

EXPERIMENTOS EN FISIOLÓGÍA VEGETAL

**Editora:
Luz Marina Melgarejo**

Melgarejo, Luz Marina (Editora)
Experimentos en Fisiología Vegetal, 2010
ISBN: 978-958-719-668-9

©Universidad Nacional de Colombia
Primera edición, Diciembre de 2010

Reservados todos los derechos: Queda rigurosamente prohibida, sin la autorización escrita de los titulares del Copyright, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento comprendidos, la reprografía y el tratamiento informático y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamos públicos.

Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de Biología.
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Tel. 3165000
extensión 11334.

Diseño y diagramación

Julián R. Hernández R.
Goth's Imágenes Taller Editorial
Impreso en Colombia

Impresión

Charlie's impresores Ltda.

Impreso en Colombia

Equipo Técnico
Universidad Nacional de Colombia

Luz Marina Melgarejo. Bióloga. Dr. Sci.
Mauricio Romero. Biólogo. PhD.
Soledad Hernández. Bióloga. Dr. Sci.
Jaime Barrera. Ing Agrónomo M Sci.
María Elena Solarte. Bióloga. MSci.
Diego Suárez. Biólogo. M Sci.
Laura Victoria Pérez. Bióloga
Andrea Rojas. Bióloga
Marisol Cruz. Bióloga
Leonardo Moreno. Químico
Sandra Crespo. Química
Walter Pérez. Químico

PRESENTACIÓN

Este libro busca promover la experimentación, la profundización y la familiarización con temas relacionados con la fisiología vegetal y el uso de metodologías bioquímicas como herramientas para entender el funcionamiento de las plantas. Es una compilación de la experiencia obtenida durante más de diez años en la enseñanza de la fisiología vegetal, en la realización de prácticas de laboratorio con los estudiantes, el trabajo de campo y laboratorio, en la ejecución de proyectos de investigación, y en los talleres de transferencia para presentar los resultados al sector productivo.

Han sido tres las razones fundamentales que motivaron la realización de este libro como una herramienta de enseñanza-aprendizaje para todos aquellos que lo aborden. (1) Orientar la ejecución de algunas prácticas relacionadas con la fisiología vegetal; analizar la respuesta de las plantas frente a factores ambientales; promover la observación de los diferentes procesos y utilizar algunas metodologías de la bioquímica para la comprensión de la respuesta de las plantas al ambiente y bajo condiciones controladas. (2) Aplicar metodologías modernas que permitan solucionar problemas relacionados con el funcionamiento, la producción de las plantas y su interrelación con el medio ambiente, entre otros. (3) Capacitar y formar recurso humano para el trabajo de campo y de laboratorio con habilidad para desarrollar ensayos prácticos, y

generar soluciones a problemas relacionados con el manejo de los cultivos agrícolas y la protección de los bosques y ecosistemas nativos.

El libro presenta como estrategia para una mejor comprensión y asimilación de su contenido, prácticas de laboratorio y de campo relacionadas con temáticas de la fisiología vegetal. I) Biología y germinación de semillas. II) Análisis de crecimiento. III) Hormonas vegetales. IV) Agua. V) Nutrición mineral. VI) Fotosíntesis. VII) Respiración vegetal. VIII) Ecofisiología vegetal. IX) Fisiología de poscosecha. X) Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología.

A través de los años, los docentes de fisiología vegetal del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia hemos ganado experiencia en la enseñanza e investigación, lo que nos ha permitido generar protocolos operativos estandarizados (POE) probados en el laboratorio y/o en campo con los estudiantes de pregrado, maestría y doctorado, y en proyectos de investigación.

El trabajo que aquí se presenta ha sido posible gracias a la financiación de proyectos por parte de la Universidad Nacional de Colombia, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Colciencias, la Fundación para la Promoción de la Ciencia y Tecnología del Banco de la República, y el sector productivo nacional. Ellos nos han permitido formar recurso humano altamente calificado y contar con una infraestructura adecuada para enseñar e investigar en temas de importancia trascendental, ya que sus resultados se aplican a la solución de problemas de la agricultura y el medio ambiente. También, gracias a su apoyo hemos participado en talleres de transferencia de conocimiento dirigidos al sector productivo.

El libro va dirigido a estudiantes universitarios de las ciencias biológicas y afines, a técnicos agropecuarios, a profesionales de ingeniería agronómica, forestal y ambiental, al sector productivo agrícola y en general a las personas interesadas en la fisiología vegetal. Para facilitar la comprensión de algunos

temas, en algunos apartes se presentan ejemplos de caso, en ellos se incluyen los resultados generados a través de los proyectos de investigación.

Luz Marina Melgarejo. Dr. Sci. Química

lmmelgarejom@unal.edu.co

Profesora

Laboratorio de Fisiología y bioquímica vegetal

Grupo Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos

Departamento de Biología

Universidad Nacional de Colombia

Agradecimiento a revisores técnicos
Universidad Nacional de Colombia

Stanislav Magnitskiy. IA. PhD. *Profesor Facultad de Agronomía*
Martha Orozco. MSci. *Profesora Pensionada Departamento de Biología*
Patricia Martínez. Química Dr. Sci. *Profesora Departamento de Química*
Harold Duban Ardila. MSci. *Profesor Departamento de Química*

Tabla de Contenido

PRESENTACIÓN	7
Luz Marina Melgarejo	
I. BIOLOGÍA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS	13
Diego Suárez, Luz Marina Melgarejo	
II. ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS	25
Jaime Barrera, Diego Suárez, Luz Marina Melgarejo	
III FITOHORMONAS	39
Marisol Cruz Aguilar, Luz Marina Melgarejo, Mauricio Romero	
IV AGUA	63
Laura Victoria Pérez, Yadira Andrea Rojas, Luz Marina Melgarejo	
V. NUTRICIÓN MINERAL	79
Jaime Barrera, Marisol Cruz, Luz Marina Melgarejo	
VI. FOTOSÍNTESIS Y PIGMENTOS VEGETALES	107
María Elena Solarte, Leonardo Moreno, Luz Marina Melgarejo	
VII. RESPIRACIÓN VEGETAL	123
Marisol Cruz Aguilar, Luz Marina Melgarejo	
VIII. ECOFISIOLOGÍA VEGETAL	137
Maria Elena Solarte, Laura Victoria Pérez, Luz Marina Melgarejo	

IX. FISIOLOGÍA POSCOSECHA	167
María Soledad Hernández,, Jaime Barrera, Luz Marina Melgarejo	
X. PRUEBAS BIOQUÍMICAS COMO HERRAMIENTAS PARA ESTUDIOS EN FISIOLOGÍA	187
Leonardo Moreno, Sandra Crespo, Walter Pérez y Luz Marina Melgarejo	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	249

I. BIOLOGÍA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Diego Suárez¹, Luz Marina Melgarejo^{1,2}

Marco conceptual

La formación, dispersión y germinación de semillas, son eventos fundamentales en el ciclo de vida de las plantas gimnospermas y angiospermas. La propagación sexual de las plantas se da por medio de las semillas, las cuales tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie (Bradford y Nonogaky 2007). Las semillas (Figura 1) son estructuras complejas que consisten, en general, en: i) El embrión, que es el producto de la fusión entre el óvulo con el núcleo espermático. ii) El endospermo que provee de nutrientes al embrión para el desarrollo y el crecimiento de la plántula. Algunas excepciones, por ejemplo, las flores de las labiadas producen frutos indehiscentes llamados núculas, que internamente contienen a la semilla, la cual nunca se libera ni se separa de la pared del ovario que la protege (Ryding 1995), estas semillas no presentan endospermo. iii) La testa de la semilla formada externamente por los integumentos que representan los tejidos maternos del óvulo (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006).

¹Contribución por igual en la preparación de este tema.

²Autor para correspondencia: lmelgarejom@unal.edu.co

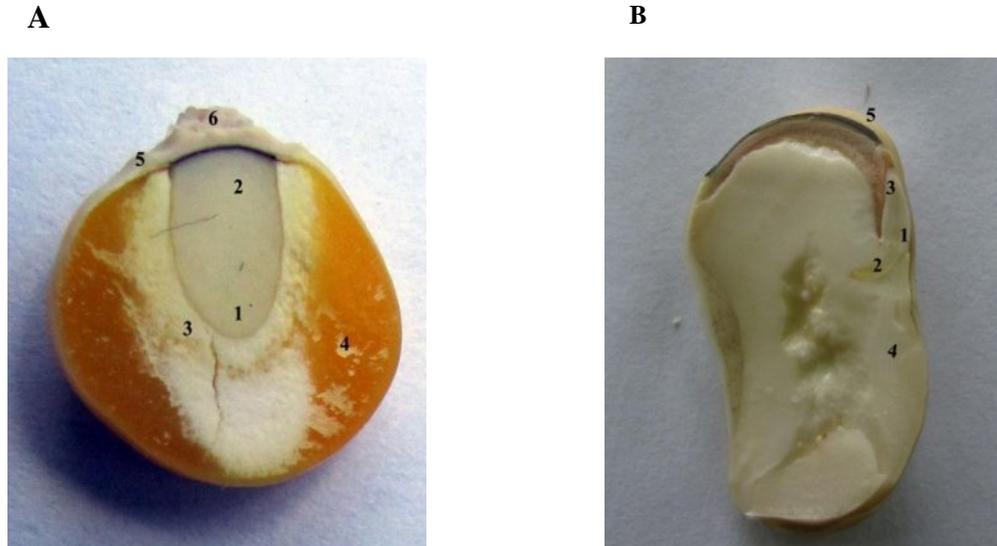


Figura 1. Principales componentes de semillas dicotiledóneas y monocotiledóneas de acuerdo al modelo presentado por Coopeland y McDonald (1995). (A) Semilla de haba (*Vicia faba*) hipocótilo (1), radícula (2), plúmula (3), cotiledón (4) y testa (5). (B) Semilla de maíz (*Zea mays*) plúmula (1), radícula (2), cotiledón (3), endospermo (4), pericarpio (5), punto de cariopsis (6). Fuente: Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

Para que la semilla cumpla con su objetivo, es necesario que el embrión se transforme en una plántula que sea capaz de valerse por sí misma, mediante mecanismos metabólicos y morfogenéticos, conocidos como proceso de germinación. El proceso de germinación está constituido por varias fases: i) Absorción de agua por la semilla o imbibición; ii) Activación del metabolismo y proceso de respiración, síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva; iii) Elongación del embrión y ruptura de la testa a través de la cual se observa salida de la radícula.

El proceso de germinación está influenciado tanto por factores internos como externos. Dentro de los factores internos están la viabilidad del embrión, la cantidad y calidad del tejido de reserva y los diferentes tipos de dormancia. Algunos de los factores externos que regulan el proceso son el grosor de la testa, disponibilidad de agua, temperatura y tipos de luz. El estudio de la biología y fisiología de las semillas es de vital importancia para el hombre, ya que la mayoría de las especies cultivadas como los cereales son propagadas a partir de semillas sexuales (Russo *et ál.* 2010).

Imbibición: es el proceso de absorción de agua por la semilla. Se da por las diferencias de potencial hídrico (mátrico) entre la semilla y la solución de imbibición.

Este proceso consta de tres fases: i) incremento rápido en la absorción de agua; ii) fase de estabilización y movilización de nutrientes; iii) absorción de agua que generalmente coincide con el proceso de germinación (Figura 2).

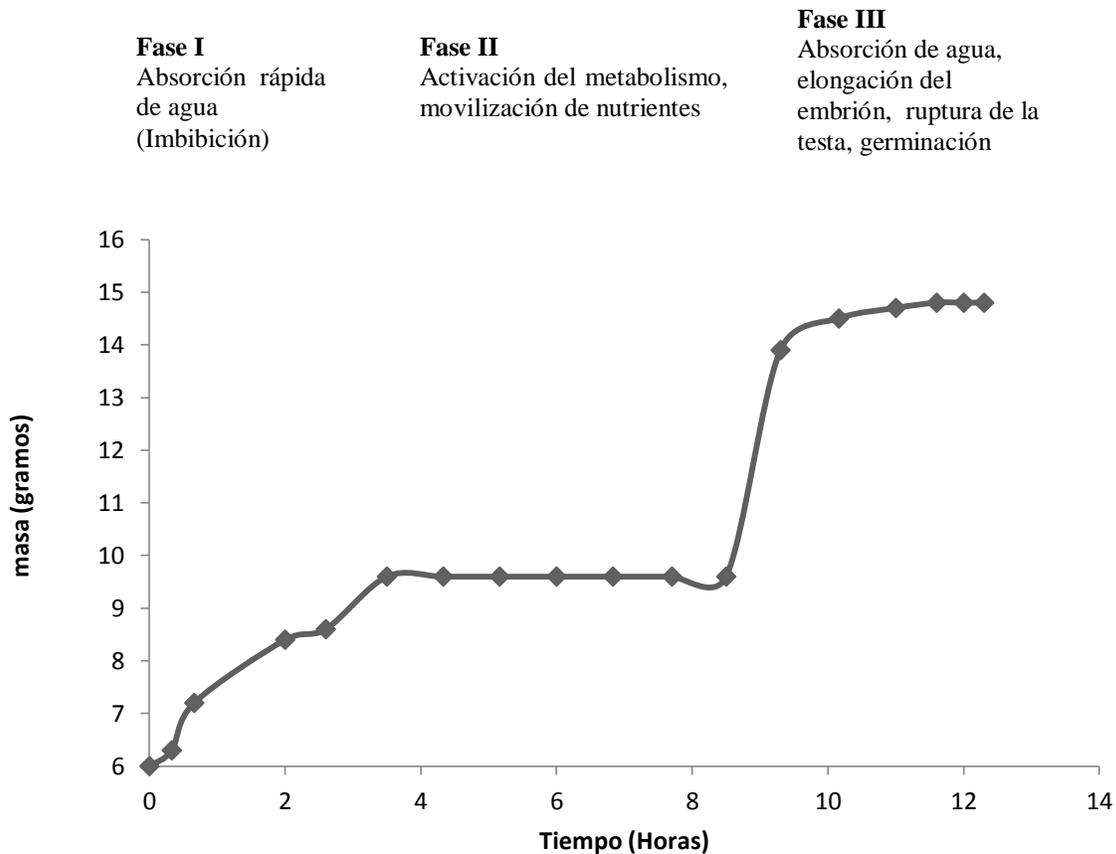


Figura 2. Fases del proceso de germinación en *Phaseolus vulgaris*. (Fuente: Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

Movilización de nutrientes: durante el proceso de germinación, en cereales por ejemplo, las reservas de nutrientes principalmente almidón y cuerpos proteicos son convertidos en compuestos básicos como azúcares simples y aminoácidos que son transportados y oxidados para suplir el crecimiento y la elongación del embrión (Taiz y Zeiger 2006).

Viabilidad del embrión. Una de las primeras pruebas en el trabajo con semillas es evaluar la viabilidad del embrión, una vez corroborada la capacidad de la semilla para germinar es importante estudiar y evaluar algunos factores internos y externos que afectan el proceso de germinación.

Para los tecnólogos de semillas la viabilidad se refiere a la capacidad de la semilla para germinar y generar plántulas normales; mientras que desde la perspectiva fisiológica se refiere a si la semilla contiene o no cualquier tejido con actividad metabólica, y si posee reservas energéticas y enzimas para el funcionamiento de las células de la planta (Moreira *et ál.* 1992). Existen diversos métodos que brindan idea sobre la viabilidad de la semilla, como la reacción con las sales de tetrazolium (Moreira *et ál.* 1992), esta prueba provee un método alternativo indirecto para medir la actividad respiratoria asociada a la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. La reducción de la sal de tetrazolium causa la formación de un precipitado insoluble, conocido con el nombre de formazán, que colorea al embrión viable de un color rojo intenso (Figura 3).

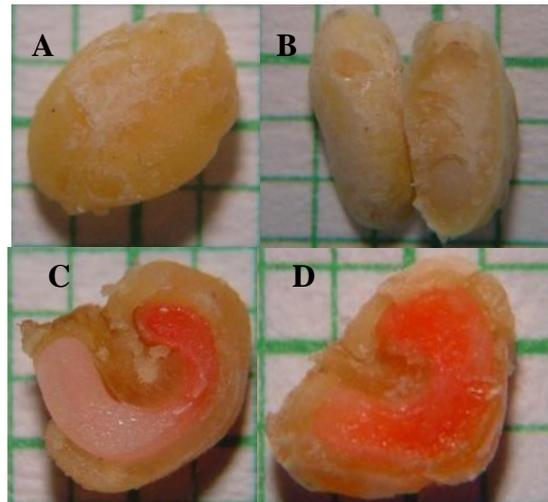


Figura 3. Prueba con trifetil tetrazolium realizada en semillas de guayaba (*Psidium guajava*). A) semilla embibida previamente en agua. B) semilla dividida longitudinalmente en dos mitades. C) inicio de coloración del embrión. D) coloración completa del embrión. (Fuente: Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

La capacidad de las semillas para retrasar el proceso de germinación hasta que las condiciones ambientales sean ideales, que permitan los mecanismos de sobrevivencia de las plántulas, es conocida como dormancia (Coopeland y McDonald 1995). La dormancia puede ser clasificada en primaria y en secundaria (Fenner 2000).

Dormancia Primaria

Es el tipo de dormancia más común en el que se puede encontrar las semillas, está dado por factores exógenos y endógenos.

Dormancia exógena

Hace referencia a las condiciones ambientales básicas que determinan el proceso de germinación como disponibilidad de agua, luz y temperatura (Fenner 2000). La absorción de agua por parte de la semilla está directamente influenciada por la presencia de la testa y la permeabilidad que ésta tenga al intercambio gaseoso (Bewley y Black 1994; Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006); algunas familias como Fabaceae, Malvaceae, Chenopodiaceae y Liliaceae presentan problemas de permeabilidad del agua y son conocidas como semillas duras (Coopeland y McDonald 1995). El efecto de la testa puede ser mecánico, o químico debido a la presencia de inhibidores fenólicos, impidiendo el flujo necesario de agua y oxígeno para la germinación.

La temperatura está frecuentemente asociada con el proceso de germinación por afectar el porcentaje de germinación, la tasa diaria de germinación, la tasa de absorción de agua, la velocidad de las reacciones enzimáticas y el transporte de las sustancias de reserva (Probert 2010)

En referencia a los requerimientos de luz necesarios para el proceso de germinación, las semillas se clasifican en tres grupos. El primer grupo corresponde o involucra a las semillas fotoblásticas positivas, ellas germinan como respuesta a la luz (Figura 4). En el segundo grupo están las fotoblásticas negativas, en él las semillas sólo germinan en oscuridad. En el tercer grupo están las semillas insensibles a la luz, germinan indistintamente bajo condiciones de luz u oscuridad (Takaki 2001).

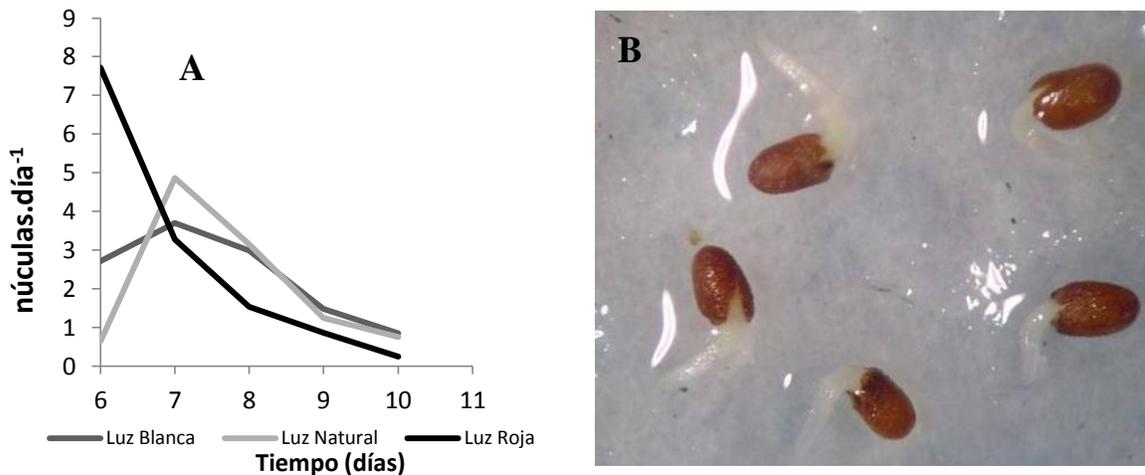


Figura 4. (A) Tasa de germinación de *Minthostachys mollis*, (B) Núculas de *M. mollis* germinadas bajo condiciones de luz. Barra= Objetivo 20X. (Fuente: Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia).

Dormancia endógena

Es el tipo de dormancia que es inherente a las características internas de la semilla, entre estos se encuentran: dormancia por embriones rudimentarios, dormancia por inhibición metabólica y dormancia por inhibición osmótica.

i) Dormancia por embriones rudimentarios. En algunas especies el proceso de maduración morfológica del embrión ocurre después del proceso de dispersión, lo cual se convierte en un tipo de dormancia porque el embrión inmaduro es incapaz de germinar, algunas especies como *Ranunculus*, *Plantago*, *Fraxinus*, *Viburnum*, *Ilex* y *Pinus* presentan este tipo de dormancia que se caracteriza por la maduración del embrión días o semanas después del proceso de dispersión (Coopeland y McDonald 1995).

ii) Inhibición metabólica. Algunos compuestos presentes en las semillas inhiben vías metabólicas específicas; por ejemplo, la presencia de cianuro en algunas semillas actúa inhibiendo la germinación debido a que bloquea la cadena de transporte de electrones en el proceso respiratorio; sin embargo, en muy bajas concentraciones el cianuro promueve el proceso de germinación (Coopeland y McDonald 1995).

El ácido abscísico (ABA), es una de las hormonas de crecimiento que regula el proceso de maduración, desecación y el mantenimiento de la dormancia de la

semilla, como mecanismos para evitar la germinación precoz (Black *et ál.* 2000). Reguladores de crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas son conocidos como sustancias que ayudan a desequilibrar las concentraciones endógenas de ABA, ayudando a romper la dormancia.

Algunos compuestos fenólicos también están involucrados en la inhibición del proceso de germinación. Una de las sustancias inductoras de la dormancia es la cumarina, la cual es metabolizada en semillas y es considerada un inhibidor natural de la germinación; el mecanismo exacto de acción aun no es claro, pero la evidencia experimental indica que este inhibidor interfiere con el proceso de fosforilación oxidativa e indirectamente con la disponibilidad de energía del embrión (Coopeland y McDonald 1995).

iii) Inhibición osmótica: Algunas sustancias poseen alta presión osmótica que inhiben el proceso de germinación en semillas. Compuestos como azúcares o sales en concentraciones altas pueden ser buenos competidores por la disponibilidad de agua con las semillas lo cual lleva a que el proceso de imbibición en las semillas no se complete y esta no pueda germinar. Ejemplos de este tipo de dormancia son encontrados en los frutos de remolacha azucarera en donde la alta concentración de azúcares y sustancias inorgánicas inhiben la germinación de las semillas (Coopeland y McDonald 1995).

Dormancia secundaria

Algunas semillas no dormantes encuentran condiciones que generan posteriormente la inducción de la dormancia. Este tipo de situaciones puede ser causado por la exposición de las semillas a condiciones que favorecen la germinación junto con la exposición a un factor que bloquea y restringe el proceso de germinación. Ejemplos de este tipo de dormancia es reportado en semillas de variedades de trigo de primavera y cebada de invierno en la que la dormancia secundaria puede ser inducida luego de una exposición de las semillas deshidratadas a temperaturas entre 50°C a 90°C, o el almacenamiento durante siete días de semillas de trigo de primavera en condiciones de alta humedad (Coopeland y McDonald 1995). Otro ejemplo, es el reportado en semillas de *Ulmus* al someter las semillas a tratamientos de oscuridad continua en el que se generó un descenso en el porcentaje de

germinación que no pudo ser corregido con tratamientos de alternancia de temperatura (Nomiya 2010). Aunque los mecanismos de dormancia secundaria pueden estar dados por el efecto de factores térmicos (temperatura), por presencia o ausencia de luz; este tipo de dormancia puede también ser inducida por exceso o ausencia de agua, compuestos químicos y gases. Algunos investigadores sugieren dos hipótesis para explicar el modo de acción de la dormancia secundaria: la primera es la imposición o bloqueo de puntos control en los procesos metabólicos que hacen parte del proceso de germinación, y la segunda hace referencia a la inducción por algún factor (exceso o déficit de agua, luz, temperatura y gases) de sustancias que inhiben la germinación contra sustancias que promueven el proceso (Coopeland y McDonald 1995).

Fase experimental

Las semillas a utilizar serán previamente colectadas teniendo en cuenta la homogeneidad en cuanto a la procedencia y edad (Delouche *et ál.* 1971; Desai *et ál.* 1997). Realizar los diferentes ensayos por cuadruplicado.

Ensayo 1. Prueba de viabilidad

Materiales

Material biológico: semillas de diferentes especies

Reactivos: cloruro de trifetil-tetrazolium al 1% disuelto en agua destilada.

Otros materiales: cajas Petri, cuchillas

Equipos: Estereoscopio

Metodología

Colocar en imbibición por 24 horas cuatro lotes de 50 semillas cada uno. Posteriormente, realizar cortes longitudinales que permitan que el embrión quede expuesto. Para establecer la posición, la forma y partes del embrión realizar cortes y esquemas preliminares, de ser necesario observar en el estereoscopio. En una caja de Petri verter 10 mL de cloruro de trifetil tetrazolium al 1% y sobre ésta solución colocar las mitades de 20 semillas, cuidando que la superficie de corte y el embrión queden en contacto con la solución. Posteriormente, dejar las cajas de Petri en un sitio oscuro por tres horas, manteniendo una temperatura entre 35-38 °C,

posteriormente observar y contar las semillas en las cuales el embrión se ha coloreado (Delouche *et ál.* 1971). Con los datos obtenidos determinar el porcentaje de viabilidad.

Ensayo 2. Curva de imbibición

Materiales

Material biológico: semillas pequeñas de diferentes especies

Otros materiales: cajas Petri o vasos de precipitado o frascos de boca ancha, papel absorbente

Equipos: balanza analítica o semianalítica

Metodología

Para la curva de imbibición registrar la biomasa fresca de cuatro lotes de 50 semillas, posteriormente colocarlas en diferentes frascos de boca ancha que contengan tres, cinco y siete mL de agua destilada respectivamente, registrar la biomasa fresca a intervalos de una hora hasta que el peso de la biomasa no varíe (Moreno *et ál.* 2006). Previo a cada medición secar con papel absorbente el exceso de agua. Con los datos obtenidos graficar y obtener la curva de imbibición de las semillas, masa Vs tiempo.

Ensayo 3. Porcentaje de germinación

Materiales

Material biológico: semillas de diferentes especies

Otros materiales: cajas Petri, papel filtro

Metodología

En cajas Petri colocar en el fondo una doble capa de papel filtro (Baskin y Baskin 2001) y agua destilada (este es el medio estándar de germinación), posteriormente colocar las semillas (dependiendo del tamaño en un número aproximado de 50 unidades por caja). El agua no debe cubrir la totalidad de la semilla. Mantener las cajas en un cuarto oscuro a temperatura ambiente y evaluar dos veces por semana el número de semillas germinadas, sacar las semillas que vayan germinando. Con los datos obtenidos determinar el porcentaje de germinación.

Ensayo 4. Prueba de vigor

Materiales

Material biológico: semillas de diferentes especies

Otros materiales: germinador, suelo u otro sustrato

Metodología

Sembrar cuatro lotes de 50 semillas cada uno, en germinadores con suelo y dos veces por semana contar el número de plantas que han emergido, con el fin de establecer la velocidad del proceso número de semillas germinadas/día (Bauer *et ál.* 2003). Con los datos obtenidos realizar la respectiva gráfica.

Ensayo 5. Efecto de la escarificación mecánica sobre la germinación

Materiales

Material biológico: semillas de diferentes especies

Otros materiales: cajas Petri, papel filtro, cuchillas, alfileres, arena o lija

Metodología

Este ensayo se realiza en semillas que presenten problemas de germinación (viabilidad alta pero germinabilidad baja). Con el fin de evaluar el efecto de la escarificación sobre el porcentaje de germinación, tomar cuatro lotes de 50 semillas cada uno. Someter a uno de los tres sistemas de escarificación mecánica propuestos a continuación, teniendo cuidado de no afectar el embrión: i) Punción utilizando un alfiler, ii) Desgaste de la testa empleando un abrasivo como arena o lija, iii) Corte con cuchilla en la testa. Cualquiera que sea el tratamiento seleccionado, a continuación, colocar las semillas en medio estándar de germinación y dos veces por semana registrar el número de semillas germinadas (Carreras *et ál.* 1983). Con los datos obtenidos determinar el porcentaje de germinación.

Ensayo 6. Efecto de la escarificación química sobre la germinación

Materiales

Material biológico: semillas de diferentes especies

Reactivos: ácido sulfúrico concentrado, agua destilada

Otros materiales: cajas Petri, papel filtro

Metodología

Este ensayo se realiza en semillas que presenten problemas de germinación (viabilidad alta pero germinabilidad baja). Para evaluar el efecto de la escarificación química tomar lotes de 50 semillas cada uno. Cada lote someterlo a los siguientes tratamientos: i) H₂SO₄ 20% durante dos minutos, ii) H₂SO₄ 20% durante un minuto, iii) H₂SO₄ 10% durante dos minutos, iv) H₂SO₄ 10% durante un minuto, v) H₂SO₄ 5% durante dos minutos, vi) H₂SO₄ 5% durante un minutos. Luego lavar con abundante agua destilada para eliminar residuos del ácido y finalmente dejar en medio estándar de germinación registrando dos veces por semana el número de semillas germinadas (Rossini *et ál.* 2006). Con los datos obtenidos determinar el porcentaje de germinación.

Ensayo 7. Efecto de la temperatura sobre la germinación

Materiales

Material biológico: semillas de diferentes especies

Otros materiales: cajas Petri, papel filtro, cuchillas

Equipos: incubadora

Metodología

Este ensayo se realiza en semillas que presenten problemas de germinación (viabilidad alta pero germinabilidad baja). Para establecer el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de la germinación tomar lotes de 50 semillas cada uno. Colocar cada lote en el medio estándar de germinación y en condiciones de oscuridad bajo los siguientes tratamientos: i) 4°C, ii) 18°C, iii) 27°C. Registrar dos veces por semana el número de semillas germinadas (Godoi y Takaki 2004). Con los datos obtenidos determinar el porcentaje de germinación.

Ensayo 8. Efecto de tratamientos con agua caliente sobre la germinación

Materiales

Material biológico: semillas de diferentes especies

Otros materiales: cajas Petri, papel filtro

Metodología

Este ensayo se realiza en semillas que presenten problemas de germinación (viabilidad alta pero germinabilidad baja). Para evaluar el efecto de tratamientos con

agua caliente, dejar bajo condiciones estándar de germinación lotes de 50 semillas cada uno, los cuales han sido previamente tratados, así: i) Inmersión por cinco segundos en agua hirviendo, ii) Inmersión por 50 segundos en agua hirviendo (Sanabria *et ál.* 2001). Con los datos obtenidos determinar el porcentaje de germinación.

Ensayo 9. Efecto de la luz sobre la germinación

Material

Material biológico: semillas de diferentes especies

Otros materiales: cajas Petri, papel filtro

Equipos: fitotrón o sistema con lámparas de luz rojo cercano y rojo lejano

Metodología

Dejar bajo condiciones de germinación estándar cinco lotes de 50 semillas cada uno e iluminados así (Negbi *et ál.* 1968; Plumier *et ál.* 1997): i) Con luz fluorescente todo el tiempo del experimento, ii) Con luz ambiental y en fotoperíodo natural, iii) Con luz rojo cercano, iv) Con luz rojo lejano, v) En completa oscuridad. Con los datos obtenidos determinar el porcentaje de germinación.

II. ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS

Jaime Barrera¹, Diego Suárez¹, Luz Marina Melgarejo^{1,2}

Marco conceptual

Hunt (1978), Radosevich y Holt (1984), Gardner *et ál.* . (1985) definen el crecimiento como un incremento irreversible en el tamaño de las plantas el cual a menudo es acompañado por cambios en la forma. Otros autores indican que el crecimiento es un aumento constante en el tamaño de un organismo, acompañado de procesos como la morfogénesis y la diferenciación celular (Taiz y Zeiger 2006). Mohr (1995) define que el crecimiento de los diferentes órganos de las plantas, es un proceso fisiológico complejo, que depende directamente de la fotosíntesis, la respiración, la división celular, la elongación, la diferenciación, entre otros, y que además está influenciada por factores como temperatura, intensidad de luz, densidad de población, calidad de la semilla, disponibilidad de agua y de nutrientes. Un primer nivel de estudio, el crecimiento de las plantas, se centra en el aumento de materia seca en el tiempo (Goudriaan y Van Laar 1995).

Análisis de crecimiento

Explica Hunt (1978, 2003) y Hunt *et ál.* (1984), que el análisis de crecimiento es una aproximación cuantitativa, que usa datos simples y básicos, para la descripción e interpretación de las plantas que crecen bajo ambiente natural, seminatural o controlado.

¹ Contribución por igual en la preparación de este tema.

² Autor para correspondencia: lmelgarejom@unal.edu.co

El análisis matemático de crecimiento usa medidas directas tales como masa seca total de la planta, área foliar total y tiempo; y medidas derivadas como son la tasa de crecimiento relativo (TCR), la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), la tasa de asimilación neta (TAN), duración del área foliar (DAF), relación del área foliar (RAF), y el índice del área foliar (IAF) que pueden ser obtenidas a partir de las medidas directas.

El patrón de crecimiento de un organismo se describe por medio de la curva sigmoidea. Según Steward (1969) se observan tres fases en la curva sigmoidea: i) Fase de retardación: ocurre cuando las plantas comienzan a perder masa seca durante el proceso de germinación. A medida que se desarrolla el embrión se van agotando las reservas de la semilla. ii) Fase logarítmica: en ella el crecimiento se da rápidamente y de forma lineal. iii) Fase de envejecimiento: el crecimiento comienza a decrecer disminuyendo por ende la masa seca.

Hay dos metodologías para efectuar el análisis de crecimiento, i) Análisis tradicional o clásico que involucra la toma de datos en función del tiempo (cada 1-2 semanas) en un gran número de muestras (Gardner *et ál.* 2003), con los cuales se generan funciones paramétricas flexibles que describen y explican el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como la elaboración de curvas de crecimiento. ii) Análisis funcional o dinámico el cual comprende medidas a intervalos de tiempos más frecuentes y en un pequeño número de plantas (Flórez *et ál.* 2006).

El análisis funcional presenta algunas ventajas sobre el método clásico, entre ellas: i) Efectúa el análisis con base en la masa seca y área foliar en función del tiempo. ii) Utiliza el método de regresión para el análisis, empleando datos disponibles en un tiempo, mientras que el método clásico requiere de datos de varias cosechas. iii) Requiere tomar datos a intervalos de tiempo frecuentes y en un pequeño número de plantas (Radford 1967).

Medidas de crecimiento

El crecimiento en el campo es dependiente de la variación genética y de las condiciones ambientales (relación planta-suelo-atmósfera), por ello se requiere tomar alto número de muestras para acercarse a la medida real del crecimiento de las

plantas en una población. Medidas de altura de la planta, diámetro del tallo, masa fresca y masa seca, aumento de volumen, diámetro a la altura del pecho DAP, área foliar, permitirán realizar el análisis de crecimiento.

Medidas directas de crecimiento

Las medidas directas que se tienen en cuenta para el análisis de crecimiento de las plantas son la masa seca y el área foliar. La masa seca se obtiene por la diferencia entre masa fresca y masa seca.

El área foliar, es obtenida con la medida de la superficie de las hojas fotosintéticamente activas. Se puede hacer por métodos directos calcando la silueta de la hoja en papel y calculando por planimetría (medidores de área foliar, escaneo y análisis de imágenes). El escaneo de imágenes consiste en escanear las siluetas de cada hoja y mediante un software de imágenes calcular el área.

Los métodos indirectos o alométricos permiten estimar el área foliar a partir de la medida directa de las dimensiones de la hoja (especialmente el largo y el ancho). Se determina una relación entre el área de la hoja y las dimensiones de la misma o el producto de ambas. Mediante modelos de regresión se establece la mejor relación entre el área y las dimensiones de la hoja.

Medidas indirectas de crecimiento (Índices de crecimiento)

Mediante el empleo del método clásico, basado en las fórmulas para valores promedios propuestos por Watson (1952), Yoshida (1972) y Hunt (1978) se pueden calcular índices de crecimiento tales como las que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Índices de crecimiento empleados en fisiología vegetal y de cultivos, adaptado de Gardner *et ál.* (2003)

Índice de crecimiento	Símbolo	Valor instantáneo	Valor promedio en un intervalo de tiempo (T ₂ -T ₁)	Unidades
Tasa de crecimiento relativo	TCR	$\frac{1}{w} \frac{dw}{dt}$	$TCR = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{(T_2 - T_1)}$	g/(g día)
Tasa de asimilación neta	TAN	$\frac{1}{AF} \frac{dw}{dt}$	$TAN = \frac{\frac{(W_2 - W_1)}{(T_2 - T_1)}}{\frac{(\ln AF_2 - \ln AF_1)}{(AF_2 - AF_1)}}$	g/(cm ² día)
Índice de área foliar	IAF	$\frac{AF}{As}$	$IAF = \frac{\frac{(AF_2 + AF_1)}{2}}{\frac{1}{As}}$	Dimensional según las unidades
Tasa de crecimiento del cultivo	TCC	$\frac{1}{As} \frac{dw}{dt}$	$TCC = \frac{1}{As} \times \frac{(W_2 - W_1)}{(T_2 - T_1)}$	g/(cm ² día)
Tasa absoluta de crecimiento	TAC	$\frac{dw}{dt}$	$TAC = \frac{W_2 - W_1}{T_2 - T_1}$	g/día
Duración de área foliar	DAF	-	$DAF = \frac{(AF_2 + AF_1) \times (T_2 - T_1)}{2}$	cm/día
Área foliar específica	AFE	$\frac{AF}{MF}$	$AFE = \frac{\frac{AF_2}{W_2} + \frac{AF_1}{w_1}}{2}$	cm ² /g

$\frac{dw}{dt}$ = derivada de la función, AF=área foliar, AS= área del suelo, MF= masa seca foliar, T= tiempo, W= masa seca.

Modelos de crecimiento:

La formulación, estructuración y aplicación de modelos de simulación de cultivos ha sido un área que se ha desarrollado considerablemente en los últimos años, por sus aplicaciones en la toma de decisiones sobre planificación y manejo de cultivos hortícolas. Estos modelos tienen como objetivo fundamental la validación correcta de los procesos de crecimiento y desarrollo en plantas (Gary *et ál.* 1998).

Los modelos de crecimiento se pueden dividir en empíricos (descriptivos) y en causales (mecanísticos o explicativos), basados estos últimos en procesos fisiológicos (Hunt 1982; Prusinkiewicz 1998). Los modelos empíricos no tienen en

cuenta explícitamente los efectos del ambiente, por lo tanto, las funciones son básicamente descriptivas y se ajustan a unas condiciones específicas sin que se puedan extrapolar los resultados a otras condiciones (Marcelis *et ál.* 1998). Por el contrario, los modelos mecanísticos proveen explicaciones y respuestas que integran el mecanismo y contribuyen al entendimiento del proceso bajo estudio (Prusinkiewicz 1998).

