie y la nueva pared celular paralela a la superficie) mientras que los planos de división del futuro tejido vascular son menos regulares. El procámbium del floema es reconocible en un estado temprano del desarrollo debido a sus células pequeñas en sección transversal. Este procámbium se desarrolla en sentido acropétalo y la diferenciación del xilema y el floema sigue la misma dirección (Fig. 28.4). Los primeros elementos del floema maduran típicamente más cerca del ápice que los primeros elementos del xilema.

Por lo que respecta a las raíces laterales, éstas se originan a alguna distancia del meristemo apical de la raíz principal y a partir de un tejido situado a cierta profundidad. Tanto en las Gimnospermas como en las Angiospermas, las raíces laterales se originan en el periciclo de la raíz principal y crecen a través del córtex. Durante la iniciación de una raíz lateral en una angiosperma, un grupo de células del periciclo experimentan

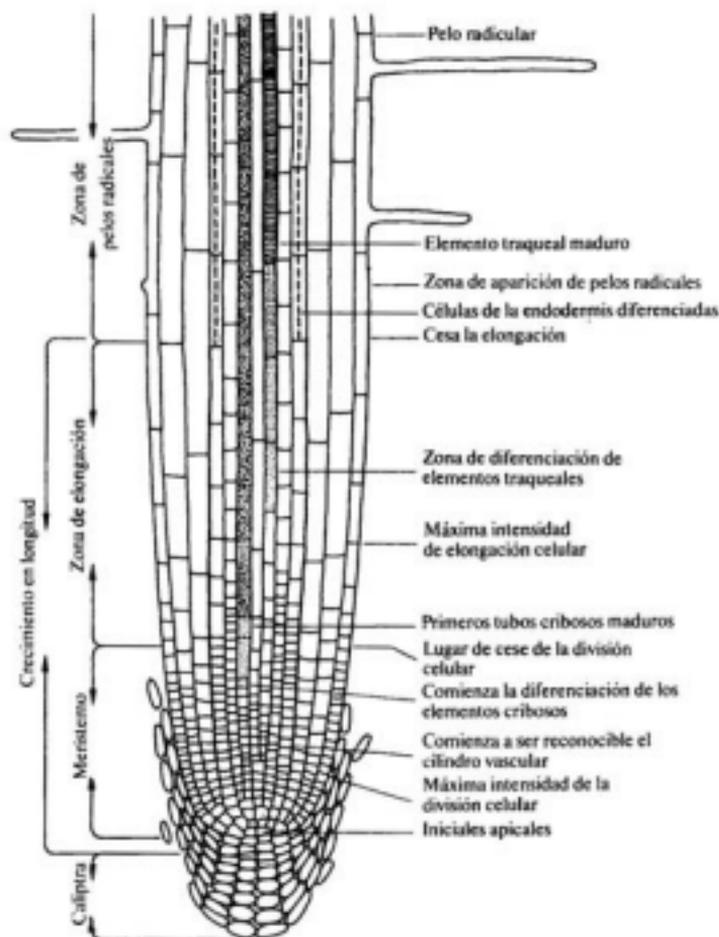


Figura 28.4.—Diagrama de la zona de crecimiento de una raíz en sección longitudinal (tomado de P. F. Wareing e I. D. J. Phillips, *The Control of Growth and Differentiation in Plants*, 2.ª ed., Pergamon Press, Oxford, 1978).

divisiones periclinales y anticlinales (eje del huso mitótico paralelo a la superficie y la nueva pared celular perpendicular a la superficie) dando lugar al primordio de la raíz lateral (Fig. 28.5). Este primordio penetra gradualmente en el córtex y antes de que emerja a la superficie de la raíz principal, la caliptra, meristemo apical y regiones de tejido primario han quedado delimitadas mediante divisiones celulares adecuadas. En cuanto al mecanismo de crecimiento de la raíz lateral a través del córtex de la raíz principal, algunos investigadores admiten que mientras la raíz lateral avanza, digiere parcial-

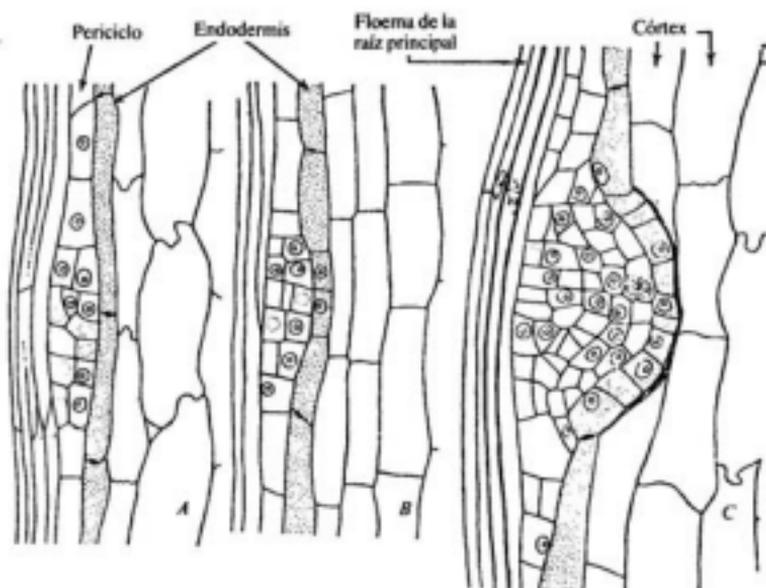


Figura 28.5.—Desarrollo de una raíz lateral. Secciones longitudinales realizadas en raíces primarias jóvenes de zanahoria. Las divisiones en el periciclo inician el primordio de la raíz (A). La endodermis se divide anticlinalmente y se acomoda al crecimiento del primordio (B y C) (tomado de Esau, K.: *Plant Anatomy*, Trans-Editions, Inc., Nueva York).

mente el tejido cortical mediante la secreción de enzimas líticos; otros investigadores consideran que la penetración es completamente mecánica. Después de la emergencia, la raíz cambia generalmente su dirección de crecimiento, observándose una respuesta geotrópica más o menos positiva. Los sistemas vasculares de las raíces principal y laterales son independientes pero se hallan en relación mediante células intermedias, ya que, como hemos visto, las raíces laterales se originan en el periciclo y, por tanto, la distancia entre su región vascular y la de la raíz principal es pequeña. Estas células intermedias derivan del periciclo.

Las raíces adventicias pueden presentarse en el hipocótilo de una plántula, en los nudos o entrenudos de los tallos y en las raíces, así como formarse en conexión con las yemas o independientemente. Se suelen iniciar estas raíces en la vecindad de los tejidos vasculares en diferenciación del órgano que las produce. Si el órgano es joven, el primordio adventicio se inicia en un grupo de células situadas cerca de la periferia del sistema vascular; si es más viejo, el origen es más profundo y se localiza cerca del cámbium vascular. En los tallos jóvenes, las células del primordio radicular derivan comúnmente del parénquima interfascicular, mientras que en los tallos más viejos lo hacen a partir de los radios vasculares. Al igual que en las raíces laterales, antes de que emerja la raíz adventicia se diferencia una caliptra y los sistemas normales de tejidos del cuerpo de la raíz.

### 28.3. Estructura del ápice vegetativo del brote

Los ápices vegetativos del brote varían en tamaño, forma, estructura citohistológica y actividad meristemática. Los ápices del brote de las coníferas son reducidos y de forma cónica. En algunas monocotiledóneas, como las gramíneas y *Elodea* y dicotiledóneas como *Hippuris*, es estrecho y alargado, con la zona distal muy elevada, libre de primordios foliares. Por otra parte, en muchas dicotiledóneas la zona distal apenas se eleva por encima de los primordios foliares o incluso se presenta por debajo de ellos.

En el ápice vegetativo de las angiospermas pueden distinguirse dos partes: una de ellas formada por varias capas de células, denominada *túnica*, que rodea y envuelve al *cuerpo* (Fig. 28.6). Estas zonas pueden distinguirse por los planos de división celular. En la *túnica*, las divisiones son predominantemente anticlinales, mientras que en el *cuerpo* son tanto anticlinales como periclinales. El grosor de la *túnica* es variable y puede estar constituida por una o más capas de células, incluso dentro de una misma especie puede variar con la edad o estado nutricional. La distinción entre *túnica* y *cuerpo* en gimnospermas está aun peor definida y aunque las divisiones en las capas de células externas en *Pinus* son predominantemente anticlinales, se suele dar con frecuencia una mezcla de divisiones anticlinales y periclinales.



Figura 28.6.—Sección longitudinal de un meristemo apical. Puede observarse la túnica formada por dos capas, cubriendo la parte central del cuerpo (tomado de P. F. Wareing e I. D. J. Phillips, *The Control of Growth and Differentiation in Plants*, 2.ª ed., Pergamon Press, Oxford, 1978).

## 28.4. Desarrollo del tallo

El cuerpo primario del tallo de la mayoría de las plantas superiores deriva solo indirectamente del meristemo apical. La mayoría de las células de los entrenudos se generan por meristemas situados por debajo de los primeros primordios foliares, que forman lo que se conoce como meristemo subapical. La longitud del tallo está determinada fundamentalmente por la actividad de dicho meristemo subapical.

Cuando este meristemo, por cualquier causa, se encuentra inactivo, se producen plantas enanas. Las células producidas por este meristemo sufren un proceso de elongación y finalmente de diferenciación. A medida que el procámbium se diferencia entre las células derivadas del meristemo apical, adquiere el perfil del futuro sistema vascular que se desarrollará a partir de él. La maduración de los elementos vasculares primarios puede tener lugar mientras el procámbium se halla todavía en división activa, o bien sucede después de que la mayoría de las divisiones se han completado. El primer caso se da con frecuencia en las plantas con semillas, donde la separación entre los tejidos vascular y fundamental no es precisa. En cambio, la delimitación temprana del sistema procambial es típica de muchas plantas vasculares inferiores. El comienzo de la delimi-

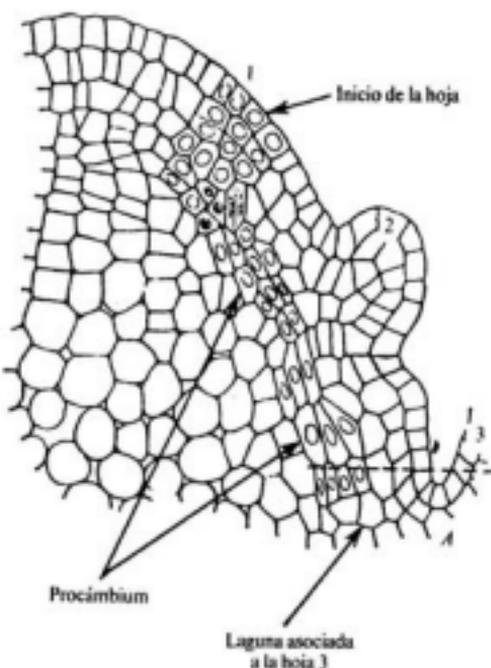


Figura 28.7.—Sección longitudinal de extremo del brote de *Linum perenne* mostrando una etapa temprana de la diferenciación del procámbium de la traza foliar correspondiente al primordio foliar 1, recién iniciado mediante divisiones periclinales en la segunda capa de la tónica. Las células con núcleo son las correspondientes al primordio foliar y al procámbium (tomado de Esau, K.: *Plant Anatomy*, Trans-Editions, Inc., Nueva York).

tación del procámbium por debajo del ápice del brote, puede reconocerse en las plantas con semillas mediante tinción diferencial entre las células derivadas del meristemo apical. Las células del meristemo fundamental, pronto muestran vacuolización creciente, mientras que las células procambiales permanecen durante más tiempo con el citoplasma denso. Las células procambiales experimentan repetidas divisiones longitudinales, pero se extienden solo muy limitadamente en sentido transversal. Así, por fin, el procámbium llega a distinguirse del resto por sus células densas y estrechas, alargadas paralelamente respecto al eje longitudinal del órgano (Fig. 28.7).

El curso de la iniciación procambial en el ápice del brote, tiene mucho que ver con las causas determinantes del establecimiento de los modelos filotáticos de una planta. Se han formulado bastantes hipótesis para explicar la existencia de filotaxis y los mecanismos de formación de las hojas en el ápice del tallo. Algunos de ellos buscan en el mismo ápice las causas de la ordenación de las hojas, mientras que otros indican que el desarrollo acropétalo del procámbium desempeña un papel importante en la ordenación de las hojas en el ápice. Mediante tratamientos quirúrgicos de ápices de brotes que dieron como resultado el desarrollo de nuevos ápices con procámbium inicialmente discontinuo con el de las partes más viejas del brote, se demostró la capacidad de los brotes para organizar su sistema vascular. Por otro lado, estudios sobre cultivos de tejidos, revelan que un tejido parenquimático en crecimiento es capaz de iniciar la diferenciación de tejido vascular sin un meristemo apical, pero que tal tejido queda organizado en un sistema característico de brotes y raíces sólo después de que el meristemo apical correspondiente se ha desarrollado.

Como norma general, el establecimiento del procámbium es seguido por la diferenciación de algunas de sus células en elementos floemáticos y xilemáticos. Los primeros elementos floemáticos se diferencian normalmente en sentido acropétalo a lo largo de la periferia externa del procámbium. La diferenciación xilemática se inicia en la parte interior del procámbium, generalmente cerca de la base de las hojas o en su nudo, y desde allí progresa acropétalmente hacia dentro de la hoja y basipétalmente hacia el interior del tallo.

El crecimiento del tallo producido por la actividad del meristemo apical, en conexión con el inicio de los primordios foliares, queda articulado en nudos y entrenudos, sobre todo por el crecimiento de estos últimos. El crecimiento de un entrenudo puede tener lugar acropétalmente tal como ocurre en *Helianthus* o *Syringa* o basipétalmente, tal como ocurre en las gramíneas y liliáceas. El alargamiento de los sucesivos entrenudos puede ocurrir paso a paso como en *Helianthus*, o puede coincidir como ocurre en las gramíneas. En algunos entrenudos, la causa principal de alargamiento es la elongación celular, mientras que en otros es la división celular. El crecimiento del tallo en diámetro también ocurre por la división y elongación celular.

Si todas las células procambiales se diferencian en tejido vascular primario, no se forma cámbium; por el contrario, si parte del procámbium permanece en estado meristemático después de terminar el crecimiento primario, se convierte en el cámbium del cuerpo secundario. En los tallos de gimnospermas y angiospermas más comúnmente estudiados, el cámbium se origina en forma de cilindro situado entre el floema y el xilema y permanece indefinidamente en la misma posición relativa, produciendo xilema secundario hacia el interior del tallo y floema secundario hacia el exterior (Fig. 28.8).

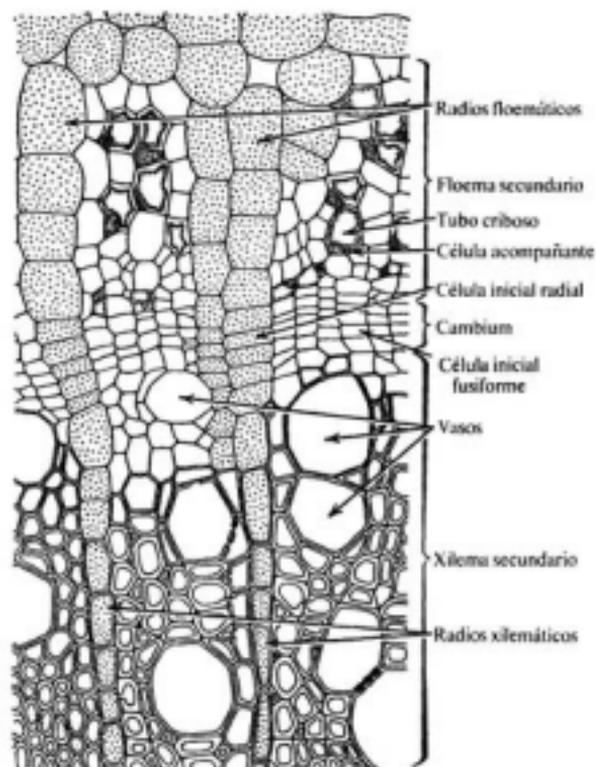


Figura 28.8.—Detalles de la estructura del tallo de *Prunus*. Los vasos están en diferentes etapas de diferenciación (tomado de Esau, K.: *Plant Anatomy*, Trans-Editions, Inc., Nueva York).

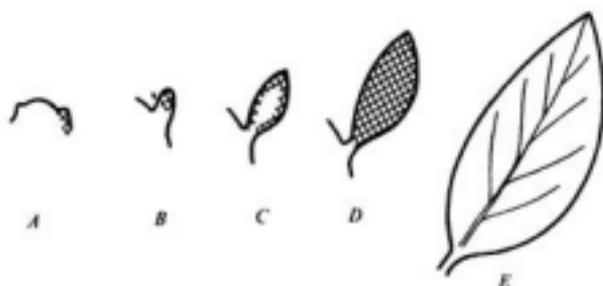


Figura 28.9.—Esquema mostrando la secuencia de crecimiento en una hoja dicotiledónea (tomado de M. B. Wilkins, *Physiology of Plant Growth and Development*, McGraw-Hill, Londres, 1969).

### 28.5. Desarrollo de la hoja

Las hojas se originan como resultado de una serie de divisiones celulares periclinales en los flancos del meristemo apical. Como resultado de esta serie de divisiones en un área muy localizada, se forma una pequeña protuberancia que dará lugar al futuro primordio foliar (Fig. 28.9). El número de capas celulares que intervienen en estas divisiones iniciales varía considerablemente en las diferentes especies. En algunas plantas herbáceas, las divisiones periclinales comienzan en la capa más externa de la túnica y en la capa inmediatamente inferior. En otras plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, las divisiones periclinales no suceden en las capas más externas, sino en las capas celulares situadas por debajo. Las dos zonas de crecimiento en los ápices de las gimnospermas, la túnica y el cuerpo, participan de forma variada en la formación del primordio foliar. Su grado de participación viene determinado por la relación cuantitativa entre túnica y cuerpo y por la profundidad de las divisiones periclinales iniciales. En *Scrophularia nodosa* las primeras divisiones para formar la hoja tienen lugar en el cuerpo. En *Acacia* se inician en la túnica y el cuerpo. Las gimnospermas con una zonación apical menos precisa que la del complejo túnica-cuerpo presentan variaciones similares a las de las angiospermas.

El desarrollo de las hojas, al menos en las dicotiledóneas, puede dividirse en tres etapas:

1. Formación de las bases foliares.
2. Formación del eje foliar.
3. Formación de la lámina foliar o limbo.

Como ya hemos visto, la base foliar se forma por la actividad meristemática debajo de la región apical distal. Algunas células localizadas en el centro de la base foliar comienzan a dividirse dando lugar a una protuberancia de forma alargada a veces algo aplanada por el lado adaxial. Esta protuberancia es el eje de la nueva hoja y está compuesta por el peciolo y la costilla media de la hoja. Poco tiempo después, algunas células de los flancos comienzan a crecer de tal forma, que el eje adquiere una apariencia más aplanada en sección transversal. Estas células de los flancos constituyen los meristemos marginales que darán lugar al limbo de la hoja. Todo lo dicho puede verse esquematizado en la figura 28.10 que representa el desarrollo de la hoja de *Nicotiana tabacum*. Como resultado de la actividad de los meristemos marginales, se forman varias capas de células en las cuales la división celular cesa en diferentes estados. Las células de la epidermis son las que cesan la división celular en primer lugar, generalmente cuando la hoja ha alcanzado la quinta o sexta parte de su tamaño definitivo. Estas células epidérmicas, sin embargo, continúan aumentando de tamaño hasta que la hoja alcanza su tamaño definitivo. Las células del mesófilo en empalizada continúan dividiéndose, dando lugar a una capa de células fuertemente empaquetadas; dejan de dividirse y alargarse poco tiempo después que las células epidérmicas. Las células del futuro mesófilo lagunar cesan de dividirse poco antes que las del mesófilo en empalizada, dejando entre ellas gran cantidad de espacios intercelulares. El primer procámbium se forma en la base del primordio foliar en un estado muy primitivo de desarrollo. Este primer procámbium dará origen a la futura vena central y se desarrolla en

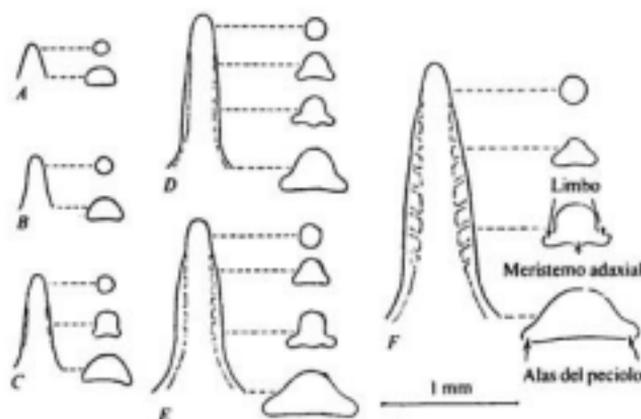


Figura 28.10.—Crecimiento de la hoja de *Nicotiana tabacum*. Secciones longitudinales y transversales. En las secciones transversales, los lados axiales de los primordios están vueltos hacia abajo. Explicación en el texto (tomado de Esau, K.: *Plant Anatomy*, Trans-Editions, Inc., Nueva York).

sentido acropétalo hacia la punta, y basipétalo hacia abajo, para unirse con el procámbium del tallo. Los primeros elementos vasculares que aparecen son los del protofloema, seguidos por los del protoxilema. Poco tiempo después, comienza la actividad de los meristemos marginales, y los primeros indicios de venas laterales aparecen cuando los primordios foliares tienen una longitud de unos 2 mm. El desarrollo completo de la hoja depende de su exposición a la luz, siendo éste uno de los aspectos más importantes de la fotomorfogénesis.

La forma final de la hoja depende de tres factores:

- La forma del primordio foliar.
- Número, distribución y orientación de las divisiones celulares.
- Magnitud y distribución del alargamiento celular.

La forma del primordio foliar varía considerablemente de una especie a otra. Como hemos visto, en el tabaco el primordio foliar tiene una estructura alargada simple, similar a un dedo, mientras que en *Acer* a la aparición del primordio foliar sigue la aparición de dos ramificaciones laterales en su base dando lugar a las venas principales de la hoja. En una hoja compuesta tal como la de *Fraxinus*, se forman una serie de lóbulos laterales a partir del primordio central que darán lugar a los folíolos de la hoja madura. La intensidad de crecimiento del limbo y de las venas principales, tiene también una marcada influencia sobre la forma final de la hoja. Cuando el crecimiento, tanto del limbo como de las venas, se mantiene armónico, resulta una hoja de contorno simple, pero si el crecimiento es más vigoroso cerca de las venas que en otras partes de la hoja, ésta puede presentar un contorno lobulado.

La división celular controla la forma por medio de su ritmo, su duración y su distribución en la hoja en desarrollo. El estudio de Avery, en 1933, sobre el desarrollo de la hoja de tabaco (Fig. 28.11) ha demostrado que la forma de la hoja viene determinada

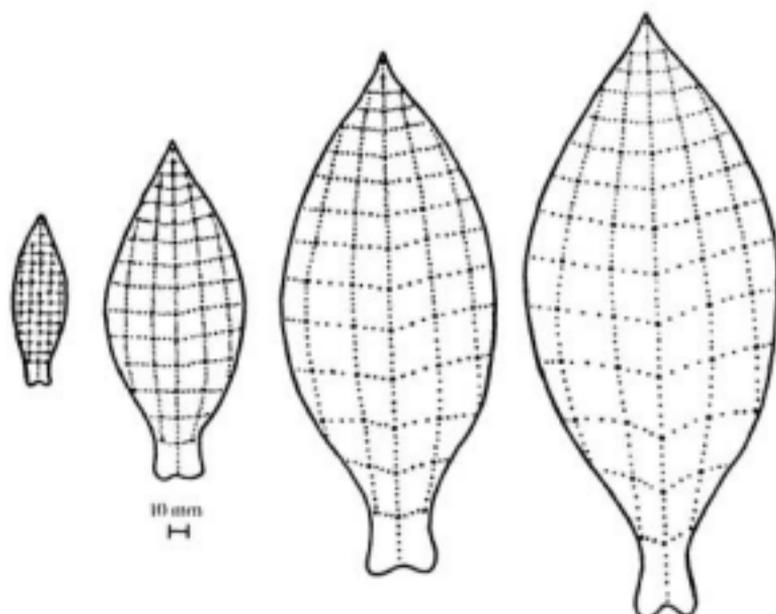


Figura 28.11.—Desarrollo de la hoja de *Nicotiana tabacum* en cuatro etapas sucesivas. Cuando la hoja tenía 1/4 del tamaño final (a la izquierda), su superficie fue marcada por un cuadrícula de 5 mm. Las distintas variaciones de forma y tamaño de los cuadros muestran que la expansión es variable, en las distintas partes de la hoja (según Avery, «Amer. Jour. Bot.», vol. 20, 1933).

por la distribución diferencial del crecimiento en las distintas áreas foliares y por el mayor crecimiento en una dimensión que en otra.

### 28.6. Desarrollo de la flor

En algún momento del ciclo biológico de las angiospermas, uno o más de los ápices vegetativos de la misma cesan de producir nuevas hojas y yemas y se transforman en un ápice floral. Este cambio de la actividad vegetativa a reproductora implicará un cambio en la estructura del ápice vegetativo del brote. El primer cambio detectable es un aumento en la división celular en la región del cuerpo, que generalmente se extiende hacia abajo y hacia los flancos. Al mismo tiempo, se observa una reducción marcada de la división celular en la parte central del meristemo, donde algunas de las células sufren una fuerte vacuolización. Como resultado de estos cambios, la región apical del brote queda transformada en una estructura consistente en una zona medular fuertemente vacuolizada, cubierta por un manto de células meristemáticas más pequeñas y densamente coloreadas (Fig. 28.12). Este manto, que incluye la túnica y las capas de células más externas del cuerpo, dará lugar a las brácteas y al primordio floral; este último se extenderá por toda la superficie del ápice, de tal forma que todo el tejido meristemático queda diferenciado. Como norma general, las distintas partes florales se originan como

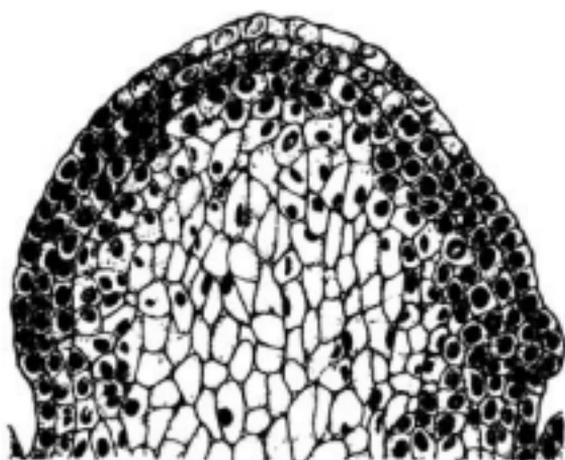


Figura 28.12.—Ápice apical reproductor en el que puede observarse una zona medular fuertemente vacuolizada cubierta por un manto de células meristemáticas fuertemente coloreadas (tomado de P. F. Wareing e I. D. J. Phillips, *The Control of Growth and Differentiation in Plants*, Pergamon Press, Oxford, 1978).

una secuencia acropétala continua de sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Esta secuencia puede resultar más o menos modificada, como ocurre, por ejemplo, en *Capse-lla*, en la que los primordios de los estambres y carpelos aparecen antes que los de los pétalos. Puede haber también diferencias en el ritmo de desarrollo de las partes florales. En las papaveráceas, por ejemplo, los sépalos se originan con un avance considerable sobre las demás partes.

Los sépalos y pétalos se originan, al igual que las hojas, a partir de divisiones periclinales en una o más capas subsuperficiales del meristemo apical. En su crecimiento hacia arriba, las partes del periantio muestran actividad apical de corta duración, seguida de crecimiento intercalar. La actividad marginal, seguida del crecimiento intercalar, es responsable del crecimiento en anchura de los primordios del periantio. En cuanto al origen de los estambres, existen aún algunas dudas ya que varios investigadores consideran que tienen el mismo origen que el periantio, mientras que otros creen que los estambres tienen un origen más profundo y que son, por tanto, estructuras axiales. Después de su iniciación, los estambres presentan un crecimiento apical de corta duración, seguido por un crecimiento intercalar. Las anteras presentan una forma especial de actividad marginal, lo cual da lugar a la característica estructura bilobulada y trilobulada. Por lo que respecta al gineceo, el origen de la placenta y los óvulos puede ser diferente al del carpelo. El carpelo se parece a una hoja en el modo de originarse desde el meristemo apical, mientras que la placenta o los óvulos se originan como una estructura axilar. Los carpelos, además, presentan crecimiento apical y marginal. Los datos sobre el desarrollo vascular de la flor no son muy abundantes. La suposición de que en la flor la diferenciación del procámbium es acropétala, se ha utilizado durante algún tiempo como criterio para apoyar el concepto de que la flor es una estructura no comparable al brote. Sin embargo, investigaciones más recientes han demostrado que entre la flor y el

brote no hay una diferencia clara, ya que la diferenciación acropétala del procámbium es corriente también en el brote de muchas plantas. Por otra parte, en las flores se ha encontrado la diferenciación acropétala como basipétala del procámbium.

### 28.7. Regulación hormonal de la morfogénesis

En el año 1882, Julius Sachs propone por primera vez la idea de que en las plantas deberían existir sustancias formadoras de órganos. Estas sustancias, que podrían ser la filocalina para las hojas, rizocalina para las raíces y caulocalina para los tallos, se moverían polarmente en direcciones específicas en el interior de la planta. Pasaron casi 50 años hasta que una de estas hipotéticas sustancias, la rizocalina fuese identificada como el ácido indol-3-acético. Hoy, 100 años después de la propuesta de Julius Sachs, podemos asumir razonablemente que la distribución y concentración de auxinas, giberelinas y citoquininas, además del ácido abscísico y el etileno, son factores vitales en la regulación de la diferenciación y morfogénesis en los vegetales.

Dos factores muy importantes en la coordinación y regulación de la diferenciación y morfogénesis en la planta entera:

- a) La localización de los lugares de síntesis de hormonas.
- b) Su movimiento y distribución desde los lugares de síntesis.

Los lugares jóvenes, especialmente las hojas en desarrollo o las regiones apicales del brote, son sitios muy activos en la síntesis de auxinas. Parece que, en general, las auxinas son transportadas desde los lugares de producción en dirección predominantemente basipétala, aunque el mecanismo de este transporte no está totalmente aclarado. Las giberelinas parecen sintetizarse en hojas en crecimiento, frutos, raíces y semillas y son transportadas libremente en todas direcciones, probablemente por el floema y el xilema. La evidencia actual sugiere que la biosíntesis de citoquininas puede estar restringida a las raíces; las semillas en desarrollo son ricas en este tipo de hormona, pero si son sintetizadas allí, o acumuladas procedentes de otra parte de la planta, es por ahora desconocido. Se conoce muy poco sobre el transporte de citoquininas, aunque parecen estar presentes tanto en el floema como el xilema. Muy poco se conoce también sobre los lugares de síntesis y mecanismo de transporte del etileno y ácido abscísico. El etileno no parece desplazarse entre diferentes partes de la planta, al menos en concentraciones fisiológicamente significativas. El ácido abscísico parece moverse, al igual que las giberelinas, en todas direcciones dentro de la planta, aunque en las raíces este movimiento parece ser fundamentalmente basipétalo, siendo sintetizado en la caliptra.

Como resultado de la elevada proporción de auxinas en la región apical del brote y de su transporte basipétalo, se forma un gradiente de concentración de auxina en la planta. También aparecen en el tallo gradientes en la concentración de giberelinas, estando la mayor concentración en las zonas apicales. Como veremos, hay una íntima correlación entre velocidades de crecimiento en las diferentes regiones del tallo y los gradientes de concentración de auxinas y giberelinas. Así, el crecimiento de los entrenudos está afectado y puede ser controlado por las hormonas que le llegan desde la región apical del brote. Es un hecho también conocido el que las hojas jóvenes en desarrollo tienen un efecto importante en la diferenciación del tejido vascular en el tallo, y

se sabe ahora que este efecto está mediatizado por las auxinas y giberelinas producidas por las hojas jóvenes.

De lo dicho, se puede deducir que las zonas de una planta en proceso de diferenciación y morfogénesis sintetizan sus hormonas precisamente en los tejidos que soportan de manera preferencial la diferenciación, pero se establece la necesidad de que si ciertas hormonas presentan capacidades morfogenéticas, deberán ser exportadas a tejidos en vías de diferenciación algo alejados de los lugares de síntesis. Hoy sabemos mucho más sobre la importancia de las hormonas en el control de la diferenciación y morfogénesis en órganos existentes, que en la formación de órganos en la planta intacta. Sin embargo, existe la posibilidad de que las hormonas colaboren para determinar los lugares de la iniciación de órganos y desencadenen las reacciones necesarias para este proceso.

La capacidad de algunos tejidos para imponer una diferenciación en otros, está bien ilustrada con los experimentos realizados en el cultivo de callo de *Cichorium intybus*. Cuando una yema apical del brote se injerta en la parte superior del callo, se induce una formación de tejido vascular en las zonas del callo conectadas con la base de la yema (Fig. 28.13). El estímulo procedente de la yema responsable de la diferenciación del tejido vascular, es capaz de atravesar una lámina de celofán interpuesta entre la yema y los tejidos del callo. Posteriormente ha sido demostrado que el AIA en tallos y raíces de guisante induce también la formación de tejido vascular en el córtex. La leche de coco, material muy rico en citoquininas, junto con las auxinas, es también capaz de inducir la diferenciación del tejido vascular en callos. Todos estos experimentos sugieren que las sustancias de carácter hormonal producidas por los meristemos apicales actúan como sustancias reguladoras de la morfogénesis en las regiones celulares adyacentes.

El papel de la auxina en la formación del xilema, se puede poner de manifiesto por experimentos de regeneración de filamentos de xilema en plantas de *Coleus*. Si uno de

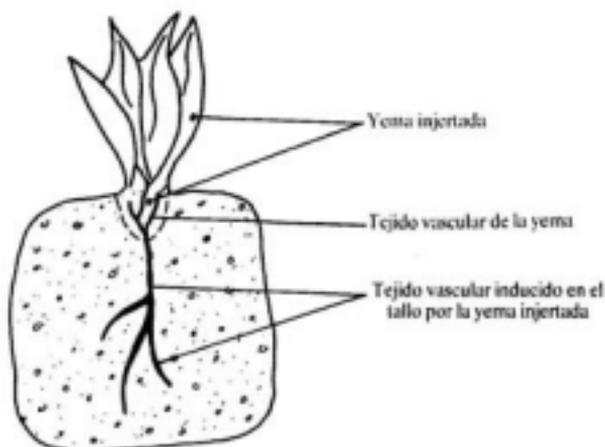


Figura 28.13.—Inducción de tejido vascular en callos de *Cichorium intybus* (achicoria) por una yema de achicoria injertada en la superficie superior del callo.

los haces vasculares de *Coleus* es dañado mediante un corte lateral, de tal manera que quede interrumpida su continuidad, ésta se restaura mediante la regeneración de un nuevo filamento que conecte los dos extremos (Fig. 28.14). El modelo de regeneración es basipétalo, comienza en el extremo superior dañado y va de célula a célula diagonalmente, a través de la médula. El filamento regenerado se forma por diferenciación de células parenquimatosas de la médula que se transforma en elementos del xilema y del floema. Se ha demostrado que la presencia de hojas por encima del corte es esencial para la regeneración. El efecto de la hoja puede ser reemplazado por auxinas, lo que sugiere que las auxinas sintetizadas en la hoja son también importantes factores reguladores de la diferenciación de los tejidos vasculares.

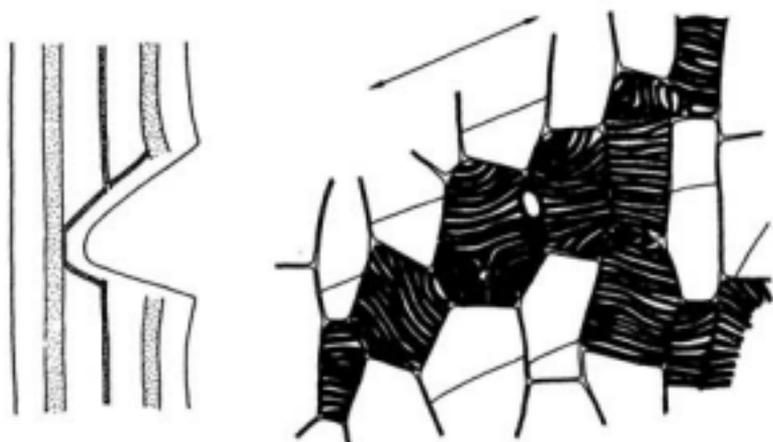


Figura 28.14.—Regeneración vascular en *Coleus*. Izquierda: regeneración de la conexión entre varios haces vasculares en el tallo. Derecha: diferenciación de células parenquimatosas en células del xilema. La flecha indica la dirección de desarrollo (según E. Sinnott y R. Bloch, «Amer. J. Bot.», vol. 32, 1945, pág. 151).

Algunos investigadores han sugerido que una hormona de crecimiento sintetizada en las raíces puede controlar el desarrollo del mesófilo foliar. Tal sugerencia está basada en experimentos realizados en *Amoracea lapathifolia*; si en esta planta se cortan los ápices radiculares, se impide el desarrollo normal del tejido intervenal de la hoja. El hecho conocido de que las raíces pueden exportar hacia el brote tanto citoquininas como giberelinas, podría explicar esta incapacidad de desarrollo del mesófilo foliar cuando se decapitan los ápices radiculares. El tratamiento con giberelinas en algunas plantas como *Triticum* y *Phaseolus* conduce a una estimulación del crecimiento foliar, mientras que en otras especies como *Pisum sativum* el crecimiento del mesófilo se ve retardado por el ácido giberélico. Por lo que respecta al papel de las auxinas sólo podemos decir, por ahora, que parecen necesarias para el desarrollo de las venas pero no para el del mesófilo. Existen también experimentos que parecen indicar un papel inhibitorio del etileno en la expansión foliar. Parece, por tanto, que el desarrollo de las hojas puede estar bajo control de las auxinas, giberelinas, citoquininas y

etileno. Sin embargo, esta posibilidad puede verse alterada profundamente en los próximos años, ya que el conocimiento que actualmente poseemos es muy incompleto y fragmentario.

La diferenciación de raíces fue primeramente considerada como la consecuencia de la producción por parte de las yemas o de las hojas de una sustancia formadora de raíces, la rizocalina, que se movería polarmente en sentido basipétalo. Esta propuesta estaba basada en el hecho demostrado experimentalmente de que extractos de yemas o de hojas, aplicados en el extremo apical de estaquillas provocaban la formación de raíces en la base. El desarrollo de ensayos cuantitativos, llevó a la identificación de la rizocalina como ácido indol-3-acético. La demostración de que la auxina era la sustancia formadora de raíces, condujo a la utilización de auxinas sintéticas para la inducción de la formación de raíces. De hecho, algunas de estas auxinas sintéticas, tales como el ácido indolbutírico o el ácido naftalenacético, son más potentes que la auxina natural. Esto puede ser debido al hecho de que la auxina natural es destruida rápidamente por el sistema enzimático AIA-oxidasa, mientras que las auxinas sintéticas al ser muy resistentes a este enzima, mantienen mejor su actividad. La mayoría de las plantas herbáceas, y muchas leñosas, responden formando raíces a la aplicación de auxinas, aunque algunas como *Taxus baccata* y *Abies alba* requieren varios meses (9-10) para formar raíces. Muchos otros factores pueden también modificar o incluso controlar la formación de raíces. Así, la sacarosa, nitrato o asparragina tienen un efecto estimulador. Entre estos factores debemos incluir la fuerte acción promotora de ciertas sustancias fenólicas. Varios investigadores han observado que estimulaciones marcadas del enraizamiento pueden obtenerse con el suministro junto a las auxinas de sustancias fenólicas que actúan sinérgicamente con la hormona. Así, se ha encontrado la acción sinérgica en el enraizamiento entre ácido p-hidroxibenzoico-AIA; ácido p-hidroxibenzoico-ácido naftalenacético; ácido gálico-ácido naftalenacético y ácido tánico-ácido naftalenacético o ácido indolbutírico. El mecanismo mediante el cual se desarrolla este efecto sinérgico no está completamente aclarado, aunque no parece probable que sea una consecuencia de la acción fenólica sobre el sistema AIA-oxidasa. Otras hormonas, tales como las giberelinas y citoquininas, tienen un efecto inhibitorio sobre la rizogénesis, siendo en el caso de las citoquininas bastante sorprendente, en vista de su efecto promotor de la división celular.

El concepto, cada vez más aceptado por los científicos, de que la diferenciación y morfogénesis son fenómenos controlados por los equilibrios entre sustancias hormonales, es particularmente interesante, ya que de otra forma sería necesario asumir que las distintas hormonas vegetales controlan la diferenciación de cada tejido u órgano. Esto nos llevaría al absurdo de suponer la existencia de sustancias controladoras de raíces, yemas, flores y quizá de estambres, pistilo, pétalos y sépalos. Un control de la diferenciación y morfogénesis por el equilibrio de las distintas sustancias reguladoras presentes en los vegetales, parece mucho más lógico. Este concepto está basado fundamentalmente en los estudios de inducción de la formación de órganos a partir de cultivos de callos, y que han dado lugar a la idea de que la organogénesis es un proceso bifásico, en el que la primera fase (citodiferenciación) da lugar a un primordio, y una segunda fase (organogénica) que determinará el tipo de órgano que se formará a partir del primor-

dio (Fig. 28.15). La naturaleza bifásica de la organogénesis, podría explicar el amplio espectro de tratamientos efectivos diferentes para la inducción de órganos a partir de callos. En el caso de la formación de raíces, todos los tratamientos hormonales pueden agruparse en dos grupos. En el primero, se obtiene desarrollo de raíces cuando el callo se mantiene en un medio con concentraciones casi equimoleculares de auxina y citoquinina. El segundo tratamiento para la inducción de la rizogénesis implica la retirada del medio de cultivo de la citoquinina y/o de la auxina. Este último tratamiento no es inductivo, sino que representa una liberación de una situación de supresión o represión. Así, por ejemplo, la diferenciación de raíces y brotes en un cultivo de callos de *Arabidopsis thaliana* se obtiene si el callo se retira del medio normal que mantiene su crecimiento con AIA, 2,4 D y Kinetina y se transfiere a otro medio con Kinetina pero sin auxinas; durante este primer subcultivo se produce una proliferación abundante de raíces. Una segunda transferencia a otro medio similar al anterior induce el desarrollo del brote.

Aunque estos dos tratamientos para inducir rizogénesis a partir de callos parecen contradictorios, pueden representar una estimulación de la rizogénesis en diferentes fases del proceso de desarrollo. El tratamiento primero, el de las cantidades equimoleculares de auxina y citoquinina, puede inducir la formación del primordio (fase de citodiferenciación) al mismo tiempo que se suministran concentraciones suficientemente

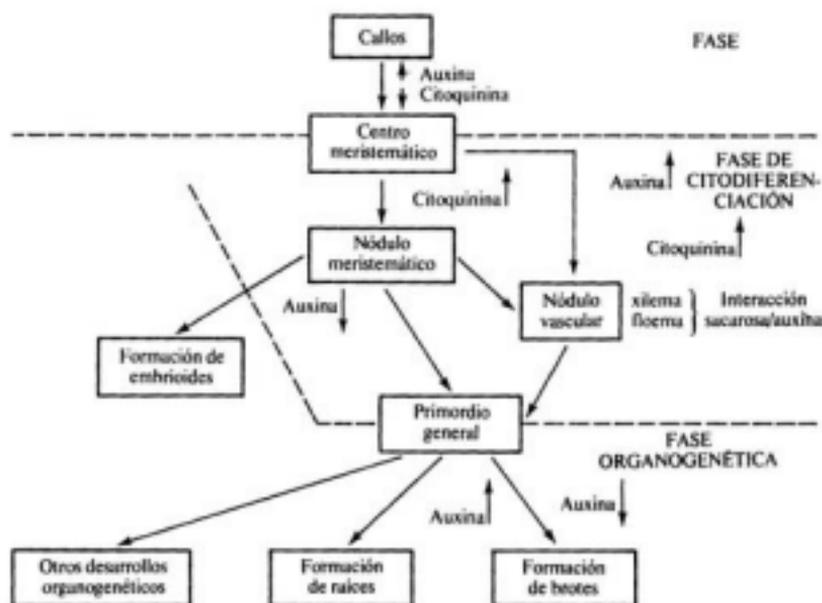


Figura 28.15.—Representación diagramática de la organogénesis en cultivos de tejidos. La dirección de las flechas indica niveles elevados o bajos de la correspondiente hormona exógena.

elevadas de auxinas para estimular el desarrollo del primordio y su transformación en raíz. Por el contrario, en el tratamiento segundo puede darse la situación en la que las hormonas exógenas suprimen el desarrollo de la raíz a partir del primordio. En tal caso debe asumirse que las hormonas presentes en el medio que permite el desarrollo del callo, permiten también que tenga lugar, por citodiferenciación, la formación de un primordio radicular y que para que éste se desarrolle sea necesaria la eliminación de alguna hormona.

Los estudios experimentales sobre la formación de brotes a partir de cultivo de callos avanzaron considerablemente después del descubrimiento de las citoquininas en el laboratorio de Skoog. Skoog y Miller, en 1957, descubren en cultivos de callos de tabaco, que una relación citoquinina/auxina elevada inducía formación de yemas, mientras que una relación baja favorecía la formación de raíces; niveles intermedios favorecían la proliferación del callo. Estos resultados son una prueba más en favor del concepto de que la diferenciación y morfogénesis están regulados por los equilibrios hormonales. La formación de brotes en la mayoría de los cultivos de callos de dicotiledóneas, se consigue mediante transferencia a un medio de cultivo en el que la relación auxina/citoquinina oscila entre 10 y 100; relaciones auxina/citoquinina de 10:1 y 50:1 inducen un desarrollo máximo de cloroplastos en cultivos de zanahoria, mientras que relaciones 1:1 no tienen apenas efecto. Algunas sustancias, como la adenina, pueden modificar la interacción auxina/citoquinina. Así, por ejemplo, en segmentos de tallo de *Plumbago* la adenina y la citoquinina actúan sinérgicamente en la inducción de la formación de yemas. También los fenoles, en adición a las auxinas y citoquininas, pueden ser importantes en la diferenciación y formación de órganos a partir de cultivos de tejidos. Generalmente, los difenoles estimulan la acción de las auxinas, resultado nada sorprendente dada su acción sobre el sistema AIA-oxidasa; así, en cultivos de médula de sauce promueven la formación de raíces, una respuesta típica a las concentraciones elevadas de auxinas. Por el contrario, en la médula de tabaco, la tirosina, que es un monofenol, promueve el desarrollo de yemas, que es respuesta característica de una relación citoquinina/auxina elevada. Por lo que respecta a otras hormonas, los resultados son algo contradictorios, pues mientras que la GA<sub>1</sub> inhibe la formación de brotes en callos, actúa sinérgicamente con auxina y citoquinina en la diferenciación de plántulas de *Secale cereale* y en la formación de yemas en callos derivados del cultivo de protoplastos de *Brassica napus*.

## 28.8. Correlaciones de crecimiento

Los distintos procesos de crecimiento que ocurren simultáneamente en una planta no son independientes entre sí, sino que están íntimamente relacionados. Así, si observamos el crecimiento de una planta, vemos que el tallo crece en longitud por efecto del crecimiento del meristemo del ápice, y al mismo tiempo crece en grosor aumentando la rigidez de las zonas más viejas. A su vez, este aumento en tamaño del tallo implica un incremento en las necesidades de agua y nutrientes y para satisfacerlas, se equilibra con el crecimiento del sistema radicular, lo cual también significa un aumento en las necesidades de sustancias orgánicas que debe aportar el tallo.

Este tipo de crecimiento que implica una interdependencia entre el desarrollo de

distintas partes de una planta se conoce como *correlaciones de crecimiento*. En el ejemplo que hemos citado, se trata de un crecimiento acompasado de dos zonas de una planta, pero hay ocasiones en las que el desarrollo de una parte implica el cese del crecimiento de otra, como es el caso de la fructificación, que cuando se produce hace que cese el crecimiento vegetativo de la planta. En estos casos, el crecimiento activo queda restringido a ciertas zonas, mientras que en otras, donde es potencialmente posible, se detiene o no se produce.

Dentro de este último tipo de fenómenos de correlación, el más estudiado ha sido el de la *dominancia apical* o inhibición correlativa de las yemas laterales. El meristemo apical de un tallo crece vigorosamente mientras que en las yemas laterales situadas por debajo de él, el crecimiento permanece inhibido. Dentro de este tipo de fenómeno se puede incluir también el caso de la inhibición del crecimiento de un tallo por la presencia de otro dominante. Este fenómeno de la dominancia apical está extendido por todo el reino vegetal, habiéndose observado en algas, hongos y briofitas además de plantas superiores.

El problema básico de la dominancia apical, es por qué las yemas laterales no se desarrollan normalmente en presencia de la yema apical. Una de las primeras hipótesis para explicar este fenómeno es la llamada *teoría nutritiva* y que asume que, dado que el meristemo apical está presente ya en el embrión y que es el primero en crecer durante la germinación, su mayor desarrollo hace que acapare todos los nutrientes en detrimento del crecimiento de las yemas laterales que son de formación posterior. Según esto, el ápice actuaría como un sumidero metabólico que mantiene un gradiente de concentración de nutrientes dirigiéndoles hacia él, lo cual impide el crecimiento de las yemas laterales. El primero en desarrollar esta teoría fue Karl Goebel en 1890, aunque sin aportar pruebas experimentales. Si la teoría nutritiva es correcta, sería posible demostrar que la dominancia apical se manifiesta más claramente cuando una planta sufre deficiencia de nutrientes. Los resultados experimentales son contradictorios, pues mientras en *Linum usitatissimum* en deficiencia de nutrientes minerales la dominancia apical es muy acusada y ésta no se observa cuando las condiciones nutritivas son óptimas, en otras plantas se observa dominancia apical aun cuando el contenido nutritivo de las yemas laterales sea el adecuado para su desarrollo. Un experimento realizado por Reed y Halma en 1920, con brotes de naranjo en los que se observaba dominancia apical, demostró que si se hace un pequeño corte justo encima de una yema lateral, es suficiente para que esta yema comience a desarrollarse normalmente, pero no las que se encuentran por encima del corte. A partir de este experimento comenzó a acumularse evidencia, que parecía descartar el hecho de que sea un suministro basal de nutrientes el que promueve el crecimiento y que más bien sea un suministro apical de alguna sustancia difusible la que inhibe el crecimiento. Snow, en 1925, aporta la primera evidencia importante en favor de sustancias difusibles en la dominancia apical. Toma dos plantas de *Phaseolus*, una decapitada y la otra completa, conservando en ambos casos los cotiledones, de forma que el aporte de nutrientes sea suficiente. Después de producir un corte en los tallos de ambas, las coloca muy próximas, manteniendo las zonas del corte separadas por un pequeño espacio lleno de agua; observa que la presencia del ápice en una de ellas inhibe el crecimiento de las yemas laterales de las dos. Concluye que el ápice produce una sustancia inhibidora del crecimiento de las yemas laterales que puede difundirse a

través del agua y pasar de una plántula a otra (Fig. 28.16). El descubrimiento de la auxina en los primeros años de la década de 1930, junto con el reconocimiento de que las hojas jóvenes son fuentes importantes de auxinas en el brote, indujo a muchos investigadores a pensar si no sería el ácido indolacético producido en la yema apical la sustancia difusible responsable de la inhibición correlativa del desarrollo de las yemas laterales.

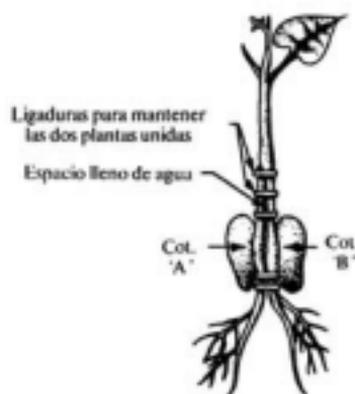


Figura 28.16.—Representación diagramática del experimento de Snow con plántulas de *Phaseolus vulgaris* (tomado de M. B. Wilkins (ed.), *Physiology of Plant Growth and Development*, McGraw-Hill, Londres, 1969).

Thimann y Skoog, en 1934, demuestran que el ácido indolacético exógeno aplicado en un bloque de agar puede sustituir a la yema apical en el mantenimiento de la inhibición del desarrollo de las yemas laterales. Más tarde demostrarían que el ápice produce auxina y que su transporte es basipétalo. Este efecto del AIA ha sido confirmado innumerables veces y en distintos materiales vegetales (Fig. 28.17), por lo que parecen existir pocas dudas sobre que la síntesis de AIA en la región apical del brote, y su transporte basipétalo sean dos componentes básicos en el mecanismo de la dominancia apical.

El problema, aún no resuelto de manera satisfactoria, es conocer de qué forma la auxina provoca la inhibición del desarrollo de las yemas laterales, sobre todo conociendo la repetidamente demostrada actividad del ácido indolacético como hormona estimuladora del crecimiento. Para resolver esta contradicción Thimann, en 1937, propone lo que se conoce como *teoría de la acción directa de la auxina*, basada en la idea de que diferentes órganos responden de manera diferente a la auxina. Así, la concentración óptima de auxina para el desarrollo de las yemas es inferior que la óptima para el desarrollo del tallo, siendo inhibido el desarrollo de las yemas por estas concentraciones supra-óptimas. De esta forma, en el crecimiento normal de una planta el tallo aumentaría su longitud bajo la influencia de la auxina, mientras que las yemas quedarían inhi-

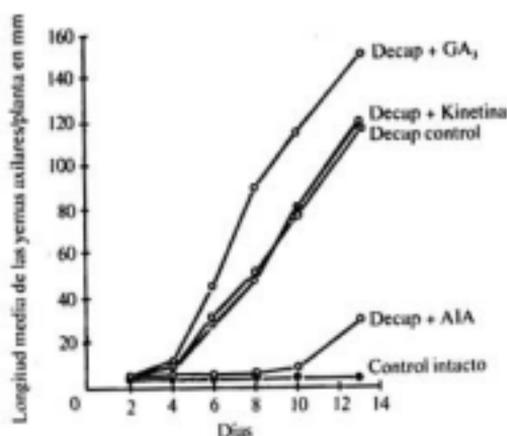


Figura 28.17.—Efecto de las hormonas en el crecimiento de yemas axilares en plantas de guisantes decapitadas (tomado de P. F. Wareing e I. D. J. Phillips, *The Control of Growth and Differentiation in Plants*, 2.ª ed., Pergamon Press, Oxford, 1978).

bidas por esa concentración de la hormona. La validez de esta teoría se considera hoy muy dudosa, ya que análisis realizados del contenido de auxinas en yemas inhibidas de *Lupinus*, *Pisum sativum* y *Syringa vulgaris* han revelado que los niveles de la hormona no son supra-óptimos, sino más bien sub-óptimos. También se ha encontrado que después de decapitar la yema apical, aumenta el contenido de auxina de las yemas laterales cuando éstas comienzan su desarrollo, lo cual si la teoría directa fuese correcta, debería inhibir el desarrollo de la yema en lugar de estimularlo, como así ocurre.

A medida que se han ido conociendo nuevas hormonas se ha visto que no sólo las auxinas participan de alguna forma en la dominancia apical. En 1959, Wickson y Thimann observan que en segmentos de tallo de guisante con yemas laterales, colocados en una solución de sacarosa con AIA, no hay crecimiento de las yemas, pero la adición de kinetina puede contrarrestar el efecto (Fig. 28.18) dependiendo de la proporción auxina/citoquinina. El mecanismo de la relación auxina-citoquininas-dominancia apical no está claro. Según Sachs y Thimann, las yemas axilares están inhibidas porque son incapaces de sintetizar citoquininas, quizás debido al efecto inhibitor de la auxina del ápice. La cuestión actual está en saber si las citoquininas juegan un papel directo al ser sintetizadas por la propia yema, estando controlada esta síntesis por las auxinas del ápice, o bien, sin dejar de ser necesarias para el crecimiento de las yemas, su papel no es primario, sino que son producidas en otros órganos; raíces fundamentalmente, e intervienen en la dominancia apical con la misma categoría que los nutrientes o el agua.

A este respecto hemos de citar un conjunto de interesantes experimentos realizados recientemente por Thimann y sus colaboradores utilizando el antibiótico Hadacidina (N-formil-N-hidroxiglicina), que interfiere con la actividad del enzima adenilosuccinico sintetasa que interviene en un paso intermedio en la síntesis del anillo púrico, y que podría interferir, por tanto, con la síntesis de citoquininas. Para probar esta hipótesis

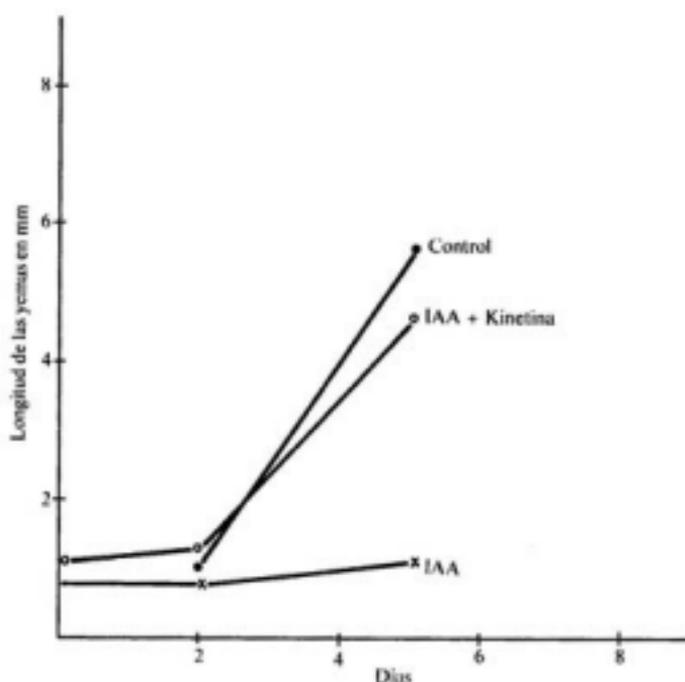
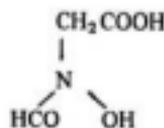


Figura 28.18.—Libración de la inhibición del crecimiento de las yemas laterales en segmentos de tallo de guisante mediante la aplicación de kinetina (tomado de K. V. Thimann, *Hormone Action in the Whole Life of Plants*, U. M. P., Amherst, 1977).

de trabajo, a plantas de guisante decapitadas, de tal manera que las yemas laterales pudieran desarrollarse y con su sistema radicular intacto, se les aplicó directamente en las yemas una cierta cantidad de Hadacidina con el consiguiente resultado de una inhibición total del desarrollo de las yemas tratadas pero no de las no tratadas. En otro lote



Hadacidina

de plantas se añadió hadacidina junto con kinetina, desarrollándose las yemas normalmente. Dado que la hadacidina es una sustancia muy inmóvil, que no es transportada hacia las raíces y que, por tanto, su acción es muy localizada, la conclusión lógica es que las citoquininas de las yemas laterales no proceden de las raíces y que al menos en el caso de la dominancia apical, el suministro crítico de la hormona es realizado directa-

mente en la yema y que éste puede hacerse, como se ha demostrado en otros experimentos, bajo la influencia de la luz.

Como otra explicación de la dominancia apical, se sugirió que la inhibición del desarrollo de las yemas se debe a una falta de conexión entre el sistema vascular de la estela y el de las yemas laterales. Un hecho repetidamente observado es la deficiente comunicación vascular que existe entre las yemas laterales y el tallo, siendo también de interés las observaciones realizadas en el sentido de que si se elimina la yema apical o si el suministro de auxinas se equilibra con citoquininas, el sistema vascular se desarrolla rápidamente, de tal forma que en yemas inhibidas pero tratadas con kinetina el contacto entre los sistemas vasculares del tallo y la yema se realiza al mismo tiempo en que la yema muestra un desarrollo apreciable. Sobre la importancia de los filamentos vasculares y el papel de la auxina en la conexión entre los sistemas vasculares Sachs, en 1969, realiza un interesante experimento que describimos a continuación: si el tallo de una planta de guisante se decapita y sobre su superficie cortada se aplica auxina de forma asimétrica, es decir, hacia la derecha del haz vascular principal, la hormona induce la formación de un nuevo haz vascular que puede ponerse en contacto o no con el haz vascular principal, dependiendo de la concentración de auxina en los dos haces vasculares (Fig. 28.19). Si la concentración de auxina es superior en el haz vascular lateral, se

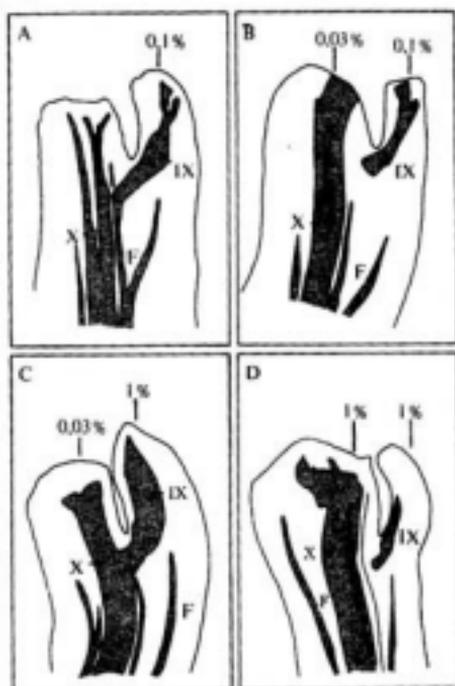


Figura 28.19.—Inducción de la formación de un haz vascular por auxinas. Explicación en el texto. X: xilema principal; IX: xilema inducido; F: trazas foliares (tomado de K. V. Thimann, *Hormone Action in the Whole Life of Plants*, U. M. P., Amherst, 1977).

produce contacto entre ambos (A y C en la figura), mientras que si la concentración de auxina es semejante en ambos haces no hay contacto (B y D). Esto podría deberse a una liberación de una pequeña cantidad de etileno que inhibe la diferenciación del xilema. En condiciones naturales podemos imaginar cómo el flujo de auxina procedente de la yema apical y desplazándose basipétalmente podría prevenir la conexión de la yema con el sistema vascular de la estela, quedando inhibido su crecimiento. Las citoquininas podrían contrarrestar este efecto induciendo la diferenciación del sistema vascular, estableciéndose la conexión de tal forma que los nutrientes pudieran llegar a la yema lateral, iniciándose así su desarrollo. En estrecha relación con lo que acabamos de decir estaría la llamada *teoría del transporte dirigido por hormonas* según la cual la auxina producida por el ápice es la que controla de alguna manera la dirección en la que se transportan los nutrientes y los demás factores que determinan el crecimiento del ápice en detrimento del de las demás yemas.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- ESAU, K.: *Anatomía Vegetal*, Omega, Barcelona, 1972.
- HILMAN, J. R.: *Apical Dominance*, en: M. B. Wilkins (ed.): *Advanced Plant Physiology*, Pitman Press, 1984.
- KIERMAYER, O. (ed.): *Cytomorphogenesis in Plants*, Springer-Verlag, 1981.
- LETHAM, D. S.; GOODWIN, P. B., y HIGGINS, T. J. V.: *Phytohormones and Related Compounds: a Comprehensive Treatise*, vol. II, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978.
- PHILLIPS, I. D. J.: *Apical Dominance*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 25, 1975, págs. 341-367.
- PHILLIPS, I. D. J.: *Apical Dominance*, en: M. B. Wilkins (ed), *Physiology of Plant Growth and Development*, McGraw-Hill, Londres, 1969.
- THIMMANN, K. V.: *Hormone Action in the Whole Life of Plants*, The University of Massachusetts Press, Amherst, 1977.
- WAREING, P. F., y PHILLIPS, I. D. J.: *Growth and Differentiation in Plants*, 3.ª ed., Pergamon Press, Oxford, 1981.

## MOVIMIENTOS DE LAS PLANTAS

A diferencia de los animales, las plantas no disponen de un sistema con el grado de diferenciación y especialización equivalente al sistema nervioso animal. La no existencia, con carácter general, de un sistema especializado en las funciones de relación, no significa que las plantas no posean la capacidad de recibir y transmitir estímulos del medio externo y la posibilidad de movimiento. Si bien la mayoría de las plantas se hallan fijas al medio por sujeción al suelo mediante las raíces, no obstante, disponen de diversos mecanismos de movimiento que les permiten, sobre todo, la orientación de sus órganos en el espacio.

Los principales tipos de movimientos de las plantas se pueden clasificar según el esquema de la tabla 29.1.

Desde el punto de vista de su mecanismo, en los movimientos provocados por estímulos externos se distingue entre los *movimientos de crecimiento* y los *movimientos de variación*. Los primeros se deben a un mayor crecimiento en extensión o elongación de una parte de la planta con respecto a la opuesta, lo que determina la formación de una curvatura (por ejemplo, en el fototropismo y en el gravitropismo). En cam-

TABLA 29.1

Clasificación de los distintos tipos de movimientos de las plantas

Movimientos de desplazamiento libre (provocados y orientados por un estímulo externo)	.....	<i>Tactismo</i>	
Movimientos de órganos	Provocados por estímulos externos	Orientado por el estímulo .....	<i>Tropismo</i>
		No orientados por el estímulo .....	<i>Nastia</i>
	Autónomos .....	<i>Nutación</i>	
Movimientos intracelulares	{	<i>Movimientos intracitoplasmáticos</i>	
		<i>Movimientos orientación cloroplastos</i>	

bio, los movimientos de variación son producidos por cambios osmóticos reversibles en células especializadas. Muchas nastias responden a este último mecanismo.

Un aspecto importante de las interacciones estímulo-respuesta de movimiento de las plantas es la existencia de *receptores* o *sensores* específicos (fotorreceptores, gravirreceptores, termorreceptores, mecanorreceptores, etc.) capaces de percibir las señales (estímulos) del medio y transducir dichas señales a distancia para obtener una respuesta de movimiento.

Con carácter general se ha establecido una terminología de referencia para los movimientos de las plantas provocados por estímulos externos. De acuerdo con ella se distingue la siguiente secuencia de procesos:

estímulo → percepción → transducción → respuesta

Se entiende por *percepción* a la interacción física entre el estímulo y un receptor en el organismo que resulta en un cambio en el receptor. Así entendido el término de percepción sería sinónimo al clásico de recepción. La *transducción* incluye los procesos bioquímicos o biofísicos provocados por el sensor activado y la integración de los procesos fisiológicos que por transmisión de una señal desde el sitio de localización del receptor al lugar de acción provocan la *respuesta* final.

### 29.1. Tropismos

Se trata normalmente de movimientos de crecimiento que ocurren en respuesta a un estímulo externo unilateral y determinan la orientación de un órgano, o parte de la planta, respecto a la dirección del estímulo. De este modo, a pesar de la imposibilidad de movimiento de la planta como un todo, ésta puede orientar en el espacio a sus órganos con respecto al estímulo externo. Cuando esta orientación es en la misma dirección del estímulo, se habla de *ortotropismo*, distinguiéndose entre *ortotropismo positivo*, en el caso de que se oriente en la misma dirección y sentido del estímulo, y *ortotropismo*

TABLA 29.2

Diferentes tipos de tropismos, según el estímulo que los provoca

Estímulo	Respuesta de la planta
Luz	Fototropismo
Gravedad	Gravitropismo (= Geotropismo)
Tacto	Tigmotropismo (= Haptotropismo)
Químico	Quimiotropismo
Agua	Hidrotropismo
Electricidad	Galvanotropismo
Aire	Aerotropismo
Lesiones	Traumatotropismo

negativo, si es en sentido contrario. Una orientación del órgano oblicua al estímulo se conoce como *plagiotropismo*. En el caso particular de una orientación perpendicular al vector del estímulo se habla de *diotropismo*.

Hay distintas posibilidades de tropismos en las plantas. En la tabla 29.2 se muestran algunas de las distintas modalidades de tropismos, según la naturaleza del estímulo unidireccional que opera. De entre ellos destacaremos, por su mayor importancia, el fototropismo y el gravitropismo (geotropismo).

### 29.1.1. Fototropismo

En el fototropismo las plantas responden con un crecimiento desigual, inducido por un cambio asimétrico de la luz que recibe la planta, de forma que causa distinta intensidad de crecimiento en la parte oscura y en la iluminada. Como consecuencia de ello, la respuesta fototrópica se manifiesta por una *curvatura de la planta orientada por la luz*.

El estudio de los movimientos fototrópicos de las plantas datan de la época de Charles Darwin, quien en 1880 los describió en su obra *Power of Movement in Plants* y fueron la base para el descubrimiento y estudio inicial de las hormonas vegetales, principalmente de las auxinas, a principios de nuestro siglo (ver Cap. 22).

En general, en este tipo de tropismos el estímulo por la luz unilateral provoca un movimiento de orientación hacia ella del tallo (ortofototropismo positivo) y, la mayoría de las veces aunque no de un modo tan claro, en sentido contrario de las raíces (ortofototropismo negativo). En el caso particular de las ramas y peciolo suelen presentar respuestas plagiofototrópicas (Fig. 29.1).

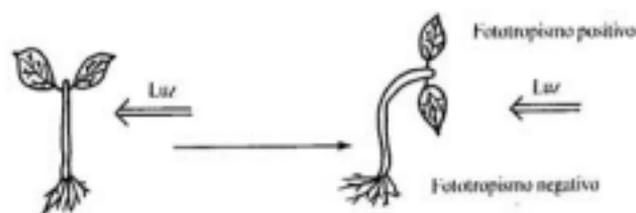


Figura 29.1.—Orientación de la parte aérea y de las raíces frente a un estímulo lumínico unilateral (fototropismo).

Un material muy útil para la experimentación del fototropismo son los *coleóptilos* de las gramíneas, las *plántulas de las dicotiledóneas* y el crecimiento del *protalo* o *protomena de helechos*. En los dos primeros casos se trata de órganos que localizan y separan la división celular y la síntesis de la auxina en el ápice y el crecimiento en extensión o elongación en la parte inferior, por lo que es fácil de localizar y seguir las diferencias en el crecimiento en extensión celular. Por el contrario, el *cloronema* de los helechos pre-

senta un crecimiento apical resultando la curvatura fototrópica de un desplazamiento del centro de crecimiento desde el ápice a los flancos del cloronema (Fig. 29.2).

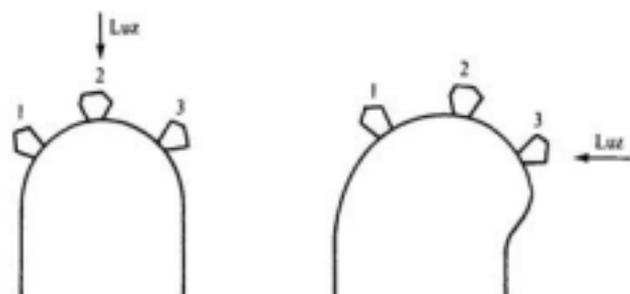


Figura 29.2.—Mecanismo del crecimiento apical en los cloronemas de helechos (tomado de H. Etzold, «Plantas», 64, 254-280, 1965).

#### 29.1.1.1. Fototropismo del coleóptilo de gramíneas

El coleóptilo corresponde a la envoltura protectora de la plúmula y hojas primarias durante los primeros días de la germinación de las semillas de cereales (por ejemplo, avena, maíz). El coleóptilo permite un buen estudio del crecimiento y de la curvatura de crecimiento por acción de la auxina. En el ápice del coleóptilo se localiza el crecimiento por división celular y la síntesis de auxina. Ésta es transportada *basipétalmente* (Cap. 22) hacia las células más inferiores en donde ejerce su acción por estímulo del crecimiento en extensión. Si por cualquier mecanismo se consigue una distribución asimétrica de la auxina, la planta responde con una curvatura, por el desigual crecimiento en extensión accionado por la asimetría de niveles de AIA en las dos partes. Son propiedades esenciales del coleóptilo para este tipo de estudios:

- La clara separación entre el crecimiento por división celular (ápice) y el crecimiento en extensión (resto del coleóptilo).
- El crecimiento del coleóptilo se debe casi exclusivamente a crecimiento en extensión.
- La velocidad de crecimiento se mantiene constante durante varias horas.
- En adecuadas condiciones nutritivas, el coleóptilo tiene un comportamiento fisiológicamente radial.

El planteamiento del estudio del mecanismo del fototropismo requiere, en primer lugar, la consideración del *fotorreceptor* de las plantas responsable de la captación de la *señal lumínica* (luz unilateral), del *comportamiento fotoquímico* del fotorreceptor y de la *transducción y amplificación* de estas señales percibidas, en las respuestas fototrópicas.

El comportamiento fototrópico del coleóptilo difiere, según la intensidad y tiempo de aplicación, de la luz unilateral. En la figura 29.3 puede observarse una típica curva dosis-efecto, en donde para diferentes intensidades de luz se representan las curvaturas fototrópicas (positivas o negativas). A pequeñas energías lumínicas se produce aumento de la curvatura (*primera respuesta positiva*), un posterior aumento de la energía conduce, paradójicamente, a un *efecto nulo* e, incluso, a una reacción negativa (*primera respuesta negativa*) hasta que de nuevo, por elevación de la energía suministrada, se alcanza una *segunda respuesta positiva*.

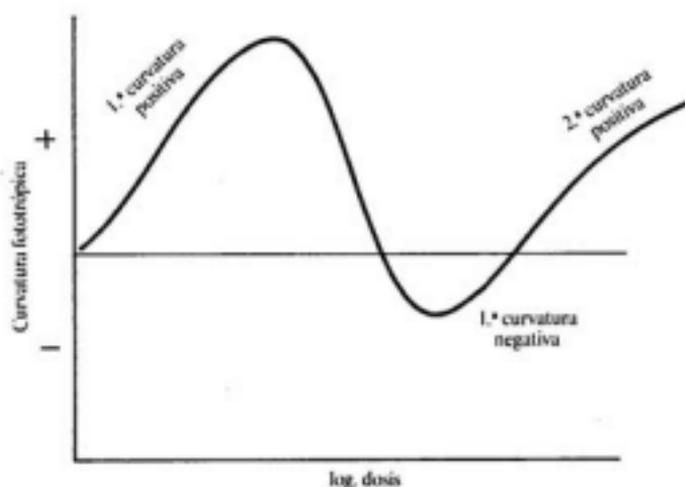


Figura 29.3.—Comportamiento fototrópico del coleóptilo a distintas intensidades y tiempos de luz unilateral (curva dosis-efecto).

#### 29.1.1.1.1. Percepción del estímulo fototrópico y naturaleza del fotorreceptor

Hay diversas evidencias sobre la naturaleza del fotorreceptor del fototropismo. Estas evidencias se basan fundamentalmente en el estudio de los espectros de acción, las curvas dosis-efecto, la presencia y distribución de los pigmentos fotosensibles en las plantas y la consideración sobre la existencia de uno o varios sistemas fotorreceptores.

Por iluminación parcial del coleóptilo se comprueba una distribución desigual de la *sensibilidad* al estímulo fototrópico. La primera curvatura positiva y la primera curvatura negativa es inducida en el ápice del coleóptilo, mientras que la segunda curvatura positiva puede ser inducida por la luz en porciones más basales. Así, un coleóptilo decapitado al que se añade auxina, reacciona a la luz unilateral con una segunda curvatura positiva y no con la primera respuesta.

La sensibilidad fototrópica del coleóptilo se corresponde con la luz de menor longi-

tud de onda (luz azul, violeta y UV cercano). El estudio de los espectros de acción muestra tres máximos en la región del azul y un pico en el UV cercano (Fig. 29.4). Como posibles candidatos fotorreceptores se citan sobre todo las *flavinas* y los *carotenoides*. Los picos a 450 y 370 nm y el mínimo a 400 nm del espectro de acción, se corresponden con los espectros de absorción de las flavinas, pero, en cambio, no coinciden tan claramente en la región visible del espectro. Por el contrario, en esta región los carotenoides muestran una mayor coincidencia que no se cumple en la región del UV cercano (Fig. 29.4).

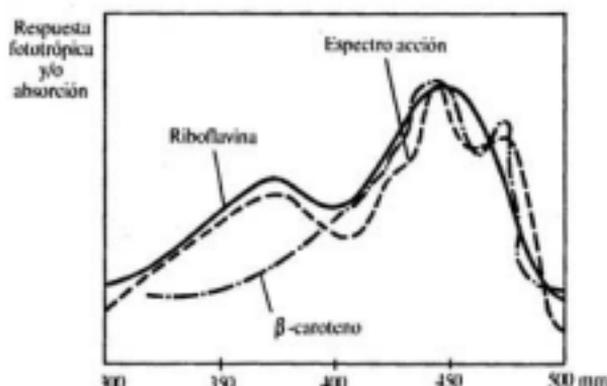


Figura 29.4.—Espectros de absorción y de acción para los carotenoides y flavinas como posibles fotorreceptores para el fototropismo.

Se han dado diversas interpretaciones para estas coincidencias y contradicciones. Cabe pensar que junto a los *fotorreceptores activos* el efecto final de asimetría se puede conseguir también con la participación de *pigmentos pantalla*. Según esta hipótesis, el fotorreceptor podría ser una flavina, mientras que los carotenoides del ápice actuarían como pigmentos pantalla. Otras veces se cita como posible mecanismo que el fotorreceptor sea el  $\beta$ -caroteno y que la radiación UV cercano sea efectiva por absorción por la riboflavina y transferencia de energía al  $\beta$ -caroteno. Difícilmente es sostenible esta interpretación por la distinta localización celular de ambos tipos de pigmentos. También se ha dado como candidato a flavinas unidas a proteínas, por cuya unión extenderían su absorción de una manera más neta a la zona azul del espectro visible. En todo caso, en el estado actual de conocimientos, es todavía prematuro establecer claramente si el fotorreceptor del fototropismo es una flavina o un carotenoide o una cooperación de ambos pigmentos.

Últimamente se consideran prometedoras las primeras evidencias para un fotorreceptor flavina/citocromo b unido a membrana, por la considerable selectividad en la fotorreducción de un citocromo tipo b por parte de la luz absorbida por una flavina.

El fitocromo (Cap. 30) no participa directamente en el fototropismo, aunque sí puede afectar la *sensibilidad* a la luz azul por parte de la planta.

## 29.1.1.1.2. Mecanismo de acción de la respuesta fototrópica

En los años veinte, Cholodny especuló que la asimetría del crecimiento que provocaba la curvatura fototrópica era debida a una distribución asimétrica por *transporte lateral de la auxina* desde la parte iluminada a la oscura; extremo que fue demostrado por Went en 1926. Por este motivo, a esta interpretación se la conoce como *teoría de Cholodny-Went*. El tiempo transcurrido desde esta primera interpretación parece haber consolidado su significación en el mecanismo del fototropismo y del gravitropismo. Actualmente parece no haber duda de que se trata de un *movimiento de crecimiento* en el que las diferencias de crecimiento, en ambos lados del órgano iluminado unilateralmente, se deben a diferencias en la concentración de auxina, que es superior en la parte oscura sobre la iluminada. Ha merecido especial atención el conocimiento del mecanismo por el que se llega a esta asimetría de AIA en el órgano fototrópicamente iluminado. En ciertos casos se ha pensado en una *inactivación por la luz de la auxina*, que ocurriría en presencia de la riboflavina y por acción fotooxidativa de la luz, llegándose así a un gradiente de auxina entre la parte oscura y la iluminada. No obstante, las pruebas experimentales con energías lumínicas para la primera y segunda curvaturas positivas no causan las altas degradaciones de AIA requeridas para aclarar la diferencia de crecimiento.

Las pruebas experimentales con el coleóptilo hablan, más bien, en favor de que no se modifican los niveles totales de auxina y de que el incremento de auxina en la parte oscura proviene, por *transporte transversal* de la auxina, de la parte iluminada unilateralmente. En el mismo sentido son indicativas las experiencias con AIA radiactivo (figura 29.5).



Figura 29.5.—Experimentos de suministro de AIA- $^{14}\text{C}$  a la sección superior de un segmento de coleóptilo de avena (tomado de H. Mohr y P. Schopfer, *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer-Verlag, Berlin, 1978).

Una hipótesis atractiva más reciente es la de Hager en la que se tiene en cuenta a la vez la inactivación por la luz de la auxina, la inhibición del transporte longitudinal y la inducción del transporte transversal. Según Hager, el transporte de la auxina en la parte basal de la célula sería una secreción *activa* por permeasas. En la parte iluminada, por fotólisis del AIA, se produciría 3-metilén oxi-indol que actuaría como inhibidor del

transporte de auxina en la parte iluminada, por bloqueo de las permeasas y así del transporte basipétalo. Debido a la distinta absorción en sentido transversal, estarían bloqueadas más permeasas en la parte iluminada que en la oscura, con lo que se llegaría a una secreción asimétrica de auxina y, en la operación de conjunto del tejido, a un transporte transversal de auxina. Investigaciones posteriores de Wilkins con AIA radiactivo vuelven a poner en duda la operatividad del transporte transversal y de la inhibición del transporte longitudinal del AIA en el fototropismo.

#### 29.1.1.2. Fototropismo en plántulas de dicotiledóneas

Las plántulas de dicotiledóneas han sido también un material de estudio adecuado para experiencias de fototropismo, pues permiten, al igual que los coleóptilos, separar fácilmente los sitios de división celular y síntesis apical de la auxina del de crecimiento en extensión en la porción subapical. Los resultados experimentales son muy parecidos a los hallados para el coleóptilo. La aplicación unilateral de la luz conduce a fototropismo positivo del hipocótilo y el espectro de acción, de un modo característico, comprende la luz azul y el UV cercano. La luz roja y el sistema fitocromo no participan en la percepción fototrópica aunque sí pueden modificar la sensibilidad frente al estímulo por la luz azul. Se cita al *criptocromo* (posiblemente una riboflavina unida no covalentemente a proteínas) como posible fotorreceptor de las reacciones fototrópicas. Aunque se ha generalizado la teoría de Cholodny-Went para su mecanismo de acción, también hay indicios indicativos de que la asimetría de crecimiento pudiera lograrse no por presencia de una sustancia estimulante, sino por la de inhibidores, como por ejemplo, en *Helianthus annuus* por ABA y xantoxina.

#### 29.1.1.3. Fototropismo y polarotropismo de protonemas de helechos

Se trata de un caso muy especial de fototropismo y, en muchos aspectos, difiere de los ejemplos anteriores. En el ciclo ontogénico de los helechos alternan dos generaciones, una formada por germinación de esporas haploides que se desarrolla en un gametofito haploide. Este gametofito, en sus primeras fases, constituye un *protonema* unidimensional que por acción de la luz se convierte rápidamente en un *protalo* bidimensional. Por reproducción sexual del protalo se origina un *esporofito* diploide que por reducción meiótica forma las esporas, capaces por germinación de originar un nuevo gametofito.

El crecimiento del protonema (cloronema) ocurre en la célula apical (Fig. 29.2) y se ha comprobado que la reacción fototrópica no se debe a un mayor crecimiento de la parte oscura sobre la iluminada, sino a un *desplazamiento de la dirección de crecimiento apical* hacia los flancos. La figura 29.2 muestra el desplazamiento de los granos de almidón de arroz, situados en el ápice, bajo los efectos del fototropismo. En luz blanca o azul el gametofito se desarrolla en un protalo bidimensional normal. En cambio, en la oscuridad o en luz roja crece unidimensionalmente por el extremo apical (protonema). En este último caso, el empleo de luz polarizada permite conocer la posición del plano de vibración eléctrico y estudiar los efectos fototrópicos para distintas direccio-

nes respecto al cloronema (*polarotropismo*). Este tipo de experiencias polarotrópicas han demostrado que la dirección del crecimiento del cloronema y del rizoides ocurren siempre en un plano perpendicular al de vibración del vector eléctrico (Fig. 29.6) y

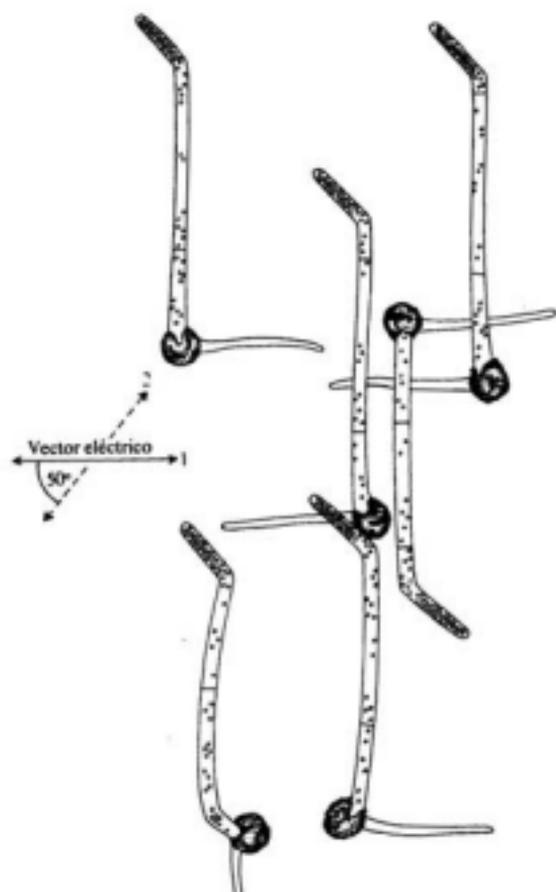


Figura 29.6.—Experimentos de polarotropismo con esporas germinantes de *Dryopteris* (tomado de H. Mohr y P. Schopler, *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer-Verlag, Berlin, 1978).

que la luz activa, contrariamente al caso general del fototropismo en la mayoría de plantas, es la roja. El sistema *fitocromo* (Cap. 30) es el fotorreceptor responsable de este caso particular de fototropismo. Este tipo de experiencias han aportado también datos para un conocimiento de la ordenación dicroica del fitocromo (ver Cap. 30).

#### 29.1.1.4. Fototropismo de «Phycomyces»

Otra aportación al estudio del mecanismo del fototropismo proviene de las experiencias con esporangióforos del hongo *Phycomyces*. Se trata de un Ficomíceto constituido por hifas no septadas pluricelulares, de organización cenocítica, cuyos esporangióforos responden al estímulo fototrópico de un modo característico en cada una de las fases de su desarrollo. En la denominada fase IVb el esporangióforo deja de crecer por el ápice y su zona de crecimiento se sitúa por debajo del esporangio, a una velocidad constante durante unos pocos días. Por estímulo fototrópico se consigue un cambio asimétrico de la velocidad de crecimiento que conduce a una curvatura.

Por aplicación unilateral de luz azul y UV cercano, entre 300 y 500 nm (Fig. 29.8), se provoca una curvatura fototrópica positiva del esporangióforo. Por el contrario, si se aplica UV de 200 a 300 nm se produce una curvatura negativa. Debido a que la zona de crecimiento se localiza subapicalmente, se produce la curvatura por mayor crecimiento de la parte convexa hacia la parte iluminada en la reacción positiva y hacia el flanco oscuro en la negativa.

En la figura 29.7a puede observarse que por iluminación *semilateral* del esporangióforo, desde un plano perpendicular al plano del dibujo, ocurre una respuesta de curvatura en el sentido opuesto a la luz, por mayor crecimiento del lado iluminado sobre el oscuro, tanto para la luz visible como para el UV.

Como puede observarse en la figura 29.7b, la respuesta fototrópica para *Phycomyces* es inversa a la que se obtiene con el coleóptilo.

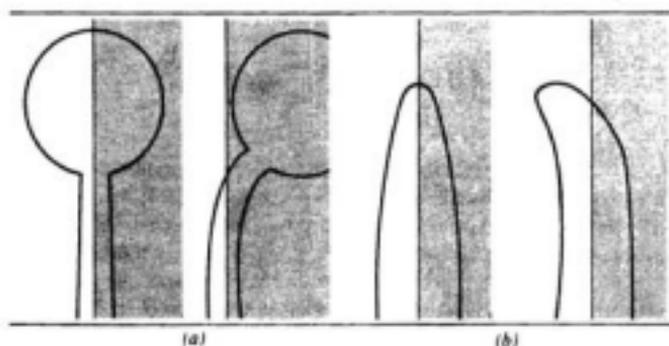


Figura 29.7.—Por iluminación *semilateral* del esporangióforo de *Phycomyces* se obtiene una respuesta de curvatura en el sentido opuesto a la luz. (a), comportamiento distinto al del coleóptilo de avena; (b), en las mismas circunstancias (según W. Haupt, *Bewegungsphysiologie der Pflanzen*, George Thieme Verlag, Stuttgart, 1977).

Las curvaturas distintas del esporangióforo según la longitud de onda empleada se han atribuido al *efecto de lente* (Fig. 29.8) del esporangióforo que determina, por encima de 300 nm, más luz en la parte oscura sobre la iluminada, mientras que por debajo de 300 nm se consigue el resultado inverso por efecto pantalla (absorción del UV por los componentes vacuolares).

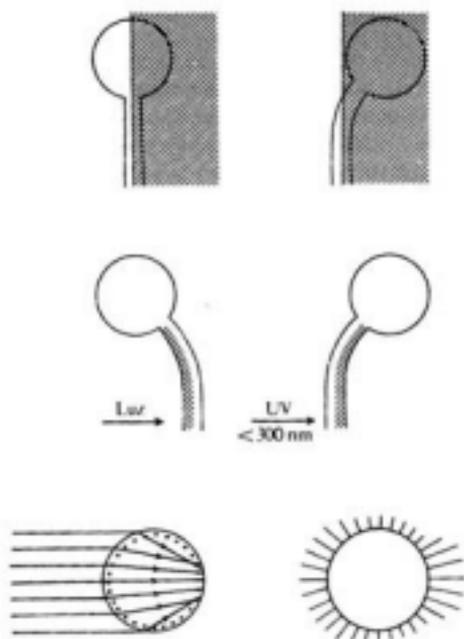


Figura 29.8.—Efecto de lente del esporangióforo de *Phycomyces* con luz  $>300\text{ nm}$  y efecto de pantalla, con resultados inversos, con luz  $<300\text{ nm}$  (tomado de W. Haupt, «Naturw. Rdsch.», núm. 18, 1965, págs. 261-267).

Por lo que vemos, el comportamiento fototrópico del esporangióforo, al contrario de lo que ocurre con el coleóptilo y en los hipocótilos de dicotiledóneas, viene determinado por un crecimiento del esporangióforo más intenso en el lado en el que absorbe el máximo de fotones que, para la luz azul y UV por encima de  $300\text{ nm}$ , por efecto lente, es el lado oscuro (Fig. 29.8, inferior izquierda), mientras que para el UV menor de  $300\text{ nm}$ , por efecto pantalla, es el propio lado iluminado (Fig. 29.8, inferior derecha). También están de acuerdo con esta interpretación los resultados según los cuales por iluminación semilateral, desde un plano perpendicular a la página, se obtiene una curvatura fototrópica negativa, tanto por la luz visible como por el UV (Figura 29.8, superior).

### 29.1.2. Gravitropismo (geotropismo)

Casi todas las plantas orientan sus órganos con respecto a la dirección de la fuerza de la gravedad. Se entiende por *geotropismo* los movimientos de los órganos de una planta inducidos y orientados por la acción de la gravedad. Dicho término fue introducido por primera vez por Franck (1868) quien, a su vez, observó que las curvaturas

geotrópicas estaban directamente conectadas con el crecimiento. Este término engloba únicamente el campo de la gravedad terrestre. En un sentido más amplio se le conoce también como *gravitropismo* o *baritropismo*, que incluye, además, la aceleración de masa. Esta diferencia es importante si se tiene en cuenta que muchos experimentos de este área de conocimientos se valen de la aplicación de centrifugaciones o se realizan en biosatélites. Por ello, últimamente tiende a generalizarse y sustituir el término clásico de *geotropismo* por el más amplio de *gravitropismo*.

### 29.1.2.1. Respuestas gravitrópicas

Al igual que ocurre con el fototropismo, en el gravitropismo los distintos órganos de la planta pueden presentar respuestas opuestas. En general, el tallo presenta ortogravitropismo negativo y las raíces ortogravitropismo positivo (Fig. 29.9). Las ramas, peciolo y raíces laterales responden normalmente con plagiogravitropismo. Un caso especial lo presentan muchas raíces y tallos subterráneos (rizomas) que crecen horizontalmente, en un ángulo recto respecto al vector de la gravedad (diagravitropismo).

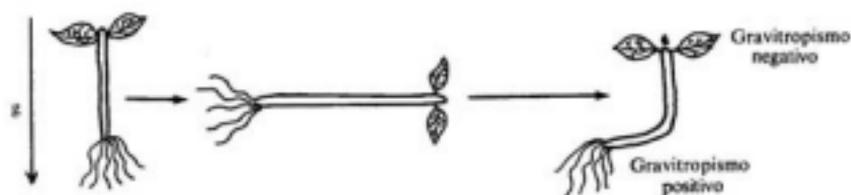
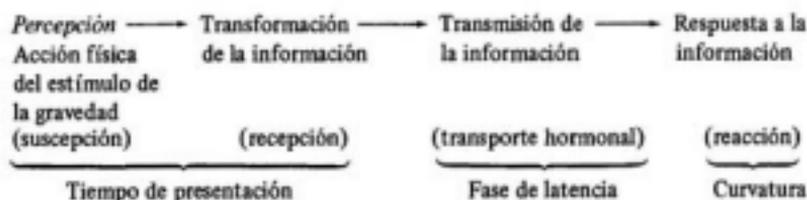


Figura 29.9.—Orientación de la parte aérea y de las raíces frente al estímulo unilateral de la gravedad (gravitropismo).

En una aproximación general al estudio del gravitropismo debe considerarse secuencialmente la cadena de fenómenos por los que la planta capta y percibe la acción de la gravedad (*sensor de gravedad*), la transducción o transformación y transmisión de esta señal (*flujo de la información*) y el mecanismo de acción de la reacción fisiológica (*curvatura geotrópica*).

Audus representa esta cadena de procesos según el siguiente diagrama:



De este modo, se entiende por *suscepción* a los cambios físicos inducidos por la acción unilateral de la gravedad, mientras que se reserva el término de *recepción* a la

transformación de la información física (cambio estructural) en información molecular (cambio hormonal). El transporte de la información desde el sitio de percepción a la región de respuesta, con mucha probabilidad, sería un *transporte hormonal* (fase de latencia) que en definitiva causaría la *reacción* (curvatura gravitrópica) como consecuencia de la concentración diferencial de estas hormonas.

No parece haber duda en que el gravitropismo es también un *movimiento de crecimiento* por el que la acción unilateral de la gravedad logra una distribución hormonal asimétrica que desencadena, en definitiva, la curvatura gravitrópica característica de cada órgano.

#### 29.1.2.2. Percepción de la gravedad por las plantas

No todas las células de un órgano son capaces de actuar como *sensores* de la gravedad, sino que, normalmente, la detección de la gravedad (gravipercepción) se halla localizada en distinto lugar al de la respuesta de crecimiento. En general, estas células sensoras (*estaticitos* o *estaticistos*) se sitúan en posición apical; así, cerca del ápice de los tallos y hojas jóvenes y en el estaténquima de la cofia de las raíces o, en el caso del coleóptilo, en la zona apical.

Ya en 1900 Haberlandt estableció la *teoría de los estatólitos*, según la cual la gravedad causaría movimientos de aceleración de masa de algún componente (*estatólito*) de las células sensoras o estaticitos. Estos estatólitos se han asimilado en muchos casos a *amiloplastos* sedimentables específicos. Estudios posteriores han reforzado esta primera interpretación de Haberlandt, en el sentido de que estos estatólitos únicamente se localizan en las regiones sensibles al estímulo gravitrópico. Recientemente dos aportaciones importantes para la teoría del estatólito han sido las investigaciones con el alga *Chara foetida* y con los estaticitos de la cofia de la raíz de *Lepidium sativum*.

#### 29.1.2.3. Procesos gravitrópicos en el alga «Charas»

El rizoides del alga verde *Chara foetida* muestra gravitropismo positivo y presenta ventajas experimentales netas para este tipo de investigaciones. Ello es debido a que está constituido por una única célula fácilmente observable al microscopio por su transparencia y por no interferir ninguna sensibilidad frente al fototropismo. En el ápice de la célula se localiza la susceptión de la gravedad, así como la respuesta gravitrópica. Se ha comprobado que la respuesta gravitrópica va ligada a la presencia de «cuerpos brillantes», denominados así por su apariencia, en cuya constitución se supone que forma parte el sulfato bórico. Normalmente los cuerpos brillantes se localizan en la región inmediata a la zona de crecimiento. Solo por altas aceleraciones por centrifugación es posible desplazarlos de la zona de crecimiento en sentido longitudinal hacia la parte basal.

En condiciones normales, los cuerpos brillantes se sitúan en una placa transversal en posición central. Si se dispone horizontalmente el rizoides, los cuerpos brillantes se desplazan hacia la parte inferior (Fig. 29.10), fenómeno que va seguido, poco después, de la respuesta gravitrópica a pesar de que el crecimiento no se ve afectado. Al cabo de un cierto tiempo se regeneran nuevos cuerpos brillantes en su zona habitual y de nuevo

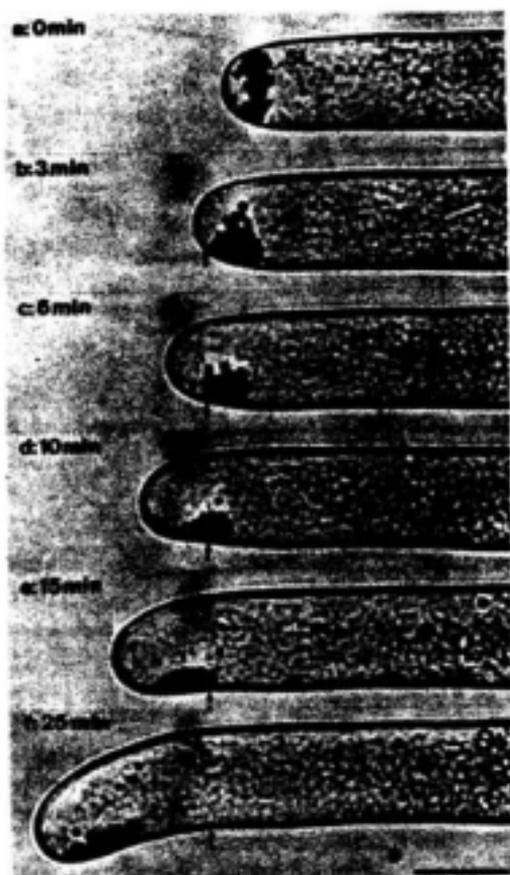


Figura 29.10.—Experimentos con rizoides del alga *Chara fortida*, situados horizontalmente. Obsérvese que en posición inicial los cuerpos brillantes se sitúan en una placa transversal de posición central, mientras que en la disposición horizontal del rizoides, los cuerpos brillantes se desplazan hacia la parte inferior (tomado de A. Sievers y K. Schrötter, «Plantas», vol. 96, 1971, págs. 339-353).

reaparece la capacidad de respuesta. Estas experiencias demuestran que los cuerpos brillantes actúan como *estatosolitos*, es decir, como sensores de la gravedad.