Modelos descriptivos

La interpretación cuantitativa del crecimiento en los modelos descriptivos se han desarrollado bajo dos enfoques matemáticos, conocidos como el análisis clásico y el análisis funcional (Hunt, 1990). Ambos modelos toman como variables base el incremento del área foliar como medida del sistema asimilatorio y la materia seca como medida del material vegetal presente. Estas medidas aplicadas a cultivos deben hacer referencia a un área de terreno. El análisis de crecimiento puede hacerse para plantas individuales o para comunidades de plantas. El análisis de crecimiento de una planta individual generalmente se realiza en estadíos tempranos de desarrollo, en los cuales se calculan algunos índices (Tabla 1) como tasa de crecimiento relativo (TCR), tasa de crecimiento absoluto (TCA), tasa de asimilación neta (TAN), área foliar específica (AFE) y tasa foliar (Gardner *et al.*, 2003). En estudios agronómicos, en general, se evalúa el crecimiento de comunidades de plantas o cultivos, que es representado como la producción o rendimiento económico de órganos de interés. Algunos de los indicadores de crecimiento en cultivos son el índice de área foliar (IAF), la duración del área foliar (DAF), la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), la tasa de asimilación neta (TAN), la partición de masa seca por órganos y los coeficientes de partición o índices de partición, y la biomasa total (Gardner *et ál.* 2003). En general, un análisis completo de crecimiento comprende los índices tanto para plantas individuales como para comunidades vegetales.

Modelos mecanísticos o explicativos

Los modelos mecanísticos o explicativos se catalogan como descripciones cuantitativas de varios procesos o niveles jerárquicos que permiten probar hipótesis y sintetizar el conocimiento, que facilitan la comprensión de sistemas complejos (Marcelis *et ál.* 1998). Los componentes de los modelos explicativos son

submodelos descriptivos más sencillos que ayudan a sustentar algunos procesos propios de la dinámica de crecimiento de cultivos como la expansión celular y el desarrollo del área foliar, la eficiencia fotosintética y la distribución de asimilados (Larsen 1990). Aunque los modelos explicativos contengan y sustenten algunos componentes fisiológicos de la dinámica de crecimiento en cultivos, carecen y no contemplan la información de los procesos bioquímicos que se dan a nivel celular, que son parte integral de los procesos de producción y asignación de materia seca. Un ejemplo es el modelo simple de producción potencial que estima y explica la tasa de crecimiento y distribución de masa seca a partir de modelos multiplicativos que incluyen parámetros como la fracción de luz interceptada FL_{INT} , que a su vez se basa en modelos empíricos que explican el incremento del área foliar, la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y el uso eficiente de la radiación (RUE). Igualmente se han generado modelos más complejos que incluyen más factores como estatus hídrico (Le Bot *et ál.* 1998), nutrición vegetal (Jones y Tardieu 1998), arquitectura de la planta (Prusinkiewicz 1998), entre otros.

Los modelos de análisis funcional se generan a partir de curvas que son ajustadas a modelos no lineales de tipo exponencial, sigmoidea, logístico, polinomial y de Gompertz, según sea el caso. Los parámetros de elección del modelo apropiado están dados por el grado de ajuste del modelo o R^2 . La determinación del modelo apropiado se puede realizar por medio de paquetes estadísticos. Una vez obtenida la curva ajustada o función, se procede a derivar esta función con la cual se pueden calcular los índices de crecimiento y rendimiento (Tabla 1) como la TAN (que permite cuantificar la fotosíntesis laminar; es la producción de materia seca elaborada por la planta, determinada fundamentalmente por la fotosíntesis y la respiración); TCR (permite realizar comparaciones equitativas, normalmente relaciona una parte de la planta con la masa seca total); IAF (área de hojas verdes (m^2) por metros cuadrados de suelo); TCC (es la misma TCR pero considera una población, es decir la ganancia en materia seca de una comunidad de plantas por unidad de área de suelo y por unidad de tiempo); TAC (es una tasa de cambio en tamaño, o sea un incremento del tamaño por unidad de tiempo); AFE (índice morfológico que describe una proporción –follaje- entre el potencial fotosintético y el respiratorio, relación entre el área foliar total y la masa seca total por planta). Los valores se obtienen de los muestreos destructivos estimados como masa seca W_1 y W_2 realizados en los tiempos T_1 y T_2 , respectivamente.

Los índices de crecimiento se pueden calcular por la metodología del valor medio empleando una herramienta o tabla de cálculo llamada herramienta moderna para el análisis clásico del crecimiento vegetal en la siguiente dirección electrónica <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/content/full/90/4/485> ó <http://aob.oupjournals.org/cgi/content/full/90/4/485/DC1>. Tool for classical plant growth analysis (Hunt *et ál.* 2002)

Fase experimental

Materiales

Material biológico: semillas de especies de cultivo corto o transitorio: haba (*Vicia faba*), arveja (*Pisum sativum*), fríjol (*Phaseolus vulgaris*), rábano (*Raphanus sativus*), lechuga (*Lactuca sativa*), habichuela (*Judiaphaseolus vulgaris*), ají (*Capsicum sp*), u otras especies de interés a evaluar.

Otros materiales: pica, pala, azadón, bolsas, cordel, flexómetro, regadera, cuaderno de campo.

Metodología

Realizar la respectiva preparación del terreno. Efectuar pruebas de viabilidad del lote de semillas. Poner a germinar 200 semillas hasta la obtención de plántulas (aparición del primer par de hojas verdaderas). Trasplantar las plántulas a las parcelas de estudio evitando generar pérdida de raíces. Una vez establecidas las plántulas en las parcelas experimentales realizar riegos diarios que permitan mantener la población en buenas condiciones de campo. Con la población experimental establecida comenzar las mediciones de crecimiento semanalmente, cosechando cinco plántulas cada vez, durante el tiempo del cultivo, registrar la masa seca total y de cada uno de los órganos (raíz, tallo, hoja, flores y frutos según el caso), el área foliar y la cobertura del área foliar.

El índice de área foliar se mide a partir de los valores del área foliar por planta y dividiendo por el área de la sombra proyectada por la misma (que puede ser un círculo ($A = \pi r^2$); rectángulo largo por ancho (LxA); cuadrado lado por lado (LxL),

o según sea el caso). También se puede establecer directamente a partir de la relación que existe entre el área foliar y el terreno que le corresponde a cada planta en función de la densidad de siembra.

Para modelar el crecimiento con las medidas directas de área foliar y masa seca, se pueden usar diversos paquetes o programas estadísticos digitales. A continuación se describen los pasos a seguir para procesar variables mediante análisis de regresión con el paquete estadístico Statistix 9,0:

1. Los datos originales son introducidos en una hoja de Excel donde en la primera columna se consigna la especie evaluada o accesión o variedad, en la segunda columna los días después de trasplante (ddt), en la tercera columna el número de réplica, en la cuarta columna el área foliar (AF) y en la quinta columna la masa seca (W). Tener cuidado de introducir las cifras decimales con puntos y no con comas.
2. En el paquete Statistix 9,0 en la ventana **File**, seleccionar **import**, en la ventana que abre ubicarse en la opción **Tipo** y seleccionar **Excel files y Abrir**. Seleccionar **Read names from file** y **Aceptar**
3. Con la matriz de datos en Statistix seleccionar la pestaña **Statistixs - Nonlinear models** y luego **Polinomial regression**.
4. En **Polinomial regression** introducir con el ícono que identifica flechas a la izquierda o derecha la **Dependent Variable** seleccionando área foliar o peso seco y como **Independent variable** los ddt. Introducir en la ventana de **Degree** el número 4 teniendo en cuenta que este valor se va cambiando según los resultados que arroje el análisis desde 4 hasta 2. oprima **OK**.
5. En los resultados que arroja el sistema verificar los siguientes parámetros: En **Predictor** verificar el valor de **P** que sea significativo ($P < 0,001$) y mas abajo en el **R-Squared** que sea alto $> 0,85$, seguido verificar el valor de **P** en la tabla de Anava de la regresión que inicia con la palabra **Source**, y en la columna **P** que el valor sea significativo ($< 0,001$).
6. Si estas disposiciones no se cumplen, pulsar la ventana de **results**, seleccionar **Options** y cambiar el valor escrito en la ventana **degree** por

- el que sigue en orden descendente (4 a 3 a 2), Pulsar **Ok** y verificar las normas del ítem 5 nuevamente.
7. Una vez validados los resultados obtener la ecuación de tipo $WS = Constant \pm ddt \pm ddt^2$. Estos valores se obtienen de la tabla de **Original Scale**, la columna de **Predictor variables** determina los parámetros del modelo (**Constant, ddt, ddt², etc**). Es necesario tener presente que si el valor de **Degree** es mayor a 2, la ecuación será un polinomio de tercer o cuarto orden y así sucesivamente. Los valores corresponden a los consignados en la columna **Coefficient**.
 8. Si los modelos polinomiales no ajustan se procede desde el ítem 2 y en la ventana de **Statistix** seleccionar **Nonlinear Model** y luego **Nonlinear Regression**
 9. En **Nonlinear Regression** se procede igual asignando la **Dependent variable** y la **independent variable** pero en la opción de **Predefined model** seleccionar la ecuación predefinida que se considere y pulsar **Ok**.
 10. En los resultados se verifica que: Las columnas de **lower 95% C.i.** y **Upper 95% C.i.**, los valores no sean negativos. Seguido se verifica que el valor de **Pseudo R.square** sea alto $>0,85$. Con estas consideraciones se selecciona el mejor modelo de las 30 opciones que hay predefinidas y se obtiene la ecuación respectiva con los parámetros de la columna **Parameter** y los valores de la columna **Estimate**.

Una vez obtenidos y modelados los datos de masa seca y área foliar, calcular la curva de crecimiento junto con los principales índices de crecimiento IAF, TAN, TCC, TCR, DAF (Tabla 1) para la especie de interés. Analizar y concluir.

Ejemplo caso de estudio

Análisis de crecimiento de dos accesiones de ají amazónico *Capsicum* sp (Castellanos et ál. 2009)

De la colección de germoplasma de *Capsicum* Amazónico se seleccionaron dos accesiones de las especies *C. chinense* y *C. annum* por su alto grado de pungencia con el objeto de evaluar su crecimiento. Para este propósito se estableció un

experimento en condiciones de campo en la ciudad de Florencia, Caquetá-Colombia. Se realizaron registros de masa seca y área foliar a partir de muestras de cinco plantas completas a las cuales se les evaluó semanalmente el área foliar por planimetría, cobertura del área foliar y la masa seca total (Tabla 2).

Tabla 2. Medidas directas de crecimiento determinadas a dos accesiones de ají amazónico, Florencia, Caquetá, 2008. n=3.

Accesión	ddt Días después de trasplante	Área Foliar cm ²	Masa seca g	Cobertura del área foliar cm ²
210 <i>C. chinense</i>	13	30,21	1,62	154,40
	20	63,51	1,93	131,55
	27	112,90	2,86	249,25
	34	170,48	2,88	216,52
	41	257,54	7,60	182,01
	48	345,08	9,83	173,42
	55	602,05	11,67	221,56
	62	620,64	16,90	259,75
219 <i>C. annuum</i>	13	34,95	1,18	63,95
	20	53,70	1,49	86,71
	27	85,86	2,83	145,68
	34	184,66	4,93	271,88
	41	304,28	4,34	397,31
	48	384,69	6,47	312,75
	55	670,42	12,63	382,58
	62	877,86	13,93	449,71
	69	1163,07	16,70	619,11

Se determinaron las ecuaciones de regresión para masa seca y área foliar. Los mejores modelos se seleccionaron por un coeficiente de correlación $r^2 > 0,80$. Se usó la herramienta del software Statistix 9,0. Todos los modelos de mejor ajuste fueron los polinomiales de segundo grado (Tabla 3) de acuerdo con la expresión $Y = cx^2 + bx + a$ donde Y es la variable, es decir la masa seca o el área foliar, y X es la variable independiente (ddt). Se calcularon los índices de crecimiento correspondientes según las fórmulas expuestas en la Tabla 1.

Tabla 3. Ecuaciones de regresión para los valores de área foliar y masa seca de las cinco accesiones de ají *Capsicum* spp

Accesión	Variable	Ecuación	r ²
CS210	Área foliar	$y = 0,2536x^2 - 5,4358x + 63,446$	0,8214
	Masa seca	$y = 0,00565x^2 - 0,1246x + 1,6179$	0,8484
CS 219	Área foliar	$y = 0,4004x^2 + 12,985x + 145,18$	0,7969
	Masa seca	$y = 27,505x^2 + 4,1600x + 1,7404$	0,8718

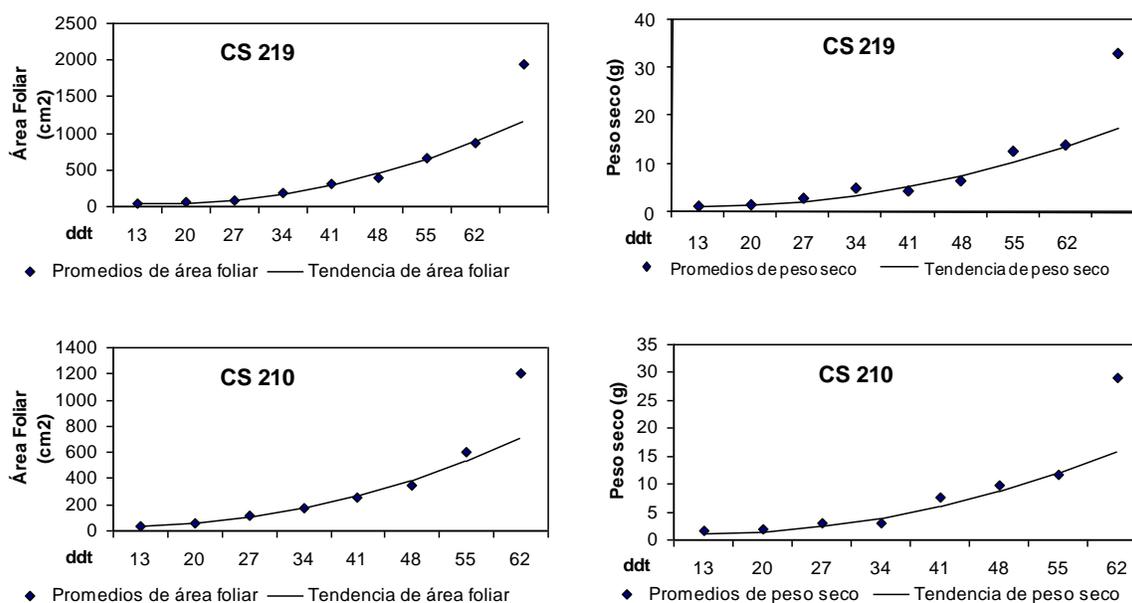


Figura 1. Área foliar y masa seca en plantas de *Capsicum* sp. Accesiones 219 (*C. annuum*) y 210 (*C. chinense*). La línea representa la tendencia del modelo, y los puntos indican los datos reales.

Los resultados de la figura 1 muestran que la fase de crecimiento rápido se presenta después de 41 ddt para *C. chinense* (CS210) y de 34 ddt para *C. annuum* (CS219). Los valores medios más altos de área foliar se obtienen en ambas especies entre los 41 y 69 ddt.

Con los datos de área foliar, peso seco y cobertura o área del dosel, se calculan los índices de crecimiento en cada período de tiempo. Con las medidas directas (Tabla 2) y aplicando las fórmulas de Gardner *et ál.* (2003) (Tabla 1), se calculan los índices de crecimiento presentados (Tabla 4).

Tabla 4. Índices de crecimiento obtenidos para dos accesiones de ají amazónico en Florencia, Caquetá

Accesión	ddt días después de trasplante	IAF	TAN	DAF	TCR	TCC
CS 210	13	0,3038	-	-	-	
	27	0,6682	0,00162	4,7254	0,0647	0,00108
	41	1,7452	0,00329	9,9624	0,1365	0,00574
	55	1,9887	0,00051	17,0251	0,0212	0,00101
	62	6,6095	0,00482	43,1604	0,1957	0,03186
CS 219	13	0,7172	-	-	-	
	27	0,9244	0,0062	6,033	0,0878	0,00573
	41	1,0669	-0,0009	7,681	-0,0252	-0,00096
	55	2,0962	0,0019	13,473	0,0948	0,00398
	69	5,2270	0,0032	35,502	0,1729	0,01673

Para las dos accesiones la TAN exhibe su máximo valor entre los 27 y 41 días ddt. Hunt (2003) indica que la TAN exhibe en general un nivel constante relativo, modificado por fluctuaciones en el ambiente durante el período de crecimiento. Páez *et ál.* (2000), encontraron en una solanacea como el tomate Var río Grande, una TAN mayor en los primeros estados de desarrollo de plantas expuestas a radiación total, condición que se hizo contraria en los estados más avanzados de crecimiento.

De manera particular a partir de los 27 ddt, el comportamiento de la TCR sigue la tendencia observada para muchas especies de crecimiento determinado.

En las etapas vegetativas de las especies anuales la planta produce biomasa de manera eficiente y sostenida en respuesta a la capacidad fotosintética. Esto explicaría la tendencia similar que muestran los índices de crecimiento IAF, TAN y TCR de los materiales de ají en etapas tempranas de crecimiento.

De las dos accesiones evaluadas, el mejor comportamiento lo registra la accesión CS 219 porque registra valores más altos de TAN, producto de una mayor área foliar lo que le provee un mayor sistema asimilatorio. Esto es consistente con el tipo de

arquitectura que muestran las dos accesiones: la accesión CS 210 exhibe escaso desarrollo foliar, presenta tipo de ramificación antocladiar en unidades simpodiales bifurcadas en dicasio con entrenudos largos, lo cual es común en el hábito de crecimiento voluble (Nuez y Costa *et ál.* 1996), ésta disposición reduce la capacidad de interceptar radiación fotosintéticamente activa PAR en un nivel superior al 40%. La accesión CS 219 exhibe por el contrario, tallo erecto con ramificaciones profusas que le proveen mayor cobertura de área foliar y mayor eficiencia en la captación de luz.

I. FITOHORMONAS

Marisol Cruz Aguilar¹, Luz Marina Melgarejo¹, Mauricio Romero^{1,2}

Marco conceptual

Las plantas han desarrollado estrategias complejas para lograr su supervivencia en un medio ambiente en constante cambio. Las interacciones entre el modelo de desarrollo de cada especie y las condiciones ambientales en donde crecen, son censadas y transmitidas por una compleja red de diferentes receptores (Lenton 1998). A excepción de la luz, los mecanismos de percepción de la planta ante los cambios medio ambientales, no se han esclarecido por completo en todos los casos. Por ello, son objeto de estudio permanente las vías de señalización que involucran una o varias hormonas (Achard *et ál.* 2006).

Estos compuestos tan importantes, responsables de los patrones de expresión génica de diversos eventos de crecimiento y desarrollo, participan en la regulación de múltiples procesos fisiológicos como la germinación de semillas, el enraizamiento, los movimientos trópicos, la tolerancia a diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos, la etapa de floración, la maduración de frutos y la senescencia, entre otros (McCourt 1999).

A diferencia de las hormonas animales, las fitohormonas se producen en las células de la planta, sin formar glándulas y se definen como compuestos orgánicos que se

¹ *Contribución por igual en la preparación de este tema.*

² Autor para correspondencia: hmromeroa@unal.edu.co

sintetizan en una parte de la planta, y se trasladan a otro sitio donde ejercen su acción fisiológica en muy bajas concentraciones, entre 10^{-9} M a 10^{-6} M, muy por debajo de la concentración de otros compuestos como nutrientes y vitaminas (Izumi *et ál.* 2009).

Las fitohormonas se caracterizan por participar en variadas respuestas morfogénicas y de crecimiento de manera pleotrópica, esto quiere decir, que una misma hormona participa en diferentes procesos y además, que dependiendo de su concentración, la misma hormona puede ser estimuladora o inhibitoria de una misma respuesta. Por otra parte, varias hormonas pueden afectar una misma respuesta, lo cual indica que hay una aparente redundancia en el control de un mismo efecto. Cada respuesta ocurre en un tiempo determinado en el desarrollo de la planta y se presenta solamente en un tejido específico u órgano (Srivastava 2002).

De acuerdo con su estructura y función fisiológica, las hormonas han sido clasificadas en varios grupos que comprenden a las auxinas, citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, jasmonatos (JA), ácido salicílico (SA), brasinosteroides, poliaminas. En el 2008, dos grupos independientemente identificaron las strigolactonas como un nuevo tipo de hormonas que inhibe la ramificación vegetal (Kamiya 2010).

Durante varias décadas se han desarrollado numerosos estudios para revelar el papel de cada fitohormona, cuyas funciones incluyen una variedad muy amplia de procesos fisiológicos. Se ha dilucidado el rol de las auxinas en procesos de crecimiento, floración, dominancia apical, crecimiento celular de los meristemos y formación de raíces en estaca leñosas; las giberelinas participan en la germinación de semillas e inducen la formación de flores y frutos; por su parte, las citoquininas retardan la caída de la hoja y el envejecimiento e inducen la diferenciación celular y la formación de nuevos tejidos; mientras que el ácido abscísico es responsable del cierre de estomas cuando hay déficit hídrico o inhibe el crecimiento vegetal en momentos de crisis, produciendo una especie de letargo; y por último, el etileno,

facilita la maduración de los frutos, la degradación de la clorofila y la posterior caída de las hojas (McSteen y Zhao 2008).

Gran parte del conocimiento actual obtenido de las respuestas mediadas por hormonas proviene de bioensayos donde se recurre a la aplicación exógena de fitohormonas. Un bioensayo permite medir en una planta o en alguna de sus partes, la respuesta de la misma a un regulador de crecimiento específico. Es uno de los mejores métodos para determinar los rangos de sensibilidad de una planta, ya que se realiza aplicación exógena de la hormona a diferentes concentraciones (Srivastava 2001).

Auxinas

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y es precisamente el ácido indol acético AIA, la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas (Srivastava 2002). La mayoría de las moléculas que integran este grupo son derivados indólicos, aunque también se encuentran algunos compuestos fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos con actividad auxínica. Las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleóptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical (McSteen y Zhao 2008).

Dado que los niveles endógenos de auxina son mucho mayores en tejidos jóvenes, es razonable sospechar que éste es su sitio de síntesis; sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser probada, debido a que las vías de biosíntesis aún no están completamente entendidas, pues se conocen múltiples y complejas vías de síntesis, algunas dependientes del triptófano y otras independientes de este amino ácido, sin que en la actualidad se haya podido establecer ninguna vía completa de síntesis de auxinas de novo. Por el contrario, se tiene suficiente certeza sobre sus roles fisiológicos, sus vías de señalización y sus mecanismos de transporte, pero aun se desconoce cómo lo produce la planta. En los últimos avances que se han hecho, se han descubierto varios genes claves en la biosíntesis de auxinas, pero aun se requiere integrar estudios genéticos con análisis bioquímicos para llenar los vacíos que subsisten (Zhao 2010).

En cuanto a los mecanismos de transporte, se conoce un mecanismo polar (más lento) en tallos y raíces, exclusivo de auxinas, que depende de proteínas transportadoras específicas para esta hormona (la familia de transportadores PIN-FORMED) (Klein-Vehn y FrimL 2008), y no polar en el floema (más rápido) donde se encontraría asociado con procesos de división del cambium y ramificación de raíces. Las auxinas generalmente son transportadas en el sentido del eje longitudinal de la planta, alejándose del punto apical hacia la base (basípeto) en el tallo y en el sentido contrario (acrópeto) desde la raíz (Srivastava 2002). La importancia del establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular son temas centrales de la biología celular y en la fisiología del crecimiento y desarrollo, ya que esta característica define la dirección de las divisiones celulares, y de esta forma, la arquitectura y forma individual de cada planta, además que está estrechamente relacionada con la dirección de la señalización y la comunicación intercelular (Zazímalová *et ál.* 2007).

Citoquininas

Las citoquininas han sido consideradas estructuralmente como derivadas de adeninas o purinas, y dentro de este grupo se incluyen la kinetina, zeatina y benzilaminopurina. Debido a su variación estructural se ha llegado a clasificar en citoquininas isoprenoides y aromáticas (Sakakibara 2006).

Este grupo de fitohormonas es considerado el responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular (Klee y Estelle 1991) y también el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y en la transducción de señales (Sakakibara 2006). Se cree que las citoquininas son sintetizadas en tejidos jóvenes o meristemáticos como ápices radiculares, yemas del tallo, nódulos de raíces de leguminosas, semillas en germinación, especialmente en endospermas líquidos y frutos jóvenes; desde donde se transportan vía xilema hacia la hoja donde se acumula, para luego ser exportada vía floema hacia otros órganos como los frutos (Srivastava 2002).

Recientemente se han reconocido sus mecanismos de biosíntesis y de señalización, debido al uso de técnicas moleculares modernas que han permitido la identificación de los genes que codifican para las enzimas y proteínas que controlan los puntos

clave de estos procesos (Sakakibara 2006). La biosíntesis y homeostasis de citoquininas, están finamente controladas por factores internos y externos como el nivel de otras fitohormonas y las fuentes de nitrógeno inorgánico, además su mecanismo de translocación está relacionado con el mismo sistema de transporte de purinas y nucleósidos tanto a nivel de toda la planta, como a nivel celular (Sakakibara 2006).

Giberelinas

Las giberelinas son un grupo de diterpenoides que se definen más por su estructura que por su actividad biológica, contrario a lo que ocurre con las auxinas y las citoquininas (Yamaguchi y Kamiya 2000).

Las giberelinas biológicamente activas, actúan como reguladores esenciales del desarrollo de las plantas y cubren todos los aspectos de la historia de vida de las plantas, modulando varias respuestas del crecimiento como la germinación de semillas, el crecimiento del tallo, la partenocarpia, la expansión foliar, la elongación de la raíz, la floración y la liberación de enzimas hidrolíticas en algunos tejidos (Ueguchi-Tanaka *et ál.* 2007). Únicamente las giberelinas biológicamente activas pueden cumplir con estas funciones, las giberelinas no bioactivas existen en el tejido vegetal como precursores de las formas bioactivas o como metabolitos desactivados. Se ha dilucidado que existe una necesidad estructural como requerimiento para la afinidad con el recientemente descubierto receptor de giberelinas en arroz (GID1) y sus homólogos en otras especies (Nakajima *et ál.* 2006). Parece ser que la regulación de la biosíntesis de giberelinas y de sus receptores y vías de señalización dependen de la especie de estudio (Yamaguchi 2008).

En general, se encuentran mayores niveles de giberelinas en las partes reproductivas en comparación con las vegetativas, y en partes jóvenes en comparación con las maduras. Se encuentra con facilidad en ápices de tallos y raíces, en hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras y embriones en germinación. Creciente evidencia

experimental basada en bioensayos, marcaje radioactivo en diferentes tejidos y patrones de expresión genética en *Arabidopsis*, sustentan la hipótesis que la biosíntesis de giberelinas ocurre principalmente en partes jóvenes de la planta, mientras que, en tejidos maduros es relativamente deficiente (Srivastava 2002). La biosíntesis de giberelinas inicia en los plastidios y el precursor de todo el proceso es el geranylgeranyl difosfato (GGDP); existen tres diferentes clases de enzimas necesarias para la síntesis de giberelinas bioactivas en plantas, las terpenos sintasas (TPSs) presentes en los plastidios, las citocromo P450 monooxigenasas (P450Os) ubicadas en el retículo endoplasmático y las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2ODDs) que se encuentran en el citosol (Yamaguchi 2008). Su transporte se realiza por los tejidos conductores de la planta (Srivastava 2002), pero aun no se sabe cómo se realiza su movimiento en las plantas (Ueguchi-Tanaka *et ál.* 2007).

Ácido abscísico

El ácido abscísico ABA es un sesquiterpenoide particularmente importante en la respuesta a estrés y desempeña un papel importante en procesos fisiológicos, cuyos efectos varían dependiendo del tejido y estado de desarrollo de la planta. Entre sus múltiples funciones, se incluye la inducción de síntesis de proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant), con lo cual se promueve la tolerancia del embrión a la deshidratación y acumulación de proteínas de almacenamiento. Además se le atribuye el mantenimiento de la dormancia de semillas; en hipocótilos, epicótilos y coleótilos inhibe el crecimiento y elongación; y en hojas promueve su senescencia (Finkelstein *et ál.* 2008). Se ha reconocido su antagonismo a diversos efectos de las giberelinas, incluyendo la promoción del crecimiento en plántulas y la síntesis de α -amilasa (Cutler *et ál.* 2010), cumple un papel importante en la regulación de las relaciones hídricas, por su relación determinante en la respuesta de las células guarda estomáticas y en el mantenimiento del crecimiento radical durante el déficit hídrico, lo cual se encuentra ampliamente estudiado y documentado en la actualidad (Kim *et ál.* 2010).

En general, se considera un antagonista de las hormonas de crecimiento como auxinas, giberelinas o citoquininas. Es considerada la hormona del estrés, ya que su síntesis se ve favorecida en condiciones adversas para la planta. Es una fitohormona

ubicua en plantas vasculares, cuyo movimiento lento y no polar ocurre en condiciones normales por los haces vasculares y en todas las direcciones. En condiciones de estrés hídrico el ABA aumenta su transporte desde la raíz a las hojas,

donde con el cambio de pH se redirecciona principalmente hacia las células oclusivas de los estomas para facilitar el cierre de estas estructuras y evitar mayor transpiración y pérdida de agua (Klee y Estelle 1991; Srivastava 2002). Recientemente, se ha encontrado que el ABA afecta las respuestas vegetales frente a patógenos, mediante la promoción de resistencias que van desde impedir la entrada al patógeno por vía estomática, hasta incrementar la susceptibilidad interfiriendo con las respuestas de defensa del sistema inmune vegetal en el que pueden interrelacionarse otras hormonas (Cutler *et ál.* 2010).

En la actualidad y como producto del estudio durante los últimos treinta años, se han logrado identificar más de 100 loci y numerosos mensajeros secundarios implicados en la señalización del ABA, incluyendo el papel del calcio, de las especies reactivas de oxígeno (ROS), de los nucleótidos cíclicos y de algunos fosfolípidos (Nambara y Marion-Poll, 2005).

Etileno

El etileno es un gas incoloro, es una molécula orgánica con actividad biológica, producida por todas las plantas, algunos hongos, levaduras y bacterias (Srivastava 2002).

Su biosíntesis se incrementa en plantas sometidas a estrés y se asocia con procesos de senescencia y maduración. Dentro de sus funciones fisiológicas más investigadas, se encuentran las relacionadas con la abscisión de hojas, marchitamiento de flores, maduración de frutos y otros procesos relacionados con el envejecimiento, pues se plantea su participación en la degradación de clorofila y peroxidación de lípidos de membranas. También favorece la epinastia de hojas, la germinación de semillas, pone fin a la dormancia de brotes y promueve la síntesis de enzimas relacionadas con defensa a patógenos, daños mecánicos o en situaciones de estrés, entre otros (Santner y Estelle 2009).

Esencialmente se produce en todas las partes de la planta, se transporta de célula a célula difundiendo en el citoplasma, ya que es suficientemente hidrosoluble para ser transportado en solución. Por regla general, el sitio de acción del etileno es próximo al sitio de síntesis (Klee y Estelle 1991).

La vía de biosíntesis del etileno se ha venido esclareciendo desde la década de los setenta del siglo XX y en el modelo actual se ha llegado a comprobar que esta hormona es sintetizada a partir de metionina en tres pasos, de los cuales se conocen claramente los productos alternativos y las enzimas implicadas en el proceso y por lo tanto, la regulación del mismo; adicionalmente, la biosíntesis inducida de etileno y su subsecuente señalización intracelular dentro de una única y conservada vía ha sido bien caracterizada en la actualidad. Sin embargo, aun hay algunos retos por abordar, como la comprensión total de los pasos que suceden entre la recepción de la señal patogénica y la biosíntesis de etileno y las vías comunes que comparte esta hormona con jasmonatos y ácido salicílico (Alonso y Stepanova 2004).

Jasmonatos

Los jasmonatos JA, incluyen el ácido jasmónico, sus ésteres y otros metabolitos intermedios. Son ciclopentanonas cuyos niveles se incrementan rápidamente en respuesta a perturbaciones mecánicas, ataques de insectos o infecciones por patógenos. Se ha demostrado el papel de los jasmonatos como mecanismos de defensa a plagas, patógenos y estrés abiótico, así como también su participación en la formación de zarcillos, maduración de semillas, producción de polen y crecimiento de raíces, entre otros (Srivastava 2002). Regulan la respuesta de defensa frente a estrés hídrico, radiación UV y ozono, entre otros tipos de estrés, además están involucrados en mecanismos de transducción, desarrollo reproductivo, senescencia y partición del carbono y a partir del estudio de mutantes se ha podido dilucidar su papel en la maduración del polen y de los estambres (Browse y Howe 2008).

La vía de biosíntesis de jasmonatos a partir del ácido α -linolénico fue propuesta por primera vez por Vick y Zimmerman en 1983 y desde entonces, todos los estudios posteriores han confirmado los procesos bioquímicos sugeridos y han adicionado importantes detalles acerca de la enzimología, regulación y localización subcelular

de la cadena de reacciones (Browse 2009). A partir de mutantes de *Arabidopsis* se ha podido esclarecer la vía de biosíntesis de la forma activa de la hormona (jasmonoil-isoleucina, JA-Ile) y se ha comprobado su requerimiento en la supervivencia de plantas atacadas por insectos y patógenos, así como en la fertilidad de la misma; también se conocen los promotores y represores en su vía de señalización, gracias a perfiles transcripcionales, pero a pesar de los enormes esfuerzos que se han hecho en la identificación del receptor de JA y su mecanismo de acción, éste aun permanece sin ser identificado (Browse 2009).

La acción hormonal de los jasmonatos está integrada en procesos de señalización corriente arriba y corriente abajo, que incluyen la interacción con otras hormonas, con proteínas mitogénicamente activadas (MAP), cascadas de quinasas, enzimas fosfatasas y sistemas de calcio/calmodulina (Howe y Jander 2008).

Ácido salicílico

El ácido salicílico es un compuesto fenólico presente en todos los órganos vegetales. Tiene impacto significativo tanto en el desarrollo y crecimiento de la planta, como en los procesos de fotosíntesis y transpiración ya que está relacionado con la toma y transporte de iones, así como con, la estructura de los cloroplastos y la anatomía de la hoja. Por otra parte, se le ha asignado una fuerte responsabilidad como señal endógena en la resistencia a patógenos y en la Resistencia Sistémica Adquirida SAR (Santner y Estelle 2009).

Mucho se ha aprendido durante las dos últimas décadas, acerca de cómo es generada, regulada y traducida la señal de ácido salicílico (SA) para dar origen a la muerte celular producida por la respuesta hipersensible (HR), la expresión de genes de defensa y/o la SAR. Una de las preguntas que actualmente orienta las diferentes investigaciones es el conocimiento de cómo es percibida inicialmente esta molécula por la planta y cómo este reconocimiento dirige los eventos de señalización de los mecanismos de defensa, hasta el momento se han caracterizado cuatro proteínas que se unen a SA; sin embargo, ninguna de ellas es el receptor de esta hormona (Vlot *et ál.* 2009).

Aunque está bien establecido que se requiere acumulación de ácido salicílico en los tejidos sistémicos localizados, para inducir una respuesta inmune tipo SAR, muchos de los componentes de la señalización y cómo cooperan para inducir la respuesta permanecen aún desconocidos o pobremente caracterizados (Vlot *et ál.* 2009).

Brasinoesteroides

La familia de los brasinoesteroides (BRs) está constituida por polihidroxi-esteroides ubicuos en los tejidos vegetales; sus funciones se relacionan positivamente con la elongación y división celular en tallos, el desarrollo de tubo polínico, la diferenciación del xilema y el desenrollamiento de las hojas. Fueron descubiertos a partir de extractos de polen, en los que se observaban compuestos activos con propiedades similares a las giberelinas, pero que se diferenciaban de estas en cuanto a los patrones de crecimiento y curvatura de tallos. Los más comunes en plantas superiores son castasterona y brasinólida (Srivastava 2002).

Está comprobado e incluido en el modelo actual de las vías de señalización de brasinoesteroides que el primer receptor de brasinoesteroides es una kinasa que se encuentra embebida en la membrana plasmática (BRI1), para la cual se ha determinado cada uno de sus dominios, secuencia, regulación, etc.; posterior a la percepción se inicia una cascada de señales que incluyen un conjunto de segundos mensajeros los cuales se encuentran identificados y reconocida su función en la modulación de la respuesta genómica (Vert *et ál.* 2005; Kim y Wang 2010).

Se han identificado las enzimas y genes comprometidos en la biosíntesis, así como los puntos de regulación (Fujioka y Yokota 2003). En la actualidad está pendiente dilucidar el papel de los factores que determinan la homeostasis de los brasinoesteroides, dónde y cuándo son sintetizados y cómo ocurre su distribución en la planta (Kim y Wang 2010).

Se han reportado enormes progresos en el entendimiento de la biosíntesis, la función, el metabolismo, el transporte y las señales de transducción de los diferentes

tipos de hormonas, evidenciando estrategias comunes usadas para transmitir las diferentes señales hormonales (Kamiya 2010).

Finalmente, es importante tener en cuenta que el crecimiento y desarrollo de las plantas está regulado por un equilibrio entre las hormonas estimulantes del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas y brasinoesteroides) y las hormonas inhibitoras del crecimiento (ácido abscísico, etileno y jasmonatos).

Fase experimental

En esta fase experimental se presentan algunos ensayos sencillos para el estudio y la comprensión de la función de las auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico.

Ensayo 1. Efecto de las auxinas aplicadas en solución, en la formación de raíces

Materiales

Material biológico: 25 Estacas leñosas de sauce (*Salix humboltiana*), o de tilo (*Tilia platyphyllos*)

Reactivos: AIA (ácido 3-indolacético)

Otros materiales: Tijeras podadoras, 4 macetas, cascarilla de arroz humedecida, vinilpel, láminas, laminillas

Equipos: microscopio, balanza analítica o semianalítica

Metodología

Preparar una solución de AIA de 500 ppm, para ello disolver lentamente 500 mg de AIA en 5 mL de etanol absoluto y sin dejar de agitar, agregar agua destilada tibia hasta completar a 800 mL. Una vez fría la solución aforar a 1L. A partir de la solución de 500 ppm, preparar las soluciones de 250 y 100 ppm. La solución una vez preparada dura aproximadamente dos semanas, se debe guardar en refrigerador y frasco oscuro debidamente rotulado.

Para la selección de estacas leñosas escoger ramas secundarias leñosas y gruesas (con diámetro entre 3–4 cm, medir el diámetro exacto). Posteriormente cortar

estacas de tamaño de 10-15 cm de longitud y con tres a seis nudos, realizar el corte basal diagonalmente debajo de un nudo y el corte superior sobre un nudo de manera horizontal. Eliminar las hojas inferiores dejando de tres a cuatro superiores. Tener en cuenta la polaridad de la estaca, es decir, el extremo correspondiente al ápice y el extremo correspondiente a la base, para aplicar las respectivas soluciones. Los tratamientos a evaluar serán: tratamiento 1) Control (Agua destilada), tratamiento 2) AIA 100 ppm, tratamiento 3) AIA 250 ppm, tratamiento 4) AIA 500 ppm. Mientras se realiza el montaje mantener las estacas en agua y posteriormente colocarlos en 100 mL de solución del respectivo tratamiento durante 2 horas. Luego, sembrar cinco estacas por pote conteniendo cascarilla de arroz húmeda, cubrir el montaje con vinipel para mantener una alta humedad relativa y regar periódicamente con agua. Al cabo de dos semanas, observar: número de raíces, longitud de raíces (<1 mm y >1 mm), presencia de primordios radicales, crecimiento de raíces secundarias. La escala para denotar la presencia de primordios es: A (abundante), M (medio), E (escaso) y N (ninguno). Realizar cortes mano alzada de las raicillas, observar bajo microscopio, identificar los tejidos componentes y analizar resultados.

Ensayo 2. Acción de las auxinas en la curvatura del tallo de arvejas crecidas en oscuridad

Materiales

Material biológico: Plántulas de arveja (*Pisum sativum*), cultivadas durante siete a diez días en oscuridad, plantas adultas de arveja de dos meses de edad cultivadas en oscuridad.

Reactivos: AIA (ácido 3-indolacético)

Otros materiales: 10 cajas de Petri, 5 vasos de 100 mL, cuchillas, transportador, papel aluminio, regla

Equipos: incubadora, balanza analítica o semianalítica

Metodología

Preparar soluciones AIA de 0,5, 5, 50, 500 y 1000 ppm. El procedimiento a realizar es el mismo tanto para plántulas como para plantas adultas. Todo el procedimiento se debe desarrollar en cuarto oscuro bajo luz verde.

Tomar las plántulas cuyo tallo tengan una longitud aproximada de 10 cm. Eliminar en cada una los primeros 5 mm que incluyen la yema apical y cortar secciones de tallo de 5 cm de largo. A través de la médula hacer un corte longitudinal de aproximadamente 3 cm.

Colocar los segmentos en un vaso con agua destilada (diferenciando plántulas, de plantas adultas) durante una hora. Marcar y numerar las cajas de Petri y agregar en cada una 20mL de las soluciones indicadas, realizar el montaje por triplicado. Marcar tres cajas como control y agregarles 20mL de agua destilada.

Colocar en cada caja cinco segmentos de arveja, cubrir con papel aluminio y llevar a incubadora a 30°C. Revisar el progreso de los segmentos diariamente en el cuarto oscuro; aproximadamente, luego de 48 horas se empiezan a observar cambios. Luego de 10 días, sacar los segmentos y proceder a montarlos en hojas de papel (de manera similar al montaje de un ejemplar de herbario) para fotocopiarlos. Ya fotocopiado, medir el ángulo de la curvatura así: trazar líneas paralelas a la punta y a la base de una porción curvada. Medir el ángulo de curvatura de ambos brazos de cada segmento y sacar un promedio (Figura 1). Analizar los resultados.

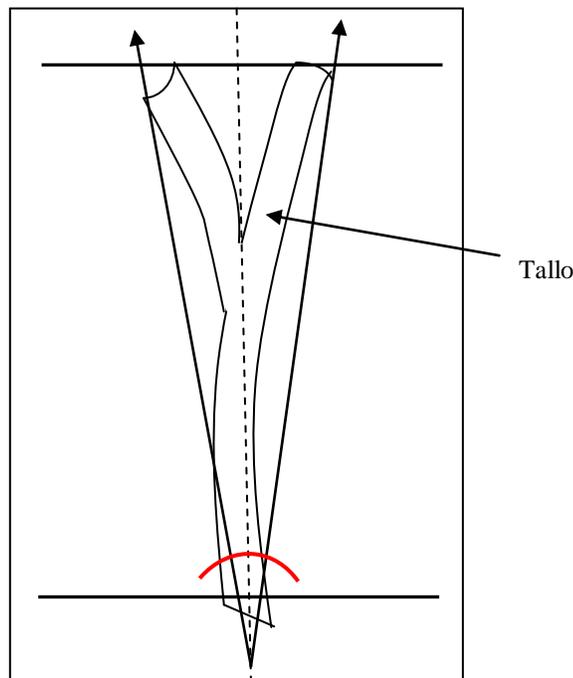


Figura 1. Medición del ángulo de curvatura en un segmento de arveja (*Pisum sativum*), joven.

Ensayo 3. Acción de las auxinas en la elongación de coleóptilos de avena (*Avena sativa*)

Material

Material biológico: semillas de avena (*Avena sativa*)

Reactivos: ácido indol acético AIA, ácido naftalén acético ANA, o ácido indolbutírico IBA.

Otros materiales: 10 cajas de Petri, cuchillas, vermiculita, arena u otro sustrato, regla, láminas, laminillas

Equipos: estereomicroscopio, balanza analítica o semianalítica

Metodología

Seleccionar semillas de avena, eliminar todas las que estén en mal estado, y proceder a desinfectarlas durante 1-2 minutos en una solución al 1% de hipoclorito de sodio. Lavar cinco veces con abundante agua destilada estéril, y colocar a embeber en agua destilada estéril durante 1 hora. Llenar un recipiente con vermiculita u otro sustrato apropiado para la germinación de las semillas, mantener húmedo con agua destilada. Sembrar las semillas en la superficie del lecho preparado y cubrir con poco sustrato.

Después de cuatro días de sembradas, seleccionar para el experimento plantas de una longitud uniforme (2,8 a 3,3 cm), con coleóptilos uniformemente rectos. Se recomienda rociar agua destilada sobre las plántulas 24 horas después de siembra de semillas y de nuevo 12 horas antes de la recolección, esto facilita el manejo de los coleóptilos.

Remover el ápice (la parte superior a 2 ó 3 mm de la punta) y separar secciones de 5 mm de cada coleóptilo seleccionado (realizar los cortes lo más uniformes posible). Seleccionar grupos de 20 y colocar durante una hora en una solución (A) consistente en agua destilada, 3% de sacarosa y buffer fosfato 10 mM de pH 4,5. Esto pondrá todos los segmentos en equilibrio y quitará la auxina endógena de ellos, además que se obtendrá un crecimiento limitado de los controles. Después de ese período de tratamiento previo, colocar un conjunto de 20 segmentos en una solución (A) nueva

para que sirvan como control. Los otros conjuntos de 20 segmentos añadirlos en el respectivo tratamiento (soluciones de 10^{-8} , 10^{-5} y 10^{-3} M de AIA, ANA, o IBA). Cada tratamiento y el control se deben realizar por triplicado. Incubar los segmentos en las soluciones, en oscuridad y durante 12 horas a 25° C.

Al final del período de incubación, transferir los segmentos para observación bajo estereoscopio, colocar uno al lado de otro, paralelamente y en una hilera. Añadir una ó dos gotas de la solución en que se hayan incubado para evitar la deshidratación. Medir y registrar la longitud de cada segmento hasta la décima de milímetro de la manera más precisa posible. Comparar las longitudes finales de los segmentos incubados.

La elongación de los segmentos de coleóptilos es directamente proporcional al logaritmo de la concentración del AIA, ANA o IBA.

Ensayo 4. Efecto de la citoquininas sobre yemas

Material

Material biológico: 8 plantas de arveja (*Pisum sativum*), de 10 cm de longitud u 8 plantas de pino de cuatro meses de edad

Reactivos: Solución de cinetina de 30 ppm

Otros materiales: frasco pequeño con tapa (en los que vienen soluciones para inyectar), cuchillas, hilo de algodón y aguja gruesa, pipeta

Equipos: balanza analítica o semianalítica

Metodología

Preparar una solución de cinetina de 30 ppm. Pesar 30 mg de cinetina y disolver en 2 mL de HCl 0,1 N o en 2 mL de KOH 0,3 N. Una vez disuelto el compuesto agregar lentamente agua a 33°C hasta volumen de 800 mL. Ajustar el pH a 5,0 y aforar a 1 litro.

Luego de preparada la solución de citoquinina, separar las plantas en dos grupos iguales. Dejar un grupo de plantas como control y tratar el otro con cinetina. Pasar un hilo de algodón a través del tallo de la planta, lo más cercano al sitio donde desea producir el desarrollo de la yema axilar. Un extremo del hilo debe permanecer sumergido en la solución de cinetina contenida en un frasco mantenido a la altura

del sitio donde se inyecta la solución. Tapar el frasco para evitar que se evapore la solución y asegurar que el hilo esté siempre sumergido, el hilo funciona como mecha transportando la cinetina al interior del tallo. Observar al cabo de dos o tres semanas si ha brotado la base de los fascículos adyacentes al hilo y si ocurrió lo mismo con el resto de los fascículos (Fernández y Johnston 1986).

Realizar una tabla de presentación de resultados: tratamiento (control y cinetina 30 ppm). Registrar número de yemas brotadas por planta, promedio de yemas por tratamiento, presencia de anomalías.

Ensayo 5. Efecto de las citoquininas en el retraso de la senescencia de hojas

Materiales

Material biológico: plantas de *Spinacia oleracea* (espinaca)

Reactivos: Solución de BAP 50 ppm

Otros materiales: potes, vermiculita, arena u otro sustrato, aspersor

Equipos: balanza analítica o semianalítica

Metodología

Preparar una solución de BAP de 50 ppm. Pesar 50 mg de BAP y disolver en 2 mL de HCl 0,1 N o en 2 mL de KOH 0,3 N. Una vez disuelto el compuesto agregar lentamente agua a 33°C hasta volumen de 800 mL. Ajustar el pH a 5,0 y aforar a 1 litro.

Tomar 20 plantas de espinaca adulta, crecidas sobre vermiculita, arena u otro sustrato, y mantenidas en condiciones óptimas de humedad, dividir en dos grupos. Asperjar el primer grupo con BAP 50 ppm (tratamiento) y al grupo 2 con agua destilada (control). Realizar el registro fotográfico del color de las hojas. Analizar los resultados.

Ensayo 6. Activación del crecimiento en plantas enanas y/o en plantas arrojadas por acción de las giberelinas

Materiales

Material biológico: semillas de *Phaseolus vulgaris* (fríjol) de tipo arbustivo, semillas de *Pisum sativum* (arveja) enana y plantas juveniles de *Lactuca sativa* (lechuga) y/o especies arrossetadas.

Reactivos: Solución de AG₃ de 20 y 200 ppm

Otros materiales: Aspersor, materos

Equipos: compresor, balanza analítica o semianalítica

Metodología

Pesar 200 mg de ácido giberélico y disolver en 2 mL de etanol absoluto. Luego diluir la solución con agua destilada tibia (33°C) y aforar a 1 L. A partir de ésta solución preparar una solución de 20 ppm de AG₃.

Seleccionar tres materos A, B, C cada uno con cinco plántulas de fríjol arbolito o de arveja enana que hayan extendido la lámina foliar de la segunda hoja verdadera. Las plantas de los materos A y B se asperjan dos veces por semana, durante dos semanas, con soluciones de AG₃ de 20 y 200 ppm respectivamente. En cada aspersión aplicar 2 mL de solución por planta. Las plantas del matero C (control), asperjarlas con igual volumen de agua. Observar y registrar datos durante cinco semanas.

Para el experimento con plantas juveniles de lechuga realizar un montaje similar al anterior, permitir que extiendan la cuarta hoja verdadera y asperjar cada planta con 5 mL de las respectivas soluciones de giberelinas 20 y 200 ppm. Repetir la aplicación tres veces, una cada semana. Las plantas del matero C (control), asperjarlas con igual volumen de agua. Observar y registrar datos durante cinco semanas.

Ensayo 7. Promoción del desarrollo floral por acción de las Giberelinas

Materiales

Material biológico: Plantas herbáceas fríjol (*Phaseolus vulgaris*) o arveja (*Pisum sativum*)

Otros materiales: Aspersor

Reactivos: solución de AG₃ de 250 y 500 ppm.

Equipos: balanza analítica o semianalítica

Metodología

Seleccionar tres materos A, B, C conteniendo plantas juveniles o en fase vegetativa de fríjol o arveja. A los materos A y B asperjarlos con las soluciones de AG₃ de 250 y 500 ppm respectivamente. En cada aspersión aplicar 3 mL de solución por planta, una vez a la semana durante cuatro semanas. Las plantas del matero C (control), asperjarlas con igual volumen de agua. Observar y registrar los datos durante tres meses, observar cuidadosamente las yemas apicales y laterales para comprobar el desarrollo floral.

Ensayo 8. Efecto del etileno en la maduración de los frutos

Materiales

Material biológico: cuatro frutos no climatéricos (mandarina, naranja, limón, u otros) y cuatro frutos climatéricos (banano, gulupa, aguacate, u otros) verdes y en madurez fisiológica, cuatro frutos climatéricos maduros.

Otros materiales: Campanas de vidrio herméticas

Reactivos: Ethrel de 500 ppm

Equipos: balanza analítica o semianalítica

Metodología

Bajo condiciones ambientales normales realizar los siguientes tratamientos: i) colocar por separado bajo campana de vidrio un fruto climatérico verde y uno no climatérico verde; ii) dejar por 15 minutos en agua destilada un fruto climatérico verde y uno no climatérico verde. Retirarlos y almacenar por separado en una campana de vidrio cerrada; iii) dejar por 15 minutos en solución de Ethrel de 500ppm un fruto climatérico verde y uno no climatérico verde. Retirarlos y almacenar por separado en una campana de vidrio cerrada; iv) colocar en una campana de vidrio dos frutos climatéricos (uno verde y otro maduro) y en otra campana dos frutos no climatéricos (uno verde y otro maduro). Luego de realizar los montajes tomar la hora de inicio del experimento y realizar seguimiento fotográfico cada 24 horas durante siete días, con el fin de observar los cambios externos debidos al proceso de maduración. Anotar las características iniciales de los frutos (color, consistencia, anormalidades, presencia de microorganismos). Al final del experimento determinar color, consistencia, sabor y olor de los frutos. Comparar y evaluar los tiempos de maduración entre los diferentes tratamientos. Determinar el efecto de la aplicación exógena de etileno (ethrel).

Ensayo 9. Efecto del etileno en plantas en desarrollo

Materiales

Material biológico: plántulas de fríjol (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*) o arveja (*Pisum sativum*)

Reactivos: Solución de ethrel de 500 ppm

Otros materiales: Aspersor, materos

Equipos: balanza analítica o semianalítica

Metodología

Sembrar en materos plántulas de fríjol, haba o arveja. Dividir en dos grupos (10 plantas por grupo). Al primer grupo asperjar con ethrel 500 ppm (tratamiento 1), y al segundo grupo con agua destilada (control). Asperjar dos veces por semana durante dos meses. En cada aspersion aplicar 5 mL de ethrel o agua según sea el caso. Observar y tomar datos semanalmente (longitud de vástago, longitud de entrenudos, color de hojas, área foliar), al final de los tratamientos registrar biomasa fresca y seca. Comparar y analizar resultados.

Ensayo 10. Determinación de ácido abscísico, en hojas de plantas sometidas a estrés por déficit hídrico

Materiales

Material biológico: Hojas del material vegetal de interés sometidas a estrés por déficit hídrico

Otros materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL, tubos de reacción tipo eppendorf de 2,0 y 1,5 mL, juego de micropipetas (rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L), puntas para micropipetas (rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L), balones aforados de diferentes volúmenes, vasos de precipitados, gradilla para tubos de 15 mL y de 2,0 mL, espátula, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas, máscara antigases), toallas de papel absorbente, agitador magnético, Cuarto oscuro.

Equipos: Agitador horizontal, balanza analítica o semianalítica, agitador tipo vórtex, potenciómetro, plancha de agitación magnética, centrífuga, balancín, lector de microplacas.

Reactivos: Nitrógeno líquido, metanol, butil hidroxitolueno (BHT), agua destilada, cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), cloruro de sodio, ácido cítrico

monohidratado, (+) 2-cis-(S)-ácido abscísico, Phytodetek ABA Test Kit (Agdia Inc., Elkhart, EE.UU.).

Preparación de soluciones

Solución de extracción de ABA (BHT 100 mg/L, ácido cítrico monohidratado 0,5 g/L en metanol): Pesar 25 mg de BHT y 125 mg de ácido cítrico monohidratado. Disolver en 100 mL de metanol R.A. y aforar a 250 mL en un balón aforado con metanol. Almacenar a 4 °C.

Buffer TBS (Tris 25 mM, MgCl₂.6H₂O 0,1mM y NaCl 0,15mM, ajustar a pH 7,5): Pesar 3,03 g de buffer tris, 5,84 g de NaCl, 0,20 g de MgCl₂.6H₂O y 0,20 g de azida de sodio. Disolverlos en agua destilada y llevar a un volumen de 1 L en un balón aforado.

Patrón de Ácido Abscísico 10 µmol ABA/mL: A un 1 mg de ácido abscísico (2-cis-(S)-ABA) adicionar 378 µL de metanol. Almacenar en un frasco ámbar y conservar a -20 °C.

Solución Stock de ácido abscísico 0,10 µmol ABA/mL: Tomar 100 µL de la solución patrón de ácido abscísico 10 µmol ABA/mL y diluir a 10 mL con metanol.

Solución indicador: Adicionar 1 mL de agua destilada al ABA-indicador (indicador de fosfatasa alcalina proveído por el fabricante del Kit), esperar cinco minutos y adicionar 4 mL del diluyente de indicador que también hace parte del Kit, y mezclar. Preparar el día de la determinación.

Solución sustrato: Disolver una tableta de sustrato en 5 mL de diluyente de sustrato. Ambos reactivos hacen parte del Kit. Preparar el día de la determinación.

Metodología

Preparación de muestras: las muestras son de tejido foliar de las plantas sometidas a déficit hídrico. Colectar las hojas directamente de la planta y macerar con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino, conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Procesamiento de muestras: Pesar aproximadamente 50 mg de macerado en un tubo de reacción de 15 mL tipo falcon de fondo cónico, cubierto con papel aluminio y rotulado. Anotar en el cuaderno de laboratorio la masa exacta del macerado. Adicionar sobre la mezcla anterior 2 mL de la solución de extracción y homogeneizar por dos minutos en vórtex, sobre cama de hielo. Incubar y agitar durante 12 horas sobre cama de hielo en agitador horizontal. Al final de este tiempo centrifugar durante 20 minutos a 6000 rpm y 4 °C. Separar el sobrenadante en nuevo tubo y secar bajo vacío. Este paso se realiza con el fin de resuspender la muestra en

una fase con menor concentración de metanol, debido a que el fabricante del kit recomienda que la concentración de la fase orgánica no sea mayor al 10 %. Finalmente, el residuo seco se resuspende con 0,15 mL de metanol y 1,35 mL de buffer de TBS.

Determinación de la concentración endógena de ácido abscísico (ABA)

La solución resultante del procedimiento anterior se utiliza para la cuantificación de ABA, la cual se realiza mediante el Test de ELISA (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay), basado en el principio de competencia por la unión con el anticuerpo entre el ABA presente en la muestra y una cantidad de indicador (fosfatasa alcalina) constante, el color amarillo resultante es inversamente proporcional a la cantidad de hormona en la muestra. La cuantificación se realiza de acuerdo a las instrucciones del fabricante del producto Phytodetek ABA (Agdia Inc., Elkhart, EE.UU.).

En primer lugar se prepara la curva de calibración a partir de la solución stock aplicando diluciones sucesivas. Por ejemplo, para preparar el patrón 1, en un tubo tipo eppendorf de 2,0 mL se adicionan 20 µL de la solución stock de ABA y se completa el volumen con 1980 µL de buffer TBS. Para preparar el patrón 2, se toman 50 µL de la solución (patrón 1), y se completa con 450 µL de buffer TBS, el patrón 3 se preparará entonces a partir del patrón 2 y así sucesivamente siguiendo las indicaciones de la tabla 1.

Tabla 1. Curva de calibración de ABA. (NSB: unión no específica 0 % de unión, Bo: 100% de unión, SS: solución stock)

Patrón	Solución	buffer TBS	picomolABA/mL	Dilución
1 NSB	20 µL de SS	1980 µL	1000	1:100
2	50 µL de 1	450 µL	100	1:10
3	60 µL de 2	240 µL	20	1:5
4	60 µL de 3	240 µL	4	1:5
5	60 µL de 4	240 µL	0,8	1:5
6	60 µL de 5	240 µL	0,08	1:10
7	60 µL de 6	240 µL	0,032	1:5
8 Bo	100 µL de TBS	-----	0	-----

Finalmente se procede como sigue:

Sobre la placa de 96 pozos contenida en el kit adicionar 100 µL de estándar o muestra por duplicado, seguida de la adición de 100 µL de la solución indicador del kit. Mezclar en el balancín suavemente. Cubrir los pozos con el sellador de placa del kit para incubar a 4 °C durante tres horas. Posteriormente, desechar el contenido de los pozos de la placa y lavar cada pozo con 200 µL de la solución de lavado que viene con el kit. Desechar y repetir la operación dos veces más. Hecho esto, adicionar 200 µL de solución sustrato a cada pozo. La placa se sella para incubar durante una hora a 37 °C. Finalmente retirar la placa de la incubadora y agregar 50 µL de solución de detención de la reacción a cada pozo. Leer la absorbancia a 405 nm en un detector de microplacas. Si la absorbancia del patrón 8 Bo es mayor a 0,700 el ensayo es válido, si no, es necesario dejar incubar a 37 °C por no más de media hora adicional.

Ejemplo de cálculo para la determinación de la concentración endógena de ácido Abscísico (ABA)

De acuerdo con los fabricantes del Kit, para linealizar la curva de calibración obtenida se grafica logit B/Bo en función del logaritmo de la concentración, donde:

$$\text{Logit } \frac{B}{B_0} = \ln \frac{\left(\frac{B}{B_0}\right)}{100 - \frac{B}{B_0}}$$

Siendo B= Absorbancia de la muestra, y Bo= Absorbancia del patrón con 100% de unión, valor que para este ensayo es de 0,698 unidades de absorbancia en promedio (Tabla 2). Con esto podemos calcular la función logit para cada muestra así:

Para una muestra o patrón que tiene una absorbancia de 0,458 tendremos que:

$$\text{Logit } \frac{B}{B_0} = \ln \frac{\left(\frac{0,498}{0,698}\right)}{100 - \frac{0,458}{0,698}}$$

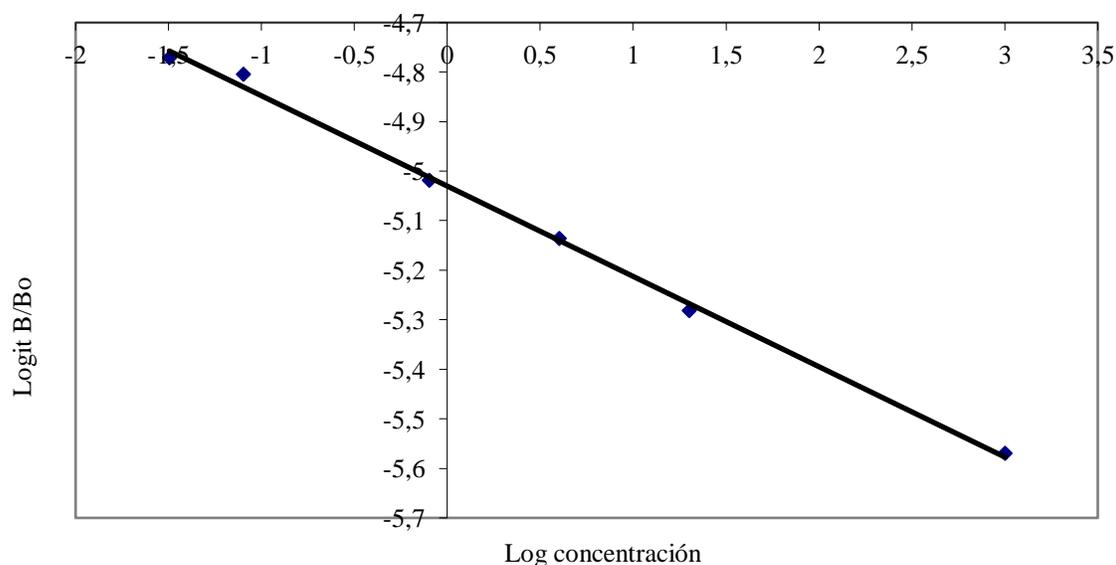
$$\text{Logit } \frac{B}{B_0} = -5,020$$

De acuerdo a esto, los resultados para la curva de calibración preparada se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados para la curva de calibración de ácido abscísico ABA. (NSB: unión no específica 0 % de unión, Bo: 100% de unión, Abs: absorbancia)

Concentración picomol ABA/mL	Log concentración ABA	Abs1 450nm	Abs2 450nm	Abs Promedio	logit prom abs
1000 (NSB)	3,00	0,277	0,277	0,265	-5,570
20,0	1,30	0,342	0,364	0,353	-5,282
4,00	0,602	0,427	0,389	0,408	-5,136
0,800	-0,0969	0,436	0,481	0,458	-5,020
0,0800	-1,09	0,561	0,573	0,567	-4,805
0,0320	-1,49	0,588	0,584	0,586	-4,772
0 (Bo)	-----	0,679	0,717	0,698	-4,595

Posteriormente se grafica el logaritmo de la concentración de ABA en función del promedio del logit (Figura 2).



$$\text{Logit B/Bo} = -0,1824 \log(\text{concentración de ABA}) - 5,0299$$

$$R^2 = 0,9975$$

Figura 2. Curva de calibración para la determinación de ABA con la ecuación de la recta

$$\text{Logit } \frac{B}{B_0} = -0,1824 \times \log \text{ concentración de ABA} - 5,0299$$

y para una muestra que presente una absorbancia de 0,500 unidades, se calcula el logit:

$$\text{Logit } \frac{B}{B_0} = \ln \frac{\left(\frac{0,500}{0,698}\right)}{100 - \frac{0,500}{0,698}}$$

$$\text{Logit } \frac{B}{B_0} = -4,932$$

Con la ecuación de la recta obtenida anteriormente se puede calcular el logaritmo de la concentración de ABA:

$$-4,932 = -0,1824 \times \log \text{ concentración de ABA} - 5,0299$$

$$\log \text{ concentración de ABA} = \frac{-4,932 + 5,0299}{-0,1824}$$

$$\log \text{ concentración de ABA} = -0,5367$$

$$\text{concentración de ABA} = 10^{-0,5367}$$

$$\text{concentración de ABA} = 0,2906 \frac{\text{picomoles ABA}}{\text{mL}}$$

Como la muestra se extrajo con 2 mL de solución de extracción, entonces:

$$0,2906 \frac{\text{picomoles ABA}}{\text{mL}} \times 2\text{mL} = 0,5812 \text{ picomoles de ABA}$$

Para obtener la cantidad de ABA endógena por gramo de material vegetal se divide por la masa de macerado utilizada, que para este caso es de 0,050 g:

$$\frac{0,5812 \text{ picomoles de ABA}}{0,050\text{g}} = 11,62 \frac{\text{picomoles de ABA}}{\text{g de material vegetal}}$$

IV. AGUA

Laura Victoria Pérez¹, Yadira Andrea Rojas¹, Luz Marina Melgarejo^{1,2}

Marco conceptual

El agua constituye gran parte de las plantas (Kramer y Boyer 1995; Taiz y Zeiger 2006). En solución acuosa ocurre la mayor parte de las reacciones metabólicas, además de procesos necesarios como el crecimiento celular, la fotosíntesis y por tanto la misma productividad (Taiz y Zeiger 2006). Por esta razón, la escasez de agua en el ambiente de la planta origina respuestas en su crecimiento y productividad. Para saber acerca del estado hídrico de la planta se pueden realizar mediciones como el potencial hídrico, el contenido hídrico relativo, la tasa de transpiración, la conductancia estomática, entre otros.

El potencial hídrico es un indicador utilizado como medida del estado hídrico en las plantas. El potencial hídrico se basa en el potencial químico del agua que es una expresión cuantitativa de la energía libre; es el trabajo que se debe realizar para llevar una unidad de masa de agua ligada a un tejido o al suelo, hasta un estado de referencia cero, que es el agua pura. Debido a que el estado de referencia es el punto cero, los valores de potencial hídrico son negativos. El potencial hídrico de una célula vegetal está dado por $\Psi_w = \psi_s + \psi_m + \psi_p$. El potencial osmótico ψ_s , depende de los solutos disueltos en el agua los cuales disminuyen el potencial hídrico de la hoja

¹ Contribución por igual en la preparación de este tema.

² Autor para correspondencia: lmelgarejom@unal.edu.co

porque el número de moléculas de agua capaces de moverse es menor. El potencial matricial ψ_m está dado por las superficies celulares sólidas que atraen moléculas de agua y disminuyen su potencial. El potencial de presión ψ_p se origina a partir de la presión de turgencia que ejerce el interior de la vacuola, cuando está llena de agua, hacia las paredes celulares, y de éstas hacia la vacuola, aumentando de esa manera el estado energético del agua (Azcón-Bieto y Talón 2000; Larcher 2003; Taiz y Zeiger 2006).

El potencial hídrico se registra preferiblemente antes del amanecer, momento en el cual la planta ha podido recuperar el agua perdida en el día y por tanto está en equilibrio con el contenido de agua del suelo (Sellin 1999). Las plantas mantienen un gradiente de potencial hídrico gracias al cual el agua asciende en flujo masivo a través del xilema, los vasos y las traqueidas. Es decir, el suelo debe tener un mayor potencial hídrico que las raíces, estas últimas un mayor potencial que el tallo, el tallo mayor que las hojas y las hojas un mayor potencial que la atmósfera. Por lo anterior, se hace referencia al término continuo “suelo-planta-atmósfera”. El agua al interior de la planta se mueve por tres vías diferentes: La vía apoplástica (por las paredes celulares sin atravesar las membranas celulares), la vía transmembranal (entra a las células) y la vía simplástica (por medio de plasmodesmos que conectan una célula con otra) (Taiz y Zeiger 2006).

Algunas especies mantienen su potencial hídrico foliar constante durante el estrés hídrico, estas son llamadas especies isohídricas, mientras que otras no pueden mantenerlo constante y son llamadas anisohídricas (Damour *et ál.* 2010).

El potencial hídrico de la planta se mide en la cámara de presión de Schöllander (Tardieu *et ál.* 2010). Para hacerlo, se corta de una planta una hoja o tallo y se coloca en una cámara de presión que está acoplada a una fuente de presión (generalmente un cilindro de gas con Nitrógeno gaseoso). Antes de cortar la hoja, la columna de agua en el xilema está bajo tensión; al cortarla, el agua es empujada rápidamente desde el xilema a las células vivas situadas alrededor. Para realizar la medida, se aplica presión positiva a la muestra a través de la cámara, mediante gas comprimido, hasta que la distribución del agua entra en las células vivientes y los conductos del xilema retornan a su estado pre-excisión; este hecho es detectado por la aparición de una gota de agua en la superficie cortada que indica el potencial hídrico de la planta. Se dice que la presión aplicada para poder distribuir de nuevo el

agua al punto inicial es la fuerza y tensión con la cual estaba unida el agua a los tejidos y por tanto es un estimado del potencial hídrico (Galmés 2006).

Otra medida del estado hídrico de la planta se realiza por medio del contenido hídrico relativo, que es un indicador del balance hídrico de la planta porque expresa la cantidad absoluta de agua que necesita la planta para alcanzar una saturación total (González y González-Vilar 2001). El contenido hídrico relativo expresa el porcentaje de contenido de agua en un momento y tejido dado. Este valor es relativo a la turgencia o saturación total y se halla normalmente en hojas o discos foliares de área conocida (Smarth y Bingham 1974).

Está dado por la ecuación (Slatyer, 1967).

$$CHR = \frac{mf - ms}{mt - ms}$$

Donde:

mf= masa fresca de la hoja o disco foliar

ms= masa seca de la hoja o disco foliar

mt= masa a plena turgencia

El paso crucial para obtener el CHR es el peso turgente, para esto se recomienda hacer una curva de imbibición de las hojas o discos foliares dado a que en un punto, debido a la saturación hídrica, se pueden comenzar a afectar las paredes celulares, pigmentos y otras estructuras de tal manera que las hojas comenzarán a perder agua. A partir de la curva de imbibición se determinará el tiempo necesario para que las hojas absorban agua hasta su punto de saturación y turgencia total (Yamasaki y Rebello 1999).

El estado hídrico de la planta está relacionado con el proceso de la transpiración en el cual la planta pierde agua por la superficie foliar, tallos (a través de lenticelas), flores y frutos. La transpiración es un proceso clave en la formación de biomasa,

además de participar de forma relevante en la estabilidad de la temperatura de la planta. La transpiración ocurre por medio de los estomas que son células

epidermales modificadas, rodeadas por otras células denominadas células guarda que al aumentar o disminuir su volumen modifican el grado de apertura del poro u ostiolo de los estomas, y con esto la tasa de pérdida de agua en forma de vapor. Los estomas pueden ser considerados como válvulas dirigidas hidráulicamente que operan en la parte aérea de las plantas (Roelfsema *et ál.* 2005). Los estomas desempeñan un rol esencial en el control de la pérdida de agua por transpiración, pero además, son la vía de ingreso de CO₂ para la fotosíntesis (Damour *et ál.* 2010). El número y la densidad de los estomas pueden ser modificados por las plantas de acuerdo a las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan (intensidad de luz, concentración ambiental de CO₂).

Los factores que influyen en la tasa transpiratoria y por tanto en la apertura estomática son el déficit de presión de vapor, que existe entre la atmósfera y las cavidades aéreas del mesófilo, la luz (calidad y cantidad), el CO₂ ambiental, la temperatura de la hoja, el estado hídrico del suelo y la presencia de contaminantes en el aire (Jones 1992; Lake *et ál.* 2001). Christmann *et ál.* (2007) recientemente han comprobado que la señal para el cierre estomático viene de las raíces y por tanto depende principalmente del contenido de agua del suelo.

La transpiración es considerada un proceso secundario inevitable, resultado de la necesidad de la apertura estomática para realizar fotosíntesis en horas del día en la cual el déficit de presión de vapor es mayor (Schulze *et ál.* 1987; Larcher 2003). Sin embargo, Snyder *et ál.* (2003) encontraron plantas en varios hábitats, con diferentes formas de vida y metabolismo fotosintético (C₃ y C₄), que presentan tasas de transpiración y conductancia estomática significativa en las horas de la noche.

Cuando la transpiración no se puede controlar y la disponibilidad de agua es baja en el suelo, disminuye el contenido de agua en la planta y esto a su vez genera la pérdida de turgencia, marchitamiento, disminución del alargamiento celular, cierre de estomas, y disminución de fotosíntesis (Shao *et ál.* 2008). Las plantas responden a este déficit con el cierre de estomas, por medio de la señal del ácido abscísico que se

transfiere de la raíz a la parte aérea de la planta para evitar la pérdida de agua, y otros mecanismos como la acumulación de azúcares y osmolitos compatibles que

disminuyen el potencial hídrico para mantener el gradiente (Yancey 2005). Esto trae consigo inevitablemente la disminución en el crecimiento. La respuesta de la conductancia estomática al ABA depende de si la especie es isohídrica o anisohídrica; para especies isohídricas la sensibilidad de los estomas al ABA se relaciona negativamente con el potencial hídrico foliar; para especies anisohídricas, la regulación estomática en condiciones de estrés hídrico depende sólo de la concentración de ABA en el xilema (Damour *et ál.* 2010).

Recientemente las acuaporinas, proteínas integrales de membrana, se han identificado como canales importantes que ayudan a la rehidratación rápida gobernando la conductancia celular para recuperar el agua y la turgencia celular (Alleva *et ál.* 2010; Vandeleur *et ál.* 2009).

La transpiración está limitada por diferentes tipos de resistencia a la difusión del agua, dentro de las cuales están la resistencia estomática (dada por número y geometría de los estomas), la resistencia cuticular (dada por la capa cerosa que recubre la epidermis), y la resistencia de la capa límite generada por el aire estático que se establece en la superficie foliar y controlada por la velocidad del viento (Larcher 2003; Taiz y Zeiger 2006).

La capacidad de una planta para regular la apertura estomática permite modular la tasa de transpiración y los requerimientos del balance hídrico. Este balance se rompe cuando la tasa de absorción de agua por parte de la raíz es menor que la tasa de transpiración (Schulze 1986). Si el suelo se seca, se reduce el paso de agua del suelo, lo que origina déficit hídrico y por tanto cierre de estomas (Domec *et ál.* 2010; Dodd y Davies 2010). Sin embargo, cada especie vegetal tiene un umbral de respuesta al potencial hídrico y a los factores que influyen en la apertura estomática (Taiz y Zeiger 2006). El estrés hídrico origina efectos en el desarrollo de comunidades naturales de plantas, así como en el crecimiento y productividad de las cosechas. Debido a esto y a la intensificación de períodos de sequía por el cambio climático global, es necesario anticipar las consecuencias del déficit hídrico en los cultivos, con el objeto de diseñar sistemas de cultivo más eficientes (Damour *et ál.* 2010).

Ciertas estrategias adaptativas de las plantas como las estrategias de fijación del carbono se relacionan también con la transpiración. Debido a que las plantas deben mantener sus estomas abiertos a expensas de la pérdida de agua, para poder acceder al CO₂ ambiental, estas han modificado el patrón tradicional de fijación de carbono para conservar el agua y ser más eficientes. Las plantas C₄ y CAM presentan diferencias anatómicas y metabólicas que les permiten disminuir la pérdida de agua con cambios en la apertura estomática (Lambers *et ál.* 1998). En tanto que las plantas C₃ y algunos subtipos de plantas C₄, en referencia a las ventajas fotosintéticas que se presentan en un ambiente méxico (hábitat que no es muy húmedo o no es muy seco, pero utiliza una mediana cantidad de humedad), se ven reducidas con la sequía, debido a que las condiciones de déficit hídrico eliminan las diferencias en la conductancia estomática, igualando el uso eficiente del agua en ambas especies (Taylor *et ál.* 2010).

La transpiración puede ser cuantificada de diversas formas, desde métodos como el potómetro, el cual mide la tasa a la cual una planta pierde agua (debido a que la planta recupera el agua que pierde por transpiración); hasta el porómetro, que es un dispositivo que mide la tasa de transpiración de una hoja, para ello la hoja a analizar es ubicada en el dispositivo tipo cubeta del equipo causando que la humedad relativa dentro de ésta aumente, posteriormente un controlador de flujo incrementa la tasa de aire seco que pasa al dispositivo para balancear el agua transpirada por la hoja, hasta que el dispositivo tipo cubeta alcanza su estado de humedad relativa inicial (estado antes que la hoja fuera ubicada). La cantidad de aire seco necesario para regresar a la cámara a su humedad relativa original permite calcular la tasa de transpiración de la hoja (Licor 1989).

El uso de la cámara de Schöllander y el porómetro permiten obtener resultados de fácil interpretación cuando se están trabajando las relaciones hídricas de las plantas. Rolando y Little (2008) encuentran en estos dos instrumentos gran precisión en las medidas tomadas en diferentes niveles de estrés hídrico.

Cada planta tiene una densidad estomática específica que influye directamente en su tasa transpiratoria. La densidad estomática es función del número de estomas más el tamaño de las células epidermales; por esta razón se ve afectada por la apertura de los estomas y la expansión de las células epidermales la cual depende de muchas

variables ambientales (Royer 2001). El índice estomático (Salisbury 1928, citado por Royer 2001) normaliza los efectos de la expansión de las células epidermales y es definido como:

$$SI (\%) = \left(\frac{\text{Densidad estomática}}{\text{Densidad estomática} + \text{densidad de células epidermales}} \right) \times 100$$

Las impresiones epidermales de hojas pueden ser tomadas fácilmente utilizando esmalte de uñas o aerosol acrílico comercial (El-Sharkawy *et ál.* 1985), los cuales se aplican sobre la hoja y son retirados después de dejarlos secar utilizando cinta pegante. Esta impresión es montada sobre láminas y observada bajo la lente de un microscopio óptico. El número de células epidermales y de estomas es cuantificado en varios campos.