Un segundo aspecto importante en el análisis de estos experimentos es la relación o mecanismo por el que el desplazamiento de los estatosolitos opera la curvatura de crecimiento o respuesta gravitropica. Las vesículas de Golgi son necesarias para el crecimiento de la pared celular y provienen de los dictiosomas que en el rizoides de *Chara* se localizan en posición más alejada del ápice. En posición vertical (Fig. 29.11) las vesículas de Golgi del rizoides fluyen a través de los espacios periféricos que dejan los

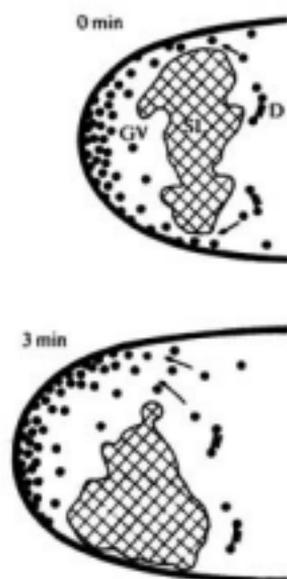


Figura 29.11.—La posición diferencial de las vesículas de Golgi, dirigida por la posición de los estatolitos (cuerpos brillantes) se traduce, en la región subapical, en una diferencia de crecimiento responsable de la curvatura gravitropica (tomado de A. Sievers y K. Schrötter, «Plantas», vol. 96, 1971, págs. 339-353).

estatolitos y alcanzan uniformemente la zona apical y subapical, con lo que ocurre un crecimiento simétrico. Por el contrario, en posición horizontal el camino hacia la parte inferior se halla bloqueado por los estatolitos, con lo que se acumulan las vesículas de Golgi en el lado superior de la zona de crecimiento. Estas diferencias en la región subapical se traducen en una diferencia de crecimiento que produce la reacción o curvatura gravitropica.

A pesar de que aún se desconocen algunos aspectos centrales de estos procesos, como, por ejemplo, la causa del transporte acropétalo de las vesículas de Golgi, la formación de los cuerpos brillantes y las características diferenciales de la región de los estatolitos que hacen que los cuerpos brillantes se mantengan en una zona apical bien definida y de algunas objeciones que más recientemente se han hecho a esta barrera o cierre parcial del camino por los estatolitos, lo cierto es que este material tan sencillo que representa el rizoide de *Chara* ha aportado nuevos aspectos para una interpretación de los mecanismos que van desde la geopercepción a la respuesta gravitropica.

#### 29.1.2.4. Procesos gravitropicos en plantas superiores

Las plantas superiores muestran una dificultad adicional para el estudio del gravitropismo. A diferencia de *Chara*, en ella la curvatura no se debe a una célula, sino

que ocurre en un órgano pluricelular en el que se hallan separadas las células sensoras de las que experimentan la reacción gravitrópica. Es decir, esta estructura presupone un mecanismo adicional de flujo de la información, presumiblemente de tipo hormonal, entre la gravipercepción y la respuesta de crecimiento. Actualmente hay fuertes evidencias también en las plantas superiores en favor de la primitiva *teoría del estatolito* de Haberlandt. Bajo la acción de la gravedad en las células sensibles (estatocitos) los estatolitos actúan como sensores por desplazamiento o sedimentación. Ha merecido especial atención el estudio de los estatocitos de la cofia de las raíces. Se ha comprobado que en la raíz la susceptión de la gravedad reside en la cofia, en los estatocitos situados en el estaténquima o columela. Este tipo de estudios indica que los estatolitos de la cofia son *amiloplastos* (Fig. 29.12).

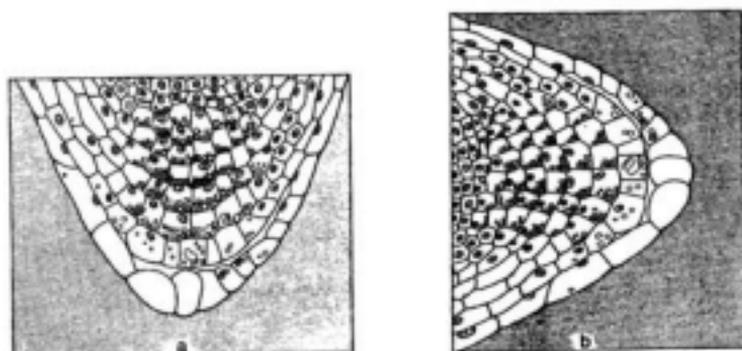


Figura 29.12.—Disposición de los estatocitos y amiloplastos (estatolitos) en la cofia de la raíz, en disposición vertical (a) y horizontal (b).

En la cofia de la raíz se pueden distinguir tres tejidos: el meristemo basal, el estaténquima central y el tejido periférico de secreción (Fig. 29.13). Los amiloplastos sedimentables se localizan únicamente en el estaténquima. La figura 29.14 muestra los rasgos distintivos observables al microscopio electrónico de la subestructura de un estatocito de la cofia de *Lepidium sativum*. Destaca la *polaridad* del estatocito y la presencia de un gran complejo del retículo endoplasmático rugoso (ergastoplasma). El núcleo se localiza en el polo proximal de la célula, mientras que los amiloplastos sedimentan sobre el complejo del retículo endoplasmático en el extremo distal. Las mitocondrias, dictiosomas y vacuolas se distribuyen al azar por el citoplasma pero no entre las cisternas del retículo endoplasmático.

En el caso de crecimiento normal *vertical* hay un equilibrio lábil, debido a la simetría radial, de la tensión de todo el complejo del retículo endoplasmático por los amiloplastos sedimentados. La desviación de la vertical causa un drástico desequilibrio en los estatocitos periféricos, principalmente en posición *horizontal*. Como consecuencia de ello, en el lado inferior el complejo del retículo endoplasmático se halla bajo presión de los amiloplastos, mientras que en el lado superior están distendidos. De

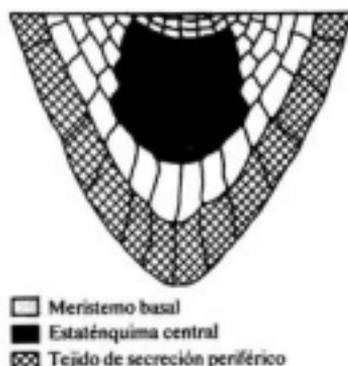


Figura 29.13.—Situación del meristemo basal, estaténquima central y tejido periférico de secreción en la cofia de la raíz de *Lepidium* (tomado de Sievers y Volkmann, en: *Plant Growth Regulation*, P. E. Pilet (edit.), Springer-Verlag, Berlín, 1977).

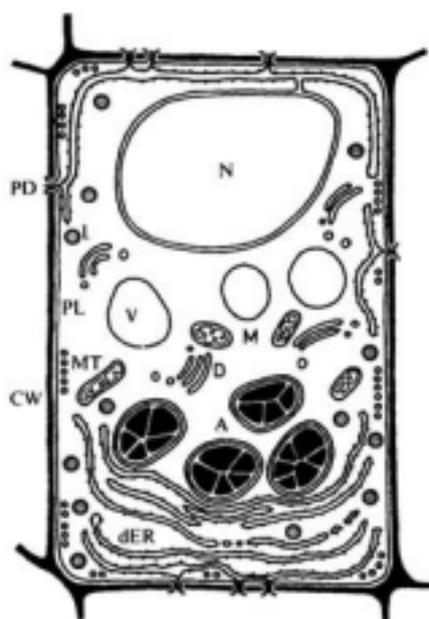


Figura 29.14.—Subestructura al microscopio de un estatocito de la cofia de raíz de *Lepidium sativum* (tomado de Sievers y Volkmann, en: *Plant Growth Regulation*, P. E. Pilet (edit.), Springer-Verlag, Berlín, 1977).

este modo se podría originar una señal diferencial (Fig. 29.15). Una serie de observaciones indican una estrecha relación funcional entre los amiloplastos y el complejo del retículo endoplasmático en la gravipercepción.

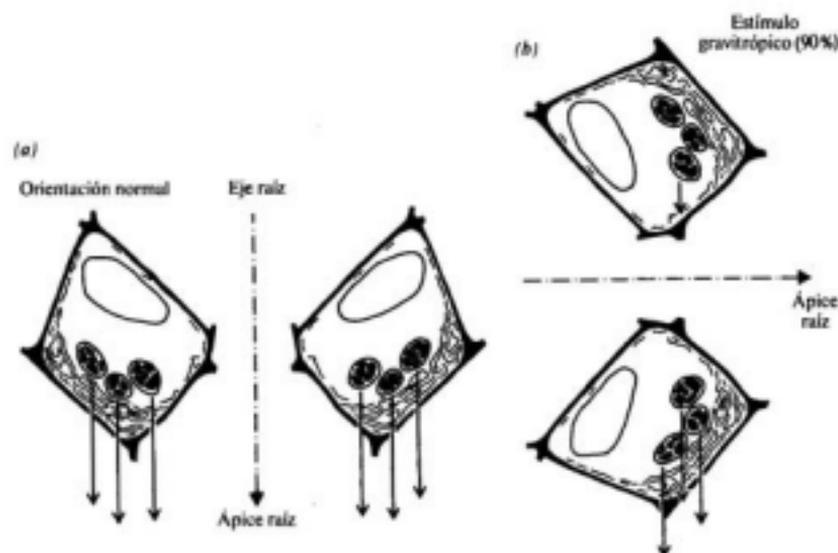


Figura 29.15.—Efectos de la tensión sobre el complejo del retículo endoplasmático por los amiloplastos sedimentados en una célula en posición normal y en otra en posición horizontal [tomado de Sievers y Volkmann, en: *Plant Growth Regulation*, P. E. Pilet (edít.), Springer-Verlag, Berlín, 1977].

#### 29.1.2.5. Mecanismo de la respuesta gravitrópica

La respuesta gravitrópica en el tallo y las raíces se basa en el control diferencial de la proporción de crecimiento en extensión en los lados opuestos del órgano. La transducción de la gravipercepción en reacción gravitrópica se logra, según la evidencia actual prioritaria, a través de un transporte hormonal que, en definitiva, causa una *distribución asimétrica* en la concentración hormonal responsable de la diferencia de crecimiento en la región de la respuesta gravitrópica. Se considera que esta distribución asimétrica se logra por un *transporte transversal*, de acuerdo con la teoría de Cholodny-Went. En este sentido, la auxina es la hormona que ha recibido más atención como responsable de este mecanismo. Las curvaturas gravitrópicas negativas que se producen en tallos o coleóptilos situados horizontalmente (Fig. 29.9) o la curvatura gravitrópica positiva en las raíces se debería, según esta teoría, a una mayor concentración de AIA en el flanco inferior sobre el superior del órgano que, para el caso del tallo y coleóptilo, determina la acción estimulante del crecimiento en extensión del lado inferior

sobre el superior (curvatura negativa), mientras que la mayor sensibilidad de la raíz al AIA explicaría el efecto inhibitorio de las altas concentraciones sobre la parte inferior respecto al lado superior (curvatura positiva). En distintas experiencias con segmentos de coleóptilo se han podido medir mayores concentraciones de AIA en el lado inferior que en el superior, en coleóptilos situados horizontalmente (distribución asimétrica), mientras que en posición vertical ocurre un transporte basal uniforme en ambas mitades. La aplicación asimétrica de AIA- $^{14}\text{C}$  confirmó estos hallazgos al ser determinada la radiactividad entre las dos mitades de dos segmentos de coleóptilo de *Zea* orientados vertical u horizontalmente.

No obstante, la teoría de Cholodny-Went para el gravitropismo ha sido cuestionada. Así se observó que al pasar coleóptilos de *Zea mays* de posición vertical a la horizontal ocurría un decrecimiento en la capacidad de transporte basipétalo de AIA en el lado superior del coleóptilo y un aumento en el lado inferior, por lo que se ha concluido que el efecto gravitropico primario era sobre el transporte y se ha sugerido que el movimiento lateral sería una consecuencia del efecto diferencial del transporte basipétalo.

Posteriormente investigaciones con secciones longitudinales aplanadas del cilindro de coleóptilo, colocadas horizontalmente con distintas posiciones que correspondían al lado superior, inferior o de perfil (Fig. 29.16), demostraron un estímulo del transporte longitudinal basipétalo de la parte inferior y una inhibición del mismo transporte en la parte superior. Este influjo sobre el transporte longitudinal debe ser independiente del transporte transversal tangencial, pues no se presenta en la porción superior y en la inferior. En las secciones de perfil se puede demostrar el transporte transversal tangencial sin ser influido el transporte longitudinal.

Para Wilkins la respuesta gravitropica del coleóptilo de *Zea* implicaría al menos

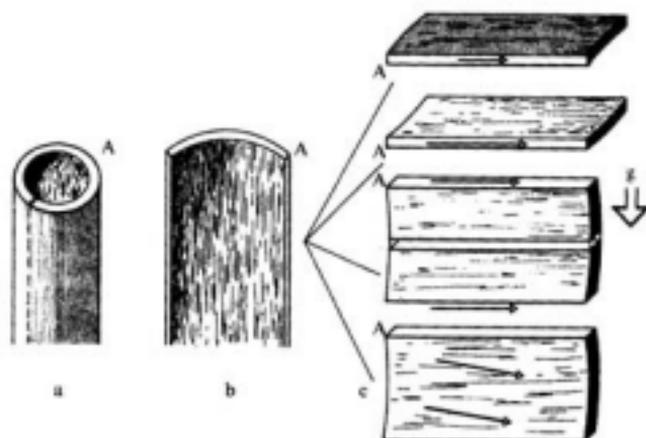


Figura 29.16.—Investigaciones de Caney y Wilkins (1969) con secciones longitudinales aplanadas del cilindro de coleóptilo, colocadas horizontalmente con distintas posiciones que corresponden al lado superior, inferior o de perfil (ver texto) (según W. Haupt, *Bewegungphysiologie der Pflanzen*, George Thieme Verlag, Stuttgart, 1977).

dos cambios en el transporte del AIA sintetizado apicalmente: la inducción, por el sistema sensor de la gravedad, de un transporte lateral de AIA a la parte inferior y el aumento del movimiento basipétalo de AIA en la parte inferior del órgano. Ambos cambios serían los responsables del aumento de AIA en la parte inferior de la zona de crecimiento del coleóptilo situado horizontalmente y del descenso de la parte superior. Esta diferencia de concentración de AIA provocaría el crecimiento diferencial (curvatura hacia arriba).

Resultados parecidos se han obtenido en experimentos con segmentos de hipocótilo etiolados de *Phaseolus vulgaris* y *Helianthus annuus* empleando AIA marcado radiactivo por  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ . No obstante, en segmentos verdes del primer entrenudo de *Helianthus annuus*, colocados horizontalmente no se pudo encontrar ni distribución asimétrica ni transporte lateral de AIA- $^{14}\text{C}$  o GA $_1$ - $^{14}\text{C}$ , en clara diferencia, pues, con los mismos hipocótilos etiolados.

Se disponen de evidencias en favor de un papel importante de la epidermis en la regulación del crecimiento en extensión en ambas mitades de un tallo estimulado gravitropicamente y del control hormonal de la extensión celular de la epidermis e incluso se ha sugerido que la gravedad pudiera actuar directamente sobre las células de la epidermis, aumentando su crecimiento cuando se hallan orientadas hacia abajo.

Aún mucho más desconocidas son las respuestas gravitropicas de las raíces. El material mejor estudiado han sido las raíces de plántulas de *Zea mays*. Los datos disponibles indican que en el flujo de información entre la cofia y la zona de crecimiento juega un papel importante una hormona inhibidora sintetizada en la cofia que es transportada basipétalmente a la zona de crecimiento. Con mucha probabilidad puede tratarse de ABA, aunque no se descartan otros inhibidores.

En resumen, la teoría de Cholodny-Went continúa siendo la explicación básica del gravitropismo, aunque quizá el AIA no sea el único intermediario responsable del mecanismo. Las giberelinas en el tallo y el ABA en las raíces pueden interaccionar potencialmente en el control de la reacción gravitropica. De esta forma, las respuestas antagónicas del tallo y raíz no sólo se deberían a la distinta sensibilidad frente a los niveles de AIA, sino también al transporte transversal de hormonas inhibidoras en la transducción gravitropica de las raíces. El plagiogravitropismo y el diagravitropismo, hoy por hoy, son aún más difíciles de explicar.

#### 29.1.2.6. Clinostatos

En el caso del fototropismo es fácil modificar la dirección del estímulo fototrópico. Por el contrario, la gravedad en la tierra tiene un valor fijo en el sentido de la vertical, lo que ha dificultado grandemente las posibilidades de variantes experimentales.

Por medio de *clinostatos* no se consigue eliminar, pero sí al menos compensar, la acción de la gravedad sobre las plantas. Los *clinostatos* consisten esencialmente en ruedas verticales que giran en un eje horizontal a pequeñas velocidades (una vuelta cada 10 minutos). En estas condiciones la planta se encuentra en un «campo de gravedad compensado», pues cada acción de la fuerza de la gravedad es compensada por otra exactamente igual en dirección contraria. A otras velocidades y posiciones se ob-

tienen distintos resultados que muestran la composición de fuerzas (gravedad y fuerza centrífuga). Los biosatélites ofrecen también condiciones para este tipo de estudios.

En ciertos casos se han utilizado las *morfactinas*, aprovechando su poder de inhibición del transporte longitudinal del IAA, para este tipo de estudios en sustitución de los clinostatos. No obstante, estos *clinostatos químicos* que representan las morfactinas no ofrecen mucha confianza debido a la falta de un conocimiento adecuado de los mecanismos de acción de las morfactinas en las plantas.

## 29.2. Nastias

En los tropismos la orientación del órgano viene establecida por la dirección unilateral del estímulo externo. En las nastias la orientación no viene impuesta por la dirección del estímulo externo, sino que reside en la propia asimetría estructural del órgano, actuando el medio externo únicamente como estímulo.

Según el factor externo estimulante se distinguen, principalmente, los siguientes tipos: *fotonastias*, *gravinastias*, *termonastias*, *quimionastias* y *tigmonastias* o *seismonastias*.

### 29.2.1. Movimientos de crecimiento

Las respuestas násticas pueden deberse tanto a *movimientos de crecimiento* como a *movimientos de variación*. Un caso típico de nastia por un movimiento de crecimiento autónomo son la epinastia y la hiponastia. En la *epinastia* se produce una curvatura hacia abajo por mayor crecimiento del lado adaxial o superior del órgano. En la *hiponastia* se llega a una curvatura hacia arriba por mayor crecimiento del lado abaxial o inferior del órgano.

En muchos casos, la posición natural de un órgano se logra por interacción de varios factores. Así, el plagiotropismo de las ramas laterales y de muchas hojas puede resultar de la composición de un gravitropismo negativo y un movimiento epinástico autónomo. Las experiencias con clinostatos permiten un análisis de muchas de estas interacciones. Si se sitúa horizontalmente una planta (por ejemplo, *Tropaeolum* o *Coleus*) en un clinostato en posición vertical y se neutraliza, por rotación a la velocidad adecuada, la acción de la gravedad, se incrementa notablemente la epinastia de los peciolo. Este tipo de experiencias demuestran que la posición del peciolo depende de la epinastia y del gravitropismo negativo que se opone a la anterior.

Los movimientos nictinásticos (variación de posición durante el día y la noche) de ciertas hojas se deben a una alternancia de crecimiento epinástico e hiponástico del peciolo. Este es el caso de las hojas de *Carica papaya*.

### 29.2.2. Movimientos de variación

Muchas respuestas násticas son movimientos de variación, debidos a cambios de turgor de algunas células especializadas que implican, normalmente, una extensión desigual reversible hasta el completo restablecimiento de la condición original.

Los movimientos de apertura y cierre de los estomas son un caso típico de *fotonastia*. La luz acciona localmente variaciones de la presión osmótica de las células oclusivas que determinan la apertura o cierre del estoma, independientemente de la dirección de la luz que sólo actúa como uno de los factores estimulantes (Cap. 5).

La mayoría de *movimientos nictinásticos* obedecen también a este mecanismo. Se conoce como plantas nictinásticas a aquellas cuyas hojas o folíolos se disponen verticalmente (cerradas) en la oscuridad y, normalmente, en disposición horizontal (abiertas) en la luz. Etimológicamente proviene del griego *nyktos* = noche y *nastós* = cierre. Se presentan movimientos nictinásticos en muchas hojas pinnadas, sobre todo en la familia de las leguminosas. Por la tarde, los folíolos se cierran y el conjunto de la hoja se abate; a la mañana siguiente se eleva de nuevo los peciolo y se abren o extienden las hojas. El estudio causal de los movimientos nictinásticos es muy complejo, pues opera, junto a un *ritmo endógeno*, la influencia de la iluminación del medio.

Las estructuras responsables de las variaciones osmóticas, en este tipo de movimientos, son unas células motoras basales situadas en los *pulvínulos*. Ya en 1938, De Groot comparó los valores osmóticos de la célula superior e inferior del pulvínulo de la base de la hoja de *Phaseolus multiflorus*, comprobando que el valor osmótico de la célula superior era mínimo y máximo el de la inferior cuando la hoja se hallaba en posición elevada. Por la noche se invertía esta relación osmótica.

Ultimamente han merecido especial atención el estudio de las hojas de *Mimosa pudica* (Fig. 29.17), *Albizia julibrissin*, *Samanea saman*, *Trifolium repens* y *Phaseolus multiflorus* que presentan movimientos de apertura y de cierre en respuesta a la luz y a la oscuridad (nictinastia). Estos movimientos están regulados por las condiciones osmóticas de las *células motoras* o *pulvínulos*. Cada hoja (Fig. 29.17) dispone de una articulación o pulvínulo primario, cada pinna de un pulvínulo secundario y cada pinnula de un

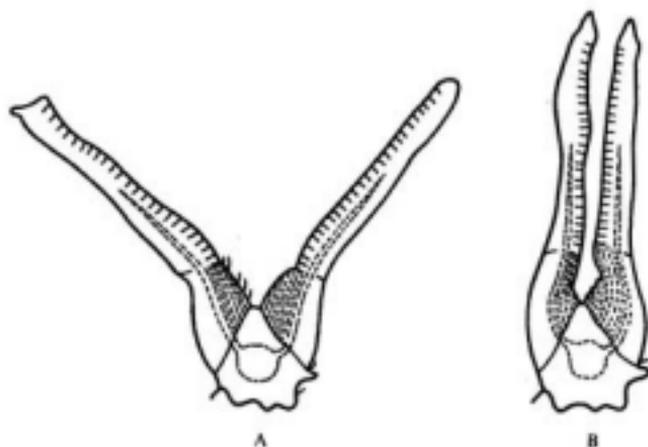


Figura 29.17.—Movimientos nictinásticos en las hojas de *Mimosa pudica* (según N. G. Ball, *Physiology of Plant Growth and Development*, McGraw-Hill, Londres, 1969).

pulvínulo terciario. Los movimientos de apertura durante el día separan el par de pinnulas (o pinnas) entre sí y de la raquilla (o raquis), mientras que los movimientos de cierre juntan las pinnulas (o pinnas) entre sí y la raquilla o raquis. El movimiento es el resultado, al menos parcialmente, de cambios en la permeabilidad de las membranas y en el transporte de  $K^+$  en las células motoras. Se ha comprobado que la luz azul es la efectiva en la apertura o posición de vigilia y que este movimiento nictinástico está bajo control del fitocromo (Cap. 30). Es muy probable un efecto del fitocromo sobre las membranas, dado que la fotorrespuesta mediada por el fitocromo ocurre en pocos minutos.

En *Mimosa pudica* y otras «plantas sensitivas» los pulvínulos foliares no sólo producen movimientos nictinásticos o fotonásticos, sino que también responden al estímulo por factores mecánicos (sacudida de las hojas, presión), estímulos eléctricos, térmicos, etc. Se conoce como *seismonastias* a estas respuestas násticas provocadas por estímulos mecánicos, reservándose, a veces, la denominación de *tigmonastias* cuando la respuesta se produce por un estímulo de contacto.

La observación de las fotonastias y seismonastias en las hojas de las leguminosas (*Mimosa pudica*, *Albizia julibrissin*, *Samanea saman*) ha demostrado que se trata de acciones rápidas que actúan a los pocos minutos del estímulo. La captación del estímulo lumínico o mecánico va seguida de una rápida transmisión, provocando una acción local sobre la permeabilidad de las membranas de las células motoras del pulvínulo, responsable de la variación osmótica entre las células superior e inferior, que determina la posición del peciolo y de los folíolos. Por acción del estímulo seismonástico pierde turgor la célula motora inferior mientras que lo mantiene la superior. Como consecuencia, se produce el descenso de posición del peciolo. En la fase de recuperación se regeneran las propiedades de permeabilidad y se restablecen las condiciones osmóticas, por entrada activa de iones, entran en turgor las células inferiores y el peciolo recupera su posición normal. En la propagación del estímulo al sitio de acción se han podido medir *potenciales de acción* (20-100 mV) aunque se han citado también intermediarios químicos de tipo hormonal (factor de Ricca) que viajarían por la corriente de transpiración.

#### 29.2.2.1. Bases biofísicas de la reacción seismonástica

En las células vegetales se han medido *potenciales de reposo* del orden de 50 a 200 mV (carga positiva en la membrana externa y negativa hacia el interior celular). En los movimientos seismonásticos el estímulo externo produce la despolarización de la membrana con cambio de tensión negativa en el protoplasma a los pocos segundos. A este cambio de tensión se le conoce como *potencial de acción*. Estos potenciales de acción se han podido observar en muchas células, incluso en las que no presentan reacciones de movimiento.

Se considera actualmente que estos potenciales de acción se deben sobre todo a los iones  $Cl^-$  y  $K^+$ . En la membrana intacta son bombeados al interior  $Cl^-$  y  $K^+$  que, por difusión, salen al exterior. En el equilibrio entre el proceso activo de entrada y la salida pasiva, se acumulan más iones  $Cl^-$  en el interior, por lo que el potencial de reposo es negativo.

Por daño de la membrana no actúa la bomba de iones y drásticamente se eleva la permeabilidad para los iones, con lo que se igualarían la concentración de iones y de cargas, fluyendo así hacia afuera los iones  $\text{Cl}^-$  y estableciéndose cargas netas positivas en el interior celular. La inmediata igualación de concentración de  $\text{K}^+$ , que sale de la célula permite recuperar de nuevo el potencial. Existe un *período refractario* en el cual el potencial de acción no se puede inducir o que requiere para ello estímulos mayores. Este período refractario corresponde al tiempo necesario para que se produzca el equilibrio dinámico de iones (fase de restitución).

Este tipo de estudios se han podido medir, sobre todo, en las células gigantes de los entrenudos de *Chara* o *Nitella*. Referido a las células motoras de los pulvínulos de *Mimosa* se considera que además ocurre una salida osmótica de agua, debido al descenso del potencial osmótico de la célula. Se ha comprobado que cada célula motora del pulvínulo obedece al principio del «todo o nada». De este modo, aunque en el vegetal no se encuentra diferenciado un «sistema nervioso» especializado en la captación y transmisión de las excitaciones, sí posee un mecanismo de base celular capaz de recoger y propagar estos estímulos.

Diversos investigadores han comprobado el paralelismo entre las células motoras de *Mimosa* y los sistemas contráctiles de los animales. Se ha sugerido que un sistema contráctil parecido a la actomiosina pudiera alterar la conformación de proteínas del tonoplasto de las células motoras al ser estimulada *Mimosa*, lo que provocaría el aumento de la permeabilidad de la membrana y, por tanto, la pérdida de  $\text{K}^+$  y otros componentes osmóticos. También se ha propuesto que la migración de  $\text{Ca}$  estimula un proceso contráctil en *Mimosa* que provocaría el incremento de la permeabilidad de la membrana, la liberación de  $\text{K}^+$ , pérdida de turgor y movimiento nástico de la hoja.

Además de esta importancia mayoritaria del  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , más recientemente, se considera que otros iones pueden contribuir a la regulación del turgor en los movimientos nictinásticos. Ha merecido una especial atención el hecho de que las migraciones de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  pueden ser accionadas pasivamente por el transporte activo de  $\text{H}^+$ , probablemente por cotransporte con sacarosa al interior de las células motoras durante ciertas fases del ciclo circadiano (véase 31.2.6).

### 29.3. Circumnutación

Se trata de movimientos revolutivos de exploración en el espacio, en los que predomina un fuerte componente endógeno o autónomo. La presentan sobre todo las *plantas trepadoras* o lianas, que requieren de soporte para su crecimiento adecuado. Normalmente, en las lianas se distingue entre las *plantas volubles*, como la planta parásita *cúscuta* y el lúpulo, cuyos tallos se enrollan alrededor de un soporte o tutor, y las *plantas con zarcillos*, en las que la fijación la logran por medio de órganos filiformes, constituidos por hojas o ramas modificadas, los *zarcillos*. Un ejemplo típico de ellas son las *Convolvuláceas*.

En las *plantas volubles* el extremo del tallo está dotado de un movimiento de exploración en hélice, de forma que describe una espiral algo desviada de la vertical de la gravedad (*circumnutación*) (Fig. 29.18). El movimiento se debe a la desigualdad de cre-



Figura 29.18.—Movimientos de circunmutación en plantas volubles (tomado de E. Strasburger, *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart).

cimiento en las sucesivas caras. El movimiento *abierto* de la circunmutación tiene un valor adaptativo al facilitar la localización de un soporte. Una vez alcanzado el soporte, la planta voluble se enrolla sobre él. Se considera que se trata de un *ritmo endógeno* (movimiento autónomo o espontáneo) con el que puede interaccionar, además, una reacción externa geotrópica, con distintas intensidades según las diferentes especies de plantas volubles. En efecto, a primera vista no se puede reconocer ningún factor externo que provoque su estímulo. Se supone que las células de la zona de crecimiento sufren oscilaciones de crecimiento rítmico-autónomo, pero no de forma sincrónica, sino metacrónica, con lo que esta coordinación crea una polaridad circular. Entre las posibles causas de estas oscilaciones de crecimiento se ha especulado sobre la posible existencia de una actividad rítmica oscilante de la AIA-oxidasa. En otros casos, se supone que las giberelinas pudieran actuar como efectores de la circunmutación. En todo caso, se requiere aún mucha investigación en este campo.

Los *zarcillos* son órganos especializados en la sujeción a un soporte o tutor en las plantas trepadoras no volubles (*plantas con zarcillos*). Los movimientos de exploración en las plantas con zarcillos son algo más complejos que en las plantas volubles. La figura 29.19 nos muestra el caso de *Bryonia dioica* (Cucurbitácea). Los zarcillos de *Bryonia* poseen una constitución dorsiventral. Inicialmente, los zarcillos más jóvenes se disponen enrollados pero, con el tiempo, se distienden y verifican en el extremo un típico movimiento de circunmutación, de componente autónomo, que describe una elipse. Cuando en su movimiento de exploración el zarcillo entra en contacto con un soporte o tutor, se produce un *movimiento haptotrópico* (o tigmotrópico) de crecimiento que determina la curvatura del zarcillo hacia la parte inferior rodeando así al tutor. Una vez sujeto el zarcillo se desarrolla un *crecimiento desigual* en la parte basal del zarcillo.

Al principio del capítulo hemos distinguido, con un criterio clásico, los movimientos «autónomos» e «inducidos». Los movimientos «autónomos» serían sólo regulados por factores endógenos de la planta, sin requerir de la acción de factores ex-

temos específicos. Por el contrario, los movimientos «inducidos» estarían provocados o controlados por factores externos. Actualmente no se consideran muy precisos estos límites, pues muchos de los movimientos conocidos como autónomos pueden verse influidos grandemente por factores externos. Así, en la epinastia y en la circumnatación pueden encontrarse junto a ejemplos de un modo típico sólo bajo control endógeno otros en los que intervienen factores externos. En definitiva, estas limitaciones son un reflejo más de los estrechos límites en que todavía se mueve esta área de conocimientos y de las dificultades de adscripción a un determinado mecanismo.

#### 29.4. Movimientos intracelulares

Se engloban en este apartado dos tipos distintos de movimientos, unos debidos propiamente al citoplasma, las *corrientes citoplasmáticas*, y otros que corresponden a mecanismos activos de desplazamiento de los orgánulos.

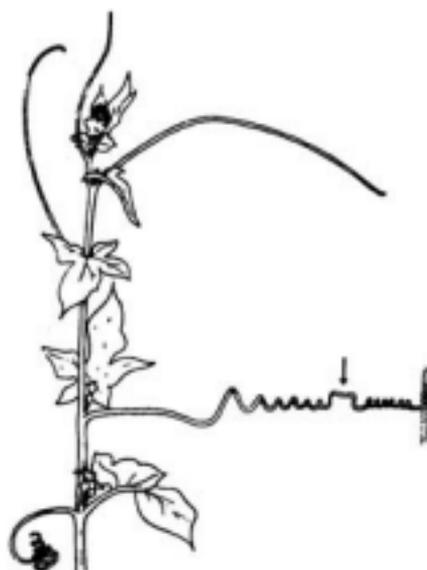


Figura 29.19.—Movimiento de exploración de los zarcillos de *Bryonia dioica*. Cuando el zarcillo contacta un soporte o tutor produce un movimiento haptotrópico que determina la curvatura del zarcillo y rodea así el tutor (tomado de E. Strasburger, *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart).

##### 29.4.1. Corrientes citoplasmáticas

En las células vegetales, observadas al microscopio, puede demostrarse fácilmente la existencia de *corrientes citoplasmáticas*. Generalmente se trata de corrientes de rota-

ción o *ciclosis*. Estos movimientos son especialmente visibles en algunas células grandes, como en las células de los entrenudos de *Nitella* y *Chara*, en las células del mesófilo de *Eloдея* y *Vallisneria* y en los plasmodios de Mixomicetos. En muchos casos, más que el movimiento propiamente dicho del plasma, se observa el desplazamiento pasivo de los orgánulos (cloroplastos, núcleo, mitocondrias, etc.).

En *Chara*, la corriente de rotación es autónoma y duradera durante toda la vida de la célula, aunque puede variar su velocidad por influjo de los factores externos. Por el contrario, en muchas plantas superiores (por ejemplo, *Vallisneria*) la influencia del medio es más amplia, desde el reposo a velocidades aceleradas.

Otras veces las corrientes citoplasmáticas manifiestan variantes respecto a la corriente de rotación. Así, en el pedicelo de *Acetabularia* y en la base del esporangio de *Phycomyces* muestran *corrientes por vías*, en las que las direcciones de la corriente no se distribuyen en las dos mitades de la célula, sino en muchas vías pequeñas. En las hifas de muchos hongos se presenta *corriente en manto*. En ésta, cada mitad celular presenta corrientes bidireccionales, aunque siempre la de posición más central es acropétala y la más externa basipétala. Otras veces se trata de *corrientes en surtidor*, fluyendo de la periferia hacia el centro (basipétala).

En las células vegetales cuyas vacuolas se hallan entrecruzadas de citoplasma, se presentan *corrientes de circulación*, mucho menos regulares que las de rotación. Este tipo de corrientes puede observarse en las células de pelos de *Cucurbita* y de los pelos filamentosos de *Tradescantia*. Un último tipo corresponde a las *corrientes de turbulencia*, por movimientos desordenados de agitación. Se presenta, por ejemplo, en células de Conjugadas.

Las células de los entrenudos de las *Charáceas* han sido las mejor estudiadas desde el punto de vista del mecanismo de estas corrientes citoplasmáticas. Hay firmes evidencias que hacen suponer que en la base de estos movimientos operan *microfilamentos* de naturaleza parecida a los de la célula animal (filamentos contráctiles de actomiosina). En este sentido hablan en favor las observaciones en microscopía electrónica y diversos datos bioquímicos (necesidad de ATP, influencia Ca-Mg, acción inhibitoria de la citocalasina, etc.).

#### 29.4.2. Movimientos de desplazamiento de los cloroplastos

En un medio lumínico isótropo los cloroplastos se distribuyen pasivamente por medio de las corrientes citoplasmáticas. No obstante, las células disponen de mecanismos de orientación activa de los cloroplastos frente a las variaciones de la dirección e intensidad lumínica. *Funaria hygrometrica* es un material clásico que puede ilustrar este concepto. A débiles intensidades de luz los cloroplastos se disponen en posición perpendicular a los rayos lumínicos (posición *diastrofa*). A intensidades mayores, adoptan una posición parietal de perfil (posición *parastrofa*). En la mayoría de casos, la luz azul es la responsable de estos movimientos de orientación específicos de los cloroplastos.

El estudio de estos movimientos ha sido objeto de especial atención en las algas, sobre todo en la Conjugadas. Nos ceñiremos a *Mougeotia*, por el evidente interés de los datos de que se dispone.

Las células cilíndricas de *Mougeotia* disponen de un único gran cloroplasto aplanado cuya posición es regulada por la luz. A baja intensidad de luz se sitúan en posición diastrofa, a alta intensidad se sitúan de perfil (parastrofa) (Fig. 29.20). El movimiento de los cloroplastos accionado por la luz es orientado por gradientes de concentración en el citoplasma, de forma que la luz, de una parte, actúa cibernéticamente como estimulante y regulador, y, de otra parte, como fuente de energía para el movimiento. Ambas acciones han podido ser claramente estudiadas en *Mougeotia*. A diferencia de muchas otras especies de plantas superiores, el fotorreceptor para el movimiento de los cloroplastos de *Mougeotia* no es inducido por la luz azul sino por la roja, obedeciendo al principio de reversión por pulsos alternativos de rojo cercano y rojo lejano. Se trata, pues, en este caso, del fitocromo (Cap. 30).

Para la inducción del movimiento de baja intensidad de luz es suficiente una corta iluminación con luz roja, responsable de la formación del fitocromo activo,  $P_{fr}$ . En este caso la energía necesaria es mínima en comparación con la energía para el movimiento que se obtiene del proceso respiratorio en la media hora siguiente.

Si, por el contrario, se deja actuar la luz roja durante todo el tiempo del movimiento, entonces la fotosfosforilación suministra la energía adicional para el movimiento. El efecto acelerador de la luz continua puede ser inhibido por DCMU y de nuevo acelerado el movimiento si se adiciona ATP. De este modo, el fotorreceptor para la acción aceleradora de la luz se hallaría en el propio cloroplasto (la clorofila), mientras que la acción cibernética de la luz sería absorbida en el plasma cortical (fitocromo). Respecto

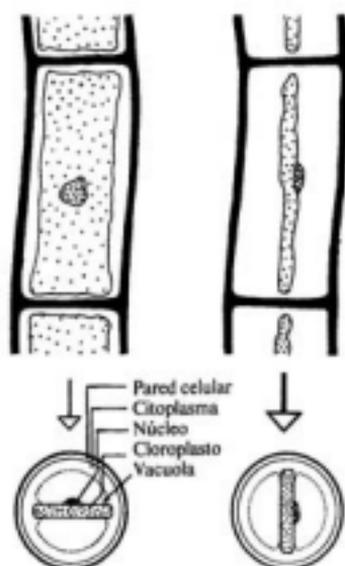


Figura 29.20.—Disposición diastrofa del cloroplasto de *Mougeotia* a baja intensidad de luz (izquierda) y posición parastrofa a alta intensidad de luz (derecha) (según W. Haupt, *Bewegungsphysiologie der Pflanzen*, George Thieme Verlag, Stuttgart, 1977).

a la cadena causal del movimiento del cloroplasto no se conoce con seguridad. Se supone que viene regida por el citoplasma a través de un sistema de *fibrillas contráctiles*, que ya hemos citado al considerar las corrientes citoplasmáticas.

En el capítulo 30 se consideran aspectos adicionales del movimiento de cloroplastos de *Mougeotia* con relación al sistema fitocromo y a su posible localización celular.

## 29.5. Tactismos

Se engloba en el concepto de *tactismo* o *taxias* a los movimientos libres de un organismo inducidos y orientados por un factor externo. Los tactismos tienen una presencia mucho más limitada que los movimientos de órganos de la planta y se reducen a organismos unicelulares o plantas inferiores. Por este motivo, no se tratan en esta obra.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- AUDUS, L. J.: *Geotropism*, en: *Physiology of Plant Growth and Development*, Edit. M. B. Wilkins, McGraw-Hill, Londres, 1969, págs. 205-242.
- BALL, N. G.: *Tropic, Nastic, and Tactic Responses*. *Plant Physiology. A Treatise* (Edit. F. C. Steward), vol. VA, Academic Press, Nueva York, 1969, págs. 119-228.
- BALL, N. G.: *Nastic Responses*, en: *Physiology of Plant Growth and Development*, Edit. M. B. Wilkins, McGraw-Hill, Londres, 1969, págs. 277-300.
- CURRY, G. M.: *Phototropism*, en: *Physiology of Plant Growth and Development*, Edit. M. B. Wilkins, McGraw-Hill, Londres, 1969, págs. 245-273.
- DARWIN, C.: *The Power of Movements in Plants*, Murray, Londres, 1880.
- DENNISON, D. S.: *Phototropism*, en: *Advanced Plant Physiology* (Edit. M. B. Wilkins), Pitman, Londres, 1984, págs. 149-162.
- FINDLAY, G. P.: *Nastic Movements*, en: *Advanced Plant Physiology* (Edit. M. B. Wilkins), Pitman, Londres, 1984, págs. 186-200.
- GRESSEL, J., y HORWITZ, B.: *Gravitropism and Phototropism*, en: *The Molecular Biology of Plant Development* (Edit. H. Smith y D. Grierson), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982, págs. 405-436.
- HAUPT, W.: *Bewegungsphysiologie der Pflanzen*, George Thieme Verlag, Stuttgart, 1977.
- HAUPT, W., y FEINLEIB, M. E.: *Physiology of Movements*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vol. 7, Springer-Verlag, Berlin, 1979.
- JUPITER, B. E.: *Geotropism*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 27, 1976, págs. 385-406.
- PHARIS, R. P., y REID, D. M. (eds.): *Hormonal Regulation of Development III*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vol. 11, Springer-Verlag, Berlin, 1985.
- PICKARD, B. G.: *Early Events in Geotropism of Seedling Shoots*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 55-75.
- REINHOLD, L.: *Phytohormones and the Orientation of Growth*, en: *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise*, vol. II, Edit. D. S. Letham, P. S. Goodwin y T. J. V. Higgins, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978, págs. 251-289.

- SATTER, R. L.: *Nyctinastic Leaf Movements: Hands of the Biological Clock*, «What's New in Plant Physiology», vol. 11, 1980, págs. 13-16.
- SATTER, R. L., y GALSTON, A. W.: *Mechanism of Control of Leaf Movements*, «Ann. Rev. Plant Physiol», 32, 1981, págs. 83-110.
- SCHMIDT, W.: *Physiological Blue-light Reception*, en: *Structure and Bonding*, vol. 41, págs. 1-44, edit. J. D. Dunitz y otros, Springer-Verlag, Berlin, 1980.
- TRONCHET, A.: *La sensibilité des plantes*, Masson et Cie, París, 1977.
- SANBERG, P. R.: «*Neural Capacity*» in *Mimosa: a Review*, «J. Behav. Biol.», vol. 17, 1976, págs. 435-452.
- WILKINS, M. B.: *Gravitropism*, en: *Advanced Plant Physiology* (Edit. M. B. Wilkins), Pitman, Londres, 1984, págs. 163-186.

## 30.1. Fotomorfogénesis

La importancia central de la luz en las plantas no se limita únicamente a la captación y transducción de energía por el proceso de la fotosíntesis (Caps. 11, 12 y 13). Por diversos mecanismos las plantas son también capaces de captar las «señales» luminicas del medio y responder biológicamente a estas variaciones luminicas del medio con cambios de valor adaptativo que abarcan las distintas fases del ciclo biológico (germinación, dormición, floración, etc.). Por estos mecanismos, las plantas son sensibles a las variaciones cualitativas, de intensidad y duración de la luz.

Según Mohr, la *fotomorfogénesis* es el control por la luz del desarrollo (crecimiento, diferenciación y morfogénesis) de las plantas por un proceso independiente de la fotosíntesis. En este sentido amplio, la fotomorfogénesis engloba el sistema fitocromo, el fotorreceptor para la luz azul y, además, el fototropismo y fotonastias. H. Smith, para obviar esta amplitud de fenómenos, ha dado una clasificación más formalista y detallada basada en el tipo de respuesta fisiológica frente a estímulos luminicos direccionales, no direccionales y periódicos o no (tabla 30.1). De acuerdo con este autor, en un senti-

TABLA 30.1  
Respuesta de las plantas a la luz



do más restrictivo, la fotomorfogénesis comprendería las respuestas de desarrollo no direccional frente a estímulos lumínicos no direccionales y no periódicos, por lo que excluiría de la fotomorfogénesis al fototropismo, fotonastias y fotoperiodismo. Independientemente de la validez de una u otra definición, en este capítulo trataremos fundamentalmente del *sistema fitocromo* y de las denominadas *reacciones de alta energía*. En el capítulo anterior ya se ha considerado el fototropismo y las fotonastias, mientras el fotoperiodismo se pospone al próximo capítulo, ya que su estudio presupone un conocimiento básico de las propiedades y funciones del fitocromo.

## 30.2. Fitocromo

### 30.2.1. Antecedentes históricos

Aunque ya se disponía de observaciones sobre efectos fotomorfogénicos que datan del siglo XIX (Cieslar, 1883), un paso decisivo en la línea de investigaciones que han conducido al descubrimiento del fitocromo fueron las experiencias de Flint y McAlister en 1935. Estos investigadores, al estudiar el influjo de diferentes longitudes de onda del espectro visible sobre la germinación de semillas de lechuga, comprobaron que la longitud de onda más eficiente para inducir la germinación era la luz roja de 670 nm y que, por el contrario, la zona del espectro más activa para inhibir esta germinación poseía su eficiencia máxima a 760 nm. Iguales efectos inhibitorios encontraron para la luz azul.

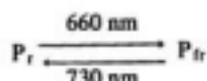
El descubrimiento en 1920 por Garner y Allard (Cap. 31) del control de la floración en algunas plantas por la duración relativa del día y de la noche (*fotoperiodismo*), estimuló el estudio de la influencia de los distintos componentes del espectro visible en este nuevo tipo de fotomorfogénesis floral. Los estudios iniciales más decisivos se han realizado por el equipo de Beltsville, encabezado por un fisiólogo vegetal, Borthwick, y por un especialista en problemas químico-físicos aplicados a la investigación biológica, Hendricks. En experiencias realizadas sobre la germinación de semillas sensibles a la luz (*Lactuca sativa*), el equipo de Beltsville comprobó, en 1952, el espectro de acción para este proceso, demostrando un máximo, para el estímulo de la germinación, a 660 nm y a 730 nm para la inhibición. El hecho más significativo de estas experiencias fue que la luz roja actuaba, según la longitud de onda escogida, de forma *antagónica* sobre un posible fotorreceptor, el cual regularía el proceso de la germinación. De esta forma se tuvieron evidencias fisiológicas en favor de la posible naturaleza monomolecular de una fotorreacción en la que se debía postular un único fotorreceptor que, según el tipo de radiación recibida, podría adoptar dos formas distintas y fotoconvertibles entre sí. Esta interpretación estaba de acuerdo con las experiencias realizadas con diferentes programas lumínicos de luz roja de distinta longitud de onda (Tabla 30.2) para la inducción o la inhibición de la germinación de las semillas de *Lactuca*. En la tabla 30.2 puede comprobarse el carácter fotorreversible y que el efecto final, de promoción o de inhibición de la germinación, depende de la última longitud de onda que se suministra. Se denomina *sistema fitocromo* a este fotorreceptor responsable de los efectos antagónicos de la luz roja

TABLA 30.2

Fotorreversión de la promoción (+) y de la inhibición (-) de la germinación en semillas de *Lactuca sativa*, var. Grand Rapis (R = rojo cercano) (RL = rojo lejano)

Irradiación	Respuesta de germinación
R	+
R-RL	-
R-RL-R	+
R-RL-R-RL	-
R-RL-R-RL-R	+
R-RL-R-RL-R-RL	-

sobre el crecimiento y el desarrollo de la planta. El análisis de los espectros de acción ya indicaba que el mecanismo de acción del fitocromo no se correspondía con el de la fotosíntesis, del que, más bien, era independiente. Para esta interpretación del fitocromo se admitieron dos formas de diferente sensibilidad para las longitudes de onda y, también, para sus acciones sobre la planta.



### 30.2.2. Propiedades del fitocromo

#### 30.2.2.1. Técnicas de estudio del fitocromo

La escasa concentración de fitocromo en las plantas, junto con la presencia de otros pigmentos (clorofilas, carotenoides, antocianos, etc.), hace sumamente difícil su correcta detección y valoración. Los problemas técnicos que este estudio presenta, fundamentalmente, son de dos tipos:

- Disponibilidad de sistemas perfeccionados para garantizar la pureza de cada una de las longitudes de onda a las que se someten las plantas objeto de investigación.
- Sistemas de detección, *in vitro* e *in vivo*, de la concentración de cada una de las dos formas (y de las formas intermedias postuladas) en que puede presentarse el fitocromo, según el tipo de irradiación previamente suministrada.

Para el primer aspecto se requiere un control extraordinariamente riguroso del programa lumínico. Los diseños para estas cámaras pueden ser muy diversos, desde la perfección de un complejo fitotrón, a la construcción de cámaras individuales climatizadas.

Como fuente luminica, para cada una de las longitudes de onda objeto de estudio, se ha mostrado muy útil el sistema constituido por un proyector de luz blanca a cuyo foco lumínico, antes de incidir sobre las plantas a ensayar, se le interpone un disco interferencial característico de la longitud de onda que se desee. El conjunto debe poseer un sistema de refrigeración para evitar el sobrecalentamiento de los filtros.

La primera detección *in vivo* del fitocromo fue conseguida por el equipo de Beltsville (Butler, 1959). Una primera dificultad para esta medición son las bajas concentraciones del pigmento en los tejidos de la planta, unido a su gran sensibilidad para pequeños cambios de absorbancia y al fondo ópticamente denso que representa el material vegetal. Por otra parte, estas experiencias se realizaron en un tejido (cotiledones o plántulas) en donde las clorofilas no presentaban una interferencia muy importante. El fundamento de la técnica se basa en la medición de la absorción por los tejidos de las irradiaciones de dos longitudes de onda de baja intensidad, suministradas alternativamente y en tiempos inferiores al segundo (espectrofotómetro de longitud de onda dual). Normalmente se escogen las longitudes de onda de 660 y 730 nm. Entonces se puede medir la diferencia en la densidad óptica, para las dos longitudes de onda escogidas, en la muestra objeto de estudio. Un punto a tener en cuenta es que el flujo lumínico debe ser poco intenso para evitar la fotoconversión del pigmento. Si el tejido recibe previamente a la medición un programa lumínico de luz roja de 660 nm, dará poca absorción para el foco lumínico de 660 nm respecto a la del de 730 nm. Si el programa lumínico previo es de 730 nm, ocurrirá el fenómeno contrario. El fitocromo total es proporcional a las diferencias de absorbancia  $\Delta A_{660-730}$  es decir, para las mediciones tras someter la muestra en un caso a rojo cercano y en otro a rojo lejano se tendrá

$$\Delta \Delta A = (\Delta A_{660-730})_{\text{rojo cercano}} - (\Delta A_{660-730})_{\text{rojo lejano}}$$

que en realidad corresponde al doble del fitocromo, pues al someter a rojo cercano se mide el descenso a 660 y el aumento a 730 nm.

En experimentos con plantas crecidas en la luz, la aplicación del herbicida Norflurazon (= SAN 9789) evita la presencia de las clorofilas y permite la medición espectrofotométrica del fitocromo sin la interferencia de aquéllas.

La aplicación de las técnicas inmunoquímicas para la purificación, detección y valoración del fitocromo ha abierto nuevas perspectivas de estudio. Estos métodos obvian las limitaciones antes citadas de las técnicas espectrofotométricas y tienen mayor sensibilidad (0-20 ng, frente a los 350 ng de las espectrofotométricas). Su principal inconveniente es que no distinguen entre las formas  $P_r$  y  $P_{fr}$ . En estos procedimientos pueden utilizarse anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. La ventaja de los anticuerpos monoclonales es que pueden obtenerse a partir de preparaciones de fitocromo parcialmente purificadas, mientras que para obtener antisuero policlonal mono-específico se requiere de fitocromo del 100 por 100 de pureza, cosa relativamente difícil de conseguir. Para la cuantificación inmunoquímica del fitocromo se han utilizado técnicas de inmunodifusión radial y de radioinmunoensayo (RIA). Desde 1983 se ha impuesto por su mayor sencillez y sensibilidad la cuantificación del fitocromo con anticuerpos monoclonales por el método ELISA («enzyme-linked immunosorbent assay»). Para mayor información se remite al lector a la bibliografía citada, especialmente la obra editada por H. Smith y M. G. Holmes (1984).

### 30.2.2.2. Aislamiento, purificación y estructura del fitocromo

En 1959, Butler consiguió aislar por primera vez el fitocromo en una forma activa fotoquímicamente. Desde esta primera purificación parcial del fitocromo ha resultado especialmente laborioso el perfeccionamiento de estas experiencias de purificación del fitocromo. En general, estos procesos de extracción y purificación son distintas variantes, dentro de las técnicas generales de la bioquímica de las proteínas, en las que se combinan procesos de filtración por geles de Sephadex, precipitación por sales de sulfato amónico, redisolución, nuevas filtraciones por Sephadex o pase por cromatografía en columna de dietilaminoetil celulosa (DEAE), etc. Más recientemente, para la purificación del fitocromo, se han aplicado métodos cromatográficos de inmovilización, y sobre todo de afinidad hidrófoba (Affi-Gel Blue).

Aunque no todos los laboratorios aportan resultados concordantes, en general, pueden citarse para el fitocromo, las siguientes características:

El fitocromo es un cromoproteido azul-verde constituido por una proteína y un grupo cromóforo. El grupo cromóforo del fitocromo posee una estructura tetrapirrólica en cadena abierta, muy semejante al grupo cromóforo de la ficocianobilina de las algas azules y rojas. Para la proteína, con los procedimientos convencionales de purificación, se obtuvo inicialmente un peso molecular de 60 kD; más tarde se vio que realmente eran productos de degradación de una unidad superior de unos 120 kD. A partir de 1982 por aplicación de la técnica de afinidad hidrófoba, antes citada, se ha podido comprobar que el fitocromo «nativo» homogéneo tiene un peso molecular monomérico de 124 kD.

La caracterización exacta del grupo cromóforo se ha mostrado muy difícil. Se han dado diversas interpretaciones sobre la estructura y mecanismo de la conversión, entre las que cabe destacar inicialmente la del grupo de Siegelman en 1968, y poco después las sucesivas aproximaciones del grupo de Rüdiger. Este grupo, en 1983, ha identificado la estructura del fitocromo por aplicación de técnicas de alta resolución de espectroscopia de resonancia magnética nuclear. En la figura 30.1 puede verse esta interpretación, con las dos formas del fitocromo  $P_r$  y  $P_b$ , y en la que la fotoconversión  $P_r \rightarrow P_b$ , según Rüdiger, se debe a una isomerización a forma cis-trans (Z, E) en el C 15 del grupo cromóforo, lo que podría explicar la diferente orientación dicróica de  $P_r$  y  $P_b$ , descrita en varias plantas (ver 30.2.3). Como vemos, este modelo interpreta el mecanismo de fotoconversión por una isomerización del grupo cromóforo y explica los resultados fisiológicos por los que una misma molécula de propiedades fotorreversibles (fotocromicidad) actúa produciendo un estímulo o una inhibición, según cual sea la longitud de onda suministrada, de algunos procesos de la planta. Más difícil es interpretar todavía el cambio conformacional estructural de la apoproteína.

### 30.2.2.3. Fotoconversión, formas intermedias y estado fotoestacionario del fitocromo

El análisis de la fotomorfogénesis, que hasta el momento hemos considerado, nos ha permitido relacionar las observaciones y resultados experimentales referentes a las

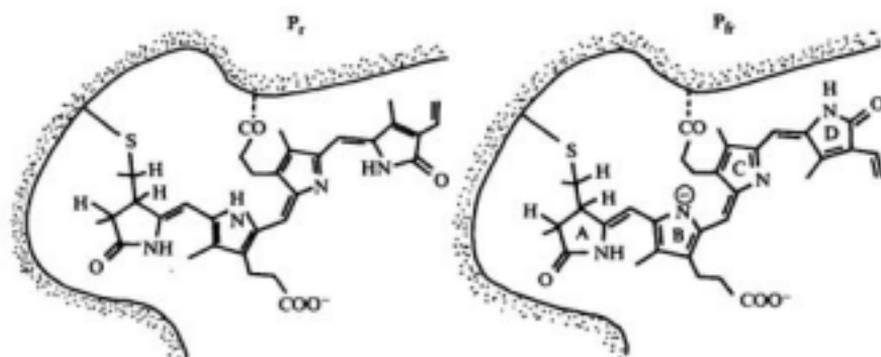
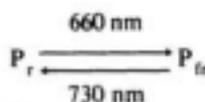


Figura 30.1.-Estructura de las formas  $P_r$  y  $P_{fr}$  del grupo cromóforo del fitocromo (Rüdiger, 1983) (tomado de B. Hock, «Progress in Botany», vol. 46, 1984, pág. 146).

acciones fisiológicas del fitocromo, a su estructura y al mecanismo de la fotoconversión. El paso lógico siguiente será la consideración más detallada del mecanismo de la fotoconversión de este pigmento, es decir, su estudio cinético y, como consecuencia, el estudio de las posibles formas intermedias y el de la proporción relativa entre las dos formas,  $P_r$  y  $P_{fr}$ , que, según el tipo de programa lumínico que la planta reciba, se establecerá en un momento dado.

Volvamos de nuevo al mecanismo básico de la fotoconversión del fitocromo:



en donde  $P_r$  es la forma inactiva y estable del fitocromo cuyo máximo de absorción se sitúa a 660 nm. Por irradiación con luz monocromática de 660 nm (rojo cercano)  $P_r$  se transforma en  $P_{fr}$ .  $P_{fr}$  representa la forma *activa* e inestable del fitocromo cuyo máximo de absorción corresponde a 730 nm. Por este motivo, si se suministra radiación monocromática roja de 730 nm (rojo lejano) esta radiación es absorbida por la forma activa del fitocromo,  $P_{fr}$ , que, como consecuencia, se transforma en  $P_r$  inactivo fisiológicamente (Fig. 30.2).

Los estudios cinéticos de esta fototransformación han permitido comprobar la presencia de productos intermedios de corta vida, en ambos sentidos de la fotoconversión. En este tipo de estudios se ha aplicado la espectrofotometría de destello y técnicas a bajas temperaturas. Los datos biofísicos parecen indicar que las fototransformaciones de  $P_r \rightarrow P_{fr}$  y a la inversa, son procesos de relajación que se inician con el producto excitado por la absorción de cuantos de luz ( $P_r$  o  $P_{fr}$ ) y acaban en  $P_{fr}$  o  $P_r$ , respectivamente.

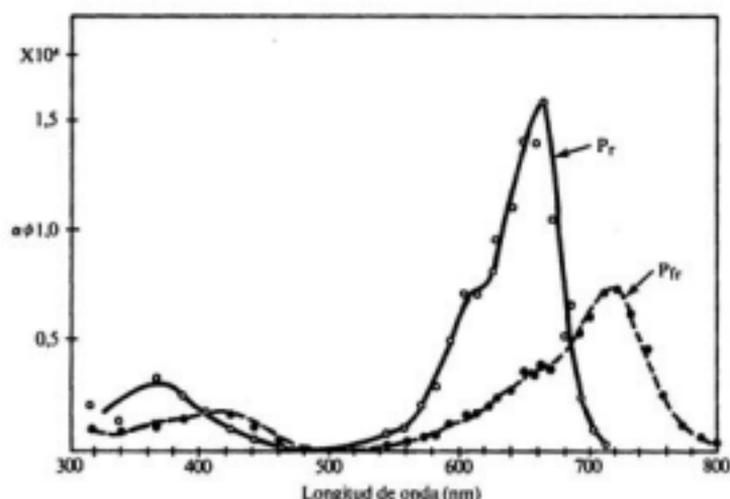


Figura 30.2.—Espectro de acción para las transformaciones fotoquímicas de  $P_r$  y  $P_{fr}$ . El coeficiente de extinción se expresa en litros  $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  y el rendimiento cuántico en moles  $\text{Einstein}^{-1}$  (tomado de H. W. Siegelman y W. L. Butler, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 16, 1965, págs. 383-392).

El empleo de bajas temperaturas ha permitido comprobar que la fotoconversión  $P_r \rightarrow P_{fr}$  engloba reacciones fotoquímicas iniciales (que se producen igualmente a bajas temperaturas) y reacciones oscuras. Se considera que en la fotoconversión inversa ( $P_{fr} \rightarrow P_r$ ) intervienen igualmente ambos tipos de reacciones. En la figura 30.3 puede observarse un esquema basado en este tipo de técnicas a las tem-

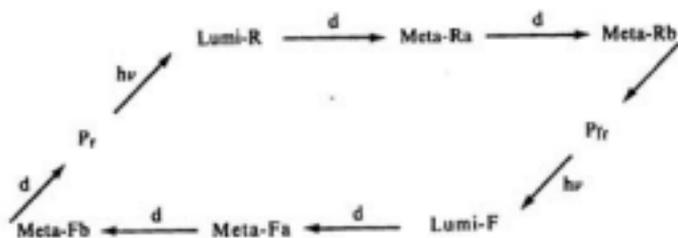


Figura 30.3.—Esquema propuesto por Kendrick y Spruit (1973) para los intermediarios en la fotoconversión del fitocromo.  $h\nu$  = reacción lumínica;  $d$  = reacción oscura. Los pigmentos derivados de  $P_r$  se indican por R y los originados de  $P_{fr}$  como F. Lumi-R, pico absorción a 698 nm; Lumi-F, absorbe a 720 nm; Meta-Rb y Meta-Fb son intermediarios de baja absorción (ver también tabla 30.4) (tomado de R. E. Kendrick y C. J. P. Spruit, «Plant Physiol.», vol. 52, 1973, pág. 327).

peraturas del N líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) con la nueva terminología propuesta por Spruit para los intermediarios de la fotoconversión del fitocromo. Esta nueva nomenclatura se basa en una adaptación de la usada para los intermediarios de la fototransformación de los pigmentos visuales.

Un estudio cuidadoso del espectro de absorción del fitocromo (Fig. 30.4) nos permite deducir que, a pesar de poseer máximos de absorción diferentes y bien

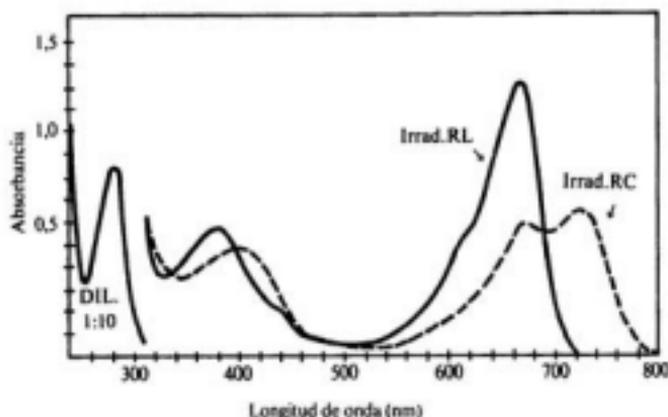


Figura 30.4.—Espectro de absorción de una solución de fitocromo, extraído de avena, después de irradiar con rojo cercano y con rojo lejano. Para las longitudes de onda menores de 300 nm el espectro se midió en una solución diluida 1/10 (tomado de H. W. Siegelman y W. L. Butler, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 16, 1965, págs. 383-392).

definidos, las dos formas del fitocromo absorben en un margen muy amplio del espectro. Por ello, resulta muy instructivo considerar el estado fotoestacionario que se produce para cada tipo de irradiación. El estado fotoestacionario viene definido por la relación

$$\frac{P_{fr}}{P_r + P_{fr}} = \frac{P_{fr}}{P_{total}}$$

Se trata de un índice que nos da la concentración de fitocromo activo ( $P_{fr}$ ) del fitocromo total de la célula o muestra, por lo que la respuesta fisiológica será función de esta relación.

En general, bastan cortas irradiaciones de unos minutos de rojo cercano de baja intensidad luminica para alcanzar valores fotoestacionarios del orden de  $P_{fr}/P_t = 0,8$  (= 80%). La irradiación de baja energía y corto tiempo (unos minutos) con luz roja lejana, suministra valores fotoestacionarios de un valor aproximado al 1 por 100, es decir,  $P_{fr}/P_t = 0,01$ . Estos valores indican una reversión casi total por la luz de 730 nm del fitocromo activo a la forma inactiva  $P_r$ .

## 30.2.2.4. Metabolismo del fitocromo

Si queremos obtener un modelo más real del metabolismo del sistema fitocromo, debemos aun considerar el siguiente hecho:  $P_r$  es estable en la oscuridad, mientras que la forma activa  $P_{fr}$  no lo es. Se conocen dos tipos diferentes de mecanismos, independientes de la luz, que determinan una caída en los niveles de  $P_{fr}$ . Puede ocurrir una *reversión oscura* de  $P_{fr}$  a  $P_r$ . Esta reversión oscura se ha podido estudiar bien en las dicotiledóneas e incluso en extractos purificados de fitocromo. Estos estudios indican que se trata de una reacción de primer orden dependiente de la temperatura. Por el contrario, mucho más dudosa es la existencia de una reacción oscura en las monocotiledóneas. Más recientemente, incluso dentro de las dicotiledóneas, se han obtenido resultados en los que no se ha podido observar reversión oscura.

La *reversión oscura inversa* ( $P_r \rightarrow P_{fr}$ ) sólo se ha podido observar en algunas semillas. Se ha sugerido que este mecanismo explicaría, quizá, que algunas semillas embebidas presenten  $P_{fr}$  en la oscuridad. Últimamente se ha postulado que las semillas deshidratadas tendrían un bajo metabolismo en las formas intermedias del fitocromo, que favorecerían la reversión oscura inversa.

Otra posibilidad que afecta al equilibrio de la forma  $P_{fr}$  por un mecanismo también independiente de la luz, es su *destrucción* por una reacción irreversible. Probablemente se trata de una destrucción enzimática, pues es afectada por la temperatura y por los inhibidores metabólicos. Se trata de un proceso no sólo mal conocido, sino incluso de nomenclatura confusa en las publicaciones de los diferentes equipos de investigación. En todo caso, esta destrucción comporta la pérdida de fitocromo fotorreversible después de la exposición a la luz.

En general, se considera que el mantenimiento de un nivel estable de fitocromo, dado el carácter inestable de  $P_{fr}$ , deberá ser el resultado de las proporciones de síntesis y las de destrucción (Fig. 30.5). Recientemente se ha comprobado una acción «negativa» de la luz sobre el nivel de mRNA traducible de la apoproteína del fitocromo, que explicaría los mayores niveles de fitocromo en planta etiolada frente a la crecida en la luz.

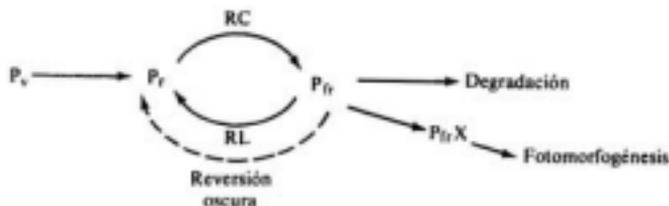


Figura 30.5.—Esquema global del metabolismo del fitocromo que incluye las fotoconversiones  $P_r \rightarrow P_{fr}$ , la reversión oscura  $P_{fr} \rightarrow P_r$ , la degradación de  $P_{fr}$ , las fotorrespuestas  $P_{fr}X$  y la neosíntesis de  $P_r$  a partir del precursor  $P_v$ . Mientras esta última reacción es de orden cero, el resto de transformaciones son de orden uno.

### 30.2.3. Localización intracelular del fitocromo

El sistema fitocromo se considera que es de presencia ubicua en el reino vegetal. Sólo es dudosa la existencia en los hongos, al menos con los datos disponibles de momento.

La presencia prácticamente general del fitocromo en las plantas y la observación de las múltiples acciones reguladas por este sistema, ha determinado un estudio intensivo para deducir su localización intracelular. Estos estudios adquieren significación inmediata si se considera su importancia en la interpretación del mecanismo de la acción primaria del fitocromo.

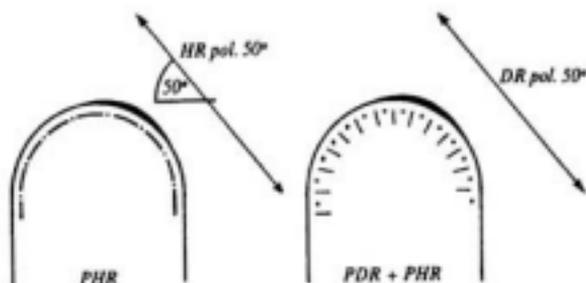


Figura 30.6.—Esquema de la supuesta orientación de la dirección principal de absorción de las moléculas de fitocromo en el ápice de cloronemas de helecho. A la izquierda, disposición para cloronemas adaptados a la oscuridad (forma  $P_7$ ). Por irradiación con rojo cercano polarizado se origina un gradiente de absorción y de distribución de la forma  $P_{7r}$ , que se representa por el grosor del borde negro. A la derecha, disposición para el ápice de cloronemas adaptados al rojo cercano. Las rayas indican la dirección principal de absorción de  $P_{7r}$  y los puntos la de  $P_7$  (tomado de H. Etzold, «Plantas», vol. 64, 1965, págs. 254-280).

La figura 30.6 muestra la interpretación de Etzold de los resultados obtenidos en experiencias con protonemas de helechos. Para poder deducir mejor la disposición molecular del fitocromo utilizó, en lugar de luz roja natural (vibración en todos los planos), luz roja polarizada (vibración en un plano). Estas experiencias de polarotropismo muestran que el crecimiento filamentosamente de los gametofitos, característico de la luz roja o en la oscuridad, siempre ocurre en un ángulo de  $90^\circ$  respecto al plano de vibración del vector eléctrico (Fig. 29.6). Cualquier cambio en la dirección de aplicación del plano de vibración de la luz roja polarizada produce rápidamente el cambio correspondiente en la dirección del crecimiento longitudinal del gametofito. El espectro de acción para la respuesta polarotrópica del gametofito indica que el fotorreceptor efectivo es el fitocromo. Además, hay que tener en cuenta la participación de un segundo fotorreceptor, que absorbe fundamentalmente en la zona azul, el cual es el responsable del crecimiento isodiamétrico del protalo en luz blanca o azul. Otro dato que se debe tener presente para la interpretación de esta experiencia, es la localización apical del crecimiento del gametofito.

Las experiencias de Haupt (Fig. 30.7) con el alga verde filamentosamente *Mougeotia* hablan también en favor de una localización axial del fitocromo, posiblemente en las membranas del plasmalema. Estas experiencias se refieren a la orientación por la luz del

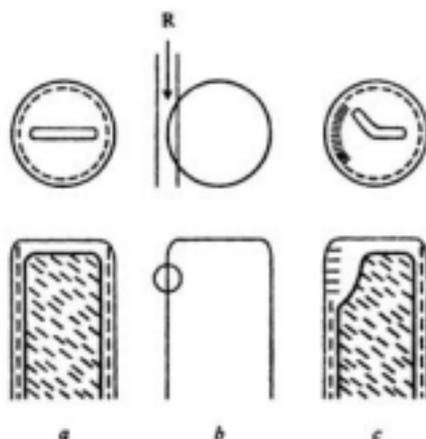


Figura 30.7.—Cambios en la orientación del fitocromo y disposición del cloroplasto de *Moenchia* en las fotoconversiones por luz roja polarizada. Esquema parcial de una célula de *Moenchia* en sección transversal (arriba) y en corte longitudinal (abajo). *a*, *b* y *c* disposiciones para antes, durante o después, respectivamente, de la irradiación con microfoco. En *b* se indica la disposición de la irradiación. *a* y *c* muestran la disposición del cloroplasto y la orientación dicroica de las moléculas de fitocromo (tomado de W. Haupt, G. Mörstel e I. Winkel-Kemper, «Planta», vol. 88, 1969, págs. 183-186).

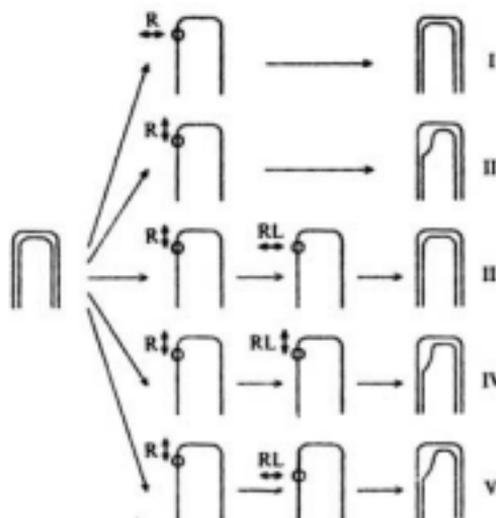


Figura 30.8.—Representación como en la figura 30.7, pero se omite la disposición de las moléculas del fitocromo. La doble flecha indica los vectores eléctricos del rojo cercano polarizado (R) y del rojo lejano polarizado (RL), respectivamente. Obsérvese cómo sólo la luz R polarizada paralelamente al eje de la célula es absorbida por  $P_1$  y causa la fotoconversión  $P_1 \rightarrow P_2$ . La fotoconversión inversa requiere luz RL polarizada perpendicularmente al eje de la célula, de donde se deduce la disposición dicroica de las formas  $P_1$  y  $P_2$  (tomado de W. Haupt, G. Mörstel e I. Winkel-Kemper, «Planta», vol. 88, 1969, págs. 183-186).

único cloroplasto aplanado que contiene cada célula de *Mougeotia* (ver sección 29.5.2). Se ha comprobado que la posición diastrofa (posición frontal del cloroplasto) viene regulada por el sistema fitocromo. La aplicación combinada de microhaces de luces polarizadas de rojo cercano y de rojo lejano (Fig. 30.8) permite deducir una disposición dicroica, en planos perpendiculares entre sí, de las dos formas del fitocromo. Por otra parte, esta técnica permite obtener respuestas parciales en el movimiento del cloroplasto de *Mougeotia*. Las conclusiones más importantes que se deducen de estos estudios son:

- a) La luz roja sólo es efectiva para la inducción de respuesta si su vector eléctrico está orientado paralelamente a la superficie celular. De aquí que  $P_r$  sea dicroico con sus dobles enlaces paralelos a la superficie.
- b) La inducción es revertida efectivamente por el rojo lejano si el vector eléctrico está orientado perpendicularmente a la superficie. De aquí que  $P_{fr}$  sea también dicroico, pero con sus dobles enlaces situados perpendicularmente a la superficie.

De este modo, Haupt concluye que las moléculas de fitocromo se hallan dispuestas en una orientación que sólo es posible si se hallan fuertemente asociadas a una estructura celular muy estable. El plasmalema sería, razonablemente, esta estructura. Asimismo, los cambios en el dicroísmo durante la fotoconversión, a juicio de Haupt, demuestran que el sistema fotorreceptor-membrana permanece altamente ordenado, incluso después de haber ocurrido cambios en la orientación del fotorreceptor.

Mucho más difícil es el estudio de la localización del fitocromo en las plantas superiores. La mayor complejidad estructural dificulta enormemente el tipo de experiencias que hemos reseñado para el caso de los gametofitos de helecho y para las algas. Marmé ha aportado evidencias en favor de la presencia del fitocromo unido a membranas en estudios con coleóptilo de maíz, por aplicación de luz polarizada de rojo cercano y de rojo lejano, en sentido paralelo o perpendicular al eje del coleóptilo. Los resultados de la fotoconversión de  $P_r$  a  $P_{fr}$ , en ambos sentidos, aportan evidencias en favor del dicroísmo del fitocromo en el plasmalema. Más recientemente, a nivel de las estructuras membranosas subcelulares, se ha comprobado que las fracciones celulares a las que están unidas las moléculas de fitocromo probablemente sean vesículas originadas a partir de membranas citoplasmáticas. Otras aportaciones señalan la asociación del fitocromo con el retículo endoplásmico, las mitocondrias e incluso con etioplastos. Mediante ensayos de localización inmunocitoquímica se ha detectado el fitocromo  $P_r$  en el citoplasma, en plántulas crecidas en la oscuridad, mientras que, después de irradiar con rojo cercano la detección subcelular de  $P_{fr}$  se localiza en estructuras membranosas. La gran sensibilidad del método inmunocitoquímico (potencialmente mil veces superior a la detección espectrofotométrica) ha abierto nuevas posibilidades en este campo de investigación.

### 30.2.4. Reacciones de alta energía

#### 30.2.4.1. Respuestas a la luz roja

Desde las primeras experiencias que condujeron a postular la existencia del fitocromo, en seguida se hizo evidente que bastaban irradiaciones de baja intensidad y en tiem-

pos cortos para que se produjeran las respuestas fisiológicas. A estas bajas intensidades se cumplía la ley de la reciprocidad, por la que

$$I \times t = \text{cte}$$

donde,  $I$  es la intensidad de luz y  $t$  es el tiempo.

La aplicación de irradiaciones durante tiempos mayores reveló otro tipo de cinética para las fotorrespuestas, junto a variaciones de las respuestas fisiológicas y, lógicamente, cambios en el espectro de acción. En un principio, estos datos hablaban en favor de un nuevo fotorreceptor, independiente del fitocromo, el cual sería el responsable de estos fenómenos, a los que se les conoció como «reacciones de alta energía» (*High Energie Reaction* = HER). Posteriormente se les ha denominado «reacciones de alta irradiancia» (*High Irradiance Reactions* = HIR).

La figura 30.9 muestra el espectro de acción para el control de la inhibición, por la luz roja lejana continua, del alargamiento del hipocótilo en plántulas de lechuga. De su observación se desprende que, por encima de 500 nm, su acción se presenta sólo para la luz del rojo lejano continuo, con un máximo a 720 nm. Se ha propuesto al fitocromo como fotorreceptor para estas reacciones de alta irradiancia.

Si se comparan los espectros de acción para irradiaciones con rojo lejano de corto tiempo (Fig. 30.2) y de largo tiempo (Fig. 30.9), los resultados son muy diferentes. El hecho de que las dos formas del fitocromo,  $P_r$  y  $P_{fr}$ , en parte solapan sus espectros de absorción en la zona del rojo (Fig. 30.4), hizo pensar en la posibilidad de que esta radiación roja lejana de 720 nm, lógicamente absorbida en gran parte por  $P_{fr}$ ,  $\xrightarrow{720 \text{ nm}}$   $P_r$ , pudiera también, en parte, ser absorbida por  $P_r$ ,  $\xrightarrow{720 \text{ nm}}$   $P_{fr}$ . Hartmann ha desarrollado experiencias con dos longitudes de onda, que son absor-

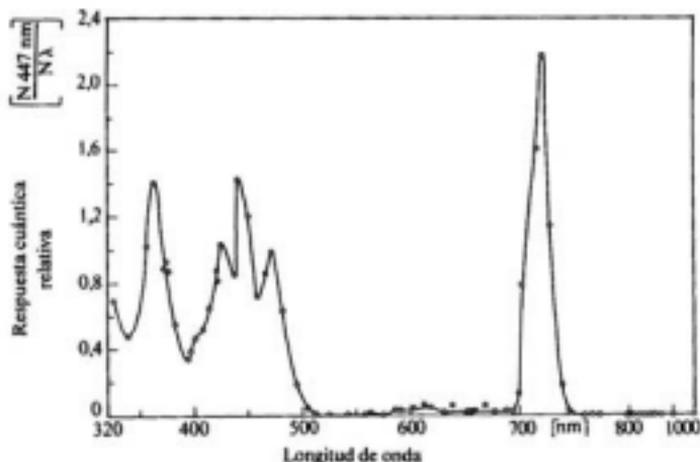


Figura 30.9.—Espectro de acción para el control de la inhibición del hipocótilo, en plántulas de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids, por la luz continua (irradiación de largo tiempo) (tomado de K. M. Hartmann, «Zeitung Naturforsch», vol. 22, 1967, págs. 1172-1175).

bidas por cada una de las dos formas del fitocromo, y calculado los estados fotoestacionarios. De acuerdo con estos estudios, la luz del rojo lejano continuo de 720 nm (muchas veces denominado rojo lejano estándar) causaría un nivel bajo, pero suficiente y estable, de fitocromo activo, del orden de  $P_{fr}/P_t = 0,03-0,06$  (3-6%).

Si volvemos a considerar de nuevo el metabolismo global del fitocromo, podemos observar cómo las reacciones oscuras de reversión de  $P_{fr} \rightarrow P_t$  y las de destrucción de  $P_{fr}$ , son reacciones de orden uno. La irradiación de corto tiempo con luz roja cercana determinará un elevado estado fotoestacionario, del orden de  $P_{fr}/P_t = 0,8$ . Esta alta proporción de fitocromo activo es muy inestable a estas elevadas concentraciones, como se deduce del estudio del metabolismo del fitocromo y de la consideración de sus constantes de velocidad. Por el contrario, la irradiación continua con rojo lejano de 720 nm («rojo lejano estándar») determina valores bajos, pero activos fisiológicamente y más estacionarios cinéticamente, del orden del 3-6%. Este hallazgo es el que ha permitido realizar las experiencias relativas al sistema fitocromo en condiciones «estacionarias», con la ventaja adicional de no interferir con las clorofilas. Estas condiciones son sumamente útiles cuando el estudio se lleva a nivel bioquímico, como veremos más adelante al considerar la regulación por el fitocromo de la cinética de los enzimas o de la actividad genética. En todo caso, para demostrar que la respuesta fisiológica es atribuible al fitocromo, siempre deberán realizarse experiencias de comprobación de la reversión por suministros de programas luminicos, en dosis bajas y cortas, de rojo cercano y rojo lejano aplicados alternadamente (experiencias de inducción-reversión).

Otro hecho observado es que la dependencia característica de la irradiancia del HIR puede ser también atribuida al sistema fitocromo. Así lo prueban los resultados referentes al estudio del alargamiento del hipocótilo en plántulas de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids. En estas experiencias se usaron irradiaciones con varias longitudes de onda, simultáneamente, y con 716 nm como única irradiación. También se utilizaron diferentes flujos de densidad cuántica. De este modo, las reacciones de alta irradiancia están condicionadas por el *fotoequilibrio* y por la *densidad de flujo*. Una vez se ha establecido un cierto fotoequilibrio, la absorción total de cuantos determina la extensión de HIR en el fitocromo. A diferencia de las reacciones de baja energía, el HIR no sigue la ley de la reciprocidad.

El equipo de Freiburg distingue entre  $P_{fr}$  (estado fundamental) y  $P_{fr}^*$  (estado excitado). La concentración del hipotético  $P_{fr}^*$  sería función de la absorción total de cuantos en el sistema fitocromo. La interpretación física de este  $P_{fr}^*$  es aún sólo de tipo especulativo, pues  $P_{fr}^*$  todavía no se ha podido medir por procedimientos físicos.

También se han avanzado hipótesis por las que el fotorreceptor para estas reacciones de alta energía serían los intermediarios entre  $P_t$  y  $P_{fr}$  e incluso se ha propuesto una interacción del HIR con la fotosíntesis.

Más recientemente Hartmann ha replanteado su teoría inicial en el sentido de atribuir los efectos del HIR al incremento en las proporciones de interconversión  $P_{fr} \leftrightarrow P_t$  conocida como ciclaje de pigmentos. Schäfer ha desarrollado un modelo (30.2.6.3) en el que se interpretan las reacciones de inducción-reversión y las debidas al HIR (Fig. 30.15).

### 30.2.4.2. Respuestas a la luz azul

Las experiencias con luz azul presentan resultados más contradictorios y difíciles de atribuir a un determinado fotorreceptor.

La observación de los espectros de acción para el HIR en el alargamiento del hipocótilo de plántulas de *Lactuca* (Fig. 30.9) indica, más bien, para la luz azul, la presencia de un fotorreceptor distinto del fitocromo. Las características del espectro han hecho pensar en la posibilidad de un fotorreceptor del tipo de las flavoproteínas (criptocromo) o de los carotenoides. Como criterio operacional para el criptocromo (fotorreceptor azul/UV) se consideran los espectros de acción con máximos en el UV cercano (370 nm) y tres picos entre 400 y 500 nm y la *no* reversión del efecto inductivo por luces de mayor longitud de onda. No obstante, se han descrito muchas interacciones de la luz azul con el sistema fitocromo, bien sea directamente sobre el propio fitocromo, o por un mecanismo más indirecto. Estos estudios son extraordinariamente difíciles si se considera la multiplicidad de fotorreceptores naturales que posee la planta, los cuales absorben en máximos que caen dentro de esta zona de longitudes de onda de la luz azul (fotosíntesis, fototropismo, fototaxis, fitocromo, etc.).

Un ejemplo de estas interacciones se encuentra en el mecanismo de cierre-apertura de los folíolos de *Mimosa pudica*, *Albizia julibrissin* y *Samanea saman*. Para el cierre de los folíolos es efectivo el sistema fitocromo. En cambio, una vez cerrados los folíolos, la apertura únicamente es inducida por la luz azul.

### 30.2.5. Fotorrespuestas reguladas por el fitocromo

El sistema fitocromo controla muchos procesos del desarrollo de las plantas (*multiplicidad* de acción). Estos procesos abarcan desde la formación de la planta (germinación de semillas o esporas) hasta la fase de senescencia y muerte.

Para fines didácticos vamos a distinguir, de acuerdo con Mohr, dos tipos distintos de respuestas morfogénicas a la luz por parte de las plantas:

- a) Las fotomorfosis *positivas* se caracterizan por el inicio o el incremento en los procesos biosintéticos o de crecimiento. Entrarían en este grupo, a modo de ejemplo, el estímulo por la luz de la germinación de las semillas y esporas, la inducción floral por el fitocromo en las plantas de día largo (Cap. 31), la síntesis de antocianos y de flavonoides en plántulas inducidas por el fitocromo, etc.
- b) En las fotomorfosis *negativas* ocurre una inhibición en los procesos de crecimiento o en cualquier otro proceso fisiológico. Son ejemplos de este tipo de fotorrespuestas el control por la luz de la inhibición del alargamiento del tallo, el menor desarrollo de las hojas en plantas etioladas, el descenso del transporte de sustancias desde los cotiledones al hipocótilo observado en plántulas de mostaza por efecto del fitocromo activo, etc.

En la tabla 30.3 se indican algunas de las acciones fisiológicas reguladas por el sistema fitocromo. De la observación de la tabla puede deducirse la amplitud de procesos controlados por este fotorreceptor. Obsérvese también el valor electivo de la luz en la dirección y en el ritmo del ciclo vegetativo de las plantas (germinación, desarrollo vege-

TABLA 30.3

Algunas de las acciones fisiológicas (fotorrespuestas o fotomorfosis) reguladas por el sistema fitocromo (\*)

Fotorrespuesta	Especie
Germinación de semillas	<i>Lactuca sativa</i>
Germinación de esporas	<i>Dryopteris filix-mas</i>
Control alargamiento tallo	<i>Sinningia speciosa</i>
	<i>Sinapis alba</i>
	<i>Phacelia tanacetifolia</i>
Crecimiento de cotiledones	<i>Sinapis alba</i>
Crecimiento de frondes	<i>Lemna minor</i>
Inhibición de la rizogénesis	<i>Pisum sativum</i>
Regeneración de raíces adventicias	<i>Sinapis alba</i>
Crecimiento de protonemas	<i>Dryopteris filix-mas</i>
Crecimiento de tallos	<i>Marchantia polymorpha</i>
Control del fotoperiodismo	<i>Xanthium pennsylvanicum</i>
	<i>Pharbitis nil</i>
Interacciones con ritmos endógenos	<i>Chenopodium amaranticolor</i>
	<i>Chenopodium rubrum</i>
Interacciones con fitohormonas	<i>Lupinus albus</i>
Influjo en resp. geotrópicas	Coleóptilo de <i>Avena</i>
	<i>Convolvulus arvensis</i>
Modif. sensibilidad fototrópica	Coleóptilo <i>Avena</i>
Movimientos fotonásticos	<i>Mimosa pudica</i>
	<i>Albizia julibrissin</i>
Movimiento de cloroplastos	<i>Mougeotia</i>
Desarrollo de cloroplastos	<i>Sinapis alba</i>
Desarrollo de peroxisomas	<i>Sinapis alba</i>
Síntesis de flavonoides	<i>Malus communis</i>
	<i>Sinapis alba</i>
Control de síntesis clorofílicas	<i>Sinapis alba</i>
	<i>Citrullus vulgaris</i>
<i>Control de enzimas (**)</i>	
Gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Fenilalanina amonio-liasa	<i>Sinapis alba</i>
Ribulosa-1,5-diP-carboxilasa	<i>Secale cereale</i>
Lipoxigenasa	<i>Cucurbita moscata</i>
Adenilato quinasa	<i>Zea mays</i>
Enzima málico	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i>
Amilasa	<i>Sinapis alba</i>
Peroxidasa	<i>Sinapis alba</i>
Ribonucleasa	<i>Lupinus albus</i>
Glutación reductasa	<i>Sinapis alba</i>
Nitrato reductasa	<i>Citrullus vulgaris</i>
Glutamato deshidrogenasa	<i>Citrullus vulgaris</i>

(\*) Para las fuentes bibliográficas detalladas véase: Barceló Coll, J. (1979).

(\*\*) Para más amplia información véase Schopfer, P. (1977).

TABLA 30.4

Equivalencias en la terminología clásica y moderna de los intermediarios en la fotoconversión del fitocromo (tomado de R. E. Kendrick y C. J. P. Spruit, en: *Light and Plant Development*, Butterworths, Londres)

Forma del pigmento	Terminología antigua	Terminología actual
Estable	$P_r$	$P_r$
Fotoproductos primarios	$P_{fr}$ $P_{om}$ $P_{os}$	$P_{fr}$ lumi-R lumi-F
Productos de relajación oscura	$P_{700}$ , Pbl $P_{os}$ - $P_x$	meta-Ra, meta-Rb meta-Fa, meta-Fb

tativo, inducción floral, etc.). Véase también la regulación enzimática, a nivel molecular, mediada por el sistema fitocromo. Todos estos datos nos serán de utilidad inmediata en la próxima sección al comentar, de forma unitaria, los mecanismos de acción propuestos para el fitocromo.

### 30.2.6. Mecanismo de acción del fitocromo

Un punto clave en estos estudios del fitocromo se centra en las investigaciones del mecanismo de acción de  $P_b$ . Las preguntas inmediatas son: ¿Cuál es la acción primaria de  $P_b$ ? ¿Existe un mecanismo general de regulación de la morfogénesis por  $P_b$ ? ¿Cómo se explica la multiplicidad de acciones que puede provocar  $P_b$ ? ¿Al ser  $P_b$  la única forma activa, cómo se explica que pueda provocar a la vez fortrespuestas positivas y negativas? ¿Qué relaciones se establecen entre el fitocromo y el resto de mecanismos de control que regulan el desarrollo de las plantas? ¿Cómo se explica que el fitocromo provoque respuestas fisiológicas rápidas (tipo I), esencialmente transductoras de energía, y respuestas lentas (tipo II), reguladoras del desarrollo de la planta?

Estas y otras cuestiones que aún podrían plantearse, han sido el objeto de diversas interpretaciones. Por el momento, a pesar de treinta años de activa investigación, no puede llegarse a una visión unitaria y, mucho menos, de tipo general y definitivo. Estas interpretaciones han ido unidas lógicamente a la evolución de las técnicas en el campo de la biología molecular a nivel genético y de las membranas.

#### 30.2.6.1. Regulación diferencial de la expresión génica

Esta interpretación se debe fundamentalmente al grupo de Mohr (Freiburg, Alemania) quienes, durante un período de más de veinte años, vienen trabajando en favor de la hipótesis de una acción diferencial del fitocromo sobre la expresión génica.

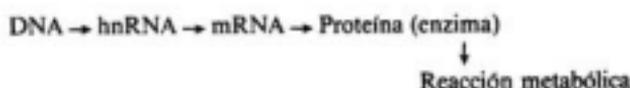
En la base de esta interpretación está el reconocimiento de la totipotencia de las células que componen a la planta (Cap. 27). El desarrollo de una planta procede de

una primera célula, normalmente cigoto o espora, la cual dispone del patrimonio genético total requerido para la nueva planta. Por división celular (mitosis) tendrá lugar el desarrollo ontogénico de la nueva planta. Las características moleculares de este mecanismo aseguran que se mantenga intacta la dotación genética de la mayoría de las células de la planta.

Este proceso de desarrollo de la planta va acompañado de diferenciaciones celulares, programadas potencialmente en la dotación genética completa de cada célula, que están estrictamente coordinadas en el espacio y en el tiempo. Según esta hipótesis, la especificidad de la respuesta no depende del fitocromo, sino del estado particular («competencia») de la célula o tejido en el momento en que se forma el fitocromo activo ( $P_f$ ). El hecho de que frente a una misma «señal» o efector,  $P_f$ , respondan diferentemente las células competentes, indica que éstas están estrictamente «determinadas» para responder a  $P_f$  de un modo específico antes de la formación de  $P_f$ . Según Mohr, se pueden concebir dos pasos sucesivos en este proceso: la «especificación de la pauta» («pattern»), que implica el establecimiento de la competencia específica de la célula a  $P_f$ , y la «realización de la pauta», que incluye la expresión de esta pauta por acción del fitocromo.

Como vemos, dos puntos críticos de esta interpretación son los mecanismos por los que se rige la «especificación de la pauta» previa a la formación de  $P_f$  y el mecanismo propiamente dicho de acción de  $P_f$  («realización de la pauta»). La existencia de estos procesos explicaría la inespecificidad de la acción del fitocromo y la multiplicidad de respuestas que promueve  $P_f$ . Por tanto, la especificidad de la acción y el tipo de respuesta habría que atribuirlos a los factores desconocidos que regularían la especificación de la pauta respecto a  $P_f$  y no al propio fitocromo activo. La acción del fitocromo, a nivel de la realización de la pauta, sería comparable, en cierto modo, a la acción de las hormonas, actuando como «efector» de la expresión génica.

Teniendo en cuenta el dogma central de la biología molecular:



la expresión génica se puede regular en sus diversos niveles: transcripción (formación hnRNA), postranscripción (procesado y forma activa del mRNA), traducción (síntesis ribosómica de las proteínas específicas) y postraducción (activación de las proteínas o enzimas preexistentes).

Referido a las fotorrespuestas lentas (tipo II) existe todo un cuerpo de evidencias, a veces contradictorias, que señalan preferentemente un mecanismo de regulación de la expresión génica por  $P_f$  a nivel de la transcripción (activación génica diferencial). Se han descrito ya más de medio centenar de enzimas en los que el fitocromo regula la expresión génica.

Con un carácter general, pueden considerarse tres tipos de enzimas en relación con su regulación por  $P_f$ :

- a) Enzimas «inducibles» ( $P_f$  activaría los genes responsables de la síntesis *de novo* de estos enzimas.

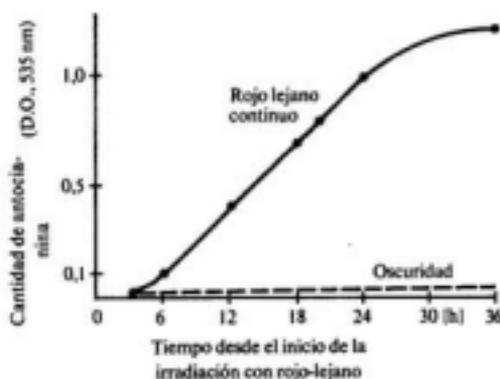


Figura 30.10.—Curso de la acumulación de antocianos en plántulas de *Sinapis alba* L. irradiadas con rojo lejano continuo. La fase de latencia es de unas 3 horas. La irradiación se suministró a las 36 horas de la siembra (tomado de H. Mohr, «Photochem. Photobiol.», vol. 5, 1966, págs. 469-483).

- b) Enzimas «reprimibles» ( $P_g$  accionaría la represión de la neosíntesis de estos enzimas.
- c) Enzimas que no son afectados por  $P_g$ .

La figura 30.10 nos permite seguir la cinética de la acumulación de antocianos en plántulas de *Sinapis alba* L., crecidas en la oscuridad o bajo rojo lejano continuo. Según estos resultados,  $P_g$  podría promover una neosíntesis de antocianos en las plántulas de mostaza. Un paso más adelante en estas investigaciones tenía que ser la comprobación del proceso a nivel molecular. Es decir, la consideración de la cinética de los enzimas participantes en esta vía lateral del metabolismo de las plantas.

Un buen material para estos estudios han sido los cotiledones de plántulas de mostaza. La L-fenilalanina amonio-liasa (PAL) es un enzima clave en la síntesis de los antocianos (Fig. 30.11). Este enzima cataliza la conversión del aminoácido aromático fenilalanina a ácido transcinámico, el cual es un precursor clave de la síntesis de los flavonoides (metabolitos secundarios de la planta) y, por tanto, entre ellos, de los antocianos.

La figura 30.12 indica la evolución de la actividad de PAL en plántulas de mostaza crecidas en la oscuridad o bajo condiciones de formación de  $P_g$  (rojo lejano continuo). Si se compara con la figura 30.10, puede suponerse la existencia de una cadena causal entre la formación de  $P_g$  y síntesis de PAL  $\rightarrow$  síntesis de antocianos.

Conforme a esta hipótesis, PAL sería así un enzima inducible, es decir,  $P_g$  promovería la activación de los genes responsables de la síntesis *de novo* de este enzima.