No todas las hojas presentan sus estomas en la cara abaxial únicamente (hipoestomática), hay hojas que presentan estomas tanto en su cara adaxial como abaxial (anfiestomáticas). El-Sharkawy *et ál.* (1985) utilizaron la siguiente ecuación para promediar la densidad estomática de hojas:

$$\begin{aligned} & \text{Densidad estomática promedio} \\ &= \frac{\text{Densidad estomática superior}^2 + \text{Densidad estomática inferior}^2}{\text{Densidad estomática superior} + \text{Densidad estomática inferior}} \end{aligned}$$

El agua del suelo es de gran importancia dentro del balance hídrico porque de él la planta extrae lo necesario para mantener los procesos metabólicos, compensando la pérdida por transpiración. Además del suelo se extraen minerales. En el suelo el agua se mueve sobre todo por fuerza mátrica, dada por los poros y capilares

formados que generan tensión vertical y horizontal y por el potencial gravitacional que empuja el agua hacia abajo (Kramer y Boyer 1995).

Las características del suelo influyen en su capacidad para retener agua y nutrientes; la textura determina la cantidad de poros (aireación) y capilares que se necesitan para mantener el agua y a su vez para permitir la aireación de la raíz para sus procesos respiratorios. A su vez, el tipo de suelo determinará también la capacidad de intercambio catiónico (capacidad de retención e intercambio de iones para que sean disponibles para las plantas). Por ejemplo, los suelos arcillosos presentan alta capacidad de intercambio catiónico y mayor capacidad de retención de agua.

La capacidad de campo, depende del tipo de suelo, se refiere a cuando en un suelo luego de riego o lluvia drena el agua por gravedad y permanece húmedo o con un potencial hídrico cercano a cero (Kramer y Boyer 1995). Por su parte, se denomina punto de marchitez permanente al contenido de agua del suelo en el cual la mayor parte de las plantas permanecen marchitas, aún en la noche (Werner 2002). El agua disponible para la planta se refiere al agua del suelo en el rango entre capacidad de campo y punto de marchitez permanente. Entre más cercano esté el suelo al punto de marchitez permanente es más difícil para la planta disponer de agua (Kramer y Boyer 1995). Las medidas de agua en el suelo se pueden realizar a partir de la masa fresca y seca para determinar el contenido de humedad (Werner 2002).

En la actualidad se están implementando nuevos métodos no destructivos de medición, para monitorear la presión de turgencia de las hojas. Zimmerman *et ál.* (2010) reportan que a pesar de grandes esfuerzos no se ha podido correlacionar el intercambio de gases a nivel foliar y el estado hídrico en las plantas, por lo cual la técnica de “*leaf patch clamp pressure*” (LPCP) está siendo exitosamente utilizada. La prueba consiste en un sensor de presión miniaturizado integrado en una abrazadera (clamp) que se engancha a un área de una hoja intacta. Los resultados de Zimmerman *et ál.* (2010) demuestran que el LPCP es una prueba precisa, no invasiva y robusta para monitorear cambios en el estado hídrico de las hojas por varios meses.

También se han creado microbiosensores que permiten observar gradientes de potencial hídrico del suelo a microescalas alrededor de las puntas de las raíces; estos microbiosensores dan información a escalas en las cuales actúan los microbios y los

pelos radicales, información que no se puede obtener por medio de los métodos tradicionales (psicrómetros, tensiómetros, reflectometría). Los microbiosensores son células bacterianas vivientes en las cuales se ha fusionado un promotor de interés y un gen reportero dirigido por el promotor, para ello modificaron dos microorganismos *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas putida* con un sistema reportero sensible al potencial osmótico (Herron *et ál.* 2010).

Fase experimental

Ensayo 1. Contenido de agua en órganos de las plantas

Materiales

Material Biológico: Plantas completas de una especie vegetal

Otros materiales: tijeras podadoras, papel periódico, cinta para marcar, marcadores, cámara húmeda

Equipos: Balanza de dos o tres cifras decimales, estufa con aire circulante

Metodología

Seleccionar tres plantas homogéneas de una misma especie, trasladarlas al laboratorio lo más breve posible bajo cámara húmeda, limpiar las raíces y retirarlas del tallo, igualmente separar cada uno de los demás órganos y determinar la masa fresca de cada una de las partes, posteriormente envolver en papel periódico y marcar; colocar en estufa con aire circulante, a temperatura de 70°C, dejar allí por 24 horas, pasado este tiempo, retirar el material de la estufa y determinar la masa seca. Calcular el porcentaje de agua en los diferentes tejidos en función de la biomasa seca.

$$CH = \left(\frac{mf - ms}{ms} \right) \times 100$$

Ensayo 2. Contenido de agua actual, agua de saturación, contenido hídrico relativo y déficit de saturación hídrica

Materiales

Material biológico: plantas de una especie vegetal

Otros materiales: tijeras podadoras, cinta para marcar, marcadores, cámara húmeda
Equipos: Balanza de dos o tres cifras decimales

Metodología

Seleccionar una especie vegetal y retirar 10 hojas homogéneas, evitar perder el pecíolo conservando la mayor proporción del mismo (mínimo 5mm), evitar que las hojas se deshidraten. Tomar cinco hojas de las seleccionadas, pesarlas y determinar el área foliar con un planímetro.

Después de pesar las hojas, colocarlas en una cámara húmeda, la cual se puede preparar utilizando un recipiente de vidrio. En el fondo de la cámara colocar algodón o papel absorbente húmedo dejando una capa de agua lo suficiente para que los pecíolos queden sumergidos. Posteriormente, introducir las hojas en el recipiente, revisar que el pecíolo quede sumergido y tapar la cámara, colocarla en un lugar con baja iluminación, y dejar allí por dos horas. Pasado el tiempo retirar las hojas y secar el exceso de agua, luego pesar. De esta manera se determina la masa en estado de saturación o turgencia. Posteriormente empacar y llevar a secado en estufa por 24 horas a 70°C. Luego de esto pesar las hojas secas.

Con las cinco hojas restantes realizar el mismo procedimiento pero trabajando con secciones de área foliar conocida. Estas secciones foliares (mínimo 30) pueden ser obtenidas con un sacabocados, posteriormente colocar a hidratar en flotación.

$$CH = \left(\frac{mf - ms}{ms} \right) \times 100$$

$$CHR = \left(\frac{mf - ms}{mt - ms} \right) \times 100$$

$$DSH = \left(\frac{mt - mf}{mt - ms} \right) \times 100$$

Donde *CH* contenido hídrico, *CHR* contenido hídrico relativo, *DSH* déficit de saturación hídrica, *mf* masa fresca, *ms* masa seca, *mt* masa a plena turgencia

Ensayo 3. Contenido de agua en el suelo, agua en estado de saturación

Materiales

Material biológico: muestras de suelo

Otros materiales: cilindros metálicos, papel periódico, bandas elásticas, papel filtro, malla de tamaño de poro pequeño, tapas para los cilindros.

Equipos: Balanza de dos o tres cifras decimales

Metodología

Pesar tres cilindros o recipientes metálicos, para toma de muestras de suelo, con sus tapas. Una vez seleccionado el sitio de muestreo retirar la vegetación superficial. Tomar muestras de suelo a nivel superficial, a 20 y a 30 cm de profundidad, una en cada cilindro, no compactar manualmente el suelo y cuidar que los cilindros queden completamente ocupados por el suelo. Registrar la masa de los recipientes con las respectivas muestras y tapas.

Para evaluar el agua de saturación en el suelo, cubrir la base de los cilindros con papel de filtro, posteriormente con la malla plástica, y finalmente ajustar con una banda elástica. Retirar la tapa superior de los recipientes y colocarlos en una cubeta que tenga un nivel de agua de aproximadamente 1 cm, dejar saturar el suelo por dos a tres horas, posteriormente colocar las tapas y registrar la masa en saturación. Colocar el montaje en estufa con aire circulante durante 24h a 70°C y al cabo del tiempo hallar la masa seca. Calcular en función de la masa seca el porcentaje de agua actual y en estado de saturación.

$$\% \text{ agua actual} = \left(\frac{\text{masa suelo húmedo} - \text{masa suelo seco}}{\text{masa suelo húmedo}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ agua saturación} = \left(\frac{\text{masa suelo saturado} - \text{masa suelo seco}}{\text{masa suelo saturado}} \right) \times 100$$

Ensayo 4. Capacidad de campo y punto de marchitez permanente

Materiales

Material biológico: plantas de una especie vegetal

Otros materiales: materas, vasos plásticos, arena, cámaras húmedas

Equipos: balanza

Metodología

Tomar tres materas con plantas sembradas con anterioridad y cubrir la superficie de suelo con arena. Determinar el peso y regar con abundante agua. Colocar las materas sobre sustrato suelo o gravilla o arena y a las 24 horas, luego que se ha drenado el agua gravitacional, hallar el peso en capacidad de campo. Colocar nuevamente las materas sobre el sustrato y cuando se observen los primeros síntomas de marchitamiento de las plantas, pasar las materas a las respectivas cámaras húmedas y observar si se recuperan, repetir el proceso hasta el día en el cual se alcanza la marchitez permanente. Hallar la biomasa de las plantas, la masa del suelo y de las materas. Pasar el suelo a secar en estufa a 70°C por 24h y determinar su masa. Calcular el contenido de agua del suelo en capacidad de campo y en el punto de marchitez permanente. Determinar el contenido de agua del suelo en función de su masa seca. Determinar el contenido de agua del suelo en función de su masa seca deñ mismo modo que se realizó con el contenido de agua del suelo y saturación.

Ensayo 5. Determinación de potenciales hídricos en la planta, el suelo y la atmósfera

Materiales

Material biológico: planta de una especie vegetal

Otros materiales: tijeras podadoras, cuchillas, lupa

Equipos: bomba de Schöllander, tensiómetros, termo-higrómetro o estación micro-climática.

Metodología

El muestreo se realizará durante un día, iniciando en prealba (al amanecer). Registrar datos cada tres horas de los factores ambientales, y de los potenciales hídricos del suelo y de la planta. El día anterior al experimento ubicar los tensiómetros, y termo-higrómetros o estación microclimática. El día del ensayo, en las respectivas horas, tomar hojas con pecíolo (3 hojas) del tercio medio de la especie seleccionada (3 plantas) y determinar el potencial hídrico con la bomba de presión.

Luego de finalizado el día y con los datos de T y HR determinar el potencial hídrico de la atmósfera (Azcón-Bieto y Talón 2000, Larcher 2003).

$$\Psi_{\text{atmósfera}} (\text{MPa}) = 0,4608 \times (T \text{ en grados Kelvin}) \times \ln (\text{HR}/100)$$

$$\Psi_{\text{atmósfera}} (\text{MPa}) = -1,06 \times (T \text{ en grados Kelvin}) \times \text{Log}_{10} (100/\text{HR})$$

T en °K

Todos los datos llevarlos a unidades de MPa, posteriormente graficar los potenciales hídricos de suelo, planta, atmósfera. Analizar los resultados obtenidos. Ver caso de estudio en la especie *Abatia parviflora* (Capítulo 8 de este libro)

Ensayo 6. Determinación de la tasa de transpiración y conductancia estomática con el equipo porómetro Licor

Materiales

Material biológico: plantas de interés a evaluar

Equipos: porómetro, estación microclimática o termohigrómetros

Metodología

El muestreo se realizará durante un día, iniciando muy temprano y con toma de datos cada hora. Seleccionar cinco hojas del tercio medio de la especie seleccionada (tres plantas) y realizar las mediciones de tasa de transpiración y conductancia estomática con un porómetro estado-estable. Posteriormente, graficar los datos obtenidos, analizar y discutir los resultados teniendo en cuenta los registrados por la estación microclimática o por termo-higrómetros.

Ensayo 7. Determinación de la tasa de transpiración con el método del potómetro

Materiales

Material biológico: ramas de una planta leñosa o planta completa

Otros materiales: Erlenmeyer o balón fondo plano, tapón para inserción en la boca del erlenmeyer, pipeta.

Metodología

Tomar una rama no muy grande de una planta leñosa o en lo posible utilizar una planta completa (el ensayo se realiza por triplicado). Colocar la rama o la planta en una cubeta de agua para evitar cavitación y deshidratación; además de la planta

sumergir una pipeta con un tapón insertado. Posteriormente introducir la rama o la planta a través del tapón y verificar que dicha muestra vegetal haya traspasado 1cm de la longitud del tapón. Llenar un Erlenmeyer con agua desgasificada hasta rebozar, procurar que no queden burbujas y colocar el tapón con la rama y la pipeta haciendo presión para que el agua ascienda por la pipeta (Figura 1). Garantizar hermeticidad en los orificios del tapón. Marcar el volumen inicial de la pipeta, evitar que queden burbujas de aire, y con una jeringa, en la parte superior de la pipeta, incorporar una burbuja de aire marcando su localización. Registrar su desplazamiento en función del tiempo en intervalos de cinco minutos; este tiempo puede variar dependiendo de la especie. Realizar una gráfica y hacer el cálculo de regresión y correlación correspondiente.



Figura 1. Montaje del potómetro para la determinación de la transpiración. Fuente Laboratorio de fisiología Vegetal, departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia

Ensayo 8. Observación y cuantificación de estomas

Materiales

Material biológico: hojas de tres especies vegetales

Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia

Otros materiales: Láminas porta y cubre objeto, esmalte transparente, cinta pegante transparente, agua

Equipos: Microscopio

Metodología

Determinar el área foliar y observar los estomas de tres especies vegetales, verificar su presencia en el haz y en el envés, y cuantificar. i) Realizar observación directa de la epidermis, para ello rasgar la hoja, tomar los bordes más delgados donde se muestra la epidermis, realizar el montaje para observación bajo microscopio y cuantificar. ii) realizar observación de la impresión de los estomas sobre películas de esmalte; para ello colocar en el haz y envés de la hoja una capa de esmalte transparente, dejar secar por tres a cinco minutos, colocar una nueva capa de esmalte y permitir secar, repetir el procedimiento una vez más, posteriormente para retirar la impresión colocar cinta pegante transparente sobre las capas de esmalte, retirar la cinta y realizar el montaje para observación bajo microscopio y cuantificación de estomas. Si la hoja presenta alta densidad de tricomas es necesario depilar y posteriormente realizar el procedimiento de impresión de los estomas.

Es necesario observar la epidermis superior e inferior y calcular el número de estomas por cm^2 . Realizar la cuantificación en diez campos visuales para posteriormente calcular el valor en toda la superficie de la hoja.

V. NUTRICIÓN MINERAL

Jaime Barrera¹, Marisol Cruz¹, Luz Marina Melgarejo^{1,2}

Marco conceptual

Cada genotipo y especie de planta requiere una nutrición mineral óptima para su normal crecimiento y desarrollo (Kovacik *et ál.* 2007). Asociado a ello, una adecuada nutrición mineral es fundamental para alcanzar una producción agrícola que garantice la seguridad alimentaria, de manera que soporte la creciente demanda de una población mundial que día a día aumenta (FAO 1998).

Hoy más que nunca, la seguridad alimentaria se ha convertido en una preocupación mundial relevante, que ha hecho que se incrementen los esfuerzos por mejorar los sistemas agrícolas productivos, no sólo en términos de cantidad, sino también de calidad (Bourguignon y Chakravarty 2003). El reto de la agricultura en el mundo de hoy, no solamente se dirige a abastecer las necesidades básicas de la población, sino que también debe tener en cuenta el medio ambiente.

El agotamiento de los suelos y el costo de los insumos que se aplican a los cultivos para suplementar su nutrición, son los factores limitantes de la productividad de la actividad agrícola (FAO 1998).

¹ Contribución por igual en la preparación de este tema

² Autor para correspondencia: lmelgarejom@unal.edu.co

Solamente el conocimiento profundo de las necesidades nutricionales de cada especie, el sistema de absorción y transporte de esos diferentes nutrientes y el efecto de las limitaciones nutricionales de cada elemento en el crecimiento y desarrollo de las plantas, permitirán adecuar planes de manejo nutricional en la medida que respondan a las necesidades de los vegetales, evitando aplicaciones innecesarias de abonos, cuyos excesos generalmente se traducen en pérdidas económicas, además de convertirse en contaminantes del suelo, de las fuentes de agua y del aire, afectando al mismo hombre (Van Reuler y Prins 1993).

En la actualidad, uno de los mayores desafíos que enfrenta esta área de la biología vegetal es el desarrollo de un modelo molecular en el que se pueda interrelacionar, por una parte, la modificación genética de la planta y por la otra, la acción de diferentes niveles de nutrientes de manera simultánea, buscando la mejor respuesta en el crecimiento y desarrollo. El presente enfoque, en el que se evalúa de manera separada la ausencia de cada nutriente, se ha quedado corto en la explicación de los verdaderos fenómenos que ocurren en la realidad y es por esto, que su capacidad de predicción ha sido mínima. Ahora se ha entendido que los sistemas complejos planta-suelo interactúan con una dinámica que exige la comprensión integral, en lugar del enfoque reduccionista con el que se ha venido abordando el tema (Ruffel *et ál.* 2010).

Elementos esenciales

Cada organismo es un sistema abierto conectado con su medio ambiente e influenciado por éste en un intercambio permanente de materia y energía. Las plantas aumentan su biomasa usando dióxido de carbono del aire, la energía del sol y los nutrientes que toman del suelo y del agua (Jones y Jacobsen 2001).

De acuerdo con las investigaciones realizadas durante el siglo pasado, en cultivos hidropónicos, con la técnica del Nutriente Faltante, existen más de 100 elementos químicos en la naturaleza, de los cuales solamente 17 se consideran esenciales para la vida de las plantas. Como producto de estas experimentaciones, diversos investigadores llegaron a la conclusión que sin estos “elementos esenciales” las plantas no pueden completar su ciclo de vida, pues estos elementos están

implicados directamente en funciones de crecimiento y reproducción y son vitales en la mayoría de las plantas para sobrevivir, además que son esenciales porque no pueden ser reemplazados por otros elementos para suplir sus funciones (Tabla 1). De los “elementos esenciales”, algunos se consideran no minerales, debido a que son tomados por la planta principalmente a partir del aire o del agua. Los otros nutrientes minerales se clasifican en macronutrientes y micronutrientes, dependiendo de la concentración en las plantas.

Dentro de los macronutrientes encontramos el nitrógeno (N), el fósforo (P), el potasio (K), el calcio (Ca), el magnesio (Mg) y el azufre (S). Por su parte, los micronutrientes incluyen el boro (B), el cloro (Cl), el cobre (Cu), el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el molibdeno (Mo), el níquel (Ni) y el zinc (Zn) (Marschner 1995).

El nitrógeno, el fósforo, el potasio y el agua son considerados como los principales factores limitantes del crecimiento, el desarrollo, y finalmente del rendimiento económico de los cultivos (Parry *et ál.* 2005). Las respuestas de las plantas a la fertilización con N, P y K son de considerable importancia en la agricultura. A pesar que N, P y K con frecuencia limitan el crecimiento y desarrollo de varios cultivos, en condiciones de campo los mecanismos precisos por los cuales ocurre esa limitación son complejos y variables según la especie, etapa de desarrollo y el medio ambiente. Limitando el suministro de N, P y K se disminuye la tasa de división celular, la expansión celular, la permeabilidad celular (Hossain *et ál.* 2010), la fotosíntesis, la producción de hojas, el crecimiento (Chapin 1980; Clarkson y Hanson 1980; Evans 1972; Zhao *et ál.* 2003, 2005a, b), y el rendimiento. Algunos reportes sugieren que la deficiencia de N afecta con más fuerza el desarrollo de la hoja que la fotosíntesis, y que los efectos de bajo niveles de N, P y K en plantas causan bajas tasas de fotosíntesis y un lento proceso de expansión de la hoja (Hossain *et ál.* 2010).

Si la concentración de un elemento nutriente esencial en el tejido vegetal está por debajo del nivel necesario para un óptimo crecimiento, la planta es deficiente en ese elemento, lo que genera una alteración en la ruta metabólica en la que participa dicho elemento, afectando otros procesos involucrados. Por ejemplo, el suministro inadecuado de iones fosfato impide la exportación de triosas fosfatadas del cloroplasto y por ende la síntesis de sacarosa. Además,

el efecto de la nutrición con fósforo en la calidad del fruto puede atribuirse a su papel como componente de los fosfolípidos, que son los mayores constituyentes de la membrana celular (Knowles *et ál.* 2001).

Otros autores (Mengel y Kirkby 1987) han propuesto una clasificación de los elementos esenciales relacionada con la función fisiológica de los mismos dentro de la planta, teniendo en cuenta su desempeño bioquímico. Así, se han definido cuatro grandes grupos, en el grupo 1, se encuentran los elementos que hacen parte de compuestos orgánicos, como el Nitrógeno (N) y el Azufre (S). En el grupo 2, aparecen los elementos que son importantes en el almacenamiento de energía o en la integridad estructural, tales como el Fósforo (P), el Sílice (Si) y el Boro (B). En el grupo 3 los nutrientes que permanecen en su forma iónica, como el Potasio (K), el Calcio (Ca), el Magnesio (Mg), el Cloro (Cl), el Manganeso (Mn) y el Sodio (Na). Finalmente, en el grupo 4, se tienen los elementos que están involucrados en reacciones de oxido-reducción, como el Hierro (Fe), el Zinc (Zn), el Cobre (Cu), el Níquel (Ni) y el Molibdeno (Mo).

Movilización de Nutrientes

El conocimiento de la forma en que la planta absorbe los nutrientes, permite tener en cuenta aspectos importantes al momento de aplicar fertilizantes, como son consideraciones de solubilidad de los componentes, movilización de nutrientes en la planta y pH del medio, entre otros (Jones y Jacobsen 2001). La adecuada toma de nutrientes depende de dos factores fundamentalmente, de la capacidad de las raíces para absorber nutrientes y de la disponibilidad de los mismos en el medio.

Del medio a la planta. Las raíces se encuentran en contacto directo con algunos nutrientes; sin embargo, estos difícilmente pueden entrar a las células por difusión simple, aproximadamente sólo el 2,5% del total de nitrógeno, potasio y fósforo ingresan a la planta mediante este mecanismo (Foth y Ellis 1997). Por lo cual, la planta utiliza para lograr el movimiento de nutrientes hacia ella, el transporte activo y pasivo. Uno de los mecanismos más importantes se conoce como “Flujo en masa” y consiste en el ingreso de los nutrientes en forma

iónica, disueltos en el agua, debido al potencial hídrico generado por la transpiración de la planta; sin embargo, la eficiencia de este mecanismo está relacionada directamente con la movilidad de cada nutriente (Foth y Ellis 1997).

Dentro de la planta. Algunos nutrientes se movilizan dentro de la planta, desde la raíz hasta la zona en crecimiento. La movilidad puede ser alta, media o baja, y dependerá del tipo de planta y del estado fenológico en que se encuentre. Para condiciones óptimas los elementos móviles son nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio, cloro, sodio, molibdeno, zinc, y los inmóviles son calcio, azufre, hierro, cobre y boro (Marschner 1995).

Se ha descubierto que algunos nutrientes pueden desplazarse desde hojas viejas a hojas más jóvenes si existe una deficiencia de nutrientes. Cloro, magnesio, molibdeno son de alta movilidad; en tanto que nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, boro, hierro y azufre se consideran nutrientes de intermedia a baja movilidad. Puede llegar a diagnosticarse la deficiencia de algún nutriente con la observación de síntomas en la planta. Por ejemplo, si el síntoma se observa en hojas superiores (más jóvenes), dado por la edad de la hoja, esto puede dar indicios que el suplemento que la planta necesita puede ser de alguno de los nutrientes menos móviles (Marschner 1995).

En el suelo. La movilidad de los nutrientes en el suelo es importante porque permite planificar su disponibilidad para las plantas. Este conocimiento influye en las decisiones de fertilización como dosis, frecuencia y tipo de fertilizante, así como del método de aplicación correcto. La movilidad de los nutrientes en el suelo en su forma iónica depende de su carga, y del pH, la temperatura y la humedad del suelo (Jones y Jacobsen 2001).

El siguiente cuadro (Tabla 1) resume las principales características de cada uno de los elementos esenciales y los síntomas de su deficiencia en las plantas:

Elemento	Función en la planta	Forma en que es principalmente absorbido	Síntomas de su deficiencia
Carbono	Constituyente de carbohidratos, proteínas y ácidos grasos. Indispensable en la fotosíntesis (Marschner 1995)	Se obtiene del aire (gas)	Generalmente no se presenta debido a la abundancia de CO ₂ en el aire. Sin embargo, en el caso de presentarse, su deficiencia limitaría el crecimiento y desarrollo vegetal (Marschner 1995).
Hidrógeno	Mantiene el balance osmótico, es importante en numerosas reacciones bioquímicas y hace parte de carbohidratos, proteínas y ácidos grasos (Marschner 1995).	Se obtiene del agua o de otros compuestos iónicos	No es un elemento limitante por su abundancia (Marschner 1995).
Oxígeno	Constituyente de carbohidratos, proteínas y ácidos grasos. Es requerido para la respiración (Marschner 1995).	Se obtiene del agua y del aire	Si el suministro de oxígeno se restringe, eventualmente los tejidos pueden morir. En el caso de raíces, la ausencia de oxígeno causa colores café y luego pudrición (Marschner 1995).
Nitrógeno	Constituyente de cada uno de los aminoácidos, es decir, presente en cada proteína. También hace parte de la molécula de clorofila y de los ácidos nucleicos. El nitrógeno estimula el crecimiento de tallos y hojas. Además estimula la producción de proteínas en frutas y granos, y ayuda a que la planta utilice otros nutrientes como fósforo y potasio (Kovacik <i>et ál.</i> 2007).	NO ₃ ⁻ y NH ₄ ⁺	Por su gran movilidad, los primeros síntomas se observan en hojas maduras. Su deficiencia causa falta de poder turgor y cambios de color en las hojas, las cuales primero se tornan verde claro, luego presentan clorosis y finalmente mueren; los sistemas radicales se ven reducidos (Suzuki <i>et al</i> , 2003). Otros síntomas que pueden presentarse son acumulación de compuestos fenólicos como flavonoides, antocianinas y cumarinas (Kovacik <i>et ál.</i> 2007)

Fósforo	<p>Constituyente de coenzimas, ácidos nucleicos y sustratos metabólicos.</p> <p>Hace parte del nucleótido más importante en la obtención de energía celular, el ATP.</p> <p>Promueve el desarrollo radical, y ayuda a desarrollar resistencia a enfermedades (Xiang-wen <i>et ál.</i> 2008)</p>	$H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}	<p>Es uno de los nutrientes más limitantes en el crecimiento y desarrollo de la planta junto con el Nitrógeno.</p> <p>En general, hojas, tallos y peciolo maduros se observan de color verde oscuro o azulado o pueden ser morados. Las hojas pueden verse enrolladas. Las plantas tienen un desarrollo lento, la floración se demora, el sistema radical es pobre y las plantas son bastante susceptibles a infecciones.</p>
Potasio	<p>Importante en fotosíntesis, traslocación de carbohidratos y síntesis de proteínas.</p> <p>Es un catalizador o activador de ciertas enzimas, participa en la osmorregulación y también en el mantenimiento del potencial de membrana (Pyo <i>et ál.</i> 2010).</p> <p>Implicado en el control del turgor de las células guarda estomáticas (Gierth y Mäser 2007).</p>	K^+	<p>En su ausencia, inicialmente se observa en las hojas maduras clorosis marginal e intervenal, enrollamientos, hojas arrugadas y brotes muy cortos.</p> <p>En general, la planta con déficit de potasio se observa débil, con un sistema radical pobre, y con muy baja tolerancia a situaciones de estrés o ataques de enfermedades.</p> <p>La deficiencia estomática implica reducción de las tasas de transpiración e intercambio de gases (Gierth y Mäser 2007)</p>
Calcio	<p>Hace parte de las paredes celulares, tiene una función importante en la estructura y permeabilidad de las membranas.</p> <p>Es un activador de las enzimas amilasa y ATPasa.</p> <p>En árboles, el contenido de Calcio está relacionado con la calidad y resistencia de la madera (Littke y Zabowaki 2007)</p>	Ca^{2+}	<p>Los síntomas de su deficiencia se observan inicialmente en hojas jóvenes dado su baja movilidad.</p> <p>En general, se observan meristemas apicales deformados, pequeños o sin crecimiento; las yemas en forma de gancho, los brotes del tallo o de flores se caen y en las hojas maduras se</p>

			presenta clorosis marginal y pérdida de turgor (Littke y Zabowaki 2007).
Magnesio	Es el componente principal de la clorofila. Combinado con ATP o ADP actúa como activador de enzimas que usan dos sustratos (Marschner 1995).	Mg^{2+}	Cuando este elemento se encuentra en bajas concentraciones, la producción de clorofila disminuye, lo que se traduce en clorosis intervenal y finalmente necrosis. En las hojas maduras se presentan primero los síntomas, ellas se tornan quebradizas y enrolladas (Marschner 1995).
Azufre	Es parte integral de los aminoácidos cisteína y metionina. Constituye parte importante de los puentes disulfuro, y por tanto de la conformación de la estructura de las proteínas (Marschner 1995).	SO_4^{2-}	Un descenso en el contenido de azufre causa reducción en la síntesis de proteínas y de todas las moléculas que dependen de este elemento. Así, las hojas jóvenes presentan clorosis, las raíces y los tallos diámetros menores a los normales, pero de mayor longitud. En general, un sistema radical débil pero invasivo y tallos rígidos y quebradizos (Marschner 1995).
Boro	Importante en la translocación de azúcares y carbohidratos. Sus funciones principales se relacionan con el normal desarrollo de la pared celular, la división celular y el desarrollo de frutas y semillas (Marschner 1995).	H_3BO_3 y $H_2BO_3^-$	Su deficiencia causa tallos y peciolo quebradizos, con crecimiento anormal y de color blanquecino. Las hojas jóvenes se presentan primero delgadas y curvadas. El programa reproductivo se ve retrasado o inhibido, y si hay frutos, éstos debido a la deficiencia se pudren con facilidad (Marschner 1995)

Cloro	Está implicado en el mantenimiento del turgor y el crecimiento de las células en situaciones de estrés hídrico (Marschner 1995).	Cl ⁻	Las hojas más maduras se vuelven cloróticas y finalmente necróticas, con un área foliar reducida. Es común el marchitamiento y el atrofiamiento del crecimiento de la planta, además de una reducción en la tasa de transpiración (Marschner 1995).
Cobre	Está implicado en la síntesis de clorofila. Es constituyente de la plastocianina, que funciona en la transferencia de electrones y de proteínas con actividad oxidasa. Está implicado en la síntesis de ADN y ARN (Marschner 1995).	Cu ²⁺	Los síntomas de su deficiencia incluyen acortamiento de entrenudos, hojas nuevas que crecen atrofiadas, enanas o retorcidas, débiles y de color verde oscuro, con puntos necróticos. El sistema radical también se presenta atrofiado, y la floración y fructificación se reducen dramáticamente (Marschner 1995).
Hierro	Es un catalizador involucrado en la activación de enzimas necesarias en las reacciones de oxido-reducción y transferencia de electrones y actúa como transportador de oxígeno. Además actúa como cofactor en la síntesis de clorofila y en el correcto funcionamiento de otras enzimas importantes como catalasa, peroxidasa, ferredoxina y citocromos (Marschner 1995).	Fe ²⁺ y Fe ³⁺	Los primeros síntomas incluyen clorosis intervenal y amarillamiento o blanqueamiento de las láminas foliares de las hojas jóvenes. En casos de deficiencia severa, se observan manchas angulares café intervenales y en los márgenes de las hojas un color café oscuro con una apariencia de quemadura. Estos síntomas pueden presentarse en una rama o en la planta entera (Marschner 1995).

Manganeso	Está implicado en la activación de enzimas que son catalizadores importantes de la reducción de carbohidratos, formación de clorofilas, y síntesis de DNA y RNA. Está directamente implicado en la producción de oxígeno durante la fotosíntesis (Shenker <i>et ál.</i> 2004).	Mn^{2+}	La clorosis intervenal es evidente y similar a la observada en deficiencia de magnesio, zinc o hierro. En casos severos, se presentan puntos necróticos y caída de hojas; la formación de flores se reduce o se detiene (Shenker <i>et ál.</i> 2004).
Molibdeno	Está implicado en la fijación de nitrógeno, en la transformación de nitrato a amonio, y en el metabolismo de carbohidratos (Marschner 1995).	MoO_4^{2-}	La clorosis intervenal, que se presenta por esta deficiencia, suele confundirse con la producida por bajos niveles de nitrógeno, adicionalmente se observan manchas y algunas veces enrollamientos en los bordes de las hojas (Marschner 1995).
Zinc	Este elemento es un activador de enzimas que están implicadas en la regulación de varios procesos metabólicos, como la síntesis de DNA, RNA, proteínas, algunas hormonas (Kalaycia <i>et ál.</i> 1999)	Zn^{2+}	En general, los síntomas incluyen un crecimiento atrofiado y acortamiento de entrenudos. Las hojas se tornan amarillas o cafés, típicamente otoñales y con menor área foliar. El sistema radical presenta anormalidades, así como los tallos. Las deficiencias de Zinc pueden inducir elevados niveles de fósforo, nitrógeno, cobre o hierro (Kalaycia <i>et ál.</i> 1999).

Para el estudio de los síntomas debidos a la deficiencia de alguno de los nutrientes esenciales, en cualquier especie vegetal, se puede utilizar la técnica de crecimiento en hidropónico, en el que las plantas crecen en una solución nutritiva la cual se debe mantener aireada. Esta solución generalmente es un medio líquido modificado a partir del formulado por Dennis R. Hoagland. La solución Hoagland modificada

contiene todos los nutrientes esenciales y puede prepararse sin alguno de ellos para determinar el efecto de su deficiencia sobre el crecimiento de la planta (Taiz y Zeiger 2006).

Algunos fisiólogos como Jones (1982) consideran, que para estudios de deficiencia de nutrientes se realice el cultivo sobre sustrato arena de río y adicionando solución Hoagland debido a que bajo ese sistema de crecimiento la raíz tiene soporte y tendrá buena aireación, lo que favorecerá el crecimiento de la planta. Además, esta técnica evita varios problemas que aparecen en los cultivos en solución como, por ejemplo, la necesidad de sustituir o complementar la solución cada pocos días, y los cambios en la composición de la solución debido a que ciertos iones se absorben más rápidamente generando cambios indeseables en el pH (Cooper 1979; Graves 1983; Jones 1983; Resh 1989). Esta modificación no altera en lo absoluto la respuesta, que en términos de deficiencia y contenido mineral foliar, se espera obtener de un ensayo totalmente hidropónico y por el contrario, favorece el crecimiento de las plantas evitando factores indeseables (Salisbury y Ross 2000).

Fase experimental

El resultado del análisis de diferentes partes de la planta varía considerablemente. Generalmente, la hoja es el órgano más útil para diagnóstico, por su marcada variación en composición de acuerdo con los diferentes niveles de fertilidad. El Plant Analysis Handbook establece que la edad fisiológica del tejido y la posición dentro de la planta son determinantes, por ello si se desconocen las instrucciones de muestreo para un cultivo en particular, la regla general establece la colecta de hojas maduras bien desarrolladas al inicio de la fase reproductiva de la planta.

Ensayo 1. Técnica del nutriente faltante

Materiales

Material biológico: plantas de interés a evaluar, con registro de inicio de germinación y condiciones de siembra conocidas.

Otros materiales: frascos oscuros con capacidad para un galón (solución matriz), 27 frascos con capacidad de 500 mL, pipetas de 10 mL para cada una de las soluciones. Cascarilla y escoria. Vasos o materas y platos plásticos.

Reactivos: Soluciones nutritivas (Tabla 2)

Equipos: pH-metro, estufa con aire caliente circulante, plancha agitadora, termómetro ambiental, higrómetro, cuaderno de laboratorio o campo.

Metodología

Nutrientes: Preparar soluciones stock tal como lo indica la tabla 2.

Tabla 2. Soluciones stock para el uso en el estudio de la sintomatología en plantas debida al déficit de algún nutriente (método del nutriente faltante).

Símbolo	Compuesto	Concentración
A	Ca (NO ₃) ₂ .4 H ₂ O	1 M (236 g/L)
B	KNO ₃	1 M (101 g/L)
C	MgSO ₄ .7 H ₂ O	1 M (246,5 g/L)
D	KH ₂ PO ₄	1 M (136 g/L)
E	Quelato de Fe (FeSO ₄ + Na ₂ EDTA)	5 g/L de Fe
F	Micronutrientes	1,81 g MnCl ₂ .4H ₂ O+ 2,86 g H ₃ BO ₃ + 0,22 g ZnSO ₄ .7H ₂ O+ 0,09 g H ₂ MoO ₄ + 0,88 g CuSO ₄ .5H ₂ O en 1 L de agua destilada)
G	NaNO ₃	1 M (85,01 g/L)
H	MgCl ₂	1 M (95,23 g/L)
I	Na ₂ SO ₄	1 M (142,06 g/L)
J	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1 M (138,01 g/L)
K	CaCl ₂	1 M (110,99 g/L)
L	KCl	1 M (74,55 g/L)

M=Molaridad (gramos de sal por litro de solución); ppm: partes por millón (número de partes de la sal en un millón de partes de solución).

Fe EDTA: en un vaso de precipitado disolver 5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 200 mL de agua destilada; en otro vaso disolver 7,45 g de Na_2 EDTA en 200 mL de agua destilada caliente (50°C). Posteriormente mezclar las dos soluciones, agitar, dejar enfriar y completar a volumen final de 1 L.

Posteriormente adicionar volúmenes específicos a partir de las soluciones stock (mL), como se indica en la tabla 3, y agitar cada vez se agregue un reactivo. Llevar a volumen final de 250 mL.

Tabla 3. Soluciones nutritivas con nutriente faltante

Solución	Completa	-Ca	-S	-Mg	-K	-N	-P	-Micro Nutriente
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2,5	-	2,5	2,5	2,5	-	2,5	2,5
KNO_3	2,5	2,5	2,5	2,5	-	-	2,5	2,5
MgSO_4	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0	1,0	1,0
KH_2PO_4	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	0,5
Fe-EDTA	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Micronutrientes	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
NaNO_3	-	5,0	-	-	-	-	-	-
MgCl_2	-	-	1,0	-	-	-	-	-
Na_2SO_4	-	-	-	1,0	-	-	-	-
NaH_2PO_4	-	-	-	-	0,5	-	-	-
CaCl_2	-	-	-	-	-	2,5	-	-
KCl	-	-	-	-	-	2,5	0,5	-

Siembra y mantenimiento del material vegetal: Mezclar en un recipiente grande la cascarilla con la escoria en proporciones iguales, homogenizando completamente la mezcla, y posteriormente disponer en vasos o materas que tengan tres orificios en el fondo, llenar hasta el borde de cada vaso y colocarlo sobre un plato desechable.

Disponer de 35 plántulas con seis hojas verdaderas, de la especie a evaluar, previamente sembradas en un sustrato arena o cascarilla-escoria, lo más uniformes

posibles y sin presencia de semilla. Después de humedecer bien, retirarlas con cuidado del matero donde se encontraban creciendo. Lavar con agua las raíces. Utilizando un lápiz, hacer un hueco de unos 4 cm de profundidad, en el sustrato añadido a las materas o vasos e introducir la plántula con todo el cuidado posible. Adicionalmente, medir a tres plantas similares, la longitud del vástago y de la raíz, la biomasa fresca y seca total, y el área foliar. A otras plantas del mismo lote, determinarles longitud, masa fresca, y disectarlas separando la raíz, el tallo, y las hojas para determinar la masa fresca y seca de cada órgano. Para cada variable, calcular el promedio y utilizar estos valores como registro inicial para todas las plantas. Las plantas deben ser regadas diariamente luego de la siembra y por espacio de 1-2 meses dependiendo de la especie a evaluar con una solución completa en dilución 1:5 (4 partes de agua por una parte de la solución completa). Posteriormente colocar los vasos en completo orden y debidamente marcados sobre un mesón del invernadero, regar cada una de las plantas con 100 mL de la solución correspondiente (Tabla 3), dejar drenar y utilizar la solución para los riegos posteriores. Este procedimiento se debe repetir cada dos días durante el tiempo del ensayo y dependiendo de la especie. A intervalos de dos veces por semana, cuando no haya drenaje sobre el plato, reemplazar la solución por agua destilada.