La comprobación molecular de esta hipótesis puede venir por varios caminos:

- a) Experiencias con inhibidores de la transcripción o de la traducción.
- b) Estudio de la cinética de la síntesis de los enzimas en función de  $P_g$ .
- c) Por suministro de precursores marcados y comprobación de su incorporación en la síntesis *de novo* del enzima.

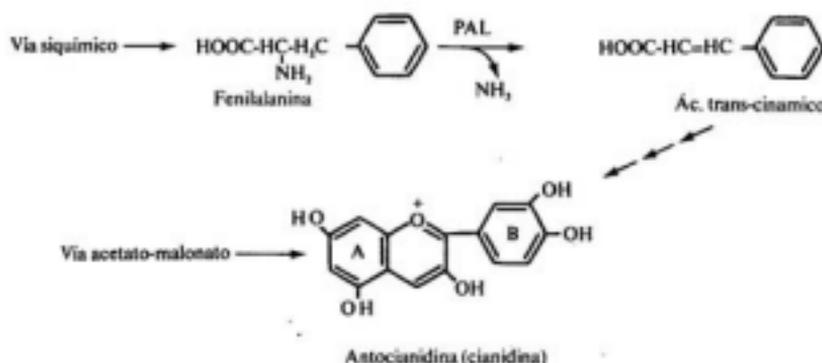


Figura 30.11.—El enzima PAL ocupa un lugar clave en la diversificación del metabolismo primario de las plantas (fenilalanina) hacia la biosíntesis de una gran diversidad de derivados fenólicos (metabolismo secundario). Los flavonoides se originan por dos caminos biosintéticos diferentes: el anillo A se sintetiza en la planta por la vía del acetato-malonato, mientras que el anillo B y el radical propano del heterociclo central provienen de la vía del ácido siquímico (aminoácidos aromáticos).

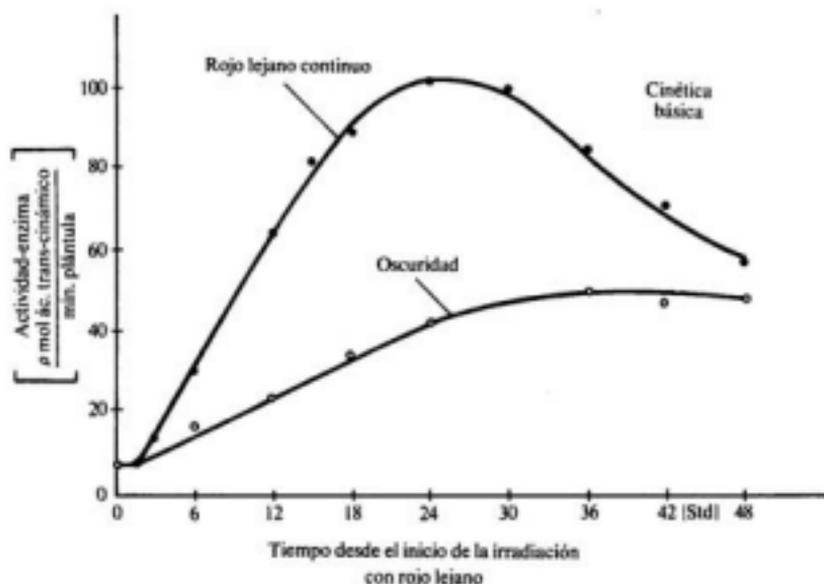


Figura 30.12.—Cinética de la actividad de PAL en plántulas de mostaza crecidas en la oscuridad o bajo acción de  $P_{FR}$  (cinética en estado fundamental). El rojo lejano continuo mantiene un fotoequilibrio bajo ( $P_{FR}/P_I = 0,05$ ) pero altamente activo y prácticamente estacionario. La fase de latencia es de 1,5 horas (tomado de M. Weidner et al, «Planta», vol. 86, 1969, pág. 33).

d) Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y de clonaje de cDNA complementario del mRNA.

Para PAL se disponen de evidencias en varios sentidos. Así, la administración de actinomicina D (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), antes o en el momento de exponer a la luz, impide la síntesis aparente del enzima. Si, por el contrario, se retrasa su administración con respecto al suministro de luz, la inhibición es mucho menos eficiente. Estos resultados han sido interpretados en el sentido de que la síntesis de RNA es necesaria para la iniciación de la síntesis del enzima, pero que una vez se ha conseguido la síntesis de mRNA, el uso de este mRNA de vida larga no requiere su síntesis continua, aunque sí precisa la presencia de  $P_0$  para la síntesis aparente del enzima o para el mantenimiento del flujo anabólico. Una comprobación directa del papel de la síntesis de RNA en la inducción enzimática por el fitocromo sería el aislamiento de los mRNA específicos y su correlación con la formación de  $P_0$ . Hasta el momento no se dispone de este tipo conclusivo de experiencias, aunque algunos autores han comprobado que el fitocromo es capaz de activar la transcripción de cistrones de rRNA.

Se han logrado resultados menos ambiguos por medio de experiencias de marcado con isótopos pesados (óxido de deuterio). Por aplicación *in vivo* de este compuesto marcado se ha comprobado la existencia de una síntesis *de novo* de PAL en los cotiledones de plántulas de mostaza y de la ribonucleasa en secciones de hipocótilo de altramuz. También se han obtenido resultados positivos para el control por el fitocromo de la síntesis de la ascorbato-oxidasa,  $\beta$ -amilasa y chalcona sintasa. En cambio, otras experiencias con  $\text{D}_2\text{O}$  de largo tiempo llegan a la conclusión de que el control por el fitocromo de PAL ocurre por activación de PAL a partir de proenzimas inactivas presentes en los cotiledones de mostaza.

Quizá uno de los experimentos más decisivos ha sido la demostración de que el incremento en la formación de polisomas se debe a un rápido aumento de mRNA traducibles, mediado por el fitocromo. Así, la cordicepina (inhibidor de la síntesis de mRNA) bloquea totalmente el efecto de la luz en la formación de polisomas y el marcaje con uridina radiactiva muestra que la radiactividad se incorpora preferentemente a la fracción de los polisomas más que a los monómeros y subunidades ribosómicas, todo ello en menos de 30 minutos que es la fase de latencia descrita en esta cinética para la neosíntesis de RNA. Desde estos experimentos se han descrito varios enzimas más en los que  $P_0$  actúa sobre la expresión génica a nivel de la activación de la transcripción. Entre ellos cabe destacar la subunidad pequeña de Rubisco y LHCP (complejo colector de energía de la membrana tilacoidal, ver Cap. 11). La comprobación definitiva de estos mecanismos tiene que venir lógicamente de la adecuada aplicación de las técnicas de hibridación de los ácidos nucleicos y las de clonaje del cDNA complementario del mRNA.

Hay también evidencias experimentales en favor de la existencia de enzimas «reprimibles» por  $P_{fr}$ . Uno de los ejemplos mejor conocidos es el de la lipoxigenasa (LOG). Este enzima cataliza en las plantas la oxidación de los ácidos grasos no saturados con dobles enlaces no conjugados en posición *cis* (como los ácidos linoleico, linolénico y araquidónico) a hidroxiperóxidos conjugados *cis-trans*. También en este caso un buen material de experimentación han sido los cotiledones de plántulas de mostaza. El estudio cinético de la actividad del enzima demuestra que la

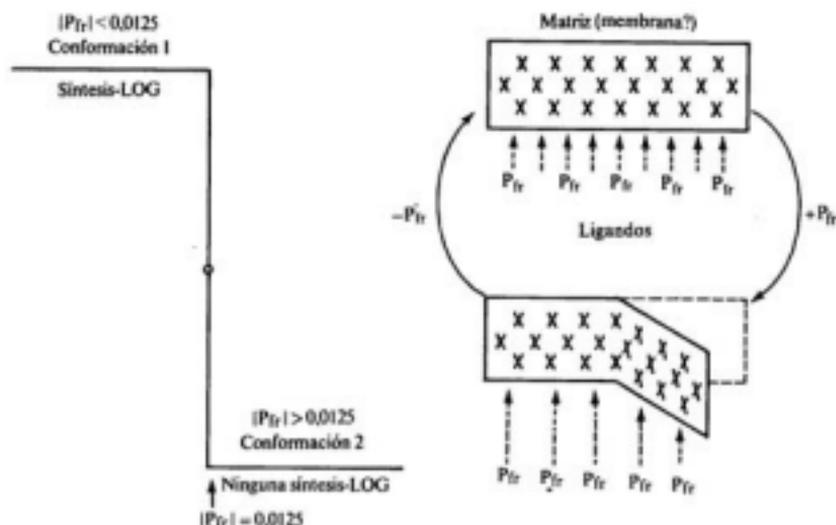


Figura 30.13.—Mecanismo de umbral para la síntesis aparente de LOG fitomodulado por el fitocromo. Para  $|P_{fr}| > 1,25\%$  se para la síntesis de LOG; si la  $|P_{fr}| < 1,25\%$  se reanuda rápidamente la síntesis aparente del enzima. Modelo probable que ilustra la regulación por  $P_{fr}$  de la síntesis aparente del enzima lipoxigenasa (LOG) por un mecanismo del tipo del todo o nada (mecanismo de umbral) (tomado de H. Mehr y H. Oelze-Karow, «Biologie in unserer Zeit», vol. 3, 1973, págs. 137-147).

síntesis aparente de lipoxigenasa, que ocurre en las plántulas de mostaza crecidas en la oscuridad, es reprimida si se suministra rojo lejano continuo ( $P_{fr}$ ). Un hecho interesante de estas experiencias fue la comprobación de la existencia de un mecanismo de umbral para la síntesis aparente de lipoxigenasa (Fig. 30.14). Si la cantidad de  $P_{fr}$  excede el umbral, la síntesis de la lipoxigenasa se para inmediatamente del todo. Si la cantidad de  $P_{fr}$  decrece por debajo del nivel umbral, se reanuda rápidamente la síntesis aparente del enzima. Más adelante (30.2.6.3), volveremos a ocuparnos del mecanismo de umbral de este enzima.

Conforme a la hipótesis de la actividad genética diferencial, no siempre  $P_{fr}$  causaría una activación o una represión de genes. Más bien, la pauta de diferenciación primaria determinaría que el tipo de funcionalidad de la mayoría de genes fuera independiente de la presencia de  $P_{fr}$ . En este sentido, la fotomorfogénesis mediada por el fitocromo es un fenómeno específico que no afecta a todas las reacciones del metabolismo ni incluye todas las integraciones que se verifican a nivel de la planta. Se ha comprobado para muchos enzimas la falta de influencia del fitocromo. Para nuestra atención escogemos, de nuevo, unas experiencias realizadas con plántulas de mostaza. El enzima considerado es la isocitrato-liasa (enzima clave del ciclo del glioxilato en las plantas). El estudio de la evolución de la actividad enzimática en plántulas de mostaza crecidas en la oscuridad o bajo la influencia del rojo lejano

continuo ( $P_{\theta}$ ) o con rojo cercano de corto tiempo ( $P_{\theta}$ ), no muestra influencias significativas del sistema fitocromo sobre el enzima isocitrato-liasa (isocitratasa).

### 30.2.6.2. Regulación de la permeabilidad de las membranas

No todos los resultados experimentales están de acuerdo, al menos aparentemente, con la hipótesis de la activación genética diferencial. Se dispone de evidencias que sugieren una acción rápida del fitocromo, difícilmente atribuible a una acción primaria a nivel de la actividad genética. En estas experiencias se ha considerado que las fotorrespuestas se deberían a efectos del fitocromo sobre la regulación de la permeabilidad de las membranas. Se debe a Hendricks y Borthwich la postulación inicial de la teoría por la que el fitocromo actuaría por control de la permeabilidad de las membranas.

Las hojas de *Mimosa pudica*, *Albizia julibrissin* y *Samanea saman* presentan movimientos de apertura y de cierre en respuesta a la luz y a la oscuridad (nictinastia) (Cap. 29). Estos movimientos están regulados por las condiciones osmóticas de las células motoras del pulvinulo, situadas en la base de los peciolos y de los folíolos (Fig. 29.17). El movimiento es el resultado, al menos parcialmente, de cambios de permeabilidad de las membranas y en el transporte de  $K^+$  en las células motoras. Se ha comprobado que este movimiento nictinástico está bajo control del fitocromo. Es muy probable un efecto del fitocromo sobre las membranas, dado que la fotorrespuesta mediada por el fitocromo ocurre en pocos minutos.

Otra experiencia que sugiere una regulación por el fitocromo de las membranas es el denominado *efecto Tanada*: si se suspenden, en medio líquido, raíces seccionadas de cebada o de judía de Mungo en un vaso de vidrio cuyas paredes previamente han sido cargadas negativamente por iones fosfato, y se irradian los extremos de las raíces con rojo cercano, éstas se adhieren a la superficie del vidrio. Por el contrario, si se irradia con rojo lejano, se liberan las raíces de la superficie del vidrio. De esta forma, el rojo cercano induce cargas positivas en los extremos de la raíz, las cuales causan la adherencia de la raíz a las superficies cargadas negativamente del vidrio. No hay duda de que este fenómeno está relacionado con la superficie del órgano y de que posiblemente causa cambios biofísicos en las membranas. Todos estos efectos se producen muy rápidamente, en tiempos del orden de los 30 segundos. La medición de los biopotenciales, en raíces y en coleóptilos de cebada, muestra cambios reversibles por acción de la irradiación del rojo cercano y del rojo lejano, con valores más positivos para el rojo cercano. Estos cambios se detectan en pocos minutos o, incluso, en tiempos menores. De nuevo estos resultados hablan en favor de un efecto directo del fitocromo sobre las membranas.

Se conocen otros movimientos rápidos en respuesta al sistema fitocromo. Recordemos los movimientos de orientación de los cloroplastos de *Mougeotia* (Figs. 30.7 y 30.8). Estos movimientos se manifiestan en un tiempo inferior a los diez minutos. Jaffe ha comprobado que la acetilcolina, un neurotransmisor animal, puede imitar los efectos de la luz roja y mediar diversas respuestas típicas del fitocromo en las raíces. Para este equipo la acetilcolina actuaría, a nivel de las membranas, como una hormona local

(mensajero secundario) que regularía las fotorrespuestas debidas al fitocromo. No obstante, la adición de acetilcolina no siempre mimetiza estos efectos.

Una hipótesis razonable para explicar estos fenómenos sería que el fitocromo se localiza en la membrana y que la transformación de  $P_r$  a  $P_{fr}$  afectaría a la permeabilidad de la membrana. De este modo, las transformaciones morfogenéticas se derivarían secundariamente de este efecto primario. De acuerdo con esta interpretación, la regulación de la expresión génica por el fitocromo sería por un mecanismo más *indirecto*.

### 30.2.6.3. Reacción primaria del fitocromo

Actualmente el aspecto más controvertido de la discusión del fitocromo es el del mecanismo de la *reacción primaria*. La *especificidad de la acción*, como ya hemos visto, se ha atribuido a la pauta de desarrollo, o competencia para  $P_{fr}$ , establecida en la diferenciación primaria o determinación. La existencia de la *multiplicidad de acción* del fitocromo y la atribución de la actividad fisiológica a la forma  $P_{fr}$  plantea el problema de la presencia de una reacción primaria seguida de diversificación de las acciones o, por el contrario, de una pluralidad de acciones primarias. A pesar del carácter altamente especulativo de muchos de estos modelos, las evidencias más bien indican la existencia de diversas *reacciones primarias* como base de la multiplicidad de *acciones*.

Un ejemplo muy ilustrativo son los estudios de la regulación de la síntesis del enzima lipoxigenasa por parte del fitocromo. Como ya hemos señalado, al hablar de la cinética de la represión de este enzima,  $P_{fr}$  actúa reprimiendo sólo a partir de cierto umbral mínimo ( $P_{fr} = 1,25\%$ ) (mecanismo del todo o nada). La reacción primaria de  $P_{fr}$  puede formularse del siguiente modo:



El modelo para esta regulación aparente de la síntesis de LOG por  $P_{fr}$  en plántulas de mostaza, se basa en el modelo de membrana de Changeux.  $P_{fr}$  sería análogo a un ligando y el receptor primario (o sitio de unión) de  $P_{fr}$ ,  $X$ , sería análogo a una matriz (membrana) ya existente antes de la iluminación (Fig. 30.14). Esta matriz tendría la posibilidad de cambios conformacionales reversibles con un alto grado de cooperatividad. Una conformación de la membrana ( $|P_{fr}| < 1,25\%$ ) permite la síntesis de LOG; otra conformación de la matriz ( $|P_{fr}| > 1,25\%$ ) no lo permitiría.

Investigaciones realizadas para estudiar la regulación por el fitocromo de otros enzimas, como en la síntesis de los antocianos, muestran que este mecanismo de umbral para la reacción primaria no tiene un carácter general. En la síntesis de los antocianos tampoco se presenta un fenómeno de cooperativismo.

Recientemente Schäfer ha desarrollado el modelo abierto del complejo receptor-fitocromo, de acuerdo con el esquema de la figura 30.15, donde  $P_r$  y  $P_{fr}$  son las dos formas fotorreversibles del fitocromo, representando  $X$  y  $X'$  las formas reversibles de los receptores o sitios de unión del fitocromo. Este modelo especulativo permite explicar tanto las reacciones clásicas de inducción-reversión como la influencia de la longi-

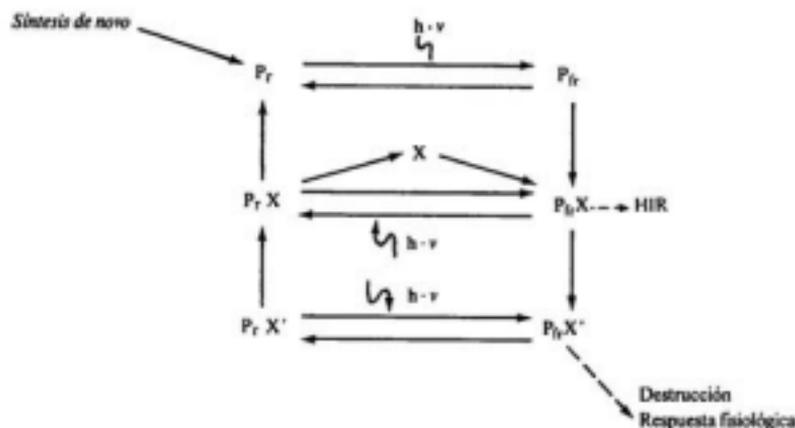


Figura 30.14.—Modelo abierto del complejo receptor-fitocromo de Schäfer (1976). Se considera que los sitios de unión (receptor) no son limitantes, por lo que las reacciones de unión son rápidas comparado con las otras reacciones. El «pool»  $P_{fr} X$  es transitorio y dependiente de la irradiancia y de la longitud de onda, siendo el efector en condiciones HIR. Por el contrario, en condiciones de inducción por pulsos cortos de rojo cercano, la regulación se logra por el «pool»  $P_{fr} X'$ .

tud de onda y del flujo cuántico en la participación del HIR y ha sido también aplicado al mecanismo de operación de LOG.

Jabben y Holmes han desarrollado un modelo, aplicable a plantas etioladas y verdes, que considera un «pool» de fitocromo lábil y otro estable. En las plantas etioladas se daría sobre todo el «pool» lábil con las formas efectoras (Fig. 30.15) A y B, que corresponden a las  $P_{fr} X$  y  $P_{fr} X'$  del modelo de Schäffer. Mientras HIR transcurre sobre la forma  $P_{fr} A$ , las fotomorfosis inductivas serían por medio de  $P_{fr} B$ . Por el contrario, en las plantas verdes dominaría el «pool» de fitocromo estable, en el que el  $P_r$  estable sería el efector general. Este modelo aclara el fenómeno observado en muchas plantas verdes en donde la acción máxima fisiológica de la luz duradera (HIR) reside en el rojo cercano, mientras que en las plantas etioladas actúa mayormente en el rojo lejano duradero.

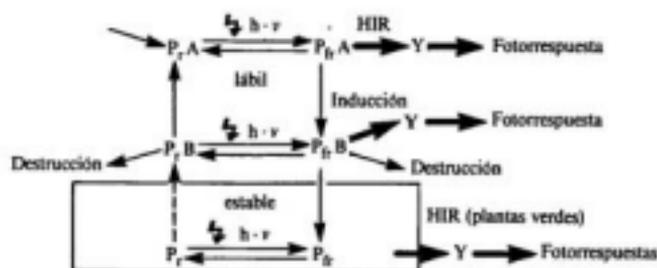


Figura 30.15.—Modelo de Jabben y Holmes (1983), referido a planta etiolada y a planta verde, que distingue entre un «pool» de fitocromo lábil y otro estable (explicación en el texto) (tomado de M. Tevini y D. P. Häder: *Allgemeine Photobiologie*, George Thieme Verlag, Stuttgart, 1985, pág. 209).

Smith ha propuesto un modelo altamente especulativo para la reacción primaria del fitocromo. En esta hipótesis ambas formas del fitocromo ( $P_r$  y  $P_b$ ) se localizan en las membranas y se admite la existencia de una única reacción inicial de  $P_b$ , cuya acción se lograría a través de un «mensajero secundario», X.

En una discusión más reciente este mismo autor señala un posible mecanismo por el que el fitocromo podría regular el transporte en las membranas basado en el modelo del mosaico fluido de membrana y en los resultados de Briggs sobre las propiedades del fitocromo.

Los datos experimentales que apoyan la intervención del «mensajero secundario» cAMP (adenosin-monofosfato cíclico) en algunas fotorrespuestas reguladas por el fitocromo han sido controvertidos y en todo caso tienen un valor discutible, debido a la falta, por el momento, de una demostración no ambigua de la presencia y función de cAMP en las plantas.

Ultimamente ha merecido especial atención la acción del fitocromo a través de la regulación de los niveles endógenos celulares y apoplásticos del  $Ca^{2+}$  (Cap. 26). Conforme a estos estudios, el  $Ca^{2+}$  podría actuar como «mensajero secundario» del sistema fitocromo. En efecto, son muchos los procesos regulados por el fitocromo que requieren de  $Ca^{2+}$ : rotación de cloroplastos de *Mougeotia*, cierre de folíolos de *Mimosa*, adherencia de los extremos de las raíces de *Phaseolus*, activación de la NAD quinasa, inhibición de la ATPasa mitocondrial, etc. En todo caso se requieren de más estudios para comprobar y conocer la importancia y conexión del  $Ca^{2+}$  con el modo de acción del fitocromo.

En resumen, a lo largo de la discusión de este capítulo hemos podido constatar la creciente importancia que actualmente se atribuye al fitocromo y a la regulación fotomorfogénica para el control del desarrollo de las plantas. El fitocromo ha sido considerado como un pigmento *sensor* que detecta las fotoseñales del medio ambiente y aprovecha esta información para dirigir y adecuar el desarrollo de la planta. Estos estudios sobre la naturaleza y modo de acción del fitocromo se hallan en la confluencia de los métodos biofísicos, bioquímicos y fisiológicos. En esta confluencia de estudios, ocupa un lugar central el conocimiento de la naturaleza y del mecanismo de la reacción primaria de este pigmento. Por ello, dos puntos esenciales en la consideración actual de los científicos especializados en este campo, son las características del hipotético receptor primario, X, y la fotorregulación a nivel molecular de la morfogénesis de las plantas.

La existencia de otros fotorreceptores de la fotomorfogénesis, sobre todo para la banda azul (criptocromo), requiere aún de intensa investigación antes de poder establecer, de una forma clara, su participación en la fotomorfogénesis.

De las anteriores consideraciones puede deducirse que la relación planta-luz es un sistema de gran significación ecológica. En este sistema la planta no sólo capta, transforma y acumula energía y materia (flujo de la energía y flujo de la materia), sino que, además, la luz posee un valor «selectivo» sobre la información celular (flujo de la información). De este modo, el fitocromo actúa como un fotomodulador que capta, transduce y amplifica las fotoseñales del medio para una mejor adaptación de su ciclo de desarrollo a las condiciones de este medio.

### 30.2.7. Significación ecológica del fitocromo y criptocromo

Ya hemos visto que el fitocromo es un típico fotorreceptor transductor de señales que suministra información a las plantas sobre las características de la luz del medio que le rodea. Esta información de la luz es muy compleja: cantidad, distribución espectral, dirección y duración de la luz. Ya hemos destacado que la operación del sistema fitocromo establece, en cada momento, el estado fotoestacionario  $P_f/P_{total}$  por mediación de las proporciones relativas de radiación de rojo cercano y rojo lejano recibidas. Parece lógico pensar que una función fundamental del fitocromo sea percibir el ambiente natural de luz y modificar adaptativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Hay muchas respuestas directas de las plantas a la luz y la mayoría de ellas están relacionadas con la necesidad de la fotosíntesis para la planta. Un caso típico es la regulación de la apertura de los estomas (Cap. 5) controlada por la luz por un doble mecanismo, ligado a las clorofilas y a la fotomorfogénesis en luz azul (criptocromo), respectivamente. La percepción de los cambios de fluencia de luz (fitocromo y criptocromo) permite a la planta responder a la sombra de la vegetación y de los objetos que tienen un pequeño efecto sobre la cualidad del espectro (suelo, piedras). Así, las propiedades fotocrómicas del fitocromo capacitan a las plantas para responder específicamente a cambios en la «cualidad» de luz producidos por la vegetación del entorno (dosel vegetal), pues los pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides, Cap. 11) de las plantas que forman el dosel apenas permiten el paso de las radiaciones del rojo cercano (absorbidas por las clorofilas) y, en cambio, perjudican poco al rojo lejano. Estas condiciones de cambio espectral favorecen una baja concentración de  $P_f$  que inhibe la germinación de las semillas fotosensibles situadas bajo el dosel vegetal, con una evidente significación de supervivencia. Las semillas podrán germinar la primavera siguiente antes de que se formen las hojas que constituirán el dosel. Un efecto general, a nivel de semillas fotosensibles, es la regulación de la germinación por su situación en el suelo. Sólo germinarán aquellas semillas que, por su disposición más superficial, disponen de la luz adecuada, asegurando así la eficiencia fotosintética de la nueva planta. Otros fenómenos claramente regulados por el fitocromo son el deshilamiento, la distinción de la duración, transición y discriminación luz-oscuridad (fotoperiodismo, Cap. 31), la dormición de muchas especies vegetales (Cap. 32) y las respuestas frente a la dirección de la luz (fototropismo, Cap. 29), aunque en este último caso es más excepcional la participación del fitocromo, siendo el criptocromo (fotorreceptor azul/UV) el fotorreceptor más específico.

Para finalizar, hay que señalar que el estado fotoestacionario  $P_f/P_{total}$  que se obtiene en condiciones de iluminación natural es muy distinto del que se obtiene en los experimentos artificiales que se han reseñado en este capítulo con fines de investigación científica. Además, la luz solar muestra un amplio margen de variación, estrechamente ligada a los diferentes parámetros del entorno físico, biológico, geográfico y climatológico, a lo largo de los días y las diferentes estaciones del año, lo que provoca en la planta oscilaciones en el estado fotoestacionario que pueden conducir a diferentes tipos de fotorrespuestas que, como observábamos en el apartado anterior, tienen un evidente sentido de adaptación fisiológica del desarrollo de las plantas a las condiciones lumínicas del medio en que viven.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BARCELO COLL, J.: *Fotomorfogénesis*, en: *Biología celular y molecular* (C. Vicente, Coord.), Blume, Madrid, 1979, págs. 397-444.
- BRIGGS, W. R., y RICE, H. V.: *Phytochrome: Chemical and Physical Properties and Mechanism of Action*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 23, 1972, págs. 293-334.
- COSENS, D. J., y VINCE-PRUE, D. (eds.): *The Biology of Photoperception*, Cambridge University Press, Cambridge, 1983.
- GOODWIN, T. W. (ed.): *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, vols. I y II, Academic Press, Londres, 1976.
- HOCK, B.: *Developmental Physiology*, en: *Progress in Botany*, vol. 46, Springer-Verlag, Berlín, 1984, págs. 140-171.
- JOHNSON, C. B.: *Photomorphogenesis*, en: *The Molecular Biology of Plant Development* (Edit. H. Smith y D. Grierson), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982, págs. 365-404.
- KENDRICK, R., y FRANKLAND, B.: *Phytochrome and Plant Growth*, Edward Arnold, Londres, 1976.
- MARME, D.: *Phytochrome: Membranes as Possible Sites of Primary Action*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 28, 1977, págs. 173-198.
- MITRAKOS, K., y SHROPSHIRE, W. (eds.): *Phytochrome*, Academic Press, Nueva York, 1972.
- MOHR, H.: *Lectures on Photomorphogenesis*, Springer-Verlag, Berlín, 1972.
- PRATT, L. H.: *Phytochrome: The Protein Moiety*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 33, 1982, págs. 557-582.
- ROUX, S. J.; WAYNE, R. O., y DATTA, N.: *Role of Calcium Ions in Phytochrome Responses: an Update*, «What's New in Plant Physiology», *Physiol. Plant.*, vol. 66, 1986, págs. 344-348.
- SCHOPFER, P.: *Photomorphogenesis*, en: *Advanced Plant Physiology* (Edit. M. B. Wilkins), Pitman, Londres, 1984, págs. 354-379.
- SHOPPER, P.: *Phytochrome Control of Enzymes*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 28, 1977, páginas 223-252.
- SHROPSHIRE, W., y MOHR, H. (eds.): *Photomorphogenesis*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vols. 16A y 16B, Springer-Verlag, Berlín, 1983.
- SMITH, H.: *Phytochrome and Photomorphogenesis*, McGraw-Hill, Nueva York, 1975.
- SMITH, H. (ed.): *Light and Plant Development*, Butterworths, Londres, 1976.
- SMITH, H., y HOLMES, M. G.: *Techniques in Photomorphogenesis*, Academic Press, Londres, 1984.
- SONG, P. S.: *Phytochrome*, en: *Advanced Plant Physiology* (Edit. M. B. Wilkins), Pitman, Londres, 1984, págs. 380-407.
- TEVINI, M., y HADER, D. P.: *Allgemeine Photobiologie*, George Thieme Verlag, Stuttgart, 1985.
- TOBIN, E. M., y SILVERTHORNE: *Light Regulation of Gene Expression in Higher Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 569-593.
- WAREING, P. F., y SMITH, H. (eds.): *Photoperception by Plants*, The Royal Society, Londres, 1983.

## FOTOPERIODISMO Y VERNALIZACIÓN

### 31.1. Fisiología de la floración

En el ciclo ontogénico del desarrollo de una planta hay marcadas diferencias entre la fase de *crecimiento vegetativo* y la *fase reproductora* que se inicia con la floración. En el primer caso los meristemos apicales, por su actividad mitótica seguida de los procesos de elongación celular y diferenciación, determinan la pauta de crecimiento localizado e indeterminado, típica del crecimiento vegetativo y que en su conjunto forman los distintos tejidos y órganos del cuerpo primario de la planta (Cap. 28). Por el contrario, en la floración cambia la pauta de actividad y diferenciación del meristemo vegetativo a meristemo floral, por cuya acción se originan los componentes de la flor (perianto, estambres, pistilo, etc.) en lugar de los típicos órganos vegetativos (hojas, tallo, yemas laterales, etc.) (Fig. 31.1).

Aunque no hay una uniformidad general, normalmente, la floración es *estacional* y requiere de un cierto grado de desarrollo vegetativo previo («madurez» para la floración). En sentido fisiológico se suele entender por floración la inducción y formación de los primordios florales. Diversos factores internos (hormonales, sobre todo) y externos (luz y temperatura, fundamentalmente) condicionan, normalmente, el control de la inducción floral. En conjunto, estos condicionamientos del medio externo sobre la dirección del desarrollo de la planta son indicativos de un alto grado de adaptación de las distintas especies a su ecotipo merced a una elaborada interacción entre distintos receptores-sensores de la planta, los factores del medio, los niveles hormonales y el programa genético de la planta.

### 31.2. Fotoperiodismo: descubrimiento y concepto

Durante el siglo XIX varios fisiólogos vegetales habían sugerido la participación de la duración del día en el desarrollo de las plantas. Así Henfrey, en 1852, indicó que la distribución natural de las plantas era debida, al menos en parte, a las variaciones de latitud de los días del verano. De un modo más preciso, J. Tournois en 1912, y H. Klebs en 1913, realizaron experimentos controlados de floración de distintas especies. Este último en sus experimentos con *Sempervivum funkii* logró inducir la floración de plantas rosetas en invierno, por suministro de iluminación continua con lámparas incandescentes.

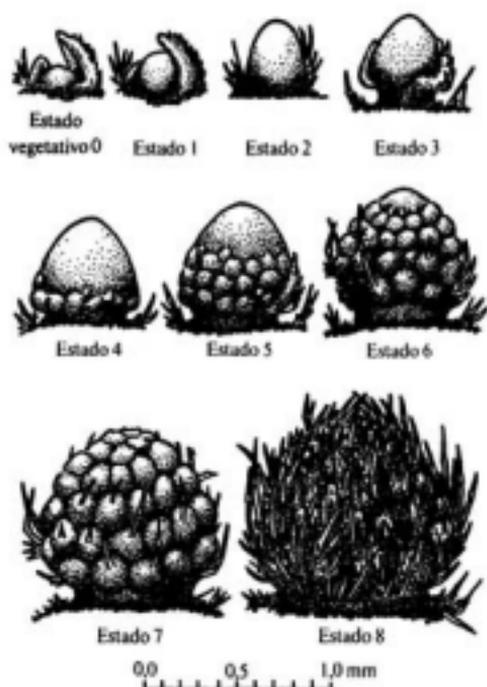


Figura 31.1.—Diferenciación y desarrollo del primordio de la inflorescencia terminal en *Xanthium* (tomado de F. B. Salisbury, «Plant Physiol.», vol. 30, 1955, págs. 327-334).

tes durante unos pocos días. De este modo, se conoció que la floración podía ser acelerada por unas condiciones de día largo.

Se debe a W. W. Garner y H. A. Allard, en 1920, el establecimiento del concepto actual de fotoperiodismo y el reconocimiento de su influencia para la regulación de distintos procesos fisiológicos. Estos investigadores observaron que los cultivos de *Nicotiana tabacum* var. Maryland Mammoth no florecían en Washington durante el verano y, en cambio, iniciaban la floración en la época desfavorable fría del invierno cuando fueron llevados al invernadero para su propagación vegetativa. Por el mismo tiempo otra observación, independiente de la anterior, de estos mismos investigadores, fue con cultivos de soja (*Glycine max*) que florecían en septiembre u octubre a pesar de haber sido sembradas en tiempos bastante diferentes (mayo, junio, julio o agosto). Una variación de 59 días en la germinación, durante mayo y junio, sólo causaba una diferencia de 11 días en el tiempo de inicio de la floración. Del estudio experimental de ambos tipos de observaciones llegaron a la conclusión que el fenómeno estacional responsable era la duración relativa del día y la noche. De acuerdo con ello, consiguieron que las plantas de *Nicotiana* y *Glycine* florecieran en verano, si se reducía artificialmente el período de iluminación diaria. En estudios posteriores con otras especies comprobaron el carácter

más general de sus observaciones para muchas especies y tipos de respuestas de las plantas.

El término fotoperiodismo procede de las raíces griegas de las palabras «luz» y «duración del tiempo» y comprende la regulación de distintos procesos del desarrollo de la planta por la *duración relativa del día y la noche*. Entre las respuestas de las plantas reguladas por el fotoperiodo están: la floración, formación de tubérculos, inicio de la dormición, actividad del cámbium, abscisión de hojas, tipo de ramificación, suculencia de las plantas, biosíntesis de antocianos, esencias, etc.

Puesto que muchas de estas respuestas (dormición, tuberización, suculencia, etc.) se tratan en distintos capítulos de esta obra, en este capítulo del fotoperiodismo nos ceñiremos de un modo más específico a la floración.

### 31.2.1. Tipos de respuestas fotoperiódicas en la inducción floral

Los fotoperiodos necesarios para la inducción de la floración presentan una gran variabilidad en los distintos ecotipos y especies vegetales y, en realidad, son una expresión adaptativa a los factores del medio externo que han condicionado la evolución.

En la tabla 31.1 se resumen los principales tipos de requerimientos fotoperiódicos para la iniciación de la floración, junto con algunas especies vegetales representativas de cada uno de los grupos. Básicamente se distinguen tres grandes grupos:

1. *Plantas de día corto* (PDC) cuyo *fotoperiodo crítico* requiere no rebasar un máximo de número de horas de iluminación por día. Entre las plantas mejor conocidas de este grupo se encuentran las especies de *Chrysanthemum*, *Xanthium strumarium*, *Kalanchoe blossfeldiana* y *Nicotiana tabacum* (var. «Maryland Mammoth»).
2. *Plantas de día largo* (PDL), que requieren un fotoperiodo crítico de luz por encima de un mínimo de horas de luz, como es el caso, entre otros, de la variedad bianual del beleño (*Hyoscyamus niger*), de *Avena sativa* (avena), *Triticum sativum* (trigo), *Allium cepa* (cebolla), *Lactuca sativa* (lechuga), *Beta vulgaris* (remolacha), *Daucus carota* (zanahoria), etc.
3. *Plantas de día neutro* (PDN), es decir, indiferentes a la duración del fotoperiodo para la inducción de la floración. Este es el caso de algunas variedades de *Solanum tuberosum* (patata), *Phaseolus vulgaris* (judía), *Gossypium hirsutum* (algodón), etc.

Vemos, pues, que para las plantas sensibles al fotoperiodo, un papel decisivo viene dado por el *fotoperiodo crítico*, más que en la diferencia absoluta de duración de los fotoperiodos en las PDL y PDC. Es más, la distinción no estriba en que las PDL requieran iluminaciones de mayor duración de 12 horas diarias y las PDC de iluminaciones inferiores a 12 horas, sino que para las PDL el fotoperiodo crítico corresponde al *mínimo* número de horas de luz diaria necesario para la floración. Por el contrario, para las PDC el fotoperiodo crítico se refiere al *máximo* de horas de luz diaria que puede recibir la planta para que sea capaz de florecer. Una iluminación por debajo del mínimo en las PDL o por encima del máximo en las PDC no permitirá la inducción floral. De este

modo, determinados fotoperíodos intermedios, que están por debajo del fotoperíodo crítico de las PDC y, a la vez, por encima del correspondiente a las PDL permiten la floración de ambos tipos de especies. Este es el caso, por ejemplo, de la especie de día corto *Xanthium strumarium* (fotoperíodo crítico: 15 1/2 h) y de la de día largo *Hyos-*

TABLA 31.1

Características fotoperiódicas de algunas especies respecto a la floración

### 1. PLANTAS DE DÍA CORTO (PDC)

#### A) Especies con un requerimiento absoluto o cualitativo de DC

<i>Amaranthus caudatus</i>	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i>
<i>Bryophyllum pinnatum</i>	<i>Lemna perpusilla</i>
<i>Coffea arabica</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> var. Maryland
<i>Chenopodium album</i>	Mammoth
<i>Chrysanthemum indicum</i>	<i>Oryza sativa</i> var. Zuiho
<i>Glycine max</i> var. Biloxi	<i>Pharbitis nil</i>
<i>Impatiens balsamina</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>
<i>Ipomea hederacea</i>	<i>Xanthium strumarium</i>

#### B) Especies con un requerimiento cuantitativo de DC

<i>Amaranthus graecizans</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>Cannabis sativa</i> var. Kentucky	<i>Helianthus annuus</i>
<i>Cosmos bipinnatus</i>	<i>Saccharum spontaneum</i>
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	<i>Salvia splendens</i>
<i>Glycine max</i> var. Mandell	

### 2. PLANTAS DE DÍA LARGO (PDL)

#### A) Especies con un requerimiento absoluto o cualitativo de DL

<i>Agropyron smithii</i>	<i>Mentha piperita</i> var. Ceres
<i>Alopecurus pratensis</i>	<i>Nicotiana sylvestris</i>
<i>Anagallis arvensis</i>	<i>Oenothera acaulis</i>
<i>Anethum graveolens</i>	<i>Phleum pratense</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Raphanus sativus</i>
<i>Avena sativa</i> var. de primavera	<i>Rubdeckia hirta</i>
<i>Dianthus superbus</i>	<i>Sedum spectabile</i>
<i>Fuchsia hybrida</i> var. Lord Byron	<i>Spinacia oleracea</i>
<i>Hyoscyamus niger</i> var. anual	<i>Trifolium pratense</i> ,
<i>Lolium temulentum</i> var. Ceres	var. English Montgomery
<i>Melilotus alba</i>	

TABLA 31.1. (Continuación)

## B) Especies con un requerimiento cuantitativo de DL

<i>Antirrhinum majus</i>	<i>Lolium temulentum</i>
<i>Beta vulgaris</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> var. Habana
<i>Brassica campestris</i>	<i>Nigella arvensis</i>
<i>Brassica rapa</i>	<i>Oenothera rosea</i>
<i>Camellia japonica</i>	<i>Secale cereale</i> var. primavera
<i>Dianthus caryophyllus</i>	<i>Trifolium pratense</i> var. America Medium
<i>Hordeum vulgare</i> , var. primavera	<i>Triticum aestivum</i> var. primavera
<i>Lactuca sativa</i>	

## 3. PLANTAS DE DÍA NEUTRO (PDN)

<i>Calendula officinalis</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Euphorbia peplus</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>Fragaria vesca semperflorens</i>	<i>Poa annua</i>
<i>Gomphrina globosa</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>Ilex aquifolium</i>	

## 4. PLANTAS DE DÍA LARGO-DÍA CORTO (PDL-C)

<i>Aloe bulbilifera</i>	<i>Cestrum nocturnum</i> (a 23° C a >24° C de DC)
<i>Bryophyllum tubiflorum</i>	<i>Kalanchoe laxiflora</i>
<i>Cestrum aurantiacum</i>	

## 5. PLANTAS DE DÍA CORTO-DÍA LARGO (PDC-L)

<i>Echeveria harmsii</i>	<i>Trifolium repens</i>
<i>Scabiosa succisa</i>	

## 6. PLANTAS DE DÍA INTERMEDIO (PDI)

<i>Chenopodium album</i>	<i>Parthenium argentatum</i>
<i>Coleus hybrida</i> var. de otoño	<i>Saccharum spontaneum</i>
<i>Mikania scandens</i>	<i>Tephrosia candida</i>

## 7. PLANTAS AMBIFOTOPERIÓDICAS (PAF)

*Chenopodium rubrum* ecotipo 62° 46' N a 25° C (a 15-20° C responde como PDI cuantitativa y a 30° C como PDL cuantitativa)

<i>Madia elegans</i>	<i>Setaria verticillata</i>
----------------------	-----------------------------

*cyamus niger* (fotoperiodo crítico: 11 h). Suministrando a ambas especies fotoperiodos diarios intermedios (por ejemplo de 14 h) se logran condiciones inductivas para la floración de ambas especies.

En realidad, muchas veces no se dan, de una manera pura, uno de los tres tipos de respuestas discutidos anteriormente, sino requerimientos lumínicos más complejos e, incluso, condicionamientos e interacciones con otros factores del medio (temperatura, humedad, etc.). En la tabla 31.1 puede observarse la existencia de plantas que requieren *fotoperiodos de tipo dual*, bien en el sentido de requerimientos sucesivos de DL-DC (grupo 4 de PDL-C, como en *Aloe bulbífera*, o, a la inversa, de secuencias de DC-DL (grupo 5 de PDC-L), como en *Trifolium repens*.

Un grupo más reducido de plantas presenta condicionamientos de *día intermedio* (PDI). Se trata, en realidad, de una variación de un tipo de respuesta de DC con unos límites muy estrechos. Así *Mikania scandens* sólo florece en fotoperiodos comprendidos entre 12,5-16 horas de luz por día. Otras veces se ha interpretado que las plantas de día intermedio tienen un requerimiento dual de luz, y que a duraciones de luz intermedias satisfacen a la vez los requerimientos de día corto y de día largo debido al solapamiento de los fotoperiodos críticos.

Un último grupo se refiere a las plantas *ambifotoperiódicas* (PAF) cuya floración es inducida tanto en día corto como en día largo, pero es inhibida en periodos lumínicos diarios intermedios. Tal es el caso, por ejemplo, de *Madia elegans* y *Setaria verticillata*.

En las plantas sensibles al fotoperiodo, el requerimiento lumínico inductivo de la floración puede ser de tipo *cuantitativo* o absoluto (de carácter obligado) o bien simplemente *cuantitativo*. En el primer caso la planta únicamente florece en condiciones inductivas de fotoperiodo, por ejemplo, las plantas de día corto *Glycine max*, var. *Biloxi*, *Xanthium strumarium* y las plantas de día largo como *Hyoscyamus niger*, sólo florecen, respectivamente, en día corto y en día largo. Por el contrario, las especies con requerimientos lumínicos *cuantitativos* pueden florecer en condiciones no inductivas, sin el fotoperiodo adecuado, aunque la presencia de éste estimula la floración. *Hordeum vulgare* (cebada) y *Helianthus annuus* (girasol) son ejemplos clásicos de requerimiento cuantitativo en PDL y PDC, respectivamente. Para un mayor detalle del comportamiento fotoperiódico de distintas especies vegetales véase la tabla 31.1.

Obsérvese que el fotoperiodismo es un mecanismo de adaptación de la planta a las variaciones estacionales del medio que indica la presencia en las plantas de un proceso de «lectura» de la duración lumínica del día, que les permite florecer en el momento más adecuado para ellas. Por regla general, las especies originarias de latitudes bajas (tropicales y subtropicales) son de día corto (florecen en otoño-invierno), mientras que las de latitudes medias y altas (países templados y septentrionales) son de día largo (florecen en primavera-verano). De este modo, las plantas consiguen ajustar su ciclo de desarrollo al periodo de clima más ventajoso, utilizando como señales la variación de estos mismos factores.

### 31.2.2. Percepción e inducción fotoperiódica de la floración

El inicio de la floración se desencadena por un cambio en la pauta de diferenciación del meristemo vegetativo a meristemo floral. Se dispone de gran cantidad de evidencias

fisiológicas, según las cuales el control del inicio de la floración es a distancia, a través de un mensajero químico (fitohormona). En general, las condiciones fotoperiódicas son percibidas por las hojas y no directamente por los meristemas. En muchos casos basta el tratamiento de una única hoja para que se produzca la inducción. Así, si se somete una sola hoja de *Xanthium strumarium* a condiciones inductivas de día corto, es suficiente para estimular la floración, aunque el resto de la planta crezca en día largo. También en muchas especies basta suministrar pocos días de fotoperíodos apropiados inductivos para que florezca la planta, incluso si posteriormente se llevan a fotoperíodos desfavorables para la floración. En *Xanthium* y *Pharbitis* un fotoperíodo inductivo adecuado de un único día es suficiente para iniciar cierta respuesta de floración.

Además de las hojas, otras partes de las plantas pueden también ser responsables de la fotoinducción. Se ha podido observar que plantas defoliadas de *Chenopodium amaranticolor* son inducidas a florecer si se sitúan en condiciones inductivas de día corto, por lo que la percepción de la duración del día, en este caso, residiría en el tallo o en las hojas jóvenes de las yemas. No obstante, en las plantas intactas normales se cree que las hojas juegan el papel dominante en la percepción fotoperiódica.

### 31.2.3. Naturaleza hormonal de la floración

De los experimentos de percepción e inducción floral ya se deduce la presencia de una hormona responsable de la iniciación de los primordios florales. Pero ha sido fundamentalmente por experimentación con injertos interespecíficos como se ha llegado a la evidencia fisiológica de la existencia de una hormona específica de la floración, a la que Chailakhyan, en 1936, denominó *florigeno*. Desde estas primeras experiencias han sido muchos los intentos de extraer e identificar químicamente esta hipotética hormona, pero, hasta el momento, los resultados no han sido positivos. En las contadas ocasiones en que se ha comprobado un estímulo de la floración por sustancias naturales de la planta, este hecho sólo ha tenido un carácter limitado a aquellas experiencias o especies vegetales estudiadas y no el carácter general que habría que adscribir al florigeno. Entre este tipo de hallazgos limitados se cita el ácido salicílico, obtenido por aplicación de áfidos a *Xanthium*, que causó la floración de la PDL *Lemna gibba*. No obstante, el ácido salicílico no induce la floración en *Xanthium* ni aplicado solo ni en combinación con GA<sub>3</sub> y/o kinetina, además de estar presente tanto en la fase vegetativa como en la floración de *Xanthium*. En otras ocasiones el posible candidato ha sido un esteroide, ausente en la fase vegetativa y presente en la floración, tal como se ha comprobado para las PDL *Hyoscyamus niger* y *Salvia splendens* y para las PDC *Perilla ocymoides* y *Chenopodium rubrum*.

La mayor dificultad para esta identificación química del florigeno estriba en la inexistencia, al revés del caso de los otros tipos de fitohormonas conocidos, de una valoración biológica con que poder estudiar los diferentes extractos vegetales y en la gran variedad de procedimientos químicos que se requieren para detectar y aislar una sustancia de naturaleza química desconocida y presente en cantidades no muy elevadas, en un material tan complejo químicamente como puede ser, por ejemplo, el floema, una hoja inducida o un meristemo en diferenciación floral.

El mismo Chailakhyan ha reelaborado, en sucesivas ocasiones, adaptándolo a los conocimientos de cada momento, su primitiva teoría hormonal de la floración, de forma que en una segunda interpretación estableció la hipótesis del florígeno como un complejo bicomponente complementario de hormonas de la floración. De este grupo de dos hormonas que compondrían el florígeno, las giberelinas serían las responsables esenciales de la formación y crecimiento de los tallos florales, como fase previa a la floración, mientras que el segundo grupo, al que denominó *antesinas*, serían las hormonas que inducirían la formación floral y asegurarían el paso a la segunda fase de la floración. Según esta hipótesis del florígeno (Fig. 31.2) las giberelinas serían

INDUCCIÓN PDC Y PDL. MECANISMOS DE FORMACIÓN DE HORMONAS DE FLORACIÓN

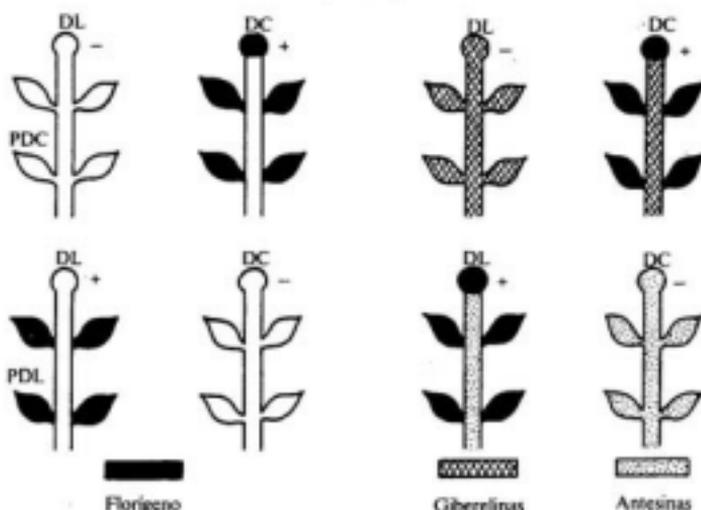


Figura 31.2.—Hipótesis del florígeno de Chailakhyan. A la izquierda, inducción fotoperiódica del florígeno en DC para las PDC y en DL para las PDL. En condiciones no inductivas no florece. A la derecha, interpretación de la hipótesis del florígeno como bicomponentes complementarios (antesinas + giberelinas). Las PDC forman siempre giberelinas (mecanismo autónomo), pero sólo antesinas en condiciones inductivas (DC). Las PDL forman siempre antesinas (mecanismo autónomo), pero sólo giberelinas en condiciones inductivas (DL) (según M. K. Chailakhyan, *Plant Growth Regulation*, Springer-Verlag, Berlín, 1977).

esenciales para la floración de las plantas de día largo, que en todo momento dependerían de antesinas, mientras que las antesinas lo serían de las plantas de día corto para las que las giberelinas nunca sería el factor limitante. Por la misma razón, el injerto entre una especie de día corto con otra de día largo, en condiciones no inductivas, provocan la floración por la presencia simultánea de las giberelinas y antesinas que componen al florígeno. Esta interpretación, aparentemente tan sencilla, ha sido cuestionada en varias ocasiones debido a las contradicciones experimentales que hacen difícil su generalización y a la falta de evidencias químicas sobre la naturaleza y existencia de la hipotética antesina.

Otras veces las contradicciones experimentales obtenidas han hecho pensar no sólo en la existencia del florigeno u hormona estimulante de la floración, sino que también la inducción floral podría producirse por eliminación de inhibidores o de un balance entre ambos mecanismos. Así, si una hoja de *Kalanchoe* es expuesta a condiciones inductivas de DC y el resto de la planta permanece en DL no se produce la floración. Basta separar todas las hojas por encima de la hoja en condiciones de DC y dejar en DL sólo las hojas por debajo para que florezca la planta. En estudios de extractos de hojas de *Kalanchoe* en condiciones inductivas o no inductivas se aisló, para esta especie, el ácido gálico como el posible inhibidor de la floración presente sólo en condiciones no inductivas de DL.

Más recientemente, Lang et al. han conseguido la floración de plantas de tabaco de DN «Trapezond» injertadas con *Nicotiana sylvestris* (PDL) o con *Hyoscyamus niger* (PDL) bajo condiciones de DL, pero ambas plantas no florecen en DC a pesar de que las plantas control de «Trapezond» florecen en DC. En este caso cabe pensar que en DC la PDL (*N. sylvestris* o *H. niger*) produce un inhibidor que, por medio del injerto, es transportado a la PDN (tabaco) en donde se contrapone al estímulo floral y, además, determina en el tabaco una tendencia a desarrollo vegetativo en roseta.

De este modo, por el momento, puede concluirse que a pesar de haber transcurrido más de cuarenta años desde que se sugirió la existencia de una hormona específica de la floración, el florigeno, ésta químicamente no ha podido todavía ser detectada en las plantas y que se requiere de un cuerpo menos contradictorio de resultados experimentales para poder avanzar en el conocimiento teórico del mecanismo hormonal de la floración.

#### 31.2.4. Interacciones luz-oscuridad en el fotoperiodismo

Las respuestas de las plantas a una secuencia determinada de períodos luminicos y de oscuridad, y la distinción entre la duración de estos períodos, presupone un mecanismo por parte de la planta, de percepción y medida del tiempo. En su hábitat natural las plantas pueden variar grandemente en la duración relativa día-noche, desde casi constantemente 12 horas en el ecuador a 0-24 horas en el círculo ártico. Experimentalmente ya hemos visto cómo pueden comprobarse diversos tipos de respuestas fotoperiódicas. No es, por tanto, extraño que las plantas frente a estas variaciones estacionales, a lo largo de la evolución, hayan adquirido la capacidad de distinguir entre la luz y la oscuridad.

Si bien en un principio se centró todo el interés en la duración del día (día largo o día corto) pronto se comprobó, por experiencias de interrupción de la oscuridad por luz, que el período oscuro jugaba un papel central en la medición del tiempo fotoperiódico. Por esta razón, por parte de algunos investigadores, se estableció que las plantas de día largo en realidad correspondían a plantas de *noche corta* y, a la inversa, las plantas de día corto a plantas de *noche larga*, reconociendo así la importancia de un período oscuro crítico.

En la figura 31.3 pueden observarse los resultados de distintas variantes de fotoperiodos y el influjo relativo de la interrupción del período lumínico por la oscuridad o del oscuro por la luz, todo ello referido a la floración de PDL y PDC. De estos resulta-

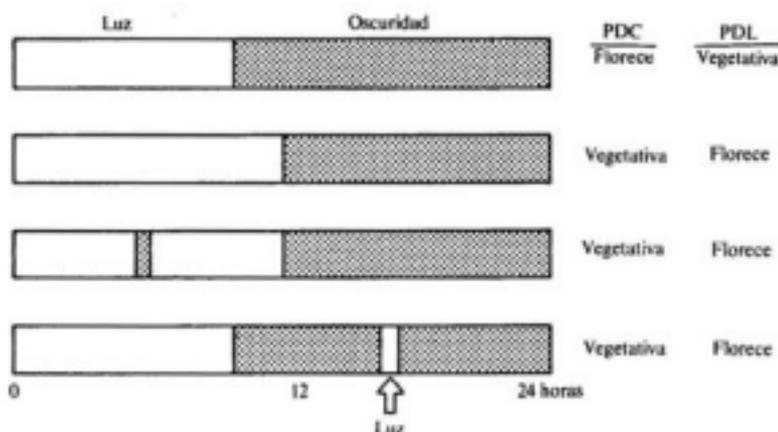


Figura 31.3.—Experiencias de interrupción del período luminoso por oscuridad y del período oscuro por luz. Obsérvese el papel decisivo del período oscuro (nictiperiodo).

dos se deduce el papel crítico que juega el período oscuro y la duración relativa de la luz-oscuridad. Una breve interrupción del período oscuro por luz de baja intensidad es suficiente para invertir el comportamiento de la planta. Se comprueba así que las PDL requieren de noches cortas y las PDC de noches largas, como lo demuestra las interrupciones, por la luz, de la oscuridad. Así una PDL, en condiciones no inductivas (día corto o noche larga) puede florecer, bastando para ello, por lo general, iluminar únicamente unos minutos durante la noche.

El efecto de interrupción de la oscuridad varía considerablemente según el momento en que ocurre la interrupción. En un principio se creyó que el momento más efectivo para la interrupción, por la luz, era sobre la mitad del período oscuro de 12-16 horas. Posteriormente, con experiencias con ciclos distintos a los diarios de 24 horas y con el uso de períodos oscuros de mayor duración, se ha comprobado que el máximo efecto de interrupción de la oscuridad por la luz en las PDC *Pharbitis nil* y *Glicine max* var. *Biloxi* ocurría ya a las 8-10 horas después del inicio de un período oscuro de 40-48 horas. Idénticos resultados se comprobaron para las PDL *Hyoscyamus niger* y *Lolium temulentum*. Se han dado diversas sugerencias para explicar este comportamiento. Cada día se tiende más a creer que esta variación de sensibilidad a las interrupciones por luz de la oscuridad se deben a la existencia de ritmos endógenos (medida del tiempo por un reloj biológico).

A pesar de que las PDC requieren para florecer de noches largas, este efecto inductivo no se consigue si no va precedido de un período luminoso. Esta necesidad de un cierto período diferencial de luz en las PDC y PDL no depende únicamente del aporte nutritivo y metabólico de la fotosíntesis (requerimiento trófico), sino que va ligada al mecanismo de la fotomorfogénesis de la planta (efecto inductivo). De aquí que durante el período luminoso se pueda utilizar parcialmente luz de menor intensidad (Cap. 30).

## 31.2.5. Participación del sistema fitocromo en la floración

El estudio del espectro de acción de estas interrupciones, por la luz, del período oscuro y las experiencias de reversión por rojo cercano y rojo lejano demuestran que el *fitocromo* es el fotorreceptor para la inducción floral. Basta el suministro de unos pocos minutos de rojo cercano de baja intensidad durante la noche a una planta de día largo, situada en condiciones no inductivas (DC), para que se produzca la floración (Fig. 31.4). Esta floración puede ser inhibida si, inmediatamente después del rojo cerca-

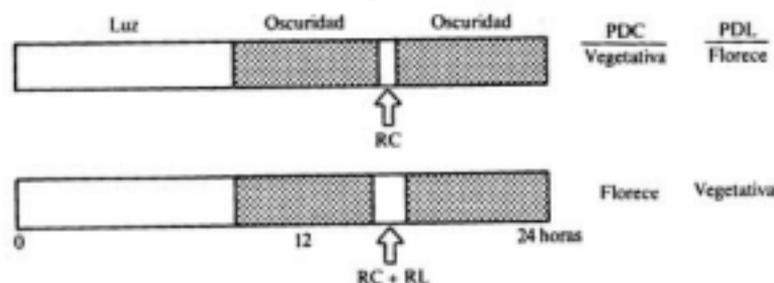


Figura 31.4.—Experiencias demostrativas de que el fotorreceptor del fotoperiodismo es el fitocromo.

no, se suministra rojo lejano. Es decir, este programa lumínico demuestra el antagonismo entre el rojo cercano y el rojo lejano y su carácter reversible, condiciones atribuibles al sistema fitocromo.

Para las distintas especies y comportamientos fotoperiódicos de las plantas, el esquema anterior no parece ser tan sencillo. En muchas respuestas de día largo, la luz no sólo parece antagonizar el efecto de la oscuridad, sino que también tiene un efecto positivo que requiere de exposiciones de día largo. En muchas plantas de DC se ha comprobado la inhibición de la floración por el rojo lejano aplicado al final del fotoperiodo o al inicio de la noche. Las respuestas fotoperiódicas de las plantas parecen depender de procesos que ocurren en «día largo» y en «noche larga». Así la floración de la mayoría de plantas de DC parecen depender primariamente de los procesos de noche larga, pero en el fresal y probablemente también en *Portulaca oleracea* la floración es controlada principalmente por un proceso inhibitorio que ocurre en días largos. En la mayoría de plantas de día largo, la floración parece depender fundamentalmente de los procesos de día largo, pero se citan efectos de noche larga, acelerados por días largos, de forma que la separación del efector inhibitorio de la oscuridad origina cierta floración que se incrementa grandemente si se expone a días largos.

Otra observación interesante a destacar es que en las PDC aunque el  $P_f$  (Cap. 30), producido por interrupción por la luz de la oscuridad, *inhibe* la floración, también estas plantas requieren  $P_f$  en ciertas fases del ciclo diario. En *Pharbitis nil* la floración se ve retrasada si se suministra una corta exposición de rojo lejano al final del día antes de transferirlas a la oscuridad. Esta inhibición es revertida por un tratamiento breve

subsiguiente con rojo cercano, mostrando espectros de acción para la reversión típicos del fitocromo.

En este sentido, la mayoría de las investigaciones indican que el fitocromo tiene una acción dual en la floración de las PDC. La inducción floral requiere primero una reacción que depende de la presencia de la forma  $P_{fr}$  del fitocromo, mientras que posteriormente en el ciclo se inhibe la floración al formarse  $P_{fr}$  por luz roja.

Un comportamiento fotoperiódico bastante generalizado es que:

- La forma activa del fitocromo,  $P_{fr}$ , en el período oscuro *estimula* la floración de las PDL e *inhibe* la de las PDC.
- Una necesidad para *ambos* tipos de plantas de un período lumínico en el que claramente actúa  $P_{fr}$ .
- Una fluctuación de la sensibilidad de la planta a  $P_{fr}$  a lo largo del ciclo diario.

Una interpretación sencilla del mecanismo molecular de la inducción floral, que requiere de posteriores comprobaciones, sería que  $P_{fr}$  durante el período crítico nocturno *activaría* en las hojas a los genes responsables de la síntesis del florigeno en las PDL (*inducción fotoperiódica*). Por transporte, desde las hojas al sitio de acción (meristemas), el florigeno causaría la *evocación* (procesos que ocurren en el ápice en el período entre la llegada del estímulo floral y los primeros síntomas morfológicos de la floración) por *activación* de los genes responsables de la iniciación floral. Por el contrario, un cierto nivel mantenido de  $P_{fr}$  durante el período oscuro de PDC *reprimiría* a los genes responsables de la síntesis del florigeno, por lo que sólo en noches largas, por reversión oscura de  $P_{fr}$  a  $P_r$ , las hojas alcanzarían los bajos niveles de  $P_{fr}$  necesarios para la desrepresión genética y la síntesis del florigeno.

Las evidencias de la regulación de la actividad genética en la floración provienen sobre todo de estudios histoquímicos (diferenciación del meristemo vegetativo a floral) y bioquímicos (fundamentalmente por empleo de inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas). No obstante, se desconoce todavía la naturaleza química del florigeno y faltan aún un cuerpo menos ambiguo de evidencias para establecer con seguridad el mecanismo molecular de la floración.

### 31.2.6. Ritmos endógenos y fotoperiodismo

El análisis del comportamiento fotoperiódico de las plantas frente a las variaciones diarias de luz-oscuridad indica la existencia en la planta de algún mecanismo de medida del tiempo (*reloj biológico*). Desde hace tiempo se conoce la existencia de estos relojes biológicos y de su manifestación en forma de *ritmos endógenos*, que pueden actuar independientemente de los factores externos. En las plantas los casos mejor estudiados de estos ritmos endógenos son los *ritmos circadianos*, denominados así por tener un ritmo cercano a las 24 horas si se sitúa en un medio externo constante.

En los apartados anteriores hemos visto cómo los fenómenos fotoperiódicos de la planta establecen una interacción entre las *fotoseñales* del medio y el comportamiento y ciclo de desarrollo de la planta, de forma que, por mediación del sistema fitocromo, la

planta capta estas señales informativas y las utiliza para ajustar su ritmo de crecimiento y de desarrollo al de las condiciones estacionales más óptimas en su hábitat (por ejemplo, floración en primavera en las PDL). También hemos constatado la existencia de muchas evidencias experimentales por las que se comprueba un cambio diario en la sensibilidad a la acción del fitocromo activo,  $P_{fr}$ , en el fotoperiodismo.

Es aún muy difícil el dar la naturaleza exacta del mecanismo de participación del fitocromo en el fotoperiodismo, como intermediario entre las variaciones lumínicas del medio y la existencia de estos ritmos endógenos de las plantas. Inicialmente se pensó que el fitocromo podría ser el «cronómetro» y adaptador de fase para estos ritmos circadianos. Los mecanismos de transformación del fitocromo (nivel de  $P_{fr}$  por las fototransformaciones, reversión oscura, degradación, etc.) podrían así actuar, en cierto modo, como medidores del tiempo mediante un sistema del tipo del «reloj de arena». Las evidencias fisiológicas, no obstante, más bien hablan de un sistema de «oscilador endógeno» del tipo, por ejemplo, del péndulo, que es difícil de adscribir funcionalmente al fitocromo. Más allá de estas evidencias nuestro conocimiento, en este campo, es aún excesivamente fragmentario y hace difícil una generalización sobre la participación e interacción manifiesta del fitocromo con los ritmos circadianos de naturaleza, aunque no de existencia, aún dudosa.

### 31.3. Vernalización: descubrimiento y concepto

La intensidad y la duración de la luz diaria no es el único factor cambiante del medio. La temperatura sufre también variaciones estacionales y fluctuaciones diarias que pueden llegar a tener su importancia incluso en nuestros climas templados. Al igual que en el caso de la luz, la planta usa de estas variaciones de la temperatura como *señales y estímulo* para la regulación de su ciclo de desarrollo.

El primer estudio en profundidad del influjo de la temperatura sobre las plantas se debe a J. Gustav Gassner en 1918 en Alemania, quien comparó la acción de diversas temperaturas (2, 5, 12 y 24° C) sobre el desarrollo de la variedad «Petkus» de invierno del centeno (*Secale cereale*) y sobre la correspondiente variedad de primavera. En los cereales (trigo, centeno, etc.) se distingue entre la variedad de «invierno», que se siembra en otoño, pasa el frío invernal, en estado de plántula, crece longitudinalmente y florece en verano, y la variedad de «primavera», que se siembra en primavera y florece en el verano del mismo año. Si en la variedad de invierno se retrasa su siembra hasta la primavera no florece, sino que permanece vegetativo en el verano. Gassner comprobó que únicamente florecían las variedades de invierno que habían recibido bajas temperaturas durante la germinación (2° C). Por el contrario, la variedad de primavera (anual) no manifestaba ningún influjo por las bajas temperaturas sobre la floración. Gassner concluyó que mientras las condiciones de temperatura en las primeras fases de crecimiento no afectaban a la floración del centeno de primavera, en cambio, la variedad de invierno precisaba de un período frío, durante la germinación o posteriormente, para inducir la floración.

En Rusia este tipo de trabajos recibieron una gran atención sobre todo en los años

treinta, fundamentalmente por parte de Lysenko. La inclemencia de los inviernos rusos hacía prácticamente imposible la siembra en otoño de la variedad de invierno de los cereales. Se trataba de un problema económico grave, puesto que la variedad de invierno es más eficiente que la de primavera. Por otra parte, el corto período de buen tiempo dificultaba una buena recolección de los cereales de primavera. En 1931 Lysenko publicó una técnica de modificación experimental del ciclo de desarrollo de los cereales de invierno por influjo de una refrigeración adecuada. El tratamiento frío requerido por el trigo de invierno era aplicado a las *semillas embebidas parcialmente* (el agua necesaria para que las semillas iniciaran la germinación y el crecimiento del embrión, pero sin llegarse a completar dicha germinación). En estas condiciones, los cereales de invierno eran capaces de fructificar en las mismas circunstancias que los cereales de primavera, es decir, sembrados en primavera florecían y fructificaban en verano, evitando así los peligros del invierno crudo. Este tipo de inducción de la floración por tratamiento frío ha pasado a denominarse *vernalización*.

En sentido estricto, la vernalización es la promoción específica de la iniciación de la floración por un tratamiento frío previo durante la fase de semilla embebida o de planta joven. Las bajas temperaturas pueden afectar también a otros procesos del desarrollo de las plantas, fundamentalmente a la *dormición* (Cap. 32) y a la *germinación* (Cap. 33), que no se engloban en este concepto y que se consideran en los correspondientes capítulos.

La vernalización es un fenómeno inductivo y de carácter no general que provoca una potencialidad o aptitud para la floración, pero no una inmediata *evocación* de ella. Normalmente ésta sólo se manifiesta a temperaturas superiores y, muchas veces, requiere de fotoperiodos adecuados. La necesidad de vernalización suele ser más común en las plantas de día largo.

### 31.3.1. Tipos de plantas que requieren vernalización

La vernalización no es un requerimiento general para todas las especies de plantas ni tampoco, las que la precisan, muestran un comportamiento idéntico. Más bien, como también ocurre con el fotoperiodismo, se presenta un abanico adaptativo de respuestas. Igualmente esta necesidad de vernalización puede ser *cualitativa* o *absoluta*, en la que es preciso la acción del frío durante un cierto tiempo para la inducción floral o, simplemente, *cuantitativa* o *facultativa*, por la que el frío únicamente estimula o acelera el tiempo de floración, pudiendo, no obstante, florecer más tarde sin previo tratamiento frío.

Entre los grupos de plantas más característicos que responden a la vernalización están, sobre todo, plantas de día largo con muchas especies monocárpicas bianuales, anuales de invierno y herbáceas perennes. No obstante, no existe necesariamente una relación entre un requerimiento de vernalización y una determinada respuesta fotoperiódica, pues junto a muchas especies que requieren además fotoperiodos de día largo (por ejemplo, *Hyoscyamus niger*), otras son de día neutro (por ejemplo, *Scrophularia vernalis*) o, incluso, de día corto (por ejemplo, *Chrysanthemum morifolium*). En la tabla 31.2 pueden observarse algunos ejemplos representativos de estas distintas modalidades.

TABLA 31.2  
 Algunas especies representativas que requieren vernalización

1. ESPECIES MONOCÁRPICAS (PLANTAS ANUALES O BIANUALES)

A) Requerimiento *absoluto* o *cuantitativo* de vernalización

<i>Beta maritima</i>	<i>Hyoscyamus niger</i>
<i>Beta vulgaris</i>	<i>Lunaria annua</i>
<i>Daucus carota</i>	<i>Oenothera biennis</i>
<i>Digitalis purpurea</i>	

B) Requerimiento *cuantitativo* de vernalización

<i>Avena sativa</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>Brassica rapa</i>	<i>Secale cereale</i>
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Sinapis alba</i>
<i>Lactuca sativa</i>	<i>Spinacia oleracea</i>
<i>Lolium temulentum</i>	<i>Triticum aestivum</i>

2. ESPECIES POLICÁRPICAS (PLANTAS PERENNES)

A) Requerimiento *absoluto* o *cuantitativo* de vernalización

<i>Anagallis tenella</i>	<i>Lolium perenne</i>
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	<i>Poa supina</i>
<i>Dianthus deltoides</i>	<i>Saxifraga rotundifolia</i>

B) Requerimiento *cuantitativo* de vernalización

<i>Chrysanthemum morifolium</i>	<i>Dianthus arenarius</i>
---------------------------------	---------------------------

Además de la importancia histórica que, como hemos visto, han tenido las plantas *anuales de invierno* para el descubrimiento de la vernalización, gran parte de las investigaciones posteriores, para estudiar el mecanismo de este proceso, han proseguido con este tipo de especies, siendo debidas fundamentalmente a Gregory y Purvis en Inglaterra. Las variedades de invierno y de primavera del centeno (*Secale cereale*, var. *Petkus*) difieren genéticamente por un único gen, que determina el comportamiento del frío en la inducción floral, requiriendo, ambas variedades, de fotoperíodos de día largo para la iniciación floral. Estas especies son sensibles a la vernalización de los cereales y su requerimiento de vernalización no es de tipo absoluto, sino *cuantitativo* o *facultativo*.

Las *plantas bianuales* son también plantas monocárpicas, como las anuales de invierno, y desarrollan su ciclo ontogénico durante dos años. El ejemplo más representativo es la variedad bianual de *Hyoscyamus niger* (beleño). Estas plantas, después de germinar al final del verano forman una *roseta*, que se caracteriza por el desarrollo vegetativo de las hojas en la base del tallo, y raíz subterránea de reserva en la época fría del invierno. En la primavera del año siguiente se desarrolla el crecimiento longitudinal del tallo (formación del escapo) que va seguido de la floración.

Se debe fundamentalmente a Melchers y Lang, en Alemania, el estudio del comportamiento frente a la vernalización y el fotoperiodismo de esta especie bianual. Estos

investigadores han demostrado que si el beleño bianual se mantiene continuamente a temperaturas medias, desde su germinación, no forman nunca un tallo florecido, sino que crecen vegetativamente, se desarrollan sin cesar nuevas hojas, pero se mantiene su porte en roseta. Si, por el contrario, se exponen las rosetas a + 5° C durante seis semanas, la planta al retornarla a temperaturas medias forma el escapo y florece, siempre que se halle en condiciones de día largo (fotoperiodo crítico 12 horas). Dos diferencias claras de esta especie respecto a los cereales de invierno son el requerimiento *absoluto* o *cualitativo* de la vernalización y la percepción del estímulo vernalizador en una fase más avanzada que la de germinación o plántula, en la de *roseta* de por lo mínimo de 10 días de edad.

Muchas otras especies bianuales muestran también esta necesidad de vernalización para la inducción de la floración. Entre ellas se ha demostrado experimentalmente este requerimiento frío en variedades de remolacha (*Beta vulgaris*), apio (*Apium graveolens*), col de Bruselas (*Brassica oleracea gemmifera*), *Digitalis purpurea*, *Lunaria biennis*, etc. Aunque con alguna excepción, la mayoría de las plantas bianuales sensibles a la vernalización requieren de tratamientos posteriores de día largo para florecer.

En contraste con el carácter monocárpico de las plantas anuales de invierno y bianuales que requieren vernalización y mueren después de florecer, el grupo de las *plantas perennes* que requieren vernalización se mantienen policárpicas. Este comportamiento paradójico plantea un difícil problema de interpretación de la inducción floral por vernalización, ya que, o bien no todas las yemas reciben la inducción por vernalización o existe en estas plantas un mecanismo de regulación de la inducción vernalizadora.

Entre las especies perennes herbáceas con este comportamiento, un caso bien estudiado es el de *Chrysanthemum morifolium* en el que se ha comprobado que las yemas apicales y axilares se hallan vernalizadas inmediatamente después del tratamiento frío, pero al final del verano las ramas de la base de la planta no están vernalizadas. En *Geum urbanum*, el frío vernaliza únicamente a las yemas situadas en las axilas de ciertas hojas. Numerosas gramíneas perennes de pradera requieren de vernalización para el inicio de la floración (*Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Cynosurus cristatus*, *Dactylis glomerata*, etc.). En la mayoría de estas especies herbáceas vivaces la inducción floral por vernalización se logra en la yema terminal, mientras que las yemas axilares permanecen vegetativas y aseguran el carácter policárpico. La observación del requerimiento vernalizador para las plantas perennes no se limita a las especies herbáceas. También se conocen especies leñosas sensibles al tratamiento vernalizador. Entre ellas el caso mejor estudiado quizá sea el del olivo (*Olea europea*) que exige de un período de vida a bajas temperaturas para iniciar la floración.

### 31.3.2. Localización de la percepción del estímulo vernalizador

Por experiencias de tratamiento localizado del frío a distintas partes de la planta, se ha llegado a la conclusión de que el sitio de percepción de la inducción floral por el frío es en las propias yemas. Basta un tratamiento frío que afecte únicamente a las yemas para que ocurra la inducción vernalizadora y, por el contrario, una acción localizada

únicamente en otros órganos vegetativos de la planta, que no afecte a los meristemos, no induce el estado vernalizado en las yemas. En experiencias de decapitación de yemas vernalizadas de *Raphanus sativus* seguido de injerto, en su lugar, de otra yema no vernalizada, no se indujo la floración. También ha resultado positiva la vernalización directa del embrión o de fragmentos de embrión de centeno en cultivo de tejidos.

Los estudios en Holanda de Wellensiek con hojas de *Lunaria biennis* han demostrado que la percepción de la vernalización no se limita a los meristemos. Cualquier tejido de la planta en fase de división celular es un sitio de percepción potencial de la termoinducción vernalizadora. Un caso extremo de estas investigaciones lo representa el hallazgo de que hojas separadas de plantas no vernalizadas de *Lunaria*, colocadas previamente a + 5° C, son capaces de regenerar una planta entera con capacidad inductiva para florecer.

### 31.3.3. Aspectos fisiológicos de la vernalización

Las temperaturas efectivas en inducir la vernalización suelen ser cercanas y algo por encima a los 0° C. Normalmente, para las distintas especies, los márgenes oscilan de 0 a 10° C, con óptimos entre los 2 y 5° C. El efecto inductor no sólo depende de la temperatura, sino que también está en función del tiempo de exposición al frío. En el centeno de invierno var. Petkus, basta una exposición a 1° C durante 42 días de las semillas en estado de imbibición para que ocurra el efecto vernalizador. En otras especies, sobre todo en las bianuales, la sensibilidad a la vernalización corresponde ya a una fase más avanzada del desarrollo de la planta (fase juvenil del desarrollo vegetativo), como es el caso, por ejemplo, del beleño.

El efecto inductor de la vernalización puede ser revertido, por un tratamiento inmediato posterior, a altas temperaturas (cerca de 30° C). Este efecto se conoce como *desvernalización* y es tanto más intenso cuanto más corto haya sido el tratamiento frío. A pesar de que las altas temperaturas provocan la desvernalización en las primeras fases del tratamiento frío, si éste se ha completado convenientemente, la inducción floral alcanza un valor estable y permanente y se propaga incluso a las nuevas células que se van formando, como lo prueba la capacidad de florecer de una semilla vernalizada o la regeneración vegetativa de nuevas plantas aptas para florecer a partir de una planta vernalizada. En ambos casos, debe existir un mecanismo supuestamente autocatalítico de propagación de la inducción floral desde el momento de su percepción hasta su acción en una fase mucho más tardía del curso de desarrollo de la planta.

Mucho más problemático que para el caso del florigeno es la demostración de una hormona específica de la vernalización, la hipotética *vernalina* de Melchers, entendiendo por tal al compuesto químico que específicamente, y siendo distinto del florigeno, evocaría la floración en las plantas vernalizadas. Se disponen de varias experiencias, alguna de ellas contradictorias, por las cuales se podría deducir la existencia fisiológica de la vernalina. Se trata fundamentalmente de experimentos de injerto entre distintas especies. Uno de los ejemplos más representativos se debe a Melchers y Lang y proviene del injerto entre la planta de día corto *Nicotiana tabacum* var. Maryland Mammoth y

la planta de día largo *Hyoscyamus niger*. El tabaco fue capaz de inducir la floración del beleño no vernalizado manteniendo el injerto en fotoperíodos de día largo. El tabaco permaneció vegetativo. En estas condiciones, la floración del beleño no era atribuible a la transmisión de florigeno desde el dador (tabaco). No obstante, si se usaba como dador plantas anuales de *Hyoscyamus niger*, los aceptores bianuales no vernalizados florecieron sólo cuando el dador se mantenía en día largo. Por otra parte, si se usa como dador *Hyoscyamus* bianual sólo se induce la formación de flores en *Nicotiana tabacum* var. Maryland Mammoth si previamente el dador ha sido vernalizado, lo que refuerza la idea de que la vernalina y el florigeno no son una misma sustancia. En otras ocasiones, los resultados han sido más desalentadores. Schwabe no fue capaz de inducir la floración en plantas no vernalizadas de *Chrysanthemum* (PDC) por injerto con plantas vernalizadas.

En ocasiones, se ha aducido que las giberelinas fueran la hipotética vernalina. La mayoría de los fisiólogos vegetales se inclinan más bien por no aceptar esta interpretación, ya que a pesar de que las giberelinas pueden sustituir al tratamiento frío en PDL situadas en condiciones de fotoperíodo inductivo, este hecho no es generalizable a todas las especies y tipos de respuestas fisiológicas y, además, la acción de las giberelinas es más específica del alargamiento previo del tallo que del proceso propiamente dicho de la iniciación floral que es el característico de la vernalización, como se puede observar en muchas yemas vernalizadas (Fig. 31.5).

Hasta el momento no se dispone de un esquema molecular de los posibles cambios accionados por la vernalización para evocar e inducir la floración. La necesidad de condiciones aerobias y nutritivas, la influencia negativa de diversos antimetabolitos y los datos disponibles sobre el estímulo de la síntesis de los ácidos nucleicos y proteínas en el proceso de la vernalización parecen indicar que se trata más bien de un verdadero proceso metabólico más que de un simple mecanismo físico por el frío.

En la figura 31.6 se muestra un esquema hipotético, que a veces se ha generalizado, y en el que se tiene en cuenta la posibilidad de desvernalización en fases previas y la interacción con los fotoperíodos. Según esta interpretación formal, la vernalización requeriría del suficiente tiempo de acción del frío para que puedan ocurrir las reacciones de transformación del compuesto A a un intermediario inestable B, con posibilidad de desvernalización por altas temperaturas, por conversión en D, o bien, si continúa la acción vernalizadora del frío, B se convertiría en el compuesto estable C que representaría la hipotética vernalina. Cuando además se dan las condiciones inductivas del fotoperíodo adecuado se sintetizaría el florigeno que por transporte a los meristemas evocaría la iniciación de los primordios florales.

Otro punto oscuro en la interpretación de la vernalización es su interacción con los requerimientos fotoperiódicos. El caso más general es el de las plantas en donde se halla asociada la necesidad de vernalización con la de fotoperiodismo, sobre todo de día largo. Un ejemplo representativo bien estudiado es la variedad bianual de *Hyoscyamus niger* la cual sólo florece si previamente al fotoperíodo inductivo de día largo ha estado sometida a vernalización. De lo contrario, permanece en estado vegetativo. La misma necesidad de vernalización, seguida de fotoperíodo de DL, se puede presentar también en plantas perennes, como es el caso de *Lolium perenne* (rye-grass).

Aunque menos comúnmente, también se presentan requerimientos de vernaliza-



Figura 31.5.—Giberelinas y vernalización. Plantas de *Daucus carota* en DL: izquierda, control no tratado por el frío y sin adicionar giberelinas; centro, sin vernalizar pero tratado con giberelinas (10  $\mu$ g/día); derecha, plantas tratadas por frío durante 6 semanas, sin añadir giberelinas (dibujo de A. Lang. «Proc. Natl. Acad. Sci.», volumen 43, 1957, págs. 709-711).



Figura 31.6.—Esquema hipotético de la vernalización.

ción y fotoperíodo inductivo de DC. A este grupo pertenecen distintas variedades de crisantemo de jardín.

En ciertos casos, el requerimiento fotoperiódico puede sustituir a la vernalización, o a la inversa. Así, se ha observado que un tratamiento con día corto puede sustituir parcialmente o por completo el tratamiento con frío en determinadas especies que normalmente son PDL. También se ha visto que en ocasiones la vernalización es capaz de sustituir el requerimiento fotoperiódico. Por ejemplo, la remolacha azucarera bianual que requiere normalmente vernalización y día largo es capaz de florecer con un tratamiento prolongado de frío en día corto (fotoperíodo no inductivo).

Desde el punto de vista genético, como ya hemos indicado (31.3.1), las variedades de invierno y de primavera del centeno difieren por un único gen que determina el comportamiento del frío en la inducción floral. Para esta especie la variedad de invierno (que requiere de vernalización) es recesiva frente a la de primavera (que no requiere de vernalización). Por el contrario, en el beleño, también adscribible a la diferencia genética de un único gen, la variedad bianual (que requiere de vernalización) es dominante sobre la anual (que no requiere de vernalización). En otras especies, como el *Lolium perenne*, participan más genes.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BERNIER, G. (ed.): *Cellular and Molecular Aspects of Floral Induction*, Longman, Londres, 1970.
- BERNIER, G.; KINET, J., y SACHS, R. M.: *The Physiology of Flowering*, vols. I, II y III, CRC Press, Boca Raton, 1981 y 1985.
- BUNNING, E.: *Die Physiologische Uhr. Dritte Auflage*, Springer-Verlag, Berlín, 1977, 1968, págs. 1-36.
- CHAILAKHYAN, M. K.: *Hormonal Regulators of Plant Flowering*, en: *Plant Growth Regulation*, P. E. Pilet (edit.), Springer-Verlag, Berlín, 1977, págs. 258-272.
- EVANS, L. T.: *Flower Induction and the Florigen Concept*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 22, 1971, págs. 365-394.
- JACQUES, R.: *Lumière, phytochrome et floraison*, «Physiol. Vég.», vol. 17, 1979, págs. 407-419.
- LANG, A.: *Physiology of Flower Initiation*, en: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg-Nueva York, vol. 15/1, 1965, págs. 1380-1536.
- LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B., y ZIEGLER, H.: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 12A, Springer-Verlag, Berlín, 1981.
- PICARD, C.: *Aspects et mécanismes de la vernalisation*, Masson et Cie, París, 1968.
- SALISBURY, F. B.: *Responses to Photoperiod*, en: *Physiological Plant Ecology I* (Edit. O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond y H. Ziegler), *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 12, Springer-Verlag, Berlín, 1981, págs. 135-168.
- SUTCLIFFE, J.: *Las plantas y la temperatura*, Omega, Barcelona, 1979.
- THOMAS, B., y VINCL-PRUE, D.: *Juvenility, Photoperiodism and Vernalization*, en: *Advanced Plant Physiology* (Edit. M. B. Wilkins), Pitman, Londres, 1984, págs. 408-439.

- VINCE-PRUE, D.: *Photoperiodism in Plants*, McGraw-Hill, Londres, 1975.
- VINCE-PRUE, D.: *Phytochrome and Photoperiodism*, en: *Light and Plant Development*, H. Smith (edit.), Butterworths, Londres, 1976, págs. 347-369.
- VINCE-PRUE, D.: *Photomorphogenesis and Flowering*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 16B: *Photomorphogenesis* (Edit. W. Shropshire, Jr. y H. Mohr), Springer-Verlag, Berlín, 1983, págs. 457-490.
- VINCE-PRUE, D.: *Photoperiod and Hormones*, en: *Hormonal Regulation of Development III* (Edit. R. P. Pharis y D. M. Reid), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 11, Springer-Verlag, Berlín, 1985, págs. 308-364.
- VINCE-PRUE, D.; BRYAN, Th., y COCKSHULL, K. E. (eds.): *Light and the Flowering Process*, Academic Press, Londres, 1984.
- WAREING, P. F., y SMITH, H.: *Photoperception by Plants*, The Royal Society, Londres, 1983.
- ZEEVAART, J. A. D.: *Phytohormones and Flower Formation*, en: *Phytohormones and Related Compounds - A Comprehensive Treatise*, vol. II, D. S. Letham, P. B. Goodwin and T. J. V. Higgins (eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978, págs. 291-327.

## DORMICIÓN DE YEMAS Y SEMILLAS

Casi todos los vegetales pasan en algún momento de su ciclo biológico por una fase de dormición, bien en forma de esporas, caso de las plantas inferiores, o bien en forma de semillas en las plantas superiores. Sin embargo, no son sólo las esporas o semillas los órganos vegetales capaces de entrar en fase de dormición, sino que también otros órganos como yemas, tubérculos, rizomas o bulbos pueden presentarla. Fuera de las regiones tropicales, todos los vegetales se encuentran sometidos a unas variaciones climáticas y ambientales, cuyo resultado es una alternancia singular de periodos favorables y desfavorables para el crecimiento. Generalmente, las fases de dormición coinciden con los periodos de condiciones desfavorables para el crecimiento, como pueden ser, temperaturas bajas o elevadas, periodos de sequía, fotoperiodos no apropiados, etc. Las plantas responden a estas condiciones mediante una interrupción del crecimiento y formación de órganos de resistencia, y así permanecen hasta que las condiciones vuelven a ser favorables para su desarrollo. Por ello, la dormición desempeña un papel muy importante en la supervivencia de las especies vegetales, ya que impedirá que éstas continúen su desarrollo bajo condiciones no adecuadas, salvándolas de una muerte segura.

A lo largo de los últimos 20 años se han hecho muchos intentos para tratar de definir con precisión qué se entiende por dormición; una de las definiciones más precisas es la formulada por Wareing, que la define como un estado en el que el crecimiento de una planta completa o de un determinado órgano vegetal queda temporalmente interrumpido. En algunas especies esta interrupción se debe a la presencia de condiciones ambientales desfavorables, tal como ocurre con la mayoría de las plantas típicas de praderas que se mantienen en crecimiento continuo durante los inviernos suaves y que interrumpen su crecimiento sólo cuando las temperaturas descienden por debajo de 5° C; de igual forma, algunas malas hierbas anuales tales como *Senecio vulgaris* o *Capsella bursa-pastoris* sólo detienen su crecimiento durante los periodos más fríos del invierno. En tales casos se habla de una *dormición impuesta* o *quiescencia*. En otros casos, sin embargo, no son las condiciones desfavorables la causa directa de la dormición. Así, nos encontramos cómo muchos árboles de zonas templadas forman las yemas de invierno en agosto, cuando las condiciones de iluminación y temperatura son todavía adecuadas para el crecimiento. Lo mismo ocurre con muchas semillas que son incapaces de germinar aunque se las coloque en condiciones óptimas para la germinación. En tales casos, la dormición parece estar causada por condiciones adversas dentro del propio órgano que entra en esta fase de dormición, hablándose entonces de *dormición innata* o *espontánea*.

El estado de dormición no se alcanza instantáneamente, sino que va desarrollándose gradualmente a lo largo de un determinado periodo de tiempo. Durante esta fase, llamada de pre-dormición, es posible inducir la reanudación del crecimiento de la planta u órgano vegetal mediante algunos tratamientos, tales como elevar la temperatura o una defoliación. Según la dormición va progresando, es cada vez más difícil inducir la reanudación del crecimiento por cambios en las condiciones ambientales, entrando, entonces, el vegetal u órgano vegetal en una fase de dormición total. A esta fase sigue otra de gradual salida de la dormición, que se denomina de post-dormición y durante la cual es cada vez más fácil inducir la reanudación del crecimiento. En muchos casos, es posible inducir una dormición total en órganos que no han terminado de salir completamente de la dormición, o incluso en órganos perfectamente aptos para el crecimiento, mediante ciertas condiciones ambientales, como una temperatura elevada. En tales casos se habla de una *dormición inducida o secundaria*.

### 32.1. Dormición de yemas

La mayoría de las especies leñosas de las zonas templadas presentan dormición de las yemas durante algún momento de su ciclo anual de crecimiento. En estas especies, la dormición de las yemas está asociada con la supervivencia de los ápices vegetativos durante los meses de invierno y también con la presencia de una floración temprana, permitiendo que los ápices florales que se diferencian durante la estación de crecimiento queden protegidos hasta la siguiente primavera. Una de estas yemas resistentes contienen generalmente un número considerable de primordios foliares cuyo crecimiento ha sido interrumpido por el comienzo de la dormición. Estos primordios pueden estar rodeados por un cierto número de escamas que pueden ser estipulas modificadas como en *Betula*, *Fagus* y *Quercus* o bien hojas ligeramente modificadas, como en *Viburnum*, o fuertemente modificadas, como en *Acer*, *Fraxinus*, *Malus*. Estas escamas previenen contra la desecación de las yemas, aíslan contra la pérdida de calor y restringen el movimiento de oxígeno hacia los primordios foliares, manteniéndose así su actividad metabólica muy baja o nula. En cierto sentido, las escamas de las yemas son análogas a las envueltas seminales. Durante el desarrollo de tales yemas se observa, en primer lugar, una interrupción en el crecimiento en extensión de los primordios foliares y del crecimiento de los entrenudos, lo que hace que la yema adopte una estructura telescópica. La actividad meristemática del meristemo apical continúa todavía por algún tiempo, con lo que se forman nuevos primordios foliares. Simultáneamente, en algunos de los primordios foliares más exteriores se observa un mayor crecimiento marginal que en aquellos que se van a transformar en hojas normales; éstos son los que darán lugar a las escamas de la yema o catafilos. Posteriormente la yema se hincha y todo el crecimiento y actividad meristemática queda interrumpido. Este esquema de formación de yemas de resistencia es similar tanto en yemas apicales como axilares. El crecimiento de las yemas axilares es, en un principio, inhibido por dominancia apical, como puede demostrarse decapitando la yema apical y observar cómo se reanuda el crecimiento de la yema axilar. Sólo al cabo de algún tiempo presentan estas yemas la dormición innata y ya su crecimiento no puede inducirse decapitando la yema apical. En algunos géneros

como *Tilia*, *Ulmus*, *Castanea* y *Robinia* no se forma una yema apical, ya que el crecimiento del tallo se termina por muerte y abscisión de la zona apical, y el crecimiento se reanuda posteriormente, a partir de la yema axilar más próxima a la apical; estos géneros, se dice que presentan un tipo de crecimiento simpodial. Las yemas apicales formadas como resultado de la terminación del crecimiento estacional del tallo tampoco presenta una dormición innata de inmediato, ya que se puede inducir la reanudación del crecimiento mediante una defoliación manual o por ataque de insectos. No es hasta que ha transcurrido cierto tiempo cuando alcanzan el estado de dormición total. Después de un cierto período en este estado de dormición total, las yemas son capaces al final del invierno y principio de primavera de reanudar el crecimiento cuando las condiciones externas, particularmente la temperatura, son más favorables.

### 32.1.1. Inducción de la dormición

La longitud de los días es probablemente el factor más importante relativo al control de la inducción de la dormición en yemas. Aunque se han encontrado algunas excepciones, como las Oleáceas y algunos árboles frutales cultivados como *Pyrus*, *Malus* y *Prunus* que parecen ser insensibles a la longitud de los días, en la mayoría de las especies estudiadas se ha observado que los días largos promueven el crecimiento vegetativo, mientras que los días cortos provocan una interrupción del crecimiento en extensión y la formación de yemas de resistencia (tabla 32.1).

TABLA 32.1

Relación de algunas especies leñosas que forman yemas de resistencia como respuesta a los días cortos

<i>Aesculum hippocastanum</i>	<i>Liriodendrum tulipifera</i>	<i>Prunus persica</i>
<i>Alnus incarna</i>	<i>Morus alba</i>	<i>Quercus spp</i>
<i>Catalpa speciosa</i>	<i>Picea abies</i>	<i>Ribes nigrum</i>
<i>Cercis canadensis</i>	<i>Pinus spp</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>
<i>Corylus avellana</i>	<i>Platanus occidentalis</i>	<i>Taxus baccata</i>
<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Populus spp</i>	<i>Ulmus americana</i>

Modificado de Wareing y Phillips.

Las plántulas de algunas especies leñosas, como *Robinia pseudoacacia*, *Betula pubescens* y *Larix decidua*, son muy sensibles a la longitud del día y pueden mantenerse en invernadero en crecimiento continuo durante 18 meses bajo condiciones de día largo; sin embargo, bajo condiciones de día corto el crecimiento se interrumpe en unos 14 días. En estas especies parece existir una longitud crítica del día por debajo de la cual se induce la dormición, y que por encima de esa longitud crítica, ésta no se presenta. Al igual que la inducción de la floración en las plantas herbáceas, también en la inducción

de la dormición juega un papel importante la duración del período oscuro. También aquí se ha demostrado que una interrupción del período oscuro con una breve iluminación provoca un retraso de la dormición, siendo la luz roja la más efectiva del espectro; este hecho, junto con la reciente demostración en plántulas de *Larix decidua* de la reversibilidad rojo/rojo lejano, implican claramente al fitocromo en la regulación de este fenómeno. El lugar de percepción del estímulo fotoperiódico parecen ser las hojas, como fue brillantemente demostrado por Wareing, en 1954, con plántulas de *Acer pseudoplatanus*. Si las plántulas defoliadas, excepto dos pares de hojas maduras, se colocaban en condiciones de día corto, formaban rápidamente una yema terminal, fenómeno que podía evitarse o bien eliminando las hojas o bien sometiénolas a iluminación continua. Si las plantas que habían formado una yema se colocaban en condiciones de día largo, no se reanudaba el crecimiento del tallo, lo que hacía suponer que las yemas presentaban una dormición innata. Este resultado, junto con otros similares, hicieron nacer el concepto de que el inicio de la dormición innata en las yemas, podría ser desencadenado por la producción de sustancias inhibitorias del crecimiento en las hojas mantenidas bajo condiciones de día corto.

Tanto las yemas laterales como las terminales de la mayoría de los árboles de hoja caduca de las regiones templadas, se encuentran en un estado de dormición innata en el momento de la caída de la hoja durante el otoño. ¿Hasta qué punto son importantes las respuestas fotoperiódicas en condiciones naturales para determinar la formación de yemas y el inicio de la dormición? La disminución estacional normal de la longitud de los días es importante en la determinación del inicio de la dormición en plántulas que normalmente continúan un cierto crecimiento activo durante el otoño, como *Larix decidua* o *Robinia pseudoacacia*, pero en árboles que dejan de crecer en junio o julio cuando los fotoperiodos naturales son todavía largos, parece dudoso suponer que la disminución de la longitud de los días sea el único factor importante en la inducción de la formación de yemas y dormición. En estos casos parece más probable que los niveles de nutrientes o equilibrio hormonal sean los que determinen el período de crecimiento y comienzo de la dormición. Parece posible, por tanto, que la consecución del estado de dormición sea la culminación de una transición gradual desde un estado de predormición hasta la dormición total y que sea la disminución natural de la longitud de los días en el otoño la que juegue un papel importante en esta transición desde la predormición, provocada como dijimos anteriormente, por un cierto estado nutricional u hormonal, a la dormición total.

### 32.1.2. Cese de la dormición

Como norma general, las yemas formadas durante finales del verano o principios del otoño permanecen en estado durmiente hasta la primavera siguiente, momento en el cual reanudan el crecimiento dando lugar a un nuevo brote. La mayoría de las plantas leñosas parecen necesitar la exposición a un período frío durante el invierno antes de que las yemas puedan sobrepasar el estado de dormición. Dos tipos de experimentos parecen apoyar fuertemente esta sugerencia. En primer lugar, la dormición de las yemas disminuye durante el transcurso del invierno, como puede demostrarse recolectando ramas de algunos árboles como tilo, sicamoro, chopo o sauce en diferentes fases

del invierno y colocándolas en condiciones templadas en un invernadero. Las ramas recogidas en octubre, noviembre y principios de diciembre permanecen durmientes. Las recogidas en enero, serán capaces de reanudar el crecimiento después de 2 ó 3 semanas de exposición al ambiente templado; las recogidas en febrero o marzo, reanudarán el crecimiento inmediatamente. El segundo tipo de experimento consiste en hacer crecer árboles jóvenes, como chopo o sicomoro, en macetas, cuando alcanzan el estado de dormición en el otoño. Algunos se mantienen en condiciones naturales, mientras que otros se colocan en invernadero en condiciones templadas. Al llegar la primavera, las yemas de los árboles que se mantuvieron en condiciones naturales reanudan el crecimiento, mientras que los que se mantuvieron en invernadero permanecerán durmientes hasta bien entrado el verano y algunos incluso morirán sin haber podido reanudar el crecimiento. Las temperaturas más efectivas para poder vencer la dormición se encuentran entre 0 y 5° C y la duración de los periodos de frío puede variar entre 260 a 1.000 horas. Aunque el periodo frío puede ser suficiente para vencer el estado de dormición, las yemas no reanudan el crecimiento inmediatamente, sino que permanecen en un estado de post-dormición, que suele durar hasta que la temperatura se eleva y las condiciones más templadas favorecen el crecimiento y desarrollo de los nuevos brotes.

El periodo frío no parece ser el único factor responsable de la eliminación de la dormición, ya que se dan casos de plantas leñosas como *Fagus sylvatica*, *Betula spp* y *Larix decidua* que pueden vencer el estado de dormición de las yemas sin haber sufrido un periodo frío, solamente colocándolas en condiciones de día largo o iluminación continua. Dado que estas plantas pueden responder al fotoperiodo incluso cuando se encuentran sin hojas, se plantea el problema de cuáles son en estos casos los órganos receptores. Aparentemente, las escamas de las yemas pueden responder al fotoperiodo, pero hemos de recordar que en el interior de la yema hay multitud de primordios foliares y que éstos pueden ser los perceptores del fotoperiodo. Persisten aún serias dudas sobre el papel que el fotoperiodo puede desempeñar en la eliminación de la dormición en condiciones naturales. Sin embargo, parece lógico suponer que en las regiones templadas, la conjunción que se da al inicio de la primavera de una elevación de la temperatura después del frío invernal, y el aumento en la longitud de los días sean factores importantes en la eliminación de la dormición de las yemas.

Además de las condiciones naturales que acabamos de describir, existen una serie de compuestos químicos que eliminan la dormición, tales como el 2-cloroetanol ( $C_2H_5CH_2OH$ ) que aplicado en forma de vapor elimina la dormición en árboles frutales; la tiourea y el dinitrofenol son igualmente efectivos. También suele ser efectiva la inmersión de la planta u órgano vegetal en un baño de agua caliente a 40° C. Especialmente importante es el hecho de que las giberelinas sean capaces de eliminar la dormición en varias plantas leñosas, sobre todo desde que se ha demostrado que el tratamiento frío conduce a un aumento de los niveles endógenos de giberelinas en las yemas de varias especies vegetales.

### 32.1.3. Regulación hormonal

Existe cada vez mayor evidencia experimental en favor de que las hormonas vegetales juegan un papel importante, tanto en la regulación de la dormición de las yemas

como de las semillas y otros órganos vegetales. Hay dos formas fundamentales de abordar el problema:

1. Observación de los efectos provocados por la aplicación exógena de hormonas.
2. Establecer los niveles hormonales endógenos y observar si existe alguna correlación entre las variaciones en los niveles endógenos y un determinado estado de dormición.

Experimentos realizados mediante la aplicación exógena de hormonas han demostrado que la dormición de las yemas puede ser vencida por las giberelinas y citoquininas. En la mayoría de los casos, las hormonas eliminan la necesidad de un período frío, aunque en algunos casos como en haya y abedul las giberelinas pueden eliminar la necesidad de fotoperiodos largos. Se han realizado también experimentos encaminados a demostrar que la aplicación exógena de inhibidores naturales puede provocar la dormición. Así, poco después del aislamiento del ácido abscísico, se demostró que su aplicación en hojas y regiones apicales de *Betula pubescens* provocaba la formación de yemas terminales durmientes bajo condiciones de día largo. En *Acer rubrum*, la aplicación exógena de ácido abscísico detiene el crecimiento bajo condiciones de día largo, aunque las yemas formadas no son comparables a las formadas en condiciones naturales por transferencia a condiciones de día corto. Resultados similares se obtienen en *Salix viminalis*. Estos resultados parecen sugerir que aunque las respuestas fotoperiódicas de las plantas leñosas pueden depender de la presencia de niveles inhibitorios de ácido abscísico, no están mediatizados únicamente por los cambios inducidos fotoperiódicamente de los niveles de ácido abscísico en los tejidos.

En cuanto a los niveles hormonales endógenos y su relación con un determinado estado de dormición, podemos considerar dos posibilidades que por supuesto no son excluyentes la una de la otra, sino que pueden darse simultáneamente. Estas dos posibilidades son:

1. Deficiencia en alguna o algunas sustancias promotoras del crecimiento.
2. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento.

Con respecto a la primera posibilidad, no parece existir por el momento ningún trabajo que relacione de una forma concluyente a las auxinas como agentes reguladores de la dormición de las yemas. Por lo que respecta a las giberelinas, hay bastantes datos que sugieren un papel importante como agente regulador de la dormición. Así, se ha demostrado que en *Acer pseudoplatanus* y en *Ribes nigrum* (Fig. 32.1) hay un aumento en el nivel de giberelinas endógenas durante el transcurso del invierno. De forma similar, la salida de la dormición en las yemas de patata va acompañada de un aumento en los niveles de giberelinas endógenas en los tubérculos. En relación con las citoquininas, diversos estudios basados en los bioensayos con extractos de yemas, indican un aumento en el contenido de citoquininas de las yemas antes de la brotación de las mismas en la primavera, aunque parece probable que esto no sea más que un reflejo de la actividad renovada de crecimiento y que no tenga nada que ver con la terminación de la dormición innata de las yemas.

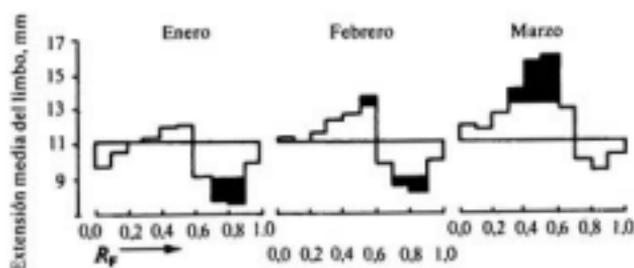


Figura 32.1.—Efecto del enfriamiento en el contenido de inhibidores y giberelinas en yemas durmientes de *Ribes nigrum* en diferentes momentos del invierno. El ensayo se realizó mediante el test biológico de la sección de limbo de maíz enano, que es sensible tanto a giberelinas como a inhibidores (tomado de M. B. Wilkins [ed.], *Physiology of Plant Growth and Development*, McGraw-Hill, Londres, 1969).

La hipótesis de que los inhibidores del crecimiento están implicados en la dormición de las yemas, fue sugerida por primera vez por Hemberg en 1949. La hipótesis está basada en que los niveles endógenos de sustancias inhibitorias del crecimiento disminuyen en el transcurso del invierno, tanto en tubérculos de patata como en yemas de *Fraxinus excelsior*; además, la disminución puede acelerarse mediante el tratamiento con 2-cloroetanol que estimula la brotación de las yemas. Observaciones posteriores realizadas por medio de fraccionamiento de los extractos mediante cromatografía en papel, han indicado que la actividad del llamado inhibidor  $\beta$ , es inferior a finales del invierno que en octubre. Tal disminución se ha detectado en *Acer pseudoplatanus*, *Diospyros virginiana*, *Malus sylvestris*, *Ulmus americana*, *Prunus persica*, *Ribes nigrum*, *Pinus palustris*. Sin embargo, también hay casos en los que no se ha observado tal disminución, o ésta aparece después de que las yemas han salido de la dormición, como en *Syringa vulgaris*, *Quercus pedunculata*, *Pyrus malus*. Otros resultados experimentales en favor de la hipótesis de los inhibidores de crecimiento, están basados en los análisis de inhibidores endógenos realizados en varias plantas leñosas como *Betula pubescens* en las que se encuentra que la concentración de inhibidores extraídos de hojas y yemas es mayor bajo condiciones de día corto que de día largo. Hoy se sabe que el ácido abscísico es el inhibidor mayoritario extraído tanto de hojas como de yemas, así como que es el componente fundamental de la fracción denominada inhibidor  $\beta$ . El hecho de que el ácido abscísico, las giberelinas y citoquininas se comporten como antagonistas en muchos test biológicos, ha posibilitado la hipótesis de que la dormición está regulada por la interacción entre inhibidores y promotores del crecimiento. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos son confusos, y muchas veces contradictorios, como para permitir un apoyo decidido a esta hipótesis que, no obstante, hemos de seguir considerando como muy probable. Un resumen final de todo lo dicho podemos verlo en la figura 32.2 que, aun tomada con todas las reservas necesarias, está basada en datos experimentales y puede muy bien indicar cómo los cambios en los niveles endógenos de promotores e inhibidores del crecimiento pueden regular la dormición de las yemas.

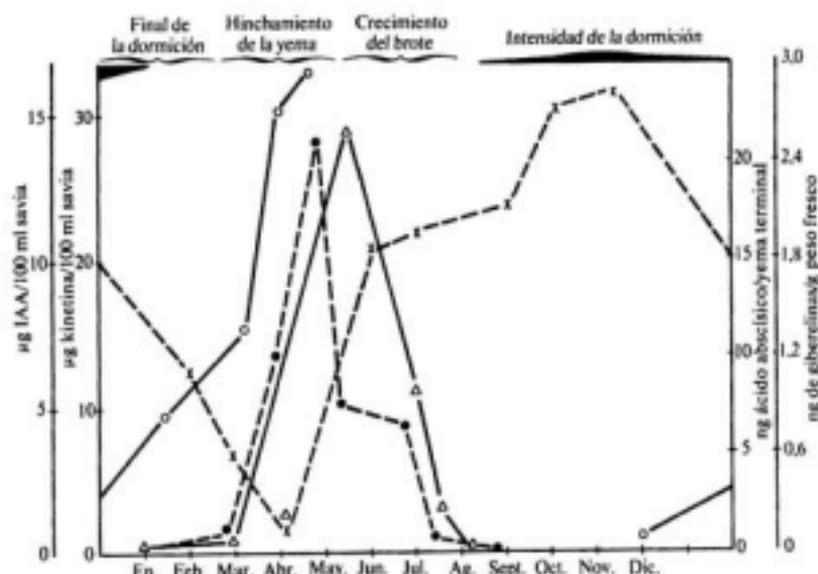


Figura 32.2.-Variaciones en el contenido de giberelinas (o-o), ácido indolacético ( $\Delta$ - $\Delta$ ), citoquininas ( $\bullet$ - $\bullet$ ) y ácido abscísico (x-x) durante el ciclo anual de crecimiento de varios árboles frutales (tomado de F. B. Salisbury y C. W. Ross, *Plant Physiology*; Wadsworth Publishing Co., Belmont, 1978).

## 32.2. Dormición de semillas

Una de las propiedades adaptativas más importantes de los vegetales es la capacidad que presentan las semillas de retener su viabilidad durante períodos prolongados de tiempo, lo que les permite sobrevivir en condiciones adversas. Existen dos formas bajo las cuales pueden manifestar las semillas esta propiedad adaptativa. Una es la incapacidad de germinar, debida a la ausencia de condiciones apropiadas, como es el caso típico de dormición impuesta. El segundo mecanismo es más importante, ya que está relacionado con ciertas condiciones intrínsecas de la propia semilla; ésta es la llamada dormición innata o también dormición orgánica. Los factores responsables de esta dormición innata son muy diversos y todos los intentos de clasificación realizados están basados en estos distintos factores.

### 32.2.1. Tipos de dormición

Los distintos tipos de dormición pueden agruparse en tres grupos: exógena, endógena y dormición combinada. Entre los tipos de dormición exógena se encuentran casos de retraso en la germinación debidos a las propiedades físicas y químicas de las envueltas seminales. Veamos a continuación cada una de éstas:

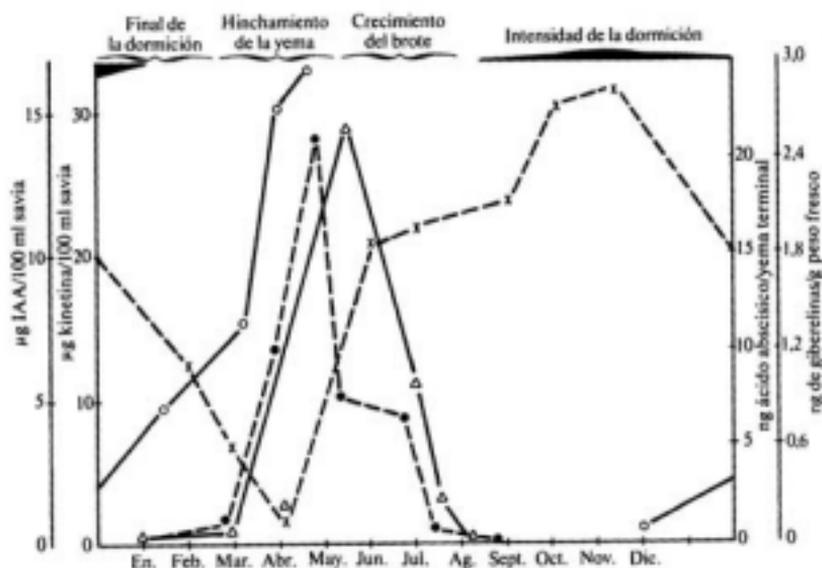


Figura 32.2.-Variaciones en el contenido de giberelinas (o-o), ácido indolacético (Δ-Δ), citoquininas (●-●) y ácido abscísico (x-x) durante el ciclo anual de crecimiento de varios árboles frutales (tomado de F. B. Salisbury y C. W. Ross, *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Co., Belmont, 1978).

## 32.2. Dormición de semillas

Una de las propiedades adaptativas más importantes de los vegetales es la capacidad que presentan las semillas de retener su viabilidad durante periodos prolongados de tiempo, lo que les permite sobrevivir en condiciones adversas. Existen dos formas bajo las cuales pueden manifestar las semillas esta propiedad adaptativa. Una es la incapacidad de germinar, debida a la ausencia de condiciones apropiadas, como es el caso típico de dormición impuesta. El segundo mecanismo es más importante, ya que está relacionado con ciertas condiciones intrínsecas de la propia semilla; ésta es la llamada dormición innata o también dormición orgánica. Los factores responsables de esta dormición innata son muy diversos y todos los intentos de clasificación realizados están basados en estos distintos factores.

### 32.2.1. Tipos de dormición

Los distintos tipos de dormición pueden agruparse en tres grupos: exógena, endógena y dormición combinada. Entre los tipos de dormición exógena se encuentran casos de retraso en la germinación debidos a las propiedades físicas y químicas de las envoltas seminales. Veamos a continuación cada una de éstas:

### 1. Dormición física

Las semillas de ciertas familias como leguminosas, papilionáceas, malváceas, queno-podiáceas, convolvuláceas, liliáceas y solanáceas poseen testas que son impermeables al agua, debido probablemente a la presencia de cutícula y a un desarrollo considerable de capas de células en empalizada. Tales semillas pueden permanecer en el suelo durante periodos considerables de tiempo antes de que se den las condiciones que permitan su germinación. Bajo condiciones naturales, las actividades de la flora microbiana del suelo, junto con diversas influencias térmicas pueden ir poco a poco erosionando estas envueltas duras hasta conseguir hacerlas permeables al agua. Sin embargo, este proceso puede durar varios años antes de que las semillas puedan germinar. Para obtener una imbibición rápida y uniforme pueden realizarse algunos tratamientos como la abrasión con arena o carborundo, tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante periodos cortos de tiempo, inmersión de las semillas en agua hirviendo, cambios bruscos de temperatura, etc.

### 2. Dormición mecánica

Este tipo de dormición se atribuye a la presencia de un pericarpio duro, que impide por su resistencia mecánica el que el embrión pueda romperlo y, por tanto, germinar. Las semillas de *Eleagnus angustifolia* son uno de los pocos ejemplos de este tipo de dormición. No existe, sin embargo, una evidencia experimental considerable en apoyo de la hipótesis de que el pericarpio actúe como un obstáculo mecánico a la germinación del embrión. Para acelerar la germinación, el pericarpio puede ser eliminado manualmente o sometido a varios tipos de tratamiento térmico.

### 3. Dormición química

Se observa fundamentalmente en plantas de regiones tropicales y subtropicales, en las que los inhibidores inhiben la germinación en las estaciones secas. Tales inhibidores se encuentran en el pericarpio y todos los identificados, hasta ahora, son de naturaleza fenólica, tales como ácido salicílico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido cinámico. La eliminación manual del pericarpio o la lixiviación de los frutos es suficiente para que se inicie la germinación de las semillas. En condiciones naturales esto ocurre en las estaciones lluviosas.

La dormición endógena, bien sola, o en combinación con la exógena, es la más extendida y la más difícil de superar. La dormición endógena sólo puede ser superada por aquellos factores que pueden provocar cambios fisiológicos, tales como la estratificación a ciertas temperaturas, condiciones de iluminación, administración de sustancias de crecimiento, etc. Los tipos de dormición endógena están determinados fundamentalmente por las peculiaridades anatómicas, morfológicas y fisiológicas del propio embrión, pudiéndose distinguir, por tanto, varios tipos de dormición, como son la morfológica, la fisiológica y la morfofisiológica. Veamos a continuación cada una de ellas:

### 1. Dormición morfológica

Este tipo de dormición, ampliamente distribuida en algunas familias como palmáceas, araliáceas, magnoliáceas y ranunculáceas, se debe a un subdesarrollo del embrión, y la germinación no tiene lugar, por tanto, hasta que el embrión ha completado su desarrollo. Este proceso puede tener lugar bajo condiciones de estratificación a temperaturas adecuadas y puede durar desde algunos días a varios meses. En la mayoría de los casos el subdesarrollo o inmadurez del embrión está asociado con algún tipo de dormición morfofisiológica.

### 2. Dormición fisiológica

Este tipo de dormición se debe fundamentalmente a una disminución en la actividad de los embriones. Las semillas que presentan esta forma de dormición pueden salir de este estado mediante un almacenamiento seco, o bien por un tratamiento frío o por un determinado tratamiento luminoso.

- a) *Almacenamiento seco*.—Las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, aunque el embrión esté perfectamente maduro, cuando se siembran inmediatamente después de recolectadas. Sin embargo, si las semillas se almacenan en un sitio seco y a temperatura ambiente, van perdiendo gradualmente la dormición y van siendo capaces de germinar cuando se las coloca en condiciones adecuadas (Fig. 32.3). Este tipo de dormición es frecuente entre los cereales como cebada, trigo, avena y arroz, también aparece en varias especies cultivadas de lechuga y en el trébol. Este es un tipo de dormición fisiológica poco profunda y por ahora no se conocen cuáles son las causas que la provocan, ni cuáles son los cambios que aparecen durante el periodo de almacenamiento que hacen que la semilla salga de este estado de dormición.

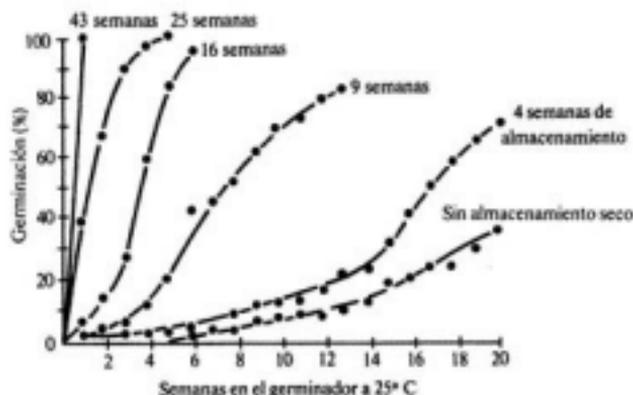


Figura 32.3.—Efecto del almacenamiento en seco y a temperatura ambiente sobre la germinación en semillas de *Impatiens balsamica* (tomado de P. F. Wareing e I. D. J. Phillips, *The Control of Growth and Differentiation in Plants*, 2.ª ed., Pergamon Press, Oxford, 1978).

- b) *Semillas sensibles a la luz.*—Uno de los tipos de dormición que ha sido estudiado con mayor intensidad durante los últimos años es el exhibido por las semillas sensibles a la luz. En un número considerable de especies, la luz es necesaria para que las semillas puedan germinar, como es el caso de *Nicotiana tabacum*, *Digitalis purpurea*, *Epilóbium hirsutum*, *Rumex crispus* y otros. Por otra parte, en un número menor de especies, la germinación es inhibida por la luz, tal como ocurre en *Nemophila insignis*, *Phacelia tanacetifolia* y *Phlox drumondii*. Un requisito necesario para que las semillas respondan a la luz es que estén inbibidas en agua; en cuanto al periodo de iluminación necesario, suele ser muy corto. Así, en semillas de lechuga 1 ó 2 minutos de luz son suficientes para obtener un porcentaje elevado de germinación, mientras que en *Lythrum salicaria* un flash de 0,1 segundo tiene un marcado efecto en la germinación. Las respuestas de las semillas sensibles a la luz se ven también fuertemente afectadas por la temperatura, y así muchas semillas que a 25° C requieren luz para germinar, pueden hacerlo en la oscuridad a temperaturas inferiores, como ocurre en ciertas variedades de lechuga. Los requerimientos de luz, pueden también perderse mediante el almacenamiento en sitios secos, de tal forma, que al cabo de cierto tiempo las semillas sometidas a este tratamiento pueden germinar en oscuridad completa. Tal y como se estudió en el capítulo 30, el fitocromo parece estar implicado en la respuesta de las semillas a la luz, tanto en las que la germinación es estimulada o inhibida, ya que ambos procesos muestran la clásica reversión rojo/rojo lejano típica de las reacciones controladas por el fitocromo.

La principal significación ecológica del sistema fitocromo en la dormición de semillas, puede ser la de suministrar un sensor luminoso que puede contribuir a desencadenar todo el proceso de la germinación cuando la semilla se encuentra muy cerca o en la misma superficie del suelo. De igual forma puede suministrar un mecanismo para inhibir la germinación cuando la semilla en la superficie del suelo se encuentra sombreada por un denso dosel foliar.

- c) *Semillas con un requerimiento frío.*—Los agricultores saben desde hace bastante tiempo que las semillas de muchas especies no germinan si se siembran bajo condiciones templadas. Sin embargo, si estas semillas se siembran en otoño y quedan expuestas al frío invernal, germinan en la siguiente primavera. Este conocimiento condujo a la práctica habitual de colocar las semillas entre capas de arena y dejarlas así todo el invierno; estas semillas «estratificadas» perdían así el estado

TABLA 32.2

Especies que requieren un período frío para el cese de la dormición

<i>Acer saccharum</i>	<i>Juglans nigra</i>
<i>Betula spp</i>	<i>Malus spp</i>
<i>Cornus florida</i>	<i>Pinus spp</i>
<i>Corylus avellana</i>	<i>Rosa spp</i>
<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Thuja occidentalis</i>
<i>Fraxinus excelsior</i>	

de dormición y germinaban en primavera. En la tabla 32.2 se exponen algunas plantas que requieren un periodo frío para vencer la dormición.

En un principio se creyó que la dormición de tales semillas era debida a la impermeabilidad de las cubiertas seminales y que eran necesarias las temperaturas de congelación para romper las cubiertas. Hoy se sabe, sin embargo, que las temperaturas de congelación no son necesarias, y que son las temperaturas de 0 a 5° C las más efectivas (Fig. 32.4). Para que la estratificación sea efectiva, las semillas deben estar inbibidas en agua y permanecer así durante un periodo de tiempo mínimo, que varía según las especies, pero que no suele bajar de varias semanas.

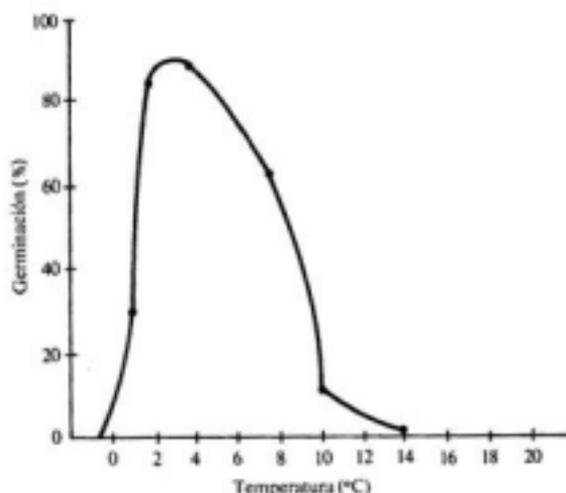


Figura 32.4.—Germinación de semillas de manzana después de enfriamiento, durante 85 días a diferentes temperaturas.

### 3. Dormición morfofisiológica

En este tipo de dormición suele darse una combinación de inmadurez del embrión con algún problema fisiológico. En las semillas de *Aralia mandshurica* el crecimiento del hipocótilo está retardado, y para germinar requiere primero una estratificación cálida entre 18 y 20° C durante 4 meses, seguida por otros cuatro meses a 0 ó 3° C; sin embargo, bajo condiciones de cambios continuos de temperatura, 15-20° C (1 día) y 0-3° C (2 días), la germinación se completa en cuatro meses. En algunas especies es el hipocótilo el que presenta dormición como ocurre en semillas de *Viburnum opulus*. Estas semillas germinan a temperaturas cálidas, pero el epicótilo sólo reanuda su crecimiento cuando la plántula con un sistema radicular desarrollado es sometida a un tratamiento frío. En algunas semillas, como en *Trillium*, se presenta una dormición morfofisiológica

doble. Las semillas deben ser expuestas inicialmente a una estratificación cálida que permite el desarrollo del embrión, y posteriormente a una estratificación fría para que crezca el hipocótilo y se forme el sistema radicular. Tan pronto como el sistema radicular alcanza un cierto grado de desarrollo, cosa que sucede durante un segundo tratamiento cálido, la semilla debe ser expuesta a un nuevo tratamiento frío y sólo entonces comienza el crecimiento general. En condiciones naturales tales semillas no pueden germinar durante un año. Estas son las llamadas semillas bienales.

Por último, y para terminar este apartado de tipos de dormición, hemos de decir que en una gran mayoría de casos, las semillas muestran una dormición combinada, es decir, una combinación de dormición endógena y exógena. Así, en semillas de *Tilia*, por ejemplo, la dormición fisiológica está asociada con una impermeabilidad al agua de las cubiertas seminales. En otros casos hay una asociación entre endocarpo duro y dormición fisiológica como en *Crataegus*, *Cornus* y *Rosa spp.* Para poder vencer esta dormición se requieren tratamientos más complejos.

### 32.3. Papel de las cubiertas seminales en la dormición de las semillas

La dormición de muchas semillas está provocada, exclusivamente, por la presencia de las cubiertas seminales, ya que cuando se aíslan los embriones, éstos germinan sin ninguna dificultad. Tal es el caso de algunas semillas que necesitan, para vencer la dormición, un almacenamiento en sitio seco, un requerimiento de un periodo frío o que requieren una cierta iluminación. En todos los casos, estos requisitos desaparecen si se eliminan las cubiertas seminales, que incluyen la testa y el endospermo y en algunas semillas el pericarpio. ¿Qué papel juegan las cubiertas seminales en estos casos de dormición? Una posibilidad, es que las cubiertas constituyan una barrera física para el intercambio de gases entre el embrión y el medio externo. Parece poco probable que los efectos de las cubiertas sean debidos a una acumulación de dióxido de carbono en el interior de la semilla, ya que la germinación de algunas semillas como las de lechuga puede estimularse aumentando las concentraciones de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, en muchas semillas sí se ha demostrado que la testa puede representar una barrera al paso del oxígeno. Así, en *Cucurbita pepo* se ha encontrado que la testa es menos permeable al oxígeno que al dióxido de carbono. En otras semillas como en *Betula*, *Avena fatua* o *Rumex crispus*, se puede inducir la germinación eliminando la testa o simplemente rompiéndola, o manteniendo la semilla intacta en concentraciones elevadas de oxígeno. Una prueba indirecta de la impermeabilidad de la testa al oxígeno se obtiene durante la germinación de algunas semillas, como guisante o garbanzo; en estas semillas, durante las primeras fases de la germinación, la respiración es anaerobia hasta que la testa se rompe por la protrusión de la radícula y entonces hay un marcado aumento en el consumo de oxígeno.

Muchos de los casos de dormición inducida o secundaria se deben a una interferencia en la toma de oxígeno asociada con temperaturas elevadas. Así, en muchas semillas no durmientes se puede inducir un estado de dormición, simplemente colocándolas a temperaturas de 30 °C o superiores mientras se encuentran en la fase de imbibición; tal tipo de dormición se conoce como termodormición. La posible importancia de la defi-

ciencia de oxígeno en el fenómeno de dormición viene dada por el hecho de que la acumulación de oxígeno disminuye el período de dormición, sugiriendo que puede estar implicada alguna reacción de oxidación.

#### **32.4. Regulación metabólica de la dormición**

Durante los últimos años se han realizado numerosos intentos para encontrar las bases metabólicas de la dormición y de la eliminación de la misma. Una de las hipótesis con mayor apoyo experimental, es aquella que supone que el ciclo de las pentosas fosfato juega un papel importante en la regulación de la dormición. Esta hipótesis está basada en unos estudios preliminares realizados con arroz, en los que se encontró que la pérdida de la dormición dependía de alguna reacción oxidativa. Una posibilidad era que tal reacción oxidativa fuera la ruta respiratoria normal. Sin embargo, el hecho sorprendente de que algunos inhibidores respiratorios, tales como cianuro potásico, azida sódica, monóxido de carbono, sulfuro de hidrógeno o hidroxilamina, no sólo no prolongaban la dormición, sino que, además, eran agentes muy efectivos en la eliminación de la misma, hizo pensar que alguna otra reacción de oxidación distinta de la ruta glucolítica-ciclo de Krebs era la responsable de la eliminación de la dormición. Estos mismos resultados se obtuvieron con otras semillas y se encontró también que tanto los iones nitrato como nitrito eran estimuladores de la germinación. El hecho de que ninguno de estos inhibidores actuara sobre la oxidación de la glucosa-6-fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato, hizo pensar que ésta podría ser la ruta oxidativa implicada en la eliminación de la dormición. La proporción en la que la glucosa-6-fosfato es utilizada a través de la ruta glucolítica o de la ruta de las pentosas fosfato, puede medirse, tanto en semillas durmientes como en germinación, determinando el  $\text{CO}_2$  liberado bien a partir del carbono 6 o carbono 1 de la glucosa marcada con  $^{14}\text{C}$ . Los resultados se expresan mediante la relación  $\text{C}_6/\text{C}_1$ . La interpretación de los resultados depende del hecho de que en la glucólisis, la molécula de glucosa se rompe en dos unidades de tres átomos de carbono, en las que los carbonos 1 y 6 de la glucosa terminan en los grupos metilo del piruvato. Por ello, si la respiración ocurre solamente a través de la ruta glucolítica, la relación  $\text{C}_6/\text{C}_1$  será la unidad. Si la glucosa es metabolizada a través de la ruta de las pentosas fosfato, durante la segunda deshidrogenación el átomo de carbono 1 es descarboxilado; de esta forma, la participación de esta ruta disminuirá la relación  $\text{C}_6/\text{C}_1$ . Así se ha determinado que la relación  $\text{C}_6/\text{C}_1$  es inferior en semillas durmientes de cebada y avena que en las no durmientes, lo que es indicativo del uso prominente de la ruta de las pentosas fosfato en los primeros momentos de la germinación. Otro aspecto en favor de la implicación de la ruta de las pentosas fosfato en la dormición, es el hecho de que compuestos tales como nitritos, hidroxilamina, tiourea y compuestos sulfidrilos tengan en común la propiedad de inhibir la acción de la catalasa. Estos compuestos, en bajas concentraciones, promueven la germinación de una forma inversamente correlacionada con la actividad catalásica, de tal forma que su capacidad para eliminar la dormición podría ser el resultado de la inhibición de la actividad catalásica mediante la formación de una nitroferrocatalasa que es inactiva; de esta forma se economiza el agua oxigenada responsable de la oxidación del NADPH por la acción conjunta de una peroxidasa y una quino-

na-oxidoreductasa NADPH dependiente. El NADP así formado aumenta la actividad del ciclo de las pentosas fosfato (Fig. 32.5). Todos los enzimas necesarios para este proceso se han encontrado en semillas secas. De igual forma, se ha encontrado que la acti-

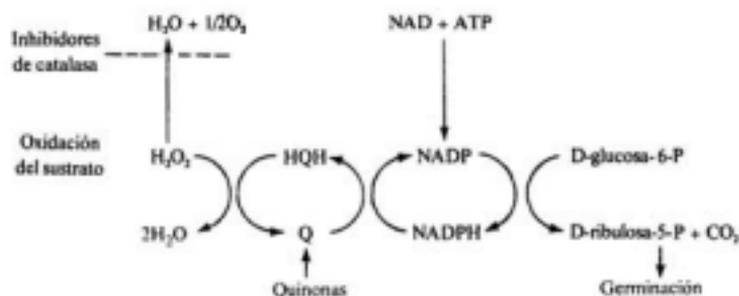


Figura 32.5.—Posible papel de la catalasa en la germinación de semillas.

vidad del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa aumenta durante la germinación de semillas de *Avena fatua* que disminuye en semillas durmientes. El NADP requerido para el funcionamiento del ciclo de las pentosas fosfato parece estar bajo control del enzima NAD kinasa, que a su vez está relacionada positivamente con los niveles de fitocromo en su forma activa (rojo lejano) que activaría la actividad NAD kinasa y que, como ya sabemos, estimula la pérdida de la dormición en las semillas sensibles a la luz. Por otra parte, para la actividad de este enzima se necesitan ciertos niveles de ATP, lo que está de acuerdo con varios resultados experimentales que señalan la necesidad de una concentración elevada de ATP en las semillas inbibidas para que éstas puedan germinar. En cuanto al origen del agua oxigenada, ésta podría ser el resultado de la acción de los enzimas glioxisomales, fundamentalmente enzimas del ciclo del glioxilato y de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos cuyo aumento en actividad también se ha encontrado relacionado con la eliminación de la dormición en algunas semillas como *Corylus avellana* y trigo. Por lo que respecta a qué ruta respiratoria es efectiva durante los primeros momentos de la imbibición, parece lógico suponer que si el cianuro, que es inhibidor de la ruta convencional de citocromos, es capaz de estimular la germinación en semillas durmientes, sea la ruta resistente al cianuro la operativa en estos primeros momentos, tal y como se ha demostrado en soja y en cebada.

### 32.5. Regulación hormonal de la dormición

Siguiendo el mismo planteamiento que cuando tratamos el tema de la regulación hormonal de la dormición de las yemas, podemos considerar que hay dos formas de abordar el problema:

1. Observando los efectos provocados por la aplicación exógena de hormonas.

2. Estableciendo los niveles hormonales endógenos y observando si existe alguna correlación entre las variaciones en los niveles endógenos y un determinado estado de dormición.

Experimentos con hormonas exógenas han demostrado que la dormición de muchas semillas puede ser superada mediante la aplicación de giberelinas, citoquininas y etileno. Semillas que muestran un requerimiento de almacenamiento en un sitio seco, o bien requerimientos fríos o luminosos, responden generalmente bien a la aplicación de giberelinas. Un número menor de tipos de dormición pueden ser superados por las citoquininas. El etileno puede también estimular la germinación en algunas especies, como lechuga; el etileno también aumenta el porcentaje de germinación obtenido sólo con citoquininas o giberelinas. Por lo que respecta al ácido abscísico, también ha sido posible demostrar que su aplicación exógena inhibe el crecimiento y germinación de muchas especies vegetales.

Determinaciones en los cambios en los niveles endógenos de hormonas promotoras han suministrado numerosos casos en los que los niveles de giberelinas y citoquininas disminuyen durante la progresiva entrada en la fase de dormición y aumenta durante la salida de la misma. Así, se ha observado que en varias semillas que requieren tanto un período frío como iluminación para germinar, los niveles tanto de giberelinas como de citoquininas aumentan después de recibir los tratamientos adecuados. Por lo que respecta al etileno, se ha encontrado que una liberación de este gas suele acompañar la germinación de muchas semillas, y que las semillas durmientes liberan menos etileno que las semillas no durmientes. A pesar del efecto claramente promotor de giberelinas, citoquininas y etileno, hay bastantes razones para creer que la regulación de la dormición de las semillas no reside sólo en la ausencia de promotores, sino que también la regulación de la dormición implica la presencia de inhibidores.

Un cambio definitivo en el concepto de regulación hormonal se produjo cuando se demostró que las citoquininas tienen una capacidad única para aliviar los efectos provocados por varios inhibidores en las semillas y otros órganos vegetales. Así, la demostración de que las citoquininas podían aliviar selectivamente los efectos de los inhibidores de la germinación, en los procesos de inducción de la germinación por las giberelinas, condujo a la hipótesis de que las citoquininas tienen un papel permisivo en la regulación de la germinación. El modelo propuesto por Khan (Fig. 32.6) supone que las giberelinas, citoquininas e inhibidores, son reguladores necesarios tanto de la dormición como de la germinación. Este modelo permite también explicar toda una serie de situaciones hormonales en las semillas aparentemente anómalas, como son la dormición en presencia de promotores, o germinación en presencia de inhibidores. Hasta hace poco tiempo era inimaginable pensar en un estado de dormición en semillas sin la presencia de inhibidores. Según el modelo propuesto (Fig. 32.6), la ausencia de giberelinas en las semillas, independientemente de la presencia o ausencia de inhibidores, puede conducir a un estado de dormición. Así, en las semillas que presentan dormición después de la recolección, el nivel de giberelinas aumenta durante el almacenamiento, tal como ocurre en *Avena fatua*. La dormición de estas semillas puede ser eliminada mediante tratamiento con giberelinas. Otra situación anómala, la germinación en presencia de inhibidores, puede ser explicada por este modelo. Por ejemplo, en semillas de *Acer pseudoplatanus*

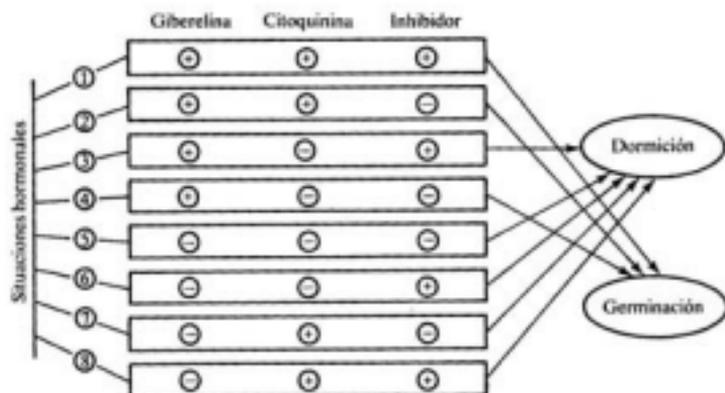


Figura 32.6.—Modelos de dormición y germinación mostrando la función selectiva de estimuladores e inhibidores (tomado de A. A. Khan, *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, North-Holland, Amsterdam, 1977).

en las que se ha detectado la presencia de inhibidores, la dormición puede ser superada por citoquininas pero no por giberelinas. Aparentemente, estas semillas presentan niveles endógenos de citoquininas insuficientes para poder contrarrestar el efecto de los inhibidores. El hecho de que el etileno actúe en muchos casos de forma similar a las citoquininas ha hecho suponer a muchos investigadores que las citoquininas podrían actuar provocando un aumento en la producción de etileno.

Respecto a la naturaleza de los inhibidores, durante muchos años se pensó que los compuestos fenólicos, debido a su abundancia y amplia distribución, eran los únicos inhibidores naturales de la germinación, siendo la cumarina el primer compuesto considerado seriamente como agente inductor de la dormición. El descubrimiento del ácido abscísico, así como el de su presencia como componente endógeno de muchas semillas, y el hecho constatado posteriormente de su interacción con giberelinas y citoquininas, dieron un impulso considerable a la hipótesis del equilibrio entre promotores e inhibidores como mecanismo regulador de la dormición. Interacciones entre promotores e inhibidores de la germinación se han obtenido entre semillas que presentan requerimientos de un periodo frío o iluminación. Así, en semillas de *Fraxinus excelsior* es posible extraer de los embriones que han pasado un periodo frío una sustancia capaz de estimular la germinación de embriones durmientes. Posteriormente esta sustancia fue identificada como ácido giberélico. En semillas de *Betula pubescens* que requieren luz para germinar, presentan sólo este requisito en la semilla intacta ya que los embriones aislados pueden germinar en oscuridad. El pericarpo de estas semillas contiene un inhibidor, identificado como ácido abscísico, que si se añade a los embriones aislados se restaura la necesidad de una iluminación para germinar.

Por lo que respecta al posible mecanismo de acción hormonal, existe cada vez una mayor evidencia experimental de que el control de la dormición se lleva a cabo por una interacción de las hormonas con las membranas biológicas. Esta sugerencia parte del

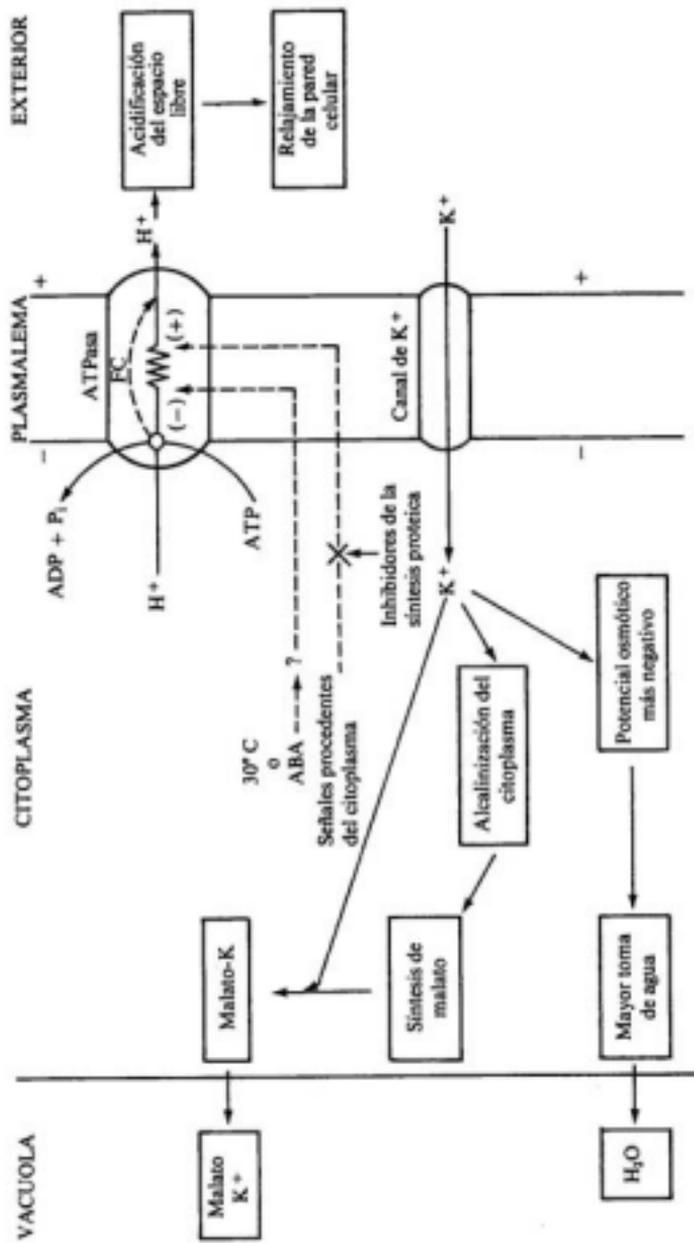


Figura 32.7.—Posible mecanismo de la inducción de la dormición en semillas de garbanzo por temperaturas elevadas o ABA y su reversión por fusicoccina (elaborado con datos de Matilla, Añadaco y cols.).

hecho de que la fusicoccina, un glucósido diterpeno producido por *Fusicoccum amygdali* es capaz de eliminar la dormición de muchas semillas de una forma similar a como lo hacen las citoquininas y giberelinas. De igual forma, la fusicoccina es capaz de revertir en semillas de garbanzo la dormición inducida por el ácido abscísico y por las temperaturas superiores a 30° C (Fig. 32.7). Si suponemos que estas hormonas poseen, por lo menos en sus pasos finales, un mecanismo de acción similar al de la fusicoccina, o que son capaces de bloquear algún proceso estimulado por la misma, entonces toda la evidencia sugiere que los receptores hormonales deben encontrarse en las membranas, ya que la fusicoccina lo que hace es activar un mecanismo de liberación de protones hacia el exterior, dependiente de un suministro de energía localizado en la membrana citoplasmática. Un hecho experimental en favor de esta hipótesis es la reciente identificación de algunos inhibidores del crecimiento, volátiles, presentes en ciertos materiales vegetales. Tales inhibidores han sido caracterizados como ácidos grasos de cadena corta, entre cinco y once átomos de carbono, siendo los más efectivos el heptanoico (C<sub>7</sub>), octanoico (C<sub>8</sub>) y nonanoico (C<sub>9</sub>). La presencia de estos ácidos en relación con la dormición ha sido probada por lo menos en varias especies de avena y lechuga. El posible efecto de estos ácidos puede ser el de interactuar con los lípidos de las membranas, interfiriendo y alterando la función normal de las membranas. El efecto estimulador de la dormición de estos compuestos puede ser revertido por las giberelinas y citoquininas, apoyando, como mencionamos anteriormente, la hipótesis de que estas hormonas actúan a nivel de la membrana celular.

Como resumen final, podemos decir que la dormición de las semillas puede deberse, probablemente, a una falta de integración entre los diferentes sistemas metabólicos requeridos para la germinación. Esta integración puede requerir el intercambio de productos, como ATP o piridín nucleótidos, entre diferentes compartimentos celulares como mitocondrias y glioxisomas. Este intercambio puede estar controlado por la acción hormonal y del fitocromo sobre las membranas limitantes de los distintos orgánulos celulares.

---

#### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- KHAN, A. A.: *Seed Dormancy: Changing Concepts and Theories*, en: *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, A. A. Khan (ed.), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1977.
- MURRAY, D. R. (ed.): *Seed Physiology*, vol. 2: *Germination and Reserve Mobilization*, Academic Press, 1984.
- NIKOLAIEVA, M. G.: *Factors Controlling the Seed Dormancy Pattern*, en: *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, A. A. Khan (ed.), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1977.
- SAUNDERS, P.: *Phytohormones and Bud Dormancy*, en: *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise*, vol. II, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978.
- TAYLORSON, R. B., y HENDRICKS, S. B.: *Dormancy in Seeds*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», volumen 28, 1977, págs. 331-354.
- WAREING, P. F., y PHILLIPS, I. D. J.: *Growth and Differentiation in Plants*, 3.ª ed., Pergamon Press, Oxford, 1981.

## MADURACIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

### 33.1. Desarrollo de las semillas

Con la excepción de algunos casos de apomixis, tal y como ocurre en *Taraxacum officinale* y en *Poa annua*, el desarrollo de las semillas comienza inmediatamente después de la fertilización del óvulo. En las Gimnospermas, la ovocélula está situada dentro del gametofito femenino y la fertilización tiene lugar por su unión con un gameto móvil liberado del tubo polínico. El desarrollo posterior del cigoto implica en primer lugar, la formación de varios núcleos libres, alrededor de los cuales, se forman las paredes celulares formando el proembrión, posteriormente, una serie de divisiones celulares darán lugar a la formación de las células embrionales y al suspensor. Este complejo celular puede dar lugar a la formación de un solo embrión, o bien formar cuatro embriones, tres de los cuales degeneran. Una vez formado el embrión, la porción central del gametofito femenino se transforma en una cavidad hacia la cual el embrión es empujado por la elongación del suspensor. En las partes persistentes del gametofito femenino se depositan los carbohidratos, proteínas y lípidos de reserva que serán utilizados durante la germinación de la semilla.

En las Angiospermas, tiene lugar una fecundación doble; uno de los gametos masculinos liberados del tubo polínico se funde con la ovocélula formándose el cigoto diploide; el otro núcleo se funde con los núcleos polares formándose un núcleo triploide a partir del cual se formará el endospermo. Tras su formación, el cigoto suele entrar en un estado de reposo y comienza a dividirse después del núcleo endospermico. El plano de la primera división zigótica es casi siempre transversal, y como resultado se obtienen dos células, una denominada célula basal y la otra célula distal. En las dicotiledóneas, la célula basal se transforma en el suspensor y la distal en el embrión. En las monocotiledóneas, la célula basal no suele experimentar ninguna nueva división, transformándose en la célula terminal del suspensor; el embrión y las otras células del suspensor se forman a partir de la célula distal. El endospermo se origina por divisiones mitóticas del núcleo endospermico triploide. La división suele ser anterior a la del cigoto, y según los grupos taxonómicos se pueden distinguir tres tipos de endospermo:

1. Nuclear: en este caso el núcleo sufre una serie de divisiones y los núcleos permanecen libres en el citoplasma, como ocurre en trigo y manzano.
2. Celular: en este caso no hay una fase de núcleos libres, sino que la primera divi-

sión del núcleo endospermico se acompaña ya por la formación de una membrana, tal como ocurre en *Thesium*, *Impatiens* y *Lobelia*.

3. Helobial: es un tipo intermedio entre los dos anteriores ya que la fase de núcleos libres es precedida por la formación de células, tal como ocurre en *Asphodelus*, *Saxifraga* y *Echium*.

Durante el desarrollo del endospermo algunos nutrientes son retirados de los tejidos adyacentes, mientras que otros son sintetizados *in situ* a partir de materiales transportados hasta allí. En cereales, hay una utilización limitada de las reservas del endospermo durante la maduración de la semilla; los residuos de las células agotadas del endospermo se transforman en la capa intermedia que queda entre el endospermo amiláceo y el escutelo del embrión maduro (Fig. 33.1). En las semillas de dicotiledóneas las reservas

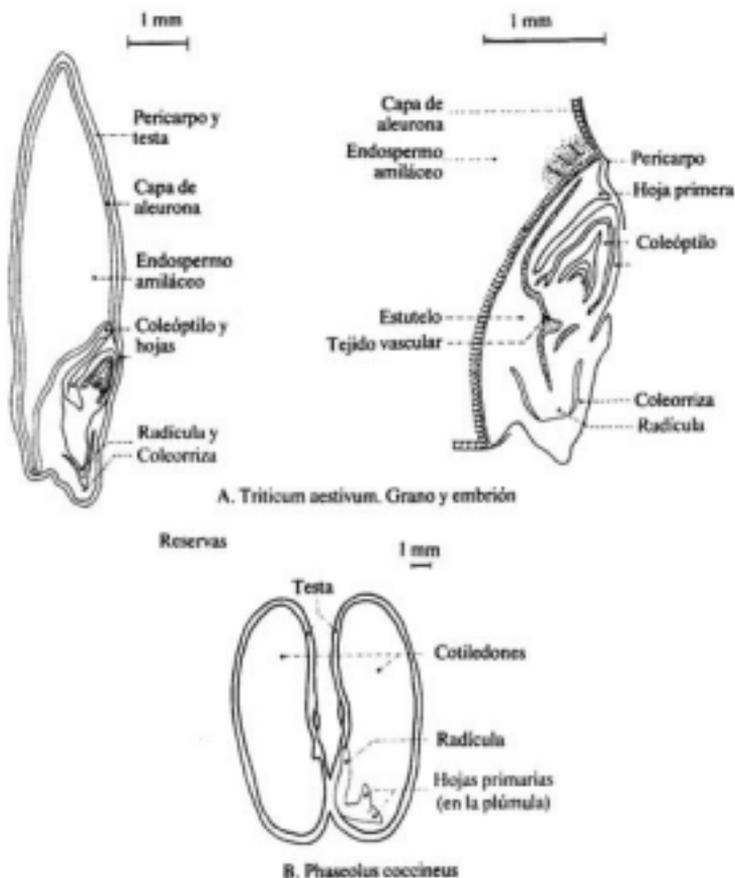


Figura 33.1.—Estructura de la semilla: A. Monocotiledónea; B. Dicotiledónea.

del endospermo son utilizadas completamente durante la maduración del embrión y son sustituidas por los cotiledones que actúan como órganos de reserva para la germinación de la semilla (Fig. 33.1).

Los tegumentos que rodean al óvulo sufren una serie de cambios durante la maduración de la semilla, transformándose en la envuelta seminal o testa. Finalmente comienza la fase de desecación, el óvulo pierde agua hacia el medio ambiente, la envuelta seminal se esclerifica y muere transformándose en una cubierta protectora que, como hemos visto en el capítulo anterior, juega un papel importante en la supervivencia de las especies vegetales.

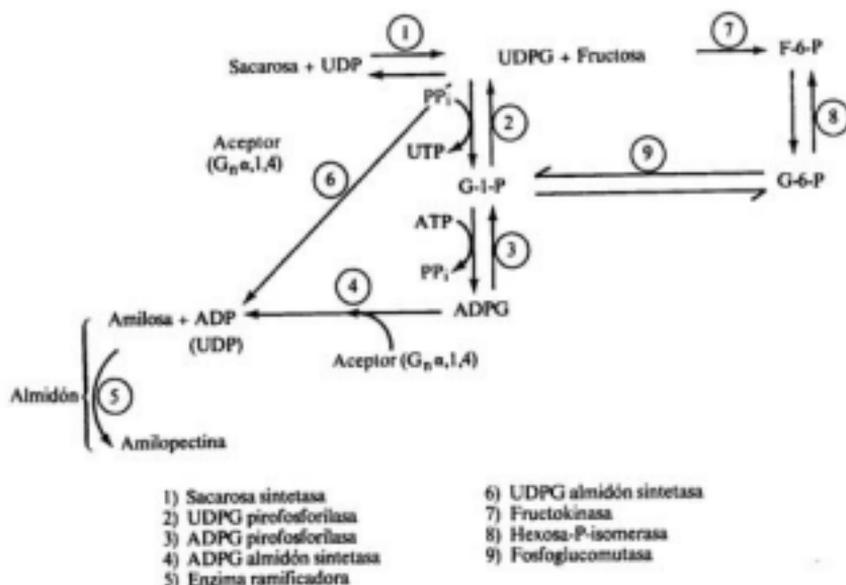
### **33.2. Producción y almacenamiento de sustancias de reserva**

Uno de los acontecimientos más importantes durante la maduración de semillas, es la producción o síntesis de sustancias de reserva, que almacenadas, bien en el endospermo o en los cotiledones, servirán como sustancias alimenticias durante las primeras fases del desarrollo posterior del embrión durante la germinación de las semillas. Desde un punto de vista didáctico, es conveniente estudiar la producción y almacenamiento de sustancias de reserva en monocotiledóneas y dicotiledóneas, ya que estos dos grupos de angiospermas representan los casos extremos en las relaciones endospermo-embrión. Como ejemplo de las primeras utilizaremos los cereales y como ejemplo de las segundas, las leguminosas.

#### **33.2.1. Monocotiledóneas**

En estas plantas, el endospermo será el órgano encargado del almacenamiento de las sustancias de reserva. El endospermo comienza a desarrollarse poco después de la antesis; por ejemplo, en trigo, dos días después de la antesis comienza la división del núcleo triploide y la formación de las paredes celulares. Al cuarto día, el endospermo se ha alargado debido a la división celular y se puede ya observar una capa externa de células meristemáticas. Esta capa sufre una serie de divisiones tangenciales para formar células hacia el interior del endospermo y divisiones radiales para extender su área superficial. Hacia el decimocuarto día está ya determinada la forma final del grano de trigo maduro. La capa más exterior de células meristemáticas se transforma en la capa de aleurona, cesan todas las divisiones celulares y el aumento posterior en tamaño del endospermo es debido exclusivamente a la expansión celular. El almacenamiento de almidón en el endospermo comienza después de que ha terminado la división celular. Las células del endospermo en este momento poseen núcleo, mitocondrias, retículo endoplasmático, dictiosomas y proplastos. Es precisamente dentro de los proplastos donde se formarán los gránulos de almidón; un gránulo por proplasto en cebada, trigo y centeno y varios en avena y arroz. Un rasgo característico de los gránulos de almidón son sus anillos concéntricos, representando probablemente cada uno un día de crecimiento del gránulo. La mayor parte de los carbohidratos del grano de los cereales proceden de la actividad fotosintética que tiene lugar después de la antesis, siendo la fotosíntesis de la última hoja y de la propia espiga la que puede proporcionar casi todos los asimilados

requeridos para el crecimiento del grano. La forma transportable del carbono fijado fotosintéticamente es la sacarosa, y todavía no se sabe con certeza si la sacarosa transportada desde el floema al endospermo lo es en su forma natural o si debe ser hidrolizada en glucosa y fructosa y resintetizada de nuevo en el endospermo. Una hipótesis ampliamente aceptada, supone que la sacarosa se hidroliza durante el proceso de salida del floema por una invertasa unida a las paredes celulares, y que los monosacáridos resultantes difunden, vía apoplasto, hacia el espacio libre del endospermo y en las células del endospermo tiene lugar la resíntesis de la sacarosa (Cap. 7). De cualquier forma, el almidón se sintetizará a partir de la sacarosa y la acumulación de este almidón está regulada, no tanto por el suministro de sacarosa al grano desde la planta madre, como por procesos que operan dentro del propio grano, como pueden ser resistencias dentro de dicho grano al movimiento de la sacarosa desde el tejido vascular al endospermo, o control de la actividad invertásica. Las bases enzimáticas para la síntesis de almidón en el endospermo de cereales han sido estudiadas y claramente elucidadas durante los últimos años. Siguiendo la pista al  $^{14}\text{C}$  de la sacarosa formada a partir de  $^{14}\text{CO}_2$ , puede verse cómo se incorpora en almidón a partir de glucosa-1-fosfato a través del sistema UDPG pirofosforilasa y ADPG almidón sintetasa:



La síntesis de amilopectina se conoce peor que la de amilosa, aunque se sabe que interviene una enzima ramificadora formadora de enlaces  $\alpha 1,6$ ; dado que la amilosa y la amilopectina se forman simultáneamente, debe existir algún mecanismo que proteja a las moléculas de amilosa, en formación, del enzima ramificador. Una posible hipótesis

es la que supone la participación de fosfolípidos que al unirse a algunas cadenas de amilosa las protegen contra el ataque del enzima ramificador; otras cadenas de amilosa, sin la protección de los fosfolípidos, se transformarán en amilopectina.

El proceso de formación del endospermo implica también la síntesis de proteínas, no sólo enzimáticas, sino también de reserva. En maíz se ha observado que entre 25 y 35 días después de la antesis el 80 por 100 de la capacidad sintetizadora de proteínas reside en el endospermo, mientras que el embrión es responsable del 20 por 100 restante. En los últimos estados del desarrollo, la capacidad sintetizadora del endospermo disminuye drásticamente debido al proceso de deshidratación, siendo entonces responsable el embrión del 75 por 100 de la capacidad sintetizadora de proteínas. 50 días después de la antesis, ni el endospermo ni el embrión son capaces de sintetizar proteínas, debido a que la mayoría de las estructuras metabolizadoras de las células han sido destruidas por el almidón y las proteínas acumuladas, y por la falta de agua que restringe la capacidad de los ribosomas para iniciar la síntesis proteica. La síntesis de las proteínas de reserva es también un acontecimiento tardío durante la maduración del endospermo en trigo y arroz. La mayoría de las proteínas de reserva quedan almacenadas en los cuerpos proteicos (Fig. 33.2), estructuras celulares delimitadas por una membrana en cuyo exterior pueden observarse a veces acúmulos de ribosomas que pueden estar implicados en la síntesis de proteínas de reserva almacenadas en los cuerpos proteicos. Otras proteínas de reserva, como la glutelina, y que se encuentran en el citoplasma, pueden ser sintetizadas por otro sistema soluble e independiente del anterior.

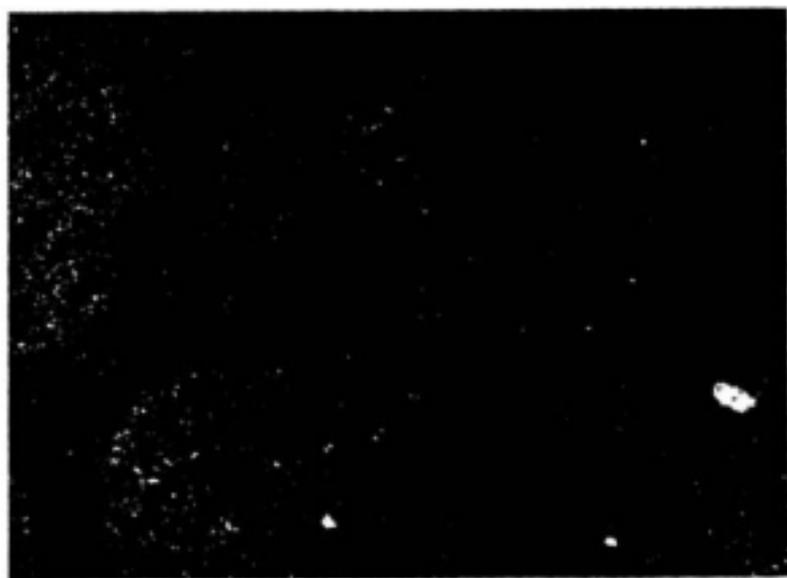


Figura 33.2.—Microfotografía de cuerpos proteicos de cotiledones de lenteja.

El contenido de DNA de los embriones aumenta hasta el momento de la maduración, mientras que en el endospermo sólo aumenta hasta que cesa la división celular. El contenido de RNA de los embriones, que aumenta durante todo el periodo de desarrollo, no es más que un reflejo del crecimiento y actividad metabólica de este órgano. En el endospermo, los niveles de RNA aumentan durante las primeras fases, cuando tiene lugar la síntesis de proteínas enzimáticas y disminuye durante la síntesis de las proteínas de reserva, probablemente debido a que el RNA necesario para la síntesis de estas proteínas se sintetizó con anterioridad y que una vez que ha sido utilizado es degradado por las ribonucleasas del endospermo.

El fosfato se acumula en forma de fitina (sales de potasio, calcio y magnesio del éster hexafosfórico del mio-inositol) en las células de la capa de aleurona en asociación con las proteínas.

### 33.2.2. Dicotiledóneas

Durante el desarrollo de las semillas de leguminosas, los cotiledones pasan por una fase inicial breve de división celular, seguida por otra fase de expansión celular (Fig. 33.3). Durante esta última fase, el endospermo desaparece y tiene lugar el almacenamiento de las sustancias de reserva en los cotiledones. El almidón, al igual que en los cereales comienza a acumularse antes que las proteínas y comienza a hacerse visible en el estroma de los cloroplastos diez días después de la antesis, conteniendo la mayoría de los cloroplastos un solo gránulo de almidón que crece dentro del mismo, observándose treinta días después de la antesis cómo las lamelas y el estroma quedan comprimidos contra las membranas limitantes del plasto. La sacarosa es también la forma principal transportable del carbono hacia los cotiledones, siendo la fotosíntesis realizada en la vaina, estípulas y folíolos la principal suministradora del carbono utilizado para la síntesis del almidón en los cotiledones. La conversión de la sacarosa en almidón sigue la misma ruta biosintética que hemos descrito en las monocotiledóneas.

La síntesis de la mayor parte de las proteínas tiene lugar durante la fase de expansión celular en la que también se observa un aumento en las concentraciones de DNA y RNA en los cotiledones. La síntesis de RNA es un acontecimiento normal, ya que durante la expansión celular tiene lugar una actividad biosintética considerable; es más difícil de explicar, sin embargo, el aumento continuo en la concentración de DNA, ya que las células no se están dividiendo. Una posible causa podría ser una poliploidización, con lo cual se obtendrían copias extras de determinados genes implicados en la codificación de las proteínas de reserva. Otra posibilidad podría ser, sencillamente, que el aumento en DNA sirviese sólo como un almacenamiento de desoxirribonucleótidos que ayudarían a mantener la división celular del embrión después que comience la germinación. Las principales proteínas de reserva aparecen almacenadas, como se ha puesto de manifiesto mediante la utilización de anticuerpos fluorescentes, en el interior de los cuerpos proteicos (Fig. 33.2). Algunas de las proteínas de reserva de las semillas de leguminosas se han identificado como glicoproteínas. Para verificar su presencia se ha aislado la región que contiene el enlace covalente entre el carbohidrato y la región proteica. Solamente se ha demostrado la existencia de tres aminoácidos: hidroxiprolina, serina y asparragina en tales enlaces en las glicoproteínas de plantas. Respecto a los

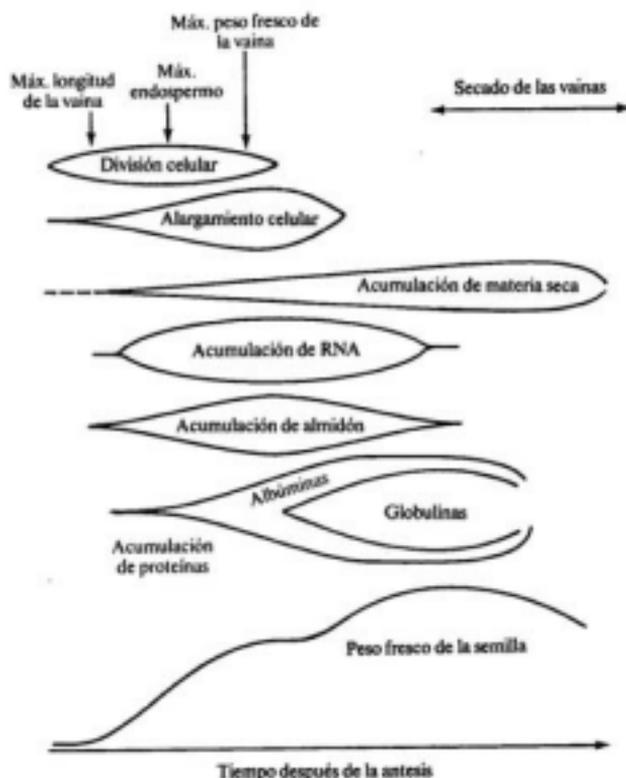


Figura 33.3.—Representación diagramática del desarrollo de las semillas de leguminosas (según J. S. Pate Pea, en: *Crop Physiology*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1975).

azúcares, glucosa, manosa y glucosamina son los más abundantes, detectándose también galactosa, xilosa, fucosa y arabinosa (tabla 33.1). No se conoce cuál puede ser la función de la glicosilación, aunque dado que en mamíferos ayuda en la transferencia de proteínas a través de membranas, y que las proteínas de reserva se encuentran en el interior de los cuerpos proteicos, la glicosilación podría también, en vegetales, ayudar a los procesos de secreción interna.

La acumulación de lípidos durante la maduración de semillas se ha estudiado fundamentalmente en dicotiledóneas, aunque no hay motivos para pensar que este proceso sea diferente en las monocotiledóneas oleaginosas. Pueden distinguirse tres fases en este proceso:

1. *Fase inicial de latencia.* Durante esta fase no hay síntesis de ácidos grasos. Su duración depende de la especie vegetal. En ricino, por ejemplo, dura entre 20 y 25

TABLA 33.1

Azúcares presentes en distintas glucoproteínas de semillas de leguminosas

Especie	Proteínas de reserva		Lectinas
	Legúminas	Vicíñas	
<i>Pisum sativum</i> . . .	Glc, Man, GlcN	Glc, Man	Glc, Xil
<i>Phaseolus aureus</i> . .	GlcN	GlcN, Man	—
<i>Phaseolus vulgaris</i> .	Azúcares neutros	Man, Gal, Xil, GlcN	Man, Glc, Gal, Xil Ara, Fuc, GlcN
<i>Lens culinaris</i> . . . .	Glc, GlcN	Glc, Fuc, Xil, Ara, GlcN	Glc, GlcN, Xil,
<i>Glycine max</i> . . . . .	—	—	Man, GlcN

días desde la polinización, mientras que en *Brassica* dura cuatro semanas. Este retraso parece ser debido a la ausencia de enzimas apropiados.

2. *Fase de síntesis rápida de ácidos grasos.* Esta fase dura unos 20 días en *Brassica* y en ricino. Al final de esta fase se ha almacenado aproximadamente el 90 por 100 de las reservas lipídicas. Esta acumulación tiene lugar fundamentalmente en los llamados cuerpos lipídicos.
3. *Fase final.* En esta fase termina la deposición de triglicéridos, acontecimiento que coincide con el comienzo de la deshidratación de la semilla. Es posible que durante esta fase algunas de las enzimas asociadas con la biosíntesis de los triglicéridos de reserva sean destruidos, y que la capacidad para volverlos a sintetizar se pierda de manera irreversible.

### 33.3. Papel de las hormonas vegetales en la maduración de las semillas

Está perfectamente demostrado que las hormonas vegetales se encuentran en las semillas durante el proceso de su maduración, por lo que es lógico suponer que algún papel fisiológico desempeñarán en ellas. Este posible papel o papeles fisiológicos pueden agruparse, según Bewley y Black, en cuatro categorías o grupos:

1. Se acumulan durante la maduración, en preparación para su posterior participación en el control de la germinación y del crecimiento de la plántula. Como ejemplos podemos citar la participación muy probable, como hemos visto en el capítulo anterior, del ABA en la dormición y también la posible liberación durante la germinación de giberelina y auxina a partir de formas ligadas de ambas.
2. Pueden controlar el crecimiento y desarrollo del fruto, como ocurre en *Pisum sativum*, en el que la tasa de crecimiento de la pared del ovario está relacionada con el contenido hormonal de la semilla.
3. El desplazamiento de materia seca hacia la semilla puede estar controlado por el contenido hormonal de las mismas; en trigo, por ejemplo, los niveles más eleva-

dos de auxinas durante el desarrollo del grano, están íntimamente asociados con la fase de máxima acumulación de materia seca (carbohidratos y sustancias nitrogenadas).

4. Por último, el propio crecimiento y desarrollo de las semillas puede estar bajo control hormonal. Así, vemos cómo la curva diáuxica de crecimiento de semillas de *Pisum arvense* se corresponde con los cambios en el contenido de citoquininas. En *Pisum sativum* existe una clara correlación entre las fases de crecimiento máximo de las semillas y los niveles de auxina y giberelina en el endospermo y embrión; además, la disminución en la tasa de crecimiento de las semillas se corresponde con un aumento en la concentración de ácido abscísico.

### 33.4. Estructura y composición química de la semilla madura

Las semillas se desarrollan a partir del óvulo fertilizado. En una semilla madura se distinguen las partes siguientes:

- *La testa*, que es la cubierta de la semilla y se forma a partir de los tegumentos del óvulo.
- *El endospermo*, que puede existir en gran cantidad o casi faltar; este último caso se da en aquellas semillas en las que los cotiledones actúan como órganos de reserva. El endospermo se forma como resultado de la fusión entre un núcleo masculino generativo y los dos núcleos polares, formándose como resultado el núcleo endospermico triploide; en las Gimnospermas el endospermo es un tejido del gametofito femenino haploide.
- *El embrión*, que es el joven esporofito parcialmente desarrollado y que no es más que el resultado de la fertilización de la ovocélula en el interior del saco embrionario por un núcleo masculino.

En las semillas de algunas plantas como *Beta*, *Yucca*, *Coffea*, el tejido nucelar persiste y aumenta de volumen, dando lugar al *perispermo*. El grado de desarrollo de estos componentes e incluso su presencia o ausencia conduce a algunas de las diferencias estructurales entre los diferentes tipos de semillas (Fig. 33.4). El tamaño y forma de las semillas es extraordinariamente variable, abarcando desde las semillas en forma de esporas de las orquídeas, las semillas de las plantas cultivadas como trigo, arroz, judía, garbanzo, hasta la semilla de *Lodoicea* que puede pesar hasta 15 kg.

La testa suele ser generalmente una envuelta dura, que presenta una cutícula lipídica o cérea que, junto con una o varias capas de células protectoras, le confiere un mayor o menor grado de impermeabilidad al agua y los gases, haciendo de esta estructura un elemento muy importante en el control de la germinación. En algunos casos la testa puede ser mucilaginoso, desempeñando entonces un importante papel en la retención de agua y dispersión de las semillas. El perispermo en la mayoría de las semillas no pasa de un incipiente estado de desarrollo, pero en algunos casos como *Yucca* y *Coffea* se transforma en el principal tejido de almacenamiento de sustancias de reserva. En las semillas que contienen endospermo, éste almacena una gran variedad de sustancias de reserva que son utilizadas durante la germinación de las semillas. Algunas semillas con

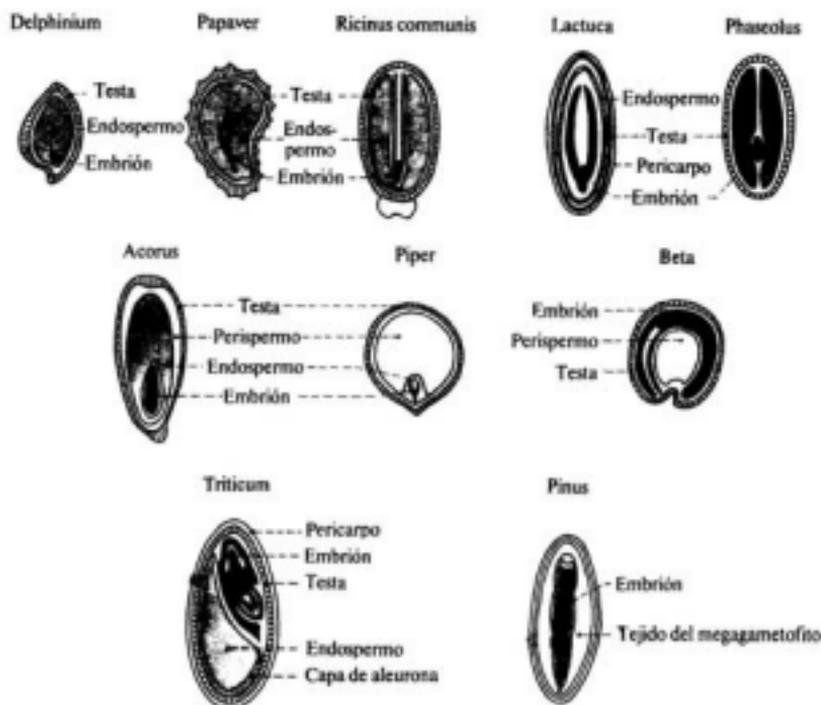


Figura 33.4.—Estructura de distintos tipos de semillas (tomado de J. D. Bewley y M. Black, *Physiology and Biochemistry of Seeds*, vol. 1, Springer-Verlag, Berlín, 1978).

abundante endospermo son las gramíneas *Trigonella foenum-graecum*, *Ricinus communis* y *Phoenix dactylifera*. En muchas plantas, el endospermo se encuentra muy reducido como en las crucíferas; en otras, como en las orquídeas, falta por completo. En estos casos, las reservas alimenticias se presentan en otras partes como cotiledones o incluso embrión. Este no es el caso de las orquídeas, en las que casi faltan por completo los materiales de reserva y representan por ello un caso muy especial de estructura seminal. El embrión consta de un eje embrionario con uno o más cotiledones. El eje embrionario está compuesto por la radícula, el hipocótilo al que se encuentran unidos los cotiledones y que une la radícula con la plúmula o epicótilo, donde se encuentran las primeras hojas verdaderas; a veces existe el mesocótilo, que es un entrenudo entre los cotiledones. Todas estas partes son fácilmente distinguibles en el embrión de las dicotiledóneas, pero son más difíciles de identificar en las monocotiledóneas, en las que el único cotiledón se ha transformado en el escutelo, la vaina basal del cotiledón se transforma en el coleóptilo, que protegerá al embrión (Fig. 33.1). La localización del embrión puede variar dentro de la semilla y puede ir desde ocupar casi toda la semilla como en las rosáceas y crucíferas, o ser casi rudimentario como en las ranunculáceas.

La composición química de las semillas presenta una gran variabilidad. Los componentes que se encuentran en las semillas pueden dividirse en dos grupos:

1. Compuestos que pueden encontrarse en cualquier parte de la planta.
2. El material de reserva, productos que, aunque pueden aparecer en otras partes de la planta en las semillas, se caracterizan por aparecer en concentraciones elevadas.

En adición a estos compuestos se pueden añadir otros productos secundarios que se presentan en algunas ocasiones. Las reservas almacenadas en las semillas son las que permiten el crecimiento y desarrollo de la plántula, hasta que ésta puede establecerse como una unidad fotosintetizadora y comenzar su vida autótrofa independiente. Existe una gran diferencia entre las semillas en su contenido de materiales de reserva. Los carbohidratos, fundamentalmente almidón, son muy abundantes en los cereales, aunque también están presentes los lípidos y las proteínas. Muchas semillas de importancia agrícola almacenan lípidos (aceites) como principal reserva. Un tercer grupo de semillas son aquellas que, junto a concentraciones elevadas de carbohidratos, también almacenan grandes cantidades de proteínas, como ocurre en algunas leguminosas tales como judía, garbanzo o lenteja. En la tabla 33.2 se muestra la composición química relativa a las sustancias de reserva de algunas semillas.

TABLA 33.2  
Composición química de algunas semillas

Especie	Porcentaje de peso seco		
	Carbohidratos	Proteínas	Lípidos
<i>Zea mays</i> .....	70	11	5
<i>Avena sativa</i> .....	66	13	8
<i>Triticum aestivum</i> .....	75	12	2
<i>Linum usitatissimum</i> .....	24	24	36
<i>Ricinus communis</i> .....	trazas	18	64
<i>Brassica napus</i> .....	27	28	34
<i>Pisum sativum</i> .....	52	24	6
<i>Cicer arietinum</i> .....	67	17	6
<i>Lens culinaris</i> .....	60	23	2

Datos basados en resultados propios y según Bewley y Black (ver bibliografía recomendada).

### 33.4.1. Carbohidratos

Los principales carbohidratos de reserva son el almidón y las hemicelulosas. El almidón se encuentra en gramíneas y leguminosas principalmente y aparece en forma de gránulos de almidón que muestran una apariencia característica, esférica, angular o elíptica, según las especies y que depende de la proporción de amilosa; así, por ejemplo,

los más redondeados tienen una mayor cantidad de amilosa. Las hemicelulosas aparecen en el endospermo de los dátiles y en los cotiledones de *Lupinus* y *Primula*. La mayoría de estas hemicelulosas son mananos con pequeñas cantidades de glucosa, galactosa y arabinosa como cadenas laterales. El perispermo de *Coffea arabica* consta también de un 5 por 100 de manano que posee un 2 por 100 de galactosa. También se encuentran algunos galactomananos, como carbohidratos de reserva, en el endospermo de semillas de leguminosas, rubiáceas, convolvuláceas y palmáceas. No es frecuente encontrar azúcares como carbohidratos predominantes de reserva. Sin embargo, éste es el caso de *Acer saccharum* que contiene un 6,4 por 100 de sacarosa y 5,2 por 100 de otros azúcares y no poseen almidón. En muchas semillas se encuentran cantidades variables, pero siempre pequeñas, de glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa.

### 33.4.2. Proteínas

Una de las características fundamentales de las proteínas de las semillas, es que mientras algunas de ellas son metabólicamente activas, las proteínas enzimáticas, otras son metabólicamente inactivas, las proteínas de reserva. Según Osborne, las proteínas de las semillas pueden clasificarse en cuatro grupos basados en la diferente solubilidad en ácidos o en álcalis:

- *Albuminas*, solubles en agua y soluciones ácidas diluidas. Son fundamentalmente proteínas enzimáticas.
- *Globulinas*, insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas (0,4 M NaCl). No son tan fácilmente coagulables por el calor como las albúminas.
- *Glutelinas*, insolubles en agua, soluciones salinas y etanol, pero pueden extraerse con soluciones fuertemente ácidas o alcalinas.
- *Prolaminas*, solubles en etanol (90 por 100) pero no en agua.

No todos estos grupos de proteínas se encuentran necesariamente en todas las semillas; en muchas, el componente mayoritario son las globulinas; en los cereales, menos el arroz, entre el 40 y el 60 por 100 son prolaminas y entre el 20 y el 40 por 100 son glutelinas.

a) *Proteínas de gramíneas*.—Los cuatro tipos de proteínas descritas por Osborne se encuentran en los granos de cereales, siendo las prolaminas y glutelinas las más abundantes. Entre las prolaminas se encuentran la gliadina del trigo, hordeína de cebada y zeína de maíz. La fracción de glutelina es muy heterogénea, estando formada por varias proteínas. Generalmente, las prolaminas presentan un contenido elevado en prolina, glutamina y asparragina, mientras que presentan cantidades relativamente bajas en triptófano, lisina y metionina. Las globulinas de ciertos cereales son muy similares en su composición de aminoácidos a las globulinas de otras semillas, incluso de leguminosas, dándose el caso en cebada, arroz y trigo, de la existencia de una proteína muy similar a la legúmina.

b) *Proteínas de leguminosas*.—Al grupo de las albúminas y globulinas pertenecen en las leguminosas las proteínas de reserva, las proteasas y sus inhibidores. Algunas de las

globulinas se han obtenido cristalizadas, como la legúmina y vicilina de guisante, araquina y conaraquina de cacahuete y glicinina de soja. La separación de las globulinas de leguminas por ultracentrifugación revela generalmente dos bandas, una con un coeficiente de sedimentación de 11-12 S (legúmina) y otra con un coeficiente de sedimentación de 7-8 S (vicilina). Una característica común de todas ellas son los niveles relativamente elevados de asparragina, glutamina y arginina y un contenido muy bajo o nulo de cisteína en la vicilina.

c) *Cuerpos proteicos*.—Fueron aislados por primera vez por Hartig en 1855, que los denominó granos de aleurona. Se encuentran en todos los tejidos que almacenan proteínas (Fig. 33.2), presentan una sección oval o circular y se encuentran rodeados por una membrana lipoproteica. Presentan a veces inclusiones denominadas cristaloides o globoides. Las inclusiones cristalinas son también de naturaleza proteica. En *Cannabis*, por ejemplo, el cristaloides ha sido identificado como la proteína edestina, una globulina con un coeficiente de sedimentación de 11 S. Los globoides son de estructura globular no cristalina. En los cuerpos proteicos se deposita también la fitina y a veces lípidos y RNA. También se han localizado en el interior de los cuerpos proteicos varias hidrolasas, fundamentalmente fosfatasas y proteasas, lo que sugiere una posible naturaleza lisosomal de los cuerpos proteicos.

### 33.4.3. Lípidos

Son un grupo de sustancias ricas en carbono e hidrógeno, solubles en los solventes orgánicos pero insolubles en agua. En semillas oleaginosas el material de reserva está constituido esencialmente por lípidos. Desde el punto de vista cuantitativo, la clase principal de éstos, presente en las semillas maduras, son los triglicéridos, bien como grasas o aceites, que pueden llegar a constituir entre el 10 y el 70 por 100 del peso seco del tejido. Los fosfolípidos y glicolípidos representan normalmente menos del 2 por 100 de los lípidos totales de la semilla. Una excepción la constituye *Briza spicata*, que tiene un 20 por 100 de lípidos, de los cuales el 78 por 100 son galactosil-diglicéridos. Otras excepciones son *Simonsia californica* y *Murraya koenigii*, en las que el principal componente lipídico lo constituyen las ceras. El glicerol tiene tres lugares de unión con los ácidos grasos, lo que permite, en teoría, una amplia variedad de compuestos. En los triglicéridos de semillas se encuentran tanto ácidos grasos saturados como insaturados. Entre los primeros el palmítico es el más abundante, encontrándose también caproico, caprílico, cáprico, láurico y mirístico. Sin embargo, los ácidos grasos predominantes en las semillas son los insaturados, y dos de ellos, oleico y linoleico, constituyen el 60 por 100 del peso del aceite en todas las semillas productoras de aceite. Otros dos ácidos muy poco frecuentes, pero que en crucíferas aparecen en concentraciones muy elevadas, son el erúcido y el ecosenoico.

a) *Cuerpos lipídicos*.—Las reservas lipídicas aparecen depositadas en unos orgánulos subcelulares denominados cuerpos lipídicos. Otros nombres utilizados son esferosomas, oleosomas y vesículas almacenadoras de lípidos. En las células de las semillas oleaginosas, los cuerpos lipídicos ocupan casi todo el territorio celular. Un problema aún no del todo resuelto es el de si los cuerpos lipídicos están rodeados o no por una membrana

lipoproteica. Estudios realizados mediante microscopía electrónica utilizando la técnica de criofractura en células de aleurona de cebada, y análisis bioquímicos en cuerpos lipídicos de cacahuete y de nuez, parecen sugerir la presencia de una membrana rodeando los cuerpos lipídicos.

#### 33.4.4. Otros compuestos

Además de los componentes mayoritarios ya citados, las semillas contienen un gran número de otras sustancias. Así, la fitina es la forma principal de almacenamiento de fosfato en las semillas; se encuentra asociada a los gránulos de aleurona en los cereales y a los globoides de los cuerpos proteicos en muchas dicotiledóneas. Los ácidos nucleicos, que pueden presentarse bien en forma libre o como núcleo proteínas. La proporción de RNA/DNA en la mayoría de las semillas es de 10:1. También se encuentran nucleótidos libres. Sustancias nitrogenadas no proteicas, tales como alcaloides, aminoácidos libres y amidas son compuestos frecuentes de muchas semillas. Algunos ejemplos de alcaloides son la piperina en *Piper nigrum*, la teobromina en *Theobroma cacao*, la cafeína en *Coffea* y la estricnina en *Strychnos nuxvomica*. Algunos de los aminoácidos libres son los que forman parte de las proteínas, mientras que otros son aminoácidos no proteináceos como el ácido  $\gamma$ -metilén glutámico,  $\beta$ -pirazol-alanina, ácido piperólico. También aparecen en las semillas ácidos orgánicos, fenoles, vitaminas, hormonas, pigmentos tales como carotenos, antocianinas, flavonoides, productos de degradación de la clorofila e incluso en las semillas de las Gimnospermas aparece clorofila.

#### 33.5. Germinación

El término germinación se utiliza para referirse a un gran número de procesos, tales como germinación de semillas, de esporas de bacterias, hongos y helechos, además de los que tienen lugar en la formación del tubo polínico. Aunque todos son procesos de germinación, vamos a restringir en este capítulo el término germinación para referirnos exclusivamente a los procesos fisiológicos que tienen lugar en las semillas de plantas superiores. La germinación de semillas puede ser definida como una serie de acontecimientos metabólicos y morfogenéticos que tienen como resultado la transformación de un embrión en una plántula que sea capaz de valerse por sí sola y transformarse en una planta adulta. En la germinación se dan procesos secuenciados y sincronizados, en un esquema tan organizado que los procesos anabólicos y catabólicos son simultáneos. Como normal general, con la germinación de la semilla la testa se rompe y la radícula emerge. En algunas semillas como en *Salsola*, no es la radícula sino el ápice caulinar el órgano que emerge en primer lugar. Una vez fuera, la radícula penetra en el suelo, produce pelos absorbentes y a veces raíces laterales, comenzando los procesos de absorción de nutrientes del suelo. En muchas semillas los cotiledones y el ápice caulinar emergen cuando el hipocótilo se alarga como resultado de un crecimiento intercalar; este tipo de germinación se llama epigea (Fig. 33.5); como ejemplos podemos citar *Ricinus communis*, *Allium cepa*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucurbita pepo*, *Lactuca sativa*. En muchas otras plantas, como en *Vicia faba* y *Pisum sativum* los cotiledones que contie-

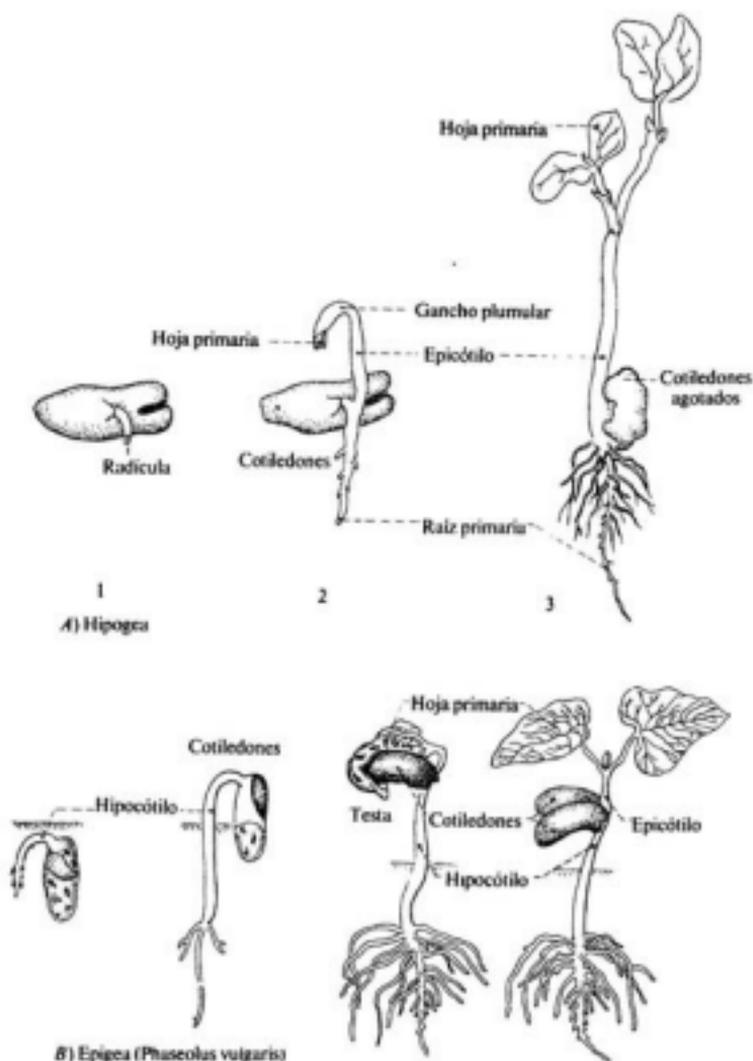


Figura 33.5.—Desarrollo de plántulas. A) Germinación hipogea. B) Germinación epigea.

nen las sustancias de reserva permanecen dentro de la testa y bajo el suelo, el hipocótilo no se alarga o apenas si lo hace. Este tipo de germinación se llama hipogea (Fig. 33.5). En este caso, la yema terminal del embrión es empujada hacia afuera por alargamiento del epicótilo, que es el entrenudo que hay sobre los cotiledones. En las gramíneas, si

consideramos que el escutelo, que no es más que el cotiledón modificado, nunca se eleva por encima del endospermo durante la emergencia de la plántula, se da este tipo de germinación hipogea.

### 33.6. Factores que afectan la germinación

Podemos considerar dos tipos de factores que afectan la germinación de las semillas: intrínsecos y extrínsecos. Entre los primeros tenemos la viabilidad de las semillas, que es el período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar, y que es extremadamente variable, dependiendo de las condiciones de almacenamiento y por supuesto del tipo de semilla. Según su longevidad, es decir, el tiempo que pueden permanecer viables, podemos agrupar las semillas en tres tipos: semillas macrobióticas, mesobióticas y microbióticas.

Las primeras, pueden germinar todavía después de decenas o centenas de años. Se da en semillas con una envuelta seminal dura como las leguminosas. El caso más extremo de retención de viabilidad es el de las semillas de *Nelumbo nucifera* encontradas en Manchuria y con una antigüedad calculada de unos 250 a 400 años. Las mesobióticas, que son las más frecuentes, tienen una longevidad entre 3 y 15 años; en este caso se encuentran los cereales. La germinación de semillas de trigo encontradas en las tumbas de los faraones es solamente una leyenda. Las semillas microbióticas no sobreviven más que algunos días o meses. Como ejemplo tenemos *Acer saccharinum*, *Salix japonica* que pierden su viabilidad en una semana o *Ulmus campestris* y *Ulmus americana* que permanecen viables durante 6 meses.

Entre los factores extrínsecos tenemos: agua, gases, temperatura y luz. Veamos cada uno de ellos.

#### 33.6.1. Agua

El primer proceso que tiene lugar durante la germinación es la toma de agua por la semilla. Esta toma de agua se conoce como fase de imbibición. La magnitud de la fase de imbibición está determinada por tres factores: composición química de la semilla, las semillas ricas en proteínas absorben gran cantidad de agua, mientras que las oleaginosas absorben menos; permeabilidad de la envuelta seminal y disponibilidad de agua en el medio ambiente. La imbibición es un proceso físico sin ninguna relación con la viabilidad de las semillas, ya que ocurre igual en semillas vivas que en semillas muertas por el calor. Durante la imbibición, las moléculas del solvente penetran en el interior de la semilla provocando un hinchamiento y un aumento en el peso fresco de la misma, entre un 40 y un 150 por 100 del peso seco (Fig. 33.6). La entrada de agua en el interior de las semillas da lugar a una dispersión de los coloides, necesaria para la vuelta a la vida activa, rehidrata las reservas alimenticias, que sólo pueden transformarse en sustancias asequibles al embrión en presencia de agua; por último, los sistemas enzimáticos responsables de la hidrólisis de las sustancias de reserva sólo se activan en presencia de agua que los hidrate.

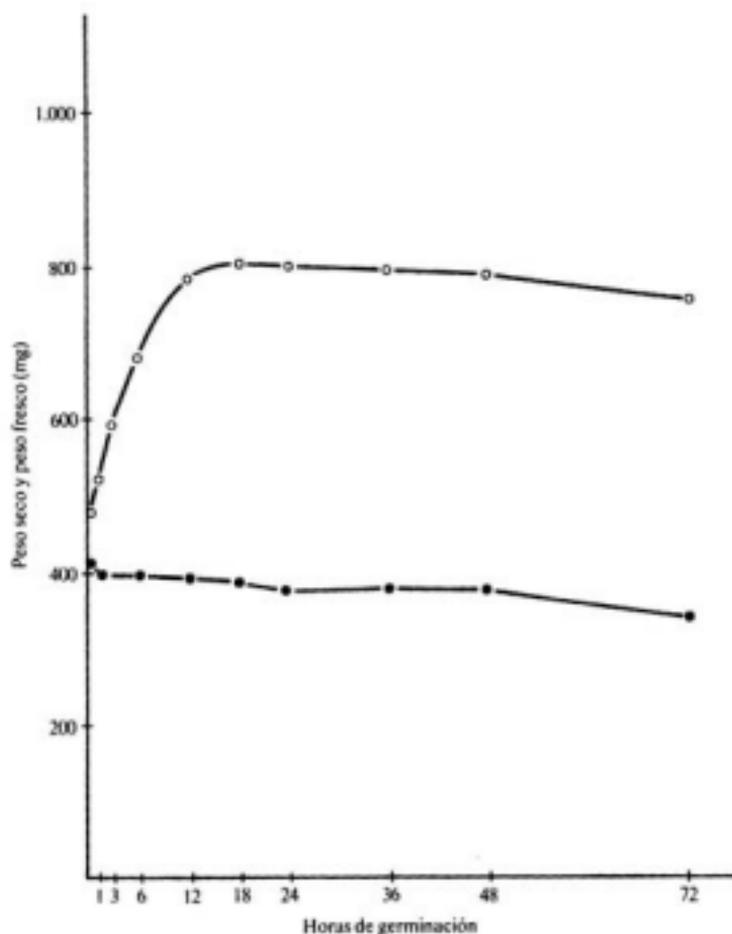


Figura 33.6.—Cambios del peso seco (●—●) y del peso fresco (○—○) de los cotiledones de *Cicer arvense* durante la germinación (datos tomados de Aldasoro y Nicolás, «Int. J. Biochem.», vol. 10, 1979, páginas 947-950).

La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio ambiente. Este potencial hídrico es mucho más bajo en las semillas secas maduras que en el medio ambiente en condiciones normales. Esta diferencia crea lo que se llama una presión de imbibición. En semillas como *Brassica napus*, *Triticum aestivum*, y *Zea mays* el potencial hídrico puede aumentar durante la fase de imbibición desde  $-4.000$  bares hasta  $-10$  bares, lo que lleva aparejado una entrada considerable de agua.

### 33.6.2. Gases

La respiración es un proceso que requiere un consumo considerable de energía. En las células vivas los principales procesos productores de energía son la respiración y la fermentación. Ambos procesos implican un intercambio de gases  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ , entre las células y el medio ambiente. La germinación, por tanto, estará profundamente afectada por la composición de la atmósfera circundante. La mayoría de las semillas germinan bien en atmósfera normal con un 20 por 100 de oxígeno y un 0,03 por 100 de  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, existen algunas semillas que aumentan su porcentaje de germinación al disminuir el contenido de oxígeno por debajo del 20 por 100. Los casos mejor conocidos son los de *Typha latifolia* y *Cynodon dactylon* que germinan mejor en presencia de un 8 por 100 de oxígeno que en la atmósfera normal. Algunas semillas pueden resistir bien las condiciones de anaerobiosis y así, el arroz, presenta un porcentaje de germinación del 80 por 100 en presencia de un 0,3 por 100 de oxígeno, y el trigo, en un 5,2 por 100 de oxígeno; se ha demostrado, sin embargo, que estas condiciones de anaerobiosis conducen a la formación de plántulas anormales y que tales anomalías pueden corregirse por la presencia de oxígeno. El efecto del  $\text{CO}_2$  es el contrario del oxígeno. La mayoría de las semillas no pueden germinar si se aumenta la concentración de  $\text{CO}_2$ . Un caso muy particular es el de las semillas de *Nelumbo nucifera* que pueden germinar en atmósferas cuya composición sea del 100 por 100 de nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono. Esto es debido a que el oxígeno es suministrado al embrión a través de una cavidad interna y desde los espacios intercelulares de los tejidos seminales; un análisis del gas atrapado en el interior de la semilla revela la siguiente composición: 18,3 por 100 de oxígeno; 0,74 por 100 de dióxido de carbono y 80,93 por 100 de nitrógeno.