VARIABLES A EVALUAR: diariamente a la misma hora registrar la temperatura máxima, la temperatura mínima y la humedad relativa dentro del invernadero. A intervalos de ocho días y durante dos meses registrar la longitud del vástago de cada planta y el estado general (color y aspecto externo). Observar las hojas y registrar la presencia de manchas necróticas o cloróticas; entorchamientos y ondulaciones en el ápice, en los bordes, en la base o en la margen; clorosis intervenal; necrosis apical. Tomar registro fotográfico. Luego de dos meses retirar, con mucho cuidado, el material vegetal de los vasos o materas, lavar las raíces suavemente con agua, medir la longitud de vástago y raíz, el área foliar, describir la arquitectura de la raíz y los síntomas que se evidencien en los diferentes órganos. Determinar masa fresca y seca en hojas y raíz. Tabular y graficar las variables evaluadas. Analizar y discutir los resultados. Incluir un análisis de varianza para determinar si hay diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Ejemplo caso de estudio

Sintomatología de deficiencias nutricionales en plantas de Arazá (*Eugenia stipitata*) (Barrera *et ál.* 2009). Se partió de soluciones nutritivas Hoagland y Arnon (1950). Para el estudio en arazá se prepararon soluciones stock y a partir de ellas las soluciones a utilizar en el ensayo, utilizando el método del nutriente faltante. Las plantas fueron establecidas en casa de malla en materas de 2 kg de capacidad sobre sustrato de arena de río previamente lavada. Las plantas fueron regadas diariamente luego de la siembra y por espacio de dos meses con una solución completa en dilución 1:5 (4 partes de agua por una parte de solución completa) para aclimatarlas. Pasado este tiempo las plantas fueron sometidas a los tratamientos con las diferentes soluciones de nutriente faltante, aplicando estas mediante un riego diario. Es decir, las plantas se regaban las plantas con el volumen establecido de cada solución diariamente en la mañana, reincorporando en la tarde el filtrado recogido en el plato. Se tomó como unidad experimental una matera, destinando para cada tratamiento tres materas. Luego de seis meses del ensayo se colectaron las plantas y sobre las hojas maduras se fotografiaron los síntomas de deficiencia y se determinaron los contenidos de nutrientes minerales (Tabla 4, Figura 1)

Tabla 4. Contenidos medios en % de 6 elementos minerales en hojas de plantas de Arazá crecidas en solución Hoagland con déficit mineral. n=3.

Tratamiento	% N	% P	% K	%Ca	% Mg	% S	Masa seca en hojas (g)
Completa	2,39	0,25	0,99	0,65	0,32	0,21	6,7
-N	1,04	0,2	0,7	0,55	0,35	0,16	1,7
-P	1,91	0,11	0,89	0,44	0,29	0,14	3,0
-K	1,91	0,31	0,38	0,5	0,32	0,12	2,3
-Ca	1,39	0,25	0,86	0,32	0,41	0,15	3,7
-S	2,31	0,3	0,92	0,6	0,33	0,12	3,0
-Mg	1,47	0,28	0,82	0,83	0,25	0,09	7,0

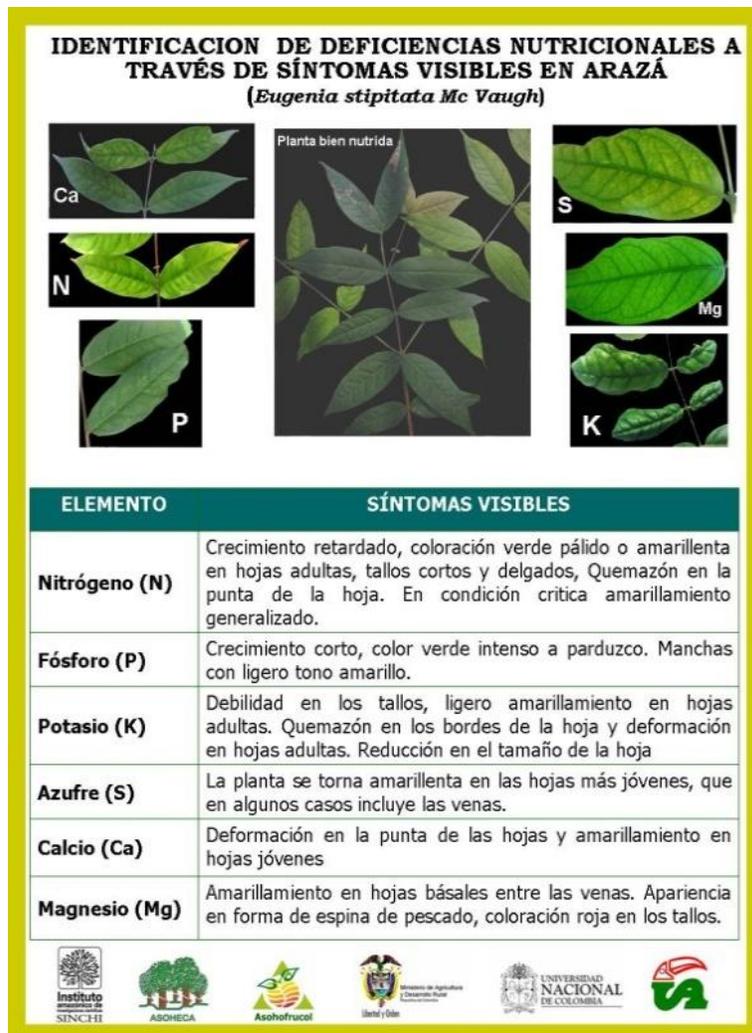


Figura 1. Síntomas de deficiencia de 6 minerales en plantas de Arazá desarrolladas bajo solución Hoagland (Barrera *et ál.* 2009)

Ensayo 2. Interpretación de análisis foliar y de suelos

La interpretación de un análisis foliar o de suelo se basa en la comparación de la concentración del elemento, determinada por el laboratorio, frente a una amplia suficiencia del mismo. La concentración de cada elemento analizado se registra entonces como menor, mayor que, o dentro del rango de suficiencia. Los rangos de suficiencia de una planta se determinan valorando en laboratorio la concentración de nutrientes y la masa fresca y seca de cada órgano a la cosecha. Con estos resultados se determina la masa total de nutrientes extraídos por la planta durante una cosecha. Este valor corresponde al umbral de extracción de nutrientes para un rendimiento determinado y constituye el rango de suficiencia que sirve de punto de comparación.

En la evaluación de la fertilidad del suelo el método más práctico es el del análisis químico del suelo, el cual es una herramienta importante para identificar, no solamente la dosis del fertilizante, sino el plan de fertilización más apropiado para cada caso. La identificación del nivel de fertilización como resultado del diagnóstico de la fertilidad se logra mediante la interpretación del análisis, la cual debe ser realizada por un Ingeniero Agrónomo capacitado y con base en los criterios desarrollados para cada cultivo por los programas de investigación.

Material

Análisis de suelos y de tejido foliar obtenidos en laboratorio certificado.

Metodología

Identificar en el *Plant Analysis Handbook* (<http://aesl.ces.uga.edu/publications/plant/>) el rango de suficiencia para cada elemento según el cultivo o especie a que corresponda. Tomar los resultados del análisis foliar y completar la tabla 5. Comparar los valores obtenidos en el laboratorio con el rango de suficiencia reportado y otorgar la calificación respectiva. Una interpretación del análisis de plantas, suelos o aguas se basa en la comparación de la concentración del elemento encontrada, contra un rango de suficiencia. La concentración de cada elemento analizado es reportada como menos que, más que o dentro del rango de suficiencia. Con esta herramienta se puede complementar el programa de fertilización que genera el análisis de suelos, debido a que permite explicar por qué un elemento está por fuera del rango de suficiencia y dar un tratamiento correctivo.

Tabla 5. Formato para interpretación del análisis foliar

	Porcentaje (%)					ppm				
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn	B
Análisis foliar										
Rango de Suficiencia										
Calificación										

Calificación: E: Exceso, NA: Nivel adecuado, D: Déficit

Utilizar la tabla de consideraciones generales para interpretar análisis de suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi IGAC (Tabla 6).

Tabla 6. Consideraciones generales para interpretar análisis de suelos



INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI
SUBDIRECCIÓN DE AGROLOGÍA
CONSIDERACIONES GENERALES PARA INTERPRETAR ANÁLISIS DE SUELOS

pH (H ₂ O)	APRECIACIÓN	P	K	%M.O			%N.Total			CIC	SATURACIÓN DE	
		ppm	meq/100g	CLIMA			CLIMA			meq/100g	BASES (SB)	
1:1		(BRAY II)		FRÍO	MEDIO	CÁLIDO	FRÍO	MEDIO	CÁLIDO		%	
<4.5	BAJO	<15	<0.2	<5	<3	<2	<0.25	<0.15	<0.1	<10	<35	
EXTREMADAMENTE ÁCIDO	MEDIO	15 - 40	0.2 - 0.4	5 - 10	3 - 5	2 - 4	0.26 - 0.5	0.16 - 0.3	0.1 - 0.2	10 - 20	35 - 50	
4.6 - 5.0	ALTO	>40	>0.4	>10	>5	>4	>0.5	>0.3	>0.2	>20	>50	
MUY FUERTEMENTE ÁCIDO	APRECIACIÓN	RELACIONES				CLASIFICACIÓN DE ACUERDO			S.A.I % (SATURACIÓN DE ALUMINIO)	APRECIACIÓN		
5.1 - 5.5		Ca/Mg	Mg/K	Ca/K	(Ca+Mg)/K	CON SALES Y SODIO						
FUERTEMENTE ÁCIDO	RELACIÓN IDEAL	2 - 4	3	6	10	ce mmohs/cm (dS/m)	PSI	CLASE	<15	SIN PROBLEMAS EN GENERAL		
5.6 - 6.0										LIMITANTE PARA		
MEDIANAMENTE ÁCIDO	K DEFICIENTE		>18	>30	>40	0 - 2		NORMAL		CULTIVOS SUSCEPTIBLES		
6.1 - 6.5							2 - 4	INFERIOR	LIMITE		LIMITANTE PARA	
LIGERAMENTE ACIDO	Mg DEFICIENTE	>10	<1			4 - 8	A	S1	15 A 30	CULTIVOS MODERADAMENTE		
6.6 - 7.3							8 - 16	15%	S2		TOLERANTES	
NEUTRO	CONTENIDO OPTIMO	ELEMENTOS MENORES* (ppm)				>16		S3		LIMITANTE PARA CULTIVOS TOLERANTES		
7.4 - 7.8		Zn	Cu	Mn	Fe	0 - 4		Na	30 A 60			
LIGERAMENTE ALCALINO	SUELO	3 - 6	1.5 - 3	15 - 30	20 - 30	4 - 8	SUPERIOR	NaS1		NIVELES TÓXICOS		
7.9 - 8.4						8 - 16	A	NaS2				
MEDIANAMENTE ALCALINO	PLANTA	30 - 100	5 - 25	30 - 200	60 - 500	>16	15%	NaS3	>60	PARA LA MAYORÍA		
8.5 - 9.0											DE CULTIVOS	
FUERTEMENTE ALCALINO	*Extractables con DTPA en suelos; digestión húmeda en tejido vegetal.							INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI				
>9.0	Boro en suelos (extractable en agua caliente): 0.6 - 1.0 ppm.							LABORATORIO DE SUELOS				
EXTREMADAMENTE ALCALINO	Boro en tejido vegetal : 30-80 ppm.							AREA DE QUÍMICA				

NC(Nivel Crítico): 25 ppm NO₃; 20 ppm NH₄; NC: 0.2 ppm B(Fosfato de Calcio); NC: 12 ppm P (Olsen modificado); NC: 20 ppm S disponible (Fosfato de calcio)

CONCENTRACION NORMAL EN TEJIDO VEGETAL (Handbook of Reference Methods for Plant Analysis, 1998):

N (%): 2,5-4,5; P (%): 0,2-0,75; K (%): 1,5-5,5; Ca (%): 1,0-4,0; Mg (%): 0,25-1,0; S (%): 0,25-1,0

B (ppm): 10-200; Cu (ppm): 5-30; Fe (ppm): 100-500; Mn (ppm): 20-300; Zn (ppm): 27-100; Mo(ppm): 0.1-0.2; Cl (ppm): 100-500

Con esta guía consolidar los resultados en la tabla 7:

Tabla 7. Interpretación del análisis de suelos

ELEMENTO	RESULTADO	ANÁLISIS
pH		
Saturación de Aluminio) S.A.I		
Elementos mayores		
Nitrógeno (N)		
Fósforo (P)		
Potasio (K)		
Calcio (Ca)		
Magnesio (Mg)		
Sodio (Na)		
Elementos menores		
Manganeso (Mn)		
Hierro (Fe)		
Zinc (Zn)		
Cobre (Cu)		
Relaciones catiónicas		
Ca/Mg		
Mg/K		
Ca/K		

Formulación de recomendaciones de fertilización

Como una guía para la formulación de recomendaciones para la aplicación de fertilizantes y de enmiendas se sugiere seguir las pautas que se relacionan a continuación:

- a) Establecer la disponibilidad de nutrientes en el suelo usando las categorías reseñadas en la tabla anterior.
- b) Calcular el peso de la hectárea de suelo, con base en el valor de la densidad aparente (g cm^{-3}) que varía según la textura, y la profundidad de raíces de las especies (cm).
- c) Con los resultados del análisis de suelos, hacer la conversión de los nutrientes del suelo a kg ha^{-1} .
- d) Determinar las cantidades de nutrientes a aplicar (diferencia entre las necesidades de la especie y los nutrientes disponibles en el suelo; con ello se corrigen las deficiencias y se ajustan los desbalances entre los nutrientes).
- e) Seleccionar el tipo de fertilizantes a usar y calcular las cantidades a aplicar en kg ha^{-1} . Se debe tener en cuenta la eficiencia del uso de nutrientes de los fertilizantes por la planta, la aplicación, y la concentración de nutrientes en cada fórmula del fertilizante.

Unidades y fórmulas usadas en las recomendaciones de fertilización: Para convertir estas unidades a kg ha^{-1} es necesario, conocer el peso de la hectárea de la capa arable, este peso depende de la densidad aparente del suelo y de la profundidad de raíces, que para la mayoría de especies de crecimiento erecto es de 10-15 cm y para las de crecimiento prostrado es de 15-20 cm. En árboles frutales se considera una profundidad efectiva de 30 cm.

Para calcular el peso de una hectárea se aplica la siguiente fórmula:

$$P(\text{ha}) = 100.000 \times Pr \times \rho_b$$

Donde:

$P(\text{ha})$ = peso de una hectárea en kg.

100.000 = constante

Pr = profundidad de raíces del cultivo en cm

ρ_b = Densidad aparente del suelo g cm^{-3}

Para aplicar la constante (100.000) se tiene en cuenta la siguiente relación matemática:

$$\text{Densidad aparente } (\rho_b) = \frac{\text{Masa seca del suelo en g (P)}}{\text{volumen del suelo en cm}^3 \text{ (V)}}$$

V = profundidad en cm x el área de 1 ha de suelo (100.000.000 cm²)

$$V = 1 \text{ cm} \times 100.000.000 \text{ cm}^2 = 100.000.000 \text{ cm}^3$$

Para usar 100.000 como constante, se asume una profundidad de 1 cm en la fórmula inicial y posteriormente se multiplica este resultado por la profundidad real de las raíces de la especie. De donde: Peso de 1 ha en kg = 100.000 x Profundidad del suelo (cm) x ρ_b (g cm⁻³)

$$\text{Peso de una hectárea} = 100.000.000 \text{ cm}^3 \times \frac{1 \text{ g}}{1 \text{ cm}^3} \times \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} = 100000 \text{ kg}$$

Cálculos a partir de los datos registrados en el análisis de suelo a kgxha⁻¹

1. Conversión de ppm a kg ha⁻¹ del nutriente:

Por definición, partes por millón es el equivalente entre el peso de una hectárea en kilos dividido por un millón de kilos. Este valor se multiplica por el valor en ppm de los siguientes elementos reportados por el laboratorio: fósforo, azufre y elementos menores (hierro, cobre, manganeso, zinc y boro).

$$\text{kilogramos por hectárea} = P(\text{ha}) \times \text{ppm del nutriente}$$

ppm = partes por millón = relación 1 en 1.000.000 ó 1/1.000.000

2. Conversión de Porcentaje del nutriente a kg ha⁻¹; el cual solo se aplica en el caso de nitrógeno asimilable.

Conversión de porcentaje a kg ha⁻¹, de nitrógeno asimilable:

i) calcular el Nitrógeno total (%), el cual equivale a la cantidad de materia orgánica MO del suelo dividida por 20. Veinte es una constante (por definición, de 100 partes de MO en el suelo, 20 corresponden al N total).

%MO= %CO x 1,724 (factor de Van Bemmelen el cual considera que la materia orgánica contiene en promedio 58% de carbono.

$$\%N \text{ total} = \% \text{ MO} / 20$$

ii) calcular el N asimilable (NA)

N asimilable (%) = %N total (0,015)

El nitrógeno del suelo tiene dos componentes, N orgánico y N inorgánico. Los microorganismos del suelo hacen la conversión de la forma orgánica a inorgánica, que es la que absorben las plantas. Se estima que entre 1,5% y 3,0% del N total del suelo corresponde a N inorgánico; usualmente se trabaja con 1,5% ó (0,015).

La cantidad de N por hectárea equivale a NA (%), multiplicada por el peso de una hectárea, dividido por 100.

$$\text{kg / ha de N} = \text{N asimilable (\%)} \times \text{P(ha)}/100$$

iii) Realizar conversión de miliequivalentes (meq) a kg ha^{-1} del nutriente.

Para esta conversión se debe tener en cuenta el peso atómico y la valencia del elemento, al igual que la densidad aparente y la profundidad de las raíces de la especie. Para el cálculo de la cantidad de kilos/ha del elemento, se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{kg}}{\text{ha}} = \left(\frac{\text{Pa}}{\text{va}} \right) \times \rho b \times \text{Pr} \times \frac{\text{meq}}{100 \text{ g de suelo}}$$

Donde:

Pa = Peso atómico de los elementos (K =39, Ca=40 y Mg=24).

(va) = Valencia de los elementos (K=1, Ca=2 y Mg=2).

ρb = Densidad aparente en g cm^{-3}

Pr = profundidad de raíces en cm

meq/100 g de suelo = Resultado del análisis de suelo reportado por el laboratorio

En la actualidad, la mayoría de los países expresan los contenidos nutricionales de los abonos en términos de nitrógeno elemental (N), pentóxido de fósforo (P_2O_5) y óxido de potasio (K_2O). Los elementos secundarios y los microelementos se expresan usualmente en términos de base elemental; sin embargo, el calcio y el

magnesio son expresados algunas veces como óxidos. En el ámbito científico, se tiende a utilizar la expresión elemental para todos los nutrientes. En la Tabla 8 se recopilan los factores que deben aplicarse para convertir los contenidos nutricionales de la base elemental a la de óxido. Este tipo de conversión es utilizado con frecuencia para los cálculos requeridos en la práctica de la fertilización.

Tabla 8. Balance general de nutrientes para el cultivo

ELEMENTO	RESULTADO EN kg ha ⁻¹	ABSORCIÓN DE NUTRIENTES EN kg ha ⁻¹	DIFERENCIA	FACTOR DE CONVERSIÓN	DOSIS A APLICAR EN kg ha ⁻¹
Elementos mayores					
Nitrógeno (N)					
Fósforo (P)				2,2910 P ₂ O ₅	
Potasio (K)				1,2046 K ₂ O	
Calcio (Ca)				1,3992 CaO	
Magnesio (Mg)				1,6581 MgO	
Sodio (Na)				1,3479 Na ₂ O	
Elementos menores					
Manganeso (Mn)				1,2912 MnO	
Hierro (Fe)				1,4297 Fe ₂ O ₃	
Zinc (Zn)				1,2447 ZnO	
Cobre (Cu)				1,2517 CuO	
Boro (B)				3,2196 B ₂ O ₃	

Los niveles de absorción de nutrientes se pueden consultar en la literatura.

No todo el nutrimento aplicado en el fertilizante es aprovechado por el cultivo, pues solamente una proporción del mismo es utilizado por la planta. A esta proporción, que generalmente es expresada en porcentaje, se le denomina eficiencia del uso de nutrientes minerales de los fertilizantes. Dependiendo de las condiciones del suelo y de las condiciones climáticas, una parte de los nutrientes aplicados en la fertilización

se perderán del sistema suelo-raíz quedando fuera de la acción absorbente de la planta, debido a la ocurrencia de los siguientes procesos: Fijación, lixiviación, inmovilización, volatilización, denitrificación, acomplejamiento, escorrentía y erosión.

Ejemplo caso de estudio

Interpretación de análisis de suelos y foliar en arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh).

El arazá (*Eugenia stipitata*) es una especie frutal tipo arbusto originario de la región amazónica. Actualmente se cultiva en la Amazonia colombiana como componente medio de los sistemas agroforestales, con caucho y maderables. De esta especie se desconoce gran parte de los aspectos nutricionales, razón por la cual se realizó el estudio en mención. En el departamento de Caquetá, municipio de Albania sobre una plantación de arazá bajo arreglo agroforestal con caucho de seis años de edad, se tomaron muestras de 20 hojas maduras por cada una de las 12 plantas asignadas a un ensayo de uso de diversas fuentes de fertilización orgánica. Los datos del análisis foliar corresponden a plantas testigo sin fertilización alguna (Tabla 9). Los rangos de suficiencia se obtienen de los contenidos reportados en la tabla 4 para plantas de arazá bajo solución nutritiva completa. El análisis de suelos corresponde al sitio donde se desarrolla el estudio.

Tabla 9. Interpretación del análisis foliar de plantas de seis años de arazá bajo arreglo agroforestal

	Porcentaje (%)				
	N	P	K	Ca	Mg
Análisis foliar	1,44	0,11	5,37	0,76	0,10
Rango de Suficiencia	1,88-2,53	0,23-0,30	0,69-1,36	0,53-0,76	0,27-0,40
Calificación	D	D	E	NA	D

Calificación: E: Exceso, NA: Nivel adecuado, D: Déficit

Se interpreta que las plantas de arazá bajo arreglo agroforestal sin fertilización alguna presentan niveles deficientes de Nitrógeno, Fósforo y Magnesio, niveles altos de Potasio y adecuados de Calcio.

El análisis de suelos se reporta en la tabla 10.

Tabla 10. Análisis de suelos. Cultivo de arazá asociado con caucho. Municipio de Albania-Caquetá

Parámetro	Valor	Interpretación
Textura	Ar	Arcilloso
pH	4,2	Extremadamente ácido
Saturación de aluminio %	82,7	Niveles tóxicos para la mayoría de los cultivos
Concentración de CO %	2,1	Deficiente
CIC meq/100 g	16,6	<10 bajo 10-20 medio
Saturación de bases %	4,6	<35% bajo
Fósforo intercambiable ppm	0,79	Bajo
Calcio meq/100 g	0,29	
Magnesio meq/100 g	0,26	
Potasio meq/100 g	0,34	<0,2 bajo 0,2-0,4 medio
Ca/Mg	1,11	Adecuada no ideal
Mg/K	0,76	Magnesio deficiente
Ca/K	0,85	No ideal

La interpretación (basándose en condiciones generales para interpretar los análisis de suelos según el formato del IGAC) sugiere que elementos como el fósforo y el magnesio son los más deficientes en este suelo y deben ser considerados en la recomendación de fertilización. El nitrógeno, aunque su nivel en hojas no es bajo y en suelos se encuentra en nivel medio, debe considerarse en la recomendación por la importancia de este elemento en la nutrición del cultivo. Dado que la especie está adaptada a condiciones de suelos con alta saturación de aluminio, este parámetro no se considera limitante para su desarrollo; sin embargo, las condiciones de saturación de bases tan bajas permiten una adición de enmiendas ricas en calcio y magnesio que favorecerán un pH más alto, mejor disponibilidad de nutrientes como el fósforo y mejores relaciones en las bases de cambio.

Para efectuar una adecuada recomendación el primer paso es determinar los contenidos en kg ha⁻¹ de los elementos. Para este ejemplo se determinan los

contenidos de los elementos considerados deficientes o de aplicación necesaria, a saber: Nitrógeno, Fósforo y Magnesio. Los cálculos se realizan siguiendo la ruta mencionada en el ítem de formulación, considerando una densidad aparente de $1,2 \text{ g cm}^{-3}$ y una profundidad de raíces de 30 cm:

Peso de una hectárea: $100.000 \text{ kg} \times 1,2 \text{ g cm}^{-3} \times 30 \text{ cm}$

Peso de una hectárea: $3.600.000 \text{ kg} = 3600 \text{ Ton}$

I. Nitrógeno

$\% \text{MO} = 2,1\% \times 1,724$

$\% \text{MO} = 3,62\%$

$\% \text{N total} = 3,62\% / 20$

$\% \text{N total} = 0,181\%$

$\% \text{N asimilable} = 0,181\% \times 0,015$

$\% \text{N asimilable} = 0,0027153\%$

$\text{N por hectárea} = 0,0027153 \times 3.600.000 \text{ kg} \div 100$

$\text{N por hectárea} = 97,75 \text{ kg.}$

II. Fósforo

$\text{P por hectárea} = 0,79 \times 3.600.000 \div 1.000.000$

$\text{P por hectárea} = 2,844 \text{ kg}$

III. Magnesio

El Mg tiene peso atómico de 24 y valencia de 2

$\text{Mg por hectárea} = (24/2) \times 1,2 \text{ g cm}^{-3} \times 30 \times 0,26 \text{ meq}/100 \text{ g}$

$\text{Mg por hectárea} = 112,32 \text{ kg}$

ELEMENTO	RESULTADO EN kg ha ⁻¹	ABSORCIÓN DE NUTRIENTES EN kg ha ⁻¹	DIFERENCIA	FACTOR DE CONVERSIÓN (Tabla 8)	DOSIS A APLICAR EN kg ha ⁻¹
Elementos mayores					
Nitrógeno (N)	97,75	200	-102,25		102,25
Fósforo (P)	2,844	100	-97,156	2,2910 P ₂ O ₅	222,58
Magnesio (Mg)	112,32	30	+82,32	1,6581 MgO	136,5

Los datos de absorción de nutrientes son estimaciones experimentales y se obtienen de un ensayo que evaluó respuesta del arazá a diferentes fuentes de fertilización en Albania, Caquetá (2009), (Barrera *et ál.* 2009)

En conclusión, la fuente de fertilizante a usar en este cultivo debe contener elementos como el fósforo y el magnesio, y en lo posible nitrógeno. Fuentes orgánicas como el abono tipo Bocachi (obtenido de la fermentación aeróbica de estiércol de bovino) adicionado con cal dolomita permitirán incorporar al suelo elementos caracterizados como deficientes y proveer una mejor condición de acidez para favorecer la absorción. La deficiencia de magnesio obedece al contenido medio de potasio, ya que este compite con el Mg para entrar a la planta, por tanto la aplicación busca disponer de la cantidad suficiente de Mg que evite la deficiencia.

La dosis final para este caso se divide entre el número de árboles por hectárea para establecer así la forma de aplicación en dosis por árbol. La fuente se selecciona de tal manera que provea los tres elementos a considerar teniendo presente cubrir las cantidades señaladas.

VI. FOTOSÍNTESIS Y PIGMENTOS VEGETALES

María Elena Solarte¹, Leonardo Moreno¹, Luz Marina Melgarejo^{1,2},

Marco conceptual

La fotosíntesis es un proceso de suma importancia para la biosfera porque convierte la energía de la radiación solar en energía química que puede ser usada por todas las formas de vida (Kraub 2003). Para la fotosíntesis la planta utiliza la radiación fotosintéticamente activa (PAR) que está en el rango entre 400 a 700nm.

La fotosíntesis comprende dos reacciones globales diferenciadas. En la primera se realiza la transducción de energía, y en la segunda la reducción y fijación del carbono. Este conjunto complejo de dos reacciones ha sido objeto de intensa investigación y ha resultado en la postulación de dos conceptos fundamentales para las reacciones fotoquímicas; el primero se refiere al concepto de unidad fotosintética (Emerson y Arnon 1932) y el segundo el concepto de dos fotosistemas (Hill y Bendal, 1960). De acuerdo al primer concepto en todos los sistemas fotosintetizadores (bacterias, algas verdes unicelulares y plantas) los pigmentos que absorben la luz se dividen en dos grupos, los que absorben y transfieren la energía hacia el centro de reacción y los que conforman este centro que constituyen un tipo particular de moléculas de clorofila (*Chl a* P680 y *Chl a* P700) y que llevan a cabo la reacción fotoquímica (Zeinalov 2005). De acuerdo al segundo concepto la luz

¹ Contribución por igual en la preparación de este tema

² Autor para correspondencia: lmelgarejom@unal.edu.co

induce una transferencia de electrones vectorial que requiere la cooperación de dos tipos de fotosistemas llamados I y II (PSI y PSII) los cuales funcionan como una maquinaria fotoeléctrica, aquí el agua es usada como donador de electrones que induce una separación de cargas en el PSII, con la liberación de O₂ como bioproducto. En el PSI, la reducción del aceptor terminal dona un electrón a la ferredoxina el cual es usado para reducir NADP⁺ que finalmente se utiliza en la conversión de CO₂ a carbohidratos. El flujo de electrones en el PSII y PSI está ligado a una serie de reacciones de transferencia de electrones a través de plastoquinonas, el complejo citocromo *b6/f* y la plastocianina. Todas estas reacciones están acopladas al consumo y liberación de protones en ambos lados de la membrana tilacoidal formando una diferencia de potencial electroquímico necesario para la síntesis de ATP con la intermediación de la ATPasa protónica. Tanto el PSII como el PSI tienen su propio centro de pigmentos antena formados por clorofila (chl) y moléculas de carotenoides (Kraub 2003). Los cuatro complejos que permiten la fotosíntesis se distribuyen en el cloroplasto: PSII en el grana, PSI en las lamelas, ATPasa en las lamelas y el complejo de citocromo en el grana y sus márgenes (Ben-She y Nelson 2004).

Los conceptos relacionados con la segunda reacción que implica reducción y fijación de CO₂ a moléculas orgánicas con la utilización de subproductos de la primera reacción, fue delineada por Bassham *et ál.* 1954 y otros quienes dilucidaron la ruta completa de asimilación del dióxido de carbono con intermediarios y las enzimas relacionadas en este proceso. El ciclo de Calvin (ruta C₃) representa la ruta central de la reducción del CO₂. El ciclo C₃ se inicia cuando la enzima Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) realiza la carboxilación del CO₂ al aceptor ribulosa-1,5-bisfosfato RuB-P y forma como primer producto estable de este proceso dos moléculas de 3- fosfoglicerato que luego es reducido a gliceraldehido 3-P, una triosa precursora de la regeneración de RuB-P y de la síntesis de sacarosa y almidón.

Existen otros procesos adaptativos en diferentes tipos de plantas posteriores al ciclo C₃. Las investigaciones de Hatch y Slack (1966) y Hatch *et ál.* (1967) mostraron una adaptación en varias gramíneas que incluye una ruta adicional de concentración de

CO₂ y una anatomía especial de la hoja (Anatomía Kranz) con dos distintos tipos de células fotosintéticas, que forman una separación de los procesos de fijación y reducción del CO₂, esta ruta ha sido llamada ruta C₄. El proceso se inicia con la fijación de CO₂ por carboxilación del fosfoenol piruvato, reacción catalizada por la enzima Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPC), en las células del mesófilo formando un ácido de 4 carbonos (malato o aspartato), estos ácidos se transportan hacia las células del haz vascular donde son descarboxilados formando CO₂ que es fijado por Rubisco para iniciar el ciclo C₃ normal y ácido pirúvico que regresa al mesófilo para regenerar el fosfoenol piruvato.

Otra adaptación es la encontrada en plantas suculentas denominada como CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas), o CAM por sus iniciales en inglés. Éstas plantas asimilan el CO₂ atmosférico durante la noche y lo almacenan como malato en vacuolas, la mayor parte de este es agotado en el día con producción de CO₂; esta adaptación responde a la conservación del agua durante el día en zonas desérticas donde los estomas permanecen cerrados. La asimilación de dióxido de carbono por plantas con metabolismo ácido de crasuláceas está acompañado por dos carboxilasas, la enzima citoplasmática PEPC que opera principalmente durante la noche cuando el estoma está abierto formando como productos de fijación el malato, citrato, o ambos que se acumulan en la vacuola, y la Rubisco que trabaja durante el día cuando los estomas están cerrados. Durante el día cuando la PEPC es regulada por malato que pasa al citoplasma se activa la enzima Rubisco en el cloroplasto y consume el CO₂ derivado de la descarboxilación del malato a través del ciclo C₃ (Wyka y Lüttge 2003; Geydan y Melgarejo 2000).

En la naturaleza las plantas experimentan un amplio rango de estrés tanto biótico como abiótico operan simultáneamente o en diferentes combinaciones y afectan el crecimiento y el desarrollo. El estrés provocado por alta radiación, radiación UV, déficit hídrico, altas concentraciones de sales, patógenos, metales pesados y temperaturas extremas puede afectar la fotosíntesis (Larcher 2003; Herrera *et ál.* 2010). El fotodaño de los cloroplastos es la respuesta principal y común de todos los factores de estrés que operan en condiciones de campo en presencia de luz, entonces el cloroplasto es considerado como el blanco del estrés ambiental. Este daño se

causa por incremento desmesurado de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) consecuencia del incremento en el traspaso de energía hacia moléculas de O₂ formando una serie de complejos que alteran el estatus redox del estroma y de la membrana tilacoidal, lo cual causa una baja en la eficiencia de los fotosistemas, disminución en el fijación de CO₂, pérdida del uso eficiente del agua, entre otras (Murata *et ál.* 2007). Sin embargo, cuando las plantas experimentan diferentes estreses en secuencia, la exposición a un estrés puede desarrollar tolerancia a otro (Shanker 2005), debido a que, el aparato fotosintético es una maquinaria molecular flexible que puede aclimatarse a fluctuaciones metabólicas y de luz en minutos o segundos o a escalas mayores de tiempo, en donde los cambios ambientales disparan respuestas de señalización que finalizan en modificaciones en la biogénesis del aparato fotosintético (Eberhard *et ál.* 2008). El estudio de los pigmentos es importante desde el punto de vista ecofisiológico ya que aporta información sobre productividad y eventos de estrés, entre otros. Las alteraciones en la composición de pigmentos fotosintéticos pueden estar relacionados con la fotoaclimatación (Richardson *et ál.* 2002). En general, las células aclimatadas a alta irradiación pueden contener altas concentraciones de carotenoides en relación a *Chl a*.

En el proceso de fotosíntesis se utilizan como componentes esenciales de la maquinaria pigmentos tetrapirrólicos denominados clorofilas. Se conoce que el primer precursor de las clorofilas en plantas es el ácido α -aminolevulínico (ALA), un compuesto de 5 carbonos que proviene del ácido glutámico (Castelfranco y Beale 1983). La clorofila *a* se puede convertir en clorofila *b* mediante la oxigenación enzimática activada por la clorofila *a* monoxigenasa (CAO) (Tanaka y Tanaka 2002). En ocasiones la biosíntesis de clorofila *a* se puede ver inhibida, en algunos casos la clorofila *b* puede reconvertirse en clorofila *a* vía 7-hidroximetil clorofila *a* por las enzimas clorofila *b* reductasa y 7 hidroximetil clorofila *a* reductasa (Tanaka y Tanaka 2002). Estos pigmentos son esenciales para la conversión de energía. La clorofila *a* está asociada a proteínas del centro de reacción y a los pigmentos antena del fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII), además esta clorofila junto con la *Chl b* se asocian a los complejos externos cosechadores de energía del PSI y PSII denominados LHCI y LHCII respectivamente (Nelson y Yocum 2006).

Además existen otros pigmentos accesorios en las plantas superiores, como los carotenoides (carotenos y xantofilas). La mayoría de los pigmentos sirven como antenas que colectan luz y transfieren la energía a los centros de reacción, además de cumplir otras funciones de protección. Los carotenoides consisten en una serie de dobles enlaces conjugados, lo cual les da la capacidad de capturar y transducir energía. Los carotenoides están asociados con proteínas y embebidos en las membranas dentro de los cloroplastos, donde interactúan con las moléculas aceptoras y transportadoras; así mismo, están relacionados con la protección contra daño fotooxidativo del aparato fotosintético, al disipar el exceso de luz absorbida por los pigmentos.

La energía lumínica absorbida por los pigmentos fotosintéticos puede ser utilizada en las reacciones fotoquímicas, ser re-emitida por la clorofila como fluorescencia o ser disipada térmicamente hacia moléculas accesorio.

Técnicas para medición de fotosíntesis

La fotosíntesis puede ser influida por factores internos y externos, y la escogencia de un método de medición es importante para conocer su comportamiento especialmente bajo condiciones de campo.

Las herramientas más comunes usadas para determinar en campo la tasa de fotosíntesis, el estado de los procesos fotoquímicos de la fotosíntesis y el contenido de pigmentos, son el IRGA (analyzer de gases en infrarrojo), el fluorómetro y el medidor de clorofila *in situ* (SPAD), respectivamente.

IRGA: Usando un analizador de gases en infrarrojo se pueden determinar las concentraciones de CO₂ en mediciones casi instantáneas, el método se basa en que éste gas absorbe radiación en el rango del infrarrojo. Para el CO₂ una región de fuerte absorción está entre 4,2 – 4,3 μm. Varias fuentes de luz como lámparas pueden emitir estas longitudes de onda.

El IRGA LCpro+, por ejemplo, para la medición de CO₂ usa un infrarrojo no dispersivo (NDIR), el CO₂ absorbe la energía en la región infrarroja en una

proporción relacionada a la concentración del gas. La muestra de gas que va a ser medida pasa a través de un tubo o celda; una fuente infrarroja es dirigida hacia la celda, luego un detector colocado al final de la celda mide la amplitud de la señal infrarroja la cual se reduce si hay CO₂ presente en la muestra de gas y tiene su máxima amplitud en “zero”. Entonces, el sensor lee el decrecimiento de la señal utilizando un filtro que permite el paso en la banda de 4,24μm, banda en la cual el CO₂ absorbe fuertemente. Los gases de referencia (que entra a la cámara) y de análisis (que sale de la cámara) son alternados con un gas “zero”. Durante el ciclo de medición el gas “zero” es generado pasando el aire a través de “soda lime” la cual remueve todo el CO₂, el equipo permite entonces medir el contenido de CO₂ en los gases de referencia y de análisis (ADC Bioscientific 2004).