### 33.6.3. Temperatura

Es conocido universalmente que las semillas sólo germinan dentro de un cierto margen de temperatura. Si la temperatura es muy alta o muy baja, la germinación no tiene lugar aunque las demás condiciones sean favorables. El límite inferior está alrededor de  $0^\circ\text{C}$ : como ejemplos de germinación a estas temperaturas podemos citar a *Fagus sylvatica* y *Trifolium repens*, además de las especies alpinas que germinan a temperaturas muy próximas a los  $0^\circ\text{C}$ . El óptimo oscila entre  $25$  y  $31^\circ\text{C}$  y el máximo entre  $40$  y  $50^\circ\text{C}$ ; como ejemplos de estos límites tenemos *Cucumis sativus*, que germina a  $48^\circ\text{C}$ . En contraste con aquellas semillas que germinan inmediatamente al ser colocadas a una temperatura determinada, están aquellas otras que requieren una alternancia periódica de temperatura, como ocurre en *Oenothera biennis*, *Rumex crispus*, *Cynodon dactylon*, *Nicotiana tabacum*, *Poa trivialis*, etc. El caso más frecuente es la alternancia diurna entre bajas y altas temperaturas, pareciendo que ni la intensidad ni la duración del cambio de temperaturas son los agentes desencadenadores de la germinación, sino que el propio cambio por sí, es el que actúa como agente desencadenante.

### 33.6.4. Luz

Sobre los efectos de la luz en la germinación ya hemos hablado en el capítulo anterior y en el capítulo 30, por lo que no volveremos a insistir aquí sobre ello.

### 33.7. Aspectos metabólicos de la germinación

Los procesos metabólicos que en relación con la germinación han sido más estudiados, son la respiración y movilización de las sustancias de reserva. Será, por tanto, a estos aspectos a los que dediquemos especial atención en este apartado.

#### 33.7.1. Respiración

Tres rutas respiratorias, glucólisis, ciclo de las pentosas fosfato y ciclo del ácido cítrico son funcionales en las semillas imbibidas. Estas tres rutas producirán una serie de compuestos intermediarios del metabolismo vegetal, así como considerables cantidades de energía y poder reductor. La respiración de las semillas secas es muy débil, debido con toda seguridad al bajo contenido de agua que poseen y que oscila entre el 5 y el 10 por 100, ya que la mayoría de las semillas secas están equipadas con todo el equipo bio-

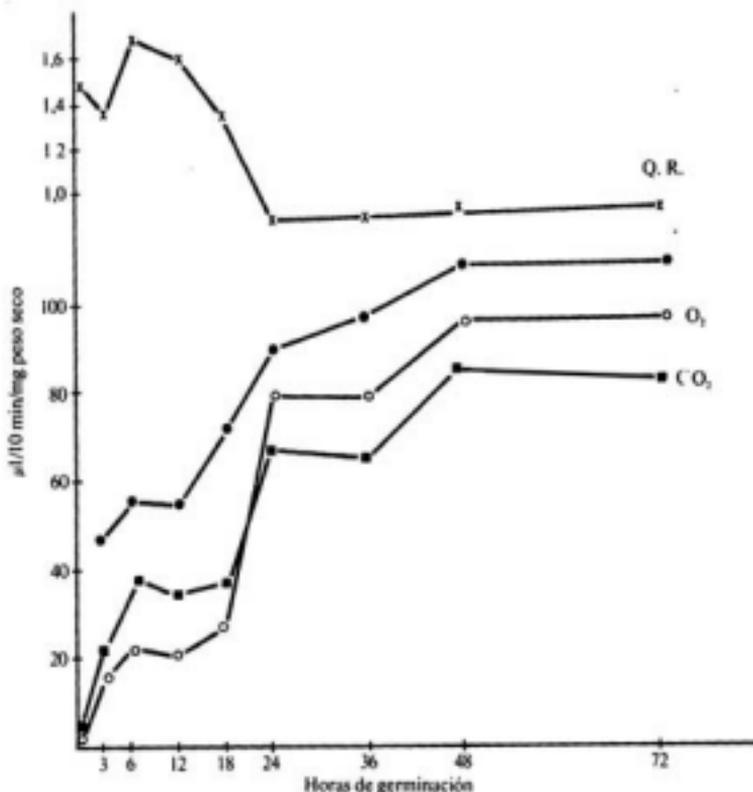


Figura 33.7.—Actividad respiratoria y cociente respiratorio (Q.R.) durante la germinación de semillas de *Cicov arizianum* (o—o) toma de O<sub>2</sub>; (■—■) eliminación de CO<sub>2</sub>; (●—●) toma de O<sub>2</sub> sin testa (datos tomados de Fuente Burguillo y Nicolás, «Rev. Española Fisiol.», vol. 35, 1979, págs. 401-408).

químico necesario para llevar a cabo una intensa actividad respiratoria. La introducción de las semillas secas en agua tiene como resultado un aumento casi inmediato del intercambio de gases (Fig. 33.7). Básicamente, en el proceso de toma de oxígeno pueden distinguirse tres o cuatro fases. La primera se caracteriza por un aumento brusco de la respiración que dura aproximadamente entre 6 y 10 horas, debido fundamentalmente a la hidratación de enzimas respiratorios. La segunda fase se caracteriza por una estabilización en el intercambio gaseoso y que tiene lugar cuando el hinchamiento de la semilla se ha completado; durante estas dos fases el cociente respiratorio es superior a la unidad (Fig. 33.7) debido probablemente a la actividad fermentativa observada en muchas semillas en estos primeros momentos de la germinación. La fase tercera se caracteriza por un segundo aumento en el intercambio gaseoso y que suele coincidir con la rotura de la testa por parte de la radícula, lo que hace que el intercambio de gases tenga lugar sin la limitación impuesta a veces por la cubierta seminal; durante esta fase el cociente respiratorio es de aproximadamente 1,0 en semillas con carbohidratos como reserva principal, mientras que en semillas oleaginosas el valor del cociente respiratorio está comprendido entre 0,6 y 0,7. Una cuarta fase, que marca una disminución en la respiración y coincidente con la desintegración de los cotiledones, una vez que se han agotado las reservas nutritivas, puede observarse en muchas semillas. Los mecanismos de la respiración y fermentación pueden ser extraordinariamente variados. Sin embargo, el mecanismo mejor establecido de la respiración es el que comienza con la glucólisis, seguido por la oxidación del piruvato en el ciclo de Krebs. Un mecanismo alternativo es la oxidación directa de la glucosa fosfato por la ruta de las pentosas fosfato. El proceso fermentativo tiene lugar a través de la glucólisis, pudiendo el ácido pirúvico formado, ser descarboxilado y reducido a alcohol, o bien reducido directamente formándose ácido láctico. El objetivo fundamental del proceso respiratorio es el de la formación de ATP y piridín nucleótidos necesarios para la intensa actividad metabólica que tiene lugar durante la germinación. La existencia de estos procesos respiratorios en semillas está perfectamente documentada, como se demuestra mediante la determinación de los enzimas necesarios o por la acumulación de etanol durante la germinación (Fig. 33.8). Volveremos con más detalle sobre este tema en el apartado de la regulación de la germinación.

### 33.7.2. Movilización de las reservas

Una vez que comienza la germinación, se van a producir una serie de reacciones metabólicas en el interior de la semilla, que darán como resultado la transformación de las macromoléculas de reserva en moléculas solubles más sencillas y asequibles al embrión. Estas reacciones serán catalizadas por las correspondientes enzimas hidrolíticas, cuya actividad aumenta considerablemente durante la germinación, bien por activación de los enzimas preexistentes o bien por síntesis de nuevos enzimas. Por conveniencia, y para facilitar su estudio, dividiremos este apartado en varias partes, tratando en cada una de ellas la movilización de un determinado material de reserva.

a) *Carbohidratos.*—Aunque se han encontrado en semillas diversos polisacáridos como material de reserva, sólo el almidón ha sido extensamente estudiado en su meta-

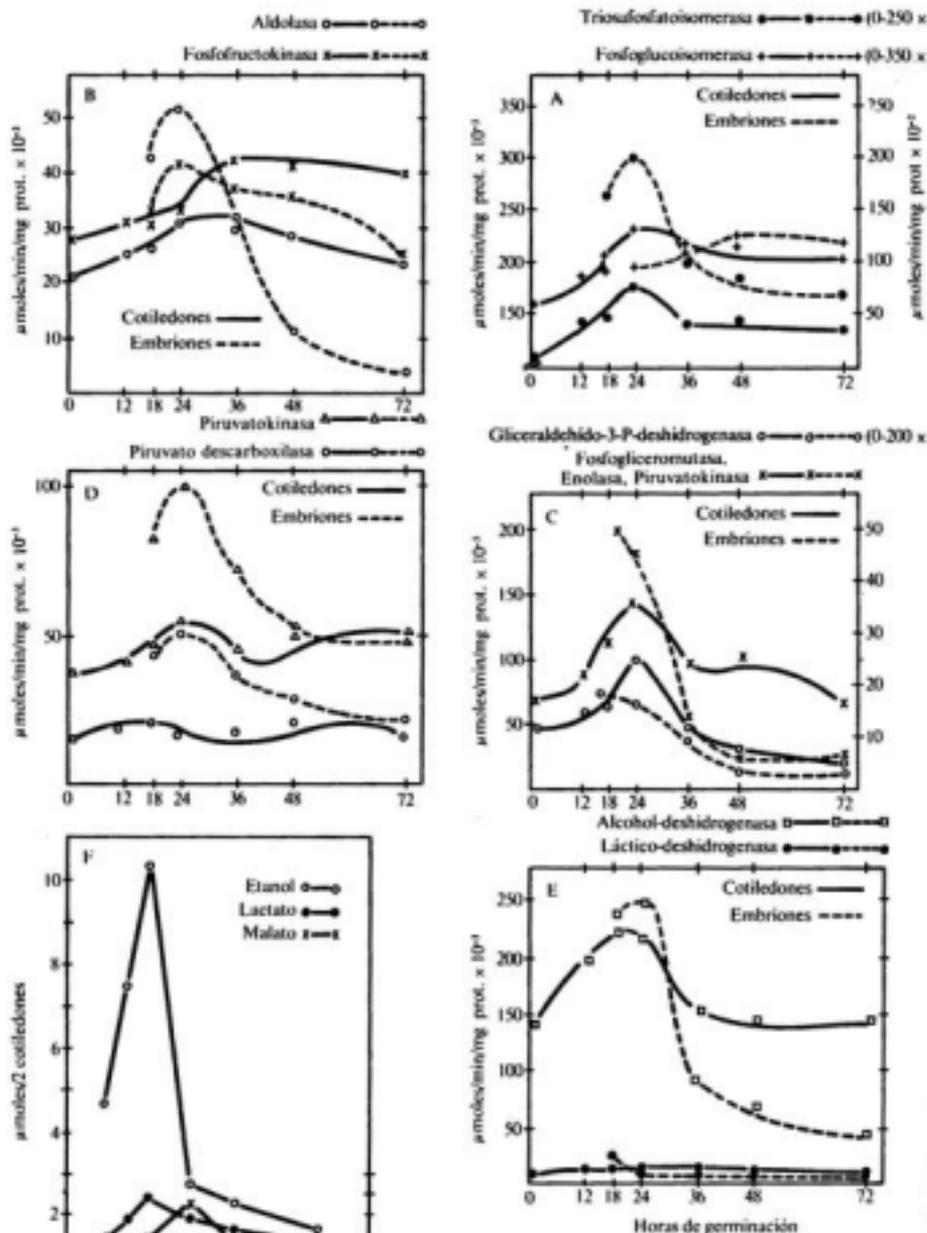
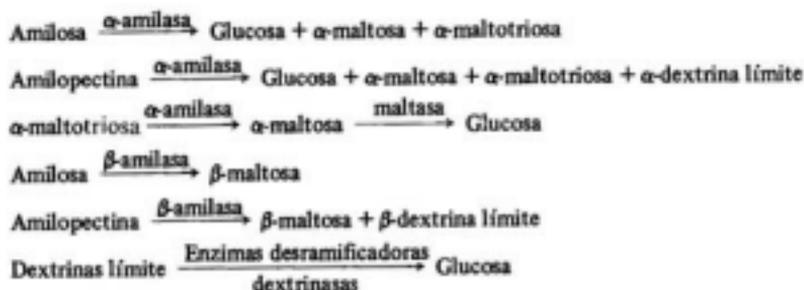


Figura 33.8.—Actividad glucólica y fermentativa durante la germinación de semillas de *Cicer arietinum*. (Datos tomados de Fuente Burguillo y Nicolás, «Plant Sci. Lett», núm. 3, 1974, págs. 143-148 y Aldasoro y Nicolás, *Phytochemistry*, vol. 19, 1980, págs. 3-5).

bolismo durante la germinación, debido a estar presente en casi todas las semillas y constituir en la mayoría de ellas, la principal reserva de energía. Dos rutas catabólicas participan en la degradación del almidón. Una de ellas es hidrolítica e implica la acción de dos amilasas, la  $\alpha$  y la  $\beta$ . La existencia de estos dos enzimas fue demostrada por Kühn en 1925 y a él se debe su denominación, ya que observó que los azúcares liberados por acción de la  $\alpha$ -amilasa tienen el grupo reductor en configuración  $\alpha$ , mientras que los liberados por la  $\beta$ -amilasa presentan el grupo reductor en configuración  $\beta$ .



La amilosa y la amilopectina son atacadas por la  $\alpha$ -amilasa que hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha 1,4$  de una manera desordenada en distintos puntos de la cadena; debido a su incapacidad para hidrolizar los enlaces  $\alpha 1,6$  de las cadenas ramificadas de la amilopectina se liberan grupos de subunidades de glucosa muy ramificadas, las llamadas dextrinas límite que son hidrolizadas por unos enzimas desramificadores, produciendo oligosacáridos lineares. La acción combinada de  $\alpha$ -amilasa y enzima desramificadora es suficiente, en teoría, para la hidrólisis completa del almidón. La  $\beta$ -amilasa libera subunidades de  $\beta$ -maltosa y  $\beta$ -dextrina límite. El disacárido maltosa es hidrolizado por la maltasa en dos moléculas de glucosa.

La otra ruta del catabolismo de almidón es fosforolítica:



La fosforilasa incorpora fosfato, en lugar de agua, a través del enlace  $\alpha 1,4$  entre el último y el penúltimo residuo de glucosa, en el extremo no reductor de la cadena del polisacárido, liberándose una molécula de glucosa-1-P. Como este enzima no puede tampoco actuar sobre los enlaces  $\alpha 1,6$ , se liberan también dextrinas límite.

Todos los enzimas descritos han sido encontrados en gran cantidad de semillas. Sin embargo, no está perfectamente claro el papel que *in vivo* tiene cada una, ya que mientras el almidón en solución es fácilmente degradado en mayor o menor proporción por cualquiera de los enzimas mencionados, los gránulos de almidón son bastante resistentes al ataque enzimático. Actualmente se sabe que la  $\alpha$ -amilasa es el único enzima capaz de atacar al gránulo de almidón nativo y que aun existiendo los demás enzimas no hay degradación de los gránulos en el endospermo de los cereales hasta que no haya secreción de  $\alpha$ -amilasa. Durante la germinación de las semillas, los gránulos de almidón están en contacto directo con el citoplasma, presentando una superficie rugosa en con-

traste con la lisa original, indicando que la hidrólisis se realiza *in situ*. La tasa de desaparición del almidón se incrementa durante la germinación y, en general, hay dos fases claras en su evolución: una lenta durante los primeros días y otra rápida que desemboca generalmente en la práctica desaparición del polisacárido, como ocurre en guisante, aunque también se dan casos como en lenteja en los que al cabo de trece días aún queda el 50 por 100 del almidón sin degradar (Fig. 33.9).

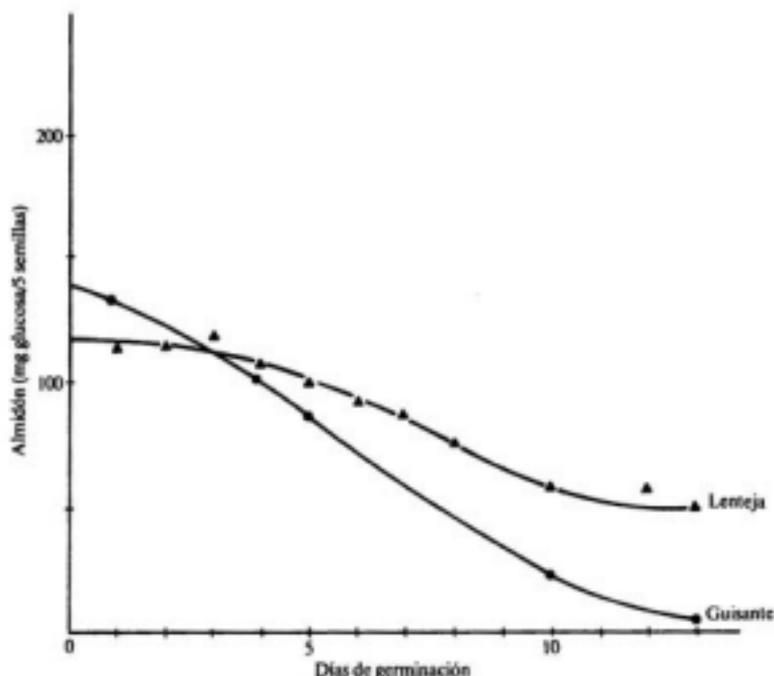


Figura 33.9.—Variaciones en el contenido de almidón de los cotiledones en la germinación de semillas (datos tomados de Juliano y Varner, «Plant Physiol.», vol. 44, 1962, págs. 886-892; Fdez. Tárrego y Nicolás, «Plant Physiol.», vol. 58, 1976, págs. 618-621).

En general, todas las actividades enzimáticas sufren un incremento considerable durante la germinación. La  $\beta$ -amilasa, fosforilasa y amilopectina-1,6-glucosidasa suelen ser enzimas preexistentes y presentan un nivel de actividad considerable en las semillas sin germinar, comenzando el incremento de la actividad ya durante los primeros momentos de la germinación. La  $\alpha$ -amilasa, sin embargo, presenta una actividad muy baja en las semillas sin germinar. Este nivel se mantiene o aumenta muy poco durante el principio de la germinación, hasta que sufre un espectacular aumento al cabo de dos o tres días de germinación (Fig. 33.10). La disolución del almidón en los granos de cereales comienza en la proximidad del escutelo, extendiéndose lateral y longitudinalmente a

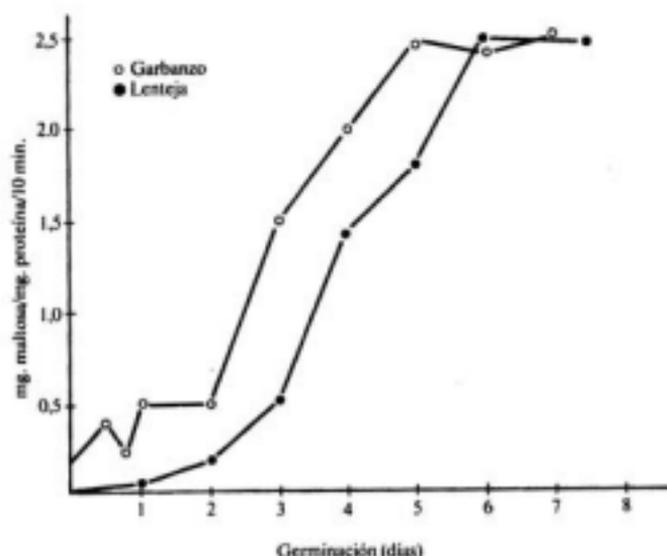


Figura 33.10.—Actividad  $\alpha$ -amilásica durante la germinación de semillas de garbanzo y lenteja (datos tomados de Fdez. Tárrego y Nicolás, «Plant Physiol.», vol. 58, 1976, págs. 618-621; Fdez. Tárrego y col. «Rev. Española Fisiol.», vol. 34, 1978, págs. 87-92).

lo largo del grano. En la hidrólisis intervienen  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas, enzimas desramificadores, de los cuales han sido aislados dos en diversos cereales, y maltasas. En algunos cereales muchas de las hidrolasas son preexistentes e incluso han sido aisladas una especie de cuerpos líticos en cuyo interior se encuentra  $\alpha$ -amilasas y  $\alpha$ -glucosidasas (maltasa).

La movilización del almidón en los cotiledones de leguminosas comienza después de que la radícula ha comenzado su elongación. El primer enzima que aumenta su actividad en los cotiledones es la fosforilasa, seguida algunos días después por un aumento en las amilasas. Parece, por tanto, que la degradación inicial lenta del almidón en leguminosas es consecuencia de la actividad fosforolítica, y que posteriormente la degradación rápida del almidón requiere la actividad amilolítica (Fig. 33.11). El papel de la fosforilasa durante estos primeros momentos de la germinación podría ser también el de suministrar el sustrato para la glucólisis (glucosa-1-P) sin necesidad de consumir ATP.

b) *Proteínas*.—La degradación de las proteínas de reserva se logra por la acción más o menos específica de enzimas proteolíticos cuya importancia es vital para el desarrollo de la nueva plántula. Los enzimas proteolíticos o proteasas se han clasificado en cuatro grupos, basándose en las propiedades de sus centros activos: *serín-proteasas* que tienen serina en su centro activo; *sulfidril-proteasas*, que requieren un grupo -SH libre en su centro activo; *metaloproteasas*, que requieren iones metálicos como cofactores y son inhibidas por agentes quelantes; *ácido-proteasas*, que son activas a pH ácido.

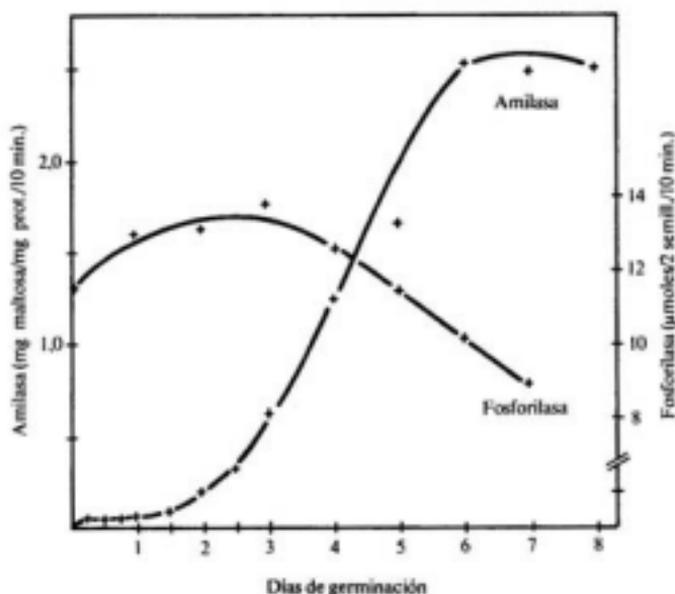
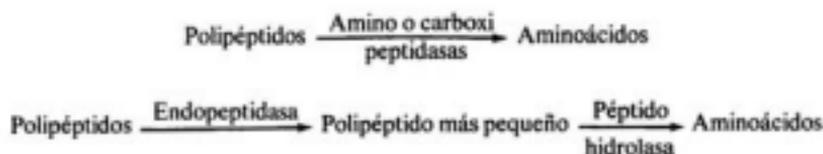


Figura 33.11.—Actividad amilásica y fosforilásica durante la germinación de semillas de *Lens culinaris* (datos tomados de Fernández Tárrega y Gregorio Nicolás, «Plant Physiol.», vol. 58, 1976, págs. 618-621).

Estas enzimas pueden, a su vez, ser clasificadas más específicamente con respecto a sus sustratos en los siguientes grupos: *endopeptidasas*, que rompen enlaces internos de las cadenas polipeptídicas, liberándose polipéptidos de menor tamaño; *aminopeptidasas*, que liberan secuencialmente los aminoácidos terminales comenzando su ataque por el extremo amino de la cadena polipeptídica; *carboxipeptidasas*, igual que en el caso anterior sólo que el ataque se inicia por el extremo carboxil. Tanto éstas, como las aminopeptidasas son exopeptidasas.

La hidrólisis de las proteínas en sus correspondientes aminoácidos puede hacerse por alguna de las dos rutas siguientes:



En los granos de cereales las reservas proteicas están localizadas en dos enclaves distintos: en los granos de aleurona y en los cuerpos proteicos del endospermo. La movili-

zación de estas reservas proteicas ha sido estudiada con cierta profundidad en granos de cebada, en los que parecen existir tres sistemas proteolíticos distintos operando simultáneamente:

1. Un sistema que hidroliza las proteínas de la capa de aleurona y que suministra aminoácidos para la síntesis de enzimas hidrolíticos; este sistema se encuentra, probablemente, bajo el control de las giberelinas producidas por el embrión.
2. Un sistema responsable de la hidrólisis de las reservas proteicas localizadas en el endospermo; este sistema puede a su vez comprender dos componentes, una proteasa sintetizada y secretada por la capa de aleurona y también controlada por la giberelina, y otra proteasa preexistente en el endospermo y activada allí mismo.
3. Un sistema presente en el embrión y responsable del «turnover» de las proteínas durante el crecimiento del embrión, y de la hidrólisis de los pequeños péptidos transportados hacia el escutelo desde el endospermo. Como responsables de estos sistemas se han aislado, en algunas variedades de cebada, hasta ocho proteasas distribuidas entre las células de aleurona, escutelo, endospermo y embrión.

En las dicotiledóneas la degradación de las proteínas de reserva ha sido estudiada intensamente utilizando semillas de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* y *Lens culinaris*. Durante la germinación de semillas de lenteja hay una degradación de las proteínas de reserva que se corresponde con una acumulación de aminoácidos libres en los cotiledones (Fig. 33.12). La digestión de los cuerpos proteicos comienza en la periferia y avanza progresivamente hacia el centro de los cotiledones (Fig. 33.13). En guisante, por el contrario, la digestión comienza en el centro y se extiende hacia la periferia. Al igual que en *Phaseolus vulgaris* y en *Pisum sativum*, en *Lens culinaris* el máximo de actividad proteolítica se produce a los cinco días de germinación (Fig. 33.14), que coincide con el máximo de acumulación de aminoácidos libres. El aumento de actividad proteolítica en el caso de la lenteja parece debido a una síntesis enzimática *de novo* ya que la cicloheximida anula el aumento de actividad; en *Phaseolus vulgaris* el aumento parece ser debido a activación enzimática más que a síntesis *de novo*. Como responsables de la actividad proteolítica se ha identificado en lenteja, una endoproteasa, que al igual que en *Vigna unguiculata*, podría estar localizada en el interior de los cuerpos proteicos y ser responsable del fraccionamiento de los polipéptidos de reserva en fragmentos más pequeños; además de la endoproteasa, se han identificado una carboxipeptidasa, una aminopeptidasa, una dipeptidasa y una péptido hidrolasa que podrían completar la hidrólisis proteica hasta la liberación de aminoácidos.

c) *Lípidos*.—Como hemos indicado en el apartado de la composición química de las semillas, la principal reserva lipídica de las mismas son los triglicéridos. El paso inicial en su degradación implica la acción de lipasas que rompen los enlaces éster liberándose glicerol y ácidos grasos. El glicerol puede entrar en la ruta glucolítica, convirtiéndose en piruvato que será oxidado a través del ciclo de Krebs. Los ácidos grasos liberados pueden ser degradados por reacciones de oxidación. La principal ruta oxidativa de los ácidos grasos es la  $\beta$ -oxidación, que genera como producto final acetyl-CoA. La  $\alpha$ -oxi-

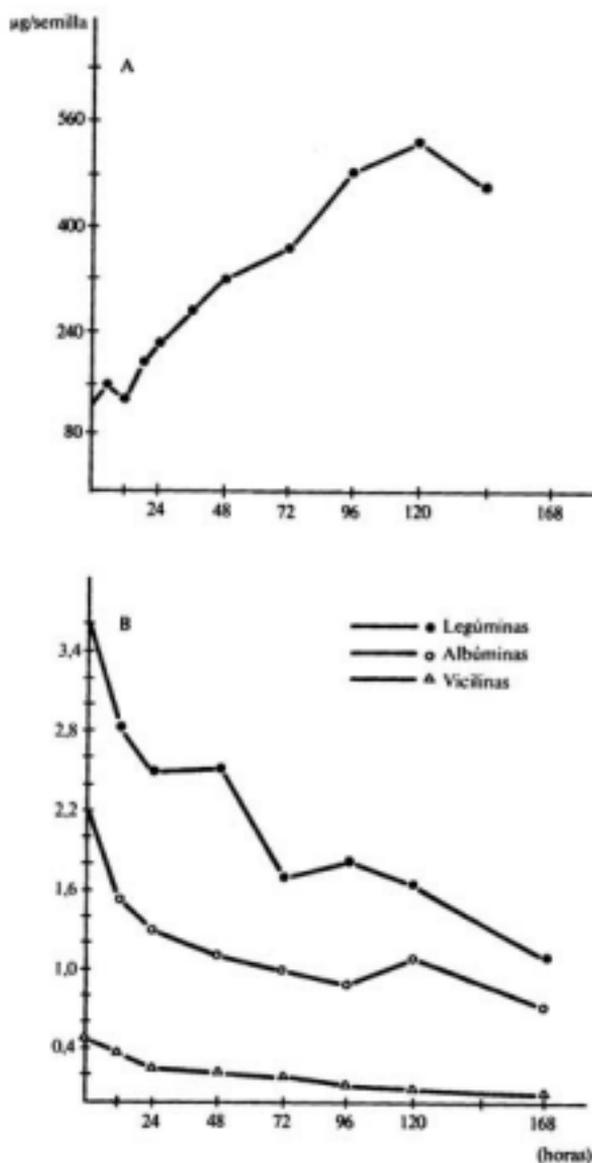


Figura 33.12.—Acumulación de aminoácidos libres (A) y degradación de proteínas de reserva (B) durante la germinación de semillas de *Lens culinaris* (datos tomados de H. Guerra, Tesis Doctoral, Univ. de Salamanca, 1978).

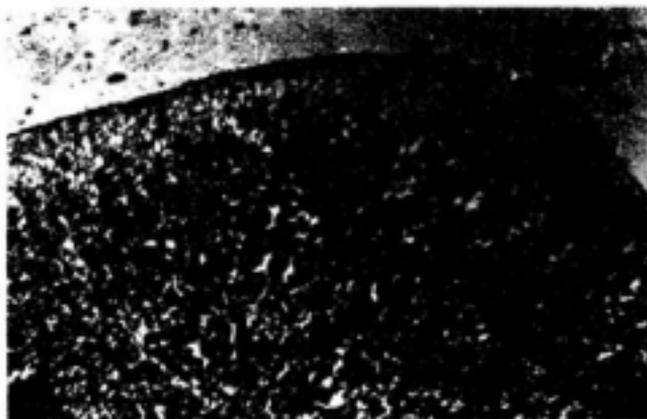


Figura 33.13.—Corte de cotiledón de lenteja en el que puede observarse cómo la digestión de los cuerpos proteicos comienza en la periferia.

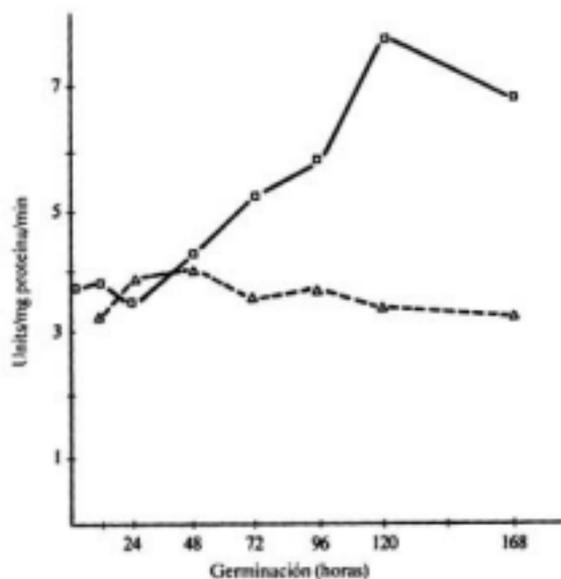
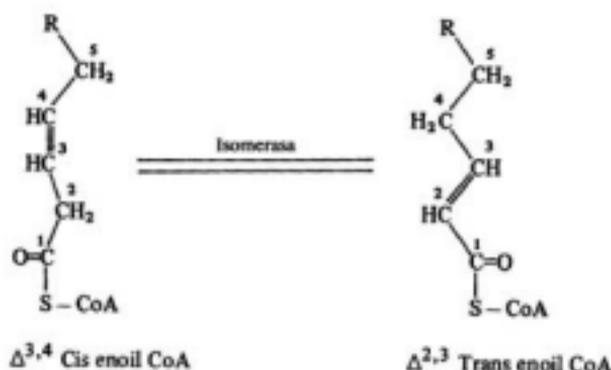
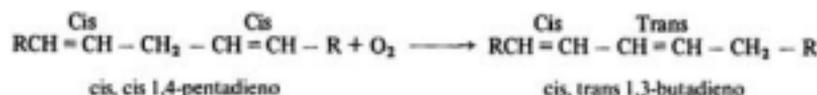


Figura 33.14.—Actividad proteolítica (□-□) durante la germinación de semillas de *Lenz culinaris* en condiciones normales y en presencia de cicloheximida (Δ-Δ) (datos tomados de H. Guerra, Tesis Doctoral, Univ. de Salamanca, 1978).

dación implica la eliminación secuencial de un átomo de carbono como dióxido de carbono; es muy poco probable que la oxidación de los ácidos grasos se produzca por este mecanismo. Otra tercera ruta consiste en lo siguiente: los dobles enlaces de los ácidos



grasos insaturados aparecen naturalmente en configuración *cis*, pero para que puedan ser oxidados por  $\beta$ -oxidación se necesita que adquieran la configuración *trans*; una isomerasa *cis-trans* realiza esta transformación. Algunos ácidos poliinsaturados como linoico y linolénico contienen un sistema *cis, cis*-1,4-pentadieno y que debe ser transformado en un sistema hidroperóxido *cis, trans*-butadieno para poder ser oxidado por  $\beta$ -oxidación. El enzima que cataliza esta reacción recibe la denominación de lipoxigenasa y cuya acción es la siguiente:



Dada la amplia distribución de este enzima en semillas, parece muy probable que todos los ácidos grasos, bien directamente o bien por una previa transformación por la lipoxigenasa, son degradados hasta acetil-CoA por  $\beta$ -oxidación. Este acetil-CoA puede ser oxidado completamente por el ciclo de Krebs en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , o utilizado a través del ciclo del glioxilato para producir carbohidratos, proceso este último muy importante en la germinación de semillas oleaginosas. La conversión de grasas en azúcar que fue señalada por primera vez en semillas de ricino por Yamada en 1955, es hoy un proceso demostrado en gran cantidad de semillas oleaginosas (Fig. 33.15).

La degradación de las reservas lipídicas implica tres orgánulos distintos, además del citoplasma de las células que almacenan lípidos. Estos orgánulos son los cuerpos lipídicos, donde tiene lugar la lipólisis, los glioxisomas, donde tiene lugar la oxidación de los ácidos grasos y la síntesis de succinato a través de ciclo del glioxilato, y las mitocondrias, donde este succinato es transformado en oxalacetato; por último, en el citoplasma tiene lugar la conversión del oxalacetato en sacarosa a través de una ruta gluconeogénica (Fig. 33.16).

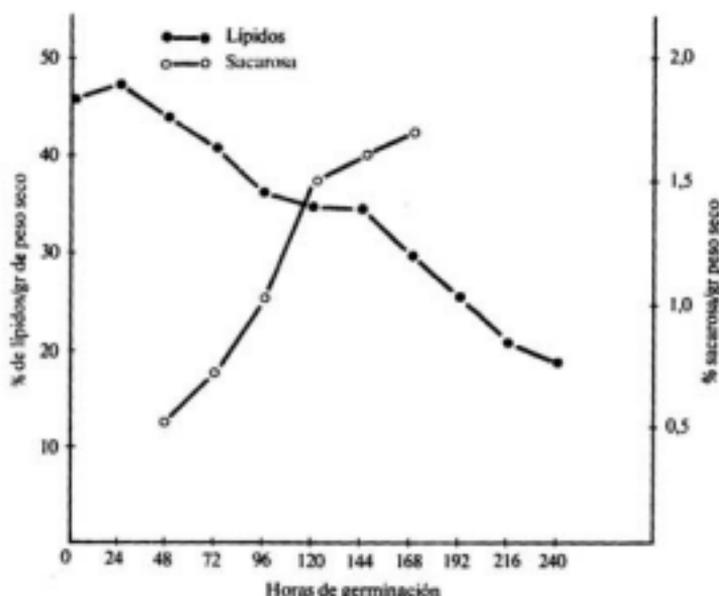


Figura 33.15.—Variaciones en el contenido de lípidos y sacarosa durante la germinación de semillas de *Brassica napus*, L.

La actividad de las lipasas suele variar con el progreso de la germinación. La actividad máxima se alcanza a los dos días de germinación en algodón, a los cuatro en ricino, a los seis en *Brassica napus* y a los trece en cacahuete. Es frecuente encontrar en las semillas oleaginosas más de una lipasa, que se suelen diferenciar en función del pH óptimo de actividad; así, en ricino, hay una lipasa ácida con un pH óptimo de 5,0 y una lipasa alcalina con un pH óptimo de 9,0.

Los glioxisomas son unos orgánulos celulares agrupados junto con los peroxisomas en la categoría denominada microcuerpos. Fueron descritos por primera vez por Breidenbach y Beevers en 1967, determinando precisamente la localización de los enzimas fundamentales del ciclo del glioxilato, isocitrato liasa y malato sintetasa en el interior de unos orgánulos de las células del endospermo de semillas de ricino, para los que propusieron el nombre de glioxisomas. Presentan una densidad ligeramente superior a la de las mitocondrias, de las que pueden separarse por centrifugación diferencial. Está lo suficientemente comprobada, en numerosas semillas, la presencia de los glioxisomas que contienen, además de los enzimas del ciclo del glioxilato los de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, como para poder considerar como un hecho universal su presencia en todos aquellos tejidos vegetales en los que tiene lugar una gluconeogénesis a partir de lípidos.

d) *Fosfato*.—En una fase primitiva de los estudios de las actividades fisiológicas que

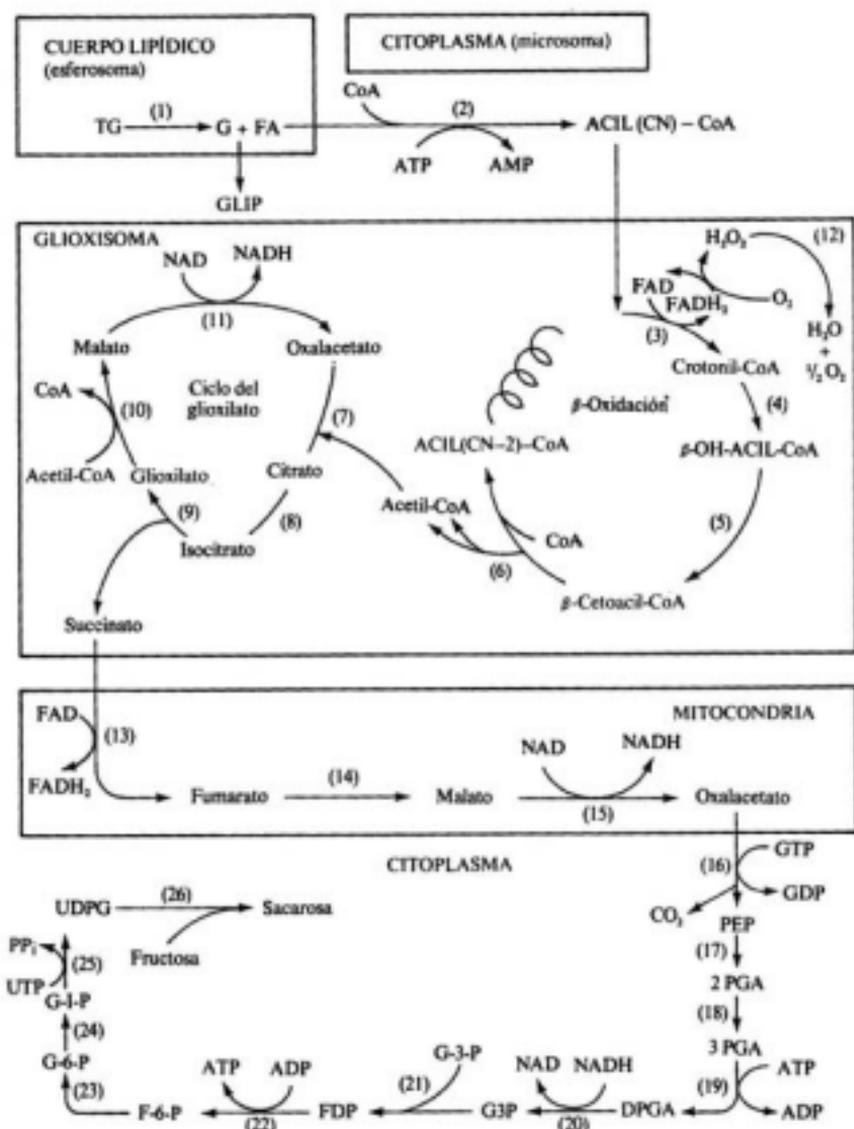


Figura 33.16.—Degradación de lípidos y su conversión en sacarosa durante la germinación de semillas oleaginosas (tomado de T. M. Ching, en *Seed Biology*, Kozłowski, T. T. (ed.), vol II, Academic Press, Nueva York, 1973).

Compartimentación de la utilización de los lípidos (Fig. 33.16).

1, Lipasa; 2, Tioquinasa de ácidos grasos; 3, Acil-CoA deshidrogenasa; 4, Crotonasa; 5,  $\beta$ -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; 6,  $\beta$ -Cetoacil tiolasa; 7, Citrato sintetasa; 8, Aconitasa; 9, Isocitrato liasa; 10, Malato sintetasa; 11, Malato deshidrogenasa; 12, Catalasa; 13, Succinato deshidrogenasa; 14, Fumarasa; 15, Malato deshidrogenasa; 16, Fosfoenolpiruvato carboxikinasa; 17, Enolasa; 18, Fosfogliceromutasa; 19, Fosfoglicerato kinaasa; 20, Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa; 21, Aldolasa; 22, Fosfofructokinasa; 23, Fosfohexosomerasa; 24, Fosfoglucomutasa; 25, UDPG-pirofosforilasa; 26, Sacarosa sintetasa; TG, Triglicérido; G, Glicerol; FA, Ácido graso.

tienen lugar durante la germinación de semillas, llegó a pensarse que el ácido fítico o su sal, la fitina, servía como fuente de energía durante los primeros momentos de la germinación a través de reacciones de transfosforilación entre este compuesto y el ADP. Sin embargo, hay tres fuertes argumentos que invalidan esta sugestiva pero improbable hipótesis:

1. La formación de ATP es un acontecimiento muy temprano en la germinación, mientras que la hidrólisis de la fitina ocurre mucho más tarde.
2. La cantidad total de  $\sim P$  que podría ser producida a partir de ácido fítico en un periodo de 6-10 días de germinación es equivalente a la cantidad producida por el metabolismo respiratorio en 10 minutos.
3. El ácido fítico no posee un enlace fosfato lo suficientemente energético como para actuar de donador de un grupo fosforilo para la formación de ATP. Por tanto, el papel de la fitina parece ser exclusivamente el de reserva de fosfato que se libera por la acción del enzima fitasa, además de los cationes, potasio, calcio y magnesio que forman parte de las sales de ácido fítico y del mio-inositol, que puede actuar como precursor de las pectinas y otros polisacáridos de la pared celular. La fitasa puede encontrarse asociada con los cuerpos proteicos y así ha sido aislada a partir de gránulos de aleurona de cebada y de cotiledones de *Vigna sesquipedalis*.

e) *Ácidos nucleicos.*—Parece no haber duda en aceptar que la replicación del DNA es un fenómeno relativamente tardío en la germinación, iniciándose después de que haya tenido lugar una síntesis de proteína considerable, lo que demuestra la presencia en semillas de un DNA preformado durante la última fase de la maduración de la semilla. Por lo que respecta al RNA, tanto en las capas de aleurona de cereales como en los cotiledones de las leguminosas, se han detectado varias ribonucleasas cuya función es la de degradar el RNA en nucleótidos que son transportados al embrión para la síntesis de sus RNAs propios. Sin embargo, tanto en cebada como en *Pisum sativum* se ha demostrado que los nucleótidos que llegan al embrión no son suficientes para mantener su crecimiento, por lo que en los embriones debe haber también una síntesis de nucleótidos, utilizando probablemente el nitrógeno de las reservas proteicas. No está esclarecido el orden, si existe, de la síntesis de los distintos RNA y sus precursores, tanto en semillas enteras como embriones. Por lo que respecta al RNA mensajero, pueden distinguirse tres clases en semillas:

- a) mRNA de nueva síntesis, que es el resultante del restablecimiento de la transcripción al comenzar la germinación, así como de la reactivación de la RNA polimerasa II y de los enzimas implicados en el procesamiento del mRNA. Su existencia puede demostrarse con inhibidores específicos, tales como  $\alpha$ -amanitina o cordicepina.
- b) mRNA residual, transcrito durante la embriogénesis y utilizado tanto para la síntesis proteica de ésta como en la imbibición de semillas. Puede dirigir la síntesis proteica inicial y no es inhibido por los anteriores compuestos. Tanto en cereales como en leguminosas no se halla unido a ribosomas, lo que quiere decir que para su funcionalidad debe formar polisomas.

- c) mRNA almacenado, transcrito también durante la embriogénesis pero reservado para uso exclusivo de la germinación, es decir, que codifica proteínas de función germinativa únicamente; esto conlleva que debe estar inactivo durante la embriogénesis y funcionar sólo en la germinación.

La existencia de un mRNA preexistente en las semillas es de gran importancia en el control de la germinación, tal y como veremos en el siguiente apartado.

### 33.8. Regulación de la germinación

Son varias las razones por las que se requiere que exista un control metabólico durante la germinación. Algunas de las más importantes son:

1. Para que la actividad metabólica no se active antes de que existan condiciones adecuadas para que la germinación tenga éxito.
2. Para asegurar la secuencia ordenada de los acontecimientos metabólicos durante la germinación.
3. Para que los materiales de reserva sean utilizados con una eficiencia óptima.
4. Para que la actividad metabólica durante la germinación conduzca al establecimiento eficaz de la nueva planta.

En cuanto a los mecanismos que intervienen en la regulación de la germinación, pueden agruparse en varios apartados muy definidos:

- a) Regulación ejercida por las cubiertas seminales y otras barreras de permeabilidad.
- b) Regulación ejercida por los requerimientos energéticos.
- c) Regulación ejercida por los acontecimientos metabólicos durante las primeras fases de la germinación.
- d) Regulación ejercida por la síntesis y activación de enzimas.
- e) Regulación ejercida por las hormonas y sustancias de crecimiento.

#### 33.8.1. Regulación ejercida por las cubiertas seminales y otras barreras de permeabilidad

Como hemos visto en el capítulo anterior, las cubiertas seminales ejercen una profunda influencia en la capacidad de las semillas para germinar. Estas cubiertas pueden regular la germinación interfiriendo alguno de los procesos siguientes: toma de agua requerida para la imbibición, intercambio gaseoso, difusión de inhibidores endógenos, etc. Además, las cubiertas pueden ofrecer resistencia mecánica al crecimiento del embrión.

Un mecanismo interesante para explicar cómo las cubiertas seminales se hacen impermeables al agua, es el propuesto por Marbach y Mayer en 1975 con respecto a tres especies del género *Pisum*. Las cubiertas de *Pisum sativum* son permeables al agua, mientras que las cubiertas de dos especies afines, *Pisum fulvum* y *Pisum elatius*

son impermeables. Las cubiertas de las especies impermeables contienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos y una mayor actividad catecol oxidasa (tabla 33.3), por lo cual se sugiere, que la impermeabilidad al agua es el resultado de una acción de oscurecimiento de la cubierta seminal, debido a la formación de quinonas por la acción de las catecol oxidasas sobre los fenoles; estas quinonas reaccionan con las proteínas de

TABLA 33.3

Actividad catecol oxidasa y compuestos fenólicos en las cubiertas seminales de tres especies del género *Pisum*

Especies	Fracción particulada (20.000ng)				Compuestos fenólicos mg/g
	pH 5,3		pH 7,3		
	Total	Espec.	Total	Espec.	
<i>Pisum elatius</i> . . . .	6,8	1,0	12,8	2,0	25,8
<i>Pisum fulvum</i> . . . .	3,1	0,7	9,1	2,0	5,9
<i>Pisum sativum</i> . . . .	0,5	0,2	1,5	0,6	0,4

Tomado de Marbach y Mayer, «Plant Physiol.», vol. 54, 1974, págs. 817-820.

la cubierta seminal lo que provoca una especie de «curtido» de estas proteínas que las hace impermeables. Es probable que estas proteínas curtidas induzcan la deposición de cutina en las paredes celulares de las células de la cubierta. El control de la actividad catecol oxidasa puede encontrarse en un rápido aumento en su actividad, provocado por la activación del enzima preexistente, inducido por una brusca deshidratación durante la maduración de la semilla.

Además de las cubiertas seminales, también las membranas celulares pueden ser importantes como agentes reguladores de la germinación. De hecho, existen datos experimentales que parecen indicar la existencia de cambios en tales membranas durante las primeras fases de germinación. Es lógico suponer, por tanto, que cualquier cambio metabólico que induzca cambios en la permeabilidad de las membranas en una semilla puede actuar como agente de control en la germinación.

### 33.8.2. Regulación ejercida por los requerimientos energéticos

La germinación de semillas es un proceso fisiológico en el que tiene lugar crecimiento y división celular, fenómenos ambos que requieren un aporte considerable de energía. La pregunta aún sin contestar es cuál es la fuente inicial de energía y cómo y cuándo son activados y controlados los procesos generadores de energía.

Descartada, tal y como mencionamos en el apartado anterior, la posibilidad de la fitina como la fuente inicial de energía, cabe preguntarse entonces cuál es la causa del brusco incremento en ATP que se observa durante la fase de imbibición (Fig. 33.17). Generalmente, el aumento en ATP va acompañado de un descenso en las concentra-

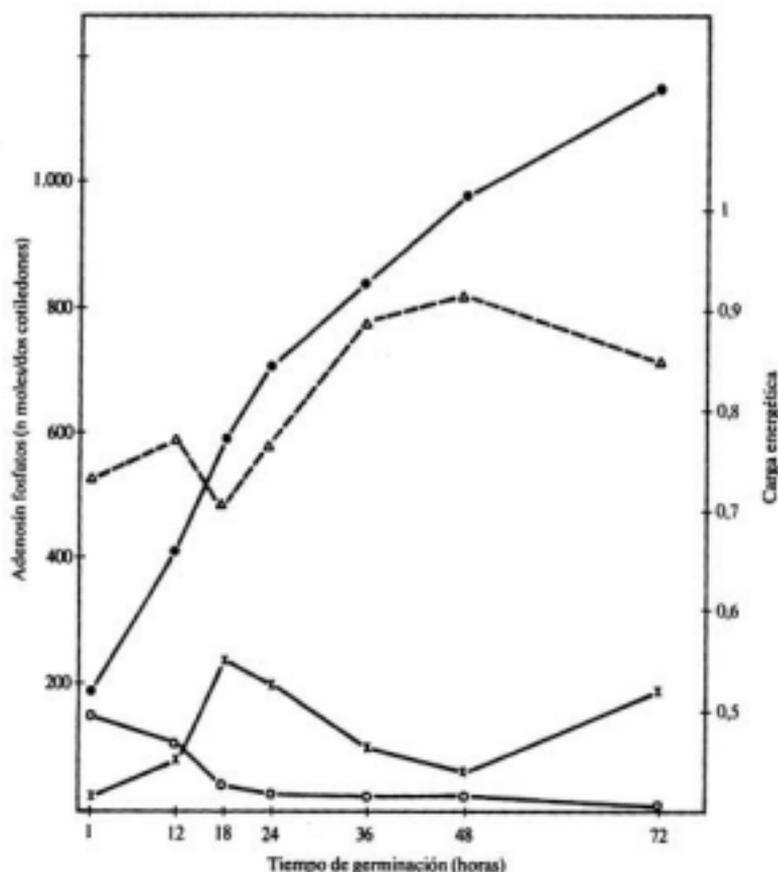


Figura 33.17.—Variación en el contenido de ATP (●), ADP (○) y AMP (x) y de la carga energética (Δ) durante la germinación de semillas de *Cicer arietinum* (datos tomados de Aldosoro y Nicolás, «Int. J. Biochem.», núm. 10, 1979, págs. 947-950).

ciones de AMP y de ADP, lo que implica unas variaciones muy importantes desde el punto de vista de la regulación metabólica de la carga energética:

$$\text{Carga energética} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2 [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

tal y como ha sido puesto de manifiesto en semillas de garbanzo (Fig. 33.17). Cuando las concentraciones de ATP, ADP y AMP dentro de una célula son tales que los valores de la carga energética están por encima de 0,5, los sistemas que utilizan ATP aumentan su

actividad, y por encima de 0,8 las células metabolizan y se dividen muy activamente; valores por debajo de 0,5 son indicativos de células en reposo metabólico.

Otra posibilidad aparte de la ya descartada de la fitina, y que explicaría el aumento brusco en la concentración de ATP, podría ser la reacción catalizada por el enzima adenilato kinasa, aunque parece poco probable, ya que de ser así el aumento de ATP debería corresponderse con un descenso considerable en la concentración de ADP, lo cual no ocurre (Fig. 33.17). La glucólisis tampoco parece ser responsable del aumento en ATP durante los comienzos de la germinación, ya que como se ha encontrado en varias semillas, la máxima actividad glucolítica coincide con los niveles más bajos de carga energética, y que según ésta aumenta, disminuye bruscamente la actividad de esta ruta metabólica (Figs. 33.17 y 33.18). Todo parece indicar que la glucólisis comienza a funcionar en semillas tan pronto como comienza la fase de imbibición, pero que por ella misma no ejerce ningún papel regulador de la germinación. ¿Cuál puede ser entonces

Gliceraldehído-3-P-dehidrogenasa o - o - - o

Fosfogliceromutasa, Enolasa y Piruvato-quinasa x - x - - - x

(Escala: 0 - 200 x 10<sup>-9</sup>)

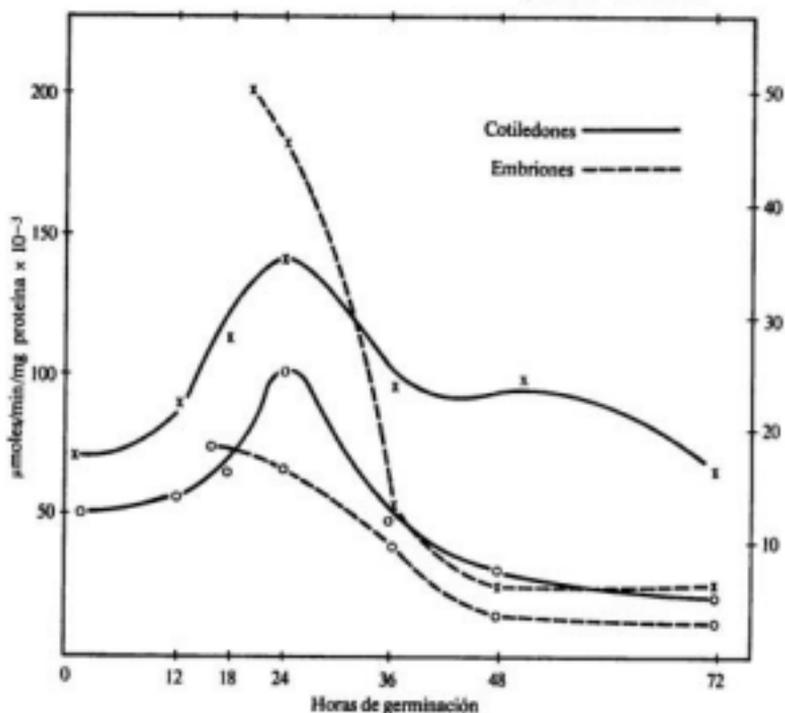


Figura 33.18.—Descenso en la actividad glucolítica a partir de las 24 horas de germinación en semillas de *Cicer arietinum* (datos tomados de Fuente Burguillo y Nicolás, «Plant. Sci. Lett.», vol. 3, 1974, págs. 143-148).

la fuente inicial de ATP durante la germinación? Recientemente se ha encontrado en extractos acelulares de algunas semillas (cebolla, guisante, lechuga, berenjena, trébol) un sistema sintetizador de ATP presente ya en semillas secas que requiere AMP, PEP y fosfato. El sistema funcionaría de la forma siguiente:



El PEP puede proceder del malato mediante la actividad de los enzimas malato deshidrogenasa y PEP-carboxilasa. Otra ruta que puede desempeñar un papel regulador de otros procesos fisiológicos durante las primeras fases de la germinación es la ruta de

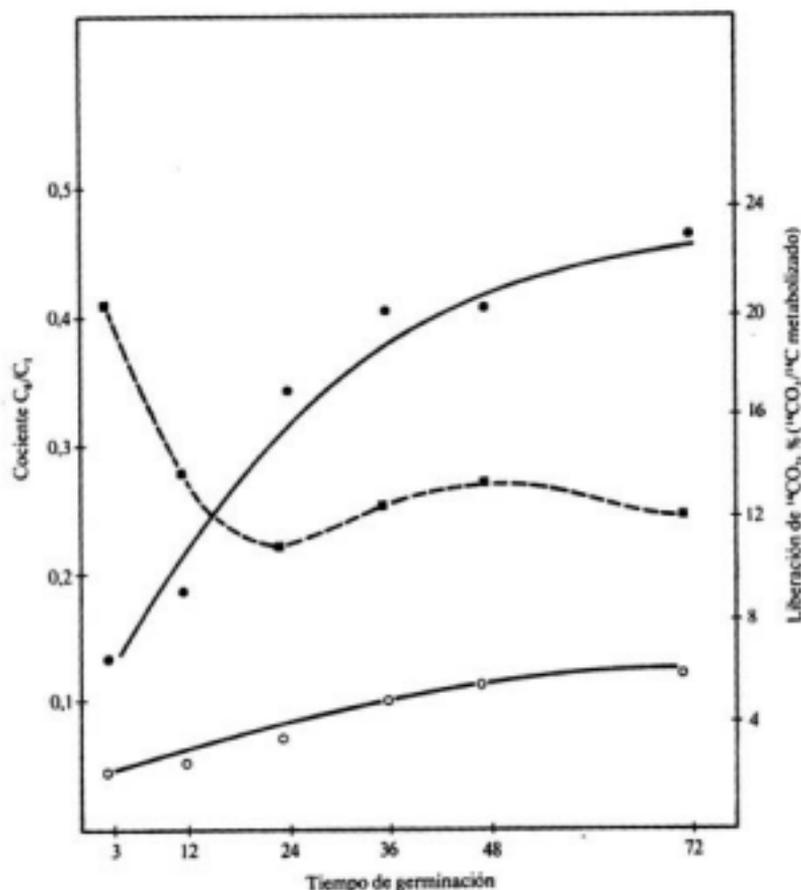


Figura 33.19.—Liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir del carbono 1 ( $\bullet$ ) o carbono 6 ( $\circ$ ) de la glucosa- $^{14}\text{C}$  y cociente  $C_3/C_1$  ( $\bullet$ ) durante la germinación de semillas de *Cicer arvense* (datos tomados de Aldasoro y Nicolás, «J. Exp. Bot.», vol. 30, 1979, págs. 1163-1170).

las pentosas fosfato. La contribución del ciclo de las pentosas fosfato al catabolismo de la glucosa durante la germinación, puede determinarse midiendo el cociente  $C_4/C_1$ , ya que cualquier disminución del mismo puede interpretarse como una mayor participación de la ruta de las pentosas (Cap. 20) en relación con la vía normal EMP-TCA. Mediante esta técnica se ha demostrado que la ruta de las pentosas juega un papel importante en el catabolismo de la glucosa durante las primeras fases de la germinación en semillas de *Phaseolus mungo* y *Cicer arietinum* (Fig. 33.19). El papel fundamental de esta ruta podría ser el de suministrar los precursores necesarios para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, así como el NADPH necesario para algunas reacciones biosintéticas.

Otro aspecto interesante a considerar dentro de este apartado, es el del comportamiento de la actividad mitocondrial durante la germinación. Gran cantidad de evidencia experimental parece indicar que las mitocondrias aisladas de semillas en reposo no son funcionales, probablemente por una deficiencia en citocromo c y a la falta, por tanto, de acoplamiento entre fosforilación y respiración. También se tienen datos que parecen indicar que las membranas mitocondriales, todas ellas muy frágiles, incorporan proteínas durante la fase de imbibición, lo que les permite una mayor estabilidad y, por consiguiente, una mayor funcionalidad de las mitocondrias. Todos estos resultados sugieren el siguiente mecanismo de control: en semillas secas, existen mitocondrias parcialmente preformadas que son inactivas, por lo cual no existe fosforilación oxidativa. En estas mitocondrias faltan algunos componentes de las membranas, probablemente proteínas y lípidos. Estos son incorporados durante la imbibición, y probablemente esta incorporación está también regulada por algún mecanismo desconocido (¿hormonal?). De esta forma se asegura el que las mitocondrias no alcancen su completa funcionalidad hasta que las condiciones para germinar sean adecuadas y permitan que ésta se desarrolle con éxito. El aumento respiratorio durante la germinación, subsecuente con la formación de mitocondrias funcionales, es un fenómeno repetidamente demostrado en semillas. Sin embargo, el mecanismo de su control no ha sido, por ahora, identificado satisfactoriamente. Posiblemente durante las primeras horas de germinación, la disponibilidad de un sustrato respiratorio sea importante a este respecto. En esos momentos los materiales de reserva permanecen intactos, y la respiración, por tanto, deberá ser mantenida por la utilización rápida de pequeñas cantidades de mono, di y trisacáridos. De cualquier forma lo que parece evidente es que un sistema respiratorio eficiente es una condición indispensable para que la germinación pueda realizarse.

### 33.8.3. Regulación ejercida por los acontecimientos metabólicos durante las primeras fases de la germinación

Durante las primeras fases de la germinación comienzan a funcionar muchos sistemas enzimáticos, responsables muchos de ellos de la degradación de los materiales de reserva. Los productos resultantes de esta degradación pueden ser utilizados como sustratos respiratorios, o bien, transportados al embrión. En general, todas las actividades enzimáticas implicadas en la degradación del almidón sufren un incremento considerable durante la germinación. Un aspecto interesante y ampliamente estudiado es el del control de estos enzimas durante la germinación. Si se realiza una separación de enzi-

TABLA 33.4  
Enzimas que degradan el almidón en diferentes especies

Especie	$\alpha$ -amilasa	$\beta$ -amilasa	Fosforilasa
Guisante .....	3	2	2
Trigo .....	8	2-7	—
Cebada .....	7	8	—
Arroz .....	13	—	—
Lenteja .....	3	1	1
Garbanzo .....	2	—	1

A. Tratamientos

B. Días de germinación



A. Tratamientos

B. Días de germinación

II

Figura 33.20.—Zimogramas de los enzimas que degradan el almidón en cotiledones de *Lens culinaris* (I) y de *Cicer arietinum* (II). A: distintos tratamientos; I: tampón acetato; II: tampón fosfato; III: tampón fosfato + EDTA; IV: tampón fosfato + HgCl<sub>2</sub>; V: tampón fosfato + CaCl<sub>2</sub>, y calentado a 70°C durante 5 minutos. B. Evolución de la actividad, enzimática durante la germinación (datos tomados de Fernández Tárrego y Nicolás, «Plant Physiol.», núm. 58, 1976, págs. 618-621, y Fernández Tárrego y cols., «Rev. Española Fisiol.», 1978, vol. 34, págs. 87-92).

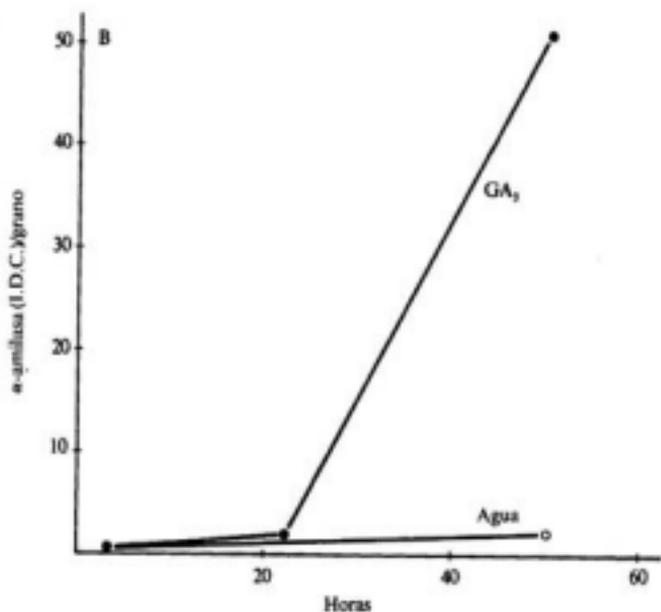
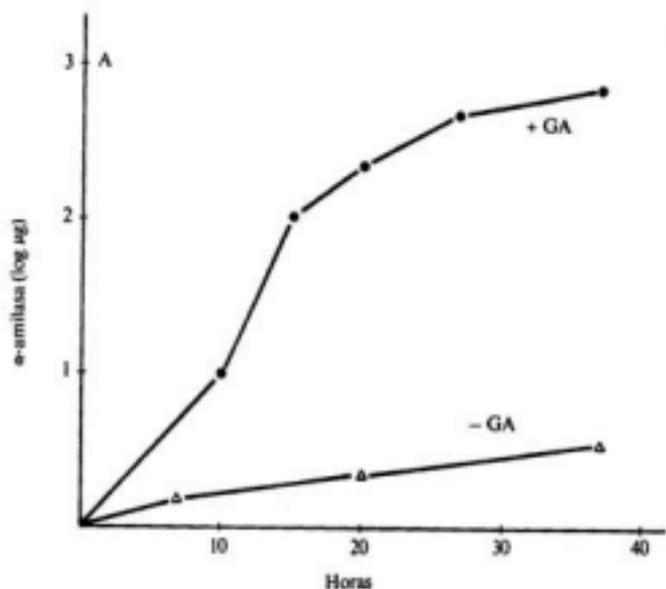


Figura 33.21.—Efecto de la giberelina en la producción de  $\alpha$ -amilasa por endospermo de cebada (A) (tomado de M. B. Wilkins, *Physiology of Plant Growth And Development*, McGraw-Hill, Londres, 1969). Y en granos de trigo sin embrión (B) (tomado de Khan y cols. «*Plant Physiol.*», vol. 51, 1973, págs. 641-645 y de M. B. Wilkins, *Physiology of plant growth and development*. McGraw-Hill. Londres, 1969).

mas mediante electroforesis, es frecuente que cada actividad aparezca representada por un número variable de isoenzimas (tabla 33,4) y el zimograma varía tanto cualitativa como cuantitativamente (Fig. 33.20). Todas estas variaciones obedecen a un sistema de control por parte de la semilla, que es diferente para los distintos tipos de actividad enzimática. Desde que se describió la inducción hormonal de la síntesis de  $\alpha$ -amilasa en capas de aleurona de cebada, ha habido una tendencia a asumir que la degradación de los carbohidratos era inducida en todas las semillas por el ácido giberélico (Fig. 33.21). En cereales, las  $\alpha$ -amilasas se sintetizan en el escutelo y son transportadas al endospermo, lugar donde se realiza la hidrólisis del almidón. Esta síntesis está influenciada por el embrión y esta influencia puede ser reemplazada, al menos parcialmente, añadiendo giberelinas al medio de incubación. Por otra parte, parecen existir otras interacciones hormonales, siempre en el embrión, que controlan la síntesis de  $\alpha$ -amilasa; así, las auxinas colaboran en la estimulación mientras que las citoquininas pueden producir una cierta inhibición, como se ha demostrado en granos de cebada (Fig. 33.22). En leguminosas el mecanismo de control ha sido menos estudiado, aunque se sabe que es diferen-

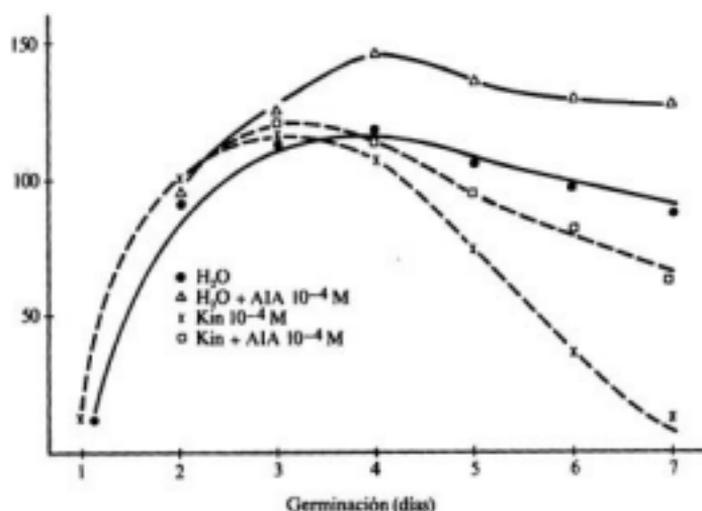


Figura 33.22.—Actividad  $\alpha$ -amilásica en granos de cebada germinados en agua (—) o Kinetina (- - -) tratados con AIA (datos tomados de Verbeek y cols., «Physiol. Plant», vol. 29, 1973, págs. 208-211).

te al de cereales. En algunas de estas semillas es también el embrión el que ejerce el control; ya que si se elimina no hay síntesis de  $\alpha$ -amilasa (Fig. 33.23). En semillas de haba parece ser que son las citoquininas las que estimulan la síntesis de  $\alpha$ -amilasa, mientras que en garbanzo, ni giberelinas ni citoquininas son capaces de reemplazar al embrión (tabla 33.5). En semillas de judía se ha demostrado la presencia de un inhibidor de amilasa, termolábil y que parece ser producido por el eje embrionario, ya que sólo se detecta en los cotiledones cuando la semilla está entera, pero no se detecta en los

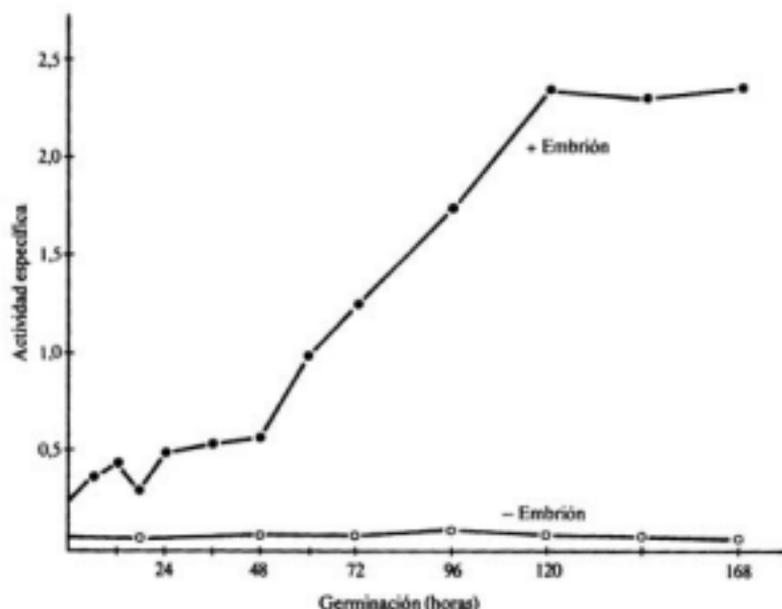


Figura 33.23.—Efecto del embrión en la actividad amilásica durante la germinación de semillas de *Cicer arietinum* (datos tomados de Fernández Tárrego y cols., «Rev. Española Fisiol.», vol. 31, 1978, págs. 87-92).

TABLA 33.5

Efecto del ácido giberélico y la kinetina en la actividad amilásica en cotiledones aislados de *Cicer arietinum* (datos tomados de Fernández Tárrego y cols., «Rev. Española Fisiol.», vol. 34, 1978, págs. 87-92).

Horas de incubación	Actividad amilásica			
	Semilla entera	Cotiledones aislados	Cotiledones aislados + GA <sub>3</sub>	Cotiledones aislados + kinetina
0	0,22*	0,07	—	—
72	1,27	0,08	0,07	0,06
240	2,15	0,10	0,09	0,09

\* Actividad específica

cotiledones separados del eje embrionario. En cualquier caso, la degradación de carbohidratos es un proceso que ocurre relativamente tarde durante la germinación, por lo que no es probable que tengan una función reguladora importante del proceso. Pa-

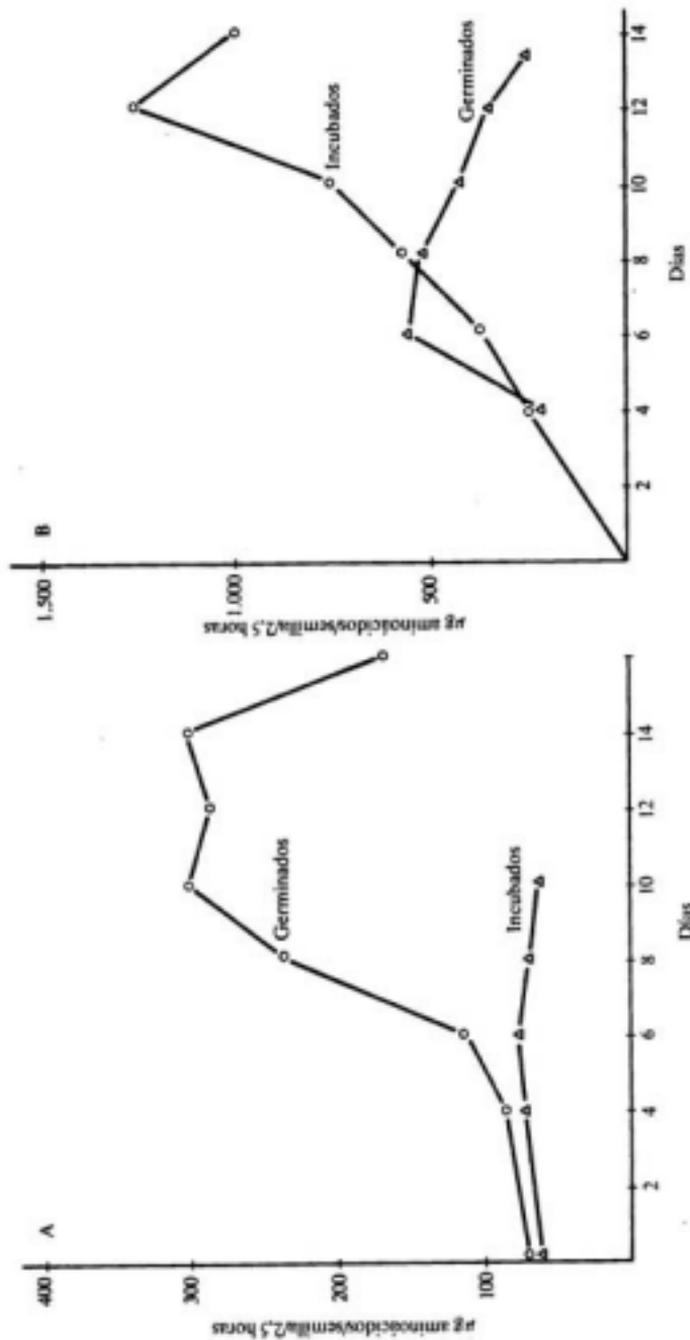


Figura 33.24.—Actividad proteolítica en semillas germinadas y colecciones incubadas de guisantes (A) (datos tomados de Yomo y Varner, «Plant Physiol.», núm. 51, 1973, págs. 708-713). Y de *Phaeolaris vulgaris* (B) (Yomo y Srinivasan, «Plant Physiol.», núm. 52, 1973, págs. 671-673).

rece mucho más significativa a este respecto la degradación inicial de oligosacáridos que produce una liberación rápida de monosacáridos que sirven de sustratos respiratorios, acontecimiento vital en el inicio de la germinación.

Un problema muy interesante y sugestivo es el del control de la actividad proteolítica y la consiguiente movilización de las proteínas de reserva durante la germinación. Un hecho universalmente observado durante la germinación es el aumento paralelo de las actividades proteolíticas junto con el de otros enzimas que intervienen en procesos anabólicos ¿cómo es posible que los enzimas proteolíticos no destruyan a los otros? Este proceso requiere, sin duda, un sofisticado mecanismo de control. Algunos de los mecanismos de control más frecuentemente estudiados incluyen: control hormonal de la síntesis *de novo*; inhibidores endógenos; zimógenos, compartimentación; pH; especificidad de sustrato; inhibición por producto final. Quizá de todos ellos el mecanismo más ampliamente estudiado sea el de la regulación hormonal de la síntesis *de novo*, aunque los resultados obtenidos son muy contradictorios, pues mientras en algunas semillas, como garbanzo y guisante, la eliminación del embrión provoca una disminución considerable en la actividad proteásica, en otras como en judía se produce un aumento en las semillas sin embrión (Fig. 33.24).

Se ha realizado un considerable trabajo en el estudio de los inhibidores endógenos de proteasas, encontrados fundamentalmente en semillas. La mayoría de estos inhibidores son de naturaleza proteica e inhiben proteasas de origen animal y microbiano, y son específicas frente a actividades tipo tripsina y quimotripsina. Aunque la hipótesis de considerar que tales inhibidores pueden tener un papel importante en el control de las proteasas de origen vegetal es muy atractiva, la mayoría de los resultados obtenidos hasta ahora han sido negativos, por lo que parece que su papel es exclusivamente en la protección vegetal contra microorganismos e insectos.

La especificidad de sustrato y la compartimentación ofrecen otros mecanismos de control de la actividad proteásica. De hecho podrían ser la razón fundamental por la que no se produce la destrucción de otros enzimas por parte de los proteolíticos. La compartimentación podría darse entre los cuerpos proteicos y el citoplasma.

No se tienen datos muy exactos sobre los posibles mecanismos de regulación de la actividad lipásica, aunque en algunas semillas, como trigo, parece que se encuentra bajo regulación hormonal.

#### 33.8.4. Regulación ejercida por la síntesis y activación de enzimas

Uno de los hechos más característicos de la germinación de semillas, es el aumento de actividad de casi todos los sistemas enzimáticos junto con la aparición de otros nuevos. Estos enzimas pueden clasificarse en varios grupos:

1. Los que se activan instantáneamente tan pronto comienza la imbibición y que fueron formados durante la maduración de la semilla.
2. Los que se activan al cabo de varias horas y que requieren algún factor más además de la imbibición.
3. Los que se activan más tarde y cuya aparición requiere síntesis de proteínas pero no de mRNA.

4. Por último, aquellos que requieren síntesis de proteínas de mRNA y activación génica.

En los últimos años, gran parte de los trabajos aparecidos sobre el control de la germinación han estado dedicados a la elucidación de los mecanismos de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos durante las primeras horas de la germinación, siendo la demostración de la existencia de un mRNA preexistente de vida larga en las semillas, uno de los aspectos más discutidos en relación con este tema. La evidencia experimental sobre la existencia en semillas de un mRNA preexistente se basa en las siguientes observaciones realizadas durante los últimos diez años tanto en mono como en dicotiledóneas:

- a) Reanudación de la síntesis de proteínas *in vivo* antes de que se detecte síntesis de RNA.
- b) Síntesis de proteínas inhibiendo la síntesis de RNA.
- c) Formación de polisomas durante la germinación en ausencia de síntesis de RNA o cuando se inhibe su síntesis.
- d) Aislamiento de RNA activo a partir de semillas secas.
- e) Aislamiento de RNA (poli A) a partir de semillas secas.
- f) Demostración de la síntesis *de novo* de algunos enzimas durante la germinación cuando se inhibe la síntesis de RNA.

De todos estos aspectos se podría destacar, por su creciente interés en los últimos años, el referente al aislamiento de RNA (poli A) en semillas. Hoy está perfectamente demostrada la existencia en células eucarióticas, de moléculas de mRNA que llevan covalentemente unidas en su extremo 3' largas secuencias de adenina, lo que permite su fácil aislamiento mediante cromatografía de afinidad en columnas de poli U-sefarosa o de oligo dT-celulosa. Así, ha sido posible demostrar su existencia y funcionamiento como mRNA en embriones de arroz, trigo, rábano, algodón y en cotiledones de semillas secas de garbanzo (Fig. 33.25). Se ha sugerido que el mRNA preexistente de vida larga podría codificar los enzimas implicados en la movilización de sustancias de reserva, amilasas, proteasas, lipasas, etc. Estos enzimas catalizan reacciones irreversibles que no requieren participación de coenzimas y que generalmente no están controladas ni por influencias alostéricas ni de acción de masas. Por otra parte, los enzimas del metabolismo intermediario, cuyo nivel celular requiere un control mucho más sensible, pueden estar codificados por el mRNA sintetizado *de novo* durante la germinación y cuya síntesis puede estar, a su vez, regulada por las condiciones celulares. La activación enzimática durante la germinación, proceso que podemos definir como la aparición de actividad enzimática en ausencia de síntesis de proteínas, puede ser otro de los mecanismos de control de la germinación. Se ha demostrado la activación de algunos enzimas durante la germinación en semillas de lechuga y de guisante. Los criterios utilizados para demostrar que se trataba de una activación fueron la no inhibición de la aparición de la actividad enzimática por inhibidores de la síntesis proteica, y la no incorporación de material radiactivo y formación muy rápida del enzima, todo lo cual sugiere la formación autocatalítica a partir de una forma precursora inactiva.

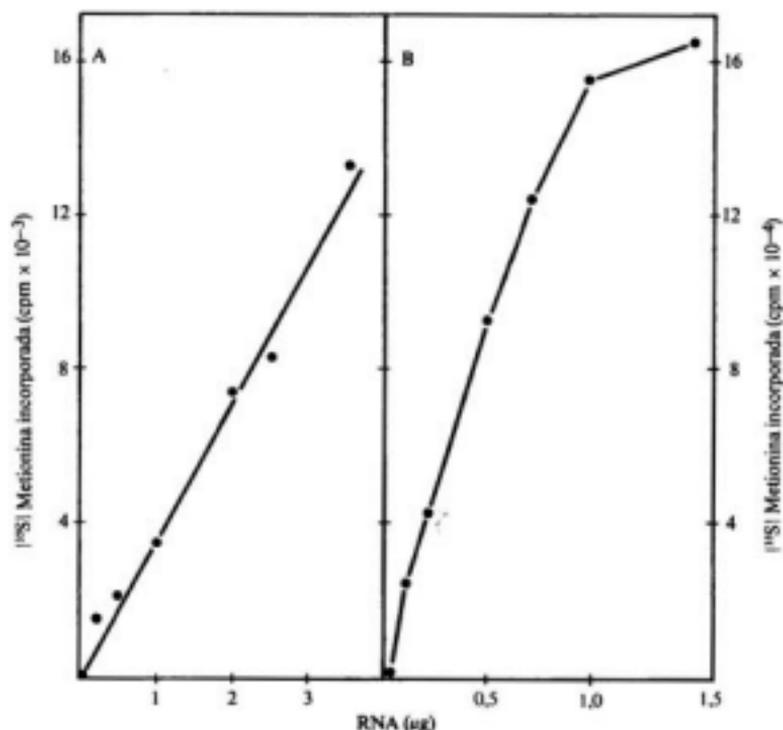


Figura 33.25.—Traducción de un mRNA (poli A) aislado de cotiledones de semillas secas de *Cicer arietinum*, en dos sistemas de síntesis de proteínas. (A) Reticulocitos de conejo. (B) Germe de trigo (datos tomados de Matilla y cols., «Plant Physiol.», vol. 65, 1128-1132, 1980).

### 33.8.5. Regulación ejercida por las hormonas y sustancias de crecimiento

Vamos a considerar, por último, el papel que desempeñan las hormonas y sustancias de crecimiento en la regulación de la germinación. Durante los últimos años, un número considerable de trabajos han venido a demostrar que algún factor producido por el embrión puede regular la aparición de varias actividades enzimáticas en los cotiledones o endospermo. El hecho de que el embrión haya podido ser reemplazado en varios casos por la aplicación exógena de hormonas, ha hecho pensar a muchos fisiólogos que este control ejercido por el embrión es de naturaleza hormonal. Así, se ha encontrado cómo el metabolismo proteico en cotiledones de guisante se encuentra regulado por algún factor producido por el embrión (Fig. 33.26); en cotiledones de calabaza la aplicación exógena de citoquininas puede reemplazar al embrión en el control de la actividad proteolítica (tabla 33.6). Asimismo, en cotiledones de judía, la adición de 6-benziladenina estimula las actividades amilásica y proteásica en ausencia del eje embrionario. Es muy conocido, y ya lo hemos citado anteriormente, el caso de la gi-

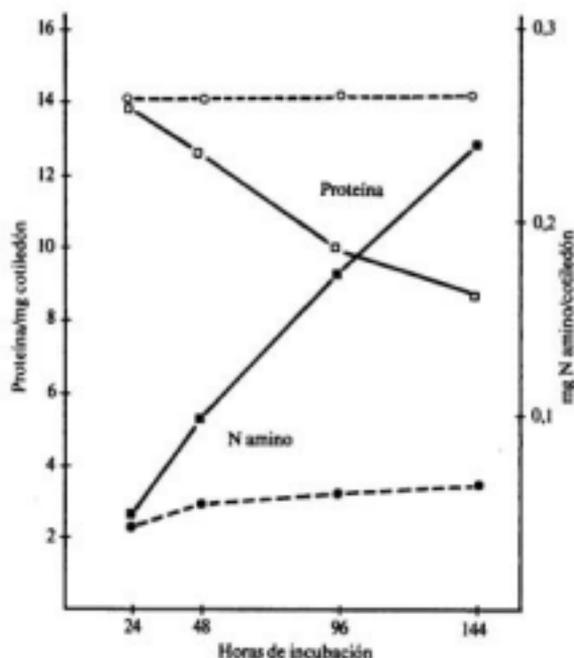


Figura 33.26.—Cambios en el contenido de proteína y N amino en semillas enteras (-) y en cotiledones aislados (---) durante la germinación de guisante (datos tomados de Chin y cols., «Plant Physiol.», núm. 49, 1972, págs. 482-489).

TABLA 33.6

Efecto de varias hormonas e inhibidores de síntesis de proteína en la actividad proteolítica de cotiledones sin embrión y semillas intactas de calabaza después de 48 horas de germinación

Solución de incubación	Actividad proteolítica	
	Sin embrión	Con embrión
Agua .....	100	153
GA <sub>3</sub> 5,8 × 10 <sup>-6</sup> moles/l .....	108	131
GA <sub>3</sub> 10 <sup>-4</sup> moles/l .....	108	108
Benziladenina 10 <sup>-4</sup> moles/l .....	153	168
Puromicina 10 <sup>-3</sup> moles/l .....	59	68
Actinomicina D 10 µg/ml .....	97	93
Actinomicina D 10 µg/ml benziladenina 10 <sup>-4</sup> moles/l .....	99	102

Datos tomados de Penner y Ashton, «Nature», vol. 212, 1966, págs. 936-937.

berelina en la inducción de la síntesis de  $\alpha$ -amilasa en el endospermo de cereales (Fig. 33.21). También en semillas de garbanzo algún factor producido por el embrión regula la actividad amilásica (Fig. 33.23), aunque ni las giberelinas ni las citoquininas pueden sustituir al embrión (tabla 33.5).

En el apartado anterior hemos visto cómo la síntesis de proteínas y de RNA son dos procesos esenciales para que tenga lugar la germinación de semillas. Parece lógico pensar que si las hormonas controlan la germinación, sea a este nivel donde realicen su acción primaria. La mayoría de los trabajos realizados en tal sentido indican que el mecanismo de acción de algunas hormonas, como giberelina o ácido abscísico, está a nivel de transcripción o traducción, actuando la primera como estimuladora. Así, en endospermo de cebada, la giberelina induce un aumento en la síntesis de mRNA (poli A) que cuando se ensaya en un sistema de síntesis de proteína cataliza la síntesis de varios enzimas, entre ellos  $\alpha$ -amilasa, y la segunda como inhibidora, el ácido abscísico inhibe la síntesis de  $\alpha$ -amilasa estimulada por giberelina en capas de aleurona de cebada, probablemente a nivel de traducción ya que el ácido abscísico inhibe la formación de  $\alpha$ -amilasa 12 horas después de la adición de giberelina, cuando los inhibidores de la síntesis de RNA ya no son efectivos.

La germinación es, probablemente, el estado más vulnerable por el que pasa una planta durante su ciclo biológico. Cuanto mayor sea el período que transcurra entre el comienzo de la imbibición y la emergencia de la plántula por encima del suelo para comenzar su vida independiente, mayores serán las posibilidades que tenga esa planta de morir. Por ello, una de las principales condiciones que tiene una planta para asegurar su supervivencia es la de una germinación rápida, regulada con precisión, que asegure el que la semilla sólo germine cuando las condiciones sean adecuadas para que tenga éxito, que permita que los acontecimientos metabólicos, que van a desarrollarse con extraordinaria intensidad y variedad, durante las primeras fases de la germinación no se interfieran unos con otros. Estos mecanismos de control son, como hemos visto, muy diversos, su conocimiento es aún muy fragmentario, pero dada la intensidad con la que se está trabajando en este campo, es muy posible que en una futura revisión y puesta al día de este capítulo, podamos disponer de datos mucho más concretos y aclarativos de este proceso fascinante.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BEWLEY, J. D., y BLACK, M.: *Physiology and Biochemistry of Seeds*, vol. I, Springer-Verlag, Berlín, 1978.
- CHING, T. M.: *Metabolism of Germinating Seeds*, en: *Seed Biology*, Kozłowski T. T. (ed.), vol. II, Academic Press, Nueva York, 1973.
- KHAN, A. A. (ed.): *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, North/Holland, Amsterdam, 1977.
- MAYER, A. M., y POLJAKOFF-MAYBER, A.: *The Germination of Seeds*, 3.<sup>a</sup> ed., Pergamon Press, Oxford, 1982.
- MURRAY, D. R. (ed.): *Seed Physiology*, vols. 1 y 2, Academic Press, 1984.

## FORMACIÓN Y MADURACIÓN DE FRUTOS

La fecundación en Angiospermas determina, ordinariamente, el desarrollo de una semilla a partir del óvulo y de un fruto a partir del ovario. La formación del fruto puede presentarse también sin desarrollo de semilla y sin fecundación tal como ocurre en algunas variedades de *Musa*, *Citrus* y *Vitis*. Este fenómeno se conoce con el nombre de partenocarpia. Generalmente, el fruto se desarrolla normalmente a partir del gineceo, pero en muchos frutos entran también a formar parte de ellos otros órganos. Tales órganos pueden ser los tépalos (*Morus*), el receptáculo (*Fragaria*), las brácteas (*Ananas*), el tubo floral (*Pyrus malus*) o el eje dilatado de la inflorescencia (*Ficus*). En casos en los que el fruto está constituido por otros órganos además del gineceo se dice que el fruto es complejo.

Durante siglos el hombre ha seleccionado y cultivado un determinado número de especies vegetales en función de los frutos que producen. Durante todos estos años, ha cambiado las características de estos frutos por selección continua y por cultivo adecuado. Estas características que el hombre ha favorecido en su selección, han afectado tanto a las características vegetativas de las plantas que los producen, como las del propio fruto. Entre las características del fruto que el hombre ha tratado de cambiar y que hacen que los frutos comerciales que hoy día conocemos, difieran mucho de los tipos salvajes ancestrales de los que proceden, se encuentran las siguientes: tasa de crecimiento, tamaño, color, olor, sabor, dulzor, textura y ausencia de semillas.

Debido a la importancia económica que hoy día tienen los frutos, son muchos los trabajos que se han dedicado al estudio del crecimiento, desarrollo y maduración de frutos, pudiéndose distinguir, al objeto de sistematizar su estudio, varias fases en su ciclo biológico. Tales fases son las siguientes:

1. Formación del primordio del fruto y desarrollo antes de la antesis.
2. Antesis, polinización y fertilización.
3. Crecimiento del fruto.
4. Maduración.
5. Envejecimiento.

### 34.1. Formación del fruto

Las dos primeras fases mencionadas anteriormente, vamos a englobarlas y considerarlas dentro de otra fase más general que denominamos de formación del fruto, para pasar posteriormente a estudiar todo lo referente a su crecimiento.

La formación de los tejidos del ovario se inicia tardíamente durante el proceso de la morfogénesis floral. En ciertas especies dioicas como *Lycchnis dioica*, el desarrollo del ovario depende de la presencia de un determinado tipo de cromosoma sexual; en otras especies, el carácter sexual puede ser modificado por ciertos factores ambientales. En especies monoicas, particularmente en las cucurbitáceas, el desarrollo de los tejidos del ovario está profundamente influenciado por la temperatura y horas de iluminación. En general, días largos y temperaturas elevadas reprimen, mientras que días cortos y temperaturas bajas favorecen el desarrollo de flores con ovarios, como se ha demostrado en *Cucurbita pepo* y *Cucumis sativus*. Las influencias hormonales en este sistema son muy considerables; se ha demostrado que el  $\text{CO}_2$  y el etileno estimulan el desarrollo de flores femeninas en cucurbitáceas, así como las auxinas, en concentraciones relativamente elevadas estimulan la formación de flores femeninas en las cucurbitáceas. Sin embargo, este efecto de las auxinas parece ser indirecto, ya que las concentraciones inductoras son las mismas que inducen la formación de etileno endógeno, actuando este compuesto como el responsable directo. Se ha encontrado que las citoquininas están también implicadas en la expresión sexual; así citoquininas aplicadas en vides formadoras de flores masculinas son capaces de convertir estas flores en hermafroditas; en *Mercurialis*

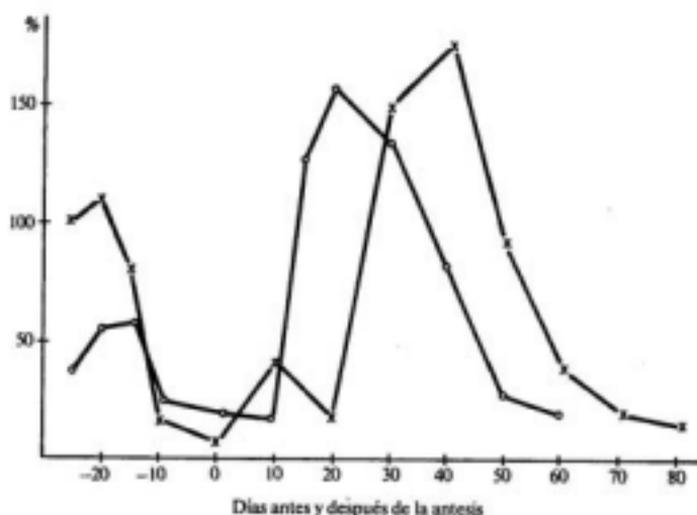


Figura 34.1.—Contenido de auxinas (x) y giberelinas (o) antes y después de la antesis durante el desarrollo de uva.

anaba la  $N_6$ -benziladenina estimula la formación precoz de flores femeninas. Las giberelinas, por otra parte, previenen la formación de flores femeninas en cucurbitáceas, siendo de hecho, capaces incluso de inducir la formación de flores masculinas en líneas de cucurbitáceas que producen normalmente sólo flores femeninas. Por lo que respecta al contenido endógeno de hormonas, éste parece disminuir según se va aproximando el momento de la antesis (Fig. 34.1). Ésta parece ser la causa, junto con el aumento en algunos inhibidores como ácido abscísico, por la que en el momento de la antesis el crecimiento del ovario se detiene y no se reanuda a menos que tenga lugar la polinización o que la flor reciba un estímulo equivalente; si esto no ocurre la flor cae por la formación de una zona de abscisión.

El estímulo positivo para la reanudación del crecimiento es generado usualmente por el polen durante su germinación, durante el crecimiento del tubo polínico y finalmente por la fusión de uno de los núcleos masculinos con la célula huevo y con los dos otros núcleos polares. Auxinas y giberelinas parecen ser los dos tipos de sustancias de crecimiento mediante las cuales ejerce el polen su efecto estimulador del crecimiento del ovario. Así, se han detectado auxinas en el polen de orquídeas, tabaco, maíz, y también se han identificado giberelinas en el polen de *Pinus attenuata* y en el de maíz. En el polen de algunas crucíferas se ha detectado la presencia de unas sustancias con actividad similar a las giberelinas denominadas «brasinas».

Después de la polinización, el control del desarrollo del fruto es asumido por las semillas en desarrollo. Numerosas observaciones y experimentos han demostrado este punto, pudiéndose destacar tres líneas fundamentales de evidencia:

1. Si alguna de las semillas jóvenes no se desarrolla, esto da lugar a frutos con anomalías en su tamaño y forma final, desarrollándose normalmente sólo las partes en proximidad a las semillas viables, quedando con un desarrollo muy retardado las zonas próximas a las semillas no viables. Así, se ha podido demostrar en experimentos realizados en manzana y fresa.
2. El peso final de un fruto es normalmente proporcional al número de semillas viables (Fig. 34.2).
3. Las semillas en desarrollo contienen una cantidad mucho mayor de sustancias de crecimiento que los tejidos del fruto que las rodean. Puede conseguirse, por tanto, desarrollo normal de un fruto con extractos de semillas inmaduras.

Todos estos datos sugieren que las semillas ejercen una profunda influencia en el desarrollo de los tejidos del fruto, y que regulan su crecimiento hormonalmente, es decir, por las sustancias de crecimiento que poseen y que son limitantes, en los tejidos del fruto.

### 34.2. Crecimiento del fruto

El crecimiento del fruto implica el desarrollo coordinado de un gran número de tejidos. El intervalo de tiempo que va desde la antesis a la madurez, varía en diferentes especies desde 3 semanas en fresa, hasta 60 semanas en naranja, oscilando en la mayoría

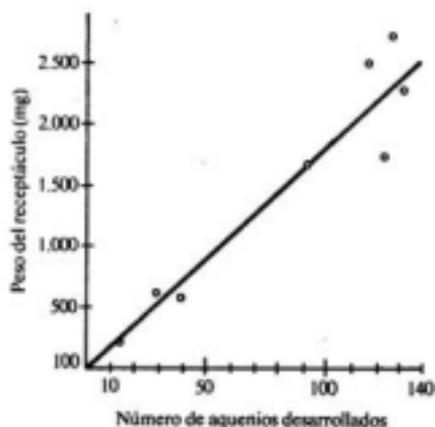


Figura 34.2.—Relación entre el número de achenios desarrollados y peso del receptáculo en fresa

de los frutos alrededor de 15 semanas. Durante este intervalo de tiempo el volumen y peso del fruto aumenta varios miles de veces, 300.000 en el aguacate, por ejemplo. En frutos no carnosos, tales como *Pisum sativum* o *Phaseolus vulgaris* los tejidos del ovario que rodean la semilla contribuyen poco al crecimiento del fruto, quedando secos y membranosos al alcanzar la madurez. Por el contrario, en los frutos carnosos estos tejidos se desarrollan vigorosamente representando una parte muy importante del peso final del fruto, tanto fresco como seco, quedando succulentos al llegar la madurez. El peso de los frutos carnosos al llegar la madurez, está determinado por el número, volumen y densidad celular. El número y volumen están influenciados por el número y volumen celular en el momento de la antesis y por la intensidad y duración de la división y expansión celular que tienen lugar después.

La división celular se halla casi completamente terminada en el momento de la antesis, o bien se termina durante el comienzo del periodo de crecimiento. En manzana hay aproximadamente 2 millones de células en el momento de la antesis y 40 millones en el momento de la recolección; para conseguir este número de células son necesarias 21 duplicaciones antes de la antesis y sólo 4,5 después. Igualmente, en uva hay 0,2 millones de células en el ovario en el momento de la antesis y 0,6 millones 40 días después; el número de duplicaciones antes de la antesis es de 17 y sólo 1,5 después. Por lo que respecta al volumen celular no hay duda de que representa la mayor contribución a la expansión total del fruto. Como ejemplo, podemos citar la contribución de los tres componentes del crecimiento en el aumento total del tamaño de la uva después de la antesis: número de células, dos veces; densidad celular, cuatro veces; volumen celular 300 veces. La expansión de las células está fuertemente influenciada por el comportamiento de la pared celular (pérdida de rigidez, deposición de materiales de la pared) turgor (flujo de agua y diferencias entre el potencial osmótico fuera y dentro de las células) y constricciones impues-

tas por la extensibilidad de la piel. Cada uno de estos componentes puede, a su vez, estar afectado por los factores de crecimiento y medio ambiente.

En resumen, podemos considerar que las divisiones celulares antes de la antesis y la expansión celular después de la antesis son los determinantes principales del crecimiento de los frutos. Contribuciones adicionales, aunque pequeñas, son suministradas por la división celular que tiene lugar después de la antesis y por el aumento en la concentración de solutos (densidad celular).

#### 34.2.1. Medida del crecimiento

El crecimiento de los frutos puede seguirse determinando varios parámetros, tales como: diámetro, volumen, longitud, peso fresco, peso seco, etc. De todos ellos los más utilizados han sido diámetro o longitud. Sin embargo, tenemos que constatar que el crecimiento de un órgano no puede ser precisado correctamente determinando únicamente una dimensión lineal. Obviamente un aumento dado en el diámetro en un fruto de tamaño grande implica un aumento mucho mayor en peso seco y peso fresco que el mismo aumento en diámetro cuando el fruto es pequeño. Por estas razones es preferible en los estudios fisiológicos determinar otros parámetros tales como volumen, peso fresco o peso seco.

Los diferentes frutos presentan intensidades de crecimiento diferentes y curvas de crecimiento también diferentes. Los frutos de pepita, tales como manzana o pera, presentan una curva de crecimiento ligeramente sigmoide (Fig. 34.3) en la que pueden distinguirse tres fases: un aumento inicial lento en el peso seco, un aumento rápido exponencial y por último una disminución en la intensidad de crecimiento. Otros frutos tales como dátil, piña tropical, plátano, fresa, naranja y melón presentan curvas de crecimiento similares a la descrita para los frutos de pepita. Los frutos de hueso tales como, melocotón, albaricoque, cereza o ciruela no presentan una curva de crecimiento sigmoide; en su lugar aparecen dos fases de crecimiento activo, separadas por un período en el que apenas si tiene lugar algún crecimiento. Las tres fases de crecimiento (Fig. 34.4) se designan como períodos I, II y III. En el período I se observa un crecimiento rápido en el pericarpio y un aumento en el peso y tamaño de la semilla. En el pericarpio hay un período de división celular seguida por un rápido alargamiento celular. En este período el endocarpio y la semilla alcanzan casi el tamaño definitivo. En el período II, caracterizado porque la intensidad de crecimiento disminuye bruscamente, hay un rápido endurecimiento del endocarpio; la disminución en la intensidad de crecimiento se debe fundamentalmente a un retardo en el crecimiento del mesocarpio, el embrión se desarrolla rápidamente y puede alcanzar su máximo tamaño durante este período. El período III es una fase de hinchamiento final en la que el crecimiento, tanto en tamaño como en peso se reanuda y alcanza una intensidad similar a la del período I. La maduración del fruto tiene lugar hacia el final de este período. Algunos otros frutos como higo, uva, frambuesa y aceituna presentan una curva de crecimiento similar a la de los frutos de hueso, pudiéndose también distinguir tres fases.

Cuando el crecimiento de frutos individuales se registra de forma continua se puede observar que no es uniforme durante períodos de 24 horas. Así, se ha demostrado que la

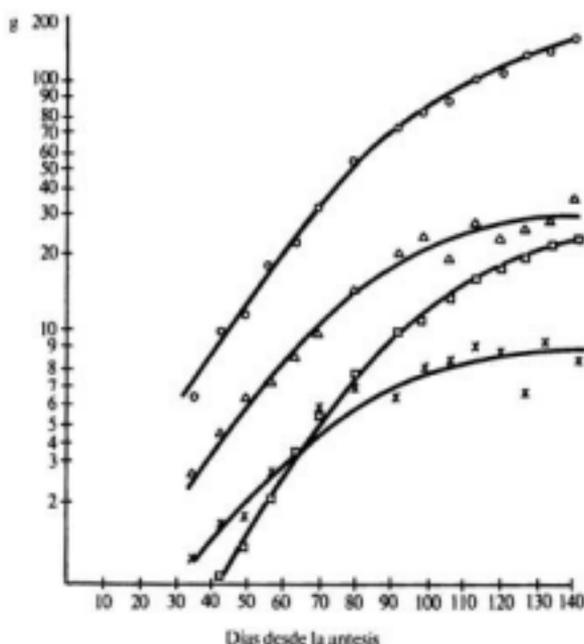


Figura 34.3.—Variaciones en peso fresco (○), peso seco (□), cenizas (Δ) y nitrógeno (x) durante el crecimiento de manzana.

intensidad de aumento en volumen en manzana durante la noche es 25 veces superior al incremento observado desde el mediodía hasta las 4 de la tarde. Resultados similares se han obtenido con aguacate y una serie de frutos no hortícolas. Estos cambios en la intensidad de crecimiento parece que están asociados con los cambios en la capacidad evaporativa de la atmósfera. Así, las intensidades de crecimiento reducidas coinciden con los períodos en los que la capacidad evaporativa de la atmósfera y las intensidades de transpiración son elevadas. Se ha observado, por ejemplo, que cuando se crean déficits internos de agua bajo condiciones de transpiración intensa, el movimiento de agua hacia los frutos no sólo se reduce drásticamente, sino que puede revertirse, es decir, salir agua del fruto hacia otras partes del vegetal; por ello, no es infrecuente observar encogimiento de los frutos durante los momentos del día de máxima intensidad transpiratoria.

### 34.3. Nutrición del fruto en desarrollo

Al igual que otros órganos vegetales, los frutos en desarrollo reciben parte de sus nutrientes a través del xilema y parte a través del floema. Tales nutrientes pueden proceder directamente del exterior, es decir, los nutrientes minerales a través del xilema o

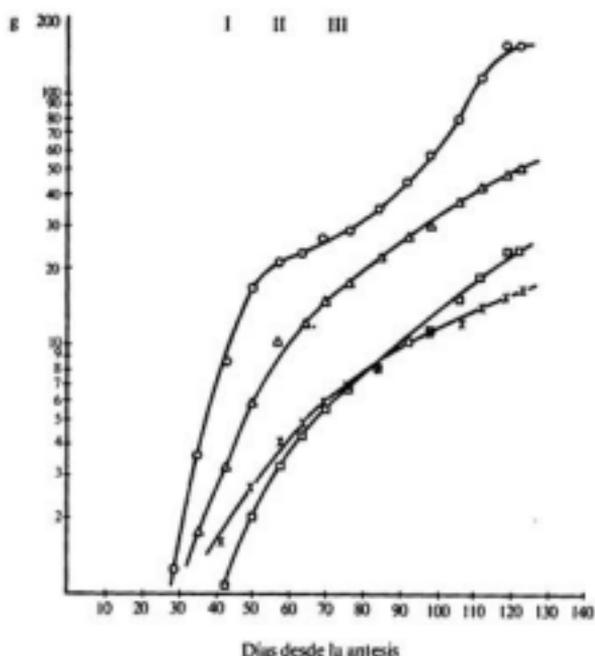


Figura 34.4.—Aumento en peso fresco (○) peso seco (□) cenizas (Δ) y nitrógeno durante el crecimiento de melocotón.

los carbohidratos solubles a través del floema, pero también hay otros nutrientes que llegan al fruto de manera indirecta, como en el caso de algunos nutrientes minerales que, transportados por el xilema, fueron destinados a las hojas y desde aquí retransportados al fruto en desarrollo, que presentará una gran demanda en estos elementos, a través del floema.

El hecho de que muchos frutos en desarrollo contengan clorofila se interpreta en el sentido de que estos órganos sean capaces de asimilar el  $\text{CO}_2$  atmosférico. Esta capacidad fotosintética de los frutos se ha demostrado en manzana, cítricos, frutos de hueso y uva. Mediante la aplicación de  $^{14}\text{CO}_2$  a porciones de la superficie de albaricoques en desarrollo se ha demostrado que el carbono así fijado se distribuye uniformemente por todo el tejido del fruto. La intensidad fotosintética es, sin embargo, muy baja y su contribución al peso seco de los frutos es muy pequeña. En manzana, por ejemplo, la intensidad fotosintética por unidad de área de la superficie del fruto es aproximadamente la décima parte de esa misma superficie foliar.

En los frutos en desarrollo, y dependiendo de la especie, aparecen cantidades variables de azúcares reductores, sacarosa, ácidos orgánicos, azúcar, alcoholes, etc. El problema está en saber cuáles de estos compuestos han sido sintetizados en las hojas u otros órganos y transportados después hacia el fruto, y cuáles son sintetizados en los

propios tejidos del fruto. Admitiendo que el transporte de carbohidratos entre hojas y fruto tiene lugar por el floema, y que el principal carbohidrato transportado por el floema es la sacarosa, tendremos que admitir que este azúcar es sintetizado en las hojas. Por lo que respecta a otros azúcares tales como el sorbitol, es bien conocido que este azúcar-alcohol es un compuesto mayoritario en las hojas y en los frutos de varias especies pertenecientes a las rosáceas, tales como manzano y ciruelo; el contenido de sorbitol en hojas y frutos de manzano es del 2,2 y 0,6 por 100 del peso fresco, respectivamente. Estos hechos, junto con la observación de que el sorbitol y la sacarosa son los principales componentes de los exudados de tubos cribosos en manzanos, sugieren que el sorbitol es también sintetizado en las hojas y transportado al fruto. El hecho también varias veces constatado de que en los exudados de floema no aparecen azúcares reductores, parece claramente indicar que estos compuestos se forman directamente en los tejidos de los frutos. Por lo que respecta a los ácidos orgánicos, algunos trabajos parecen indicar que son sintetizados en las hojas y transportados a los frutos. Sin embargo, estudios en los que se suministran  $\text{CO}_2$  y sacarosa marcados con  $^{14}\text{C}$  a uvas y estudios enzimáticos realizados con limones, sugieren que estos frutos son capaces, al menos, de una síntesis considerable de ácidos orgánicos en sus propios tejidos.

Desde hace bastante tiempo se conoce el hecho de que los frutos exhiben una estabilidad relativa en su composición química, independientemente de las condiciones de nutrición de la planta. Este hecho implica que los nutrientes disponibles en un momento dado se mueven preferentemente hacia los frutos en desarrollo a expensas de otros órganos de la planta. Gran cantidad de observaciones han constatado la capacidad de los frutos para actuar como auténticos sumideros fisiológicos o metabólicos, es decir, lugares hacia los cuales se mueven preferentemente todos los nutrientes, tanto inorgánicos como orgánicos. Un hecho claro es la existencia de una competencia muy activa entre los frutos en desarrollo, hojas y brotes por los nutrientes disponibles en la planta; también existe esta misma competencia entre frutos individuales, desarrollándose al mismo tiempo. Una investigación sobre el mecanismo de este transporte de nutrientes hacia los frutos se ha intentado siguiendo el movimiento de  $^{32}\text{P}$  y  $^{42}\text{K}$  en fresas en desarrollo. La inyección de estos nutrientes en el pedúnculo permite un movimiento de los mismos hacia el fruto, pero no hacia la planta madre. El pedúnculo escindido no muestra tal polaridad en el transporte. Experimentos posteriores demostraron que el movimiento de los isótopos hacia los frutos estaba determinado por la presencia de los frutos, pero no por la de la planta madre. Cuando el material radiactivo se aplica en la superficie o se inyecta en el receptáculo, la actividad se extiende por todo el receptáculo pero no se mueve fuera de este órgano. La presencia de la transpiración del fruto no inhibe el movimiento de nutrientes hacia el fruto. Estos resultados parecen demostrar que las fresas desarrollan la capacidad de desplazar los nutrientes desde la planta madre, que esta atracción es independiente de la transpiración y que el receptáculo actúa como una trampa fisiológica para los nutrientes una vez que llegan allí. Mientras que los nutrientes parecen moverse preferentemente hacia los frutos en desarrollo, el agua puede ser retardada desde los frutos hacia las hojas. Ya hemos mencionado anteriormente los cambios diurnos en el crecimiento del fruto y el engorgimientamiento experimentado por algunos de ellos durante el día. De alguna forma, los frutos parecen actuar como reservorios de humedad, de los cuales pueden las hojas retirar agua. Así se ha observado que en ramas

escindidas de limonero con frutos y hojas, éstas tardan mas tiempo en marchitarse que en ramas similares pero sin frutos.

La idea de que la capacidad de los frutos para atraer nutrientes está bajo alguna clase de regulación hormonal fue sugerida por primera vez por Murneek en 1926, antes de que fuera conocida la naturaleza de ninguna hormona vegetal. Trabajos más recientes sugieren ya claramente esta regulación hormonal. En hojas escindidas, la kinetina, por ejemplo, provoca un movimiento de aminoácidos y fosfato hacia las áreas localizadas de aplicación de la hormona. En plantas intactas se ha demostrado que la aplicación de auxinas o citoquininas puede aumentar el movimiento de fosfato, así como de otros iones inorgánicos. En plantas de soja decapitadas, la aplicación de ácido indolacético o ácido giberélico aumenta el movimiento de asimilados marcados desde las hojas primarias. Una prueba directa de la similitud entre los efectos de los frutos en desarrollo y la aplicación de sustancias de crecimiento en el transporte de nutrientes, se ha obtenido mediante experimentos con judías, en los que se ha demostrado que el  $^{32}\text{P}$  de hojas se mueve normalmente hacia el pedúnculo del fruto, pero este movimiento se reduce considerablemente si el fruto en desarrollo se elimina. Sin embargo, si se aplica al pedúnculo, del cual se ha eliminado el fruto, pasta de lanolina con ácido indolacético, hay de nuevo un incremento en el transporte de  $^{32}\text{P}$  hacia esa zona. El transporte de asimilados marcados con  $^{14}\text{C}$  hacia el pedúnculo del fruto puede estimularse de la misma manera. En este sistema experimental ni el ácido giberélico ni la kinetina tienen efecto cuando se aplican individualmente, pero se presenta una interacción sinérgica cuando las tres hormonas se aplican juntas. También se ha observado que la aplicación de sustancias de crecimiento a frutos normales en desarrollo aumenta a menudo la intensidad de desarrollo y el tamaño final. Así, por ejemplo, ciertas auxinas aumentan el tamaño de albaricoques, el ácido giberélico aumenta el tamaño de la uva, albaricoque y melocotón. Tales efectos podrían explicarse también por una acción de las sustancias de crecimiento en el transporte de nutrientes hacia los frutos en desarrollo; se ha demostrado que aplicaciones de kinetina en naranja o de ácido giberélico en uva aumentan el movimiento de asimilados marcados con  $^{14}\text{C}$  hacia los frutos desde hojas expuestas a  $^{14}\text{CO}_2$ . Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de experimentos realizados que apoyan la idea de que las sustancias de crecimiento, bien las producidas normalmente en los frutos o las aplicadas exógenamente, afectan el movimiento de nutrientes hacia los frutos en desarrollo, el mecanismo de tales efectos sigue siendo un problema a resolver.

#### **34.4. Contenido endógeno de hormonas durante el desarrollo del fruto**

Los frutos en estado de desarrollo constituyen la fuente más rica de sustancias de crecimiento en los vegetales. Citoquininas libres han sido detectadas e identificadas en algunos frutos, tales como zeatina en ciruela, manzana o algodón, o en el endospermo líquido de coco. En algunos casos se ha encontrado una buena correlación entre concentración endógena de citoquininas e intensidad de división celular, tal como ocurre en mesocarpo de aguacate (Fig. 34.5) o frutículos de manzana, ciruela o algodón. Las citoquininas detectadas en frutos no son sintetizadas necesariamente en estos órganos,

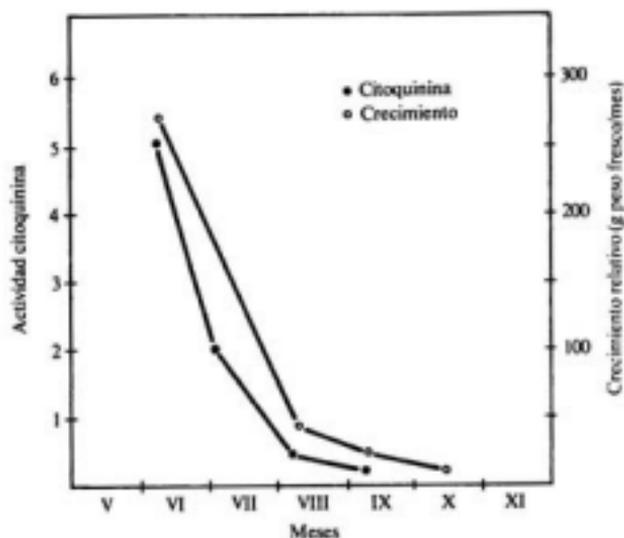


Figura 34.5.—Cambios en citoquininas libres (●) y crecimiento (○) en frutos de aguacate (modificado de P. B. Goodwin, en: *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*, vol. II, D. S. Letham, P. B. Goodwin y T. J. V. Higgins (eds.)).

sino que pueden ser sintetizadas en otras partes del vegetal y fluir hacia ellos por el xilema. De hecho, se ha detectado la presencia de citoquininas en el fluido xilemático. En algunos casos como en *Perilla frutescens* se detecta un pico de actividad citoquinina en el fluido xilemático de plantas con flores que coincide con el momento de rápido crecimiento del fruto. Este pico no se detecta en las mismas plantas en estado vegetativo. Por lo que respecta a las giberelinas, una buena correlación entre intensidad de crecimiento de las semillas y actividad giberelínica se ha encontrado en varias plantas, tales como *Phaseolus vulgaris*, *Pharbitis nil*, *Echinocystis macrocarpa*, *Citrus sinensis*, *Hordeum vulgare*, *Prunus persica*, *Pisum sativum*, etc. En algunos frutos la presencia de semillas no es necesaria para la presencia de giberelinas endógenas. Así en uva y pera la actividad giberelínica se detecta exactamente igual en variedades con y sin semillas. La fuente más rica de actividad giberelínica en los frutos es el endospermo. Los propios frutos son capaces de sintetizar giberelinas tal y como se ha demostrado por el crecimiento de frutos en medios de cultivo, por la identificación de giberelinas en los frutos o por la presencia de giberelinas difusibles en los pedicelos de algunos frutos, tales como peras. Por último, los endospermos inmaduros de granos de cebada, junto con la capa de aleurona y el pericarpio, incorporan la radiactividad del acetato marcado en  $GA_3$  en los momentos en que la actividad extraíble es máxima en cada uno de estos tejidos.

En un gran número de frutos aparece un pico de actividad auxínica cuando el endospermo se hace celular y el cigoto comienza su crecimiento. La fuente más rica de actividad auxínica en los frutos son las semillas, y dentro de la semilla es el endospermo.

Sin embargo, el desarrollo de la actividad auxínica en los frutos no es enteramente dependiente de la presencia de semillas, ya que en los frutos partenocárpicos la actividad auxínica es similar a la encontrada en frutos con semillas. Dos líneas de evidencia parecen indicar que las auxinas se sintetizan en los propios frutos. En primer lugar, muchos frutos aislados en desarrollo son fuentes muy ricas en auxinas difusibles. Por otra parte, algunos frutos, como lima o sandía, convierten el 2-<sup>14</sup>C-triptófano en 2-<sup>14</sup>C-ácido indolacético.

Hasta la fecha se han aislado dos inhibidores que pueden estar implicados en el crecimiento de los frutos y que han sido identificados como ácido abscísico y 1-acetoxi-2-4-dihidroxi-n-heptadeca-16-ene (ADH), este último, por ahora ha sido detectado solamente en el mesocarpo de aguacate, mientras que el ácido abscísico lo ha sido en una gran cantidad de frutos tales como algodón, aguacate, coco, limón, aceituna, manzana, fresa, plátano, tomate, uva, calabaza, pera, etc. En algodón el contenido en ABA aumenta bruscamente al principio del desarrollo, y de nuevo en el momento de la maduración. El primer pico puede estar relacionado con la abscisión de los frutos jóvenes pero no con el crecimiento rápido de los frutículos jóvenes; el segundo pico está relacionado con el cese del crecimiento, envejecimiento y abscisión. De forma similar, en guisante hay un aumento en el contenido de ABA en la flor y de nuevo en la semilla madura. En manzana, uva, trigo, y pera hay un aumento en el momento que comienza la maduración; por el contrario, en aceituna el contenido en ABA disminuye progresivamente según el fruto alcanza su tamaño definitivo. En aguacate el ABA aparece tardíamente durante el crecimiento del fruto y su concentración varía inversamente con la intensidad de crecimiento. Las partes del fruto más ricas en ABA varían en los distintos frutos; así, en uva son la piel y las semillas mientras que en aguacate es la pulpa, siendo su concentración muy baja en semillas. Por lo que respecta a su origen, ha sido posible demostrar que el mesocarpo de aguacate y el embrión y endospermo de frutos inmaduros de trigo son capaces de convertir el mevalonato marcado en ABA; de igual forma se ha demostrado también que el aguacate intacto y los frutos verdes o maduros de tomate pueden también transformar el mevalonato marcado en ABA.

Por último, y por lo que respecta al etileno, hormona que desempeñará un papel fundamental en el proceso de maduración, se han detectado en algunos frutos tales como algodón, higo, manzana, cereza y tomate, dos picos de actividad; uno inmediatamente después de la antesis y asociado con la abscisión de los frutículos, y otro posteriormente y asociado con la maduración. En estas especies y en otras, como uva y melón, se detecta una concentración constante, pero muy baja de etileno durante todo el período de crecimiento.

#### **34.5. Frutos partenocárpicos**

En 1902, Noll introduce el término partenocarpia para designar la formación de frutos sin polinización u otra estimulación previa. Nitsch, en 1952, considera la partenocarpia como el desarrollo de un fruto sin fertilización de los óvulos. Este tipo de partenocarpia podemos considerarla como vegetativa para distinguirla de otro tipo de partenocarpia denominada estimulativa, en la cual el estímulo partenocárpico puede indu-

irse polinizando flores con polen de otras especies totalmente distintas a la que queremos inducir a formar frutos partenocárpico. Entre las especies que presentan partenocarpia estimulativa podemos citar uva, melón y calabaza, y entre las especies que presentan partenocarpia vegetativa se encuentran el plátano, naranja navel y piña tropical. La ausencia de semillas en el fruto maduro no es causa suficiente para decidir si un fruto es o no partenocárpico, ya que pueden haber degenerado después de un período inicial de crecimiento. Por otra parte, existen frutos que presentan partenocarpia natural como los de *Garcinia mangostiana* y ciertas variedades de calabaza e higos que presentan una especie de pseudo-semillas.

La partenocarpia puede estar determinada genéticamente, tal como ocurre en naranja, calabaza, higo, uva, pera, plátano. En esta última especie un único gen es el responsable del comportamiento partenocárpico. En adición a este determinismo genético, también los factores ambientales y las hormonas pueden ser responsables de la inducción del comportamiento partenocárpico. Así, se ha observado que después de una helada puede inducirse la partenocarpia en peras; las bajas temperaturas también pueden inducir la formación de berenjenas partenocárpicas, al igual que en calabaza y tomate. Gustafson, en 1936, obtiene por primera vez frutos de tamaño normal a partir de ovarios no polinizados de tomate, petunia y pimiento, mediante tratamiento de esos ovarios con varias auxinas tales como: ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido indolpropiónico. Desde entonces se ha inducido la partenocarpia en una gran variedad de plantas mediante tratamiento con diversos factores de crecimiento. Así, las auxinas inducen partenocarpia en muchas cucurbitáceas y solanáceas, en moras, higo, gladiolo, uva, pera, aguacate, fresa. Las giberelinas son también efectivas en un gran número de especies, como en manzana, almendra, albaricoque, melocotón, mandarina, ciruela. Las citoquininas son activas en higo y uva. El ácido abscísico ha mostrado ser activo en *Rosa sherardii*. En algunas especies se necesita una combinación de sustancias de crecimiento para que el efecto sea máximo; por ejemplo, en cereza es necesaria una combinación de giberelinas y auxina y en mango es necesaria una combinación de giberelinas, auxinas y citoquininas. En general, las auxinas son más efectivas en aquellos frutos que presentan un gran número de óvulos por ovario y particularmente en aquellos frutos en los que puede ocurrir partenocarpia estimulativa. Las giberelinas son activas no sólo en aquellos frutos sensibles también a las auxinas, sino en aquellas flores en las que los ovarios contienen sólo uno o muy pocos óvulos. Como regla general, los óvulos de variedades capaces de desarrollar frutos partenocárpico son más ricos en auxinas y giberelinas en el momento de la antesis que los de variedades que requieren fertilización y desarrollo de semillas para el crecimiento del fruto.

En la mayoría de los casos, los frutos cuyo desarrollo partenocárpico se induce hormonalmente, completan su ciclo de desarrollo desde la antesis hasta la maduración con sólo una aplicación hormonal en el momento en que la floración se ha completado. En tales frutos, la intensidad de crecimiento y el tamaño final es idéntico al de los frutos con semillas. Este modelo general de respuesta sugiere la presencia de un único mecanismo responsable del comienzo del desarrollo del fruto y que la puesta en marcha de dicho mecanismo se consigue mediante el tratamiento hormonal. Este aporte hormonal para iniciar el ciclo de desarrollo del fruto puede ser suministrado en las condiciones normales por las semillas.

### 34.6. Composición química del fruto

#### 34.6.1. Carbohidratos

El valor comercial de los frutos depende fundamentalmente de su sabor, apariencia y textura. En estos tres aspectos intervienen de forma importante los carbohidratos presentes en los frutos. Así, el sabor depende fundamentalmente del equilibrio de azúcares y ácidos; el color atractivo de muchos frutos se debe en muchos casos a los derivados azucarados de las antocianidinas, y por último, la textura está regulada fundamentalmente por los polisacáridos estructurales.

Es evidente que el contenido en azúcares presenta un gran variabilidad entre los distintos frutos, pudiendo oscilar entre el zumo de lima que no contiene más que trazas de azúcares, y el de dátil, en el que los azúcares constituyen el 61 por 100 del peso fresco. En la mayoría de los frutos el principal material de reserva está constituido por carbohidratos, aunque se encuentran excepciones como el aguacate, en el que son las grasas el principal material de reserva, representando los azúcares sólo el 0,4 por 100 en el momento de la recolección. La glucosa, fructosa y sacarosa son los azúcares más abundantes en los frutos. En la tabla 34.1 puede verse la composición de algunos frutos en estos azúcares.

TABLA 34.1  
Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en algunos frutos

Fruto	Contenido de azúcar expresado como porcentaje del peso de la porción comestible		
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
Manzana .....	1,72	6,08	3,62
Albaricoque .....	1,93	0,37	4,35
Plátano .....	5,82	3,78	6,58
Cereza .....	4,70	7,24	0,0
Dátil .....	32,00	23,70	8,20
Higo .....	5,54	4,00	0,0
Uva .....	8,20	7,28	0,0
Limón .....	0,52	0,92	0,18
Melón .....	2,09	1,52	1,43
Naranja .....	2,36	2,38	4,70
Melocotón .....	1,47	0,93	6,66
Pera .....	2,44	7,00	0,98
Piña .....	2,32	1,42	7,89
Ciruela .....	4,00	1,34	4,26
Fresa .....	2,59	2,32	1,30
Tomate .....	1,63	1,17	0,0

Datos tomados de G. C. Whiting, *etc. The Biochemistry of Fruits and their Products*, A. C. Hulme (ed.), volumen I, Academic Press, Londres, 1970.

Aparte de estos azúcares se han encontrado otros, aunque en menor proporción, tal y como se representa en la tabla 34.2. Por lo que respecta a los polisacáridos, se ha detectado en frutos la presencia de polisacáridos estructurales, es decir, formando parte de las paredes celulares, tales como celulosa, hemicelulosas y sustancias pécticas, y de polisacáridos de reserva como almidón en la mayoría de los frutos y fitoglucógeno en el maíz dulce.

TABLA 34.2  
Contenido en otros azúcares en diferentes frutos

Azúcares	Frutos
Manosa .....	Manzanas, melocotón, naranja
Galactosa .....	Pera, manzana, melocotón
Arabinosa .....	Manzana, lima, pomelo, dátil, mango
Xilosa .....	Fresa, cereza, melocotón, albaricoque, pera, manzana
Heptulosa .....	Melón, naranja, fresa, tomate
Rafinosa .....	Uva, ciruela
Maltosa .....	Plátano
Sorbitol .....	Manzana, cereza, albaricoque, melocotón
Mio-inositol .....	Albaricoque, melocotón, pera, manzana

Elaborada con datos tomados de G. C. Whiting, en: *The Biochemistry of Fruits and their Products*, A. C. Hulme (ed.), vol. I, Academic Press, Londres, 1970.

### 34.6.2. Ácidos orgánicos

Muchos frutos son particularmente ricos en determinados ácidos orgánicos, que pueden encontrarse bien disueltos en el agua de las células como ácidos, sales, ésteres o glicósidos, o bien formando cristales de oxalato cálcico como en muchos frutos jóvenes, o bien de bitartrato potásico como en uvas. En la tabla 34.3 puede observarse una lista de ácidos orgánicos presentes en algunos frutos de importancia comercial. Los más abundantes son el ácido cítrico y el ácido málico. La abundancia de ácidos orgánicos hace que el pH de los zumos de frutos sea a veces muy bajo, como es el caso del limón o tomate, cuyos pH son 2 y 4, respectivamente. Los ácidos libres asociados a las células con sus sales potásicas constituyen un excelente sistema de tampón. Aunque en muchos frutos no hay una distinción considerable entre la piel y la pulpa, ésta sí existe por lo que se refiere al contenido de ácidos orgánicos. Así, en el limón la piel es mucho más pobre en contenido ácido que la pulpa, que es la misma situación que se da en plátano. El caso contrario se da en manzana, sobre todo por lo que se refiere al ácido quínico. Es muy probable que la mayoría de los ácidos orgánicos de las células de los frutos se encuentren en las vacuolas, ya que parece poco probable que el pH del citoplasma celular sea tan bajo como el que presentan los jugos de frutas.

TABLA 34.3  
Ácidos orgánicos presentes en algunos frutos

Ácidos	Manzana	Pera	Uva	Plátano	Fresa
Glicólico .....	+	+	+	+	Trazas
Láctico .....	+	+	+	+	
Glicérico .....	+	+	+	+	Trazas
Pirúvico .....	+		+	+	
Glioxílico .....	+		+	+	
Oxálico .....	+		+	+	
Succínico .....	+	+	+	+	+
Fumárico .....	+		+		
Málico .....	++	++	++	++	+
Tartálico .....			++		
Citramálico .....	+	+		+	
Cítrico .....	+	+	+	+	+++
Isocítrico .....	+		+		
Cis aconítico .....			+		
Oxalacético .....	+		+	+	
-Oxoglutárico .....	+	+	+	+	
Galacturónico .....	+	+	+		
Glucurónico .....	+		+		
Caféico .....	+		+		
Clorogénico .....	+	+	+		
p-Cumarilquinico .....	+				
Quínico .....	+	+	+	+	+
Siquímico .....	+	+	+	+	Trazas

Datos tomados de R. Ulrich, en: *The Biochemistry of Fruits and their Products*, A. C. Hulme (ed.), vol. 1, Academic Press, Londres, 1970.

Existen bastantes razones para creer que una gran parte de los ácidos orgánicos de los frutos son transportados desde las hojas y raíces pero no sintetizados en el propio fruto. Algunas de estas razones son:

- La acidez es mucho más elevada, por ejemplo, en el centro de la uva donde los tejidos vasculares se encuentran más desarrollados que en los tejidos externos.
- La fotosíntesis no es muy activa en los frutos.
- Después de la recolección del fruto no hay aumento en el contenido de ácidos orgánicos.
- Los frutos de tallos parcialmente defoliados son menos ácidos que aquellos procedentes de tallos con todas sus hojas intactas.

Es posible que los ácidos orgánicos puedan proceder no sólo de las hojas, sino también de las raíces. En uvas, por ejemplo, se ha demostrado que el ácido cítrico puede ser

sintetizado en las raíces y transportado a las partes aéreas de la planta, a veces, parcialmente transformado en ácido málico.

Desde un punto de vista práctico, la acidez, como responsable en gran medida del sabor de los frutos, juega un papel importante en el valor comercial de los mismos. En algunos casos como pera o uva, el dulzor es preferido a la acidez, sin embargo, en otros como limón o pomelo es preferida la acidez.

### 34.6.3. Proteínas

Los constituyentes proteicos de los frutos, aunque aparecen en concentraciones muy bajas, son de importancia capital, no sólo como componentes de estructuras nucleares y citoplasmáticas que toman parte en la determinación y mantenimiento de la organización celular, sino porque constituyen la fracción enzimática implicada en el metabolismo durante el crecimiento, desarrollo y maduración de frutos. Como ya hemos dicho, el contenido proteico de los frutos es muy bajo, sobre todo si lo comparamos con su contenido en semillas, hojas y otras partes o tejidos vegetales. Su concentración, por otra parte, puede variar ampliamente según las especies, lugar de crecimiento, estación, prácticas de cultivo e influencias ambientales. En la tabla 34.4 puede verse el contenido en proteínas de algunos frutos.

TABLA 34.4

Contenido proteico de algunos frutos expresado como nitrógeno total  $\times 6,25$

Fruto	% de proteína
Manzana ( <i>Malus silvestris</i> )	0,2
Albaricoque ( <i>Prunus americana</i> )	1,0
Plátano ( <i>Musa sapientum</i> )	1,1
Cereza ( <i>Prunus cerasus</i> )	1,2
Dátil ( <i>Phoenix dactylifera</i> )	2,2
Higo ( <i>Ficus carica</i> )	1,2
Uva ( <i>Vitis vinifera</i> )	0,6
Limón ( <i>Citrus limonia</i> )	1,2
Melón ( <i>Cucumis melo</i> )	0,7
Naranja ( <i>Citrus sinensis</i> )	1,0
Tomate ( <i>Lycopersicum esculentum</i> )	1,2
Sandía ( <i>Citrullus vulgaris</i> )	0,5

Adaptado de E. Hansen, en: *The Biochemistry of Fruits and their Products*, A. C. Hulme (ed.), vol. I, Academic Press, Londres, 1970.

Dado que las proteínas más estudiadas en frutos son las enzimáticas, vamos a referirnos exclusivamente a ellas. En cuanto a su localización, es muy variada, pudiendo encontrarse no sólo en las paredes celulares y plasmalema, sino también en diferentes

compartimentos y orgánulos citoplasmáticos tales como, núcleo, retículo endoplasmático, ribosomas, cloroplastos, leucoplastos, mitocondrias, peroxisomas, glioxisomas, lisosomas y vacuolas, además de la fracción soluble. Entre los enzimas detectados se encuentran todos aquellos responsables de los cambios de textura durante la maduración, tales como pectinasas y celulasas, de la desaparición del almidón, como fosforilasas y amilasas. La clorofilasa puede ser responsable de la degradación de clorofila que tiene lugar durante la maduración de frutos con el consiguiente cambio en color. La ribonucleasa, enzima que puede ser importante durante la fase de envejecimiento de los frutos, ya que inicia la degradación celular del RNA requerido para la síntesis de proteínas. Otros enzimas encontrados en frutos incluyen, catalasa, peroxidasas, transaminasas, enzima málico, aldolasa, fenolasas, que intervienen en el oscurecimiento de los tejidos de los frutos cuando quedan expuestos al aire; este oscurecimiento es el resultado de la oxidación de los fenoles y la consiguiente polimerización no enzimática de las quinonas formadas en taninos.

La composición en aminoácidos de las proteínas de los frutos ha sido determinada sólo en algunos. Generalmente, en la hidrólisis aparecen los mismos aminoácidos que pueden detectarse en estado libre en los frutos.

#### **34.6.4. Lípidos**

El interés en estos compuestos procede fundamentalmente del hecho de que los frutos de algunas especies vegetales como aceituna o aguacate, acumulan gran cantidad de reservas oleaginosas durante su desarrollo, reservas que por otra parte constituyen una fuente importante de grasas y aceites para la alimentación humana. Las reservas lipídicas de los frutos son fundamentalmente triglicéridos, siendo los ácidos oleico y linoleico los componentes más abundantes de estos lípidos.

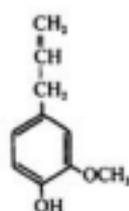
Los lípidos que se acumulan en la epidermis de los frutos forman la cutícula, desempeñando un papel importante en el control de la transpiración y en la protección de los frutos contra el ataque de insectos y parásitos. Otros lípidos existentes en los frutos son los que forman parte de las membranas biológicas, fosfolípidos y glicolípidos.

#### **34.6.5. Compuestos volátiles**

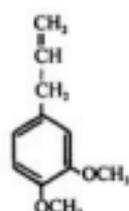
El aroma es uno de los componentes fundamentales del sabor de los frutos. Los órganos del olfato en los animales están localizados en un área muy pequeña, el epitelio olfatorio, localizado en la parte superior de la cavidad nasal, y que por ello puede ser sólo impresionado, por lo menos en condiciones normales, por gases o vapores; por ello, las sustancias productoras de aroma deben ser volátiles. Los compuestos volátiles individuales se encuentran en concentraciones por debajo de una parte por millón o incluso de partes por mil millones, por lo que el examen directo de los frutos o jugos de frutas es muy poco útil en el estudio de estos compuestos. En la mayoría de los casos los compuestos volátiles deben ser concentrados, bien por destilación o extracción con solventes, seguido de secado y nueva concentración. La esencia así obtenida es analizada por cromatografía de gases y los diferentes componentes identificados por espectrofo-

tometría de infrarrojos o resonancia magnética nuclear. Por estos métodos se han identificado varias clases de compuestos que pueden agruparse en ésteres, lactonas, alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas, acetales, hidrocarburos y fenoles. En naranja, por ejemplo, se han identificado alrededor de 150 compuestos diferentes y en manzana unos 160.

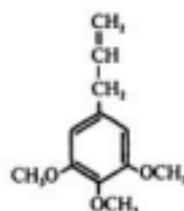
En manzana, el compuesto responsable del aroma del fruto maduro parece ser el etil-2-metilbutirato, mientras que en el fruto verde los responsables parecen ser el hexanal y el 2-hexenal. En plátano, es el isopentenil acetato, aunque también contribuyen de manera considerable en los plátanos maduros otros compuestos, tales como eugenol y sus derivados O-metileugenol y elemicina:



Eugenol



O-metileugenol

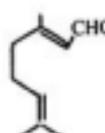


Elemicina

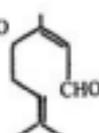
El aroma característico de los cítricos se debe fundamentalmente a los aceites esenciales solubles en agua. Cuando se aíslan por destilación al vapor, el destilado se separa en dos capas, conteniendo la superior aceitosa todo el aroma. Estos aceites son una mezcla de terpenos hidrocarburos, fundamentalmente (+) limoneno, que constituye entre el 80 y el 90 por 100 de los aceites de los cítricos; pero son los terpenos oxigenados, que representan alrededor de 5 por 100 del aceite los que suministran los aromas típicos de las especies.



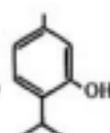
(+)-Limoneno



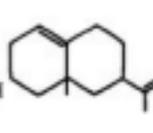
Geranial



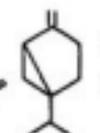
Neral



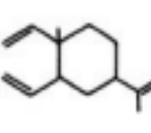
Timol



Valenceno

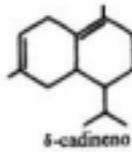
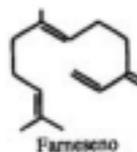
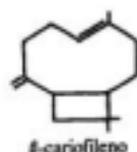


Sabineno

 $\beta$ -elemeno

El aceite de limón consiste de un 95 por 100 de hidrocarburos y un 5 por 100 de compuestos oxigenados. El (+) limoneno representa el 70 por 100 del aceite, pero el contenido en citral (mezcla de geranial y neral) es el responsable fundamental del aroma. En la piel de las mandarinas, el 68 por 100 de los constituyentes volátiles es (+) limoneno; en este fruto no existe un compuesto único como responsable del aroma típico, sino que son una mezcla de terpenoides alifáticos y oxigenados los responsables; así

una mezcla de metil N-metilntranilato y timol evoca el aroma de la mandarina. El aceite de naranja contiene un 90 por 100 de (+) limoneno, pero los responsables del aroma son el valenceno junto con sabineno  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -cariofileno, farneseno, humuleno y  $\delta$ -cadineno.



### 34.6.6. Fenoles

La concentración de sustancias fenólicas en frutos varía enormemente de especie a especie. Por ejemplo, en plátano es de 0,53 g/100 g de peso seco, llegando en algunas variedades de naranja hasta 5 g/100 g de peso seco; también varía mucho dentro de la misma especie, entre las distintas variedades, e incluso varía dentro de un mismo fruto con las diferentes estaciones y localizaciones. La clase de fenoles más abundante es la de los derivados del ácido cinámico y los flavanos. El ácido clorogénico es el derivado del ácido cinámico más abundantemente encontrado en frutos, siendo especialmente abundante en manzana. En algunos frutos como el dátil, son abundantes los ésteres del ácido siquímico. La concentración de derivados del ácido cinámico disminuye según el fruto va madurando, siendo su concentración mucho mayor en la piel que en el resto del fruto. Entre los flavanos, los más abundantes son la (+) catequina y (-) epicatequina. Son también más abundantes en la piel que en la pulpa y en frutos inmaduros más que en maduros.

Otras sustancias fenólicas, tales como las antocianidinas y antocianinas, son fácilmente detectables debido a que son sustancias coloreadas. Las más comunes son la pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina. Aparecen fundamentalmente como  $\beta$ -glicósidos, siendo los azúcares más abundantes la D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa y L-arabinosa. Las antocianinas están localizadas típicamente en las capas epidérmicas de frutos tales como, manzana, ciruela, pera; en contraste con los derivados del ácido cinámico y los flavanos, su concentración aumenta al llegar la madurez. Otras sustancias fenólicas también encontradas en frutos son los flavonoles, tales como el kenferol en las uvas y fresa o la quercetina en manzana, albaricoque, fresa y tomate. Las sustancias fenólicas confieren a algunos frutos propiedades astringentes, y son responsables del marcado sabor amargo que presentan algunos frutos como el pomelo, que lo debe a la presencia del flavonoide naringina.

### 34.6.7. Carotenoides y triterpenoides

Los carotenoides más abundantes en frutos son el  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina, licopeno, criptoxantina y zeaxantina. Generalmente los carotenoides son

sintetizados rápidamente durante la maduración y este proceso suele estar acompañado por una pérdida de clorofila, lo que conduce a los cambios típicos de color que se observan al madurar los frutos. Entre los triterpenoides, los más interesantes debido a su importancia comercial están los principios amargos encontrados en las rutáceas y meliáceas, conocidos colectivamente como limonoides. En las rutáceas el más ampliamente distribuido es la limonina.

### 34.6.8. Vitaminas

La contribución principal de los frutos a la nutrición humana es, sin duda, el suministro de la vitamina antiescorbútica, ácido ascórbico o vitamina C. Los frutos junto con las verduras son la fuente principal a partir de la cual todos los primates obtienen esta vitamina. La forma natural de aparición del ácido ascórbico es como ácido L-ascórbico. En la tabla 34.5 puede verse el contenido de algunos frutos en ácido ascórbico.

TABLA 34.5  
Contenido en ácido ascórbico en algunos frutos

Fruto	Ácido ascórbico mg/100 g
Manzana .....	2-10
Albaricoque .....	7-10
Plátano .....	15-30
Cereza .....	5-8
Pomelo .....	40
Limón .....	50
Melón .....	25-35
Naranja .....	50
Mandarina .....	30
Melocotón .....	7
Pera .....	4
Piña .....	25
Fresa .....	60
Tomate .....	25

Datos tomados de L. W. Mapson, en: *The Biochemistry of Fruits and their Products*, A. C. Hulme (ed.), volumen I, Academic Press, Londres, 1970.

Además de la vitamina C, algunos frutos como albaricoque, melocotón, melón y cereza son buenas fuentes de  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A). Albaricoque, higos y cítricos contienen cantidades moderadas de ácido pantoténico y biotina.

### 34.7. Maduración de frutos

La maduración de frutos puede ser definida como la secuencia de cambios en color, sabor y textura que hacen que el fruto sea aceptable para el consumo humano. Los fenómenos asociados con la maduración de la mayoría de los frutos incluyen cambios en color, lo que implica una pérdida de clorofila (fruto verde), con el consiguiente desenmascaramiento de otros pigmentos y con la síntesis de otros nuevos; alteraciones en el sabor, que incluye cambios en la acidez, astringencia y dulzor, dependientes a su vez de cambios en los ácidos orgánicos, fenoles, azúcares y compuestos volátiles; y por último cambios en la textura del fruto. Otros cambios visibles incluyen la abscisión del fruto, y en algunos frutos un aumento en la deposición de ceras en la piel. Por debajo de estos cambios visibles, y como responsables de ellos, se encuentran cambios en la composición química y del metabolismo de los frutos.

Los estudios sobre la maduración de los frutos comienzan con los trabajos de Kidd y West en 1920 realizados en manzana. Estudian los cambios en la actividad respiratoria de manzanas recogidas en varios estados de su desarrollo. Observan que, después de recogidas, la producción de  $\text{CO}_2$  disminuye a niveles mínimos aumentando bruscamente poco después y desencadenándose todos los cambios típicos de la maduración de frutos. Para este aumento en la respiración y que parece ser un momento crítico en la vida de un fruto proponen el término de *climaterio*. En trabajos posteriores, los mismos Kidd y West demuestran que un aumento similar en la respiración tiene lugar también en las manzanas que maduran en el árbol; también demuestran que una vez que el fruto, bien en el árbol o separado de él, entra en esta fase crítica, la misma es irreversible y no puede ser detenida aunque si retardada por la aplicación de factores exógenos. Posteriormente, ha sido establecido que una concentración activa de etileno en los espacios intercelulares en el interior del fruto precede al aumento respiratorio, y que un suministro exógeno de etileno puede desencadenar el climaterio en frutos inmaduros e inducir en ellos el proceso autocatalítico de la producción de etileno. El etileno es considerado, por tanto, como la hormona natural de maduración y que es el aumento en la biosíntesis de etileno hasta concentraciones estimuladoras, más que el aumento en la respiración, el acontecimiento que marca la transición entre la fase de crecimiento del fruto y la de envejecimiento. Por todo ello, podemos definir el climaterio como un periodo en el desarrollo de ciertos frutos, durante el cual tiene lugar una serie de cambios bioquímicos iniciados por la producción autocatalítica de etileno, que señala el cambio de crecimiento a envejecimiento, implica un aumento en la respiración y conduce de forma irreversible a la maduración del fruto.

Posteriormente a los trabajos de Kidd y West con manzana, fue establecido que otros muchos frutos presentaban un modelo similar de respiración asociado con la maduración. Biale, en 1960, clasifica los frutos como climatéricos y no climatéricos. En la tabla 34.6 se da una lista de frutos pertenecientes a estos dos grupos. Frutos climatéricos son aquellos en los que hay un aumento en la respiración cuando maduran y que además son capaces de producir etileno en respuesta a bajas concentraciones de etileno. Esta capacidad falta en los frutos no climatéricos.

La maduración de frutos climatéricos va acompañada por una serie de cambios rápidos en la composición química, como hidrólisis de polisacáridos, hidrólisis de los

TABLA 34.6

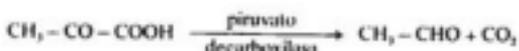
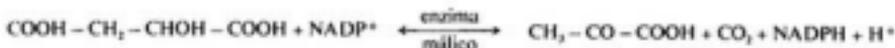
Clasificación de los frutos por su comportamiento durante la maduración

Frutos climatéricos	Frutos no climatéricos
Manzana .....	Cereza
Albaricoque .....	Calabaza
Aguacate .....	Uva
Plátano .....	Pomelo
Chirimoya .....	Piña
Higo .....	Limón
Melón .....	Naranja
Melocotón .....	Mandarina
Pera .....	Fresa
Tomate .....	—
Sandía .....	—

Datos tomados de McGlasson, Wade y Adato, en: *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise*, vol. II, D. S. Letham, P. B. Goodwin y T. J. V. Higgins (eds.), Elsevier/Nort Holland, Amsterdam, 1978.

componentes de la pared celular y consiguiente ablandamiento, cambios en ácidos orgánicos, aumento en aroma, cambio en color, transformación de cloroplastos en cromoplastos, aumento en la producción de etileno, etc. En un fruto no climatérico típico como la naranja, los cambios en la composición son graduales y no son acompañados por aumentos respiratorios o de la producción de etileno.

Se han dado varias razones para intentar explicar a qué es debido este aumento respiratorio que precede al inicio de la maduración de los frutos. Algunas de estas razones son, la presencia de sustratos respiratorios, tal como la fructosa 6-fosfato. De hecho, en plátano se ha sugerido que el aumento respiratorio puede deberse a un aumento en la concentración de fructosa-1,6-difosfato como resultado de una activación de la fosfofructokinasa. Otra posibilidad podría ser la mayor disponibilidad de aceptores de fosfato, es decir, ADP, para la formación de ATP; de esta manera la mayor o menor concentración de ADP podría controlar el aumento respiratorio. En algunos frutos climatéricos como pera y manzana, se observa un aumento en el cociente respiratorio durante el climatérico; esto se explica por el aumento en la actividad de los enzimas, enzima málico dependiente de NADP y piruvato decarboxilasa. La actividad conjunta de ambos enzimas resulta en una producción de CO<sub>2</sub> sin ningún consumo de oxígeno, lo que hace que el QR aumente:



Existe también considerable evidencia de que durante el climaterio hay cambios considerables en la actividad metabólica de los frutos, y que esto podría ser solamente el reflejo de ciertas alteraciones en las estructuras subcelulares, tales como las membranas celulares. Se ha detectado, por ejemplo, que los frutos climatéricos muestran una rápida disminución en su capacidad para incorporar nucleótidos en el RNA, así como una disminución en la síntesis de ribosomas y en la incorporación de aminoácidos en nuevas proteínas. Durante la maduración se observa también un aumento en la actividad de los enzimas hidrolíticos, lo que conduce a un ablandamiento y cambio típico en la textura del fruto maduro; se sabe que en este aumento de actividad juega un papel muy importante el etileno.

Muchos investigadores suponen que la integridad de las membranas juega un papel importante en la regulación del proceso de maduración. Un gran número de trabajos apoyan el concepto de que las células de los frutos son cada vez más permeables durante la maduración. De esta forma pueden ponerse en contacto ciertos enzimas y sustratos que antes estaban separados por una membrana con permeabilidad selectiva, y desencadenarse toda la serie de procesos irreversibles que conducen a la maduración del fruto. La importancia de la integridad de la membrana en la fisiología del fruto se pone de manifiesto mediante el efecto retardador que sobre la maduración y el envejecimiento tiene la infiltración de calcio en los tejidos del fruto, ya que este elemento tiene una función restauradora de la integridad de la membrana y reestablece sus propiedades de permeabilidad selectiva.

### 34.8. Regulación hormonal de la maduración

Actualmente se considera que la mayoría de los procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación vegetal están regulados por la interacción de dos o más de los cinco tipos conocidos de hormonas vegetales, por lo que es lógico pensar, sobre todo por el hecho conocido de que auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno han sido detectadas en gran variedad de frutos, que los procesos de maduración están regulados de forma similar. Generalmente, se considera que el etileno y el ácido abscísico son promotores de los procesos de envejecimiento, mientras que auxinas, giberelinas y citoquininas son retardadores del envejecimiento.

Se tienen gran cantidad de datos sobre las respuestas de tejidos de frutos a la aplicación exógena de ácido indolacético y auxinas sintéticas. Sin embargo, se sabe muy poco sobre las relaciones entre los niveles endógenos de auxinas y la maduración natural de los frutos. Los resultados obtenidos con la aplicación de auxinas exógenas son bastante contradictorios, pues si bien retardan la maduración de plátanos, uvas y peras, aceleran la de albaricque y melocotón. Estas diferencias, aparentemente contradictorias, pueden explicarse por la influencia que el tratamiento auxínico puede tener sobre la producción endógena de etileno por los tejidos del fruto. En los frutos no climatéricos, el tratamiento con auxinas no suele aumentar la producción de etileno; por el contrario, en frutos climatéricos el tratamiento auxínico en concentraciones por encima de  $10 \mu\text{M}$  estimula la producción de etileno, de tal forma que se acelera el proceso de maduración; tratamientos auxínicos inferiores a  $10 \mu\text{M}$  suprimen la producción de etileno y la respiración. Así, aplicaciones de 100 a  $1000 \mu\text{M}$  de AIA en frutos de aguacate aceleran

la maduración, mientras que tratamientos de 1 a 10  $\mu\text{m}$  retrasan el climaterio y la maduración. También el método de aplicación de las auxinas es importante a la hora de valorar los resultados obtenidos. Por ejemplo, en plátanos enteros introducidos en una solución de 2,4-D que permanece en la piel y no penetra al interior, se estimula la producción de etileno y se acelera la maduración del fruto; sin embargo, mediante la técnica de infiltración al vacío que proporciona una buena distribución de la hormona por todo el tejido, se obtiene una inhibición de la maduración. Estos resultados, junto con el hecho observado de que los niveles de auxinas en los frutos en el momento de la maduración son muy bajos, parecen sugerir que la maduración puede estar de alguna forma relacionada con una deficiencia de auxinas; algunos resultados obtenidos con antiauxina parecen apoyar esta sugerencia, aunque es necesaria una mayor experimentación para obtener unos resultados más concretos. En relación con esto último, también se ha sugerido que la producción de etileno por los tejidos de los frutos estimula la actividad peroxidásica y la actividad AIA oxidasa que reducirían los niveles de auxina.

La mayoría de los efectos de las giberelinas en vegetales, están relacionados con el desarrollo y el mantenimiento de un estado juvenil, lo que se refleja en procesos tales como estimular la germinación, inducir la síntesis de enzimas, estimular la elongación, retrasar la pérdida de clorofila, etc. El etileno, por otra parte, es una hormona que acelera todos los procesos de envejecimiento en plantas, por lo cual es lógico pensar en la posibilidad de que el equilibrio endógeno entre giberelinas y etileno podría estar implicado en el control de la maduración de frutos. De hecho, se ha observado que ambas hormonas actúan como antagonistas en varios procesos típicos de la maduración de frutos. Se ha demostrado que el tratamiento de naranja, tomate, plátano y albaricoque con giberelinas, retrasa la pérdida de clorofila y el aumento de carotenoides, proceso que es acelerado por el etileno. También el tratamiento con giberelinas en naranja, ciruela y tomate retrasa el ablandamiento típico de la maduración, debido a que la giberelina suprime casi por completo la actividad poligalacturonasa y también afecta, aunque en menor grado a la actividad celulásica (Fig. 34.6); en este caso, el etileno también actúa como antagonista. Como consecuencia de estos resultados podría pensarse que las giberelinas podrían interferir con el proceso de maduración, manteniendo los tejidos en un estado relativamente juvenil. Esta interferencia podría ser eliminada por una reducción en los niveles de giberelina durante los últimos estados de la maduración de frutos, hecho que realmente ocurre. El aumento posterior en la producción de etileno desencadenaría todos los procesos de la maduración. La actividad de las giberelinas también podría ser reducida de una forma indirecta mediante la biosíntesis de ácido abscísico inducida por el etileno.

Aunque las citoquininas son también un grupo de hormonas que se caracterizan por su actividad anti-envejecedora, no parecen, por lo menos por los resultados obtenidos hasta ahora, desempeñar un papel importante en la regulación de la maduración de frutos. Los efectos más importantes de las citoquininas en la maduración de frutos parecen ser aquellos asociados con los cambios metabólicos que ocurren después que se ha iniciado la maduración, como pueden ser el metabolismo respiratorio de los frutos, cambios metabólicos en los plastos y el mantenimiento de los niveles de otras hormonas en el fruto.

Todos los frutos liberan etileno durante su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, la

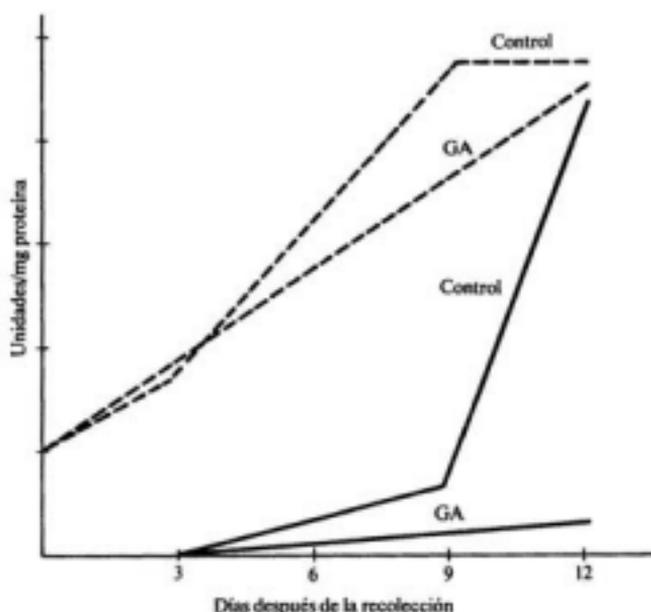


Figura 34.6.—Efecto de la giberelina en la actividad poligalacturonasa (---) y celulosa (—) en tomate (según J. K. Babbitt y cols., «J. Amer. Soc. hort. Sci.», vol. 98, 1973, pág. 71).

forma como se realiza esta liberación es diferente en frutos climatéricos y no climatéricos. Ambos tipos de frutos liberan etileno en concentraciones relativamente elevadas inmediatamente después de la antesis. La liberación del gas continúa a intensidades muy bajas durante el crecimiento y la maduración en frutos no climatéricos y la consecución de la madurez total no está asociada con un aumento en la liberación de la hormona. Por el contrario, en los frutos climatéricos la liberación del etileno aumenta bruscamente durante la maduración; por ello, la mayoría de los trabajos sobre el papel del etileno en la maduración están realizados con frutos climatéricos ya que su papel en los frutos no climatéricos es aún más confuso. En la tabla 34.7 se muestra la concentración interna de etileno en varios frutos, tanto climatéricos como no climatéricos; en estos últimos la concentración interna es mucho más baja y cambia muy poco con la maduración; por el contrario, en los frutos climatéricos se observa un brusco aumento en su concentración interna durante la maduración. Cuando un fruto climatérico se trata con etileno a una concentración y tiempo suficiente (0,1-1,0  $\mu\text{l/l}$  de etileno y durante un día) se inicia el proceso de la maduración y la intensidad respiratoria alcanza valores máximos, que son casi independientes de la concentración de etileno utilizada. Por el contrario, en la aplicación de etileno a un fruto no climatérico, hay un aumento en la intensidad respiratoria que es siempre proporcional al logaritmo de la concentración de etileno utilizada, y sólo aparecen algunos fenómenos apreciables de envejecimiento como la degradación de clorofila y acumulación de carotenoides, pero sin que se acelere el auténtico proceso de maduración. La diferencia en este comportamiento reside en la

TABLA 34.7

Concentración interna de etileno en varios frutos climatéricos y no climatéricos

Fruto	Concentración interna de etileno ( $\mu\text{M}$ )
Manzana .....	25-2.500
Melocotón .....	0,9-20,7
Aguacate .....	29,8-74,2
Plátano .....	0,05-2,1
Tomate .....	3,6-29,8
Limón .....	0,11-0,17
Naranja .....	0,13-0,32
Piña .....	0,16-0,40
Ciruela .....	0,14-0,23

Datos tomados de McGlasson, Wade y Adato, en: *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*, vol. II.

diferente capacidad de los frutos climatéricos y no climatéricos para iniciar la síntesis endógena de etileno en respuesta a un tratamiento con etileno. Este aumento en la síntesis etileno es lo que se denomina liberación o producción «autocatalítica» de etileno.

La iniciación de la producción autocatalítica de etileno requiere la presencia en la atmósfera de al menos un 6-7 por 100 de oxígeno. Una vez que esta producción comienza, la síntesis ya es menos dependiente de la presencia parcial de oxígeno y sólo puede ser inhibida por una anoxia total.

En ciertos frutos ha sido posible demostrar que un aumento en la liberación de etileno precede al aumento respiratorio asociado con la maduración. Al menos deben cumplirse tres criterios de garantía antes de poder concluir que un aumento en la síntesis de etileno precede al aumento respiratorio climatérico; estos tres criterios son:

1. El primer aumento detectable en el etileno endógeno debe preceder al primer aumento detectable de la respiración; la diferencia en la sensibilidad de los métodos utilizados para determinar estos dos parámetros puede afectar los resultados.
2. La concentración interna de etileno alcanzada como resultado del aumento de su síntesis debe ser suficiente para inducir el climaterio.
3. La fase de latencia entre el momento en el que se alcanza la concentración umbral de etileno y el comienzo del aumento respiratorio, debe ser el mismo independientemente de que el etileno sea el producido endógenamente o aplicado externamente.

Algunos frutos en los que ha sido posible demostrar esta producción de etileno previa al aumento respiratorio son el plátano (Gros Michel), algunas variedades de melón y de aguacate. En algunos frutos, por el contrario, la maduración puede iniciarse como consecuencia del contenido preclimatérico de etileno, sin ningún aumento aparente en la intensidad de la liberación de etileno. Después de que se ha iniciado la maduración,

aumenta la producción de etileno, lo que acelera otros cambios asociados con la maduración. Así se comportan el mango, algunas variedades de chirimoya, aguacate y probablemente también la manzana. En muchos frutos el aumento en la producción de etileno es casi coincidente con el comienzo del aumento respiratorio climatérico, por lo que es muy difícil poder saber cuál de los dos procesos es anterior.

La sensibilidad de los frutos al etileno varía, no sólo con la edad, sino también con el hecho de que el fruto esté unido a la planta materna o separado de ella. Así, se ha observado en muchos frutos climatéricos que si se arrancan de la planta materna se acelera el comienzo de la maduración. Este fenómeno sugiere que ciertas sustancias inhibitorias de la maduración son transportadas hacia el fruto desde la planta materna y que, al mismo tiempo, el fruto produce sustancias promotoras de la maduración. Por el momento, no existe evidencia clara de que esto sea cierto. Sin embargo, lo que sí es evidente, aunque el mecanismo permanezca desconocido, es que el proceso que desencadena la pro-

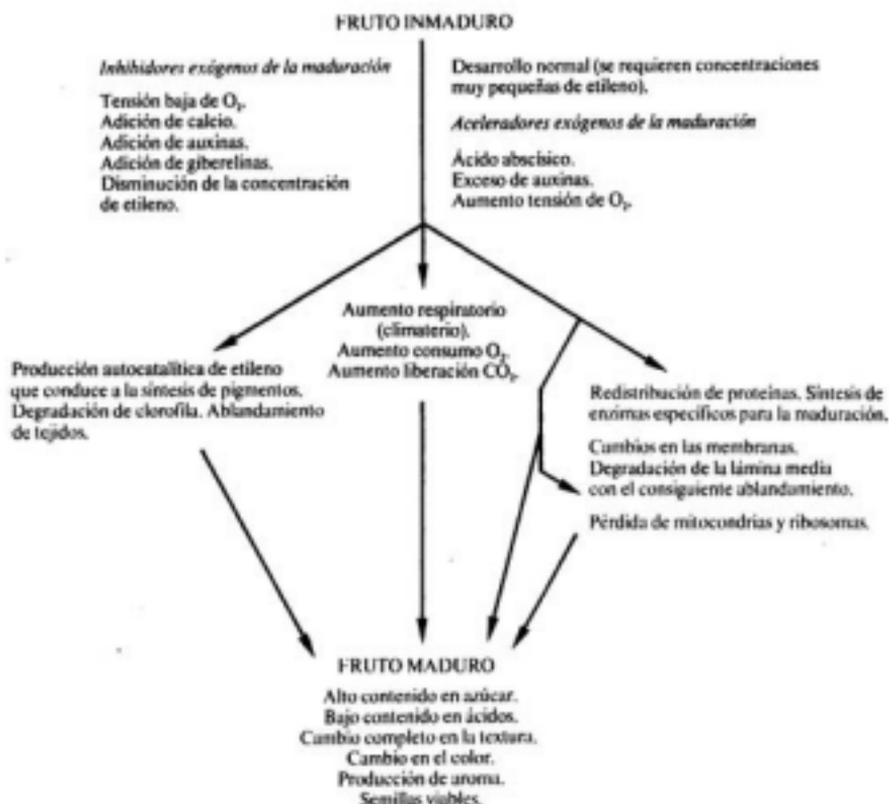


Figura 34.7.—Maduración de frutos climatéricos (adaptado de G. E. Hobson).

ducción de etileno está sometido a un estricto control metabólico, regulado probablemente por otras hormonas. De hecho, experimentos realizados con auxinas, giberelinas y citoquininas parecen indicar que todas ellas están implicadas en la determinación de la sensibilidad al etileno.

El efecto del ácido abscísico en la maduración de los frutos y su posible papel como regulador natural de este proceso, ha sido objeto de bastantes trabajos durante los últimos años. Los tratamientos con ácido abscísico aceleran la maduración en algunos frutos climatéricos tales como tomate, aguacate, plátano y también en algunos no climatéricos como uva y naranja. Sin embargo, su papel promotor de la maduración no parece ejercerse a través de un aumento en la producción de etileno, ya que la mayoría de los resultados obtenidos hasta la fecha parecen indicar más bien lo contrario, que es el aumento en la producción de etileno la que provoca un aumento en la concentración de ácido abscísico. El posible papel del ácido abscísico en la maduración podría ser, tal como han sugerido varios investigadores, el siguiente: el ácido abscísico es un potente inhibidor de la acción de las hormonas promotoras del crecimiento, cuyo efecto, como hemos visto en este apartado, es considerado como inhibidor de la maduración. Si durante los estados más avanzados del desarrollo del fruto disminuye el nivel de estas hormonas, la maduración puede verse acelerada sin que cambie el nivel de ácido abscísico, ya que el nuevo equilibrio hormonal favorece su actividad; este nuevo estado en el fruto puede ser el desencadenante de una serie compleja de fenómenos que conducen a la maduración del fruto.

En la figura 34.7 se esquematiza a manera de resumen el posible mecanismo de la maduración de los frutos climatéricos.

### 34.9. Regulación de la maduración por factores externos

La utilización de los factores externos en el control de la maduración de frutos tiene gran importancia para el correcto almacenamiento de los mismos, y sobre todo, para su comercialización fuera de su época natural de producción.

#### 34.9.1. Efecto de la temperatura

La maduración de los frutos sólo tiene lugar dentro de un relativamente estrecho margen de temperaturas. Por debajo de una temperatura crítica los frutos no pueden madurar normalmente; esta temperatura se sitúa alrededor de 10-13° C en plátano y tomate, mientras que para algunas variedades de naranja y manzana es de 3° C. También existe una temperatura límite por encima de la cual la maduración también se ve alterada. La mayoría de los frutos no maduran o lo hacen mal por encima de 30-35° C.

#### 34.9.2. Composición gaseosa de la atmósfera

Modificaciones de la composición normal de la atmósfera, tales como disminuir la concentración de O<sub>2</sub> y elevar la de CO<sub>2</sub> retrasan la maduración de los frutos. Es-

tas modificaciones de la atmósfera acopladas al uso de temperaturas, justo por encima del límite inferior, constituyen la base del denominado «almacenamiento en atmósfera controlada» de gran utilización en la industria hortofrutícola.

#### 34.9.2.1. Efecto de la tensión de oxígeno

Niveles bajos de  $O_2$  (entre 1-5 %) retrasan el comienzo de la maduración. El efecto del oxígeno puede estar relacionado con una inhibición de la actividad respiratoria, aunque su efecto principal parece residir en una interferencia de la iniciación del proceso que determina el comienzo de la maduración. De todas formas es necesario siempre un nivel mínimo de oxígeno para evitar los procesos fermentativos que dañarían al fruto.

#### 34.9.2.2. Efecto de la tensión de anhídrido carbónico

Concentraciones de  $CO_2$  entre el 3 y 10 por 100 son generalmente efectivas en el retraso de la maduración. Este efecto del  $CO_2$  debe estar relacionado con su conocido efecto como inhibidor competitivo de la acción del etileno (Cap. 25).

En la tabla 34.8 se resumen las diferencias en cuanto a composición gaseosa entre la atmósfera normal y la atmósfera controlada.

TABLA 34.8

Composición gaseosa de la atmósfera normal y la controlada

Gases	Atmósfera normal	Atmósfera controlada
$N_2$	78%	93%
$O_2$	21%	3%
$CO_2$	0,003%	3%
Otros	0,97%	1%

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- COOMBE, B. G.: *The Development of Fleshy Fruits*, «Ann. Rev. Plant Physiol», núm. 27, 1976, páginas 507-528.
- HOBSON, G. E.: *What Factors are Involved in the Onset of Ripening in Climacteric Fruit? Current Advances in Plant Science. Commentaries in Plant Science*, vol. 11, núm. 10, 1979.
- HULME, A. C. (ed.): *The Biochemistry of Fruits and their Products*, 2 vols., Academic Press, Nueva York, 1970.

- MCGLOSSON, W. B.; WADE, N. L., y ADATO, I.: *Phytohormones and Fruit Ripening*, en: *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise*, Letham, D. S.; Goodwin, P. B., y Higgins, T. J. V. (eds), vol. II, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- SPENCER, M.: *Fruit Ripening*, en: *Plant Biochemistry*, Bonner, J., y Varner, J. E. (eds.), Academic Press, Nueva York, 1965.
- THIMANN, K. V.: *Senescence in Plants*, CRC Press, 1980.



# VII

**Las plantas  
en condiciones  
adversas**



## ENVEJECIMIENTO, ABSCISIÓN Y MUERTE DE LAS PLANTAS

La muerte de la planta no es un proceso irrelevante desde el punto de vista evolutivo. Debe ocurrir después de que se ha producido descendencia, y según la forma en que ocurra, puede desarrollarse proporcionando ventajas selectivas a la especie a que pertenece la planta. Así, muchos aspectos del funcionamiento de las plantas previo a la muerte, no se comprenderán en función de las ventajas para la planta, individual, si no en función de las ventajas que proporcionan al conjunto de la especie.

Sabemos que la reproducción, especialmente la sexual, es un mecanismo de multiplicación y diversificación de material hereditario de la especie que así, ante condiciones cambiantes en la biosfera, puede presentar algún o algunos individuos que, por su particular dotación genética, sobrevivan en el nuevo ambiente. Por un problema de espacio, disponibilidad de nutrientes, luz, etc., el número de individuos de una especie no puede crecer indefinidamente, por lo que se impone una renovación continua de ellos, eliminando a los más antiguos para permitir a la descendencia ensayar sus potenciales genéticos. La muerte de las plantas más viejas, es una necesidad de la especie y, por tanto, no puede extrañar que este organizada, presentando una coherencia funcional en lugar de ser un proceso desordenado. La primera regla de esa organización funcional, consistirá en que permita las mejores condiciones para el desarrollo de los nuevos individuos de su misma especie. Una desviación de esta regla, puede conducir en poco tiempo a la desaparición de la especie. No es de extrañar, pues, que la muerte de un individuo vaya asociada a la transferencia de nutrientes desde ese individuo a la descendencia.

En las plantas, que tienen un crecimiento continuo a lo largo de toda su vida, además del envejecimiento y muerte del individuo, se presentan fenómenos de envejecimiento y muerte de las estructuras más viejas de cada individuo, que son sustituidas por las nuevas que se van desarrollando. Como es de esperar, también estos procesos «locales» de envejecimiento se organizan de forma que se produzcan con el máximo de economía para la planta, y por tanto van también asociados a un transvase de nutrientes desde zonas viejas a zonas nuevas.

Es de esperar, por tanto, que la fisiología del envejecimiento y muerte de las plantas o de estructuras de las plantas, se presente de una forma ordenada y susceptible de explicación lógica.

### 35.1. Fases de la vida de las plantas

Todo el desarrollo de las plantas se presenta como un continuo, pero aun así dentro de él se pueden distinguir tres fases fisiológicamente diferenciadas: juventud, madurez y vejez. Revisaremos en este apartado las características distintivas de las tres fases, para centrarnos más intensamente en apartados posteriores en los procesos del envejecimiento.

#### 35.1.1. Juventud

Se caracteriza por una elevada actividad metabólica y un rápido crecimiento. Es frecuente que las estructuras que se diferencian en ella, tengan una forma y tamaño diferente a las de la planta adulta, fenómeno muy corriente en hojas. Esta fase, abarca desde que aparece la plántula con la germinación de la semilla, hasta que comienza el desarrollo reproductivo.

La duración de esta fase es enormemente variable de unas plantas a otras. Hay algunas en las que la fase juvenil sólo dura unas dos semanas. En las plantas bianuales, todo el primer año es abarcado por la fase juvenil. En las plantas perennes puede durar varios años. Hay plantas, como el bambú, que permanecen juveniles un número indefinido de años, 20, 30 o más, y eventualmente maduran y mueren rápidamente. Evidentemente, con tan variables periodos de duración, la fisiología será muy diferente de unas plantas a otras.

En una misma planta pueden estar, en un estado de transición, hojas juveniles y maduras, con sus formas y tamaños diferentes y en una disposición gradual en una misma rama. La variación en la forma y en la disposición de las hojas en la rama durante la transición de hojas jóvenes a hojas maduras, puede ser muy diferente de unas plantas a otras. Incluso se dan casos, como en *Ipomoea caerulea* (Fig. 35.1), en que después de pasar por distintos grados de madurez se da finalmente una reversión a formas foliares juveniles.

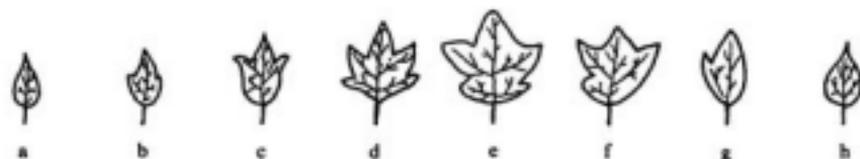


Figura 35.1.—Formas sucesivas de hojas en distintas etapas del crecimiento de *Ipomoea caerulea*.

Las diferencias morfológicas macroscópicas entre estructuras jóvenes y adultas, van en general acompañadas de diferencias en su estructura microscópica. Parece que son factores hormonales los que controlan que, por ejemplo, desde un ápice se diferencien hojas jóvenes u hojas adultas, pero por ahora se conoce muy poco de cómo

operan dichos factores hormonales. En algunas plantas se ha encontrado que la aplicación de giberelinas permite prolongar el periodo juvenil. Igualmente, el posible papel de las giberelinas en el periodo juvenil, parece deducirse de la mayor longitud de los entrenudos en las etapas juveniles. En la mayoría de los casos estudiados, el estado juvenil parece asociado también con altos niveles de auxinas. Los factores ambientales también influyen en la aparición de la transición de estado juvenil a maduro. Así, días largos o días cortos pueden mantener a una planta en estado juvenil durante largos periodos o indefinidamente al no permitir la inducción de la floración. Igualmente, temperaturas moderadamente altas pueden impedir la vernalización requerida por muchas plantas para pasar a la fase madura reproductora.

### **35.1.2. Madurez**

Durante la madurez, tiene lugar una reducción de la velocidad de crecimiento y se desarrollan las flores y otras estructuras reproductivas. Parece que, precisamente, la demanda de nutrientes minerales y orgánicos por estas últimas, es la causa de la menor velocidad de crecimiento vegetativo. En la mayoría de las plantas monocárpicas (es decir, que mueren después de dar una generación de frutos), prácticamente todas las yemas se transforman de vegetativas en reproductoras, impidiendo así el crecimiento vegetativo. En plantas perennes, permanecen bastantes yemas vegetativas y otras estructuras meristemáticas.

De todas formas durante la madurez, al igual que en la juventud, predomina, aunque menos, la velocidad de los procesos anabólicos sobre la de los catabólicos, en especial en lo que se refiere a proteínas y ácidos nucleicos. Una cantidad considerable de reservas, se acumula en estructuras reproductoras, como semillas y frutos en formación.

Parece que una disminución de auxinas en la planta, determina la entrada de ésta en la madurez, aunque otros factores hormonales deben estar también implicados.

La duración de la madurez es también muy variable de unas plantas a otras, guardando en general una relación de proporciones inversa con la duración de la juventud. Así, mientras en plantas monocárpicas (anuales, bianuales o de otro tipo) la madurez suele durar unas pocas semanas, en plantas perennes la madurez ocupa la mayor parte de su vida.

### **35.1.3. Vejez**

Se designa como vejez a aquella etapa, generalmente irreversible, de degeneración estructural y funcional que usualmente conduce a la muerte de la planta o de las estructuras de la planta que la presentan. Muchos de los mecanismos que operan en el envejecimiento, parecen operar ya de alguna forma durante la madurez. Pero, característicamente, durante el envejecimiento la velocidad de los procesos catabólicos predomina sobre la de los anabólicos.

La mayor parte de los procesos y mecanismos que operan durante la juventud y madurez, han sido estudiados en capítulos anteriores. Nos centraremos, pues, en los apartados siguientes, en el estudio de los mecanismos que operan y desencadenan los procesos de envejecimiento. Por ser más estudiados, revisaremos principalmente el

envejecimiento de hojas y planta entera. Pero debe tenerse en cuenta que en la planta existen procesos más específicos de envejecimiento que operan de una forma continua y que son consustanciales con los procesos de desarrollo y diferenciación. Esto último ocurre, por ejemplo, con la diferenciación de los vasos de xilema, los cuales alcanzan su funcionalidad cuando mueren sus células, después de un proceso que, a todas luces, es un fenómeno de envejecimiento a nivel celular.

### **35.2. Tipos de envejecimiento y procesos metabólicos asociados**

Como ya hemos dicho, el envejecimiento puede afectar a todo el organismo o sólo a algunas estructuras de él. Incluso se puede hablar de envejecimiento de una población, por ejemplo, de plantas monocárpicas. Salvo los tejidos meristemáticos, que potencialmente son inmortales, en general todos los tejidos derivados de ellos presentan, antes o después, síntomas de envejecimiento que usualmente les llevan a la muerte. Aunque el envejecimiento afecte a todo el organismo, normalmente no afecta simultáneamente a todas sus estructuras.

Como ya hemos mencionado, todas las plantas monocárpicas sufren los procesos de envejecimiento cuyo comienzo, variable de unas a otras, se sitúa en las proximidades de la fructificación. En las plantas perennes la situación es más compleja, la planta puede permanecer en estado de madurez incluso durante cientos de años, y a veces sólo una acumulación de circunstancias desfavorables puede llevar a su muerte. El estudio de ésta, pertenece usualmente más al dominio de la Patología que al de la Fisiología. Muchas perennes en cambio, al cabo de unos pocos años de entrar en la madurez, inician los procesos de envejecimiento debidos, en general, a dificultades funcionales asociadas con su tamaño. Con mucho, y debido a sus facilidades experimentales, es el envejecimiento de las plantas monocárpicas el más estudiado, junto con el del envejecimiento de estructuras definidas de las plantas. Ambos tipos de envejecimiento presentan una serie de características comunes, así como otras distintivas. Pasaremos revista, primero a una serie de ejemplos de envejecimiento de estructuras concretas de la planta, para analizar después los procesos asociados a ambos tipos de envejecimientos.

Un ejemplo muy estudiado de envejecimiento de estructuras es el de las hojas basales de una gramínea. Estando aún en activo crecimiento, es decir, en juventud, las hojas basales van envejeciendo en tanto van apareciendo otras hojas más apicales. Sin duda, las hojas muy basales reciben poca luz y su producción fotosintética apenas puede compensar, o no compensa, su desgaste respiratorio, resultando más rentable para la planta sacrificar las hojas basales, poco o nada productivas, y aprovechar en lo posible sus componentes para el desarrollo de estructuras más apicales.

El envejecimiento de estas estructuras más basales, no es sino un aspecto de la forma característica de crecimiento de estas plantas, y sólo en matices podemos distinguir este envejecimiento de los tipos de envejecimiento que conducen, por ejemplo, a la formación de vasos del xilema, traqueideas, esclerenquima, etc.

El envejecimiento de hojas que conduce a su caída en plantas de hoja caduca, parece responder a motivaciones diferentes a la anterior. Esta es una situación muy frecuente en Angiospermas perennes de climas fríos o templados. Dicha caída se suele dar

en el otoño, previa a la entrada en el período frío. Se ha razonado en este caso, que dichas plantas apenas si pueden realizar fotosíntesis con las bajas temperaturas de invierno. Entonces, parece que resulta más rentable a la planta formar hojas nuevas pasado el período frío, que permanecer todo el invierno con las hojas de la estación anterior que, además de no proporcionar productos fotosintéticos a la planta, van a determinar un mayor enfriamiento de la planta, debido a su gran superficie de transpiración. Por supuesto, antes de la caída de la hoja la mayor parte de sus componentes aprovechables van a pasar a la planta en forma de eslabones de bajo peso molecular.

Quizá unas motivaciones parecidas a las anteriores, determinan que muchas herbáceas perennes (como la alfalfa) pierdan cada año casi todas sus estructuras aéreas, mientras que la raíz y la base del tallo permanecen viables mucho tiempo y pueden regenerar la planta entera en condiciones apropiadas.

Bajo todos los aspectos, la maduración de frutos es un fenómeno de envejecimiento, pero sus importantes características diferenciales nos han llevado a incluirlo en el capítulo 34. Por su interés económico es, sin duda, el proceso de envejecimiento más estudiado.

Aunque se trata sólo de una aproximación, podemos decir que los procesos de envejecimiento de estructuras concretas de la planta son semejantes a los que sufre la planta entera en el envejecimiento. La analogía la podemos concretar aún más, si partimos de que las estructuras reproductivas juegan, en el envejecimiento de la planta entera, un papel semejante al de las zonas jóvenes de la planta, en el envejecimiento de las estructuras adultas de la misma. Esta aproximación nos permitirá estudiar conjuntamente ambos tipos de envejecimiento, y sólo hacer referencia a cada tipo para situaciones particulares.

De una forma general, podemos decir que durante el envejecimiento, tiene lugar en las hojas una disminución de clorofila, una disminución de la velocidad de fotosíntesis, una disminución de almidón, una disminución de proteínas, y una disminución del contenido de RNA. Este último presenta una subida temporal al final del envejecimiento, y luego bruscamente vuelve a disminuir. Paralelamente a estos cambios, tiene lugar un aumento de la respiración (que al final se hace brusco para presentar después una también brusca disminución) con bajo cociente respiratorio (0,7 a 0,8), un aumento de amoníacos libres y en general de otras formas nitrogenadas solubles y un aumento de carbohidratos solubles. Todos estos aumentos, presentan una disminución final, que precede inmediatamente a la muerte de la hoja. Habida cuenta de la ausencia de clorofila y, por tanto, fotosíntesis, los cambios son semejantes en estructuras no fotosintéticas.

Precediendo a estos cambios, tiene lugar un aumento de los niveles de enzimas degradativas, como glicosidasas, proteasas, ribonucleasas y clorofilasa. Estos enzimas son, pues, responsables de la degradación de material de alto peso molecular y su transformación en sustancias de bajo peso molecular, fácilmente transportables a través de las estructuras de la planta, hasta las zonas jóvenes o hasta las estructuras reproductivas. Paralelamente, tienen lugar cambios en los niveles de los enzimas del metabolismo intermediario, para realizar las transformaciones de los metabolitos hasta sus formas usuales de transporte. Estos cambios metabólicos afectan principalmente al metabolismo nitrogenado. Junto a la exportación de sustancias orgánicas, tiene lugar una exportación de nutrientes inorgánicos, como fosfato, catión potasio, catión magnesio, etc.,

desde las estructuras en envejecimiento a otras zonas de la planta. Las hojas, que en la madurez son sólo fuente de azúcares y aminoácidos, se convierten en la vejez en fuente de muchos de los componentes que almacenaban. Al mismo tiempo que exporta muchos elementos útiles a otras partes de la planta, la hoja en envejecimiento parece transformarse en sumidero de elementos tóxicos. Así se ha encontrado que durante el envejecimiento, las hojas de muchas especies acumulan grandes cantidades de metales pesados como Pb, Zn, Cd, Co, Cu, Ni, Fe, Mn, Cr... o simplemente de elementos que se encuentran muchas veces en gran exceso en el suelo como Ca, Al, Na... Se ha sugerido que esta acumulación en hojas viejas, además de proporcionar un mecanismo de desintoxicación de las zonas jóvenes de la planta, contribuye, al caer la hoja muerta al suelo, a impedir el crecimiento de otras especies vegetales competidoras en las proximidades.

Con la pérdida de clorofila de las hojas, se desenmascaran los colores amarillo y naranja de los carotenoides. Al mismo tiempo, se activa la síntesis de flavonoides que lleva a una acumulación de antocianos, principalmente del tipo cianidina, lo que en conjunto confiere a las hojas viejas colores característicos, que van desde el amarillo al naranja, según el tipo final de pigmento que predomina.

Durante el envejecimiento, se activan procesos oxidativos que llevan a una modificación de los lípidos e inactivación de proteínas. En muchos casos relacionados con ellos, se da un aumento de los niveles de radical superóxido,  $O_2^-$ , y una disminución de superóxido dismutasa (apartado 12.7).

Paralelamente a los cambios químicos, tienen lugar una serie de cambios de las propiedades físicas de las estructuras en envejecimiento. Así, tiene lugar un aumento de permeabilidad de membranas (por supuesto asociado con un cambio de su composición lipídica), que facilita la salida de nutrientes. Ocurre también una disminución hasta casi anulación de la transpiración, probablemente mediada por un aumento previo de ácido abscísico que cierra los estomas.

El proceso de envejecimiento, aunque en general inherente a la propia ontogenia de la planta, se ve afectado de una forma compleja y variable por distintos factores ambientales. Incluso éstos pueden inducir la aparición de los síntomas de envejecimiento. Así, los procesos de envejecimiento son estimulados por situaciones de déficit de nutrientes (especialmente de nitrógeno) y climas secos. Los efectos de la temperatura pueden ser variables, pudiendo afirmar que, en general, temperaturas extremas favorecen la aparición de síntomas de envejecimiento. Posteriormente las temperaturas moderadamente elevadas lo aceleran.

### **35.3. Ideas acerca de las causas del envejecimiento**

Las primeras ideas sobre cómo operan las condiciones que desencadenan los procesos de envejecimiento (Molish, 1928), sugerían que para el envejecimiento monocárpico existía una competencia por la captación de nutrientes entre estructuras reproductoras y estructuras vegetativas. Competencia que decantada a favor de las estructuras reproductoras, determinaba una degeneración y muerte de las estructuras vegetativas. Para el envejecimiento de sólo algunas estructuras de la planta, parecía lógico imaginar una competencia semejante entre zonas jóvenes o de reserva de nutrientes y zonas adultas.

Un gran número de resultados experimentales, en que se suprimían las estructuras reproductoras y como resultado se retrasaba indefinidamente el envejecimiento de la planta monocárpica, apoyaban esta interpretación.

Sin embargo, esta idea de la competencia por la captación de nutrientes, presentaba ciertos inconvenientes. Por ejemplo, en soja se encuentran ya síntomas de envejecimiento en hojas, cuando las flores son aún muy jóvenes y no es de esperar que presenten una gran demanda de nutrientes. Otras veces, los síntomas de envejecimiento aparecen cuando ocurre la maduración de los frutos, proceso que no requiere apenas aporte de nutrientes del resto de la planta. Otro hecho significativo es que la formación de flores masculinas en espinacas, induce envejecimiento tan eficazmente como la formación de flores femeninas y frutos en la planta, cuando la demanda de nutrientes en uno y otro caso es muy diferente. Por otra parte, la contribución de la propia fotosíntesis de las estructuras reproductivas en tanto contienen células clorofílicas, no se puede despreciar a la hora de establecer la demanda de materia orgánica por ellas. Esta contribución puede en muchos casos rebasar el 50 por 100 de la demanda. Además, y aunque parece paradójico, paralelamente a la aparición de la floración en trigo, tiene lugar una disminución de la velocidad de la fotosíntesis, tanto en hojas jóvenes como en hojas adultas que las lleva finalmente a envejecer. Estos resultados, apuntan a que lo que ocurre, es más bien que las estructuras reproductoras producen algo que induce al envejecimiento de estructuras vegetativas. En el envejecimiento de estructuras adultas, solamente cabe suponer que son las estructuras jóvenes las que producen estas sustancias inductoras del envejecimiento. Así, se ha visto que si se extirpan yemas de plántulas de dicotiledóneas, se impide el envejecimiento y caída de los cotiledones.

Cualquiera que sea el mecanismo que lo origina en la planta, el envejecimiento determina un aumento de los procesos de degradación relativos a los de síntesis. Así, una aproximación experimental al problema, consistiría en estudiar qué factores pueden controlar la proporción relativa de síntesis y degradación en estructuras de la planta y, en particular, si entre esos factores se encuentran sustancias hormonales. La evidencia experimental apuntada sugiere que, efectivamente, las estructuras jóvenes y las reproductivas, producen sustancias que determinan el envejecimiento en otras estructuras de la planta. El problema consiste en identificar esas sustancias y su posible interacción con otras producidas en la propia estructura en envejecimiento, o en cualquier otra estructura de la planta. Por otra parte, una comprensión del problema, requiere conocer también la posible contribución de la competencia por los nutrientes, entre las distintas estructuras, en el desarrollo de los síntomas de envejecimiento.

#### **35.4. Estudio experimental de los mecanismos que operan en el envejecimiento**

Normalmente, cuando una hoja es separada de la planta, al cabo de poco tiempo muestra los síntomas típicos del envejecimiento y muere. Se había observado que cuando esas hojas tienen capacidad de formar raíces, como ocurre con hojas de especies de *Kalanchoe*, o cuando son inducidas para formar raíces, éstas impiden que se desarrollen los síntomas del envejecimiento, y eventualmente los revierten. Parece, pues, que las raíces producen algo que inhibe el desarrollo de los síntomas del envejecimiento.

El estudio del fenómeno del envejecimiento, se centró entonces, mayoritariamente, en hojas separadas de la planta, e incluso en cortes de hojas. Éstas presentan una serie de síntomas, pérdida de clorofila, proteínas, etc., bajo todos los aspectos semejantes a los que presentan las hojas que envejecen en la planta. Más importante todavía, esos síntomas responden a los tratamientos hormonales de una forma cualitativamente igual a como lo hacen las hojas que envejecen intactas en la planta. Evidentemente, la situación funcional de una hoja separada de la planta, es muy diferente de la que tiene una hoja que permanece unida, pero experimentalmente es mucho más fácil controlar las sustancias que recibe una hoja cortada y, por ejemplo, mantenida en flotación en agua, que la gran cantidad de variables físicas y químicas que pueden afectar al envejecimiento de la hoja intacta en la planta.

Aunque los resultados deben interpretarse con precaución, los estudios sobre los efectos de distintas sustancias, sobre los síntomas del envejecimiento de hojas cortadas, son, hoy día, la fuente principal de conocimiento de los mecanismos que operan en el envejecimiento.

En 1957, Richmond y Lang encontraron que la citoquinina: quinentina, retrasa los síntomas de envejecimiento de hojas de *Xanthium pennsylvanicum*. Resultados semejantes, se han encontrado con muchas otras plantas (Fig. 35.2) y para muchos de los síntomas típicos del envejecimiento. Existen evidencias de que una disminución del transporte de citoquininas desde la raíz al tallo, determina el envejecimiento de éste. En otras plantas se ha encontrado que las giberelinas son más eficaces retrasando los síntomas de enve-

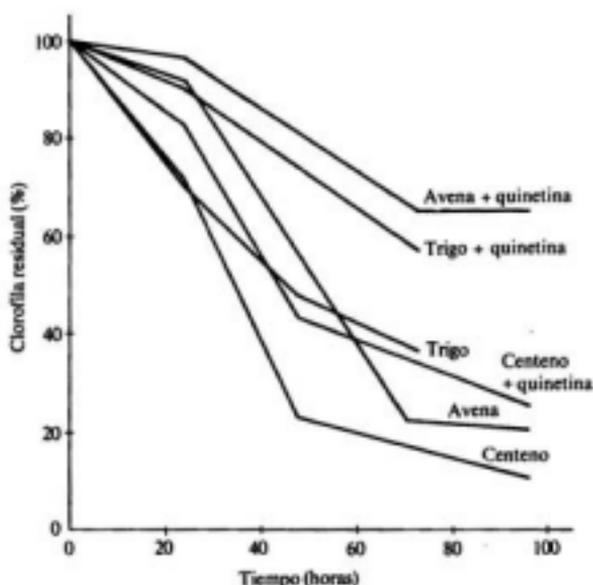


Figura 35.2.—Efecto de la quinentina sobre la retención de clorofilas por cortes de hojas de algunas plantas (resultados no publicados, de B. Sabater).

jecimiento. Más raramente, en algunas otras plantas se ha encontrado retraso del envejecimiento por auxinas. Por el contrario, el ácido abscísico acelera, en la mayoría de los casos, el curso del envejecimiento e incluso lo provoca. Es muy probable que citoquininas y giberelinas, las dos principales hormonas conocidas como retardantes del envejecimiento, tengan efectos diferentes sobre los distintos síntomas de envejecimiento, es decir, que aunque éste fuera desencadenado por un acontecimiento único, su curso para cada síntoma concreto depende de diversos factores hormonales. Parece tentador con estos datos, suponer que uno de los primeros acontecimientos que inician los procesos del envejecimiento consiste en una disminución relativa de citoquininas y giberelinas y/o un aumento de ácido abscísico. Este desequilibrio hace que para una gran variedad de procesos diferentes, se favorezca la degradación sobre la síntesis. Cada uno de estos procesos puede tener distinta especificidad hormonal, e incluso de interacción hormonal, según las posibilidades de combinación de efectos de citoquininas, giberelinas y ácido abscísico. Es significativo que el etileno favorezca la maduración de los frutos (Cap. 25), proceso que hemos asimilado al del envejecimiento. El etileno parece ser el factor más importante que favorece el envejecimiento de estructuras florales, como pétalos, proceso de gran importancia comercial.

Con los resultados disponibles actualmente, parece que el desequilibrio entre síntesis y degradación, que se produce en el envejecimiento a favor de la última, es debido más a un aumento de los procesos degradativos que a una disminución de los biosintéticos. Así, en general, en las primeras etapas del envejecimiento se produce un aumento de proteasas, nucleasas y clorofilasa, que presumiblemente son utilizadas para los procesos degradativos de sus respectivos sustratos. Este aumento es inhibido por citoquininas y giberelinas, y favorecido por ácido abscísico. Además, el aumento requiere síntesis de proteínas en citoplasma y/o cloroplastos, de manera que los síntomas del envejecimiento son también retrasados por aplicación de cloranfenicol (inhibidor de síntesis de proteínas en cloroplastos) y/o por cicloheximida (inhibidor de síntesis de proteínas en citoplasma). Parece, pues, que el balance de citoquininas y/o giberelinas con ácido abscísico es determinante de la expresión de genes específicos que codifican enzimas degradativos requeridos para el envejecimiento.