El equipo LCpro+ está diseñado para el uso en campo y consta de una consola principal, un surtidor de aire, un microprocesador, una tarjeta de almacenamiento y una cámara conectada a la consola. La cámara es equipada con control de temperatura y una unidad de luz removible. La consola principal suministra aire a la cámara que tiene CO₂ y H₂O controlables. Se miden las concentraciones de CO₂ y H₂O, y luego el aire se dirige sobre la superficie de la hoja; la descarga de aire que sale de la cámara también es analizada, esto genera un decrecimiento determinado en el contenido de CO₂ y un incremento en el contenido de H₂O. De las diferencias en la concentración del gas de referencia y de análisis, y la tasa de flujo de aire, se calcula la asimilación y la transpiración, esto es llamado “Sistema abierto de medición” por comparación con el “Sistema cerrado” donde se hace pasar el gas y se mide continuamente una muestra de gas en un tiempo y tasa establecidas (ADC Bioscientific 2004). La medición del CO₂ se realiza por un analizador infrarrojo de gases (IRGA) y el agua se mide por dos sensores de humedad. El sistema también mide temperatura de la hoja, temperatura de la cámara, radiación fotosintéticamente activa y presión atmosférica (ADC Bioscientific 2004).

Las mediciones de intercambio de gases pueden realizarse en todo tipo de experimento, bajo condiciones de invernadero o en campo, se puede hacer en plantas intactas lo que permite realizar mediciones a través del tiempo, se pueden determinar patrones estacionales y ciclos diurnos, se pueden fijar parámetros

deseados de luz y CO₂ realizando curvas de respuesta a la radiación y al dióxido de carbono que proporcionan información sobre la fisiología de la fotosíntesis.

Fluorescencia de la clorofila: la energía de la luz en longitudes de onda de 400 a 700 nm es absorbida por la clorofila y puede seguir tres caminos: i) ser usada para dirigir la fotosíntesis (procesos fotoquímicos), ii) disipada como calor o iii) reemitida en pequeñas pero detectables cantidades de radiación de longitud de onda más larga (rojo/rojo lejano) (procesos no fotoquímicos), esta emisión de luz es llamada fluorescencia de la clorofila a. Los tres procesos se dan en competencia, así que incrementos en la eficiencia de alguno puede inducir decrecimiento en los otros dos. De esta manera midiendo el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila a se proporciona información sobre cambios en la eficiencia de la fotoquímica y la disipación de calor (Maxwell y Johnson 2000).

Los sistemas más comunes de medición de la fluorescencia de la clorofila son el fluorómetro no modulado y el fluorómetro modulado, se basan en la concepción teórica anterior.

El fluorómetro no modulado tiene como referencia los estudios de Kaustky y colaboradores en los años 60's, en donde los cambios en fluorescencia por iluminación de hojas preadaptadas a oscuridad están cualitativamente correlacionados con cambios en la asimilación de CO₂ y en la tasa fotosintética (Maxwell y Johnson 2000; Baker 2008).

Cuando la hoja es adaptada a oscuridad, las quinonas (QA) oxidadas al máximo y los centros de reacción del PSII están abiertos, es decir, están en capacidad de realizar reducciones fotoquímicas de QA, luego de ser expuestas a un rayo de 0,1 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se produce un nivel mínimo de fluorescencia F_0 , un pulso de luz rojo lejano que excita preferiblemente al fotosistema II (PSII) y remueve electrones de QA, se aplica antes de la medición de F_0 ; luego la hoja es expuesta a pulsos cortos de luz actínica de alta densidad de flujo fotónico (cientos de $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de tal manera que QA llega a su máximo de reducción y máximo nivel de fluorescencia F_m . Los centros de reacción del fotosistema II (PSII) con la QA reducida están ahora

“cerrados”. La diferencia entre F_m y F_o es definida como F_v , y la relación de F_v/F_m puede ser usada para estimar el rendimiento cuántico máximo de reducción de QA es decir de la fotoquímica del PSII. La relación F_v/F_m es un buen indicador de plantas expuestas a diversos estreses bióticos y abióticos cuando están en presencia de luz (Maxwell y Jonson 2000; Baker 2008).

El fluorómetro modulado se basa en que una hoja en continua luz actínica tiene un nivel de fluorescencia F' . El cual aumenta a un nivel máximo de fluorescencia cuando la hoja es expuesta a un corto pulso de luz saturante que reduce al máximo la QA. La diferencia entre F_m' y F' se denomina F_q' (aunque hay varias denominaciones como F_v'). La relación F_q'/F_m' es teóricamente proporcional al rendimiento cuántico de la fotoquímica del PSII y este es equivalente al rendimiento cuántico del flujo lineal de electrones de los centros de reacción del fotosistema II. Por otra parte y teniendo el cuidado necesario en las mediciones y características de la muestra a medir, se puede establecer una relación lineal entre la eficiencia de operación del PSII y el transporte lineal de electrones que utiliza la relación F_q'/F_m' para estimar la tasa de transporte de electrones no cíclico en el PSII. En ciertas circunstancias F_q'/F_m' es un buen indicador de cambios en el rendimiento cuántico de asimilación de CO_2 por la hoja (ϕCO_2) pero no debe ser usada para estimar tasas absolutas de asimilación de CO_2 (Baker 2008).

La fluorescencia de la clorofila a es una herramienta muy útil en la evaluación de la calidad fisiológica de plantas tanto en invernadero como en campo. La facilidad en el manejo de los equipos permite abarcar mediciones de muchas plantas, permite seleccionar genotipos, evaluar la variabilidad genética y la respuesta de las plantas a varios estreses ambientales y bióticos.

Medidor de clorofila “in situ”: Actualmente se ha reportado que la cantidad de clorofila y de nitrógeno total determinados por los métodos cotidianos en gramíneas, leguminosas, frutales y algunas hortalizas presentan una alta correspondencia con las unidades SPAD medidas con el detector de clorofila Minolta SPAD-501 (Reeves *et al.* 1993). Turner y Jund (1991), con un modelo del detector de clorofila SPAD-502, mostraron que la “unidad SPAD” es un valor proporcional al contenido de nitrógeno en plantas de arroz. Posteriormente, el equipo SPAD-502 fue calibrado

para el cultivo de maíz (Krugh *et ál.* 1994), trigo (Follet *et ál.* 1992; Fox *et ál.* 1994), pasto (*Festuca*) (Kantety *et ál.* 1996) y algodón (Wood *et ál.* 1992) con el fin de detectar posibles deficiencias de nitrógeno. Los valores SPAD se basan en el principio que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y el resto que se refleja entra en contacto con la celda detectora del SPAD-502 y es convertida en una señal eléctrica. La cantidad de luz captada por la celda es inversamente proporcional a la cantidad de luz utilizada por la clorofila, la señal es procesada, y la absorbancia es cuantificada en valores dimensionales que van de 0 a 199, por lo que las unidades SPAD serán siempre las mismas de acuerdo con el tono verde de las hojas (Krugh *et ál.* 1994).

El contenido de clorofila y la absorción de nitrógeno se han correlacionado con las unidades SPAD en diversas condiciones ambientales de intensidad lumínica, temperatura, humedad relativa, plagas, densidad de población, fuente de nitrógeno, entre otros. (Hidermanet *ál.* 1992; Piekielek y Fox 1992).

Sin embargo, el SPAD provee sólo un índice simple del contenido de pigmentos de la hoja y la determinación de la composición de pigmentos requiere de valores de calibración con mediciones reales de pigmentos usando métodos destructivos (Mielke *et ál.* 2010). Las relaciones matemáticas entre los valores SPAD y el contenido de pigmentos varía entre especies (Marenko *et ál.* 2009) o entre variaciones ambientales como la luz. Mielke *et ál.* (2010) encontraron que los ambientes de luz afectan significativamente los valores SPAD de *Eugenia uniflora* así como el contenido de Clorofila a (*Chl a*), clorofila b (*Chl b*) y clorofila total (*Chl a+b*).

Fase experimental

Ensayo 1. Determinación de tasa de fotosíntesis, y curvas diarias de fotosíntesis mediante IRGA

Materiales

Material biológico: plantas de ciclo corto

Equipos: IRGA (analizador de gases al infrarrojo) de tipo abierto, computador.

Metodología

Bajo las mismas condiciones de luz, humedad relativa y temperatura, sembrar en sustrato suelo y en potes las semillas del material biológico (plantas de ciclo corto) a evaluar, una semilla por cada pote, regar diariamente y a capacidad de campo, permitir el desarrollo de las plantas y luego de dos meses de edad medir los diferentes parámetros con el IRGA de tipo abierto; posteriormente dividir en dos grupos, un grupo de 10 plantas se mantendrán bajo las mismas condiciones de crecimiento (control) cuidando de mantenerlas en capacidad de campo, el otro grupo de 10 se cubrirán con polisombra 70% (tratamiento).

Realizar curvas diarias de intercambio de gases, haciendo mediciones a las 7:00, 9:00, 11:00, 13:00, 15:00 y 17:00 h, al menos por tres días. A partir de los resultados se determina la hora en que se da la tasa de fotosíntesis máxima. Posteriormente, a intervalos de 8 días y en cuatro hojas del estrato medio de las plantas medir la tasa de fotosíntesis en la hora seleccionada. El monitoreo se puede realizar durante el ciclo de vida de la planta, o en diferente estado fenológico. Con los resultados encontrados relacionar la tasa fotosintética con el contenido de pigmentos.

Utilizando la misma metodología base (curvas diarias y mediciones de tasa de fotosíntesis máxima a través del tiempo) se pueden realizar mediciones en otros experimentos, por ejemplo, i) un grupo de plantas estresadas por déficit hídrico vs plantas no estresadas, ii) un grupo de plantas estresadas por exceso de sales vs plantas no estresadas, iii) un grupo de plantas sometidas a estrés biótico vs plantas sin estrés

Ensayo 2. Determinación de la fluorescencia de la clorofila mediante fluorómetro modulado

Materiales

Material biológico: plantas del ensayo 1

Equipos: fluorómetro modulado, computador.

Metodología

Bajo las mismas condiciones del ensayo 1 (luz, humedad relativa y temperatura), medir los diferentes parámetros de fluorescencia de la clorofila con un fluorómetro de amplitud modulada PAM. Posteriormente, después de la aplicación del tratamiento de polisombra, a intervalos de 8 días y en cuatro hojas del estrato medio de las plantas realizar mediciones de la tasa de transferencia de electrones a través del fotosistema II (PSII), rendimiento cuántico del PSII (F_v/F_m) el cual es indicador del estado fisiológico de la planta, ya que depende de la integridad del complejo PSII/LHCII (complejo de absorción de luz) y el quenching fotoquímico y no fotoquímico los cuales son muy sensibles a diferentes tipos de estrés que puedan afectar las membranas tilacoidales o causar la acumulación de especies reactivas de oxígeno en el cloroplasto. Con base en los resultados obtenidos realizar tablas, gráficas y la respectiva discusión de resultados. En general una fanerógama bajo condiciones óptimas presenta valores de F_v/F_m superiores a 0,8 (Gemel *et ál.* 1997).

Utilizando la misma metodología base se pueden realizar mediciones de otros experimentos como se indica en el ensayo 1.

Ensayo 3. Anatomía de plantas C_3 , C_4 y CAM (adaptado de Echavarría *et ál.* 1988).

Materiales

Material biológico: Muestras frescas de hojas o tallos fotosintéticos de plantas C_3 , C_4 y CAM, de interés a evaluar

Reactivos: Safranina al 0,02 %, etanol 70%, glicerina, agua destilada

Otros materiales: 3 bases de cajas Petri de 10 cm de diámetro, cuchillas nuevas, agujas de disección, placas de tinción, láminas y laminillas porta y cubreobjetos, pipeta pasteur

Equipos: microscopio

Metodología

Colectar hojas frescas del material a evaluar. Colocar respectivamente en bolsas plásticas bien marcadas que contengan una muy pequeña cantidad de agua, cerrar herméticamente. Realizar a las respectivas especies cortes transversales a mano

alzada, para facilitar puede colocar el espécimen en medio de dos láminas de icopor y realizar los cortes con una cuchilla nueva. Tener cuidado de realizar el corte en la parte central de la hoja incluyendo la vena central y nervaduras secundarias, lo más delgados posibles, y colocar en caja Petri conteniendo agua para evitar deshidratación. Seleccionar los cortes más delgados y colocar sobre placas de tinción, adicionar safranina al 0,02% de tal forma que cubra los cortes durante tres minutos, eliminar el exceso de colorante y realizar dos enjuagues con etanol al 70%, agregar una mezcla de glicerina : agua (1:3) por tres minutos, realizar el montaje de los cortes sobre láminas en que se tenga dispuesta una gota de glicerina y cubrir con laminilla cubreobjetos, seleccionar las mejores muestras a través de un microscopio de luz en aumentos de 40 y 100X y realizar observación, dibujos y tomas fotográficas de las características de cada una de las muestras.

Recordar que la Anatomía C₃ se caracteriza por presentar epidermis superior e inferior, parénquima en empalizada, haces vasculares y parénquima esponjoso. La anatomía Kranz de las plantas C₄ se caracteriza por la presencia de células de la vaina del haz vascular que presentan cloroplastos con distribución centrípeta, y una capa externa a esta que corresponde al mesófilo; así mismo, pueden presentarse variaciones de este subtipo con una vaina formada por dos capas de células, una más externa denominada mestoma (separa el mesófilo de la vaina del haz vascular) la cual no presenta cloroplastos y otra interna parenquimática con cloroplastos que está en contacto con el haz vascular. La anatomía de las CAM se caracteriza por presentar parénquimas de almacenamiento gruesos y con mucílagos, los tejidos fotosintéticos (mesófilo) son delgados y externos.

Ensayo 4. Extracción y determinación del contenido de clorofilas a, b y total, y carotenoides en tejido foliar

El contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total, y carotenoides se determina a partir de la extracción con acetona al 80% previamente enfriada a -10°C (Lichtenthaler 1987).

Materiales

Material biológico: 0,1 g de hojas frescas sin venas

Reactivos: Nitrógeno líquido, acetona, agua destilada.

Preparación de acetona-agua 80% (v/v): La acetona debe encontrarse libre de agua antes de preparar la solución al 80%. Para eliminar el agua presente en la acetona agregar 5g de un agente secante como el Na_2SO_4 anhidro, a un litro de acetona, dejando reposar un día completo, y posteriormente filtrar (Vogel 1989). Preparar la solución de acetona al 80% en un balón aforado, almacenar en frasco oscuro y almacenar a -10°C para su uso inmediato.

Porcentajes mayores de agua resultan en degradación de la clorofila, y porcentajes menores disminuyen el rendimiento en la extracción (Lichtenthaler 1987).

Otros materiales:, tubos de reacción tipo Eppendorf de 2,0 mL, juego de micropipetas (rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL), puntas para micropipetas (rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL), vasos de precipitados, celda de cuarzo para espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico, gradilla para tubos de 2,0 mL, espátula, mortero, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio), toallas de papel absorbente, agitador magnético.

Equipos: centrífuga, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, cabina de extracción, agitador tipo vórtex, tanque para transporte de nitrógeno líquido, plancha de agitación.

Metodología

Colectar hojas frescas, eliminar las venas mayores y cortar en pedazos pequeños. En un mortero ubicado sobre cama de hielo colocar 1g del material vegetal fresco, adicionar nitrógeno líquido sobre el material vegetal y macerar hasta obtener un polvo muy fino. Todo el proceso se debe realizar en un sitio con baja luminosidad. Del macerado y por triplicado tomar una masa de 0,1g aproximadamente (anotar el peso exacto de muestra), colocarla en tubos de reacción oscuros de 2,0 mL debidamente rotulados, y someter al siguiente proceso: adicionar 1,5 mL de acetona 80% v/v a -10°C ; mezclar en vórtex por dos minutos asegurando el completo contacto del material vegetal con la acetona; centrifugar durante tres minutos a

10000 rpm y 4°C; retirar el sobrenadante usando una micropipeta y colocarlo en el respectivo frasco ámbar, rotular y cubrir con papel aluminio; repetir el procedimiento hasta obtener lavados sin coloración verde. El sobrenadante debe quedar libre de materiales en suspensión; de ser necesario se debe filtrar o centrifugar.

Transferir cuantitativamente el sobrenadante recuperado, que fue almacenado en el frasco ámbar, a un balón aforado de 10 ó 25 mL de acuerdo al número de lavados y aforar con acetona 80% (v/v) previamente enfriada. Realizar lecturas de absorbancia a las longitudes de onda 663nm, 647nm y 470 nm; si la absorbancia a 663 nm supera 0,600 realizar una dilución tomando 500 µL y llevándola a 1mL con acetona al 80% v/v, medir la absorbancia nuevamente. El contenido de clorofilas y de carotenoides se reporta como mg de clorofila o carotenoides /g material vegetal. El blanco analítico es acetona al 80% v/v.

Ejemplo caso de estudio

Cálculos para determinar el contenido de clorofilas y carotenoides

La metodología ha sido adecuada y probada en diferentes especies vegetales (Fuente Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia): *Eugenia estipitata* y *Theobroma grandiflorum* (Barrera *et ál.* 2009), *Psidium guajava* (Melgarejo *et ál.* 2010a), *Gmelina arborea* (Melgarejo *et ál.* 2010b), *Mircianthys leucoxila*, *Abatia parviflora*, *Cedrela montana* y *Alnus acuminata* (Melgarejo *et ál.* 2010c), *Rhizophora mangle* y *Avicennia germinans* (Melgarejo *et ál.* 2010d), entre otros.

A manera de ejemplo y siguiendo el procedimiento se llegó a las siguientes lecturas de absorbancia a 647 nm, 663 nm y 470 nm, en la especie *Gmelina arborea* (Tabla 1). Con el propósito de obtener mediciones espectrofotométricas más exactas es necesario considerar el rango de lectura entre 0,3 y 0,85; extractos con absorbancias <0,3 en la región del rojo no producen valores correctos de pigmentos porque hay varios factores que intervienen en la línea base, y absorbancias >0,9 pueden indicar problemas con la medida del detector (Lichtenthaler y Buschmann 2001).

Tabla 1. Resultados determinación del contenido de clorofila. A= absorbancia

Masa (g)	Volumen (mL)	A 647 nm			A 663 nm			A 470 nm		
0,1010	25	0,425	0,432	0,436	0,625	0,619	0,606	0,625	0,631	0,627
Promedio		0,431			0,617			0,628		

Lichtenthaler, (1987) desarrolló las siguientes ecuaciones para obtener la concentración de clorofilas y carotenoides en mg/L.

$$\text{Clorofila } a = (12,25 \times A_{663nm}) - (2,79 \times A_{647nm})$$

$$\text{Clorofila } b = (21,5 \times A_{647nm}) - (5,1 \times A_{663nm})$$

$$\text{Clorofila total} = (7,15 \times A_{663nm}) + (18,7 \times A_{647})$$

Carotenoides

$$= \frac{(1000 \times A_{470nm}) - (1,82 \times \text{Clorofila } a) - (85,02 \times \text{Clorofila } b)}{198}$$

Estas ecuaciones tienen en cuenta los coeficientes de absortividad molar de estos pigmentos cuando se encuentran los tres presentes en una misma solución de acetona al 80%.

Para determinar la concentración de clorofilas en la solución se remplazan los valores de las absorbancias promedio obtenidas, para este ejemplo los de la tabla 1 como sigue:

$$\text{Clorofila } a = (12,25 \times 0,617) - (2,79 \times 0,431) = 6,36 \frac{mg}{L}$$

$$\text{Clorofila } b = (21,5 \times 0,431) - (5,1 \times 0,617) = 6,12 \text{ mg/L}$$

$$\text{Clorofila total} = (7,15 \times 0,617) + (18,7 \times 0,431) = 12,47 \text{ mg/L}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{(1000 \times 0,628) - (1,82 \times 6,36) - (85,02 \times 6,12)}{198} = 0,48 \text{ mg/L}$$

Si se realiza una dilución, multiplicar las concentraciones obtenidas a partir de las ecuaciones anteriores por el factor de dilución.

La concentración de clorofilas y carotenoides en el material vegetal se calcula multiplicando las concentraciones obtenidas de las ecuaciones por el volumen al cual se aforó, en litros, y dividiendo por la masa inicial de material vegetal utilizado, como se muestra a continuación:

Clorofila a:

$$\frac{6,36 \frac{\text{mg clorofila a}}{\text{L}} \times 0,025\text{L}}{0,1010 \text{ g}} = 1,57 \frac{\text{mg clorofila a}}{\text{g material vegetal fresco}}$$

Clorofila b:

$$\frac{6,12 \frac{\text{mg clorofila b}}{\text{L}} \times 0,025\text{L}}{0,1010 \text{ g}} = 1,51 \frac{\text{mg clorofila b}}{\text{g material vegetal fresco}}$$

Clorofila total:

$$\frac{12,47 \frac{\text{mg clorofila total}}{\text{L}} \times 0,025\text{L}}{0,1010 \text{ g}} = 3,09 \frac{\text{mg clorofila total}}{\text{g material vegetal fresco}}$$

Carotenoides:

$$\frac{0,48 \frac{\text{mg carotenoides total}}{\text{L}} \times 0,025\text{L}}{0,1010 \text{ g}} = 0,12 \frac{\text{mg de carotenoides}}{\text{g material vegetal fresco}}$$

VII. RESPIRACIÓN VEGETAL

Marisol Cruz Aguilar¹, Luz Marina Melgarejo^{1,2}

Marco conceptual

En 1804 Theodore de Saussure detectó el fenómeno respiratorio de las plantas, en sus *Recherches chimiques sur la végétation* trata el tema de la nutrición y respiración vegetal en su totalidad. Sobre la respiración de las plantas, realizó minuciosos experimentos con semillas en las que observó que el oxígeno circundante desaparece durante la germinación, reemplazándose simultáneamente por un volumen semejante de dióxido de carbono. Hoy en día se conoce que las plantas respiran por todos sus órganos: raíz, tallo, hojas, flores y frutos. La respiración no necesita la luz solar, se realiza indistintamente con luz o en la oscuridad, en las mitocondrias. Ocurren múltiples pasos oxidativos, cada uno catalizado por una enzima específica.

La respiración es la central energética que dirige las fuerzas celulares necesarias para la biosíntesis, el mantenimiento celular y el transporte activo en plantas, está acoplada a la producción de ATP, poder reductor, esqueletos de carbono y es el proceso que provee numerosos sustratos para las reacciones de biosíntesis en el citoplasma. La demanda y oferta de estos metabolitos producidos a partir del proceso respiratorio varía dependiendo del tejido particular, el estado de desarrollo de la planta y de factores medio ambientales (Douce y Neuburger 1989).

¹ Contribución por igual en la preparación de este tema

² Autor para correspondencia: lmelgarejom@unal.edu.co

Adicionalmente, es un proceso que libera grandes cantidades de CO₂ a la atmósfera, a nivel global se ha calculado que las plantas terrestres liberan como producto de la respiración aproximadamente 60 gigatoneladas de carbón por año a la atmósfera (Schimel 1995).

La respiración incluye el proceso de glucólisis que ocurre en el citosol, el ciclo del ácido cítrico mejor conocido como ciclo de Krebs, que ocurre en la matriz de la mitocondria y la cadena de transporte de electrones que ocurre en la membrana interna del mismo organelo (Atkin y Tjoelker 2003). En términos generales, la glucólisis es un proceso en el que la sacarosa es dividida en dos azúcares de seis carbonos, los cuales entran a la cadena de reacciones y son convertidos en piruvatos que al perder un átomo de carbono, ingresan al ciclo de ácidos tricarbónicos como Acetil-CoA, en la mitocondria; adicionalmente se obtiene energía química en forma de ATP en pequeñas cantidades, poder reductor en forma de NADH y algunos ácidos inorgánicos como el malato (Rocha *et ál.* 2010).

Dentro de la mitocondria se desarrollan las dos fases siguientes de la respiración; en la matriz de este organelo se encuentra la maquinaria enzimática necesaria para dirigir el conjunto de reacciones del Ciclo de Krebs, en las cuales se obtienen como productos, dióxido de carbono (CO₂) y precursores de otras rutas metabólicas de importancia para la célula, adicionalmente se genera una gran cantidad de poder reductor y se sintetiza ATP (J. van der Merwe *et ál.* 2010).

Finalmente, la última fase respiratoria, la fosforilación oxidativa, es un proceso que está acoplado a varios complejos, en su mayoría proteicos, que se encuentran embebidos en la membrana interna de la mitocondria y que consiste en una serie de reacciones de oxido-reducción que finalmente reducen la molécula de oxígeno, obteniendo como resultado agua. Durante la ocurrencia de esta cadena de transporte de electrones se utiliza la mayor parte de poder reductor generado en las fases anteriores y se genera un gradiente de concentración de protones hacia el espacio intermembranal con el cual se dirige la síntesis de ATP en una de las formas más eficientes y comunes en los organismos aeróbicos (Kadenbach *et ál.* 2010).

El complejo proceso respiratorio de las células vegetales es similar a lo observado en las células aeróbicas de otros organismos; sin embargo, en las mitocondrias de las plantas se presentan algunas particularidades que las diferencian de las del reino animal y les confieren su carácter exclusivo, otorgándoles vías alternativas de respiración y con ello mayor flexibilidad para reaccionar ante diversas situaciones que pueden llegar a ser limitantes del metabolismo (Taiz y Zeiger 2006).

En primer lugar, en la matriz de todas las mitocondrias vegetales estudiadas hasta el momento se encuentra la enzima NAD^+ málica la cual cataliza la descarboxilación del malato para producir piruvato, el cual, como se mencionó con anterioridad es el producto final de la glucólisis y precursor en el ciclo del ácido cítrico; con la presencia de esta enzima se asegura la continuidad del ciclo y además se regula el nivel de ácidos orgánicos dentro de la célula. En segunda instancia, junto a la membrana interna de la mitocondria se encuentran enzimas complementarias de la cadena transportadora de electrones, son cuatro enzimas NAD(P)H deshidrogenasas, dos en el lado externo y dos en el lado interno de la membrana, tres de ellas dependientes de calcio y todas bombeando electrones al pool de ubiquinonas, cuyos sustratos son NADH y NADPH que provienen de diferentes etapas de los procesos previos a la fosforilación alternativa (Rasmusson *et ál.* 2004). Además, una enzima muy particular y específica de las mitocondrias vegetales, la oxidasa alternativa (AOX), sobre la cual se han logrado avances debido a los numerosos esfuerzos y estudios que se han realizado para comprender su función e importancia (Borecký *et ál.* 2006). Esta enzima es una oxido-reductasa que transfiere electrones desde el ubiquinol (la forma reducida de la ubiquinona) para reducir oxígeno y producir agua, aunque se conoce bastante de su estructura, regulación y actividad, el mecanismo preciso por el cual ocurre la reducción del oxígeno es desconocida (Møller 2001). Esta enzima, junto con las otras cuatro, son vías alternativas al paso de electrones por los complejos enzimáticos, sin que ocurra exportación de electrones, y por lo tanto, sin generación del gradiente de concentración de protones necesario para la producción de ATP. Siendo la fosforilación oxidativa una de las formas más eficientes de producir ATP,

es difícil entender por qué la planta ha desarrollado vías alternativas

precisamente para reducir esta alta eficiencia y ésta es la razón por la que se encuentra una inquietud considerable alrededor de la vía oxidasa alternativa. Algunas de las explicaciones que se han encontrado están relacionadas con la necesidad de aumentar la temperatura en las partes florales en ciertos estados particulares de desarrollo, en los que, específicamente en este tipo de tejidos, se ha observado mayor actividad de AOX, puesto que la energía que no es convertida en ATP, es disipada como calor (Taiz y Zeiger 2006). Además de esta función en el control de la temperatura, se ha encontrado que la activación de esta vía alternativa está regulada por ciertos metabolitos, de manera que la AOX se constituye en un regulador de la producción de ATP (Møller 2001), adicionalmente se ha encontrado una última participación de la AOX en diferentes situaciones de estrés, en las cuales al verse afectada la tasa de respiración normal, esta vía alternativa puede ser un mecanismo para evitar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), al evitar la sobre-reducción del pool de ubiquinonas (Sieger *et ál.* 2005).

Por otro lado, hay que considerar que en la última década ha habido un incremento en el interés entre las interacciones entre la respiración y la fotosíntesis, ya que hay varias vías metabólicas importantes, como la fotorrespiración y la asimilación de nitrógeno que requieren que las reacciones ocurran en ambos organelos, mitocondria y cloroplastos (Bartoli *et ál.* 2005). El término fotorrespiración describe la evolución de CO₂ dependiente de luz debido a la actividad oxigenasa de la enzima Rubisco; se encuentran involucrados tres organelos diferentes en el proceso, peroxisomas, mitocondria y cloroplastos. Este fenómeno se descubrió producto de la observación del efecto de diferentes concentraciones de oxígeno sobre el proceso respiratorio, así, se advirtió que la velocidad de la tasa respiratoria mitocondrial estaba limitada por la concentración de oxígeno, pero que a su vez, ante concentraciones elevadas de oxígeno se presentaba una limitación en la tasa fotosintética, la cual podría explicarse por un proceso respiratorio liberador de CO₂ independiente del mitocondrial, o por un efecto inhibitor de oxígeno en alguna etapa de la fotosíntesis, lo cual es lo que ocurre simultáneamente en este proceso conocido como fotorrespiración (Ogren 1984). El metabolismo fotorrespiratorio implica dos ciclos interconectados que constituyen la vía de reciclaje de glicolato y la vía asociada de reciclaje de aminoácidos.

Todo el proceso inicia con la actividad oxigenasa de la enzima Rubisco en el cloroplasto, de la cual CO_2 y O_2 son sustratos competitivos; cuando es el oxígeno quien se une al sitio activo de la enzima, la enzima se divide formando una molécula de glicolato y otra de 3-fosfoglicerato, ésta última ingresa al ciclo de Calvin, mientras que la molécula de glicolato ingresa al peroxisoma donde se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y glioxalato, el cual puede tomar vías alternativas, bien sea regresando al cloroplasto o convirtiéndose en glicina que al exportarse a mitocondria, inicia una serie de reacciones cuyo resultado final será la producción de glicerato en el peroxisoma que ingresará al cloroplasto para hacer parte finalmente del ciclo de Calvin. Estas vías se definieron inicialmente mediante estudios enzimológicos mediante el uso de metabolitos radio marcados y actualmente se han confirmado con la ayuda del análisis de mutantes y aproximaciones genéticas clásicas; sin embargo, algunas preguntas permanecen vigentes, pues aun se desconocen los mecanismo de transporte entre los diferentes compartimientos y la identidad precisa y posible redundancia de los genes involucrados en la fotorrespiración (Foyer *et ál.* 2009). Algunos autores sugirieron diferentes roles de este proceso, que en algunos momentos estuvo en la mira de los mejoradores, pues se creía que al disminuir la competencia de CO_2 con O_2 , se aumentaba la eficiencia de la fotosíntesis, particularmente en plantas de metabolismo C_3 y con ello se aumentaba la producción y el rendimiento de los cultivos; sin embargo, esta tendencia fue desapareciendo en la medida en la que se inició la comprensión de su importancia como articulador de otras importantes rutas metabólicas y proveedor de metabolitos necesarios en otros ciclos vitales para la planta (Niessen *et ál.* 2007).

El conocimiento del proceso de la respiración en el metabolismo de la planta ha avanzado enormemente en años recientes, así como la comprensión estructural, anatómica y bioquímica de la mitocondria, reflejando su destacada participación en el adecuado funcionamiento de organismos autotróficos. Sin embargo, aun quedan algunas respuestas por ser contestadas en este campo, como es el entendimiento de las propiedades particulares de la mitocondria vegetal frente a la mitocondria animal, las cuales le otorgan ciertas propiedades bioquímicas más flexibles, que son importantes en la integración en el metabolismo general de algunos tejidos como hojas o raíces. De otro lado, está pendiente el perfeccionamiento de las técnicas de

aislamiento de mitocondrias vegetales que se mantengan en condiciones fisiológicamente activas en diferentes tejidos y abarcando mayor número de especies, para ser usados en estudios relacionando funciones específicas de cada tejido con sus tasas metabólicas respiratorias, por ejemplo, frente a condiciones de estrés (Stitt *et ál.* 2010).

Fase experimental

Ensayo 1. Toma de oxígeno en la respiración

Material

Material biológico: 20 semillas de arveja (*Pisum sativum*), o semillas de maíz (*Zea mays*)

Reactivos: 40 mL de NaOH al 20%, 20 mL de H₂O destilada

Otros materiales: pipeta de 10 mL, 3 vasos de 50 mL, 3 tubos de ensayo del mismo tamaño, varilla de agitación, algodón, lápiz de cera

Equipos: balanza analítica o semianalítica

Metodología

Tomar dos tubos de ensayo y en cada uno colocar a embeber 10 semillas durante un período de 24 horas, insertar una mota de algodón húmedo, disponer un tercer tubo solamente con algodón húmedo. Posteriormente tomar dos vasos de precipitado y en cada uno agregar 20 mL de NaOH 20%, tomar un tercer vaso y adicionar a éste igual cantidad de H₂O. Invertir uno de los tubos con semillas en el vaso que contiene NaOH y el otro en el vaso que contiene agua; el tubo sin semillas irá en otro vaso que contiene NaOH. Los tubos deben quedar en posición vertical. Marcar el nivel del líquido en cada uno de los vasos. Observar y marcar la altura del líquido en los tres tubos y en los tres vasos al cabo de 24 horas (Figura 1).



Figura 1. Disposición del experimento ensayo 1. (Fuente: Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia).

Ensayo 2. Medida de la respiración por el Método Warburg

Material

Material biológico: 60 semillas embebidas durante 24 horas (arveja (*Pisum sativum*), maíz (*Zea mays*)).

Reactivos: Solución de NaOH al 10%, fenolftaleína (disolver 0,5 g de fenolftaleína en 100 mL de alcohol 95%, para pruebas muy sensibles utilizar la solución al 0,1%), Solución de HCl 0,1 N, 120 mL de Solución de Ba(OH)₂ al 0,2 N la cual debe filtrarse.

Otros materiales: cuatro recipientes de 500 mL, cuatro tapones biperforados o conectores con dos salidas, 3 tubos de vidrio doblados en U, cuatro tubos de vidrio doblados en L, mangueras adecuadas para la conexión, embudo, bureta, pinza para bureta, soporte universal, Erlenmeyers de 100 mL, pipetas de 10 mL, gotero.

Metodología

Disponer los componentes como se indica en la figura 2. Agregar al primer recipiente (de izquierda a derecha) 30 mL de NaOH al 10% para que absorba el CO₂ del aire que penetra; en el segundo recipiente colocar 50 mL de Ba(OH)₂ 0,2 N el cual tiene como fin retener el CO₂ del aire que no fue absorbido antes; en el tercer recipiente colocar 60 semillas previamente embebidas y en el cuarto recipiente colocar 40 mL de Ba(OH)₂ 0,2 N el cual atrapar  el CO₂ producido por la respiración de las semilla; a este cuarto recipiente conectar la bomba de vacío. Tener cuidado que el tubo en L que se ubica por el lado izquierdo, dentro de cada recipiente, quede en contacto con la respectiva solución. Colocar a funcionar el sistema durante media hora. Entre tanto titular 3 alícuotas de 10 mL de Ba(OH)₂ (blanco de experimento), para ello colocar cada alícuota en Erlenmeyer de 100 mL, agregar dos o tres gotas de fenolftaleína y titular con HCl 0,1 N, dejar caer el ácido gota a gota, agitar suavemente hasta que se perciba el cambio de color en la solución, registrar el volumen de ácido gastado en cada alícuota titulada. Luego de los 30 minutos de funcionamiento del sistema, filtrar el contenido del cuarto recipiente y titular tres alícuotas de la misma manera que se hizo con el blanco de experimento.



Figura 2. Disposición del experimento ensayo 2. (Fuente Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

Con base en el HCl gastado en cada titulación determinar la cantidad de CO₂ desprendido en la respiración de las semillas. Para ello promediar el gasto de HCl utilizado en las titulaciones iniciales (blanco) y en las finales (muestras problema). Determinar la diferencia en la cantidad de HCl gastado en las últimas titulaciones, restando de la cantidad del blanco la cantidad utilizada en la muestra.

Con el valor obtenido calcular la cantidad de CO₂ producido, aplicando la siguiente fórmula: $D \times N \times 22 = \text{mg CO}_2$

D = Diferencia en la cantidad de HCl gastado

N = Normalidad del ácido

22 = Peso equivalente del CO₂

La cantidad calculada, se refiere únicamente al contenido de CO₂ en la alícuota titulada. Calcular el contenido total de CO₂ de la muestra con base en el volumen total del cuarto matraz.

Ensayo 3. Determinación de la tasa respiratoria de las raíces con oxímetro

Materiales

Material biológico: plantas de interés a evaluar con sistema radical completo

Reactivos: reactivos para preparación de solución Hoagland (ver tema relacionado con nutrición mineral); CdCl₂ 0, 500, 1000ppm, cada uno en 100 mL de solución Hoagland 0,1M; KCl saturado (37,5g KCl en 120 mL de agua desionizada); 50 mL de CaSO₄ (1mM) + MES-buffer (100 mM pH 6,0); NaCl

Otros materiales: materas, arena de río, vasos de precipitado, frascos para mantenimiento de soluciones, balones aforados, pipetas Pasteur.

Equipos: Oxímetro Oxylab system 32 marca Hansatech, balanza analítica o semianalítica

Metodología

Sembrar 50 plantas de la especie a evaluar sobre el sustrato arena de río, registrar las condiciones ambientales (PAR, temperatura, humedad relativa). Realizar riego diario a capacidad de campo, y semanalmente con solución Hoagland 0,1M, para mantener condiciones óptimas de crecimiento. Luego de tener plantas con 4-6 hojas

realizar los tratamientos de interés, i) tasa respiratoria en raíces de plantas sometidas y no sometidas a cadmio u otro metal pesado, ii) tasa respiratoria en raíces de plantas sometidas y no sometidas a déficit hídrico, iii) tasa respiratoria en raíces de plantas sometidas y no sometidas a estrés salino, iv) seguimiento de la tasa respiratoria del sistema radical de una planta durante su ciclo de vida, iv) otros de interés del investigador. Luego de realizado el respectivo tratamiento, a las 24 horas, o a los tres días, o a la semana o según el diseño experimental que haya seleccionado, remover la plántula del sustrato, lavar las raíces, pesarlas y determinar su tasa respiratoria con el Oxímetro Oxylab.

El Oxímetro es un sistema que está diseñado para proveer un control computarizado del contenido de oxígeno dentro de la cámara que hace parte del equipo, mediante la medición de la señal del electrodo que se controla por medio de la base que se conecta a través de un puerto serial a un computador con sistema compatible con Windows©. El software del equipo permite visualizar de manera gráfica en tiempo real la evolución del oxígeno y parametrizar algunas condiciones experimentales.

El electrodo de oxígeno es una forma especializada de celda electroquímica, que consta de cátodo y ánodo inmersos en una solución de electrolito (KCl saturado). Con la aplicación de un voltaje polarizante se ioniza el electrolito y se inicia un flujo de corriente que inicia una serie de reacciones en las que se consume oxígeno. El principio de medición de este equipo se basa en que la magnitud del flujo de corriente es proporcional a la concentración de oxígeno disuelta en el electrolito, la cual a su vez es proporcional a la concentración de oxígeno en el medio circundante.

Ejemplo caso de estudio

Determinación de la tasa respiratoria con Oxímetro Oxylab

Efecto de la contaminación con Cadmio en la tasa respiratoria de raíces de *Avicennia germinans* (Fuente: Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia), con el fin de contribuir al conocimiento de los posibles mecanismos de retención, translocación,

acumulación y/o tolerancia que pudieran presentar estas plantas en estos tejidos (Melgarejo *et ál.* 2010d).

Las plántulas fueron crecidas sobre sustrato arena de río, mantenidas en cuarto de crecimiento a temperatura promedio de 27°C, humedad relativa de 70% y sometidas a 12 horas de luz (6:00 – 18:00 horas) con un PAR de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con riego cada tercer día a capacidad de campo y adición semanal de solución nutritiva Hoagland 0,1M.

Luego de tener plántulas con 6 a 8 hojas, se sometieron a los respectivos tratamientos, i) 0, 500 y 1000 ppm de CdCl_2 . Luego de tres días de tratamiento, se removió la plántula del sustrato, se lavaron cuidadosamente las raíces para retirar el sustrato, se retiró con papel absorbente el exceso de agua y se registró la masa fresca de raíz utilizada para analizar en el oxímetro. Se determinó la tasa respiratoria con el Oxímetro Oxylab system 32 Hansatech.

Con el valor de las tasas de respiración obtenidas (Tabla 1), se realizan los respectivos cálculos como se explica abajo.

Tabla 1. Datos obtenidos de tasas de oxígeno consumido por unidad de tiempo (Rate) en raíces de *Avicennia germinans*. Plántulas sometidas a tratamientos con CdCl_2 . Intervalo: número de intervalo en Oxylab, medido dentro del tiempo de análisis

Especie	[CdCl_2]	Réplica	Intervalo	Masa fresca (g) Raíz	Rate
<i>A. germinans</i>	0	1	1	0,0191	0,0018
<i>A. germinans</i>	0	1	2	0,0191	0,0011
<i>A. germinans</i>	0	1	3	0,0191	0,0031
<i>A. germinans</i>	0	1	4	0,0191	0,0001
<i>A. germinans</i>	0	1	5	0,0191	0,0023
<i>A. germinans</i>	0	1	6	0,0191	0,0020
<i>A. germinans</i>	500	1	1	0,0217	0,1296
<i>A. germinans</i>	500	1	2	0,0217	0,0979
<i>A. germinans</i>	500	1	3	0,0217	0,1127

<i>A. germinans</i>	500	1	4	0,0217	0,1722
<i>A. germinans</i>	500	1	5	0,0217	0,1408
<i>A. germinans</i>	500	1	6	0,0217	0,1334
<i>A. germinans</i>	500	2	1	0,0382	0,2119
<i>A. germinans</i>	500	2	2	0,0382	0,1923
<i>A. germinans</i>	500	2	3	0,0382	0,2432
<i>A. germinans</i>	500	2	4	0,0382	0,2709
<i>A. germinans</i>	500	2	5	0,0382	0,2503
<i>A. germinans</i>	500	2	6	0,0382	0,2376
<i>A. germinans</i>	1000	1	1	0,0333	0,4424
<i>A. germinans</i>	1000	1	2	0,0333	0,3923
<i>A. germinans</i>	1000	1	3	0,0333	0,3344
<i>A. germinans</i>	1000	1	4	0,0333	0,3858
<i>A. germinans</i>	1000	1	5	0,0333	0,3829
<i>A. germinans</i>	1000	1	6	0,0333	0,3550
<i>A. germinans</i>	1000	2	1	0,0303	0,3437
<i>A. germinans</i>	1000	2	2	0,0303	0,3834
<i>A. germinans</i>	1000	2	3	0,0303	0,3505
<i>A. germinans</i>	1000	2	4	0,0303	0,3431
<i>A. germinans</i>	1000	2	5	0,0303	0,3258
<i>A. germinans</i>	1000	2	6	0,0303	0,3360

Ejemplo de cálculos con el control (0 ppm CdCl₂):

Tomar todos los datos (**Rate**) de un mismo tratamiento y réplica y promediarlos.

Este valor es la tasa de respiración promedio por segundo

$$\frac{(0,0018 + 0,0011 + 0,0031 + 0,0001 + 0,0023 + 0,0020)}{6} = 0,0017$$

Dividir este valor por el peso fresco de raíz utilizado para análisis en el oxímetro. Así, se convierte en la tasa de respiración promedio por segundo por g de masa fresca.

$$\frac{0,0017}{0,0191} = 0,089$$

Tasa de respiración= 0,089 nmol de O₂ /g masa fresca/segundo

Reportar la medición por minuto, el valor obtenido en el paso anterior se multiplica por 60 segundos.

$$0,089 \times 60 = 5,34$$

Tasa de respiración= 5,34 nmol de O₂ /g masa fresca/minuto

Proceder de la misma manera con los datos de réplicas correspondientes a tratamientos, para obtener las tasas respiratorias. Hallar los valores promedio de las tasas de respiración y el error estándar de cada tratamiento (en este caso, el control no tuvo réplicas). Realizar la respectiva gráfica: tasa de respiración en raíces Vs tratamiento

VIII. ECOFISIOLOGÍA VEGETAL

Maria Elena Solarte¹, Laura Victoria Pérez¹, Luz Marina Melgarejo^{1,2}

Marco conceptual

La ecofisiología es el estudio de las adaptaciones fisiológicas de los organismos al hábitat o al medio ambiente (Etherington 1982). La ecofisiología vegetal tiene como referente las plantas, centrándose en la distribución de las mismas y su capacidad de adaptarse y/o aclimatarse o no a diferentes ambientes, generando así un rango con límites y óptimos, dependiendo muchas veces, no sólo de la especie, sino de la plasticidad fenotípica de la misma.

Dentro de esta posible adaptación (que incluye cambios a nivel genético) y aclimatación (que genera cambios transitorios no subyacentes en cambios genéticos), la ecofisiología vegetal pretende dilucidar los mecanismos fisiológicos que explican algunas observaciones ecológicas (Lambers *et ál.* 1998).

Al estudiar las plantas en su ambiente, se deben tener en cuenta múltiples factores ambientales, a diferencia de los estudios de fisiología que se realizan en vivero, donde es posible controlar ciertas variables para evaluar una sola de estas en la planta. Es por esto que la ecofisiología se considera una ciencia de síntesis donde participa no sólo la planta sino su ecosistema incluyendo la atmósfera (temperatura, viento, radiación, precipitación, humedad), el suelo (textura, capacidad de intercambio catiónico, microorganismos, disponibilidad de nutrientes) y los

Microrganismos cercanos que generan competencia, simbiosis, cooperación o patogenicidad (Ackerly *et ál.* 2000; Reigosa *et ál.* 2003). De esta manera, se trata de

¹ Contribución por igual en la preparación de este tema

² Autor para correspondencia: lmelgarejom@unal.edu.co

escalar desde procesos a nivel de órganos, a plantas completas, doseles, paisajes y dependiendo del objetivo se puede abordar hasta una escala global.

Las principales áreas de la ecofisiología son el estudio de la respuesta a estrés que puede ser ocasionado por: salinidad, déficit hídrico, anegamiento, déficit o exceso de algún nutriente, toxicidad por metales, altas o bajas temperaturas, disturbancia (contaminación, claros de bosque, fuego) e interacciones entre organismos (Balaguer 2004); donde la planta debe responder a los cambios ambientales para poder mantener sus funciones metabólicas y fisiológicas. La ecofisiología también tiene en cuenta cambios a nivel morfológico; por ejemplo, en regiones secas es frecuente el desarrollo de succulencia para acumulación de agua, la presencia de estomas sólo en el envés, tricomas para reflejar la radiación, entre muchas otras adaptaciones. Cuando se tiene como objetivo evaluar la respuesta de determinada planta a un ambiente se miden variables como la tasa fotosintética, la fluorescencia de la clorofila, la tasa transpiratoria, el potencial hídrico, el índice de área foliar, entre otras. A continuación se explicará el fundamento de algunos equipos para estudios en fisiología vegetal, y la importancia que tiene dicha variable dentro del conjunto integral de respuesta de la planta a las condiciones del entorno.

Fluorescencia de la clorofila: permite aproximarse al desempeño fotosintético y al estado del aparato fotosintético a nivel del fotosistema II y proviene del hecho de que la luz que absorbe la clorofila de la hoja puede tomar tres vías distintas; ser direccionada al fotosistema II para realizar fotosíntesis, ser liberada en forma de calor ó ser reemitida en una longitud de onda mayor como fluorescencia (Maxwell y Johnson 2000). Esto se debe a que de la totalidad de la luz que absorbe la hoja, solo una parte de la luz que excita electrones, puede ser recibida por la plastoquinona (primer aceptor de electrones del fotosistema II) y el resto de la energía será llevada a las otras dos vías. Por tanto, cuando el pool de plastoquinona se reduce en su totalidad se dice que los centros de reacción están cerrados y aumenta tanto el nivel de fluorescencia, como la disipación de la luz por calor; en este caso

se habla de una desviación no fotoquímica de la luz (Krause y Weiss 1991; Schreiber *et ál.* 1998; Maxwell y Johnson 2000; Baker 2008). La medida de la fluorescencia se posibilita por la competencia directa entre las tres vías.

La fluorescencia se mide por medio del fluorómetro, que es un equipo no invasivo; la medida se obtiene a partir de la programación de flashes de luz saturantes que generan la consecuente respuesta fluorescente instantánea en la hoja, la cual es detectada por el equipo. Por medio de niveles diferentes de fluorescencia, obtenidos a partir de la aplicación de dichos flashes de luz se pueden obtener variados parámetros de los cuales se obtiene información. El proceso para medir los valores de fluorescencia se inicia con la obtención de la fluorescencia mínima F_o a partir de la aplicación de luz mínima a la hoja. Posteriormente, se puede aplicar un haz de luz saturante actínica (fotosintética) que da lugar a la fluorescencia máxima (F_m) disminuyendo la contribución fotoquímica a cero a partir del cierre de los centros de reacción (Quick y Horton 1984). Por medio de la diferencia entre la F_o y la F_m , se obtiene la fluorescencia variable, F_v . Una vez la fluorescencia ha disminuido después del flash saturante de luz se obtiene la fluorescencia en estado estable de la clorofila (F_t o F_s). Esta disminución de la fluorescencia se da porque aumenta la tasa de transporte de electrones por activación de enzimas involucradas en el metabolismo de carbono y la apertura de estomas, hecho conocido como desviación fotoquímica (Maxwell y Johnson 2000; Baker 2008). Estos valores se pueden obtener en hojas o plantas adaptadas a oscuridad, o en estado adaptado a la luz, en presencia de luz actínica (fotosintética) en cuyo caso se simboliza con una prima después del parámetro. Por ejemplo F_m' significa que es la fluorescencia máxima de una hoja o planta bajo luz actínica constante. La obtención de estos valores bajo luz actínica se realiza con fluorómetros con posibilidad de aplicar flashes de amplitud y frecuencia modulada de tal manera que sólo la fluorescencia emitida gracias a esa amplitud fuera detectada; se detecta la fluorescencia modulada antes de la aplicación de un flash saturante (establecido por el investigador) y la fluorescencia máxima durante el flash (Schreiber *et ál.* 1986; Genty *et ál.* 1989). En el caso de fluorómetros no modulados solo es posible realizar mediciones en hojas adaptadas a oscuridad.

A partir de las anteriores medidas el fluorómetro calcula diferentes parámetros. Dentro de los parámetros medidos en hojas adaptadas a oscuridad se encuentra la F_v/F_m que estima el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (como si todos los centros de reacción estuvieran abiertos); esta se calcula como $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, es una medida potencial del desempeño fotosintético del fotosistema II siendo de gran utilidad debido a que el fotosistema II es uno de los más sensibles a estrés, de tal manera que al disminuir, es un indicador de estrés en la planta. Valores por debajo de 0,83 indicarían estrés (Bjorkman y Demming 1987; Maxwell y Johnson 2000). No obstante se ha visto que la planta presenta disminución considerable de F_v/F_m solo cuando hay un estrés severo ya que la planta cuenta con un 50% extra de fotosistemas II (Lee *et ál.* 1999).

La desviación no fotoquímica se calcula a través del quenching no fotoquímico $NPQ = (F_m^o - F_m')/F_m'$ (Bilger y Björkman 1990), este valor indica la proporción de luz que está dirigiéndose a la vía de la disipación por calor, y puede estar relacionado con la protección del aparato fotosintético a partir del ciclo de las zeaxantinas (Demmig-Adams y Adams III 1992) o el daño del mismo que genera diferentes niveles de fotoinhibición (Osmond 1994). La medida del NPQ se usa en plantas sometidas a condiciones de estrés ya que es proporcional al nivel de estrés.

Dentro de los parámetros hallados en hojas sometidas a luz actínica se encuentra el rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II (Φ_{PSII}) que indica la proporción de luz absorbida que está siendo dirigida al fotosistema II (Maxwell y Johnson 2000); se calcula a partir de la fórmula $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t)/F_m'$ (Genty *et ál.* 1989). A diferencia de F_v/F_m este parámetro es real, y no potencial, y disminuye a medida que aumenta la densidad de flujo fotónico (Baker 2008). Φ_{PSII} puede relacionarse directamente con el rendimiento en la asimilación de carbono en condiciones de ausencia de estrés, debido a que la mayoría de los electrones tomados por el fotosistema II se dirigen al proceso fotosintético. No obstante, en condiciones de estrés y sobretodo en plantas C_3 debido a las tasas elevadas de fotorrespiración y a otros desvíos de la transferencia de electrones, como la reacción de Mehler y el flujo cíclico de electrones en los fotosistemas, la relación no se puede establecer

directamente (Genty *et ál.* 1989; Fryer *et ál.* 1998; Flexas *et ál.* 1998; Flexas *et ál.* 2002; Baker 2008).

A partir de Φ_{PSII} se puede obtener la tasa de transporte de electrones por el fotosistema II (ETR) a partir de la ecuación: $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PFD}$ (densidad de flujo fotónico) $\times 0,5$. Esta última constante tiene que ver con la suposición que los electrones se dividen entre el fotosistema I y II de manera equitativa (Maxwell y Johnson 2000).

Dependiendo del objetivo del estudio se pueden usar unos y/u otros parámetros para lo cual se programa el fluorómetro por medio del software correspondiente y teniendo en cuenta el diseño experimental.

Intercambio de gases: El intercambio de gases se mide por un sistema portable para fotosíntesis en cuya consola generalmente vienen incluidos diferentes sensores para la medición de la tasa transpiratoria, temperatura foliar, humedad relativa, radiación fotosintéticamente activa, flujo de aire a través del sistema y la concentración de carbono interno. La base del sistema de análisis comprende una consola principal conectada a una cámara foliar donde se ubica la hoja específica a ser medida. La consola principal supe de aire con condiciones controlables de CO₂ y H₂O a la cámara foliar. El gas de referencia (proveniente del exterior y sin ningún cambio en el caso que así lo desee el investigador, o por el contrario, siendo controlada la concentración de CO₂ y H₂O) se dirige a la cámara foliar hacia las dos superficies foliares de tal manera que el aire descargado por la hoja presenta cambios a partir de la tasa transpiratoria y de fotosíntesis que presente. A partir de la diferencia entre las concentraciones del gas de referencia y el analizado se determinan las dos tasas.

La tasa de transpiración se mide a partir de sensores de humedad, mientras la tasa fotosintética a partir de un sistema de análisis de gases infrarrojo. Esta se basa en la propiedad del CO₂ de absorber la energía en la región infrarroja en una proporción relacionada a la concentración del gas. La muestra de gas a ser medida pasa por una celda y ésta es irradiada con una fuente de gas infrarrojo, un detector en el extremo de la celda mide la amplitud de la señal infrarroja que será menor en cuanto el CO₂

lo haya reducido. Los gases de referencia se alternan con un nivel de gas “cero” que se obtiene a partir de químicos (en general *soda lime*) que absorben el CO₂ en su totalidad en cada intervalo de medida para iniciar un nuevo ciclo de medición que permitirá a la celda re-llenarse y reajustarse al flujo de aire (ADC BioScientific Ltd 2004).

La medida de la tasa fotosintética a lo largo del día permite evaluar la respuesta de la fotosíntesis a la humedad, a la radiación fotosintéticamente activa y a la temperatura en las condiciones cambiantes diarias, determinando las estrategias que desarrolla la planta para conservar agua en horas de mayor PAR a lo cual puede responder con cierre de estomas, lo que se refleja en la disminución de la tasa transpiratoria y su tasa fotosintética, o por el contrario intenta lidiar con el déficit de presión de vapor procedente de la alta temperatura y mantiene los estomas abiertos (Rabaiolli-da Silva y Rebello-Dillenburg 2007; Tay *et ál.* 2007; Yu *et ál.* 2009). Esto tendrá relación directa con el tipo de metabolismo de la planta de acuerdo a sus adaptaciones fotosintéticas C3, C4 o CAM y a su vez influirá en la tasa fotosintética máxima hallada.

Usualmente los sistemas de análisis de fotosíntesis tienen posibilidades de regular la concentración de CO₂ y la cantidad de radiación fotosintéticamente activa manteniendo constantes otros parámetros para realizar curvas de respuesta fotosintética a la luz y a la concentración de CO₂. Las curvas de saturación de luz permiten, a partir del sometimiento de la hoja a niveles crecientes de PAR y condiciones estables de CO₂ y temperatura, determinar el punto de compensación por luz en el cual el intercambio de gases es cero debido a que la respiración se equilibra con la fotosíntesis (la entrada y salida de CO₂ es la misma). Antes de este punto la salida de CO₂ debida a la respiración es mayor y por tanto se puede determinar la tasa de respiración de la planta. Después del punto de compensación por luz se da una proporcionalidad entre la radiación PAR y la tasa fotosintética donde la velocidad de la eficiencia en la toma de CO₂ está limitada por las reacciones de luz. La pendiente de la recta será mayor cuanto más moles de CO₂ sean tomados por determinados moles de fotones absorbidos lo cual se denomina eficiencia fotosintética. Posteriormente en la curva, a pesar que la radiación PAR

sigue aumentando, la toma de CO₂ solo aumenta ligeramente hasta que es constante, punto que se denomina “punto de saturación por luz” donde la tasa está limitada por procesos enzimáticos y disponibilidad de CO₂. El punto de saturación indica la fotosíntesis máxima de la planta que es típica de cada especie (Larcher 2003).

También se realizan curvas de respuesta de la fotosíntesis a CO₂ en las cuales la hoja se irradia con PAR saturante constante y se elevan paulatinamente los niveles de CO₂, así se puede determinar el punto de compensación por CO₂ y el punto de saturación por CO₂.

Todo lo anterior permite determinar el desempeño fotosintético de la planta en un ambiente determinado.

A partir de la medida de la tasa de fotosíntesis y la tasa de transpiración que proporciona el sistema de análisis se puede determinar el uso eficiente del agua (WUE= tasa fotosintética/tasa transpiratoria) que permite determinar el balance entre la pérdida de agua y la toma de CO₂ y por tanto el uso de estrategias para la conservación de agua en la planta. También se puede hallar el uso eficiente del agua intrínseco dado por $WUE_i = \text{Tasa fotosintética} / \text{Conductancia estomática}$ (Dry y Loveys 1998; Poni *et ál.* 2009).

Potencial hídrico: Es una medida de la energía libre de Gibbs asociada al agua que se encuentra ligada al suelo o a un tejido en la planta y referida al volumen molar del agua (Reigosa *et ál.* 2003). El potencial hídrico se describe como el trabajo necesario para llevar el agua ligada al nivel del potencial del agua pura a una misma temperatura y presión atmosférica (Slayter y Taylor 1960). Indica la energía con la cual el agua está siendo retenida en un tejido, o en el suelo. Esta se mide en unidades de energía, pero puede y usualmente se expresa en unidades de presión (pascales o bares). El potencial hídrico en una célula está determinado principalmente por el potencial osmótico (solutos disueltos en el agua que disminuyen el potencial hídrico de la misma) y el potencial de presión (presión de las paredes celulares sobre el agua que se encuentra en la célula) (Reigosa *et ál.* 2003).

El potencial hídrico se mide principalmente a partir del sistema de cámara de presión de Schöllander la cual está compuesta por la cámara de presión y una bomba de presión a la cual se conecta. El proceso para medir el potencial hídrico foliar o del tallo se inicia cortando una hoja con pecíolo o un tallo, colocándolo de tal manera que quede expuesto por un orificio presente en la parte superior de la cámara de presión. Luego de sellada la cámara y sin fugas, se aplica ascendentemente presión a la cámara por medio de la bomba hasta el punto en el cual aparezca una gota de agua en el extremo del pecíolo o tallo cortado. Cuando esto ocurre se dice que la presión positiva ejercida por la bomba de presión ha igualado la tensión con la cual está retenida el agua dentro de los tejidos, estimando el potencial hídrico (Reigosa *et ál.* 2003; Galmés 2006).

El potencial hídrico representa un método simple para evaluar el estado fisiológico de la planta debido a que el crecimiento celular, la fotosíntesis y la productividad están fuertemente influenciados por sus componentes (Repellin *et ál.* 1997). La medida de potencial hídrico antes del amanecer es de las más frecuentes en estudios ecofisiológicos debido a que en este punto el contenido de agua entre las hojas y el suelo está en equilibrio y la pérdida de agua es mínima (Sellin 1999), si el potencial hídrico foliar es bajo o muy negativo aún en la noche, se puede afirmar que hay estrés hídrico en la planta. Durante el día, es importante la medida del medio día cuando la radiación fotosintéticamente activa es mayor. El mantenimiento de estomas abiertos depende de la hidratación del interior de la hoja (Zsófi *et ál.* 2009). El potencial hídrico foliar depende del potencial hídrico del suelo, de la conductividad hidráulica de la planta, de la tasa transpiratoria y de la altura de la planta (Sack y Hollbrook 2006). El umbral de potencial hídrico al cual se cierran los estomas de la planta es una característica que varía entre las especies (Mediavilla y Escudero 2004). En el curso de un día el estado hídrico de la planta, aún en una planta bien regada, decrece al medio día a medida que la tasa transpiratoria aumenta, por el ascenso de la demanda por evaporación. En buenas condiciones ambientales, la planta recupera su estado hídrico hacia el final del día, aumentando su potencial hídrico a medida que la temperatura y por tanto la transpiración disminuyen (Dodd y Davies 2010).

Índice de área foliar: El índice de área foliar es el área proyectada de las superficies de las hojas por unidad de área de suelo (Marshall y Waring 1986). Aunque esta medida se relaciona con el crecimiento y el desarrollo, también es una medida ecofisiológica ya que se relaciona con el área de la superficie fotosintética y de la transpiración dentro del dosel (Chen *et ál.* 1997) y está fuertemente relacionada con la productividad de cultivos aprovechables debido a que determina la habilidad para capturar la energía lumínica (Wilhem *et ál.* 2000).

En un principio era necesario usar métodos destructivos o alométricos para hallar el índice de área foliar, pero los primeros eran dispendiosos y los segundos poco precisos. Actualmente se cuentan con métodos ópticos que permiten realizar una medida del LAI rápida y reproducible. Estos métodos se basan en la medida de la radiación fotosintéticamente activa que llega al dosel, y la radiación fotosintéticamente activa que hay debajo de este, es decir que ha sido absorbida por el dosel (Fournier *et ál.* 2003). En el caso del equipo Sunscan (Delta T Devices Ltda, 1995) la medida de radiación incidente se mide a través de un sensor de fracciones de emisión (BFS) que se ubica en una zona despejada a la cual llegue la radiación solar sin obstáculos. El BFS discierne la radiación total en radiación directa (que proviene directamente de la luz solar sin ser dispersada) y radiación difusa (que proviene de la radiación dispersada a través de las nubes que viene de diferentes puntos). Por su parte la radiación transmitida, que corresponde a la que deja pasar el dosel de la planta, se mide por medio de una sonda que contiene numerosos fotodiodos a lo largo del sensor (Breda 2003; Kalackaska *et ál.* 2005). Tanto el BFS como la sonda están conectados a un *logger* desde el cual se configura las mediciones y se pueden visualizar los datos obtenidos (Delta T Devices LTda 1995). Para tomar la medida, se deben cuadrar los niveles que se encuentran tanto en el BFS y en la sonda. Esta última se debe colocar a la altura deseada (punto en el cual se incluya la mayor parte del dosel de la planta a medir) y por debajo del dosel. La medida se toma directamente al presionar el botón una vez se considere que la sonda está captando la sombra producida por el dosel. El sunscan por medio de la ecuación de Campbell (1986) que incluye la luz transmitida, calculada por la diferencia entre la luz total y la absorbida, calcula el índice de área foliar.

Debido a que el sunscan es un método óptico se mide inevitablemente el sombreadamiento causado por ramas y tallos. Por tanto se recomienda usar el término Índice de Área de la Planta a menos que el método se haya calibrado con la planta.

Fase experimental

Materiales

Material biológico: cinco plantas de la misma especie establecidas bajo condiciones de campo.

Otros materiales: aditamentos de los equipos a utilizar, tijeras, cuchillas, papel absorbente, cinta de enmascarar, cinta flag

Equipos: IRGA, fluorómetro modulado, bomba de Schöllander, sun scan, estación microclimática, tensiómetros o medidores de humedad del suelo

Metodología

Seleccionar la especie a evaluar y las condiciones experimentales, por ejemplo: i) análisis ecofisiológico de plantas durante las épocas de lluvia y seca; ii) análisis ecofisiológico de plantas sometidas y no sometidas a un determinado estrés, iii) análisis ecofisiológico de plantas de la misma especie crecidas en diferentes condiciones ambientales, iv) análisis ecofisiológico de plantas durante el ciclo de vida, y en diferentes estados fenológicos, v) otro de interés del investigador.

Realizar la toma de datos en rangos de dos a tres horas durante el día para determinar los cambios en las diferentes variables de la planta e integrarlos en la respuesta general al ambiente. Para esto, el muestreo de ecofisiología se debe iniciar desde horas de la mañana hasta finalizar la tarde, antes del anochecer. Como ejemplo, comenzando a las 6:00am en rangos de dos horas, registrar un total de seis puntos en el día (6-8, 8-10, 10-12, 12-14, 14-16, 16-18 horas) midiendo la tasa fotosintética y tasa de transpiración con el IRGA, el potencial hídrico con la bomba de Schöllander, la fluorescencia de la clorofila con el fluorómetro modulado (F_v/F_m , ETR, qP, Φ_{PSII} , NPQ), y el índice de área foliar con el sunscan; esto se complementa con medidas ambientales que se miden también con estos equipos (PAR, humedad

relativa, temperatura) y por medio de la estación microclimática. En lo posible se debe tener una estación microclimática permanente en el sitio de estudio, para poder correlacionar las variables fisiológicas medidas con las condiciones ambientales en las cuales se ha desarrollado la planta.

De la misma manera se deben realizar mediciones de humedad del suelo con sensores de humedad del suelo o de potencial hídrico con tensiómetro.

También, es apropiado complementar el estudio con un análisis de suelo que permita determinar su efecto en los resultados ya que puede haber deficiencia de nutrientes y agua, presencia de patógenos, entre otros, que pueden afectar los resultados.

Cada variable se debe medir en varias plantas (mínimo cuatro) y dentro de la planta en varias hojas (mínimo cuatro) dentro de cada rango de hora. Dependiendo del equipo es posible hacer más mediciones o registros; por ejemplo, al usar el IRGA se debe esperar en cada medición que el flujo de aire se equilibre con la salida de CO₂ y H₂O de la hoja y por esta razón en cada medida la estabilización del equipo puede durar de 30 segundos a tres minutos. En tanto que con el fluorómetro se puede tomar la medida directa y rápidamente, y por esta razón se pueden realizar más mediciones dentro de cada planta y rango de hora.

Realizar las medidas de índice de área foliar una vez al día entre las 11:00am y las 13:00 debido a que en esa hora el sol llega directamente a las plantas y esta es una especificación del equipo.

El IRGA, el fluorómetro y el sunscan no se deben mojar, por tanto si se presenta precipitación se deben guardar los equipos. El IRGA se afecta con alta humedad (por encima del 80%). Después de una lluvia las hojas deben secarse suavemente con papel absorbente para evitar la entrada de humedad a los equipos. El IRGA es muy sensible a la humedad por tanto es recomendable no prenderlo hasta que la lluvia haya cesado y la humedad relativa haya bajado. Normalmente esto se puede comprobar con un valor de CO₂ de referencia por debajo de 400 ppm.

Después de la curva diaria, realizar con el IRGA medidas nocturnas de respiración (hacia las 23:00 o 24:00 h, o antes del amanecer. Tomar en la noche datos de F_v/F_m con el fluorómetro, en todo caso la planta debe estar adaptada a oscuridad por lo menos 30 minutos para tomar esta medida. A su vez, antes del amanecer (3:00-4:00 am) es necesario realizar una medida del potencial hídrico de la planta que indique su estado hídrico en el punto en el cual ha podido recuperar las pérdidas durante el día. En este punto el contenido de agua entre las hojas y el suelo está en equilibrio y la pérdida de agua es mínima.

Las curvas diarias permiten establecer las estrategias de fotosíntesis y transpiración que tiene la especie objeto de un estudio, determinando si presentan cierre estomático al medio día, hora del día en que se presenta una mayor tasa de fotosíntesis neta o de transpiración, los resultados pueden ser contrastados con el potencial hídrico y las condiciones micro climáticas. Con los datos de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática se puede calcular el uso eficiente del agua intrínseco y extrínseco. La información anterior es muy útil para hacer seguimiento de plantas bajo diferentes tratamientos o durante el ciclo de vida del organismo, o para comparar entre épocas climáticas, o estados fenológicos, entre otros.

Curva de saturación fotosintética por luz: con el IRGA realizar en un día entre las 9:00 y las 13:00 horas curvas de saturación fotosintética por luz para determinar el punto de compensación lumínico, el punto de saturación luminoso y la eficiencia fotosintética. Los puntos se hallan por medio de modelos de regresión no lineal a través de las ecuaciones del modelo estadístico de Mitscherlich (Aleric y Kirkman 2005) y el modelo hiperbólico de Michaelis Menten (Givnish *et ál.* 2004).

Se recomienda elaborar las curvas en el rango de horas de 9:00 a 13:00 debido a que en la tarde las plantas pueden tener niveles de estrés debido a alta radiación, temperatura y deficiencia de agua induciendo el cierre estomático. Para la curva de luz se establecen condiciones de CO_2 cercanas a 400 ppm, y si es necesario se fija también la temperatura de la hoja. Se comienza con niveles de PAR saturantes. Si la planta está adaptada a alta PAR la curva puede comenzarse con 1500-1600 μmol

fotones/m²s, mientras que si la planta crece en un ambiente sombreado o de baja luz la curva se puede comenzar en 1000 μmol fotones/m²s. A partir de este punto se comienza a descender en rangos de 200 a 300 μmol fotones/m²s, hasta un valor de 100 μmol fotones/m²s punto en el cual la disminución debe ser menos espaciada porque se busca que por debajo de este punto esté el punto de compensación por luz. Una vez pasados los datos al computador, se ajustan a los modelos indicados anteriormente (modelo de Mitscherlich o el modelo hiperbólico de Michaelis-Menten).

Igualmente realizar curvas de saturación de CO₂. Para ello, se fijan las condiciones de PAR a un nivel saturante para la planta (hallado anteriormente por medio de la curva de luz), y se realizan mediciones a las siguientes concentraciones de CO₂: 380, 250, 150, 50, 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, y 1000 μmol CO₂ mol⁻¹. Con los datos que se obtengan se pueden ajustar modelos como el planteado por Mitscherlich (Alerick y Kirkman 2005) o el modelo FvCB para curvas A/C_i de Farquhar *et ál.* (1980).

Ejemplo caso de estudio

Taller: potenciales hídricos, transpiración, conductancia estomática, y variables ambientales

A continuación se presenta una serie de datos tomados en campo (Tabla 1) para el estudio de la especie forestal *Abatia parviflora*. Se utilizó para la determinación del potencial hídrico del suelo tensiómetros, para el potencial hídrico de la planta la Bomba de Presión y para el potencial hídrico de la atmósfera las mediciones de humedad relativa y temperatura de acuerdo a la metodología indicada anteriormente. Igualmente se presentan datos de PAR, transpiración y conductancia estomática tomadas con porómetro.

En una hoja de cálculo de Excel se organizan los datos en columnas como se observa en la tabla 1. Los datos que se obtienen con los tensiómetros y bomba de Schöllander son en Bares, para ello se debe realizar la conversión de los mismos a MPa, para lo cual recuerde que 1 Bar = 0,1 MPa.

Para obtener el potencial hídrico de la atmósfera se calcula de acuerdo a alguna de las fórmulas:

$$\Psi_{\text{atmósfera (MPa)}} = 0,4608 \times (T \text{ en grados Kelvin}) \times \text{Ln}(\text{HR}/100)$$
$$\Psi_{\text{atmósfera (MPa)}} = -1,06 \times (T \text{ en grados Kelvin}) \times \text{Log}_{10}(100/\text{HR})$$

A manera de ejemplo en la fila 1, hora 4:00 (Tabla 1):

$$\Psi_{\text{atmósfera (MPa)}} = 0,4608 \times (T \text{ en grados Kelvin}) \times \text{Ln}(\text{HR}/100)$$
$$= 0,4608 \times (T \text{ }^{\circ}\text{C}_{\text{ambiente}} + 273) \times \text{Ln}(\text{HR}/100)$$
$$= 0,4608 \times (13,49 + 273) \times \text{Ln}(61/100)$$
$$\Psi_{\text{atmósfera}} = -66(\text{MPa})$$

Posteriormente se grafica (Figura 1). Para el $\Psi_{\text{atmósfera (MPa)}}$ se trabaja como $\Psi_{\text{atmósfera MPa}/100}$ por escala.

Tabla 1. Datos de campo (arboretum Universidad Nacional de Colombia) obtenidos para el estudio en *Abatia parviflora* (Fuente: Colmenares *et ál.* En revisión. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

HORA	Ψ suelo MPa	Ψ hoja (MPa)	Ψ atmósfera (MPa)	Ψ atm MPa/100	T ambiente (°C)	Transpiración ($\mu\text{g}/(\text{cm s})$)	Conductancia estomática (cm s^{-1})	T HOJA (°C)	PAR ($\mu\text{mol quanta s}^{-1} \text{m}^{-2}$)	HR/100
4:00	-0,014	-0,100	-66,0	-0,660	13,49	2,36	0,44	16,63	0,19	0,61
6:00	-0,014	-0,050	-53,4	-0,534	12,93	1,97	0,47	14,77	10,69	0,67
8:00	-0,014	-0,100	-66,1	-0,661	16,45	6,23	1,15	18,43	343,50	0,61
10:00	-0,014	-0,075	-79,5	-0,795	17,37	8,30	1,23	20,10	551,46	0,55
12:00	-0,012	-0,250	-104,7	-1,047	20,69	10,46	1,12	21,97	786,45	0,46
14:00	-0,014	-0,250	-113,7	-1,137	21,09	12,27	1,42	21,43	601,39	0,43
16:00	0,000	-0,050	-118,6	-1,186	15,25	6,10	0,69	18,57	97,47	0,41
18:00	0,000	-0,050	-99,8	-0,998	15,41	3,37	0,43	18,83	0,19	0,47
20:00	0,000	-0,050	-87,7	-0,877	13,61	2,76	0,36	17,87	0,19	0,51
22:00	0,000	-0,050	-77,0	-0,770	12,93	2,15	0,32	16,90	0,19	0,56
0:00	0,000	-0,050	-36,6	-0,366	12,97	0,71	0,23	15,30	0,19	0,76
2:00	0,000	-0,050	-38,4	-0,384	12,25	1,15	0,42	14,37	0,19	0,75
4:00	0,000	-0,050	-34,9	-0,349	12,01	0,47	0,30	14,50	0,19	0,77
6:00	0,000	-0,050	-43,2	-0,432	12,49	2,39	0,71	15,70	45,35	0,72
8:00	0,000	-0,075	-51,1	-0,511	16,17	5,16	1,30	17,70	797,51	0,68
10:00	0,000	-0,075	-77,8	-0,778	18,29	7,82	1,29	19,03	557,20	0,56
12:00	0,000	-0,300	-128,6	-1,286	17,45	10,41	1,15	19,37	426,03	0,38
14:00	0,000	-0,050	-97,4	-0,974	14,97	9,40	1,42	18,50	289,06	0,48
16:00	0,000	-0,050	-57,9	-0,579	16,41	4,19	0,90	18,23	193,48	0,65
18:00	0,000	-0,125	-58,2	-0,582	14,81	2,69	0,38	17,63	21,48	0,64
20:00	0,000	-0,150	-58,9	-0,589	14,57	1,19	0,24	17,03	0,19	0,64
22:00	0,000	-0,075	-41,2	-0,412	11,89	0,86	0,25	14,83	0,19	0,73
0:00	0,000	-0,150	-34,7	-0,347	12,65	0,49	0,17	15,63	0,19	0,77
2:00	0,000	-0,125	-43,3	-0,433	13,01	0,68	0,19	16,37	0,19	0,72
4:00	0,000	-0,350	-36,6	-0,366	12,65	0,48	0,15	14,77	0,19	0,76

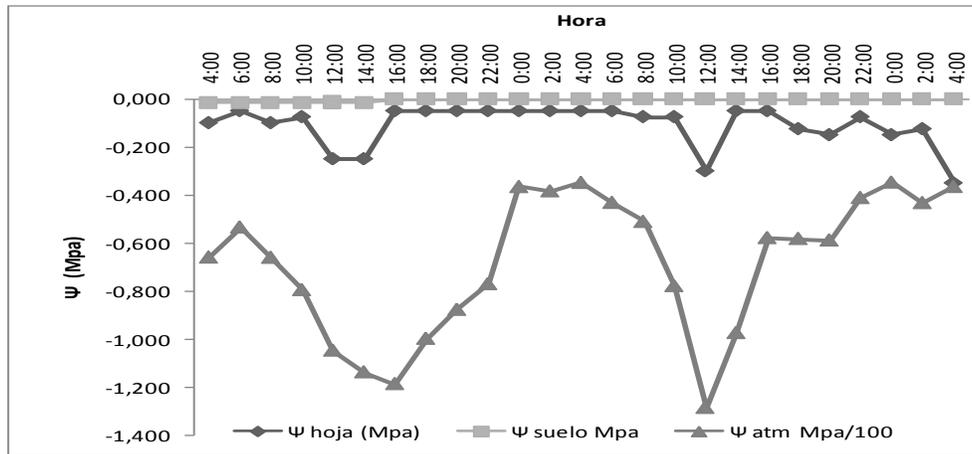


Figura 1. Potenciales hídricos. ■ ψ_{suelo} (MPa), ◆ ψ_{hoja} *Abatia parviflora* (MPa), ▲ $\psi_{\text{atmósfera}}$ (MPa). (Fuente: Colmenares *et ál.* En revisión. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

Con los datos de la tabla 1, se pueden realizar otras gráficas del comportamiento de las variables durante el día, como por ejemplo, tasa de transpiración y temperatura foliar (Figura 2).

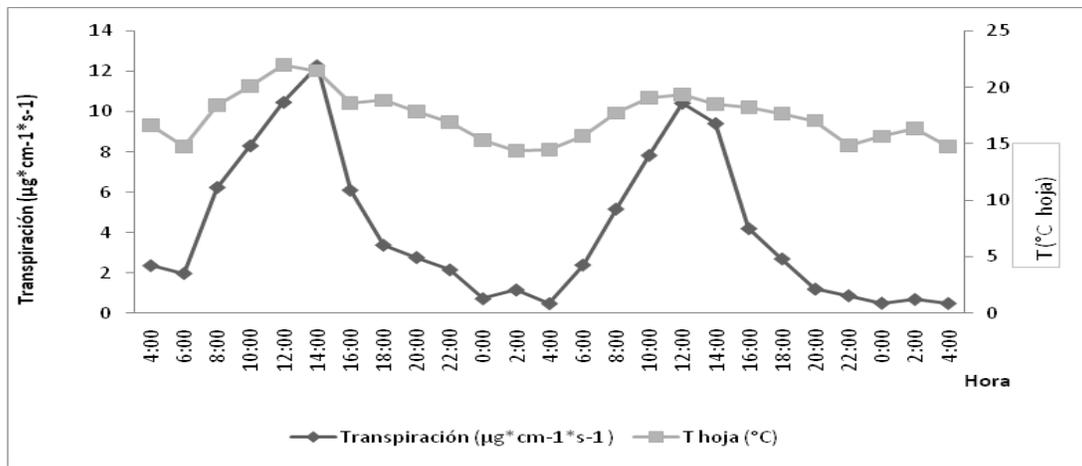


Figura 2. Transpiración y temperatura de la hoja de *Abatia parviflora* (Fuente: Colmenares *et ál.* En revisión. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

Teniendo en cuenta las figuras 1 y 2, se observa que los potenciales hídricos se hacen más negativos hacia el medio día, en tanto que la tasa de transpiración y conductancia estomática aumentan hacia el mismo rango de tiempo; lo que da idea

del movimiento del agua en el continuo suelo-planta-atmósfera. Igualmente, en la figura 2 se observa la tendencia de la temperatura foliar y su relación con la tasa de transpiración.