Por ahora, no sabemos si estas acciones hormonales ocurren directamente sobre el genoma o están mediadas por otros efectos hormonales más primarios. Desde luego, existen otros procesos del envejecimiento que, probablemente, no requieren que la acción hormonal se ejerza a nivel genético. Así, parece ocurrir con los cambios de propiedades de las membranas que las hacen más permeables. Se ha sugerido también, que muchos efectos hormonales provocadores del envejecimiento de hojas están mediados por una disminución de la transpiración (recuérdese el efecto del ácido abscísico sobre ésta en el capítulo 5). Igualmente, la iluminación que retrasa envejecimiento en hojas provoca apertura estomática y, en consecuencia, aumento de la transpiración. Prácticamente todas las manifestaciones típicas del envejecimiento se afectan por los tratamientos hormonales, pero todavía sabemos muy poco de qué relaciones causales encadenan entre sí las diferentes manifestaciones del envejecimiento. Desde luego un hecho muy significativo es que tanto el envejecimiento como su prevención por hormonas o por iluminación requiere síntesis de proteínas. Así, ambos son afectados por tratamiento con cloranfenicol (Fig. 35.3) y cicloheximida. Parece, pues, lógico pensar

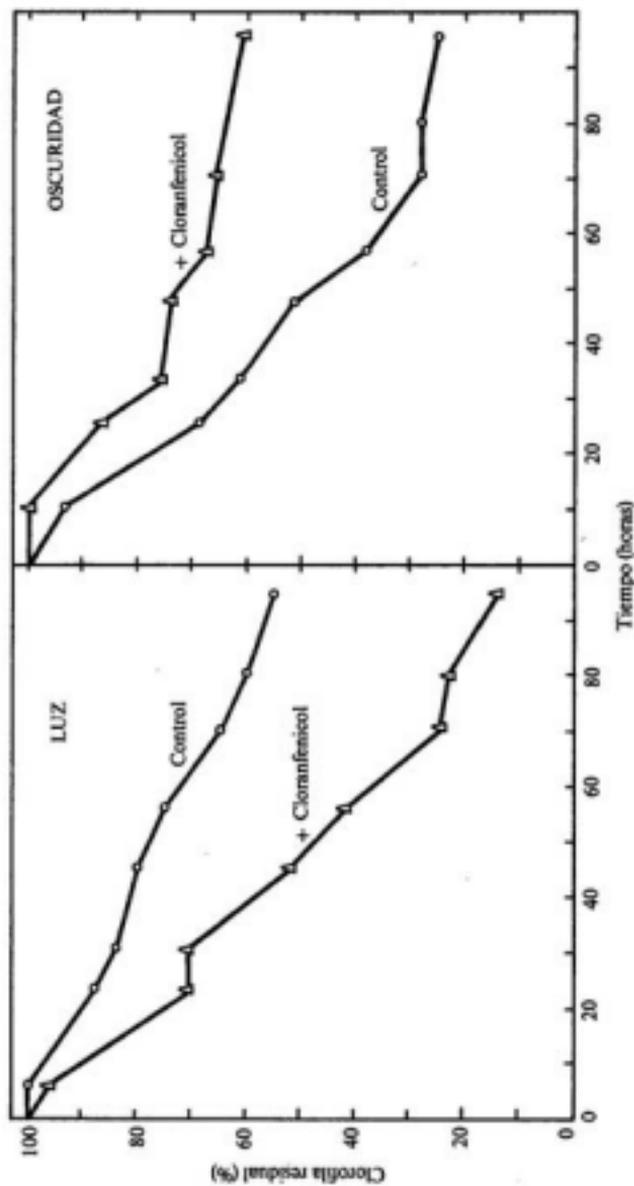


Figura 35.3.—Efecto del cloranfenicol sobre el curso del envejecimiento en la oscuridad y sobre la protección al envejecimiento por luz. El envejecimiento se mide por la pérdida de clorofila (datos tomados de Cuello y Sabater, *Plant and Cell Physiol.* vol. 23, 561-565, 1982).

que según sean las proteínas sintetizadas, una estructura determinada entrará o no en envejecimiento. Una cuestión distinta es si la síntesis de determinadas proteínas es el primer acontecimiento que dispara la manifestación de los síntomas del envejecimiento.

Más complejo, pero también relacionado con el envejecimiento, parece ser el conocido efecto de las citoquininas, de convertir las estructuras donde se encuentran a alta concentración, en sumidero de sustancias (Cap. 24). En relación con el envejecimiento, este efecto significará que la probable disminución de citoquininas en una hoja que va a envejecer, determina que ésta no sea un sumidero, es decir, que hacia ella no se dirija material para biosíntesis, sino hacia otras zonas jóvenes más ricas en citoquininas que, además, actuarán atrayendo los productos de degradación procedentes de zonas en envejecimiento. Hoy por hoy, no podemos establecer si los efectos de citoquininas, favoreciendo los procesos biosintéticos sobre los degradativos y favoreciendo la formación de sumideros de sustancias en la planta, están relacionados. Una posibilidad de relación es que al inhibir los procesos degradativos y favorecer los biosintéticos las citoquininas bajan en esa zona la concentración de componentes de bajo peso molecular, y con ello crean un gradiente favorable a la transformación de esa zona en sumidero, hacia donde se dirigen sustancias de bajo peso molecular.

En resumen, y aunque quedan importantes lagunas en la comprensión de este nivel del envejecimiento, parece claro que en sus primeras etapas, éste está mediado por una disminución de citoquininas y giberelinas y un aumento de ácido abscísico. Estos cambios hormonales favorecen la degradación del material celular y su exportación a otras zonas de la planta. Queda por aclarar con más precisión:

1. Cómo estos cambios hormonales favorecen los procesos degradativos y la exportación de productos.
2. Cómo se ordenan temporalmente esos procesos degradativos, de forma que no se produzca un colapso del funcionamiento celular, es decir, que continúe funcionando la maquinaria de biosíntesis de proteínas para algunas proteínas específicas, a pesar de la disminución de proteínas totales; qué estructuras concretas se degradan primero, etc.
3. Quién determina la producción del desequilibrio hormonal propio del envejecimiento.

Los dos primeros problemas, parecen que se pueden abordar con la técnica de estudiar envejecimiento de estructuras separadas de la planta. El tercer problema, parece más complejo y remite a los primeros trabajos que indicaban la participación de sustancias aceleradoras del envejecimiento, producidas en estructuras jóvenes o reproductoras y que ejercían su efecto en zonas adultas o vegetativas en general.

Es difícil imaginar que el ácido abscísico, sustancia conocida que acelera el envejecimiento, se produzca en zonas jóvenes o reproductoras de la planta. Por el contrario, es bien conocido que se produce en zonas viejas, mientras que las jóvenes producen más citoquininas y giberelinas. Sin descartar que por la propia ontogenia de una estructura ésta, llegado cierto grado de desarrollo, produce más abscísico y menos citoquininas y giberelinas, e incluso auxinas, y en consecuencia entra en envejecimiento, toda la

evidencia experimental apunta a una modulación de esa ontogenia, en esta etapa, por otras zonas jóvenes o reproductoras de la planta. La conclusión inevitable es la de la existencia de una desconocida hormona del envejecimiento o de una serie de factores que lo favorecen, que se forman en zonas jóvenes y que por razones aún desconocidas, sólo se muestran efectivos en zonas adultas. En éstas, determinan un aumento de abscisico y una disminución de gibberelinas y citoquininas (por efectos sobre sus síntesis, degradaciones y/o transporte desde otras zonas), que llevan de una forma ya mejor conocida a los procesos de envejecimiento.

### 35.5. **Abscisión**

El envejecimiento y cese de las actividades celulares en la hoja y la maduración de los frutos, culmina con la caída o abscisión de hojas y frutos, respectivamente. La caída de frutos, tiene el interés evidente de contribuir a la diseminación de las semillas. Ambos, caída de hojas y frutos, son también de interés, entre otras cosas, para evitar la existencia de zonas que pueden constituir focos de infección. En consecuencia, veremos cómo la abscisión no es un proceso pasivo, sino está estructural y funcionalmente programado para que se produzca en el momento oportuno y en el lugar adecuado. Otras estructuras, como flores sin fecundar, también presentan el fenómeno de la abscisión.

La abscisión de hojas, flores y frutos ocurre a través de la llamada capa o zona de abscisión. Esta zona consiste en un cilindro, de mayor base que altura, formado por células modificadas en la base del peciolo, de la estructura considerada, casi en la unión del peciolo al tallo. En hojas compuestas, cada foliolo forma además su propia zona de abscisión. La zona de abscisión consta, en general, de varias capas de células parenquimáticas, de pared delgada y longitud pequeña en la dirección del eje del peciolo. Estas células ocupan todo el cilindro de abscisión, excepto en el sistema vascular (Fig. 35.4) y resultan de divisiones anticlinales sobre la sección del peciolo. La zona de abscisión puede formarse incluso antes de que la hoja esté madura, pero en este caso el proceso se detiene en la etapa descrita, hasta que la muerte de la hoja o de la flor o la maduración del fruto, la completan, como veremos a continuación.

La duración de la vida de la flor puede ser muy variable, desde sólo unas 3 ó 4 horas hasta 3 ó 4 meses. Las hojas alcanzan una mayor longevidad, algunas tanto como la planta. Las acículas de las Gimnospermas, pueden alcanzar de 8 a 10 años de vida. Los frutos en general, se pierden dentro de la misma estación en que se forman.

Justo antes de que se inicie la abscisión, la lámina intermedia de la pared (perpendicular al eje del peciolo) que separa dos capas de células contiguas en la zona de abscisión más alejada del tallo, es digerida por celulasas y pectinasas vertidas por las células contiguas en esta zona de la pared. Simultáneamente, se produce un aumento de la actividad metabólica (síntesis de proteínas, respiración, etc.) en las células de la zona de abscisión más próximas al tallo. Algunas capas de estas células aumentan de tamaño, forzando la rotura del sistema vascular y la caída de la hoja, fruto, etc., caída que, además, en esta etapa se ve ayudada por el viento, golpes, etc. Inmediatamente antes de la caída o poco después, se acumulan sustancias gomosas en los conductores vasculares,

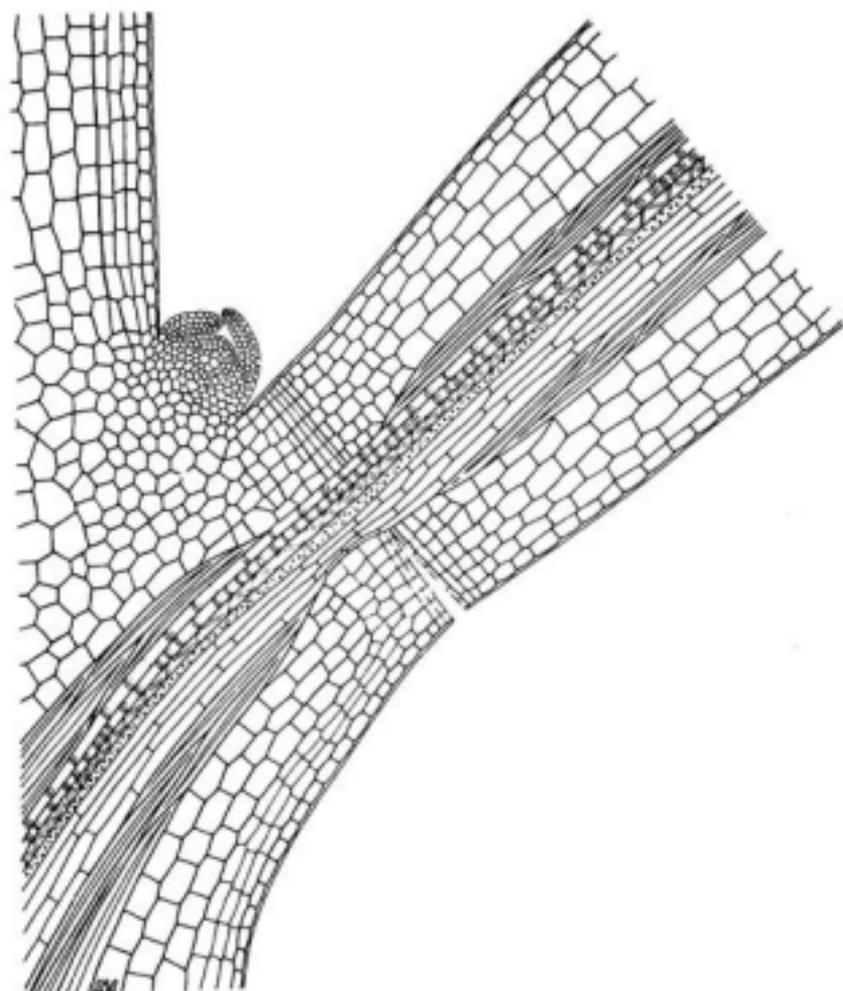


Figura 35.4.—Dibujo de la zona de abscisión (tomado de R. G. Bidwell, *Plant Physiology*, MacMillan, Nueva York, 1974).

que quedan obstruidos, formándose capas corticales de células de corcho con abundantes depósitos de lignina y suberina, que actúan como una barrera ante la invasión microbiana y la pérdida excesiva de agua.

Diversos factores ambientales favorecen el desarrollo de la abscisión, en general, a través de su efecto sobre el envejecimiento de la estructura que soporta ese peciolo. La abscisión sólo ocurre en órganos fisiológicamente inactivos. Por ejemplo, si se quita el limbo de la hoja, al poco tiempo tiene lugar la abscisión del peciolo que lo soportaba.

Precisamente, el sistema de peciolo de hojas a las que se ha desprovisto del limbo, se utiliza frecuentemente en el estudio de los mecanismos de abscisión.

Evidentemente, la abscisión debe ser un proceso sometido a diversos mecanismos de control, que regulen las complicadas funciones celulares implicadas en ella.

Ya se explicó (Cap. 26), que buena parte de los trabajos sobre el descubrimiento del ácido abscísico, se realizaron siguiendo su efecto estimulante sobre la abscisión. Paradójicamente, el papel del ácido abscísico en la abscisión, es hoy día muy discutido. Como veremos, los efectos hormonales encontrados sobre la abscisión son muy complejos y la comprensión de su ordenación es aún difícil.

El contenido de proteínas y RNA de la zona de abscisión, aumenta durante la abscisión, y así ésta puede ser inhibida por inhibidores de la síntesis de proteínas y RNA. Parece, por otra parte, que los nutrientes requeridos en la zona de abscisión para estos procesos biosintéticos proceden, en su mayor parte, de la propia estructura que está envejeciendo y que soporta el peciolo.

El estudio experimental de los efectos hormonales sobre la abscisión es extenso y sus resultados a veces difíciles de interpretar. Así, por ejemplo, auxinas aplicadas a concentraciones moderadas en la región próxima al tallo, provocan abscisión. En cambio, si se aplican al otro lado de la zona de abscisión, en la región alejada del tallo, retrasan la abscisión. Se ha querido interpretar estos resultados, como un efecto de la dirección del gradiente de auxinas sobre la abscisión, o lo que parece más probable, como una respuesta diferente a las auxinas, en las células próximas y en las alejadas del tallo, de la zona de abscisión. Giberelinas, citoquininas y abscísico, también afectan a la abscisión. La interpretación de los resultados es a veces complicada, porque es difícil separar un efecto directo de la hormona en la zona de abscisión, de otro mediado por su acción en el envejecimiento de la hoja.

Las ideas más aceptadas actualmente sobre el control hormonal de la abscisión, sugieren que en tanto la hoja es joven, la auxina que ésta sintetiza y las citoquininas y giberelinas que le llegan de la raíz o sintetiza la propia hoja, impiden la abscisión. Cuando la hoja envejece, disminuye el aporte de estas tres hormonas, y, además, parece que una sustancia de naturaleza desconocida pasa desde el limbo de la hoja a la zona de abscisión, donde estimula la síntesis de etileno. Éste, estimula la formación de enzimas degradativos de la pared y el crecimiento de las células de la zona de abscisión próximas al tallo, acontecimientos que provocan la abscisión. El papel del ácido abscísico es incierto y puede estar relacionado con su acción general estimulante del envejecimiento.

---

#### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- BEEVERS, L.: *Senescence*, en: *Plant Biochemistry*, 3.<sup>a</sup> ed. (ed. por Bonner, J., y Varner, J. E.), Academic Press, Nueva York, 1976, págs. 771-794.
- HALL, R. H.: *Cytokinins as a Probe of Developmental Processes*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 24, 1973, págs. 419-444.

- NOODEN, L. D., y LEOPOLD, A. C.: *Phytohormones and the Endogenous Regulation of Senescence and Abscission*, en Letham, D. S. et. al. (eds.): *Phytohormones and Related Compounds: a Treatise*, vol. II, Elsevier, North Holland, Amsterdam, 1978, págs. 329-369.
- SABATER, B.: *Hormonal Regulation of Senescence*, en S. S. Parohit (ed.): *Hormonal Regulation of Plant Growth and Development*, *Advanced in Agricultural Biotechnology*, vol. 16, M. Nijhoff-Junk, Amsterdam, 1985, págs. 169-218.
- SACHER, J. A.: *Senescence and Postharvest Physiology*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 24, 1973, págs. 197-224.
- THIMANN, K. V. (ed.): *Senescence in Plants*, CRC Press, Florida, 1980.
- THOMAS, H., y STODDART, J. L.: *Leaf Senescence*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 31, 1980, págs. 83-111.

## FISIOLOGÍA DE LAS PLANTAS EN CONDICIONES DESFAVORABLES

Las plantas se encuentran sometidas en la biósfera a muy diferentes condiciones desfavorables, a las que sobreviven en tanto se le permita la flexibilidad adaptativa de su genoma. En un sentido amplio, unas determinadas condiciones ambientales son desfavorables en cuanto se apartan de las condiciones óptimas de crecimiento y multiplicación de la planta. En un sentido restrictivo y práctico, nosotros a lo largo del texto hemos ido estudiando la influencia que tiene sobre las funciones de las plantas, la variación de los parámetros ambientales dentro de unos márgenes habituales a las plantas en cuestión. En este capítulo, estudiamos la influencia de las condiciones ambientales en las plantas, cuando la variación de los parámetros sobrepasa los límites habituales de la planta. Estos límites habituales de los parámetros, no se pueden establecer, en general, con precisión pero existe un criterio práctico para establecer dónde empieza una condición desfavorable a un valor poco usual de un parámetro. Según este criterio, el valor del parámetro es poco usual cuando provoca una respuesta cualitativamente diferente a la que provocan las variaciones de las condiciones dentro de los márgenes normales en los cuales la planta crece y se desarrolla más rápidamente.

Si una planta no se ve sometida habitualmente a unas condiciones, es porque no vive normalmente en ellas, es decir, porque en esas condiciones no es competitiva con otras plantas, o simplemente porque es usualmente eliminada por otros factores de ese ambiente. Transitoriamente, una planta puede soportar unas condiciones adversas, hasta la vuelta de las condiciones habituales a ella. Precisamente, el objeto de este capítulo, es el de conocer qué mecanismos desarrolla la planta para soportar estas condiciones transitoriamente adversas y estudiar cómo esas condiciones provocan alteraciones funcionales e incluso la muerte de la planta.

Es frecuente que en unas condiciones consideradas adversas para la generalidad de las plantas, ciertas plantas que han desarrollado más intensa y permanentemente los mecanismos para soportar esas condiciones, vivan de una forma habitual en esos ambientes extremos. En general, los mecanismos que desarrollan transitoriamente las plantas ante condiciones adversas, son semejantes a los que muestran, permanentemente, las plantas habituales en esas condiciones. Por este motivo, a lo largo de este capítulo cuando hablamos de Fisiología en condiciones desfavorables, muchas veces nos referimos a los mecanismos presentes en las plantas, habituales en esas condiciones desfavorables.

De una forma global, ante condiciones adversas, las plantas pueden desarrollar dos

tipos de mecanismos de respuesta. En un tipo de mecanismo, la planta desarrolla funciones y estructuras que contrarrestan (o protegen de) las condiciones adversas y de forma que éstas no lleguen, o lleguen atenuadamente, a la mayoría de las células. En el otro tipo de mecanismo, son más las células las que adaptan sus funciones para que puedan operar en esas condiciones adversas, es decir, resisten esas condiciones adversas. Con frecuencia en las plantas se dan simultáneamente los dos tipos de mecanismos de adaptación: *contrarrestar y resistir*.

A continuación, vamos a revisar los tipos de condiciones adversas o extremas a que más frecuentemente se ven sometidas las plantas, así como los mecanismos que ante ellas desarrollan las plantas.

### 36.1. Sequedad

La sequedad es, sin duda, la condición ambiental transitoria y extrema a que más frecuentemente se ven sometidas las plantas. Así, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de defensa contra la desecación. Los límites entonces, entre condiciones habituales y no habituales de sequedad en plantas, son difíciles de trazar, y ya vimos al hablar de la transpiración (Cap. 5), cómo las plantas desarrollaban diversos mecanismos para reducirla en condiciones de sequedad extrema.

No vamos a repetir aquí dichos mecanismos de reducción de la transpiración (reducción del número de estomas, reducción de la superficie de las hojas, estomas hundidos, gruesa cutícula, etc.) en condiciones de sequedad extrema, y que operan cuando los mecanismos habituales de control de apertura y cierre de los estomas son insuficientes ante el pequeño aporte de agua a la planta. Adaptaciones tan difundidas contra la sequedad, como son los mecanismos fotosintéticos de plantas C-4 y CAM, también han sido tratadas bajo otros aspectos en el capítulo 15 y, por tanto, tampoco las repetiremos aquí. Se tratan, todos los mecanismos ya estudiados, de reacciones de proteger o contrarrestar el ambiente adverso, pero como veremos, existen muchas otras formas de contrarrestar o de resistir las condiciones adversas.

En general, las condiciones de sequedad provocan, además de un deficiente aporte de agua a la planta, unas situaciones favorables a la intensa transpiración, por lo que los mecanismos habituales de control de ésta son insuficientes y a veces incluso hasta inadecuados. Las reacciones de protección contra esta situación son variadas, pudiendo implicar modificaciones que favorecen la absorción y/o modificaciones que dificultan la transpiración.

De acuerdo con los requerimientos hídricos y, por tanto, con los ambientes que habitualmente ocupan, las plantas se clasifican en:

- a) Hidrofitas que crecen en ambientes de agua superabundante.
- b) Mesofitas, que lo hacen donde el agua es moderadamente abundante.
- c) Xerófitas, que lo hacen donde el agua es escasa.

Muchos de los rasgos estructurales y funcionales que adoptan Hidrofitas y Mesofitas en ambientes secos, son los habitualmente característicos de Xerófitas.

Una forma de adaptación a la sequía temporal es la de las plantas anuales, las cuales sobreviven a los periodos secos en forma de semillas. Muchas plantas del desierto reducen a unos pocos días de lluvia todo su ciclo de vida. Se trata también de un caso de adaptación a sequedad extrema por protección o evitación de la condición desfavorable. En estos casos, en periodo seco sobrevive la semilla, mucho más resistente que las estructuras vegetativas a la desecación.

Muchas plantas perennes de climas secos evitan la sequedad por el desarrollo de un profundo sistema radicular, que les permite captar agua de zonas del suelo más ricas en ella. En una modificación parecida, muchos cactus presentan un extenso sistema radicular que les permite captar rápidamente el agua caída en una tormenta esporádica.

Otras plantas perennes presentan un mecanismo de adaptación por resistencia, que consiste en que su protoplasma presenta alta concentración de solutos y, por tanto, valores extremadamente bajos de potencial hídrico, con lo cual apenas si pueden perder agua. La célula asume así, y soporta, la condición de sequedad. Las plantas que presentan este mecanismo se conocen como xerófitas verdaderas. Se conocen entre éstas, casos en que el agua representa sólo entre un 30 y un 40 por 100 de la masa total, cuando en la mayoría de las plantas los valores normales son de entre un 80 y un 90 por 100, y son letales valores de un 60 e incluso un 70 por 100. Se sabe muy poco de la causa de la resistencia de las células de las xerófitas verdaderas a tan bajos valores del potencial hídrico. Sus proteínas enzimáticas deben ser solubles y funcionales a tan altas concentraciones de solutos, y algún soluto debe conferir fluidez al protoplasma a pesar de tan baja proporción de agua. Entre los solutos cuyo aumento de concentración es más acusado, se encuentra frecuentemente el aminoácido prolina.

Muchas algas, musgos y líquenes pueden soportar también condiciones de muy baja cantidad de agua, pero con un metabolismo muy lento cuya velocidad aumenta cuando, esporádicamente, pueden tomar grandes cantidades de agua.

Los mecanismos de adaptación a ambientes secos, son tan diversos que no se puede dar aquí una visión detallada de cada uno de ellos. Con mucha frecuencia se encuentran casos nuevos de adaptación con un mecanismo específico de economía hídrica. Sin duda uno de los mecanismos más originales es el del aprovechamiento de las gotas de rocío que, en determinados ambientes y épocas del año, se depositan por la noche en las hojas. Esta situación es muy frecuente en los bosques de *Prosopis tamarugo* en la Pampa del Tamarugal al norte de Chile. En ellos el agua pasa a la atmósfera durante el día por transpiración y muchas veces en que por la noche se forma rocío, el agua de éste es reabsorbida por las hojas. Por un mecanismo que aún está por estudiar, el agua absorbida por las hojas es expulsada al suelo por las raíces, permitiendo disponer de ella para el día siguiente. Una situación frecuente en plantas de ambientes secos, consiste en la producción de agentes aleloquímicos (36.7) que inhiben el crecimiento de otras especies en las proximidades, especies que de otra forma competirían por la captación de la poca cantidad de agua disponible.

Los efectos de la desecación sobre el funcionamiento de las plantas son complejos, variables de unas plantas a otras y dependientes del grado de desecación. A veces, muchos efectos son indirectos, como el caso, por ejemplo, de que si una planta transpira poco, aumentará su temperatura y este aumento provocará una serie de trastornos fun-

cionales, que pueden llegar a provocar la muerte de la planta. Es significativo que un aspecto de la capacidad de las plantas para soportar los ambientes secos, resida en su capacidad también de soportar elevadas temperaturas, aspecto que consideraremos posteriormente.

Una disminución del agua ambiental, si es prolongada, provoca tarde o temprano, una disminución del potencial hídrico en las células y esta disminución afecta, con intensidad variable de unas plantas a otras, a su funcionamiento. Hsiao ha señalado una serie de procesos fundamentales, que pueden ser grave y negativamente afectados por potenciales hídricos progresivamente decrecientes (aproximadamente de  $-1$  a  $-15$  atmósferas) y que por orden de sensibilidad son: crecimiento celular, síntesis de la pared celular, síntesis de proteínas, síntesis de clorofila, apertura de estomas, fotosíntesis y respiración. Intercalados, y probablemente mediando algunos de estos procesos, tienen lugar aumentos de las concentraciones de ácido abscísico y de prolina y una disminución de citoquininas.

También la producción de etileno aumenta en las situaciones de *stress* hídrico y podría mediar muchas de las otras respuestas. La sensibilidad del crecimiento celular a los déficits hídricos es particularmente acusada. Se ha sugerido que el hecho de que las plantas suelen crecer durante la noche más que durante el día, puede estar relacionado con la mayor abundancia de agua durante la noche, aunque sin duda deben estar implicados también otros factores. Desde luego una menor abundancia de agua determina una disminución de la turgencia celular y con ello del crecimiento. Precisamente se piensa que los cambios de turgencia que acompañan a un déficit hídrico, pueden disparar otra serie de respuestas celulares. En general con una disminución acusada del potencial hídrico disminuye la actividad de la mayoría de los enzimas, excepto, en general, de los hidrolíticos de proteínas y polisacáridos que al producir sustancias de bajo peso molecular, hacen bajar el potencial osmótico y dificultan la pérdida de agua.

Una situación totalmente diferente se da en los casos de exceso de agua por inundación. En esta situación, el etileno se acumula debido a la dificultad de su difusión al exterior. Muchos daños producidos por las inundaciones en las plantas se deben a este efecto del etileno y, curiosamente, las plantas de terrenos pantanosos (como el arroz), están adaptadas a esta situación de alta concentración de etileno que estimula en ellas los procesos de crecimiento.

### 36.2. Altas temperaturas

Ya hemos mencionado que, usualmente, la adaptación a ambientes secos suele ir asociada con resistencia a elevadas temperaturas, debido a la elevación de temperatura que en la planta provoca una baja transpiración. Pero además, ocurre que los climas secos suelen ser también cálidos.

La mayoría de las plantas superiores mueren por exposición a temperaturas de entre  $45$  y  $50^{\circ}\text{C}$ . Algunas xerófitas verdaderas pueden sobrepasar ligeramente estos límites y sobrevivir. En general, incluso temperaturas de entre  $35$  y  $40^{\circ}\text{C}$  causan daños graves en las plantas no aclimatadas a ambientes calurosos.

Los mecanismos por los que las altas temperaturas provocan la muerte de las plantas, pueden ser variados. De una forma general, si la elevación de la temperatura es brusca, la muerte se produce por una desnaturalización de las proteínas que cuando afecta a algún o algunos enzimas claves, resulta fatal para la célula.

Cuando la elevación de la temperatura se produce de una forma más lenta, diversos procesos químicos, catalizados enzimáticamente o no, se aceleran, acumulándose sustancias tóxicas. Es frecuente en este sentido, la intoxicación por amonio liberado por una elevación lenta y prolongada de la temperatura. En cualquier caso, a las temperaturas que usualmente provocan la muerte de la planta, no se ve afectado de una forma inmediata el material genético. En este último sentido, son de destacar ensayos de reanimación de plantas y bacterias, en principio muertas por temperaturas entre 45 y 60°C. Parece que precursores de coenzimas estimulan la reanimación de estas plantas, lo que sugiere que los enzimas más sensibles a la elevación de la temperatura son los implicados en las rutas biosintéticas de vitaminas y coenzimas. Restaurados éstos, externamente, se puede reanudar, a temperatura moderada, el funcionamiento de la planta. Lógicamente, si los tratamientos letales se hacen a temperaturas más elevadas, se afecta un mayor número de enzimas y la reanimación se hace imposible.

Además de por desnaturalización, los niveles de un enzima pueden disminuir por un desequilibrio, a elevadas temperaturas, entre su velocidad de formación y su velocidad de degradación, favor de la última. De acuerdo con todos estos factores que hemos mencionado como causantes de la muerte, la resistencia de las plantas a la elevada temperatura puede residir en varios factores:

- a) Una aceleración de la velocidad de los procesos biosintéticos con las elevadas temperaturas, para compensar la elevada velocidad de los procesos degradativos, especialmente de proteínas. Esta adaptación supone un recambio muy rápido de materiales y, por tanto, un elevado consumo energético por la planta.
- b) La producción de formas enzimáticas (isoenzimas) más resistentes a la desnaturalización, debido a su particular estructura primaria y en consecuencia espacial.
- c) Una más rápida velocidad de reconversión del amonio liberado, en aminoácidos y en otras formas orgánicas nitrogenadas.

Los mecanismos de evitación o protección, como adaptación a las elevadas temperaturas, no son frecuentes. Cuando se produce una elevación moderada de la temperatura, ya vimos (Cap. 5) que se produce, para compensarla, un aumento de la transpiración. Si la transpiración es excesiva, se cierran estomas para proteger de la pérdida de agua. Si todavía progresa la elevación de la temperatura, se puede descontrollar el mecanismo de apertura y cierre estomático, se abren de nuevo los estomas y aumenta otra vez la transpiración. Desde este momento, los efectos perniciosos de las altas temperaturas, se ven acompañados de los efectos perniciosos de la desecación. De nuevo vemos cómo los efectos de las altas temperaturas y ambientes secos se dan juntos y, en consecuencia, las adaptaciones a ellos deben contemplar mecanismos comunes.

Cuando se produce un aumento brusco de 8 a 10 °C por encima de la temperatura normal de crecimiento de una planta, se sintetizan diversas proteínas características (proteínas del choque térmico) y disminuye la síntesis de las proteínas normales de la

célula. El control de la síntesis de las proteínas del choque térmico se ejerce a nivel de transcripción. Su función no es aún bien conocida, aunque parece claro que juegan un papel clave en la tolerancia a la nueva temperatura.

### **36.3. Bajas temperaturas**

Quizá después de la desecación, las bajas temperaturas parecen ser la causa más frecuente de muerte en las plantas. En cualquier caso, el desarrollo o no de la capacidad de soportar bajas temperaturas, es una causa fundamental de la distribución de las plantas en la biosfera y un problema de primera magnitud en la Agricultura. La capacidad de soportar bajas temperaturas, es así enormemente variable de unas plantas a otras. Mientras la mayoría de las plantas tropicales mueren cuando se exponen a temperaturas entre 0 y 5°C, e incluso sufren daños graves por temperaturas entre 10 y 12°C, plantas árticas pueden sobrevivir a temperaturas de -40°C e incluso algo menores. La severidad del tratamiento con bajas temperaturas, depende también del tiempo de exposición, y dentro de una misma planta, del tejido.

Normalmente, en los estudios de muerte y adaptación de plantas a bajas temperaturas, se distingue si estas bajas temperaturas quedan por encima o por debajo del punto de congelación del agua de la planta.

La adaptación, daño o muerte de las plantas por bajas temperaturas, pero que no provocan congelación del agua de la planta, es de enorme importancia económica en un gran número de cultivos de climas templados o cálidos como: citrus, maíz, algodón, patatas, habas, etc. Aunque la velocidad de los procesos metabólicos está influida fuertemente por la temperatura, es difícil imaginar cómo una disminución de temperatura que no llega a la congelación del agua puede provocar la muerte de tejidos, e incluso de toda la planta. Parece entonces lógico pensar, que la sensibilidad a las bajas temperaturas reside en las membranas. En efecto, éstas, y principalmente por su bicapa lipídica, son una estructura semifluida, cuya mayor o menor fluidez está controlada por su composición lipídica y por la temperatura. De una forma aproximada, altas temperaturas y alta proporción de ácidos grasos no saturados en los lípidos de las membranas, favorecen una mayor fluidez de las membranas. Parece lógico pensar que el grado de fluidez de una membrana es fundamental para el funcionamiento apropiado de los sistemas de transporte localizados en ella, para el funcionamiento de los enzimas y sistemas enzimáticos (respiración, fosforilación, etc.) localizados en ella, y para que ésta funcione como una barrera física que impida el paso libre de componentes celulares. Según la temperatura normal de vida de una planta, ésta adopta una determinada composición lipídica de las membranas, para que tengan la apropiada fluidez. Un descenso moderadamente rápido de la temperatura, no permite una adaptación de la composición lipídica de las membranas a la nueva situación, con lo que éstas se hacen más cristalinas, menos fluidas, con todas las consecuencias funcionales que esto lleva consigo. De estas consecuencias funcionales, las más graves parecen ser las que se refieren a la baja producción de ATP, y aún más al libre paso de sustancias a través de las membranas. La salida de sus componentes, determina un colapso del funcionamiento de la célula y su muerte. Por este motivo, muchos efectos perniciosos o letales de bajas temperaturas, que no produ-

cen congelación, se pueden evitar con un rápido recalentamiento que no dé tiempo a una salida excesiva de componentes celulares. Por otra parte, si la velocidad de enfriamiento es muy lenta, o las plantas se tratan antes a temperaturas moderadamente bajas, da tiempo a que las células adapten la composición lipídica de sus membranas a la nueva situación, aumentando la proporción de ácidos grasos no saturados para impedir un cambio excesivo en su fluidez. Esto permite a las plantas adaptarse a soportar ambientes más fríos, dentro de los márgenes de síntesis relativa de ácidos grasos no saturados que les permita su genoma.

Los mecanismos de adaptación y de muerte de las plantas, por temperaturas por debajo del punto de congelación del agua, plantean problemas completamente nuevos respecto a los que hemos considerado hasta ahora. Si la temperatura baja tanto que se forman cristales de hielo en la planta, ésta o parte de sus células pueden morir de forma diferente según la velocidad de enfriamiento. Si este enfriamiento es muy lento, antes de que se congele el agua de las células, se congela la de los espacios extracelulares, que además de más accesibles al frío, presentan menor concentración de solutos y, por tanto, menos descenso crioscópico. La congelación de parte del agua extracelular, determina un aumento de la concentración de solutos en él y, por tanto, una salida de agua de las células y pérdida de su turgencia. Si el proceso continúa se crean todos los síntomas típicos de desecación y las células mueren por este motivo.

Si por el contrario, el enfriamiento con congelación es brusco, se forman, incluso dentro de la célula, cristales de hielo cuyo crecimiento rompe la subestructura celular, las membranas y la ordenación estructural de muchas proteínas. La muerte de las células sobreviene así por una pérdida de sus componentes a través de las membranas rotas a la vez que por una pérdida de funcionamiento de muchas de sus proteínas. El papel de los cristales de hielo provocando la muerte de las células parece indudable, y así se explica que las semillas, que tienen un muy bajo contenido de agua, puedan sobrevivir a tratamientos por temperaturas muy bajas (algunas hasta temperaturas del nitrógeno líquido,  $-196^{\circ}\text{C}$ ).

La adaptación a temperaturas por debajo del punto de congelación, puede ocurrir por los mecanismos de evitación o protección contra la congelación y por resistencia a la situación de la congelación.

Muchas plantas tienen meristemos subterráneos, al abrigo de las bajas temperaturas del aire, que les permiten reiniciar el crecimiento cuando cesa el período frío.

La mayor parte de los árboles que soportan bajas temperaturas ambientales, mantienen el agua de sus tejidos subenfriada por debajo del punto de congelación, en un estado metaestable sin formar cristales de hielo. Estos se forman en su corteza, pero no en el xilema, que puede alcanzar los  $-40^{\circ}\text{C}$  sin formar cristales, quizá debido a su compacta estructura. Si se produce la congelación, esto puede suceder en las células, que así mueren, o en el xilema, en cuyo caso los cristales también rompen las membranas de las células parenquimáticas que lo rodean y, por tanto, también mueren. Parece, pues, que en estas especies se dan unas características estructurales, y quizá algún componente, que confieren estabilidad al agua subenfriada. Aunque se trata de un caso de resistencia a baja temperatura, bajo otros aspectos es un caso de evitación o protección contra la formación de hielo.

De todos formas, la mayor parte de las especies que sobreviven a muy bajas tempe-

raturas, lo hacen porque toleran (resisten) la formación de hielo dentro de ellas. En general, en herbáceas adaptadas a climas fríos y más aún en árboles de bosques boreales, se forma hielo en los espacios intercelulares, sufriendo las células una intensa deshidratación y quedando en un estado de inactividad metabólica, del que salen por hidratación cuando sube la temperatura. Por mecanismos semejantes de deshidratación, en una situación de letargo pueden sobrevivir, a temperaturas quizá próximas a  $-200^{\circ}\text{C}$ , ciertos líquenes, musgos, esporas y, como ya hemos indicado, semillas. En ningún caso parece que las células puedan sobrevivir, en cambio, a la formación de hielo dentro de ellas.

Con fines aplicados, se han desarrollado técnicas de medida de resistencia al frío y de inducción de resistencia al frío, especialmente para adaptar especies de interés agrícola a climas moderadamente fríos. Para la medida en el laboratorio de la resistencia a bajas temperaturas, después de someter a éstas un trozo de tejido a estudiar, se realiza sobre él, ya a su temperatura normal de crecimiento, un ensayo de viabilidad, por ejemplo con tetrazolio, que al ser reducido por las deshidrogenasas de las células vivas toma un color rojo. Se puede inducir resistencia al frío en muchas plantas, por exposición de éstas a temperaturas moderadamente bajas ( $-3$  a  $+5^{\circ}\text{C}$  dependiendo de la planta) durante varios días. En muchas especies también el tratamiento con días cortos induce resistencia al frío. En general, aquellos factores que favorecen el crecimiento, abonado, riego, etc., inhiben el desarrollo de la resistencia al frío, y es significativo en este sentido que en general las plantas con mayor velocidad de crecimiento tienen menor resistencia a los ambientes extremos.

#### 36.4. Salinidad y otras condiciones extremas del suelo

Otro factor que es frecuentemente causa de una limitación al crecimiento de muchas plantas es la salinidad. Esta salinidad a veces se plantea a la hora de poder o no utilizar determinadas aguas para riego, pero además es un problema ya del suelo. El problema tiene, además, una trascendencia económica grande, ya que la práctica del riego agrícola, especialmente con aguas de baja calidad, determina una salinización progresiva del suelo. En efecto, siempre que este riego se realiza con un agua cuyo contenido de sales sobrepase la proporción relativa de sal y agua que toma la planta, el suelo se enriquecerá progresivamente en sales, a menos que una lluvia abundante ejerza una labor eficaz de lixiviación del suelo. Se estima por este motivo, que grandes extensiones de terreno se están volviendo improductivas todos los años.

La sal más frecuente en los suelos es el  $\text{ClNa}$ , pero los suelos salinos pueden contener cantidades considerables de otras sales como  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ ,  $\text{SO}_4\text{Mg}$ ,  $\text{SO}_4\text{Ca}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ,  $\text{ClK}$  y  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ .

La sensibilidad de las plantas a la salinidad del suelo es muy variable y, en muchos casos, la capacidad de soportar concentraciones moderadas de sales en el suelo, puede ser inducida en ciertas plantas por exposición a condiciones salinas. Entre las plantas cultivadas, las de remolacha, tomate, arroz, etc., son conocidas como relativamente tolerantes a la salinidad. En cambio, leguminosas, planta de cebolla, etc., sólo toleran aguas de muy baja salinidad. Las plantas C-4 son, en general, más tolerantes a la sal que las plantas con fotosíntesis C-3.

Desde el punto de vista teórico y práctico, es altamente interesante la fisiología de las plantas halofitas, pobladores naturales de suelos salinos, de las costas, etc. Estas plantas crecen mejor en ambientes salinos, presentando máximos de crecimiento en concentraciones de NaCl que varían de unas plantas a otras entre 0,02 y 0,5 M y soportando en cualquier caso concentraciones mayores de 0,3 M. Entre estas plantas son bien conocidas, especies de *Salicornia*, *Allenrolfea*, *Limonium*, *Atriplex* y *Sarcobatus*.

En las halofitas terrestres, siempre se da una elevada concentración de solutos en sus células, lo que permite un muy bajo potencial hídrico (casi hasta -200 atmósferas cuando en las hojas de la mayoría de las plantas, raramente baja entre -20 y -30 atmósferas). Existen tipos de halofitas con bajos potenciales hídricos, fundamentalmente porque pueden acumular sales y soportar estas altas concentraciones salinas sus funciones celulares. El agua penetra en ellas osmóticamente como en no halofitas debido a su bajo potencial hídrico. Otros tipos de halofitas, mantienen en su interior bajas concentraciones de sales y altas de otros solutos. Aunque en estas últimas la sal penetra en la planta, ésta aumenta de volumen tomando grandes cantidades de agua, confiriendo a las hojas el carácter de suculentas. En cualquier caso, un exceso de sal en estas últimas plantas es eliminado por estructuras especializadas (que probablemente operan con un transporte activo) de raíces y hojas. En los casos en que se acumula sal, ésta lo hace mayoritariamente en las vacuolas, por lo que parece que en cualquier caso el citoplasma no ha de soportar altas concentraciones salinas. Así, si en las plantas que no acumulan sal, debe operar en la membrana plasmática una bomba de  $\text{Na}^+$  que expulsa a éste fuera de la célula, en las que acumulan sal debe operar una bomba de  $\text{Na}^+$  en el tonoplasto, por la que el  $\text{Na}^+$  pasa a la vacuola. El  $\text{Na}^+$  al ser transportado, va acompañado de  $\text{Cl}^-$  que, en mayor o menor proporción, neutraliza la carga positiva del  $\text{Na}^+$ . El resto de carga no neutralizado por  $\text{Cl}^-$ , suele ser neutralizado por aniones de ácidos orgánicos dicarboxílicos como, málico, oxálico, aspártico, glutámico, etc., que acompañan al  $\text{Na}^+$ . Ciertas halofitas requieren en cualquier caso  $\text{Na}^+$  como micronutriente. En halofitas que no acumulan sal, los bajos potenciales hídricos de las células, parece que son proporcionados fundamentalmente por carbohidratos, polioles, aminoácidos (fundamentalmente prolina), etc.

Existen evidencias de que la savia bruta del xilema de muchas halofitas no tiene tan alta concentración de solutos como el suelo, de manera que el más bajo potencial hídrico en el xilema, requerido para que ocurra la absorción de agua, se consigue por la tensión (presión negativa) a que se ve sometido por la transpiración. Ésta es la situación que se da, por ejemplo, en los manglares que cubren estuarios muy salinos de ríos de zonas tropicales. Se estima que en ellos el potencial osmótico ( $\psi_p$ ) del agua que baña sus raíces tiene valores tan bajos como -30 Atm, mientras que el potencial osmótico en el xilema es mucho más alto: -0,3 Atm. El necesariamente más bajo potencial hídrico ( $\psi$ ) en el xilema que en el medio externo que baña las raíces para que pueda tener lugar la absorción de agua, se consigue con valores muy negativos del potencial de presión ( $\psi_p$ ) en el xilema, por ejemplo, -30 Atm.

Según la evidencia actualmente disponible, parece que la adquisición de la capacidad de soportar altas concentraciones salinas reside fundamentalmente en la operatividad de sistemas de transporte activo de  $\text{Na}^+$ , en plasmalema o en tonoplasto, y sólo en una medida menor, en el pequeño efecto (o en su caso efecto beneficioso) de la alta

concentración de solutos en el citoplasma sobre el funcionamiento de los procesos metabólicos.

Otras condiciones extremas del suelo pueden residir en sus posibles valores extremos de pH. Éste puede tener un efecto directo sobre la actividad de permeasas de la raíz, o puede tener un efecto indirecto solubilizando elementos nutritivos y/o elementos tóxicos del suelo. La mayoría de las plantas crecen en suelos cuyo pH debe quedar entre 3 y 9. Existe óptimos de pH del suelo para el crecimiento de las distintas plantas, pero esos óptimos dependen además de la naturaleza del suelo. Se ha mencionado en otros capítulos la influencia del pH del suelo, en la disponibilidad por la planta de hierro, fosfato y otros nutrientes por lo que no lo discutiremos otra vez. En cuanto al efecto sobre la disponibilidad de elementos tóxicos, algunos posibles efectos de éstos los veremos más adelante.

### **36.5. Altitud**

A alturas grandes sobre el nivel del mar, se dan una serie de factores que afectan al funcionamiento de las plantas, algunos específicos de las grandes alturas y otros comunes en otras situaciones que discutimos en apartados concretos.

Entre los factores ambientales de las grandes alturas tenemos altos valores de radiación (infrarroja, visible y ultravioleta), bajas temperaturas, grandes fluctuaciones de temperaturas, frecuentes situaciones de sequedad, todos ellos que ya hemos considerado o que veremos en seguida (efecto de altas radiaciones). Además, se dan otra serie de factores más específicos como es una baja tensión de  $\text{CO}_2$  y de  $\text{O}_2$  y unos vientos intensos.

La alta radiación permite altas velocidades de fotosíntesis y así estas plantas requieren altos valores de iluminación para saturar la fotosíntesis. Por la posibilidad de alta radiación ultravioleta, las plantas de zonas altas tienen una cutícula muy gruesa que, además de atenuar la transpiración, supone un potente filtro contra la radiación ultravioleta. Como es bien sabido, ésta produce mutaciones en células somáticas y germinativas que, en general, resultan letales.

Por el ambiente frecuentemente seco, lógicamente las plantas de las grandes alturas presentan caracteres xeromorfos. Su fotosíntesis, sin embargo, es tipo C-3, pues las temperaturas son bajas. De todas formas, tienen valores de intensidad de iluminación para saturación de la fotosíntesis, sensiblemente más altos que los de las plantas C-3 que pueblan zonas de menor altitud sobre el nivel del mar. El viento elevado, que también contribuye a una elevada pérdida de agua por transpiración, es un factor que puede ocasionar daños a la planta por rotura de tallos, etc. Así, estas plantas tienen hojas pequeñas, que ofrecen poca superficie al viento.

Viento, sequedad y bajas temperaturas, son los tres factores más frecuentemente determinantes de las adaptaciones a las grandes alturas.

### **36.6. Agentes químicos contaminantes**

La variedad de agentes químicos contaminantes, así como el hecho de que muchos de ellos sean de aparición muy reciente, hace difícil efectuar una clasificación de los

tipos de respuestas de las plantas ante ellos. En la mayor parte de los casos ni tan siquiera la respuesta es conocida. Veremos sólo, entonces, algunos de los ejemplos mejor conocidos de respuestas por las plantas y de efectos en ellas, que pueden servir como línea general sobre los posibles problemas que se plantean en cada caso.

El ozono reacciona con los hidrocarburos insaturados, formando unos intermedios no bien conocidos que penetran por los estomas y alteran el funcionamiento celular. Las células epidérmicas, en especial las oclusivas, toman grandes cantidades de agua, mientras que las mesofílicas se deshidratan. Las hojas se hacen quebradizas y se desarrollan manchas cloróticas.

Un importante contaminante, el anhídrido sulfuroso  $\text{SO}_2$ , solo o en combinación con ozono, causa clorosis y enanismo de árboles.

En muchos casos, la aplicación de agentes reductores como azúcar, ascórbico, etc., protegen a las plantas de agentes oxidantes.

Los fluoruros son especialmente graves por sus efectos acumulativos en las plantas, causando hundimiento del tejido foliar.

El etileno se libera en gran cantidad por los tubos de escape de los automóviles, provocando una serie de efectos bien conocidos sobre el crecimiento de las plantas.

El catión aluminio es soluble a pH ácidos, en estas condiciones inhibe el crecimiento de muchas especies porque inhibe absorción de hierro y algunos procesos metabólicos. Algunas especies como las azaleas, toleran grandes cantidades de aluminio. Ciertas plantas incluso acumulan grandes cantidades de elementos que son tóxicos para la mayoría de las plantas, quizá porque los enmascaran con agentes complejantes o los acumulan en las vacuolas, mecanismos defensivos que probablemente sean generales, aunque más o menos intensos según la planta.

El selenio es tóxico, pero además es un micronutriente esencial demostrado en animales y bacterias. Ciertas plantas del género *Astragalus*, tienen la capacidad de acumularlo en grandes cantidades sustituyendo al azufre en aminoácidos y derivados. El selenato puede competir y actuar como sustrato del sistema de asimilación del sulfato y seguir el mismo metabolismo que éste. El wolframato, en cambio, puede inhibir la utilización de sulfato y otros procesos.

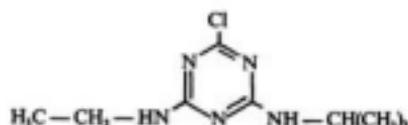
Modernamente, la llamada lluvia ácida está produciendo un gran impacto por la severidad de sus efectos. El pH muy bajo de algunas aguas de lluvia, se debe a que éstas son ricas en ácidos sulfúrico y nítrico. Éstos se producen por la oxidación e hidratación en la atmósfera de los óxidos sulfuroso y de nitrógeno emanados en grandes cantidades por la utilización de combustibles fósiles. Ya la acidez del agua es grave para la planta pero, además, cuando la lluvia ácida cae sobre un terreno poco alcalino o con poca capacidad tamponadora, solubiliza diversos cationes metálicos que tienen efectos graves en las plantas y en los animales. De estos iones, el catión aluminio se ha señalado como uno de los mediadores más claros en los devastadores efectos que la lluvia ácida está produciendo en muchos bosques y cultivos.

Son poco conocidas las respuestas a insecticidas. Sin embargo, han sido más estudiados los efectos de los herbicidas en las plantas. De hecho el uso de herbicidas constituye una de las grandes contribuciones a la mejora de la productividad agrícola en los tiempos modernos. La eliminación de las malas hierbas es una práctica agrícola común y el uso de los herbicidas sustituye a los grandes requerimientos energéticos de

dicha eliminación por métodos mecánicos. Muchos aspectos de la selección de un herbicida apropiado están en relación con la ausencia de efectos en el hombre del herbicida aplicado a las plantas y dependen en buena medida del metabolismo y de la estabilidad del herbicida. Otros aspectos a considerar en la utilización del herbicida apropiado, residen en su especificidad y mecanismo de acción en la planta. Sin duda la especificidad está en relación con el mecanismo de acción del herbicida, pero también depende de su posibilidad de penetración o de eliminación por la planta. En cualquier caso, la especificidad es esencial cuando se pretende eliminar a todas las plantas excepto a la de interés agrícola en una explotación determinada.

Todavía la búsqueda de nuevos herbicidas y su aplicación práctica dependen en buena medida de conocimientos empíricos, pero son cada vez mejor conocidos los mecanismos de acción de los herbicidas sobre el funcionamiento de las plantas.

Un buen número de herbicidas actúan inhibiendo la fotosíntesis, en general en alguna etapa del transporte de electrones. Entre ellos los del grupo s-triazina y concretamente la atrazina:



es uno de los más usados. La atrazina es absorbida por las raíces y vía xilema pasa a las hojas, donde provoca clorosis y muerte. Muchas plantas son sensibles a la atrazina, pero, por ejemplo, el maíz que la transforma en productos inactivos es insensible a ella. Otras especies como el algodón son también resistentes a la atrazina porque la almacenan en estructuras no fotosintéticas. Otras especies, en fin, tienen un sistema radicular tan profundo que no absorben a la atrazina depositada en el suelo. Otros importantes herbicidas inhibidores de la fotosíntesis (ver 12.5) son las ureas sustituidas como el DCMU (Diurón) y el CMU (Monurón). Incluso la urea que es un fertilizante, a dosis altas se comporta como herbicida. Aunque no son muy selectivas, las ureas sustituidas depositadas en el suelo no afectan a las plantas con raíces profundas. Actualmente se logran ureas sustituidas más específicas, probablemente debido a la posibilidad de su degradación por las plantas insensibles a ellas. Otra aproximación al problema consiste en obtener razas de plantas cultivadas resistentes al DCMU, y hacer uso de las técnicas de la ingeniería genética. La proteína de 32.000 daltons asociada al fotosistema II es la responsable de la sensibilidad a herbicidas derivados de la urea (ver 12.5). Se ha logrado clonar el gen correspondiente a esta proteína, tanto de plantas normales como de plantas resistentes a DCMU y se conocen los cambios de nucleótidos, y en consecuencia de aminoácidos en la proteína, responsables de dicha resistencia. Como esta proteína está codificada en el DNA de cloroplastos, la transformación de plantas sensibles, introduciendo en cloroplastos el gen clonado de plantas resistentes, es difícil. Una aproximación prometedora ha consistido en obtener una quimera genética, introduciendo el gen clonado de esta proteína resistente en el plásmido Ti (ver 27.4), pero incluyendo también la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido

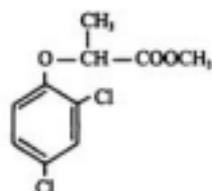
(*transit peptide*) del terminal amino, común a los precursores de las proteínas de cloroplastos sintetizadas en citoplasma (ver 10.5). Con el plásmido Ti se puede transformar el genoma nuclear de muchas plantas. Se podría lograr así una planta transformada, con el gen que confiere resistencia al DCMU en el núcleo, pero modificado de tal manera que su producto proteínico maduro pasaría a cloroplastos.

Los herbicidas derivados de sulfonilurea inhiben la biosíntesis de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Las uracil herbicidas tienen también una acción especialmente acusada sobre la fotosíntesis más que sobre el metabolismo de ácidos nucleicos en contra de lo que podría sugerir su semejanza estructural con el uracilo. Los carbamatos

tos  $(R_1-O-C(=O)-N(R_2)_2)$ , pero no los tiocarbamatos  $(R_1-S-C(=S)-N(R_2)_2)$  y  $R_1-S-C(=O)-N(R_2)_2$ , inhiben también la fotosíntesis aunque ambos tienen efectos adicionales como es la inhibición del crecimiento del tallo y de las hojas. Los carbamatos inhiben también mitosis en tallos y raíces. Otro herbicida que actúa sobre el proceso fotosintético es el paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridonio) cuya acción determina la formación de altas cantidades del radical superóxido ( $O_2^-$ ) (ver 12.7).

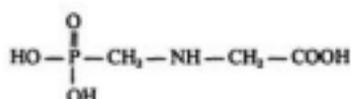
Otro grupo de herbicidas, como las dinitroanilidas, son poderosas inhibidoras de la división celular. Su acción es mucho más acusada en plántulas que en planta adulta y se pueden usar así selectivamente en determinadas etapas de la cosecha. La mayor sensibilidad de las plantas jóvenes se debe a su fácil absorción y translocación, así como a la mayor velocidad de crecimiento de las plantas jóvenes.

Otro importante grupo de herbicidas lo constituyen los fenoxiderivados y los derivados del ácido benzoico. Son sustancias tipo auxina e interfieren, sustituyen y/o alteran el metabolismo y el mecanismo de acción auxínico (Cap. 22), alterando el crecimiento normal de la planta. Con distintos derivados se puede lograr mayor o menor selectividad. Así, por ejemplo, dentro de este grupo podemos incluir al éster metílico del diclorprop:



que es muy activo contra dicotiledóneas y casi inactivo para monocotiledóneas.

Los derivados de ácidos alifáticos son herbicidas que son ácidos como acético, propiónico, butírico, etc., con diferentes grupos como halógenos o grupos orgánicos complejos sustituyendo a átomos de hidrógeno. Así, dentro de este grupo se puede incluir al glifosato:



Probablemente, algunos de estos herbicidas inhiben la síntesis de lípidos y así, en plantas tratadas con ellos, reducen drásticamente la cutícula. El glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos a nivel de la 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintetasa. De bacterias resistentes a glifosato se ha aislado y clonado el gen de este enzima resistente a glifosato, que difiere del sensible en la sustitución de un solo aminoácido. Introducido el gen en un vector apropiado, se está intentando transformar plantas de interés agronómico para conferirles resistencia a este herbicida. Al ser el herbicida poco específico, puede facilitar el cultivo de la planta transformada libre de, prácticamente, cualquier otra contaminación vegetal.

### 36.7. Otras situaciones desfavorables: agentes infecciosos, consumidores vegetales, alelopatía

Es bien sabido que las plantas son muy resistentes contra la infección microbiana. Dicha resistencia le es conferida por una gran variedad de componentes químicos y por barreras físicas contra la penetración microbiana.

Muchos componentes químicos antimicrobianos, suelen encontrarse de una forma habitual en las plantas e incluyen fenoles y derivados de bajo peso molecular (ácido clorogénico, catecol, flavonoides, etc.), taninos, alcaloides, etc. En la tabla 36.1 se dan las fórmulas de algunos de los agentes antimicrobianos de plantas, así como la enfermedad contra la que protegen. En general, estos inhibidores tienen acciones antimicrobianas muy generales y de amplio espectro. Plantas deficientes en ellos, son más sensibles a la infección que las variedades que los presentan.

Entre las barreras físicas contra las infecciones, la cutícula, además de ser la primera barrera que usualmente encuentra el organismo invasor, contiene sustancias de bajo peso molecular poco conocidas y con actividad antimicrobiana. Las paredes constituyen otra barrera, cuya compleja estructura requiere un variado aparato enzimático para su desintegración, por lo que es difícil para un microorganismo abrirse camino entre ella. Además, las proteínas de las paredes actúan como inhibidores de los enzimas hidrolíticos del patógeno.

A diferencia de los componentes químicos antimicrobianos vistos hasta ahora, las fitoalexinas no están presentes habitualmente en una planta, sino que como consecuencia de la exposición a un agente patógeno, se producen en gran cantidad. Son agentes antimicrobianos mucho más específicos que los considerados anteriormente. Como sólo se producen en cantidad si la planta ha sido expuesta al patógeno, esta primera exposición «inmuniza» contra futuros ataques de ese patógeno o de otros emparentados, según la especificidad de la fitoalexina. En la tabla 36.2 se dan las fórmulas de algunas fitoalexinas y algunas de las enfermedades que combaten. Moléculas pequeñas y poco conocidas del patógeno, actúan como inductoras de la formación de fitoalexinas. Pero

TABLA 36.1

Algunos compuestos protectores contra las enfermedades en plantas

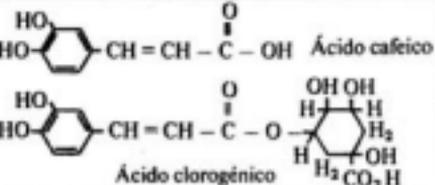
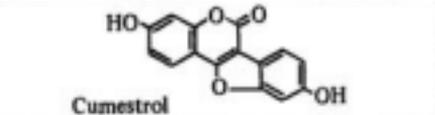
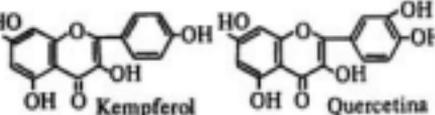
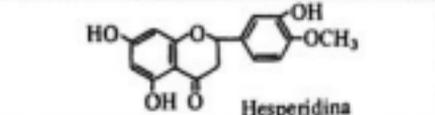
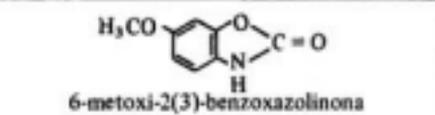
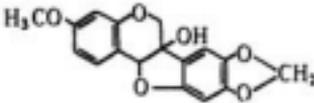
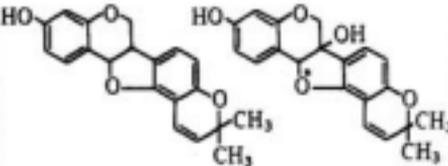
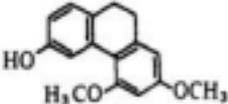
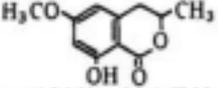
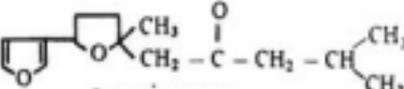
Enfermedad	Agente protector
<p>Roña de la patata, en general infecciones en tejidos de distintas plantas por: <i>Streptomyces scabians</i>, <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Verticillium albo-atrum</i>, etc.</p>	 <p>Ácido cafeico</p> <p>Ácido clorogénico</p>
<p>Tizón de la cebolla producido por <i>Colletotricum circinans</i></p>	 <p>Ácido protocatético</p> <p>Catecol</p>
<p>Diversas infecciones en alfalfa</p>	 <p>Cumestrol</p>
<p>Infecciones víricas en hojas de <i>Prunus</i></p>	 <p>Kempferol</p> <p>Quercetina</p>
<p>Infecciones víricas en <i>Citrus</i></p>	 <p>Hesperidina</p>
<p>Infecciones causadas por <i>Fusarium nivale</i></p>	 <p>6-metoxi-2(3)-benzoxazolinona</p>
<p>Costras en frutos causadas por especies de <i>Venturia</i>, especialmente en manzanas y peras</p>	<p>Quinonas, polifenoles, etc.</p>
<p>Infecciones por Mohos en trigo</p>	<p>Compuestos fenólicos</p>
<p>Infecciones por <i>Esclerotinia fruticola</i> en manzanas</p>	<p>Productos de oxidación de fenoles</p>
<p>Infecciones víricas en general</p>	<p>Taninos</p>

TABLA 36.2  
Algunas fitoalexinas

Enfermedad	Fitoalexina inducida
Infección por <i>Ascochyta pisi</i> en guisante	 <p>Pisatina</p>
Enfermedad causada por <i>Monilinia fruticola</i> en <i>Phaseolus</i>	 <p>Faseolina                      Hidroxifaseolina</p>
Infecciones en Orquídeas	 <p>Orcinol</p>
Infección por <i>Ceratocystis fimbriata</i> en zanahoria	 <p>3-metil-6-metoxi-8-hidroxi-3,4-dihidro-isocumarina</p>
Infección en <i>Ipomea batatas</i> por <i>Ceratocystis fimbriata</i>	 <p>Ipomeamarona</p>

más frecuentemente, las sustancias inductoras son productos de la degradación de las paredes celulares (oligosacarinas), que se producen con el ataque de un agente externo. Estas sustancias también producen cambios acusados en el crecimiento y metabolismo de la planta.

En general, la infección de la planta se favorece por situaciones de bajo *status* nutritivo, por ejemplo, cuando hay pocos carbohidratos, probablemente por una más débil disposición de las defensas químicas. Si la infección se produce finalmente, la respuesta inmediata suele ser un aumento respiratorio pero sin producción de ATP, lo que trae como consecuencia un sensible aumento de la temperatura en la zona infectada.

La fotosíntesis disminuye y se produce una degradación de las proteínas de la planta. Se suelen bloquear el xilema y el floema, con lo que se reduce la absorción de agua y nutrientes. En cambio, se produce un aumento de transpiración y, por tanto, un marchitamiento de la planta. Se altera el metabolismo hormonal y con ello se produce un desequilibrio que produce variados efectos, entre ellos un crecimiento anormal.

Muchas veces los agentes antimicrobianos se difunden fuera de la planta, impidiendo la proliferación microbiana en las proximidades de ésta.

Contra el consumo de la planta por animales (insectos, vertebrados, etc.) las plantas han desarrollado también diversos mecanismos de defensa. Terpenos, taninos, alcaloides y glucósidos cianogénicos, actúan por diversos mecanismos como repelentes de los animales. Bien como venenos del metabolismo mayoritario, bien como provocadores de sabores desagradables, o bien por efectos sobre el funcionamiento cerebral, las plantas producen una gran variedad de sustancias, que las protegen de su desaparición debido al consumo por animales. En otros casos, mecanismos de defensa más sofisticados han permitido a las plantas defenderse contra el ataque animal. Así, una herida producida, por ejemplo, por la mordedura de un insecto en una hoja de tomate, libera un compuesto que se difunde por el resto de la planta, induciendo la acumulación en todas las hojas, de una proteína inhibidora de las proteasas digestivas de muchas especies de insectos y otros animales, y así éstos no continuarán atacando a la planta para evitar trastornos digestivos. El compuesto producido en la herida no está aún completamente caracterizado, pero parece de naturaleza carbohidrato. Es diferente de la traumatina (ácido 2-oxotrans-10-dodecenoico), otra sustancia producida en respuesta a la formación de una herida.

En general, reciben el nombre de agentes aleloquímicos, aquellas sustancias que producidas por organismos de una especie, afectan al funcionamiento (crecimiento, conducta, etc.) de organismos de otra especie. No sólo entre plantas y microorganismos y animales se producen estas relaciones, sino también entre las mismas plantas. Compuestos producidos por especies de plantas pueden, al difundirse en el suelo, impedir el crecimiento de otras y evitar la competencia. Este fenómeno tiene, por lo demás, una gran importancia ecológica y práctica. Si inhiben el crecimiento de otras especies, estos agentes se llaman alelopáticos. Muchos de ellos se liberan en el suelo desde las hojas caídas. Químicamente, los agentes alelopáticos son muy variados; entre los más conocidos, en cuanto a su modo de acción, están los fenoles y los aminoácidos no proteicos. Éstos no se incorporan en las proteínas de las plantas que los producen, porque en ellas la maquinaria de biosíntesis de proteínas, concretamente las aminoacil-tRNA sintetasas, los discriminan de los aminoácidos proteicos; pero la maquinaria de biosíntesis de proteínas de una planta sensible no los discrimina, con lo que se incorporan en sus proteínas, sustituyendo parcialmente a los aminoácidos correctos y formando así proteínas inactivas en la planta sensible.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- ALBERHEIM, P., y ANDERSON-PROUTY, A. J.: *Carbohydrates, Proteins, Cell Surfaces and the Biochemistry of Pathogenesis*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 26, 1975, págs. 31-52.
- BEWLEY, J. D.: *Physiological Aspect of Diccation Tolerance*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», volumen 30, 1979, págs. 195-238.
- BURKE, M. J.; GUSTA, J. V.; QUAMME, H. A.; WEISER, C. J., y LI, P. H.: *Freezing and Injury in Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 27, 1976, págs. 507-528.
- DARVILL, A. G., y ALBERSHEIM, P.: *Phytoalexins and their Elicitors-a Defense Against Microbial Infections in Plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 35, 1984, págs. 243-275.
- FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F., y YEO, A. R.: *The Mechanism of Salt Tolerances in Halophytes*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 28, 1977, págs. 89-121.
- HEITEFUSS, R., y WILLIAMS, P. H. (eds.): *Physiological Plant Pathology*, en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 4, Springer-Verlag, Berlín, 1976.
- JACKSON, M. B.: *Ethylene and Responses of Plants to Soil Waterlogging and Submergence*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 36, 1985, págs. 145-174.
- KIMPEL, J. A., y KEY, J. L.: *Heat Shock in Plants*, «Trends Biochem. Sci.», 1985, págs. 353-357.
- LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B., y ZIEGLER, H. (eds.): *Physiological Plant Ecology*, I, II, III y IV: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vols. 12A, B, C y D, Springer-Verlag, Berlín, 1981, 1982 y 1983.
- RYAN, C. A.: *Proteinase Inhibitors in Plant Leaves: a Biochemical Model for Pest Induced Natural Plant Protection*, «Trends in Bioch. Sciences», vol. 3, 1978, págs. 148-150.
- SWAIN, T.: *Secondary Compounds as Protective Agents*, «Ann. Rev. Plant Physiol.», vol. 28, 1977, págs. 479-501.

## Índice de organismos

- Abies alba*, 567.  
*Acacia*, 531.  
*Acer*, 452, 656.  
*Acer platanoides*, 480.  
*Acer pseudoplatanus*, 37-40, 43, 44, 658, 660, 661, 670.  
*Acer rubrum*, 660.  
*Acer saccharum*, 665, 685, 689.  
*Acetabularia*, 537, 602.  
*Acetobacter xilinum*, 62.  
*Aerobacter aerogenes*, 63.  
*Aesculus hippocastanum*, 657.  
*Agallia constricta*, 540.  
*Agrobacterium*, 539, 540, 543, 544.  
*Agrobacterium rhizogenes*, 540, 542.  
*Agrobacterium rubi*, 540.  
*Agrobacterium tumefaciens*, 539, 540, 542, 543.  
*Agropyron junceiforme*, 207.  
*Agropyron smithii*, 637.  
*Agrostis setacea*, 212.  
*Agrostis stolonifera*, 212, 213.  
*Agrostis tenuis*, 213.  
*Albizia julibrissin*, 597, 598, 620, 621, 628.  
*Alchemilla*, 138.  
*Allenrolfea*, 778.  
*Allium cepa*, 636, 687.  
*Alnus*, 173.  
*Alnus incarna*, 657.  
*Aloe bulbilifera*, 638, 639.  
*Alopecurus pratensis*, 637.  
*Althea rosea*, 470.  
*Amaranthus*, 496.  
*Amaranthus caudatus*, 496, 637.  
*Amaranthus graecizans*, 637.  
*Amoracea laphathyfolia*, 566.  
*Anabaena*, 361, 364.  
*Anacystis nidulans*, 375.  
*Anagallis arvensis*, 637.  
*Anagallis tenella*, 648.  
*Ananas*, 722.  
*Anethum graveolens*, 637.  
*Antirrhinum majus*, 638.  
*Apium graveolens*, 649.  
*Aralia mandshurica*, 666.  
*Arabidopsis thaliana*, 568, 637.  
*Armeria*, 210.  
*Arum maculatum*, 419.  
*Asclepias*, 68.  
*Ascophyta pisi*, 785.  
*Asparagus officinalis*, 530, 543.  
*Aspergillus*, 373.  
*Aspergillus niger*, 522.  
*Asphodelus*, 670.  
*Astragalus*, 213, 770.  
*Astragalus bisulcatus*, 195.  
*Astragalus crotolariae*, 195.  
*Atriplex*, 210, 778.  
*Atriplex patula*, 328.  
*Atriplex rosea*, 328.  
*Atropa belladonna*, 530.  
*Aurogenus magnivena*, 541.  
*Avena*, 450, 522, 621, 636.  
*Avena fatua*, 667, 669, 670.  
*Avena sativa*, 524, 636, 637, 648, 684.  
*Azotobacter*, 364, 366, 370.  
*Bacillus*, 364.  
*Begonia rex*, 529.  
*Beijerinckia*, 364.  
*Beta*, 184, 210, 682.  
*Beta maritima*, 648.

- Beta vulgaris*, 636, 638, 648, 649.  
*Betula*, 173, 656, 659, 665, 667.  
*Betula pubescens*, 657, 660, 661, 671.  
*Brassica*, 450, 541.  
*Brassica campestris*, 638.  
*Brassica napus*, 569, 684, 690, 703.  
*Brassica oleracea*, 524, 649.  
*Brassica rapa*, 638, 648.  
*Briza spicata*, 686.  
*Bryonia dioica*, 595, 600, 601.  
*Bryophyllum*, 541.  
*Bryophyllum pinnatum*, 637.  
*Bryophyllum tubiflorum*, 638.  
  
*Calendula officinalis*, 638.  
*Calonyction aculeatum*, 470.  
*Calothrix*, 364.  
*Calluna vulgaris*, 213.  
*Camelia japonica*, 638.  
*Cannabis*, 686.  
*Cannabis sativa*, 637.  
*Capsella*, 562.  
*Capsella bursa-pastoris*, 655.  
*Carica papaya*, 596.  
*Castanea*, 657.  
*Catalpa bignonioides*, 223, 648.  
*Ceanothus*, 364.  
*Cerastium holosteroides*, 213.  
*Ceratocystis fimbriata*, 785.  
*Cercis canadiensis*, 657.  
*Cestrum auranticum*, 638.  
*Cestrum nocturnum*, 638.  
*Cicer arietinum*, 453, 684, 690, 692, 694,  
 708-709, 711, 712, 715, 719.  
*Cichorium*, 547.  
*Cichorium endiva*, 530.  
*Cichorium intibus*, 565.  
*Citrullus vulgaris*, 621, 737.  
*Citrus*, 95, 772, 783.  
*Citrus limonia*, 737.  
*Citrus sinensis*, 731, 737.  
*Cladofora*, 548.  
*Clostridium*, 364, 366.  
*Coffea arabica*, 637, 682, 685, 687.  
*Coleus*, 467, 468, 480, 566, 596.  
*Coleus hybrida*, 638.  
*Colletotricum circinans*, 773.  
*Commelina comunis*, 511.  
*Convolvulus arvensis*, 621.  
  
*Coriandrum sativum*, 530.  
*Cormus*, 667.  
*Cormus florida*, 665.  
*Corylus avellana*, 470, 648, 665, 669.  
*Cosmos bipinnatus*, 637.  
*Crataegus*, 667.  
*Cucumis melo*, 470, 737.  
*Cucumis sativus*, 470, 638, 691, 723.  
*Cucurbita*, 168, 172, 177, 602.  
*Cucurbita maxima*, 167, 470, 476, 477.  
*Cucurbita moscata*, 621.  
*Cucurbita pepo*, 175, 667, 687, 723.  
*Cupressus*, 95.  
*Cyanophora paradoxa*, 246.  
*Cynodon dactylon*, 177, 692.  
*Cynosurus cristatus*, 649.  
*Chaos chaos*, 402.  
*Chara*, 148, 599, 602.  
*Chara corallina*, 86.  
*Chara foetida*, 588-590.  
*Chenopodium album*, 637, 638.  
*Chenopodium amaranticolor*, 614, 621,  
 640.  
*Chenopodium rubrum*, 621, 630, 638, 640.  
*Chlamydomonas*, 373.  
*Chlorella*, 232, 304, 350, 355, 373, 546.  
*Chlorella fusca*, 381.  
*Chloris gayana*, 177.  
*Chlorobium*, 253, 280, 364.  
*Chlorobium thiosulfatophilum*, 332.  
*Chromatium*, 364.  
*Chrysanthemum*, 636.  
*Chrysanthemum indicum*, 637.  
*Chrysanthemum morifolium*, 637, 647-  
 649, 651.  
  
*Dactylis glomerata*, 649.  
*Datura*, 492, 541.  
*Daucus carota*, 530, 636, 648, 652.  
*Derxia*, 364.  
*Desulfovibrio*, 364, 383.  
*Dianthus arenarius*, 648.  
*Dianthus caryophyllus*, 638.  
*Dianthus deltoides*, 648.  
*Dianthus superbus*, 637.  
*Digitalis purpurea*, 648, 649, 665.  
*Digitaria sanguinalis*, 177.  
*Dioscoria*, 177.  
*Diospyros virginiana*, 661.

- Dryopteris, 99, 584.  
 Dryopteris filix-mas, 621.
- Echeveria harmsii, 638.  
 Echinocystis macrocarpa, 470, 476, 477, 722.  
 Echium, 675.  
 Ectocarpus siliculosus, 521.  
 Eleagnus angustifolia, 663.  
 Elianthus tuberosus, 527.  
 Elodea, 556, 602.  
 Elodea canadensis, 190, 602.  
 Ephedra, 170.  
 Epilobium hirsutum, 665.  
 Equisetum, 541.  
 Eragrostis tenella, 210.  
 Escherichia coli, 63, 369, 371, 387, 388, 535.  
 Esclerotinia fruticola, 784.  
 Eucalyptus, 101.  
 Euphorbia peplus, 638.  
 Euphorbia splendens, 71.
- Fagus, 656.  
 Fagus silvatica, 175, 553, 657, 659, 665, 691.  
 Ficus carica, 695, 737.  
 Ficus sycamorus, 506.  
 Fragaria, 722.  
 Fragaria vesca semperflorens, 638.  
 Fraxinus, 172, 452, 561, 656.  
 Fraxinus excelsior, 656, 661, 665, 681.  
 Fuchsia, 138.  
 Fuchsia hybrida, 637.  
 Fucus, 547.  
 Fucus serratus, 521.  
 Funaria, 541.  
 Funaria hygrometrica, 602.  
 Fusarium moniliforme, 469.  
 Fusarium nivale, 773.  
 Fussicoccum amygdali, 522, 673.
- Garcinia mangostiana, 733.  
 Geum urbanum, 649.  
 Gibberella, 472.  
 Gibberella fujikuroi, 469, 470, 476-478.  
 Ginkgo, 167, 170.
- Glaux, 207, 210.  
 Glycine max, 175, 635, 637, 639, 643, 681.  
 Gomphrina globosa, 638.  
 Gossypium, 68, 187.  
 Gossypium ceiba, 68.  
 Gossypium hirsutum, 269, 636.
- Halicystis, 89, 148.  
 Halimione, 210.  
 Hedera helix, 223.  
 Helianthus, 558.  
 Helianthus annuus, 583, 595, 637, 639.  
 Helianthus tuberosus, 223, 638.  
 Helminthosporium sativum, 522.  
 Heracleum, 187.  
 Hevea brasiliensis, 162.  
 Hidrodictyon, 89.  
 Hippuris, 549.  
 Hordeum vulgare, 213, 638, 639, 648, 732.  
 Hydrangea, 195.  
 Hyoscyamus, 651.  
 Hyoscyamus niger, 636, 637, 639, 642, 643, 647, 648, 651.
- Ilex aquifolium, 638.  
 Impatiens, 675.  
 Impatiens balsamina, 489, 637.  
 Ipomea, 502.  
 Ipomea batatas, 785.  
 Ipomea caerulea, 346.  
 Ipomea hederacea, 637.  
 Iris germanica, 223.  
 Isoetaceae, 112.
- Juglans, 173.  
 Juglans nigra, 665.  
 Juncus squamosus, 212.  
 Juniperus, 95.
- Kalanchoe, 642, 751.  
 Kalanchoe blossfeldiana, 621, 636, 637.  
 Kalanchoe laxiflora, 638.  
 Klebsiella, 364, 366, 370.  
 Klebsiella aerogenes, 369.  
 Klebsiella pneumoniae, 369-371.  
 Kigelia, 177.  
 Kingia, 99.

- Lactuca sativa*, 607, 608, 618-621, 636, 648, 687.  
*Larix decidua*, 657-659.  
*Lemna*, 495, 514.  
*Lemna gibba*, 640.  
*Lemna minor*, 381, 392, 491, 494, 621.  
*Lemna perpusilla*, 637.  
*Lens*, 453.  
*Lens culinaris*, 681, 684, 698-701, 712.  
*Leucadendron daphnoides*, 501.  
*Lepidium sativum*, 586, 588, 591, 592.  
*Lilium*, 541.  
*Limonium*, 778.  
*Linum perenne*, 557.  
*Linum usitatissimum*, 570, 675.  
*Liriodendron tulipifera*, 657.  
*Lobelia*, 675.  
*Lodoicea*, 682.  
*Lolium perenne*, 648, 649, 651, 653.  
*Lolium temulentum*, 177, 637, 638, 643, 648.  
*Lunaria annua*, 648.  
*Lunaria biennis*, 649, 650.  
*Lunularia cruciata*, 521.  
*Lupinus*, 572, 685.  
*Lupinus albus*, 626.  
*Lupinus luteus*, 498.  
*Lycopersicum*, 541, 638.  
*Lycopersicum esculentum*, 476, 638, 737.  
*Lychnis dioica*, 723.  
*Lythrum salicaria*, 665.  
  
*Madia elegans*, 638, 639.  
*Malus*, 656, 665.  
*Malus communis*, 621.  
*Malus domestica*, 172.  
*Malus sylvestris*, 656, 661, 737.  
*Marchantia*, 447.  
*Marchantia polymorpha*, 621.  
*Mastigocladus*, 364.  
*Melilotus alba*, 637.  
*Mentha piperita*, 637.  
*Mercurialis annua*, 724.  
*Methanobacterium*, 364.  
*Mikamia scandens*, 638, 639.  
*Micromonas*, 400.  
*Mimosa*, 599.  
*Mimosa pudica*, 597, 598, 620, 621, 628, 631.  
  
*Minuartia verna*, 213.  
*Mollugo*, 326.  
*Monilinia fruticola*, 785.  
*Morus*, 713.  
*Morus alba*, 657.  
*Mougeotia*, 602-604, 615-617, 621, 628, 631.  
*Mucor mucedo*, 520.  
*Murraya koenigii*, 686.  
*Mussa*, 713.  
*Mussa sapientum*, 737.  
*Myosotis*, 461.  
*Myrica*, 364.  
  
*Nardus stricta*, 212.  
*Nelumbo nuccifera*, 689, 691.  
*Nemophila insignis*, 665.  
*Nerium oleander*, 223.  
*Nicotiana*, 96, 164, 167, 187, 541.  
*Nicotiana glauca*, 532, 541.  
*Nicotiana langsdorffii*, 532, 537, 541.  
*Nicotiana sylvestris*, 637, 642.  
*Nicotiana tabacum*, 487, 562, 635-638, 650, 651, 665, 691.  
*Nigella arvensis*, 638.  
*Nitella*, 148, 151, 599, 602.  
*Nitella flexilis*, 86, 89.  
*Nitella translucens*, 86.  
*Nitellopsis*, 148.  
*Nitrobacter*, 363.  
*Nitrosomonas*, 363.  
*Nostoc*, 364.  
*Nuphar advenum*, 223.  
  
*Oenothera acaulis*, 637.  
*Oenothera biennis*, 648, 691.  
*Oenothera rosea*, 638.  
*Olea europea*, 649.  
*Origanum vulgare*, 209.  
*Oryza sativa*, 39, 637.  
*Ornithopus sativus*, 365.  
  
*Parthenium argentatum*, 638.  
*Paspalum dilatatum*, 177.  
*Perilla ocymoides*, 640.  
*Perilla frutescens*, 731.  
*Petroselinum hortense*, 530.

- Phacelia tanacetifolia*, 621, 665.  
*Pharbitis*, 541.  
*Pharbitis nil*, 470, 621, 637, 643, 644, 731.  
*Phaseolus*, 177, 507, 566, 631, 785.  
*Phaseolus aureus*, 62, 681.  
*Phaseolus coccineus*, 470, 675.  
*Phaseolus lunatus*, 637.  
*Phaseolus multiflorus*, 597.  
*Phaseolus mungo*, 684.  
*Phaseolus vulgaris*, 60, 182, 223, 454, 456, 470, 494, 543, 571, 595, 621, 636, 638, 687, 694, 716, 725, 731.  
*Philadelphus pubescens*, 162.  
*Phleum pratense*, 550, 637.  
*Phlox drumondii*, 665.  
*Phoenix dactylifera*, 683, 710, 737.  
*Phycomitrium*, 541.  
*Phycomyces*, 585, 586, 602.  
*Phytomonas leptovasarum*, 175.  
*Phytophthora infestans*, 784.  
*Picea*, 447.  
*Picea abies*, 657.  
*Pinus*, 99, 100, 447, 556, 657, 665.  
*Pinus attenuata*, 470, 724.  
*Pinus palustris*, 661.  
*Pinus resinosa*, 170.  
*Pinus silvestris*, 170.  
*Piper nigrum*, 687.  
*Pisum*,  
*Pisum arvense*, 682.  
*Pisum elatius*, 706, 707.  
*Pisum fulvum*, 706, 707.  
*Pisum sativum*, 365, 470, 476, 572, 621, 638, 648, 681, 682, 684, 699, 705-707, 724, 731.  
*Platanus occidentalis*, 657.  
*Plumbago*, 569.  
*Poa annua*, 638, 674.  
*Poa pratensis*, 649.  
*Poa supina*, 648.  
*Poa trivialis*, 691.  
*Polygonum sachalinense*, 223.  
*Polygonum persicaria*, 193.  
*Populus*, 452, 657.  
*Populus nigra*, 223.  
*Populus robusta*, 498.  
*Porphyra perforata*, 351.  
*Portulaca oleracea*, 644.  
*Primula*, 685.  
*Prochloron*, 255.  
*Prosopis tamarugo*, 772.  
*Prunus*, 559, 657, 784.  
*Prunus americana*, 737.  
*Prunus cerasus*, 737.  
*Prunus laurocerasus*, 223.  
*Prunus persica*, 657, 661, 731.  
*Prunus serotina*, 172.  
*Pseudomonas*, 363.  
*Purshia*, 364.  
*Pyrus malus*, 466, 661.  
  
*Quercus*, 187, 656, 657.  
*Quercus borealis*, 175.  
*Quercus pedunculata*, 661.  
*Quercus robur*, 175.  
*Quercus rubra*, 175, 181.  
  
*Ranunculus sceleratus*, 530.  
*Raphanus sativus*, 494, 637, 650.  
*Rhizobium*, 363, 364, 369, 370, 380.  
*Rhizobium japonicum*, 370.  
*Rhizobium trifolii*, 365.  
*Rhizopus suinus*, 443, 449.  
*Rhodomicrobium*, 364.  
*Rhodopseudomonas sphaeroides*, 253, 284.  
*Rhodopseudomonas viridis*, 285.  
*Rhodospirillum*, 284, 364.  
*Rhodospirillum rubrum*, 332.  
*Rhodotorula*, 364.  
*Rhus typhina*, 162.  
*Ribes nigrum*, 657, 660, 661.  
*Ricinus communis*, 169, 172, 476, 477, 674, 684, 687.  
*Robinia*, 165, 168, 173-175, 657, 658.  
*Rosa*, 665, 667.  
*Rosa sherardi*, 733.  
*Rubdeckia hirta*, 637.  
*Rumex*, 473.  
*Rumex crispus*, 665, 667, 691.  
  
*Saccharum spontaneum*, 637, 638, 778.  
*Salicornia*, 210.  
*Salix*, 187.  
*Salix viminalis*, 172, 175, 187, 480, 660.  
*Salix japonica*, 689.  
*Salmonella typhimurium*, 369, 392.

- Salsola*, 210, 687.  
*Salvia splendens*, 637, 640.  
*Samanea saman*, 597, 598, 620, 628.  
*Sarcobatus*, 778.  
*Saxifraga*, 675.  
*Saxifraga rotundifolia*, 648.  
*Scabiosa columbaria*, 210.  
*Scabiosa succisa*, 638.  
*Schizymenia pacifica*, 351.  
*Scrofularia nodosa*, 560.  
*Scrofularia vernalis*, 647.  
*Secale cereale*, 569, 621, 638, 646, 648.  
*Sedum spectabile*, 637.  
*Sempervivum funkii*, 634.  
*Senecio macrophyllus*, 223.  
*Senecio vulgaris*, 655.  
*Sequoia*, 95; 101.  
*Setaria verticillata*, 638, 639.  
*Silene*, 477.  
*Simonsia californica*, 686.  
*Sinapis alba*, 621, 624, 648.  
*Sinningia speciosa*, 621.  
*Solanum*, 177.  
*Solanum tuberosum*, 636, 638.  
*Sorghum vulgare*, 524.  
*Spartina*, 210.  
*Spergula arvensis*, 501.  
*Spinacia oleracea*, 637, 640.  
*Spirogyra*, 234.  
*Streptomyces scabiens*, 784.  
*Strychnos nux-vomica*, 687.  
*Suaeda maritima*, 210.  
*Syringa*, 172, 542.  
*Syringa vulgaris*, 572, 661.
- Tamarix*, 210.  
*Taraxacum*, 473, 548.  
*Taraxacum dens leonis*, 494.  
*Taraxacum officinale*, 175, 674.  
*Taxus bacata*, 567, 657.  
*Thalassiosira*, 373.  
*Theobroma cacao*, 687.  
*Theofrosia candida*, 638.  
*Thesium*, 675.  
*Thuja occidentalis*, 665.  
*Tilia*, 657, 667.  
*Tilia cordata*, 175.  
*Tilia platyphyllos*, 175.
- Tradescantia*, 67, 190, 602.  
*Trifolium pratense*, 637, 638.  
*Trifolium repens*, 597, 638, 639, 691.  
*Trigonella foenum graecum*, 683.  
*Trillium*, 666.  
*Triticum*, 566.  
*Triticum aestivum*, 566, 638, 648, 675, 684, 690.  
*Triticum sativum*, 636.  
*Tropaeolum*, 138, 177, 596.  
*Tropaeolum majus*, 223.  
*Typha latifolia*, 345, 691.
- Ulmus*, 657.  
*Ulmus americana*, 162, 167, 657, 661, 689.  
*Ulmus campestris*, 689.  
*Ulmus glabra*, 480.  
*Ulva taeniata*, 251, 351.
- Vallisneria*, 602.  
*Valonia*, 89, 148, 149, 151.  
*Venturia*, 784.  
*Verticillium alboatrum*, 784.  
*Viburnum opulus*, 656, 666.  
*Vicia*, 453, 504, 505.  
*Vicia faba*, 39, 175, 638, 687.  
*Vigna sesquipedalis*, 705.  
*Vigna unguiculata*, 699.  
*Vitis*, 152, 487, 713.  
*Vitis vinifera*, 737.
- Welwitchia*, 170.
- Xanthium*, 488, 491, 514, 515, 635, 640.  
*Xanthium pensylvanicum*, 494, 621, 752.  
*Xanthium strumarium*, 175, 636, 637, 640.
- Yucca*, 187, 682.  
*Yucca flaccida*, 172.
- Zea*, 371, 594.  
*Zea mays*, 476, 594, 595, 621, 684, 690.

# Índice de materias

- ABA (véase ácido abscísico).
- Abedul, 660.
- Abscisis, II, 513.
- Abscisión, 733, 742, 766-768.
- Absorción
- de fotones, 268.
  - de nutrientes, 140.
    - Mecanismo «dual», 143, 144, 145.
    - Mecanismo «unitario», 143, 144, 145.
    - Mecanismo «multifásico», 145.
    - Transportador, 143.
    - Transporte activo, 142, 150, 151-156.
    - Transporte facilitado, 143.
    - Transporte pasivo, 143, 145-151.
    - Velocidad de absorción, 143.
    - Visión general, 156-157.
- Aceite
- de limón, 739.
  - de naranja, 740.
- Aceituna, 726, 732, 738.
- Acetabularia, 537, 602.
- Acetaldehído, 400.
- Acético, tiokinasa, 203.
- Acetil CoA, 395, 396, 408, 409, 410, 704.
- Acetil CoA deshidrogenasa, 704.
- O-Acetil-L-serina, 388, 389.
- O-Acetil-L-serina-sulfhidrilasa, 388, 391.
- Acetileno, 503.
- 1 Acetoxi-2-4-dihidroxi-n-heptadeca-16-n, 723.
- Ácido
- abscísico, 129, 329, 462, 485, 486, 499, 510, 513, 528, 564, 583, 595, 660, 662, 670, 671, 681, 682, 719, 721, 722, 724, 732, 733, 744, 745, 749, 763, 766-768.
  - y fototropismo, 583.
  - y gravitropismo, 595.
- cis-aconítico, 407, 736.
- $\delta$ -aminolevulinico, 259-261.
- 1 aminociclopropano-1-carboxílico, 506, 507, 509.
- 4 amino-3,5,6-tricloro picolinico, 459.
- acetil acético, 459.
- ascórbico, 175, 209, 741.
- ascórbico oxidasa, 205.
- aspártico, 172, 318, 324, 377, 379, 450.
- benzoico, 460, 522.
- 3 benzofuranacético, 458, 459.
- 2 benzotiazolil oxiacético, 497.
- cafeico, 522, 524, 736.
- capríco, 686.
- caprílico, 686.
- caproico, 686.
- $\alpha$ -cetoglutárico, 174.
- cinámico, 63, 64, 522, 525, 663, 740.
- citramálico, 736.
- citrico, 174, 329, 332, 409, 735, 736.
- clorogénico, 522, 524, 726, 740.
- 2 cloro indolacético, 460.
- 3 cloro indolacético, 460.
- corismico, 64.
- O-cumárico, 524.
- P-cumárico, 64, 522, 524.
- cumarilquinico, 736.
- 5 deshidroquinico, 64.
- 3 deshidrosiquimico, 64.
- 3 desoxi- $\alpha$ -arabinoheptolosónico-7-P, 64.
- 2.5 Diclorobenzoico, 460.
- 2.6 diclorobenzoico, 460.
- 2.4 diclorofenoxiacético, 458-462, 464, 568, 745.
- 2.4 diclorofenoxipropiónico, 460.
- dihidrofaseico, 517, 518.
- dihidroxi-octanoico, 42.

- eicosenoico, 686.  
 5 enolpirúvil-siquímico 3-fosfórico, 64.  
 erúico, 686.  
 faseico, 517, 518, 520.  
 fenilacético, 448, 451, 459.  
 fenilpirúvico, 64, 451.  
 fenólicos, 522, 524, 525.  
 ferúico, 64.  
 fitico, 206, 705.  
 fórmico, 339, 504.  
 fosfoenolpirúvico, 57, 64, 399, 704.  
 6 fosfogluconico, 209, 423.  
 fosfomevalónico, 476.  
 fumárico, 174, 409, 736.  
 GA<sub>3</sub> (véase ácido giberélico).  
 galacturónico, 36, 736.  
   TDP-D-ácido galacturónico, 62.  
   UDP-ácido galacturónico, 59, 62, 66.  
 gálico, 42, 522, 567.  
 giberélico, 182, 209, 462, 469, 486, 501,  
   524, 566, 671, 711, 715, 730.  
 glicólico, 336, 356, 736.  
 glicérico, 736.  
 glioxílico, 334, 335, 736.  
 glucónico, 174.  
 glucurónico, 39, 59, 736.  
   D-ácido glucurónico kinasa, 59.  
   UDP-ácido glucurónico, 59, 66.  
   UDP-ácido glucurónico pirofosfori-  
   laza, 59.  
 glutámico, 172, 450.  
 heptanoico, 673.  
 p-hidroxibenzoico, 522, 524, 567.  
 inden-3-acético, 459.  
 indolacético, 49-52, 57, 182, 208, 564,  
   565, 567, 568, 571-573, 662, 733, 744.  
 3 indolacético, 442-468.  
   Biosíntesis, 449-453.  
   Complejo, 463.  
   Degradación del AIA, 456-458.  
   Mecanismo de acción del, 463-466.  
   Valoración del, 444.  
 indolacético oxidasa, 456-458, 467, 468,  
   567, 569, 730, 732, 745.  
 indolbutírico, 567, 733.  
 3 indolbutírico, 458-459.  
 indol-3-isobutírico, 460.  
 indol isopropiónico, 460.  
 indolpirúvico, 448-451, 459.  
 indolpirúvico descarboxidasa, 450.  
 indolpropiónico, 733.  
 isocitrónico, 329, 409, 736.  
 láctico, 693, 736.  
 láurico, 686.  
 linoleico, 686, 702, 711, 738.  
 linoléico, 702.  
 lipoico, 384, 385, 389.  
 lunulárico, 518.  
 málico, 174, 212, 317, 322, 329, 409,  
   734-737.  
 malónico, 174.  
 2 metil, 4-clorofenoxiacético, 459, 460.  
 γ-metilenglutámico, 687.  
 mevalónico, 263, 265, 475-477, 479,  
   480, 498, 517.  
 mevalónico quinasa, 476, 479.  
 mirístico, 686.  
 naftalenacético, 458, 462, 567.  
 naftil-1-acético, 458, 459.  
 naftil-2-acético, 459.  
 naftilftalámico, 462.  
 naftoico, 460.  
 naftoxi-2-acético, 458, 459.  
 nonanoico, 673.  
 nucleicos, 499.  
 octanoico, 673.  
 oleico, 397, 686, 738.  
 oxalacético, 174, 321, 322, 409, 736.  
 oxálico, 174, 339, 736.  
 oxalosuccínico, 409.  
 α-oxoglutarico, 409, 736.  
 2-oxo-trans-10-dodecanoico, 786.  
 palmítico, 686.  
 pantoténico, 741.  
 piperídico, 687.  
 pirúvico, 174, 325, 693, 736.  
 prefénico, 64.  
 proteasas, 697.  
 quínico, 174, 735, 736.  
 ribonucleico, 206.  
 salicílico, 522, 640, 663.  
 sináptico, 64.  
 D-siquímico, 63, 64, 174, 736, 740.  
 siquímico-3-fosfórico, 64.  
 succínico, 174, 395, 405, 409, 420, 709,  
   736.  
 sulfúrico, 663.  
 tánico, 567.  
 tartárico, 174, 709, 736.  
 2.3.6 triclorobenzoico, 459-461.

- 2.4.5 triclofenoxiacético, 460.  
 2.4.6 triclofenoxiacético, 460.  
 trihidroxi-octadecanoico, 42.
- Ácidos hidroxámicos, 422.  
 $\alpha$ -hidroxisulfínicos, 339.  
 trispóricos, 520, 521.
- Acidófilas, 211.
- Aconitasa, 409, 704.
- Acoplamiento conformacional, 293, 416.  
 químico, 293, 416.  
 quimiosmótico, 293, 294, 416.
- Actinomicina D, 465, 537, 626, 720.
- Achicoria, 565.
- Adaptación a bajas temperaturas, 774-777.
- Adenilato kinasa, 325, 354, 709.
- Adenin nucleótidos, 354.
- Adenina, 488, 498, 499, 508, 569.
- Adenosina, 498, 499.
- Adenosina-5-fosfosulfato (APS), 385.  
 Adenosina-5-fosfosulfato sulfotransferasa, 387, 392.
- Adenosina-5-sulfatofosfato quinasa, 385.
- ADP-glucosa, 311, 314, 677.
- ADP-glucosa pirofosforilasa, 314, 677.
- ADP-glucosa almidón sintetasa, 677.
- Agalla, 538-539, 540.
- Agalla de corona o cuello, 539-540.
- Agentes antimicrobianos, 782-785.  
 químicos contaminantes, 752-779.
- Agrocina, 543.
- Agrocinopinas, 540.
- Agropina, 540.
- Agua  
 Absorción y transporte del, 91-105.  
 capilar, 93.  
 Flujo en plantas, 85-87.  
 gravitacional, 93.  
 de imbibición (higroscópica), 93.  
 Medida, 87-89.  
 oxigenada, 451, 456, 668, 669, 703, 704.  
 Relaciones hídricas célula, 77-90.  
 del suelo, 93.
- Aguacate, 725-749.
- AIA-oxidasa, 522, 524-526.
- Aire limitante, capa de, 354.
- Aizoaceas, 328, 329.
- ALA (véase ácido  $\beta$ -aminolevulinico).
- ALA-sintetasa, 259.
- Albaricoque, 515, 726-745.
- Albúmina de suero bovino, 404.
- Albúminas, 680, 685, 700.
- Alcachofa, 446.
- Alcohol  
 coniférico, 42, 63.  
 cumárico, 42, 63.  
 deshidrogenasa, 208, 400, 401, 451, 694.  
 sinápico, 42, 63.
- Aldehído deshidrogenasa, 448.
- Aldolasa, 206, 400, 694, 704, 738.
- Aldolasas, 305.
- Aleopatía, 785.
- Aleloquímicos, 785.
- Aleno, 507.
- Alfalfa, 759.
- Algas  
 azules, 603.  
 pardas, 603.  
 rojas, 255.  
 verde-azules, 255, 364, 366, 373, 387.  
 verdes, 255.
- Algodón, 67, 185, 447, 449, 513, 515, 628, 703, 781.
- Aliso, 364.
- Almacenamiento seco, 664, 667.
- Almendra, 733.
- Almidón, 313-315, 676-685, 693-697, 711-712, 714, 738.  
 fosforilasa, 314.  
 Síntesis del, 677, 678.  
 sintetasa, 314.
- Alubias, 345, 450, 485, 516.
- Aluminio, 195, 213, 780.
- Amarantáceas, 328.
- $\alpha$ -Amilasa, 204, 473, 484, 514, 516, 695-697, 711, 714, 721.
- $\beta$ -Amilasa, 626, 695, 697, 712.
- Amilopectina, 313, 677, 678, 695.
- Amilopectina 1-6 glucosidasa, 696.
- Amiloplastos, 248.
- Amilosa, 313, 677, 678, 684, 685, 695.
- Aminoácido, 376, 492, 493.
- 9-Amino-acridina, 299.
- Aminoácidos aromáticos, 450.
- $\gamma$ -Aminolevulinato deshidratasa, 207.
- Aminopectidasas, 689, 690, 698, 699.
- Aminoetoxivinilglicina, 509.
- Amino oxidasa, 450.
- Aminotransferasa, 377, 450.

- Amital, 413, 416.  
 Amo 1618, 476, 478, 481, 482.  
 Amonificación, 363.  
 Amonio,  
   Asimilación en plantas del, 376-378.  
   Control asimilación del, 380-381.  
   Localización de la asimilación del, 379-380.  
 Anatomía foliar, 317-319.  
   en corona, 317-319.  
 Androgénesis, 530.  
   directa, 530.  
   indirecta, 527, 531.  
 Anhidrasa carbónica, 208, 322.  
 Anhídrido carbónico, 395-422, 510, 667-669, 691, 692, 728-730, 742, 743, 748.  
 Anhídrido sulfuroso, 385, 779.  
 Anoxia, 747.  
 Anteroxantina, 264.  
 Antesina, 633.  
 Antesis, 640-642, 675, 676, 678, 680, 722, 728, 732, 733, 746.  
 Anticuerpos monoclonales en fitocromo, 609.  
 Anticuerpos policlonales en fitocromo, 609.  
 «Antiports», 153-156.  
 Antocianidinas, 625, 734, 740.  
 Antocianinas, 493, 525, 740.  
 Antocianos, 524.  
   y fitocromo, 624-625.  
 Aparato estomático, 110.  
 Aparato de Golgi, 43, 63, 65, 66.  
 Apigenina, 524, 525.  
 Apio, 649.  
 Apomixis, 674.  
 Apoplasma (Apoplasto), 98, 142.  
 Apoplasto, 98, 178, 677.  
 APS (véase Adenosina-S-fosfosulfato).  
 APS, quinasa, 385.  
 Aposición, 67.  
 Arabinogalactano, 38-44, 53.  
 Arabinosa, 36, 38, 40, 53, 61.  
 Arabinoxilanos, 37, 45.  
 Araquina, 686.  
 Área cribosa, 162-164, 170, 171, 188.  
 Área foliar, 359.  
 Arginasa, 208.  
 Arginina, 208, 543, 650, 686.  
 Arroz, 50, 51, 54, 469, 475, 501, 511, 676, 691, 746.  
 Ascorbato oxidasa, 626.  
 Asparragina, 172, 567, 686.  
 Atebrina, 299.  
 Athiorhodáceas, 283.  
 ATP, 287-301, 396, 399-424, 708-710.  
   y corrientes citoplasmáticas, 602, 603.  
   y reducción de sulfatos, 385, 391.  
 ATP-asa, 53, 57, 162, 164, 167, 203, 204, 289, 292, 402.  
 ATP-asas en absorción iónica, 152-156.  
 ATP-sulfato adenilil transferasa, 385.  
 ATP-sulfurilasa, 385.  
 Atrazina, 781.  
 Auxina, 441-468.  
   y dominancia apical, 569-574.  
   y fototropismo, 582.  
   y gravitropismo, 593-595.  
   y maduración de frutos, 723-749.  
   y morfogénesis, 560-569.  
   y la pared celular, 48-57.  
   y transformación tumoral, 540, 541.  
   Transporte transversal de, 582.  
 Auxinas, 487, 489, 490, 493, 494, 509-511, 514-517, 519, 521, 522, 525-527.  
 Avena, 37, 48, 51, 442, 444, 445, 447, 450, 454, 464, 520, 525, 526, 579, 582, 636, 655, 676.  
 Azufre, 195, 198, 201, 204, 207, 383, 384.  
   Absorción y transporte de, 385.  
   Ciclo del, 382, 383-384.  
   Incorporación a compuestos orgánicos del, 388-390.  
 B995, 481, 482.  
 Bacterias purpúreas, 283.  
 Bacterioclorofilas, 256, 283.  
 Bario, 195.  
 Baritropismo, 587.  
 Basófilas, 211.  
 Beleño, 482, 636, 648.  
 Benciladenina, 488, 720, 724.  
 Bencilaminopurina, 182, 493, 500.  
 Bencilurea, 495.  
 Bencimidazol, 497.  
 Benzoquinona, 292.

- 2 Benzoxazolinona, 462.  
 Berenjena, 733.  
 Betacianina, 499.  
 Biotecnología vegetal, 542-543.  
   *Agrobacterium tumefaciens* en, 542.  
   *Agrobacterium rhizogenes* en, 542.  
   vectores intermediarios en, 543.  
 Biotina, 207, 384, 385, 389, 741.  
 Bomba  
   ATP-asa, 152-156.  
   de calcio, 154, 156.  
   electrógena, 153.  
   electrogénica, 127, 128.  
   de extrusión de Na<sup>+</sup>, 156.  
   iónica, 152-156.  
   de protones, 53, 153-155.  
   de sodio, 156.  
 Boro, 195, 205, 208, 209.  
 Brasicinas, 520.  
 Brasicas, 724.  
 Britten y Davidson, modelo de, 537.  
 Brote,  
   Crecimiento del, 447.  
   Estructura del, 556.
- Cacahuete, 686, 687.  
 Cactáceas, 327.  
 Cactus, 772.  
 Cadena respiratoria, 412, 415.  
 δ-Cadineno, 740.  
 Cafeína, 687.  
 Calabaza, 180, 181, 450, 468, 475, 477,  
   481, 485, 526, 719, 720, 732, 733, 743.  
 Calcícolas, 211-213.  
 Calcifugas, 211-213.  
 Calcio, 38, 156, 173, 174, 195, 204, 206,  
   207, 211-213, 631.  
 Caliptra, 96.  
 Calmodulina, 156.  
 Calosa, 162-171.  
 CAM, 105, 153, 317.  
 Cámara subestomática, 110.  
 Cambium vascular, 553.  
 Campanuláceas, 315.  
 Canal iónico, 128.  
 Cáncer, 534.  
 «Cane gallo», 536.  
 Caña de azúcar, 183, 315, 343, 353.  
 Capa  
   de abscisión, 766, 767.  
   de aleurona, 640, 675, 676, 683, 699,  
   705.  
 Caracteres xeromorfos, 131, 133.  
 Carbamatos, 781.  
 Carboximetildimetil-ditiocarbamato, 461.  
 Carboxipeptidasas, 698, 699.  
 Carga  
   energética, 354, 708, 709.  
   del floema, 153, 178, 179.  
 β-Cariofileno, 740.  
 α-Caroteno, 257, 258, 264.  
 β-Caroteno, 257, 258, 264, 581, 740, 741.  
 δ-Caroteno, 264.  
 ζ-Caroteno, 264.  
 Carotenoides, 257, 258, 740.  
   Oxidación de, 352, 357, 516, 517, 519,  
   520.  
 Carotenos, 257.  
 Caspary, banda, 96, 157.  
 Catalasa, 207, 238, 668, 669, 704.  
 Catecoloxidasa, 707.  
 Catequina, 740.  
 Caulescencia, 482.  
 Caulocalina, 520, 564.  
 Cebada, 37, 355, 448, 450, 471, 474, 475,  
   481, 484, 526, 628, 639, 664, 668, 669,  
   676, 685, 686, 699, 705.  
 Cebolla, 636, 777, 784.  
 Célula cribosa, 153, 154, 162-165, 170,  
   171.  
 Células  
   accesorias, 110.  
   acompañantes, 162, 166, 170, 175, 177,  
   189.  
   albuminosas, 162, 171.  
   embrionales, 650, 674.  
   de guarda, 110.  
   intermediarias, 178.  
   del mesófilo, 318.  
   oclusivas, 110.  
   parenquimáticas, 162.  
   procambiales, 165.  
   somáticas, 431.  
   de transferencia, 178.  
   de la vaina, 318, 328.  
 Celulasa, 711, 718, 719, 738, 745, 746.  
 Celulasas, 766.  
 Celulosa, 35-37, 43-45, 49, 53, 61, 63-71,  
   708.

- Biosíntesis de la, 61.  
 Centeno, 646, 648, 653, 676.  
 Centro  
   meristemático, 568.  
   quiescente, 552-553.  
 Centrospermas, 328.  
 Ceras, 35, 41, 42, 72.  
 Ceras epicuticulares, 109.  
 Cereza, 726, 732, 736, 737, 741, 743.  
 $\beta$ -Cetoacetyl tiolasa, 704.  
 $\beta$ -Cetoacil-CoA, 704.  
 $\alpha$ -Cetoglutarato, 410.  
 Cianelo, 246.  
 Cianidina, 625, 740.  
 Cianuro, 401, 402, 416, 668, 669.  
 Ciclo  
   del azufre, 383, 384.  
   de Calvin, 303-309, 419.  
   dicarboxílico C-4, 321, 328.  
   glioxilato, 396, 669, 702, 703, 704.  
   de Krebs, 408-410.  
   del nitrógeno, 362, 363.  
   pentosasfosfato, 421, 422.  
   tricarboxílico reductivo, 332.  
 Ciclosis, 190, 191.  
 Cilindro vascular, 548.  
 Cinética de la absorción, 141-145.  
 Ciperáceas, 328.  
 Circumnutación, 599, 600.  
 Ciruela, 726, 729, 730, 733, 734, 740, 745, 747.  
 Cisteína, 207, 384, 385, 388-391, 659, 686.  
   Biosíntesis de la, 388.  
   sintetasa, 388.  
 Cistina, 207, 384.  
 Citocinesis, 43.  
 Citocromo  
   a, 403, 411, 412, 414, 417.  
   a<sub>2</sub>, 403, 411, 412, 414, 419.  
   b, 411, 415-417, 420, 581.  
   b<sub>3</sub>, 279.  
   b<sub>6</sub>, 279, 293.  
   b<sub>555</sub>, 412.  
   b<sub>557</sub>, 411.  
   b<sub>560</sub>, 411.  
   c, 410-417, 711.  
   c<sub>547</sub>, 411, 417.  
   c<sub>549</sub>, 411, 416, 417.  
   c-NADH reductasa, 413.  
   f, 279, 292, 293.  
   oxidasa, 207, 411, 453.  
 Citocromos, 279.  
 Citoquinina-oxidasa, 499, 515, 516.  
 Citoquininas, 485, 487, 501, 510, 525, 733.  
   y dominancia apical, 572-575.  
   y dormición, 661-672.  
   y germinación, 714, 719.  
   y maduración de frutos, 730, 731, 733, 744, 745.  
   y morfogénesis, 564, 569.  
   y transformación tumoral, 541.  
 Citral, 739.  
 Citratosintasa, 409, 704.  
 Citrulina, 173.  
 Climaterio, 742-748.  
 Clinostato, 589.  
   químico, 590.  
 Cloro, 195, 205, 208, 292.  
 Cloroetano, 659.  
 Clorofenilalanina, 57.  
 Clorofila, 205, 207, 285, 286, 349, 352, 357, 473, 474, 495, 687, 738, 742, 745, 746, 748.  
 Clorofila  
   a, 254.  
   b, 254.  
   c, 256.  
   d, 256.  
   de *Chlorobium*, 257.  
 Clorofilas, 254-257, 632.  
 Clorofilasa, 738, 759, 763.  
 Clorofilida a, 255.  
 Cloroplasto, 285-302.  
   Estructura del, 235-238, 357.  
   Membranas del, 240-243, 296-298, 300, 301.  
   Movimientos de desplazamiento del, 602-604, 616, 617.  
   Vector de DNA, 544.  
 Cloroplastos, 234-250.  
   Aislamiento de los, 238-240.  
   Composición de los, 238-240.  
   Envoltura de los, 240.  
 Clorosis, 203-205.  
 Cloruro de 2 cloroetiltrimetilamonio (CCC), 476, 478, 481, 482, 501.  
 CMU, 741.  
 Cobalto, 195, 216.  
 Cobre, 195, 205, 208, 219.

- Cociente respiratorio, 396, 397, 665, 666, 692, 693, 716, 743.
- Coco, 469, 487, 489, 732.
- Coefficiente de difusión de  $\text{CO}_2$ , 222.
- Coefficiente de reflexión  $\sigma$ , 86, 146.
- Coenzima A, 207, 384, 385, 389, 408, 410.
- Col de Bruselas, 649.
- Coleóptilo, 48, 50, 51, 53, 54, 56, 442-447, 462.  
y fototropismo, 579-582.  
y gravitropismo, 594.
- Coleoriza, 675.
- Colesterol, 484.
- Coliflor, 205.
- Colina- $\text{C}^{14}$ , 484.
- Colonización genética, 536.
- Columela, 585.
- Complejo  $b_6$ -ctf, 293.
- Complejo  $\text{CF}_1$ - $\text{F}_0$ , 155, 297.
- Complejo clorofila a/b proteína, 265, 266, 283, 285.  
 $\text{F}_1$ - $\text{F}_0$ , 417.  
P700-clorofila a-proteína, 265, 266, 283, 285.  
receptor-fitocromo, 630.
- Complejos proteína-clorofila, 265, 266, 283, 285.
- Compuestas, 328.
- Conaraquina, 686.
- Concentración crítica, 199, 202.
- Condiciones desfavorables, 770-786.
- Conductancia hidráulica de una membrana ( $L_p$ ), 85, 102, 103.
- Conductividad hidráulica ( $L$ ), 102, 103.
- Conservación de la energía, 291-293.
- Constante de Planck, 266.
- Control fotosintético, 282, 291.
- Control respiratorio, 408.
- Copilil pirofosfato, 476-478.
- Coproporfirinógeno, 262.
- Cordicepina, 626.
- Correlaciones de crecimiento, 569-575.
- Corriente citoplasmática, 601-602.  
de circulación, 602.  
en manto, 602.  
Microfilamentos en, 602.  
en surtidor, 602.  
de turbulencia, 602.  
por vías, 602.
- Corrientes citoplasmáticas, 190, 191.
- Corrientes transcelulares, 191.
- Córtex (corteza), 96, 97.
- Cotransporte, 153.
- Crafts y Broyer, hipótesis de, 98, 158.
- Crasuláceas, 329.
- Crecimiento, 429, 432, 435-439.  
almacenado, 56.  
celular, 41.  
en mosaico, 67.  
protoplásmico, 67.  
en red múltiple, 67.
- Criptocromo, 583, 620, 632.  
significación ecológica del, 632.
- Criptofitas, 258.
- Criptoxantina, 740.
- Cromatina, 500.
- Cromatóforos, 234.
- Cromo, 213.
- Cromoplastos, 248.
- Crotonasa, 704.
- Crotonil-CoA, 704.
- «Crown gall», 539.
- Cuanto, 269.
- Cuantosomas, 243.
- Cubierta seminal, 667, 693, 698, 706, 707.
- Cucurbitáceas, 329.
- Cuerpo, 556, 557, 560, 562.
- Cuerpo prolamelar, 246.
- Cuerpos  
lipídicos, 681, 686, 687, 702, 704.  
proteicos, 676, 678, 680, 698, 699, 701.
- Cultivo  
de callos, 430, 530.  
de células, 430, 530.  
en experimentos de diferenciación, 530.
- Cultivos de arena, 198.
- Cumarina, 662.
- Cumarinas, 522, 526.
- Curva de acción, 199.
- Curva sigmoide, 432, 434, 436-438, 441.
- Curvas de absorción, 141.
- Cutícula, 109, 654.
- Cutina, 35, 41, 42, 73, 671.
- Cutinización, 73.
- Chailakhyan, hipótesis de, 640-641.
- Chalcona sintasa, 626.  
gravitropismo, 588-590.

- Chirimoya, 743, 748.  
 Cholodny-Went, teoría de, 582.  
   en fototropismo, 582, 583.  
   en gravitropismo, 593-595.  
 Chopo, 658, 659.  
 Choque térmico, 774, 775.
- Dátil, 685, 713, 726, 734, 735, 737, 740.  
 DAPP (véase dimetil-atil-pirofosfato), 260, 263.  
 DCMU, 244, 275, 278, 603, 781, 782.  
 Deficiencias, 202-209.  
 Deficiencias minerales, 357.  
 Déficit de presión de difusión (DPD), 78, 81, 83, 90.  
 Delfidina, 195.  
 Delfinidina, 740.  
 Dendrógrafo, 103.  
 Descortezamiento anular, 161, 162.  
 Desecación, 772, 773.  
 Desepoxidasa, 352.  
 Desnitrificación, 363.  
 Destiogluco-brasicina, 449, 450.  
 Desvernalización, 644, 650, 652.  
 Dextrina límite, 695.  
 Dextrinasa, 695.  
 DHAP (véase dihidroxiacetona fosfato).  
 Día corto, 636-645, 657, 658, 660, 661.  
 Día largo, 636-645, 657-661, 696.  
 Diadinoxantina, 254, 255.  
 Dibromotimoquinona, 292.  
 2, 4-Diclorofenol, 522.  
 $\gamma$ ,  $\delta$ -Dicetovalerato, 259, 261.  
 2,4-Diclorofenoxiaceticético, 509.  
 Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridonio, 781.  
 Dictiosoma, 166, 171, 676.  
 Diferenciación, 429, 432, 529-545, 546, 556, 559, 566-567, 569.  
   embrioides haploides de microsporas, 530-531.  
   Mecanismo de la, 532-538.  
   y protoplastos, 531-532.  
   y regeneración en cultivo de tejidos, 529-530.  
   1,3-Difosfoglicerato, 306, 400, 401.  
 Difusión, 146-147, 185.  
 Digitonina, 402.
- Dihidroxiacetona-fosfato, 306, 307, 310, 400.  
 3,4-Dihidroxicumarina, 527.  
 3',4'-Dihidroxi-flavonoides, 524.  
 Dihidrozeatina, 487, 493, 498.  
 Dimetil-alil-adenina, 488, 490.  
 Dimetil-alil-pirofosfato, 260, 262, 472.  
 6,7-Dimetoxi-2-benzoxazolinona, 462.  
 Dinitroanilidas, 771.  
 2,4-Dinitrofenol, 455.  
 Dipeptidasa, 699.  
 Discriminación isotópica en fotosíntesis, 328-329.  
 Diurón, 751.  
 División  
   anticlinal, 554.  
   celular asimétrica, 550, 551.  
   polarizada, 550.  
   desigual, 537.  
   periclinal, 554.
- DNA (ácido desoxirribonucleico), 487, 492, 499, 509.  
 Autoduplicación (replicación) del, 532, 534.  
 cDNA, 619.  
 de cloroplastos, 243-246, 781.  
 Propiedad autocatalítica del, 534.  
 Propiedad heterocatalítica del, 533.  
 repetitivo, 534.  
 T-DNA, 540, 543.  
 Transcripción del, 532, 533.
- Dominancia apical, 570.
- Donnan  
   Espacio libre de, 149.  
   Potencial de, 148-150.  
   Sistema o mecanismo de, 148-150.
- Dormición, 647, 655-673.  
 Semillas, 662-673.  
 Tipos de, 662-667.  
   regulación hormonal, 669-673.  
   regulación metabólica, 668, 669.
- Yemas, 656-662.  
 Cese, 658-659.  
 inducción, 657, 658.  
 regulación hormonal, 659-662.
- DPIP, 278.
- Ecuación  
 general de la fotosíntesis, 361.

- de Michaelis, 228.
- de Nernst, 145.
- Edestina, 686.
- Efecto
  - Emerson, 273, 274.
  - lente en fototropismo, 585-586.
  - pantalla en fototropismo, 586.
  - Pasteur, 421.
  - del pH del suelo, 768.
  - Tanada, 628.
  - Warburg, 355.
- Efectos de las bajas temperaturas, 274-277.
- Efectos fisiológicos de la altitud, 779.
- Eficiencia
  - fotoquímica, 361.
  - fotosintética, 360, 542.
  - máxima diaria, 361.
- Eje embrionario, 683.
- Elaioplasto, 248.
- Electro-ósmosis, 188-190, 206.
- $\beta$ -Elemento, 739, 740.
- Elementos
  - esenciales, 194, 195.
  - no esenciales, 194, 195.
  - minerales, 193.
- Elemicina, 739.
- ELISA en fitocromo, 609.
- Embrioides, 530-531.
  - de células somáticas, 530.
  - haploides de microsporas, 530.
- Endodermis, 96, 97, 98, 157, 158.
- Endoglucanasa, 49.
- Endopeptidasas, 698.
- Energía
  - de un fotón, 269.
  - libre, 152, 430.
- Enolasa, 400, 694, 704.
- Entropía, 430.
- Envejecimiento, 732, 744-746, 758-766.
- Enzima
  - desramificadora, 695, 697.
  - inmunoensayo, 446.
  - málica, 208, 323, 324, 331, 414, 743.
  - ramificadora, 677, 678.
- Epicatequina, 740.
- Epicotilo, 666, 683, 688.
- Epimerasas, 307.
- Epinastia, 596.
- Epitemas, 138.
- Epoxi-caroteno, 352.
- Equinenona, 257.
- Eritrosa, 4-P, 64, 209, 423.
- Esclereidas, 162.
- Escopoletina, 492, 527.
- Escopolina, 492.
- Esculetina, 527.
- Espacio libre, 142, 149, 677.
  - del agua, 149.
  - aparente, 149.
  - de Donnan, 149.
- Espectro
  - de absorción de los pigmentos fotosintéticos, 251-253, 349.
  - de acción de la fotosíntesis, 250, 350.
- Espectrofotómetro diferencial, 273.
- Espectrometría de masas, 446.
- Espesamientos nacarados, 165.
- Espinaca, 287, 288, 481.
- Esquema Z, 274-281.
- Estados electrónicos excitados, 270-273.
- Estaquiosa, 174, 179, 685.
- Estatolito, 588-593.
  - Teoría del, 588-593.
- Éster metílico del dicloroprop, 781.
- Esteroles, 517.
- Estilete de áfidos, 162, 172, 183.
- Estomas, 105, 109-112, 153, 206, 208, 223, 224, 350, 355, 395, 597, 632.
- Estratificación, 663-666.
- Estricnina, 687.
- Estroma, 235, 307.
- Etanol, 399-401, 424, 693, 694.
- Etil- $\delta$ -metilbutirato, 739.
- Etileno, 503-512, 564-567, 575, 669-671, 768.
  - y maduración de frutos, 742-749.
- Etioplasto, 246.
- Euforbiáceas, 328.
- Eufenol, 739.
- Euglenofitas, 258.
- Exoglucanasa, 49.
- Exopeptidasas, 698.
- Extensina, 41, 63.
- Extracto de levadura, 487.
- Factor
  - de ablandamiento, de la pared, 49, 51.
  - CF<sub>1</sub>, 155, 297.

- CF<sub>0</sub>, 155, 297, 402.  
 F<sub>1</sub>, 155, 404.  
 F<sub>0</sub>, 404.  
   limitante, 345, 346.  
   reductor del oxígeno, 299.  
 Farneseno, 731.  
 Farnesil pirofosfato, 260, 476, 477.  
 Farnesil pirofosfato sintetasa, 477.  
 Fase  
   de citodiferenciación, 568, 569.  
   fotoquímica, 289.  
   organogenética, 568, 569.  
 Faseolina, 543.  
 Fases de la vida de las plantas, 756-758.  
 Fenilacetaldehído, 451.  
 Fenilalanina, 63, 64, 399, 451.  
 Fenilalanina-amonio-liasa, 524, 525, 624-626.  
 L-fenilalanina amonio-liasa (PAL) y fitocromo, 624-626.  
 Fenilurea, 496.  
 Fenolasa, 208, 711, 738.  
 Fenoles, 458, 524, 527, 567, 569, 663, 671, 707, 738, 739, 740, 782.  
   Mono, 457.  
   P-dihidro, 457.  
   Poli, 457.  
   Sustancias fenólicas, 520.  
 Fenoxiderivados, 781.  
 Feolítina, 278.  
 Fermentación, 399-402.  
 Ferredoxina, 207, 278, 289-291, 296, 309, 366-368, 374, 376, 378, 379, 389, 391.  
 Ferredoxina-NADP-oxidoreductasa, 278.  
 Ferredoxina-tiorredoxina-reductasa, 309.  
 Ferricianida, 289.  
 Ferricianuro potásico, 413.  
 Fibras, 162.  
 Fibrilla, 37, 43, 44, 61.  
 Fibrilla elemental, 36.  
 Fick  
   Primera ley de, 146.  
   Segunda ley de, 147.  
 Ficobilinas, 258, 259.  
 Ficobiliproteínas, 258.  
 Ficocianinas, 258.  
 Ficoeritrinas, 259.  
 Fijación biológica del N<sub>2</sub>, 363-370, 542.  
 Fijación del N<sub>2</sub>, 209.  
 Filocalina, 558.  
 Filotaxis, 560.  
 Fisiología vegetal, 28-32, 443.  
 Fitasa, 705.  
 Fitina, 679, 686, 687, 705, 707, 709.  
 Fitoalexinas, 520, 782.  
 Fitocromo, 261, 479, 485, 501, 512, 521, 606, 633, 658, 665, 669, 673.  
   Antecedentes históricos del, 607-608.  
   Calcio en, 631.  
   Degradación del, 614.  
   Detección del, 608-610.  
   Especificación de la pauta, 623.  
   Espectro de absorción del, 613.  
   Espectro de acción del, 612.  
   Estado fotoestacionario del, 613, 632.  
   Estructura del, 610, 611.  
   Fotoconversión del, 608-612.  
   Fotorrespuestas del, 620-622.  
   Fotoperiodismo del, 644-645.  
   Fototropismo del, 581, 583-584.  
   Intermediarios de fotoconversión del, 611-613, 615, 622.  
   Localización del, 615-617.  
   Mecanismo de acción del, 622-631.  
   Movimiento cloroplasto del, 602-604, 631.  
   Multiplicidad de acción del, 622, 629.  
   Propiedades del, 608-614.  
   Reacción primaria del, 629-631.  
   Reacción de alta energía del, 617-620.  
   Realización de la pauta, 623.  
   Regulación expresión génica del, 622-628.  
   Regulación permeabilidad membranas del, 628-631.  
   Reversión oscura del, 612, 614.  
   Reversión oscura inversa del, 614.  
   Significación ecológica del, 632.  
 Fitoeno, 264.  
 Fitoflueno, 264.  
 Fitoglucógeno, 735.  
 Fitoheamaglutininas (lectinas), 363.  
 Fitol, 253, 525.  
 Flavina/citocromo b  
   fotorreceptor del fototropismo, 581.  
 Flavodoxina, 366, 368.  
 Flavonoides, 522, 524-527.  
 Fleinas, 315.  
 Floema, 96, 97, 161-192.  
   Citología del, 164-178.

- Dirección del transporte del, 177-182.  
 Elementos del, 162-164.  
 Estructura del, 162-171.  
 Intensidad y velocidad del transporte del, 176.  
 Mecanismos de transporte por el, 185-192.  
 Sustancias transportadas por el, 171-176.  
 Transporte por el, 186.
- Floración**, 440, 634.  
 Fisiología de, 634.  
 y fitocromo, 644-645.  
 y florigeno, 640-642.  
 y hormonas, 640, 650.  
 y ritmos endógenos, 645.  
 y vernalina, 650-652.
- Floretina**, 525.
- Florigeno**, 520, 640-642.  
 Evidencias fisiológicas del, 639, 640.  
 Naturaleza química del, 640.
- Florizina**, 291, 525.
- Flujo**  
 del agua en plantas, 85, 91, 102, 104.  
 del CO<sub>2</sub>, 105, 224, 228.  
 hidráulico, 85, 86, 102, 104.  
 interfacial, 185, 186.  
 en masa, 151, 183, 185.  
 de presión, 186-188.  
 de protones, 152, 294.
- Fluorescencia de clorofilas**, 270-273.
- Fluorofenilbiuret**, 497.
- Fluoruros**, 780.
- Formación de la raíz**, 553-555.
- Formas de los pigmentos fotosintéticos *in vivo***, 265, 266.
- Fosfatasa ácida**, 165, 167.
- Fosfatasa**, 307.
- Fosfatidil-colina**, 404.
- Fosfatidiletanolamina**, 404.
- Fosfatidilglicerol**, 404.
- Fosfatidilinositol**, 404.
- 3'-Fosfo-adenosina-5'-fosfosulfato (PAPS)**, 385-386.
- Fosfoenolpiruvato**, 400, 401, 420.
- Fosfoenol-pirúvico-carboxikinasa**, 324, 330, 704.
- Fosfoenol-pirúvico-carboxilasa**, 125, 321, 322, 327, 329, 331.
- Fosfofructosa kinasa**, 313, 400, 424, 667, 694, 704, 716, 743.
- 2-Fosfoglicerato**, 400, 704.
- 3-Fosfoglicerato**, 289, 400, 401, 704.
- Fosfoglicerato kinasa**, 400, 704.
- 3-Fosfoglicerato kinasa**, 307.
- Fosfogliceromutasa**, 400, 694, 704, 709.
- Fosfoglucoisomerasa**, 424.
- Fosfoglucomutasa**, 314.
- Fosfogluconato**, 422.
- Fosfogluconato deshidrogenasa**, 210, 422.
- Fosfoglucosa isomerasa**, 314, 400, 694, 704.
- Fosfoglucosa mutasa**, 677, 704.
- Fosfolipasa**, 207.
- Fosfolípidos**, 404, 484, 686, 738.
- Fosfón D**, 476, 478, 481, 482.
- Fosfopiruvato sintetasa**, 356.
- Fosforescencia**, 270.
- Fosforilación**, 355.
- Fosforilación oxidativa**, 252, 414, 415.  
 Mecanismos de, 416-419.
- Fosforilasa**, 58, 314, 315, 695, 697, 712, 738.
- Fósforo**, 195, 203, 206, 210, 213.
- Fotoexcitaciones**, 269-273.
- Fotofosforilación**, 152, 287-302, 522.  
 acíclica, 279.  
 cíclica, 279, 288, 289.  
 no cíclica, 288, 289.  
 Mecanismo de, 293-299.  
 pseudocíclica, 301.
- Fotólisis del agua**, 208, 215, 288, 293, 296.
- Fotomorfogénesis**, 153, 600, 606, 607, 632.  
 fotorreceptor (véase fitocromo y criptocromo).
- Fotón**, 269.
- Fotonastia**, 596, 597, 606.
- Fotooxidación**  
 del aparato fotosintético, 350.  
 de la clorofila, 350, 352.
- Fotoperiodismo**, 634-646.  
 antesina, 641.  
 Descubrimiento y concepto del, 634-636.  
 fitocromo, 644-645.  
 florigeno, 640-642.  
 Fotoperiodo crítico, 636.  
 Giberelinas, 650.  
 Inhibidores del, 642.

- Interacción luz-oscuridad, 642-643.  
 Naturaleza hormonal del, 640-642.  
 Percepción e inducción floral del, 639-640.  
 Planta de día corto (PDC), 636-637.  
 Planta de día largo (PDL), 636-637.  
 Planta de día neutro (PDN), 636, 638.  
 Respuestas fotoperiódicas, 636-639.  
 Ritmos endógenos, 636, 638, 639, 645-646.
- Fotorreceptores  
 de la fotomorfogénesis, 608, 610, 611, 613, 631, 632.  
 del fotoperiodismo, 644-645.  
 del fototropismo, 580-581, 583, 584.
- Fotorrespiración, 334-343, 542.  
 Medida de la, 334, 335.
- Fotosíntesis, 183, 207, 208, 222, 352.  
 del azufre, 391.  
 c-3, 317, 328.  
 c-4, 317-329.  
 Capacidad de, 436.  
 Espectro de acción de la, 251, 252, neta, 355.  
 del nitrógeno, 375-376, 377, 379.  
 Proceso luminoso de la, 267-283.  
 Proceso oscuro de la, 267-283.  
 en plantas suculentas, 329-331.  
 Transporte de electrones, 275-283.
- Fotosistema I, 275-281, 292, 293.  
 Fotosistema II, 207, 208, 275-281, 293.
- Fototropismo, 578-586, 606.  
 auxina, 582-583.  
 carotenoides, 581.  
 de coleoptilo de gramínea, 579-583.  
 de *Phycomyces*, 585-586.  
 de plántulas de dicotiledóneas, 583.  
 de protonemas de helechos, 583-584.  
 Espectro de acción del, 581.  
 Flavinas, 581, 583.  
 Fotorreceptor del, 579-581.  
 Luz visible, y UV, 581, 583, 585.
- Fototropismos, 439.
- F6P (véase fructosa-6-fosfato).
- Fracción proteínica, 1, 245.
- Fragmoplasto, 43.
- Frambuesa, 717.
- Fresa, 724-726, 729, 732-736, 740, 741, 743.
- Fresal, 98.
- Fructificación, 440.
- Fructosa, 174, 179.  
 1,6-difosfatasa, 309.  
 2,6-difosfato, 313, 316.  
 6-fosfato, 306, 311, 400.
- Frutos, 722-751.  
 Composición química de los, 734-741.  
 Crecimiento de los, 724-727.  
 Formación de los, 723, 724.  
 Maduración de los, 742-751.  
 partenocárpicos, 732, 733.
- Fructosanos, 315.
- Fucosa, 36-38.
- Fuerza motora de protones, 152, 296, 299-301, 414.
- Fuerza de succión (FS), 78, 83, 90.
- Fuerza motora de protones ( $\Delta p$  o pmf), 152.
- Fumarasa, 409, 704.
- Fumarato, 704.
- 6-Furfuril amino purina, 487, 496.
- Fusicoocina, 521, 522, 672, 673.
- Fusión celular, 531, 542.
- GA-3P (véase gliceraldehído-3-fosfato).
- Galactano, 44.
- Galactolípidos, 240, 241.
- Galactomananos, 37, 685.
- Galactosa, 36, 38, 40, 174.  
 D-galactosa-1-P, 58.  
 UDP-D-galactosa, 58, 59, 66.
- Galactosidasa, 49, 55.
- Galactosil-diglicéridos, 686.
- Garbanzo, 682, 684, 697, 708, 712, 714, 717-719.
- Gas del alumbrado, 503.
- GDP-glucosa, 61.
- Genes  
 Control negativo de actividad de, 535.  
 Control positivo de actividad de, 535.  
 Efector de, 535.  
 Hup, 370.  
 Nif, 370.  
 Operador, 535.  
 Operón, 535.  
 Redundancia génica de, 534.  
 Regulación actividad de, 534.  
 Regulación amplificación de, 534.  
 Regulación de la traducción de, 534.

- Regulación de la transcripción de, 534-538.  
 Reguladores, 535.  
 Saltadores, 544.
- Genisteína, 522.  
 Georgiev, teoría de, 536.  
 Geotropismo (véase gravitropismo).  
 Geraniáceas, 326.  
 Geranial, 739.  
 Geranil-geranil pirofosfato, 263, 476-479.  
 Geranil-geranil pirofosfato sintetasa, 476, 477.  
 Geranil pirofosfato, 263, 476.  
 Germen de trigo, 719.  
 Germinación de semillas, 687-721.  
 y fitocromo, 607, 608, 620, 621.  
 Giberelina A y X, 469.  
 Dormición, 656, 669, 670, 671.  
 y germinación, 689, 713, 714, 719-721.  
 Maduración, 744-749.  
 y morfogénesis, 558-566.
- Giberelinas, 469-482, 510, 515, 516, 522, 526, 527, 763, 765.  
 y florigeno, 641.  
 y fotoperiodismo, 641.  
 y vernalización, 650.
- Gimnospermas, 766.
- Girasol, 344, 345, 355, 360, 448, 468, 543, 639.
- Glándula salina, 204, 207.
- Gliadina, 685.
- Gliceraldehído-3-fosfato, 304, 305, 400, 401, 423.  
 Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 307, 309, 400, 694, 704, 709.  
 Glicerato, 337, 338.  
 Glicina, 337-338.  
 Glicina descarboxilasa, 338.  
 Glicinina, 686.  
 Glicolato fosfato de, 335-337.  
 Glicolato oxidasa, 336, 337, 339.  
 Glicolípido, 60, 686, 738.  
 Glicoproteína, 62, 66, 678, 679.  
 Glicosilación, 63.  
 Glifosfato, 782.  
 Glioxalato, 336, 337.  
 Glioxisoma, 396, 402, 664, 702-704.  
 Globulinas, 680, 685, 686.  
 Glucanasas, 41, 49.  
 $\alpha$ 1.6, 41, 49.  
 $\beta$ 1.3, 41, 49.  
 $\beta$ 1.4, 41, 49.  
 $\beta$ 1.6, 41, 49.
- Glucano, 37, 45, 56.  
 no celulósico, 37, 45.  
 mixto, 37.  
 Glucobrasícina, 448-451.  
 Glucolisis, 399-402.  
 Glucomananos, 37.  
 Gluconeogénesis, 703.  
 O- $\beta$ -D glucopiranosil, éteres, 479.  
 Glucosa, 35-37, 58, 174, 179, 210, 399-402, 508, 668, 697.  
 no celulósica, 49, 51, 57.  
 6-P, 58, 59, 400, 401, 422, 423, 668, 669, 677.  
 1-P, 58, 399, 677, 695, 697, 704.  
 6-P, cicloaldolasa, 59.  
 Glucosa-1-fosfato, 311-314.  
 Glucosa-6-fosfato, 311-314.  
 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 205, 423, 659.  
 Glucosamina, 680, 681.  
 Glucosidasa, 759.  
 $\beta$ -glucosidasa, 500.  
 Glucósidos, 500.  
 7-Glucósidos, 499.  
 9-Glucósidos, 499.  
 Glucósidos de citoquininas, 493, 500.  
 $\beta$ -D Glucosil ésteres de gas, 469, 470.  
 Glucuroarabinosilano, 37, 45.  
 Glumifloras, 326.  
 Glutamato deshidrogenasa (GDH), 365, 376, 379, 381.  
 Glutamato-oxalacetato aminotransferasa, 377.  
 Glutamato-oxalacetato transaminasa, 311.  
 Glutamato-piruvato aminotransferasa, 377.  
 Glutamato semialdehído, 259.  
 Glutamato sintasa, 378-380.  
 Glutamina, 377-379, 685, 686.  
 Glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT), 377, 378-380.  
 Glutamina sintetasa, 377-381.  
 «Glutation», 524.  
 Glutelina, 678, 685.  
 Gradiente electroquímico, 296, 297, 301.

- de pH, 152, 291-293, 294, 296, 299, 301.  
de protones, 152, 297, 298.
- Gramíneas, 328, 537, 543.
- Grana, 235.
- Gravitropismo, 153, 577, 578, 586-596.  
ácido abscísico, 595.  
ácido endolacético (auxina), 593-595.  
cuerpos brillantes, 588-590.  
en Chara, 588-590.  
epidermis en, 595.  
estrolito, 588, 589, 591.  
giberelinas, 595.  
inhibidores, 595.  
gravipercepción, 588-593.  
en plantas superiores, 590-593.  
respuesta gravitropica, 587-588.
- Gruinales, 328.
- Grupos sulfidrilo, 207, 291, 299, 670, 688.
- Guisante, 56, 364, 444, 448, 450, 455, 473, 474, 477, 481, 484, 485, 489, 490, 498, 509-511, 524, 526, 667, 686, 696, 699, 712, 716, 720.
- Gutación, 98.
- Haba, 714.
- Hadacina, 573-574.
- Hagen-Poiseuille, ecuación de, 102.
- Halofitas, 209, 210, 777.
- «Hairy root», 540.
- Haptotropismo, 577, 600.
- Haya, 651.
- Helmintosporol, 521, 522.
- Hemicelulosa, 37, 45, 684, 685, 735.  
Biosíntesis de la, 62.
- Heptulosa, 735.
- Heterocarión, 531.
- Herbicidas, 542, 780-783.
- Hexanal, 739.
- 2-Hexenal, 739.
- Hexokinasa, 400.
- Hexosa-P-isomerasa, 677.
- Hexosas monofosfato, 492.
- Híbrido somático, 531-532, 533.
- Hidatodos, 98, 138.
- Hidrofitas, 771.
- Hidrogeniones, 402, 403.  
Excreción de, 51, 53, 55, 152-156, 207, 292-294, 410, 416-418.
- Hidrógeno, 194, 195, 397.
- $\alpha$ -Hidrokaurenoico, 477, 478.
- Hidroquinona, 417.
- Hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa, 704.
- 4'-Hidroxi flavonoides, 524.
- Hidroxi lamina, 659.
- $\beta$ -Hidroxi- $\beta$ -metil-glutavil-CoA, 260, 263.
- Hidroxi metil transferasa, 336.
- Hidroxi piruvato, 336.
- Hidroxi prolina, 39, 41, 53, 66.
- Hierro, 195, 204, 207, 213.
- Higo, 726, 732, 734, 737, 741, 743.
- Hipocotilo, 666, 683, 688.
- Hiponastia, 596.
- Hipótesis quimiosmótica, 152, 294, 296, 299, 300, 416, 417.
- HIR (reacción de alta irradiancia), 617-620.
- Histogénesis, 431.
- Histonas, 536.
- Hoja, 347, 560.  
Desarrollo de la, 560-562.  
de sol, 348, 354.  
de sombra, 348, 354.
- Homocisteína, 389.
- Homologías, 439.
- Homoserina, 508.
- Hordeína, 658, 685.
- Hormonas  
esteroidicas, 483, 484.  
vegetales, 440.
- Humuleno, 740.
- Imbibición, 689, 705, 706, 711, 717, 721.  
«Import», 154.
- Índice del área foliar (LAI), 359, 360.
- Indolacetaldehído, 448-451, 458.
- Indolacetaldoxíma, 449, 450.
- Indolacetaldoxíma hidrolasa, 451.
- Indolacetónitrilo, 448-451.
- Indolaldehído deshidrogenasa, 450.
- Indol-3-etanol, 448.
- Información genética, 439, 532-538.
- Informosomas, 536.
- Ingeniería genética, 542.
- Inhibición de fotosíntesis, 354.
- Inhibidor  $\beta$ , 513, 515, 661.
- Inhibidores de proteasas, 690, 717.
- Inhibidores de la respiración, 439.
- Interacción binaria, 201.

- Interacción terciaria, 201, 202.  
 Intensidad fotosintética, 346, 354.  
 Intensidad luminosa, 230, 360.  
 Intensidad de la transpiración, 116.  
 Intercambio iónico, 150.  
 Intususcepción, 67.  
 Inulinas, 315.  
 Inundación, 773.  
 Invertasa, 180, 677.  
 Iones,  
   Absorción activa de, 98, 151-156.  
   Absorción pasiva de, 145-151.  
 IP (véase isopentenil pirofosfato).  
 Isocitrato deshidrogenasa, 409.  
 Isocitrato liasa, 703, 704,  
   y fitocromo, 627.  
 Isomerasas, 307.  
 Isopentenil acetato, 739.  
 Isopentenil pirofosfato, 260, 263, 476,  
   477.  
 Isopreno, 517.  
 Isoprenoides, 516.
- Jacob y Monod, teoría de, 535.  
 Judía, 364, 543, 628, 636.  
 Judía francesa, 180.  
 Judía de Mungo, 628.  
 Jugo floemático, 172-174, 188.  
   Exudación del, 166, 167, 172, 173.  
   Composición del, 167, 173.  
 Juventud de las plantas, 756, 757.
- Kaurenal, 477, 481.  
 Kaureno sintetasa, 477-479.  
 Kaurenol, 477, 478.  
 Kempferol, 524, 525.  
 Kenferol, 713, 740.  
 Kinasas, 307.  
 Kinetina, 568, 571, 573, 714, 715, 730,  
   762-765.
- Labiadas, 329.  
 Lacasa, 202, 208.  
 Lactato, 399-401.  
 Lactato deshidrogenasa, 384, 385, 400,  
   401, 667, 694.  
 $\delta$ -Lactona, 475.
- Lamelas, 235.  
 Lámina media, 43, 206, 748.  
 Laticíferos, 162.  
 Laurel, 165.  
 Leche de coco, 559.  
 Lechuga, 473, 475, 481, 489, 491, 501,  
   526, 636, 664, 665, 667, 670, 671, 718.  
 Lecitina, 484.  
 Lectinas (fitohemaglutininas), 365.  
 Leghemoglobina, 365.  
 Legúmina, 685, 686, 700.  
 Leguminosas, 364, 767.  
 Lenteja, 684, 696, 697, 699, 701, 702.  
 Lenticela, 109, 393.  
*Lepidium sativum*  
   estatocito, 588, 591, 592.  
 Leucoplastos, 248.  
 Levaduras, 368.
- Ley  
   de Fick, 130, 146-147.  
   del interés compuesto, 434.  
   de Kirchhoff, 229.  
   del mínimo, 194, 199.  
   de Mitscherlich, 199.  
   de Ohm, 91, 228.
- LHCP, 626.  
 Licopeno, 264, 713, 740.  
 Lignina, 35, 41, 72, 419.  
   Biosíntesis de la, 63-65.  
   Lignificación, 72.  
 Liliáceas, 329.  
 Lima, 732, 734, 735.  
 Limón, 729, 732, 734, 735, 737, 741, 743,  
   747.  
 Limoneno, 739, 740.  
 Limonina, 741.  
 Lino, 68.  
 Lipasa, 699, 703, 704, 717.  
 Lípidos intermediarios, 60.  
 Lipooxigenasa (LOG), 626-627, 702,  
   y fitocromo, 626-627.  
 Lisímetros, 116.  
 Lisina, 685.  
 Luteína, 257, 258, 264, 713, 740.  
 Luz, 233, 347, 350,  
   azul, 186, 233, 291, 347, 350, 620, 656,  
   691.  
   y cloroplastos de *Mougeotia*, 602-  
   604.  
   y fototropismo, 581, 583, 585-586.

- y scismonastias, 598.
  - roja, 180, 611-619, 649.
  - y cloroplastos de Mougeotia, 603.
  - y fototropismo, 584.
  - y polarotropismo, 584.
  - rojo-lejano, 180, 611-619, 649.
- Lluvia ácida, 780.**
- Macronutrientes, 195.**
- Madurez, 757.**
- Magnesio, 154, 173, 174, 195, 201, 204, 207, 281, 292, 367, 368, 377, 678, 705.**
- Magnolia, 165.**
- Maíz, 37, 203, 345, 353, 355, 356, 357, 447, 448, 452, 453, 454, 455, 462, 466, 473, 474, 489, 492, 500, 594, 617, 661, 678, 685, 715, 724.**
- Malformina, 521.**
- Malato**
- cálcico, 206, 212.
  - deshidrogenasa, 409, 412, 714.
  - sintetasa, 694, 695.
- Málico deshidrogenasa, 127, 323, 331.**
- Maltasa, 703, 704.**
- Maltosa, 695, 735.**
- Maltotriosa, 695.**
- Malvidina, 740.**
- Manano, 685.**
- Mandarina, 733, 739, 740, 741, 743.**
- Manganeso, 195, 204, 207, 292, 377.**
- Manglares, 778.**
- Mango, 733, 735, 748.**
- Maninotriosa, 174.**
- Manipulación genética, 542.**
- D-Manitol, 172, 183, 404.**
- Manosa, 36, 62, 680, 681, 735.**
- GDP-Manosa, 60, 62.**
- Manzana, 452, 522, 524, 724-748.**
- Marchitamiento, 205, 208.**
- Mecanicistas, 29.**
- Mecanismo dual en la absorción, 144-145.**
- Mecanismo unitario en la absorción, 144-145.**
- Mecanismos de evitación, 771.**
- Mecanismos de resistencia, 771.**
- Melibiosa, 174.**
- Melocotón, 726, 728, 730, 733-735, 741, 743, 744, 747.**
- Melocotonero, 422.**
- Melón, 446, 732, 734, 735, 737, 741, 743, 747.**
- Membrana citoplasmática, 48, 53, 63, 154, 179, 206, 207, 671, 735.**
- Meristemo, 431, 545.**
- apical, 452, 556, 557, 558, 563, 565, 570, 656.
  - subapical, 557.
  - marginal, 560, 561.
- Mesófilo**
- de empalizada, 318.
  - esponjoso, 318.
  - lagunar, 318.
- Mesofitas, 771.**
- Metabolismo ácido de crasuláceas, 153, 329-331.**
- Metabolismo del oxígeno, 283, 284.**
- Metales pesados, 213, 214.**
- Metalo proteasas, 697.**
- Metil-N-metilantranilato, 740.**
- Metil zeatina, 488.**
- 3-Metilen oxi-indol**
- y fototropismo, 567.
- 3-Metilen-2-oxindol, 457, 458.**
- Metilseleno cisteína, 195.**
- 5-Metiltioadenosina, 504, 508.**
- 5-Metilribose, 504, 508.**
- 0-Metileugenol, 739.**
- Metional, 506.**
- Metionina, 204, 384, 385, 389, 504, 506-509, 685.**
- Biosíntesis de, 389.
- Método**
- de la cámara de presión, 88-89, 103.
  - de Chardakov, 87-88.
  - unifactorial, 199.
- 6-Metoxi-2-benzoxazolinona, 462.**
- Mevalonato, 732.**
- Mevalonil pirofosfato, 476.**
- Mg 2,4-divinilfeporpirina  $\alpha_9$ , 259, 261.**
- Michaelis-Menten, ecuación de, 143.**
- Micorrizas, 95.**
- Microfibrilla, 36, 37, 66-68, 70.**
- orientación de, 68.
- Micronutrientes, 195.**
- Microtúbulos, 67, 166.**
- Mini Ti, 543.**

- Mio-inositol, 43, 59, 679, 705, 735.  
 Miosotis, 481.  
 Mirosinasa, 448.  
 Mitocondrias  
   Aislamiento y purificación, 404, 405.  
   Determinación de la actividad respiratoria, 405-408.  
   Estructura, 402, 403.  
   Vectores de DNA, 544.  
 Mitosis, 42, 529.  
 Modelo Z, 281.  
 Molibdeno, 195, 205, 209, 365-368, 371.  
 Monóxido de carbono, 668.  
 Monurón, 750.  
 Mora, 733.  
 Morfactina en gravitropismo, 596.  
 Morfactinas, 462.  
 Morfogénesis, 439, 546-575.  
   Regulación hormonal, 564-569.  
 Mougeotia  
   Localización del fitocromo, 615-617.  
   Posición diastrofa en cloroplastos, 603.  
   Posición parastrofa en cloroplastos, 603.  
 Movimientos de las plantas  
   autónomo o espontáneo, 576, 599.  
   de crecimiento, 576, 596.  
   de desplazamiento libre, 576, 604.  
   intracelulares, 576, 601.  
   nastias, 596-599.  
   nutación, 576, 593, 599.  
   de órganos, 576.  
   percepción, 577.  
   provocados por estímulos, 576.  
   receptores (sensores), 577.  
   respuesta, 577.  
   transducción, 577.  
   de variación, 576, 596-598.  
 Mucigel, 141.  
 Muerte de las plantas, 755-766.  
 NAD, 288, 396, 400, 401, 408, 410, 704.  
 NAD-Kinasa, 631, 669.  
 NADH, 55, 62, 275, 371, 374, 380, 396-400, 402, 403, 405, 406, 408-411, 677.  
 NADH-Deshidrogenasa, 403, 411, 412, 414, 416.  
   Sistemas de, 413-414.  
 NADH-UQ-reductasa, 411.  
 NADP, 288.  
 NADPH, 288, 289, 290, 711.  
 Naranja, 503, 724, 726, 730, 733-735, 737, 739-741, 743, 745, 747, 749.  
 Naringenina, 524, 525.  
 Naringina, 740.  
 N-3-Clorofenil-N'-Fenilurea, 497.  
 N-3-Nitrofenil-N'-Fenilurea, 497.  
 N', N'-difenilurea, 496, 497.  
 N<sup>6</sup>-(2-hidroxibenzil) adenosina, 498.  
 Nastia, 596-599.  
   Movimiento de crecimiento, 576, 596.  
   Movimiento de variación, 576, 596-598.  
   Seismonastia, 598-599.  
   Tigmonastia, 598.  
 Necrosis, 175, 204, 205.  
 Neoxantina, 257, 258, 740.  
 Neral, 739.  
 Nernst, ecuación de, 147-148, 150, 151.  
 Neumátodos, 138.  
 Neurosporeno, 264.  
 Niacina, 175.  
 Nictagináceas, 328.  
 Nictinastia  
   y fitocromo, 628.  
 Níquel, 195, 213.  
 Nitro  
   Localización celular y reducción del, 374-375.  
   Reducción asimiladora del, 370-373.  
   Reducción fotosintética del, 375-376.  
   Reducción no asimiladora del, 370.  
   Reducción a nitrito, 372-373, 375-376.  
 Nitro potásico, 501.  
 Nitro reductasa, 209, 372-376, 380.  
 Nitrilasa, 448, 451.  
 Nitrificación, 363.  
 Nitrito  
   Reducción a amoníaco del, 372, 373-376.  
 Nitrito reductasa, 244, 372-376.  
 Nitrogenasa, 209, 354, 366-370, 380.  
 Nitrogenasa reductasa, 367-368.  
 Nitrógeno, 195, 203, 205, 206, 209, 362-382, 691.  
   Ciclo del, 362-363.  
   Fijación biológica del, 363-370.  
   Genes hup, 370.  
   Genes nif, 369-371, 532.

- Fotosíntesis del, 375-380.  
 Manipulación genética del, 369-371.  
 Reducción asimiladora. nitrato, 370-372.  
 Reducción biológica  $N_2$ , 365-370.  
 Niveles de energía en clorofilas, 270-272.  
 Nódulo meristemático, 568.  
 Nódulo vascular, 568.  
 Nódulos en leguminosas, 364-368.  
 Proceso fisiológico infección/simbiosis, 364-365.  
 Nofiramicina, 49, 51, 52.  
 Nopalina, 539-540.  
 Norflurazon, 609.  
 Nucleasas, 763.  
 Núcleo, 165, 169, 170, 676, 738.  
 Nucleolo, 165.  
 Nucleósido difosfato kinasa, 312.  
 Nucleosoma, 536.  
 Nuez, 678.  
 Número de Avogadro, 266.  
 Nutación, 576, 599-601.  
 Nutrición,  
 Absorción de nutrientes, 140-160.  
 Relaciones suelo-planta, 140-141.  
 Nutrición mineral, 193-214.
- Octopina, 539-540.  
 Oleato potásico, 185.  
 Oligomicina, 178, 275, 286.  
 Oligosacarinas, 785.  
 Olivo, 649.  
 Oncogenicidad de *Agrobacterium*, 536.  
 Opinas, 539-540, 543.  
 Organogénesis, 431.  
 Órganos consumidores, 177-182.  
 Órganos productores, 177-182.  
 Ornitina, 208, 543.  
 Osmómetro, 83, 95-98, 187.  
 Ósmosis, 78, 83, 187.  
 Características osmóticas de la célula vegetal, 82-85.  
 Diagrama estado osmótico (Höfler), 84, y raíz, 95, 96, 98.  
 Ostiolo, 110.  
 Oxalacetato, 57, 377, 396, 410, 702, 704.  
 Oxalato, 212.  
 $\alpha$ -Oxidación, 702.  
 $\beta$ -Oxidación, 396, 402, 664, 672, 675, 676, 677, 699, 702-704.  
 Oxidasa, 450.  
 Óxido de etileno, 508.  
 Oxindoles, 458.  
 Oxigenasa, 333-334.  
 Oxígeno, 188, 189, 405-407, 410-417, 419, 422-425.  
 2-Oxoglutarato, 376-378.  
 $\alpha$ -Oxoglutarato deshidrogenasa, 409.  
 Ozono, 769.
- P430,  
 P680, 275-279, 290.  
 P700, 275-279, 290, 291.  
 P870, 283.  
 PAL (véase  $\alpha$ -fenilalanina amonio-*liasa*).  
 PAPS, 385-386.  
 PAPS-reductasa, 387.  
 Paraquat, 781.  
 Pared celular, 35, 73.  
 Biosíntesis de la, 58-63.  
 Composición química de la, 35-42.  
 Elongación de la, 37-48.  
 Engrosamiento de la, 67-69.  
 Estructura de la, 43-45.  
 Extensión de la, 46-58.  
 Lugares de síntesis de la, 65-69.  
 Pérdida de rigidez de la, 48-56.  
 Origen de la, 43.  
 Propiedades mecánicas de la, 46-48.  
 secundaria, 69-73.  
 Parénquima floemático, 162.  
 Parénquima interfascicular, 555.  
 Paternocarpia, 722, 732, 733.  
 estimulativa, 732, 733.  
 vegetativa, 732, 733.  
 Patata, 180, 207, 442, 514, 628, 660, 661.  
 Pectina, 38, 39, 165, 705, 735.  
 Biosíntesis de la, 62.  
 Pectinasa, 738, 766.  
 Pelargonidina, 740.  
 Pelo absorbente (radicular), 95-97.  
 Pentosas fosfato, 209, 394.  
 Peonidina, 740.  
 PEP (véase fosfoenol pirúvico).  
 PEP carboxilasa (véase fosfoenol pirúvico carboxilasa).  
 Peptidohidrolasa, 698, 699.

- Pera, 726, 731, 737, 740, 741, 743, 744.  
 Periciclo, 96, 97.  
 Permeabilidad membranas  
 y fitocromo, 621-624, 628-631.  
 Permeasa, 154.  
 Peroxidasa, 450, 456, 457, 523, 524, 525.  
 Peróxido de hidrógeno, 420.  
 Peroxisomas, 336-338, 703, 738.  
 Peso fresco, 430, 432.  
 Peso seco, 430, 432, 436.  
 Petunia, 733.  
 Petunidina, 740.  
 pF de un suelo, 94.  
 Pfr, 604, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612,  
 613, 616, 618, 619, 623, 624, 625, 626,  
 627, 629, 630, 632.  
 3-PGA (véase ácido 3-fosfoglicérico).  
 Phycomyces,  
 y fototropismo, 585-586.  
 Piericidina, 412, 414, 416.  
 Pigmentos  
 criptocromo, 583, 620, 632.  
 fitocromo, 606-633.  
 de fotonastia, de mimosa, 598.  
 del fototropismo, 580-581, 583, 584,  
 585-586.  
 pantalla en fototropismo, 581, 586.  
 Pigmentos antocianínicos, 203, 204.  
 Pimiento, 733.  
 Pinocitosis, 53, 63, 153.  
 Piña tropical, 726, 733, 734, 741, 743, 747.  
 $\beta$ -Pirazolalanina, 687.  
 Pirenoide, 238.  
 Pirofosfatasa, 311, 325, 386.  
 Pirofosfato, 311, 325, 386.  
 Pirofosforilasa, 58.  
 Piruvato  
 descarboxilasa, 400, 694, 743.  
 deshidrogenasa, 406.  
 fosfato dikinasa, 323, 325.  
 kinasa, 206, 400, 694, 709.  
 Placa  
 cribosa, 162, 163, 165, 167, 169, 187-  
 189, 191.  
 ecuatorial, 43.  
 Planta  
 ambifotoperiódica, 638, 639.  
 de día corto (PDC), 636-637.  
 de día intermedio, 638, 639.  
 de día largo (PDL), 636-637.  
 de día neutro (PDN), 636, 638.  
 Plantas  
 bianuales, 647, 746, 747.  
 C-3, 105, 176, 317, 328, 354, 359, 542.  
 C-4, 105, 176, 208, 317-329, 354, 355,  
 359.  
 CAM, 105, 153, 317.  
 etioladas, 439.  
 monocárpicas, 647, 648, 649, 756, 757.  
 perennes, 649, 756, 757, 772.  
 de sombra, 348.  
 Plásmido-Ti, 539, 540, 542-543, 781,  
 782.  
 Plasmodesmos, 43, 168, 169, 178, 179.  
 Plasmolisis, 84.  
 Incipiente de, 84.  
 Plastocianina, 208, 275, 279, 292, 293.  
 Plastoquinona, 275-279, 292, 293.  
 Plastos, 166, 169, 170, 171, 235, 245-  
 248.  
 tipo P, 166, 167, 170.  
 tipo S, 166, 170.  
 Plátano, 503, 726, 732-741, 743-745, 747,  
 748.  
 Plomo, 213.  
 Poder reductor, 215.  
 Polaridad, 546-551.  
 Bases estructurales y moleculares de la,  
 549.  
 Celular, 548-549.  
 Determinación de la, 547.  
 Persistencia de la, 547-548.  
 Polarotropismo, 583-584, 615.  
 Poliaminas, 527, 528.  
 Poligalacturonasas, 41, 745, 746.  
 Polinucleótidos, 500.  
 Polisacárido, 60.  
 Polisomas, 626, 705.  
 Pomelo, 735, 740, 741, 743.  
 Poro areolado, 100.  
 Porómetro, 120.  
 Portulacáceas, 329.  
 Potasio, 153, 154, 173, 188, 189, 195, 196,  
 202, 204, 206, 210, 598-599.  
 Potencial  
 de acción en seimonastias, 598.  
 de difusión, 148.  
 de Donnan, 148-150.  
 electroquímico, 145, 147.  
 gravitacional, 93.

- hídrico, 46, 78-81, 90, 182, 183, 187, 198, 690.  
 componentes, 81-82, 90.  
 medida, 87-89.  
 sistema suelo-planta-aire, 91, 104-105.  
 suelo, 93.  
 hídrico atmosférico, 81, 106-110.  
 matricial, 82.  
 unidades y expresión, 89-90.  
 suelo, 93.  
 de membrana, 148, 189, 292.  
 de membrana (transmembrana),  $E_M$ , 148.  
 de Nernst, 147-148.  
 osmótico, 82, 85, 88, 90, 93, 173, 187, 198, 210, 725.  
 medida, 89.  
 suelo, 93.  
 unidades y expresión, 89-90.  
 de presión, 46, 82, 83, 84, 88, 89, 90, 180, 186.  
 medida, 89.  
 suelo, 93.  
 unidades y expresión, 89-90.  
 químico, 79, 145, 152, 286.  
 del agua, 79.  
 de reposo, 598.  
 Potómetro, 115.  
 Pr, 608-619, 622, 630, 631.  
 Presión  
 hidrostática, 82, 83, 187, 191.  
 de pared (PP), 83, 90.  
 radicular, 95, 98.  
 en transporte por xilema, 101-102.  
 de turgencia, 56, 58, 83-84, 90.  
 Primordio, 435.  
 floral, 562.  
 foliar, 557, 558, 561.  
 radicular, 569.  
 Procambium, 556-558, 561, 563.  
 Productividad, 439.  
 de una cosecha, 358, 361.  
 Prolaminas, 685.  
 Prolina, 167, 173, 658, 676, 685, 772, 778.  
 Pronasa, 55.  
 Propilgálico, 509.  
 Propileno, 507.  
 Proplastos, 246, 667.  
 Proteasa, 685, 686, 717, 759, 763.  
 Proteína-Fe-S, 411, 415.  
 Proteína-P, 165, 167, 169, 171, 173, 186, 188.  
 Proteína punto isoeléctrico, 188.  
 Proteína de reserva, 542, 679, 680, 685, 699.  
 Proteínas  
 Desnaturalización de, 352, 492, 499.  
 con hierro y azufre, 268, 279.  
 ribosomales, 500.  
 Proteinoplastos, 249.  
 Protochlorofilida, 259-261.  
 Protochlorofilida-holocromo, 260.  
 Protonemas de helecho  
 y fototropismo, 583-584.  
 localización del fitocromo, 614-617.  
 Protónes, 152-156, 294-297, 299-300, 416, 417, 419.  
 Protoplasma, 430, 431, 439.  
 Protoplastos  
 y diferenciación celular, 531.  
 Fusión de los, 529, 531, 533, 542.  
 Protoporfirina IX, 259, 262.  
 Puentes de hidrógeno, 37, 43, 45, 55.  
 Pulvinulo, 598-599.  
 Punteaduras, 69, 70, 101.  
 areoladas, 71, 100.  
 Cavidad de, 71.  
 Membrana de, 71, 100.  
 Par de, 70, 71, 100.  
 primarias, 43, 69.  
 Punto de compensación, 232, 340, 341, 354.  
 Punto de compensación para la luz, 348, 350.  
 Purina, 499.  
 $Q_{10}$ , 184, 422.  
 $Q_{10}$  fotorrespiración, 353.  
 $Q_{10}$  de fotosíntesis, 355.  
 $Q_{10}$  respiración, 355.  
 Quenopodiáceas, 328.  
 Queratina, 524, 525.  
 Quinetina, 487, 488.  
 Quimioantótrofos, 332, 333.  
 Quimotripsina, 490-492, 717.  
 Quinona, 729.  
 Rábano, 450, 514, 526, 718.

- Radical superóxido, 283.
- Rafinosa, 168, 170, 685, 726.
- Raíces
- Crecimiento de, 447.
  - Elongación de, 446.
  - Formación de, 553-555.
- Raíz pilosa, 540.
- Ramnogalacturonano, 38, 39, 44.
- Ramnosa, 36, 39, 731.
- Reacción
- de alta energía, 183, 617-620.
  - de alta irradiancia, 617-620.
  - respuesta a la luz roja, 617-619.
  - respuesta a la luz azul, 620.
  - autocatalítica, 438.
  - fotoquímica, 230, 231.
  - fototrófica, 349.
  - de Hill, 268.
  - monomolecular, 434.
  - oscura, 230, 231.
- Reactivo Hill, 268.
- Recorrido equivalente en aire, 225.
- Reducción
- de nitratos, 217, 370-376.
  - de sulfatos, 217, 383, 392.
- Regulación
- de la actividad génica, 534-538.
  - por fitocromo, 622-628.
  - del ciclo de Calvin, 306-307.
  - del transporte electrónico fotosintético, 277.
- Relación del área foliar (LAR), 436.
- Relación  $C_w/C_p$ , 668, 710.
- Relaciones hidricas, 77-90.
- Reloj biológico, 440, 645.
- Remolacha, 62, 180, 181, 184, 327, 345, 355, 636, 649, 777.
- Rendimiento
- cuántico, 349, 350.
  - de la fotosíntesis, 358, 439.
- Reproducción vegetativa, 430.
- Resistencia
- a altas temperaturas, 774.
  - de cloroplasto, 228.
  - debida a la membrana plasmática, 227.
  - a la difusión, 354, 356.
  - de la hoja, 226.
  - de mesófilo, 227, 228.
  - de la pared celular, 227.
- Respiración, 227, 361, 439.
- Determinación de la, 397-399.
- Factores que afectan a la, 422-424.
- Rendimiento energético, 419, 420.
- resistente al cianuro, 419-421.
- Reticulo endoplasmático, 43, 53, 165, 169, 171, 188, 462, 738.
- Reticulocitos de conejo, 719.
- Retrocontrol, 356.
- Riboflavina, 458.
- Ribonucleasa, 208, 492, 516, 626, 679, 705, 738, 759.
- Ribosa, 504.
- Ribosa-5-fosfato, 419.
- Ribósido de zeatina, 493.
- Ribosomas, 166, 169, 170, 178, 626, 678, 705, 737, 744, 748.
- de cloroplastos, 244.
- Ribulosa
- 1,5-difosfato, 306, 335-336.
  - 1,5-difosfato carboxilasa, 305-307, 335, 336, 354, 626.
  - 5-fosfato, 423, 669.
  - 5-fosfatokinasa, 307, 356.
  - difosfato oxigenasa, 354.
- Ricino, 680, 681, 702, 703.
- Ricca, factor de, 598.
- Rizocalina, 520, 564, 567.
- Ritmo endógeno
- y circunmutación, 599-600.
  - y fitocromo, 645-646.
  - y fotoperiodismo, 643, 645-646.
- RNA, 462-466, 484, 489, 492, 498-500, 516, 532, 534-537, 623, 626.
- informosomas, 532.
- Maduración o procesado del mRNA, 536.
- mRNA precursor, 536.
  - nuclear heterogéneo, hnRNA, 536.
  - polimerasa, 466, 500.
  - sintetasa, 492.
  - traducción del mRNA, 534-537.
- rRNA, 626.
- Roble, 27, 345.
- Rojo cercano
- y fitocromo, 607, 611-617.
- Rojo lejano
- y fitocromo, 611-620.
  - continuo (rojo lejano estándar), 619, 624.
- Rosal, 515.

- Rotenona, 410, 414.  
 Rubidio, 206.  
 Rubisco (ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa), 626.  
 RuDP (véase ribulosa-1,5-difosfato).  
 Ruta alternativa, 402, 411, 419, 422.  
 Rutina, 524.
- S-adenosil-L-metionina SAM**, 63, 507, 508, 509.  
 Sabineno, 739, 740.  
 Sacarosa, 153, 162, 172-174, 178, 179, 182, 183, 186, 187, 198, 201, 209, 210, 311, 396, 524, 677, 685, 702-704, 728, 729. fosfato, 311. fosfato sintetasa, 311, 312. sintetasa, 312, 704.  
 Salinidad, 209-211, 542, 777, 778.  
 SAN 9789, 609.  
 Sandía, 732, 737, 743.  
 Saturación de la luz, 359.  
 Sauce, 174, 183, 195, 569, 649.  
 Sedoheptulosa-1,7-difosfatasa, 309.  
 Sedoheptulosa-7-fosfato, 420.  
 Seismonastia, 598.  
 Selenio, 195, 213, 780.  
 Semillas, 607, 608, 621, 674-721. Desarrollo de las, 674, 676. Estructura y composición química de las, 682-687. Germinación, 607, 608, 621, 687-721. Aspectos de la, 689-692. epigea, 687, 688. Factores que afectan a la, 692-706. hipogea, 687, 688. Regulación de la, 706-721. Maduración de las, 674-687.  
 Semiquinona, 415.  
 Senescencia, 432, 436.  
 Sequedad, 542, 758-766, 771-773.  
 Serin-proteasas, 697.  
 Serina, 39, 53, 173, 336-338, 499, 679, 697.  
 Serina-sulfidrilasa, 388.  
 Serina transacetilasa, 391.  
 Serpentina, 211.  
 Sesquiterpeno, 522.  
 Sicamoro, 658, 659.  
 Silene, 481.  
 Sílice, 42.
- Simplasto (simplasma), 97-98, 142, 178.  
 Sirohemo, 374, 388.  
 Sodio, 153, 154, 156, 173, 174, 210.  
 Soja, 183, 669, 686, 721.  
 Soluciones nutritivas, 196-199.  
 Sorbitol, 172, 729, 735.  
 Spin electrónico, 270, 275.  
 Suberina, 35, 42. Suberificación de la, 73.  
 Succinato, 396, 410, 416, 420, 702. deshidrogenasa, 409, 411, 704. -UQ reductasa, 411.  
 Succinil-CoA, 409, 418.  
 Succinil-CoA-sintetasa, 206, 409.  
 Suculentas, 120, 121, 329.
- Suelo**  
 Ácido, 213.  
 Agua de un, 93.  
 Agua capilar del, 93.  
 Agua gravitacional del, 93.  
 Agua de imbibición (higroscópica) del, 93.  
 calcáreo, 213.  
 Capacidad de campo del, 94.  
 disponibilidad de agua para las plantas, 94.  
 Equivalente de humedad del, 94.  
 Punto de marchitamiento permanente del (PMP), 94.
- Sulfato**  
 Activación del, 385.  
 activo, 385-386.  
 amónico, 501.  
 Localización y reducción del, 390.  
 Luz y reducción del, 391.  
 Reducción asimiladora del, 386. Reducción no asimiladora, 386.  
 Reducción fotosintética del, 391.  
 Reducción del sulfato activo, 387. -reductasa, 387.  
 Regulación y reducción asimiladora, 391-392.  
 Sulfidril-proteasas, 697.
- Sulfito**  
 Reducción del, 388. -reductasa, 388. unido XS-SO<sub>2</sub>H, 388-390.  
 Sulfolipidos, 240, 241.  
 Sulfotransferasas, 386-387.  
 Sulfuro

- de hidrógeno, 668.
- unido XS-SH (persulfuro), 390, 391.
- Superóxido dismutasa, 283.
- «Symport», 153-156.
- Tabaco, 164, 345, 351, 353, 355, 446, 450, 455, 463, 468, 489, 490, 493, 494, 561, 569, 724.
- Tactismo, 576, 598, 604.
- Tallo, 557-559.
  - Crecimiento del, 447.
  - Desarrollo del, 557-559.
- Tanino, 738, 785.
- Tasa
  - de fotosíntesis, 229, 231, 355, 357.
  - de fotosíntesis aparente, 229.
  - netas de asimilación (NAR), 436.
  - de respiración, 432.
- T-DNA, 540, 543.
- Tejido cambial, 431.
- Temperatura, 182-184, 422, 424, 542, 691.
- Teobromina, 687.
- Teoría
  - del crecimiento por pH ácido, 53-56.
  - epigenética
  - y diferenciación, 534.
- Tetraarabinósido, 41, 44.
- Thiorhodáceas, 284.
- Tiamina, 175, 207, 384, 385.
- Tiempo mínimo de relajación, 49, 51.
- Tigmotropismo, 577, 600.
- Tilacoides, 235, 241-243, 265, 278-283.
- Tilo, 649.
- Timidina, 552, 553.
- Timol, 712, 715, 739, 740.
- Tiocarbamatos, 781.
- Tiorredoxina, 309.
- Tiorrodobacteriales, 383.
- Tiosulfonato reductasa, 388.
- Tiourea, 668.
- Tirosina, 63, 64, 496, 499.
- Tirosinasa, 208.
- Tomate, 62, 96, 180, 181, 203, 357, 446, 448, 450, 452, 489, 732, 735, 737, 740, 741, 743, 745, 747, 749, 777.
- Tonoplasto, 83, 167, 169, 170, 171, 186.
- Tono, 70, 71.
- Totipotencia, 529, 534.
- Transaldolasa, 423.
- Transaminasa, 377, 729.
- Transcetolasa, 305, 419, 423.
- Transferencia específica de masa, 176.
- Transferencia de excitación electrónica, 272.
- Transferencia de masa, 176.
- Transformación tumoral, 538-542.
- Transformación por *Agrobacterium*, 539-540, 542-543.
- Transfructosidasas, 314.
- Transglucosilasas, 56.
- Transglucosidasas, 314.
- Transpiración, 106-139, 208, 350, 729, 738.
  - Control artificial de la, 137, 138.
  - Estudio cuantitativo de la, 132-136.
  - Factores que la afectan, 120-126.
  - Funciones de la, 136, 137.
  - Magnitud de la, 106, 107.
  - Medida de la, 114-116.
  - Necesidad física de la, 107-109.
  - peristomática, 129, 130.
  - relativa, 116.
  - Resistencias de la, 132-136.
- Transportador, 143, 151, 152-157.
  - Teoría de Epstein del, 143.
- Transportador de electrones, 207, 416.
- Transporte
  - activo, 161, 178, 179, 151-157.
  - activo electrógeno, 153-156.
  - de agua
    - Modelo de analogía del, 91-92.
    - por las raíces, 95-98.
    - por el xilema, 98-105.
  - bidireccional, 181, 188, 189, 191.
  - a corta distancia, 91, 157.
  - de electrones fotosintético, 207, 208.
  - Organización del, 410-412.
    - respiratorio, 399, 401, 410, 420.
  - fotosintético de electrones, 274-281, 355, 357.
  - de hidratos de carbono, 356.
  - a larga distancia, 91, 158.
  - a media distancia, 91, 158.
  - pasivo, 145-151, 157, 161.
  - por el xilema, 98-105.
    - de nutrientes minerales, 156-159.
    - teoría presión radicular, 101-102.
    - teoría tensión-cohesión, 102-104.

- Transiciones electrónicas en clorofila, 270, 271.
- Transposón, 544.
- Traumatina, 785.
- Trebol, 362, 363, 664.
- Trepadoras (plantas)  
y circunmutación, 576, 599-601.
- Tricoblasto, 95.
- Trifolina, 365.
- Trigo, 27, 37, 95, 345, 356, 444, 446, 467, 468, 485, 525, 603, 664, 669, 674, 678, 681, 682, 685, 691, 712, 717, 718, 732.
- Trisofosfato isomerasa, 400, 694.
- Tripsina, 717.
- Triptamina, 449-451.
- Triptofano, 57, 208, 449, 450-453, 685, 732.
- Triptofano descarboxilasa, 450.
- Triptofol, 449, 451.
- Triptofol oxidasa, 451.
- Tropismos, 576-596.  
aerotropismo, 577.  
diotropismo, 578.  
fototropismo, 577-586.  
galvanotropismo, 577.  
geotropismo, 577, 586-596.  
gravitropismo, 577, 586-596.  
haptotropismo, 577.  
hidrotropismo, 577.  
ortotropismo, 577.  
plagiotropismo, 578.  
tigmotropismo, 577.  
traumatotropismo, 577.
- Tubo criboso, 161-164, 178, 179, 181, 185, 187, 189, 190.  
elemento de, 162, 163, 165-167, 169, 170.
- Tumores vegetales  
agallas, 538-539.  
agalla de cuello o corona, 539-540.  
de crecimiento ilimitado, 538.  
de crecimiento limitado, 538.  
genéticos, 541-542.  
virus tumor de las heridas, 540-541.
- Túnica, 556, 557, 558, 560, 562.
- Turgencia celular, 84-85.
- Ubiquinona, 281, 410-412, 415-417, 420.
- Ubiquinona citocromo C reductasa, 411.
- UDP, 677.
- UDP-glucosa, 58, 59, 61, 311, 313, 315, 677, 704.
- UDP-glucosa almidón sintetasa, 677.
- UDP-glucosa pirofosforilasa, 311, 677, 704.
- Umbelífera, 523.
- Unidad fotosintética, 282.
- «Uniports», 153.
- Uracil herbicidas, 781.
- Urea, 208.
- Urógeno III cosintetasa, 256, 258.
- Urógeno I sintetasa, 259, 261.
- Ussing-Teorell, ecuación de, 150.
- UV cercano  
y fototropismo, 581, 583, 585-586.
- Uva, 452, 725, 726, 728-730, 732-737, 740, 743, 744, 749.
- Valenceno, 739, 740.
- Van den Honert, ecuación de, 91.
- Vasos,  
Carga de, 158.
- Vectores intermediarios, 543.
- Vejez, 757-758.
- Velocidad de fotosíntesis, 230.
- Venenos, 231.
- Verbascosa, 174.
- Verbascotetraosa, 174.
- Vernalina, 650-651.  
Evidencias fisiológicas de la, 650-653.
- Vernalización, 646-653.  
en anuales de invierno, 638-640, 646-648.  
Descubrimiento y concepto de la, 646.  
Fisiología de la, 650-653.  
Fotoperiodismo de la, 647, 651-653.  
Percepción de la, 649.  
en plantas bianuales, 647-649.  
en plantas perennes, 649.  
Requerimiento absoluto de la, 647-648.  
Requerimiento cuantitativo de la, 647-648.  
Temperaturas efectivas de la, 650.  
Tipos de, 647-648.
- Vías de difusión, 225.
- Vicilina, 686, 700.

- Vigor híbrido o heterosis, 357.  
 Violaxantina, 257, 258, 264, 458, 519, 740.  
 Virus gemini, 543.  
 Virus mosaico coliflor (caMV), 543.  
 Virus del tumor de las heridas, 540-541.  
 Vitalismo, 31.  
 Vitalistas, 29, 30.  
 Vitamina  
   C, 732.  
   K, 281.  
 Vitaminas, 440, 494, 520.  
 Volubles (plantas)  
   y circumnutación, 599.  
 Volumen  
   de empaquetamiento, 432.
- Xantofilas, 258.  
 Xantoxina, 516, 517, 583.  
 Xerofitas, 131, 771.  
   verdaderas, 772.  
 Xilanos, 37.  
 Xilema, 95-101, 104, 158, 159.  
   Albura del, 101.  
   Cavitación del, 104.  
   Duramen del, 101.  
   Transporte por el, 101-105, 158, 159.
- Traqueidas del, 99, 100.  
 Vasos del, 98, 99-100.  
 Xiloglucanos, 37, 38, 43, 44, 53, 56, 57.  
 Xilosa, 36-38, 61, 62, 680, 681, 735.  
   UDP-D-xilosa, 59, 62, 66.  
 Xilulosa-5-fosfato, 404, 405, 419, 420.  
 XSSH, 388-391.  
 XSSO<sub>2</sub>H, 388-391.
- Zanahoria, 207, 467, 494, 495, 530, 636.  
 Zarcillos,  
   en circumnutación, 599-601.  
 Zea,  
   y gravitropismo, 594.  
 α-Zeacaroteno, 264.  
 β-Zeacaroteno, 264.  
 Zeatina, 488, 489, 490, 493, 500, 730.  
   glucósido, 493.  
   ribósido, 493.  
 Zeaxantina, 257, 258, 264, 740.  
 Zeína, 677.  
 Zigoñiláceas, 328.  
 Zigoto, 430, 529.  
 Zinc, 195, 204, 208, 213, 214.  
 Zona de abscisión, 766-768.  
 Zygotropismo, 520.

## Índice de autores

- Adams, 504.  
Adato, I., 743, 747.  
Addicot, 510.  
Albersheim, P., 37, 38, 39, 40.  
Aldasoro, J. J., 672, 690, 694, 708, 710.  
Allard, H. A., 607, 635.  
Andrews, 333.  
Aristóteles, 27, 190, 217.  
Ariz, 142.  
Arnold, 231.  
Arnon, D. I., 197, 268, 285-287, 332.  
Ashton, F. M., 720.  
Askenasy, 102.  
Audus, 445, 474, 495.  
Avery, G. S., 562.
- Babbit, J. K., 746.  
Bajaj, Y. P. S., 533.  
Ball, N. G., 597.  
Banister, P., 211, 212.  
Barber, J., 387, 390.  
Barceló Coll, J., 621, 633.  
Barcroft, J., 397.  
Basham, 301.  
Beevers, H., 694, 703.  
Benson, 301.  
Bergson, 29.  
Bewley, J. D., 681, 683, 684.  
Bidwell, 221, 767.  
Black, L. M., 540.  
Black, M., 681, 683, 684.  
Blackman, F., 225, 230, 231, 232, 233,  
267, 346.  
Blackman, V. H., 434, 436.  
Bloch, R., 566.
- Böhm, J., 102.  
Bonner, J., 53, 237, 242, 364.  
Bonner, W. D., 396, 408.  
Borthwich, 600, 621.  
Bosch, 365.  
Bowes, 335.  
Boysen Jensen, 442, 443.  
Boyer, P. D., 293, 299.  
Breidenbach, R. W., 703.  
Briggs, 631.  
Brill, W. J., 367, 371.  
Britton, 536, 537.  
Brodie, T. G., 397.  
Brown, 223, 224.  
Broyer, T. C., 98, 158.  
Burg, 507.  
Burk, 145.  
Burriss, R. H., 364.  
Burrows, 498.  
Butler, W. L., 602, 603, 605.
- Calvin, 303-305.  
Canny, M. J., 190, 191.  
Caspary, 96, 97, 157.  
Cieslar, 607.  
Cleland, R., 47, 51, 56, 466.  
Clowes, F. A. L., 68, 553.  
Colvin, J. R., 60.  
Cornforth, 513.  
Cousins, 503.  
Crafts, A. S., 98, 158.  
Crone, G., 196, 197.  
Crozier, 475.  
Cuello, 764.  
Curtis, O. F., 159.

- Chailakhyan, 640, 641.  
 Chain, R. K., 284.  
 Changeux, 629.  
 Chardakov, 87, 88.  
 Ching, T. M., 704, 720.  
 Cholodny, 582, 583, 594, 595.
- Dainty, 86.  
 Darwin, Ch., 442, 572.  
 Darwin, F., 442.  
 Davidson, 536, 537.  
 Dazzo, 365.  
 De Vries, W., 190.  
 Dixon, H. H., 102.  
 Donnan, 146-150.  
 Dock, 443.  
 Duhamel de Monceali, 442.  
 Dutrochet, 78, 218.
- Emerson, 231, 273, 280.  
 Epstein, 143-145, 151.  
 Esau, K., 96, 97, 100, 162-164, 166, 168,  
 555, 557, 559.  
 Escombe, 223, 224.  
 Etzold, H., 579, 615.
- Fahn, A., 99.  
 Fensom, D. S., 192.  
 Fernández Tarrago, J., 696-698, 712,  
 715.  
 Fick, 146, 147, 151.  
 Flint, 607.  
 Franck, 586.  
 Frenkel, A. W., 287.  
 Fuente, 455.  
 Fuente Burguillo, P., 692, 694, 709.
- Garner, W. W., 607, 635.  
 Gassner, J. G., 646.  
 Georgiev, 536.  
 Gibbs, 79, 317, 377.  
 Goebel, K., 570.  
 Goldsmith, 455.  
 Goodwin, P. B., 731, 743.  
 Gorham, P. R., 181, 183.  
 Green, 89.
- Gregory, 434, 436, 648.  
 Grossebacher, 141.  
 Guerra, H., 700, 701.  
 Gunning, 236.  
 Gustafson, F. G., 733.
- Haagen Smith, 443.  
 Haber, 365.  
 Haberlandt, 487.  
 Häder, D. P., 630, 633.  
 Hagen, 102, 143, 591.  
 Hager, 582.  
 Haldane, J. B. S., 397.  
 Hales, S., 78, 102, 158, 193, 217.  
 Hall, M. A., 69, 70, 173, 177, 507.  
 Halma, F. F., 570.  
 Hansen, E., 737.  
 Hardy, R. W. F., 369, 382.  
 Hartig, T., 158.  
 Hartt, C. E., 183.  
 Hatch, 315.  
 Haupt, W., 585, 594, 603, 610, 615, 616,  
 617.  
 Hemberg, T., 661.  
 Hendricks, 607, 628.  
 Henfrey, 634.  
 Higgins, T. J. V., 731.  
 Hildebrandt, 530.  
 Hill, 268, 522.  
 Hinkle, P. C., 294, 295, 298, 417, 418.  
 Hoagland, D. R., 159, 197.  
 Hobson, G. E., 739.  
 Hock, B., 611, 633.  
 Holmes, 630.  
 Holmes, M. G., 609.  
 Höfler, 85.  
 Homes, M. V. L., 201.  
 Honwink, A. L., 68.  
 Hubbell, 365.  
 Hulme, A. C., 734-737, 741.
- Ingen Housz, J., 218, 393.
- Jabben, 630.  
 Jacob, 535.  
 Jagendorf, A. T., 300.  
 Jenny, 141.

- Joly, J., 102.  
 Jones, R. L., 189.  
 Joy, K. W., 182.  
 Juliano, B. O., 696.  
 Juniper, B. E., 68, 553.
- Keegstra, K., 45.  
 Kende, 507.  
 Kendrick, 612, 622.  
 Key, 465.  
 Khan, A. A., 670, 713.  
 Kirchoff, 229.  
 Klebs, H., 634.  
 Knop, W., 194, 196, 197.  
 Kogl, 443, 458.  
 Kok, 275.  
 Konze, 507.  
 Kortschak, 317.  
 Koshland, 145.  
 Kozłowski, T. T., 704.  
 Kramer, P. J., 78, 94, 97.  
 Krebs, H. A., 330, 399, 408, 409, 419, 420,  
 424, 699.  
 Kurosawa, 469.
- Lamport, D. T. A., 39, 41, 44, 63.  
 Lang, H. M., 283, 491, 494, 648, 650, 652,  
 752.  
 Laties, 145.  
 Latzko, 319.  
 Lea, 379.  
 Ledbetter, C., 165.  
 Leech, 379.  
 Lehninger, A., 409.  
 Leopold, 455.  
 Letham, D. S., 475, 731, 743.  
 Liebig, J., 140.  
 Lineweaver, 145.  
 Linossier, 220.  
 Loewus, F. A., 59.  
 Lorimer, 335.  
 Lundegardh, 151.  
 Lysenko, 647.
- MacDougal, 101.  
 Mapson, L. W., 741.  
 Marbach, I., 706, 707.
- Marcaud, 536.  
 Maskell, F. G., 161, 177, 185.  
 Mason, T. J., 161, 177, 185.  
 Masuda, Y., 48, 49-51.  
 Matilla, A., 672, 719.  
 Mayer, A. M., 218, 697, 707.  
 McAlister, 607.  
 McCarty, R. E., 294, 295, 298, 417, 418.  
 McCready, 455.  
 McGlasson, W. B., 743, 747.  
 Melchers, 642, 648, 650.  
 Menten, 143.  
 Meyer, B. S., 78.  
 Michaelis, 143, 144, 230.  
 Mifflin, 379.  
 Milburn, J. A., 174.  
 Miller, C. O. F., 454, 475, 563.  
 Mitchell, P., 152, 294, 297, 300, 419.  
 Mitscherlich, E. A., 199, 200.  
 Mohr, H., 582, 584, 606, 620, 622-628.  
 Molish, 503, 750.  
 Monod, 535.  
 Morre, 466.  
 Münch, E., 140, 186, 189.  
 Murphy, 379.
- Nägeli, C. W., 78, 161.  
 Neljubow, 503, 504.  
 Nelson, C. D., 183.  
 Nernst, 147, 148, 150, 151.  
 Newmann, 90.  
 Nicolás, G., 687-689, 690, 692, 694, 696-  
 698, 699-701, 708-710.  
 Nissen, 145.  
 Nitsch, J. P., 732.  
 Nobercourt, 530.  
 Noll, D. S., 723.  
 Nollet, 78.  
 Northcote, D. M., 66.
- Ochoa, 267.  
 Oelze-Karow, H., 627.  
 Ogren, 335.  
 Ohkuma, 513.  
 Ohm, 91, 228.  
 Osborne, 493, 509.

- Paal, 442, 443.  
 Palmer, J. M., 412.  
 Pate, J. S., 644.  
 Peel, A. J., 186.  
 Penner, D., 720.  
 Pérez, E., 57.  
 Pfeffer, 78, 149, 151.  
 Philip, 87.  
 Philips, I. D. J., 551, 552, 554, 556, 563, 572.  
 Pilet, P. E., 592, 593.  
 Pitman, 158.  
 Pouiseuille, 102.  
 Porter, K. R., 165.  
 Postgate, 367.  
 Priestley, J. H., 39, 218.  
 Purvis, 648.
- Ray, 455, 466.  
 Reed, H. S., 570.  
 Renner, O., 78.  
 Ricca, 598.  
 Richmond, 491, 494, 762.  
 Robertson, J., 400.  
 Roelofsen, P. A., 67.  
 Ross, C. W., 192, 662.  
 Rüdiger, 610-611.
- Sabater, B., 156, 762, 764.  
 Sachs, T., 431, 442, 572, 574.  
 Salisbury, F. B., 195, 635, 662.  
 San Pietro, A., 288.  
 Saussure, T., 193, 218.  
 Sawada, 469.  
 Sayre, 125.  
 Scarth, 125.  
 Scott Russell, 92.  
 Schäfer, 629, 630.  
 Scherrer, 536.  
 Schanarrer, 536.  
 Scholander, 88, 101, 103.  
 Schopfer, P., 582, 584, 621.  
 Schrötter, K., 589, 590.  
 Schwarz, 141.  
 Schwenn, 388, 389.  
 Senebier, 218.  
 Serrano, R., 154, 160.  
 Sheldrake, 455.
- Siegelmann, H. W., 612.  
 Sievers, A., 589, 590, 592, 593.  
 Silver, W. S., 369.  
 Sinnott, E., 566.  
 Skoog, F., 487, 569.  
 Slack, 317.  
 Slater, E. C., 289.  
 Slatyer, 78, 82, 105.  
 Slavik, B., 89, 90, 103, 105.  
 Smith, 24, 247, 320, 599, 609, 631, 633.  
 Snow, R., 570.  
 Soding, 443.  
 Spanner, D. C., 78, 188, 189.  
 Sprenger, C., 193.  
 Spruit, 612, 622.  
 Srinivasan, K., 716.  
 Stanton, 89.  
 Steer, 236.  
 Steward, 530.  
 Stout, 159.  
 Strasburger, E., 600, 601.  
 Sze, H., 155, 160.
- Tanada, 628.  
 Taylor, 78, 519.  
 Teorell, 150, 151.  
 Tevini, M., 630, 633.  
 Thaine, R., 191.  
 Thimann, K. V., 443, 461, 571-573.  
 Torii, 145.  
 Tournois, J., 634.  
 Traube, 78.  
 Trebst, A., 388, 389.  
 Tupper-Carey, R. M., 39.
- Ulrich, R., 736.  
 Ussing, 150, 151.
- Van den Honert, 91, 185.  
 Van Belmont, 193, 217.  
 Van Overbeek, 444.  
 Van't Hoff, 78.  
 Varner, J. E., 237-242, 364, 696, 716.  
 Vasil, 530.  
 Verbeek, R., 714.  
 Vishniac, 268.  
 Volkmann, 592, 593.

Von Liebig, J., 194, 199.  
Von Sachs, J., 194, 558.

Wade, N. L., 743, 747.  
Warburg, O., 222, 353, 397.  
Wareing, P. F., 458, 513, 515, 551, 552,  
554, 563, 572, 655, 657, 658, 664.  
Weatherley, P. E., 78, 183.  
Webb, J. A., 181.  
Wellensiek, 650.  
Went, 442, 453, 454, 582, 583, 594, 595.  
Whiting, G. C., 734, 735.  
Whittaker, 344.

Wickson, M., 572.  
Wiesner, 487, 503.  
Wilkins, M. B., 559, 571, 583, 661, 713.  
Wilson, 387.  
Winkler, 222.  
Woodward, J., 193.

Yang, 504.  
Yomo, H., 716.

Zarra, I., 50, 51, 52, 54, 57.  
Zelitch, 345.  
Zimmermann, 104, 105, 174.

## TÍTULOS PUBLICADOS DE CIENCIA Y TÉCNICA

- FÍSICA, J. Garmendia Iraundegui.  
PROBLEMAS DE FÍSICA, J. Garmendia Iraundegui (2.ª ed.).
- TEORÍA MODERNA DE CIRCUITOS ELÉCTRICOS, R. Itigo Madrigal.
- DISPOSITIVOS Y CIRCUITOS ELECTRÓNICOS, J. Millman y C. C. Halkias (10.ª ed.).
- DISPOSITIVOS Y CIRCUITOS ELECTRÓNICOS. Soluciones a los problemas, J. Millman y C. C. Halkias (8.ª ed.).
- QUÍMICA ORGÁNICA FÍSICA. Fundamentos y espectrometrías, M. Ballester.
- ANÁLISIS MATEMÁTICO, R. Losada Rodríguez.
- CIENCIA DE MATERIALES, P. Coca Rebolero y J. Rosique Jiménez (10.ª ed.).
- CIENCIA DE MATERIALES. Problemas, P. Coca Rebolero y J. Rosique Jiménez.
- TECNOLOGÍA MECÁNICA Y METROTECNIA, P. Coca Rebolero y J. Rosique Jiménez (4.ª ed.).
- TÉCNICAS DE PROGRAMACIÓN Y CONTROL DE PROYECTOS, C. Romero López.
- CÁLCULO DE PROBABILIDADES, A. Krief y S. Lévy.
- ORDENADORES, PROGRAMAS Y PROCESOS DE CÁLCULO, K. Clark y D. Cowell.
- PROBLEMAS DE PROGRAMACIÓN, F. Sanchis Llorca y A. Morales Lozano.
- DICCIONARIO DE INGENIERÍA DE CAMINOS, I. Morilla Abad.
- FUNDAMENTOS DE CIBERNÉTICA, F. H. George.
- FISIOLOGÍA VEGETAL, J. Barceló Coll, G. Nicolás Rodrigo, B. Sabater García y R. Sánchez Tamés (4.ª ed.).
- ANÁLISIS MATEMÁTICO. Cálculo diferencial en espacios euclídeos, M. N. Bentabol Marinas, J. Margalef Roig, E. Outelelo Domínguez y J. L. Pinilla Ferrando.
- ANÁLISIS MATEMÁTICO. Cálculo integral en espacios euclídeos, M. N. Bentabol Marinas, J. Margalef Roig y E. Outelelo Domínguez.
- CÁLCULO INFINITESIMAL. I.1, F. García Castro y A. Gutiérrez Gómez (2.ª ed.).
- CÁLCULO INFINITESIMAL. I.2, F. García Castro y A. Gutiérrez Gómez (3.ª ed.).
- CÁLCULO INFINITESIMAL. II.1, F. García Castro y A. Gutiérrez Gómez (2.ª ed.).
- CÁLCULO INFINITESIMAL. II.2, F. García Castro y A. Gutiérrez Gómez.
- ÁLGEBRA LINEAL (vol. 1), A. Gutiérrez Gómez y F. García Castro.
- ÁLGEBRA LINEAL (vol. 2), A. Gutiérrez Gómez y F. García Castro.
- MÉTODOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X. Principios y aplicaciones, J. Bermúdez Polonio.
- MÉTODOS MATEMÁTICOS PARA LA ECONOMÍA. Campos y autosistemas, J. Borrell Fontelles.
- MÉTODOS MATEMÁTICOS PARA LA ECONOMÍA. Programación matemática, J. Borrell Fontelles.
- FITOFÍSICA AMBIENTAL, C. Vicente Córdoba y M. E. Legaz González.
- ANATOMÍA VEGETAL, A. Fahn.
- ZOOLOGÍA DE INVERTEBRADOS, P. A. Meglisch.