De acuerdo con los datos presentados en la tabla 1, realizar las gráficas correspondientes a PAR, temperatura ambiental, humedad relativa, transpiración y conductancia estomática. Calcular el déficit de presión de vapor (VPD). Realizar gráficas de correlación entre las diferentes variables.

Ejemplo caso de estudio

Taller: Déficit de presión de vapor

El déficit de presión de vapor DPV es un dato climatológico, basado en la humedad relativa y temperatura (Allen *et ál.* 1998). El DPV influencia en gran medida la apertura estomática y por tanto la transpiración. Se ha reportado que el DPV determina más que variables climatológicas simples, la tasa fotosintética a partir del control de la apertura estomática, ya que el cierre estomático estaría dado por un aumento del DPV. Esta se obtiene a partir de las siguientes ecuaciones:

e_s = presión de vapor a saturación

e_a = presión de vapor actual o real

Déficit de presión de vapor:

$$DPV = e_s - e_a$$

$$e_a = \frac{e^\circ(T_{m\acute{a}x}) \frac{HR_{m\acute{i}nima}}{100} + e^\circ(T_{m\acute{i}n}) \frac{HR_{m\acute{a}xima}}{100}}{2}$$

$$e_s = \frac{e^\circ(T_{m\acute{a}xima}) + e^\circ(T_{m\acute{i}nima})}{2}$$

$e^\circ(T_{m\acute{a}xima})$ = presión de vapor de saturación a temperatura máxima (kPa),

Siendo:

$$e^\circ(T_{m\acute{a}xima}) = 0,6108 \text{ exponente } ((17,27 T_{m\acute{a}xima}) / (T_{m\acute{a}xima} + 273,3))$$

Donde exponente = 2,7183.

$e^{\circ}(T_{\text{mínima}})$ = presión de vapor de saturación a temperatura mínima (kPa),

Siendo:

$$e^{\circ}(T_{\text{mínima}}) = 0,6108 \text{ exponente } ((17,27 T_{\text{mínima}}) / (T_{\text{mínima}} + 273,3))$$

Donde exponente = 2,7183.

HR_{máx} = humedad relativa máxima diaria (%).

HR_{mín} = humedad relativa mínima diaria (%)

T_{máx} = temperatura máxima

T_{mín} = temperatura mínima

Así, por medio de los datos climatológicos se calcula cada uno de los parámetros (Tabla 2). (Datos tomados en campo en *Passiflora edulis* Sims. Fuente laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

Tabla 2. Datos de campo tomados en Granada (Cundinamarca) (Fuente: Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia).

Fecha	T _{máx}	T _{mín}	HR _{mín}	HR _{máx}	e ^o _{T_{máx}}	e ^o _{T_{mín}}	ea	es	DPV
22/06/2009	15,6465	12,8474	79,0726	95,9856	1,556	1,326	1,252	1,441	0,189
23/06/2009	17,4863	11,2475	78,2148	95,9856	1,726	1,209	1,255	1,467	0,212
24/06/2009	19,0057	9,768	63,7528	95,9856	1,877	1,108	1,130	1,493	0,363
25/06/2009	18,6859	9,808	71,6209	95,9856	1,845	1,111	1,194	1,478	0,284
26/06/2009	19,6858	9,9678	64,7086	94,8334	1,949	1,122	1,162	1,535	0,373
27/06/2009	17,7261	10,608	73,7534	95,9856	1,749	1,165	1,204	1,457	0,253
28/06/2009	19,8456	11,3674	62,2086	95,9856	1,966	1,217	1,196	1,592	0,396
29/06/2009	18,3655	12,0075	81,0581	95,9856	1,812	1,263	1,341	1,538	0,197
30/06/2009	18,0458	10,568	85,0287	95,9856	1,780	1,162	1,314	1,471	0,157
01/07/2009	17,9659	9,8879	75,9839	95,9856	1,772	1,116	1,209	1,444	0,235
02/07/2009	18,1257	11,7277	76,4497	95,9856	1,788	1,243	1,280	1,516	0,236
03/07/2009	17,806	11,3674	80,9846	95,9856	1,757	1,217	1,295	1,487	0,191

04/07/2009	17,6861	10,8478	77,3076	95,9856	1,745	1,181	1,241	1,463	0,222
05/07/2009	18,5261	10,3675	73,9004	95,9856	1,828	1,148	1,227	1,488	0,262
06/07/2009	17,806	10,1277	81,4256	95,9856	1,757	1,132	1,259	1,444	0,186
07/07/2009	19,0456	11,2475	67,7973	92,9708	1,882	1,209	1,200	1,545	0,345
08/07/2009	17,0859	11,5672	67,3559	95,9856	1,687	1,232	1,159	1,459	0,300
09/07/2009	17,4863	9,9678	74,4887	95,9856	1,726	1,122	1,181	1,424	0,243
10/07/2009	17,7261	9,3683	74,6357	95,9856	1,749	1,083	1,172	1,416	0,244
11/07/2009	18,0058	11,4473	75,3711	95,4952	1,776	1,223	1,253	1,500	0,246
12/07/2009	19,1655	9,8879	71,3514	95,9856	1,894	1,116	1,211	1,505	0,294
13/07/2009	21,0053	9,3683	64,6596	94,0981	2,095	1,083	1,187	1,589	0,402
14/07/2009	18,4861	10,0478	73,4594	95,9856	1,824	1,127	1,211	1,476	0,265
15/07/2009	18,2057	8,6483	69,1699	95,9856	1,796	1,037	1,119	1,417	0,298
16/07/2009	18,3655	9,8879	68,3362	95,9856	1,812	1,116	1,155	1,464	0,309
17/07/2009	19,4453	9,6081	65,3459	95,9856	1,924	1,098	1,155	1,511	0,355
18/07/2009	19,8456	10,0478	62,4536	95,4952	1,966	1,127	1,152	1,547	0,395
19/07/2009	19,4453	11,1675	65,8608	94,6864	1,924	1,203	1,203	1,563	0,360
20/07/2009	18,9657	10,6879	70,0278	95,9856	1,873	1,170	1,217	1,522	0,304
21/07/2009	19,2455	10,3276	71,1551	95,9856	1,902	1,146	1,227	1,524	0,297
22/07/2009	17,806	10,4475	76,9156	95,9856	1,757	1,154	1,229	1,455	0,226
23/07/2009	18,646	9,728	70,7141	95,9856	1,840	1,106	1,181	1,473	0,292
24/07/2009	19,6058	12,0475	66,3262	95,9856	1,941	1,266	1,251	1,603	0,352
25/07/2009	20,1254	11,6877	64,6596	95,0053	1,997	1,240	1,235	1,618	0,384
26/07/2009	19,4453	11,4873	73,0426	95,2503	1,924	1,226	1,286	1,575	0,288
27/07/2009	20,2053	12,607	67,8218	94,1471	2,006	1,308	1,296	1,657	0,361
28/07/2009	19,4453	9,1279	67,4784	95,9856	1,924	1,067	1,161	1,495	0,334
29/07/2009	16,5664	12,7275	76,6457	95,9856	1,639	1,317	1,260	1,478	0,218
30/07/2009	20,4052	9,8479	64,3901	95,9856	2,028	1,114	1,187	1,571	0,383
31/07/2009	19,3654	9,9678	71,9398	95,9856	1,915	1,122	1,227	1,518	0,291

Ejemplo caso de estudio

Taller: Fluorescencia de la clorofila

Mediciones de fluorescencia de la clorofila fueron tomadas en plantas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en estado juvenil, sembradas en Anapoima, Granada y Tena (Cundinamarca) desde las 7:00 am hasta las 7:00 pm en rangos de dos horas (Melgarejo *et ál.* 2010h), con un fluorómetro modulado PAM. Con los datos se realizaron gráficas a través del uso de la herramienta de tablas dinámicas en excell determinando el promedio en cada rango. Para este caso se obtuvieron las tendencias diarias en el rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II (ϕ PSII) y la tasa de transporte de electrones (ETR) (Figura 3).

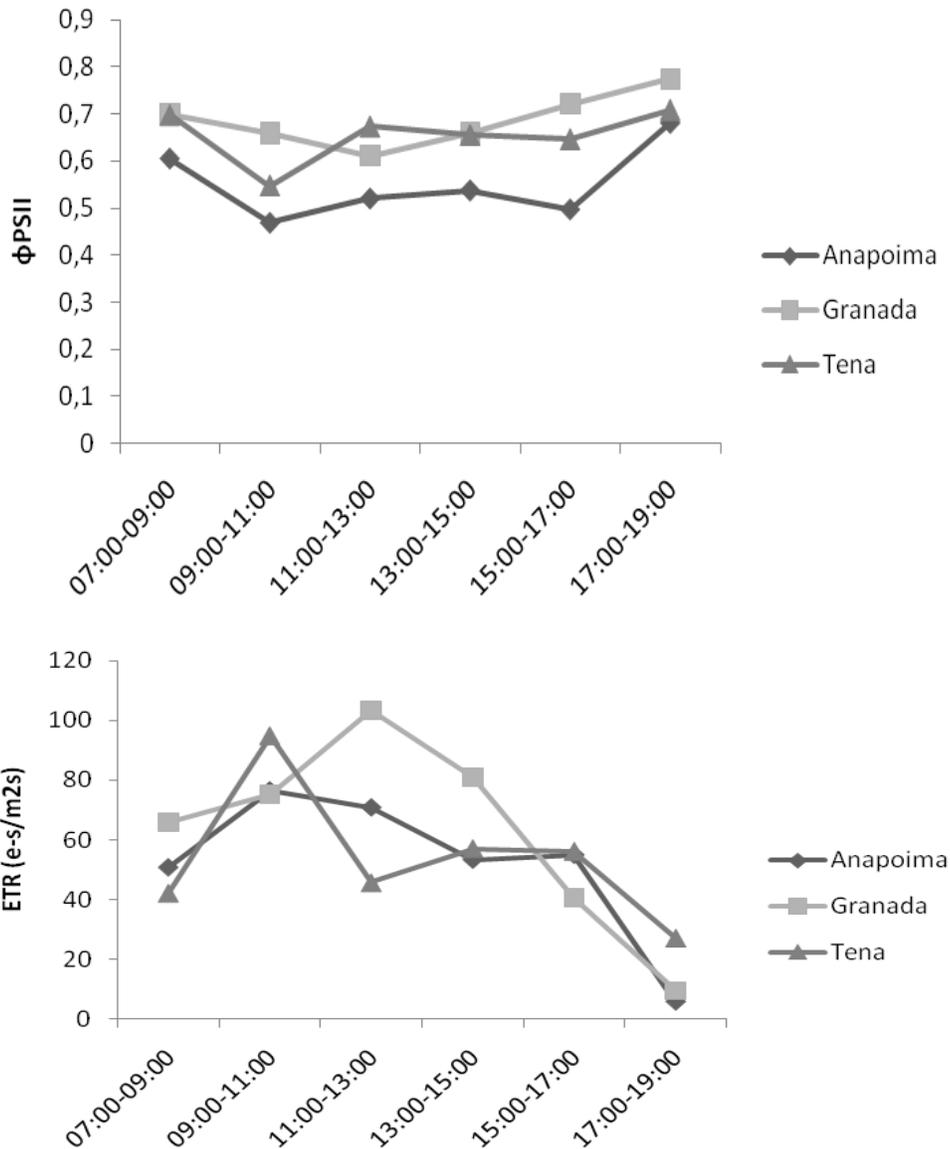


Figura 3. Rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II (ϕ_{PSII}) y tasa de transporte de electrones (ETR) en plantas de *Passiflora edulis* Sims) en estado juvenil, sembradas en Anapoima, Granada y Tena (Cundinamarca). (Melgarejo *et ál.* 2010h. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

Se observa que ϕ_{PSII} es menor en plantas sembradas en Anapoima que en las sembradas en Granada y Tena cuyos valores son similares. Por su parte, la ETR es similar en las plantas medidas en los tres sitios; no obstante, las plantas sembradas en Granada presentan un pico mayor entre las 11:00 y las 15:00. Para analizar los

datos de fluorescencia de la clorofila es importante tener en cuenta la radiación fotosintéticamente activa, PAR; por esto, es útil comparar las tendencias obtenidas en los diferentes parámetros con la tendencia de la PAR durante los días en que se muestrearon las plantas (Figura 4)

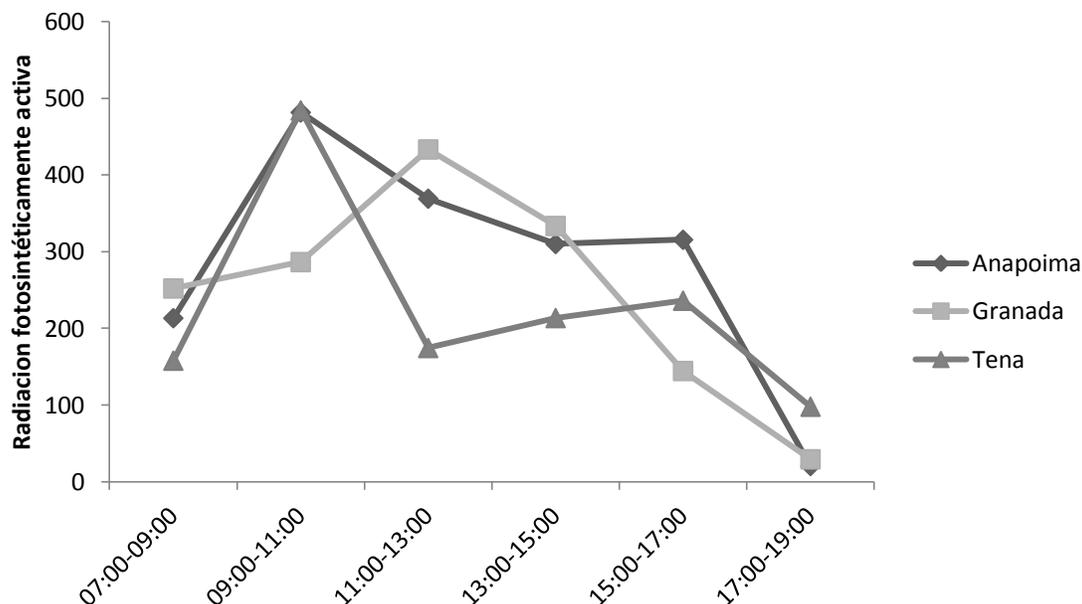


Figura 4. Radiación fotosintéticamente activa en Anapoima, Granada y Tena (Cundinamarca). Agosto de 2009. (Melgarejo *et ál.* 2010h. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

A pesar que los valores de PAR en Granada y Anapoima son similares, el ϕ PSII y la ETR son menores en las plantas sembradas en Anapoima, indicando menor eficiencia en el uso de la luz. Por su parte, la PAR registrada en Tena es muy baja desde las 11:00 h, y a esto se debería el menor valor de ETR encontrado desde este punto de muestreo. La tendencia de ϕ PSII es opuesta a la de la PAR porque a mayor radiación menor cantidad de electrones podrían ser aceptados por los aceptores de electrones en el fotosistema II. Por su parte, la tendencia de la ETR es similar a la de la PAR porque a mayor PAR más cantidad de electrones podrían ser transportados. Esta tendencia no se dio en Anapoima ya que en el pico de PAR de 9:00 a 11:00, la ETR no aumenta, indicando que los electrones se están desviando antes de entrar a la cadena de transporte de electrones y se están disipando por vías alternas, mostrando menor eficiencia en el uso de la luz.

A partir de medidas nocturnas con el fluorómetro se puede obtener el rendimiento cuántico máximo potencial del fotosistema II o eficiencia cuántica fotosintética máxima del fotosistema II, F_v/F_m , que indica el estado del fotosistema II. De la misma manera que con los datos de fluorescencia tomados en el día, los datos de fluorescencia tomados en la noche pueden incluirse en una tabla dinámica y hallar los promedios totales para posteriormente obtener la respectiva gráfica (Figura 5)

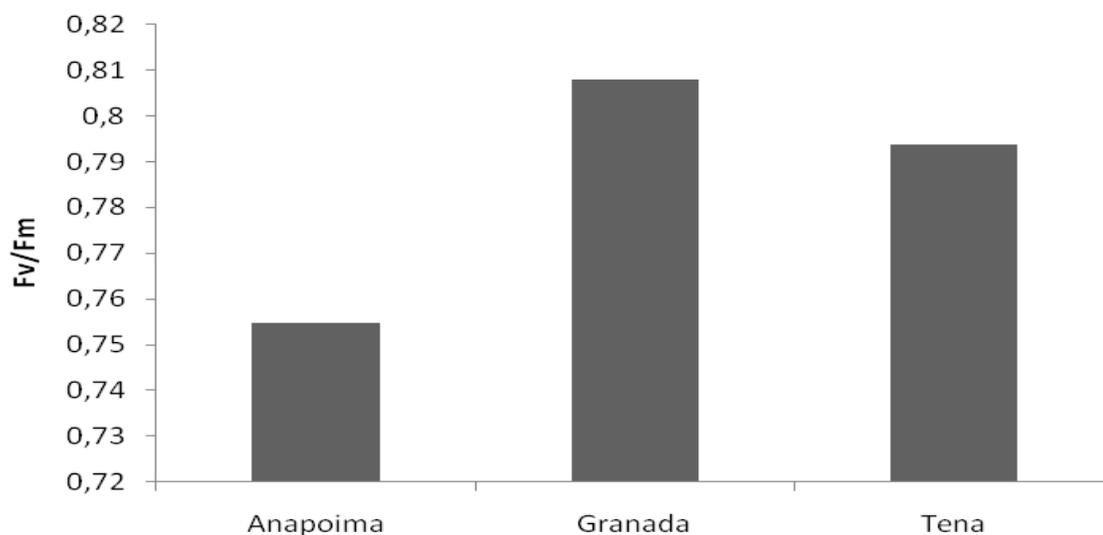


Figura 5. Rendimiento cuántico máximo potencial del fotosistema II, F_v/f_m , en plantas de *Passiflora edulis* Sims) en estado juvenil, sembradas en Anapoima, Granada y Tena (Cundinamarca). (Melgarejo *et ál.* 2010h. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia)

La figura 5 indica que la F_v/F_m es mayor en las plantas de gulupa de Granada, seguida de las de Tena, y por último de las de Anapoima cuyo promedio es considerablemente bajo, indicando estrés por alta radiación o fotoinhibición en las plantas de gulupa crecidas en Anapoima.

Ejemplo caso de estudio

Taller: elaboración de una curva de luz (A/PFD)

A continuación se presenta una serie de datos tomados en campo en *Psidium guajava* (Tabla 3), utilizando un equipo IRGA Licor 6400, y de acuerdo a la metodología indicada anteriormente.

En una hoja de cálculo Excel se organizan los datos en columnas como se observa en la tabla 3. A partir de estos datos se determina el modelo estadístico que mejor se ajuste y que permita explicar la realidad biológica del organismo evaluado, para ello se probarán los siguientes modelos: i) el hiperbólico rectangular o modelo Michaelis Menten (Givnish et ál. 2004); y ii) el de Mitscherlich (Aleric y Kirkman 2005)

Tabla 3. Tasa fotosintética A y Densidad de flujo fotónico PFD. Datos tomados en campo. Especie *Psidium guajava* (Solarte et ál. 2010. Fuente Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia).

Densidad de flujo fotónico PFD ($\mu\text{moles de fotones/m}^2\text{s}$)	Tasa de Fotosíntesis A ($\mu\text{moles CO}_2\text{/m}^2\text{s}$)
1100	11,1
900	11,1
700	11,1
500	10,6
400	9,4
200	6,5
150	5,7
50	2
25	0,6
10	-0,7
0	-1,2

i) El modelo hiperbólico de Michaelis Menten se basa en la ecuación

$$A = \frac{A_{sat} PFD}{K + PFD} - Rd$$

Donde:

A= Fotosíntesis neta

$A_{sat} = a$ = Tasa fotosintética a saturación por luz (Amax)

$K = b$ = Constante de saturación por luz (definida como ½ de la PFD saturante)

$Rd = c$ = Tasa de respiración

$$\text{Pcl (Punto de compensación lumínico)} = \frac{b \times c}{a - c}$$

La pendiente de la porción lineal de la curva de respuesta a la luz (usando los primeros tres o cuatro puntos) se estima usando una regresión lineal, y el rendimiento cuántico (ϕ) es calculado como la pendiente de la regresión lineal.

Pasos para aplicar el modelo hiperbólico de Michaelis Menten:

Para establecer el modelo de la curva A, PFD en campo se pueden usar varios software estadísticos, para el caso de estudio se describen los pasos usando el paquete estadístico Statistix 9,0.

1. Los datos originales son introducidos en una hoja de Excel donde la primera columna es densidad de flujo fotónico fotosintético (PFD) y la segunda es la tasa de fotosíntesis (A) (Nota: para no tener inconveniente al correr el programa, colocar en esta columna la letra P en lugar de A). Tener cuidado de introducir las cifras decimales con puntos y no comas. Antes de copiar los datos para este modelo eliminar el valor cero correspondiente a la última medición de PFD.
2. En el paquete Statistix 9,0 en la página principal pegar la tabla de datos, con esta matriz seleccionar las pestañas *Statistix-non linear models* y luego *non linear regression*.
3. En esta ventana introducir con el icono de flecha las *Dependent Variable* seleccionando tasa de fotosíntesis; seleccionar en la ventana de *Model specification Use specified model* y en el recuadro *nonlinear regression model* digitar la ecuación del modelo hiperbólico: $c+a \times PFD/(b+PFD)$
4. En la ventana *Maximum Iterations* escribir el número 100 en el caso que aparezca un número diferente. Luego en *Parameters*, escribir en *1 la letra a, en 2 la letra b y en 3 la letra c*. Escribir en *Starting value*, el número cero para todos los parámetros.
5. Dar *OK*.
6. En esta ventana verificar que las columnas de *lower* sea de *95% C.i.* y *Upper 95% C.i.*, para los parámetros a y b que no tengan valores negativos,

el parámetro *c* corresponde a la respiración por esto tiene valor negativo; seguidamente revisar que el valor de ***Pseudo R.square*** sea alto >0,85. Con estas consideraciones se obtiene la ecuación respectiva con los valores de la columna ***Parameter***. El parámetro *a* corresponde a la fotosíntesis a saturación por luz o fotosíntesis máxima, el parámetro *b* es la Constante de saturación por luz (definida como ½ de la PFD saturante), y el parámetro *c* corresponde a la tasa de respiración.

- Finalmente puede observar la gráfica ajustada para esto (Figura 6), vaya a ***Results-Plots-fitted curve***; en la ventana que emerge no se debe hacer ningún cambio. Oprimir ***OK***

Los datos que se obtienen luego de haber seguido los anteriores pasos son:

Nonlinear Regression

$$\text{MODEL: } A = c + \frac{A_{max} \times PFD}{b + PFD}$$

Parameter	Estimate	Lower Std Error	Upper 95% C.i.	95% C.i.
a	15,197	0,5753	13,789	16,604
b	154,00	29,937	80,743	227,25
c	-1,6969	0,6955	-3,3987	5,000E-03

Convergence criterion met after 13 iterations.

Residual SS (SSE)	1,0929
Residual MS (MSE)	0,1822
Standard Deviation	0,4268
Degrees of Freedom	6
AICc	-0,9752
Pseudo R-Squared	0,9919

Parameter Correlations

	a	b	c
a	1,0000		

b -0,2118 1,0000
 c -0,6608 0,8458 1,0000

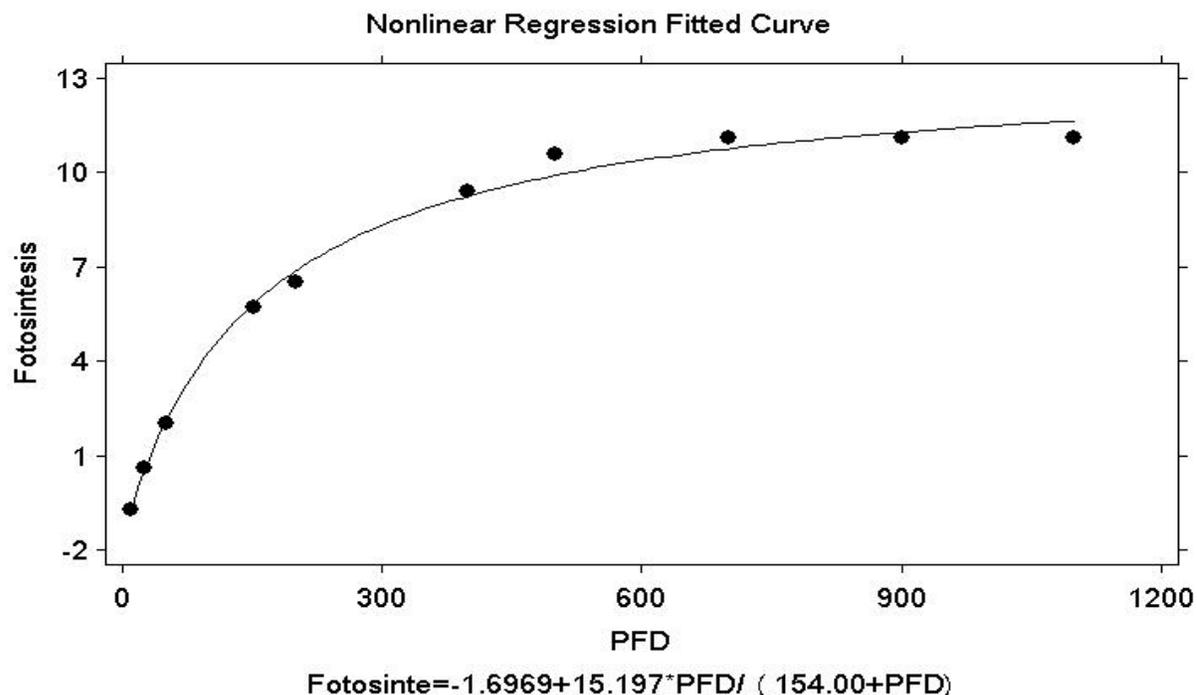


Figura 6. Curva de luz de *Psidium guajava* crecida en Santander, Colombia (Solarte et ál. 2010). Ajuste modelo hiperbólico de Michaelis Menten

Calculo de parámetros

El cálculo de los parámetros fotosíntesis máxima a saturación por luz ($A_{max} = A_{sat}$), constante de saturación K (definida como la mitad o $\frac{1}{2}$ de la PFD saturante) y respiración (R_d) se obtienen a partir de la ecuación del modelo (parámetros a , b , y c). La tasa de respiración se toma como valor absoluto. El punto de compensación lumínico (P_{cl}) se despeja a partir de la ecuación, como se indica abajo.

$$A_{max} = a = 15,197$$

$$K = b = 154$$

$$R_d = c = 1,6969$$

$$P_{cl} \text{ (Punto de compensación lumínico)} = \frac{b \times c}{a - c}$$

$$P_{cl} = \frac{(154) \times (1,6969)}{15,197 - 1,6969} = 15,49$$

De este modelo se concluye que para guayaba la fotosíntesis máxima es de 15,2 $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, el punto de compensación lumínico es de 15,49 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, la constante de saturación (K) es de 154 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y la respiración es de 1,7 $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Parámetros que son típicos de una planta C_3 .

Cálculo de la eficiencia de la fotosíntesis (ϕ)

- I. Para determinar este parámetro copiar de la tabla 3 las últimas cinco filas correspondientes a las tasas fotosintéticas entre 0 (cero) y 150 $\mu\text{moles de fotones/m}^2\text{s}$ (Densidad de flujo fotónico).
- II. En el paquete Statistix 9,0, en la página principal, pegar la tabla de datos. Con esta matriz seleccionar las pestañas *Statistix-linear models* y luego *linear regression*.
- III. En esta ventana introducir con el icono de flecha las *Dependent Variable* seleccionando tasa de fotosíntesis; y PFD en *independent variable*.
- IV. Dar *OK*.
- V. En esta ventana verificar que el valor de **P** para el modelo y la variable PFD sea menor a 0,05 y que el R^2 sea mayor a 0,9. El coeficiente correspondiente a la variable PFD es la pendiente de la línea y corresponde a la eficiencia de la fotosíntesis.
- VI. La eficiencia de la fotosíntesis para este ejemplo es de 0,045 mol $\text{CO}_2/\text{mol de fotones}$.

Least Squares Linear Regression

Predictor

Variables	Coefficient	Std Error	T	P
Constant	-0,84012	0,28938	-2,90	0,0623
PFD	0,045	0,00403	11,18	0,0015

R-Squared	0,9766	Resid. Mean Square (MSE)	0,23894
Adjusted R-Squared	0,9688	Standard Deviation	0,48882

AICc	20,288
PRESS	9,7628

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	29,8712	29,8712	125,01	0,0015
Residual	3	0,7168	0,2389		
Total	4	30,5880			

ii) El modelo Mitscherlich se basa en la ecuación

$$\text{Fotosíntesis (A)} = A_{\max} (1 - e^{-A_{qe}(PFD) - (Pcl)})$$

Donde:

A= Fotosíntesis neta

A_{\max} = Asíntota de la fotosíntesis a alta luz (fotosíntesis máxima)

A_{qe} = Pendiente inicial de la curva (eficiencia de la fotosíntesis (ϕ))

Pcl = Punto de compensación por luz (intercepto en x cuando la fotosíntesis es igual a cero)

Pasos para aplicar el modelo Mitscherlich

- I. Los datos originales (Tabla 3) son introducidos en una hoja de Excel donde la primera columna es densidad de flujo fotónico fotosintético (PFD) y la segunda es la tasa de fotosíntesis (A). Tener cuidado de introducir las cifras decimales con puntos y no con comas.
- II. En el paquete Statistix 9,0 en la página principal pegar la tabla de datos, con esta matriz y seleccionar las pestañas *Statistix-nonlinear models* y luego *non linear regression*.
- III. En esta ventana introducir con el icono de Flecha la *Dependent Variable* seleccionando tasa de fotosíntesis; debe escoger en la ventana *predefined model* el modelo *monomolecular growth: y = a *(1-Exp(-b *(x-c)))*
- IV. No debe modificar ningún otro parámetro y oprimir **OK**
- V. En esta ventana verificar que las columnas de *lower 95% C.i. y Upper 95% C.i*, para todos los parámetros no tengan valores negativos; seguidamente revisar que el valor de *Pseudo R.square* sea alto >0.85.

Con estas consideraciones se obtiene la ecuación respectiva con los valores de la columna **Parameter**. El parámetro **a** corresponde a la fotosíntesis a saturación o fotosíntesis máxima, el parámetro **b** es la pendiente inicial de la curva a bajos niveles de luz (o eficiencia fotosintética) y el parámetro **c** corresponde al punto de compensación lumínica (PCL).

- VI. Finalmente se puede observar la gráfica ajustada (Figura 7), para esto, ir a **Results-Plots-fitted curve**; en la ventana que aparece no se requiere hacer ningún cambio y oprimir **OK**

Los datos que se obtienen luego de haber seguido los anteriores pasos son:

Nonlinear Regression

MODEL: Fotosinte = a*(1-Exp(-b*(PFD-c)))

Parameter	Estimate	Lower Std Error	Upper 95% C.i.	95% C.i.
a	11,259	0,1601	10,890	11,628
b	5,130E-03	2,624E-04	4,525E-03	5,735E-03
c	17,887	2,2341	12,735	23,039

Convergence criterion met after 19 iterations.

Residual SS (SSE)	0,5359
Residual MS (MSE)	0,0670
Standard Deviation	0,2588
Degrees of Freedom	8
AICc	-18,571
Pseudo R-Squared	0,9979

Parameter Correlations

	a	b	c
a	1,0000		
b	-0,6914	1,0000	
c	-0,0548	0,2389	1,0000

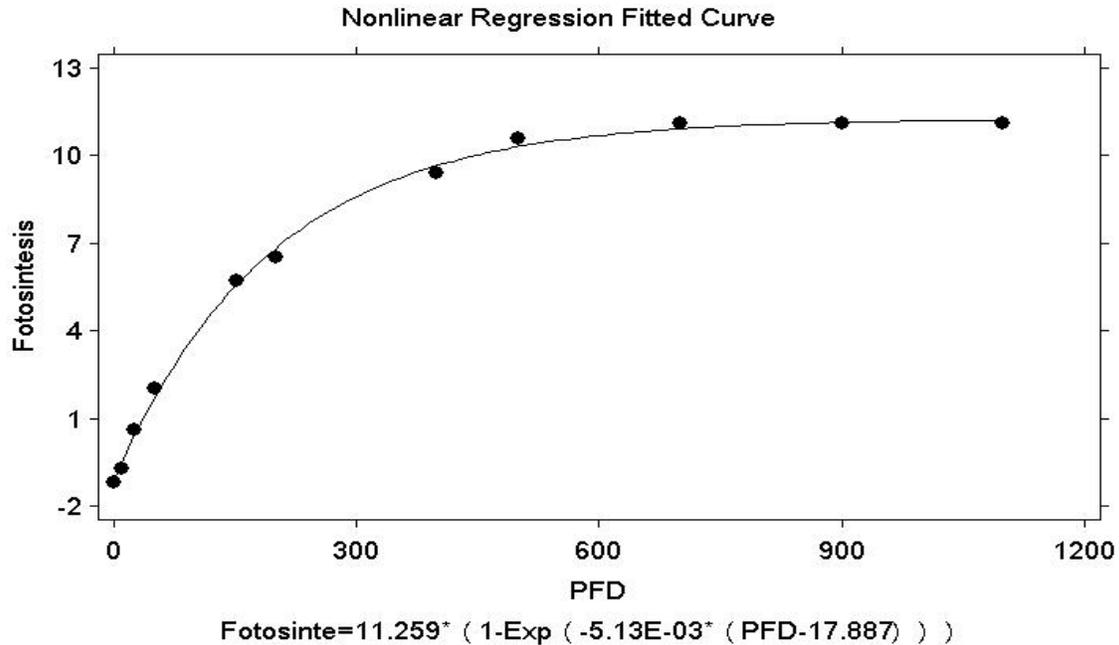


Figura 7. Curva de luz de *Psidium guajava* crecida en Santander, Colombia (Solarte et ál. 2010). Ajuste modelo Mitscherlich

Calculo de parámetros

El cálculo de los parámetros fotosíntesis máxima (A_{max}), eficiencia fotosintética y punto de compensación lumínica (P_{cl}) se resuelven de acuerdo a los parámetros a , b y c del modelo, como se muestra a continuación:

$$A_{max} = a = 11,259$$

$$P_{cl} = c = 17,887$$

$$\varphi = b = 5,13 \text{ 0E} - 03$$

De este modelo se concluye que para guayaba la fotosíntesis máxima es de 11,3 $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, el punto de compensación lumínico es de 17,9 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y la eficiencia fotosintética es de 0,00513

Teniendo en cuenta lo anterior presentar en una tabla el resumen de los parámetros obtenidos en cada modelo, comparar, analizar y discutir sobre estas diferencias, presentar los gráficos correspondientes a la curva de luz y obtener conclusiones sobre la efectividad de los modelos utilizados.

IX. FISIOLÓGÍA POSCOSECHA

María Soledad Hernández^{1,2}, Jaime Barrera¹, Luz Marina Melgarejo¹

Marco conceptual

La madurez es un proceso irreversible que ocurre en los frutos y en algunos vegetales o verduras. Las manifestaciones de la madurez pueden ser identificadas y asociadas al proceso de la recolección, para lo cual se establecen índices de recolección, los cuales pueden ser utilizados en manejos para mitigar o retrasar la senescencia.

La madurez es un proceso fisiológico y bioquímico, que está bajo control genético y hormonal, es un proceso que está acompañado por múltiples cambios a nivel celular, más que por un aumento de tamaño (Wills *et ál.* 1998; Seymour *et ál.* 1993). La etapa de maduración requiere de la síntesis de nuevas proteínas y ARNm, así como de nuevos pigmentos y componentes de sabor; procesos que requieren de energía y esqueletos carbonados, los cuales son proporcionados mediante el proceso de la respiración (Seymour *et ál.* 1993).

De acuerdo con el patrón respiratorio y la síntesis de etileno en una etapa temprana de la madurez, los frutos han sido clasificados en dos categorías: climatéricos o no climatéricos (Kuntz *et ál.* 1998, Seymour *et ál.* 1993).

¹ Contribución por igual en la preparación de este tema

² Autor para correspondencia: mshernandez@unal.edu.co

Rhodes (1980), citado por Herrero y Guardia (1991), define la crisis climatérica como un período de evolución de ciertos frutos en el que se sucede una serie de cambios bioquímicos que se inician con la producción autocatalítica del etileno, marcando el paso del crecimiento hacia la senescencia, presentando un aumento de la respiración, que conducen a la maduración. En los frutos tropicales como guayaba (*Psidium guajava*), araza (*Eugenia stipitata*), copoazu (*Theobroma grandiflorum*), gulupa y cholupa (*Passiflora edulis*) se encuentra que hay crisis climatérica al inicio de la maduración; sin embargo, en otros casos como el camu camu (*Myrciaria dubia*), la cocona (*Solanum* spp) y algunas variedades de ají (*Capsicum* spp), la maduración no se encuentra acompañada de crisis climatérica (Bardales *et ál.* 2008; Hernández *et ál.* 2007; Barrera *et ál.* 2008; Jiménez *et ál.* 2008)

Seymour *et ál.* (1993) y Wills *et ál.* (1998) mencionan que los frutos no climatéricos muestran un descenso gradual en su respiración, mientras que los frutos climatéricos presentan un pico respiratorio durante la maduración (Figura 1). Otra definición indica que los frutos no climatéricos son los que no presentan maduración extensiva después de ser cosechados y cuyo patrón de respiración podría cambiar lentamente después de esto (Salveit 1993; Villavicencio *et ál.* 2001). El término climatérico inicialmente implicó solamente frutos con respiración incrementada, pero la producción de etileno, junto con la producción de CO₂, es ahora aceptada como un criterio para identificar frutos climatéricos. Para algunos autores el climaterio debe estar acompañado por un ascenso no sólo de la respiración sino además de la producción de etileno (Tadesse *et ál.* 2002); otros autores clasifican los frutos como climatéricos con sólo presentar un aumento del etileno durante el “ripening”, sin necesidad del ascenso respiratorio (Salveit 1993). Adicionalmente, los frutos climatéricos deben responder a la aplicación exógena de etileno en la etapa de maduración, sintetizándolo autocatalíticamente. Normalmente los frutos climatéricos se recolectan antes de la subida climatérica, mientras que los frutos no climatéricos maduran en la planta y contienen una menor proporción de almidón (Herrero y Guardia 1991).

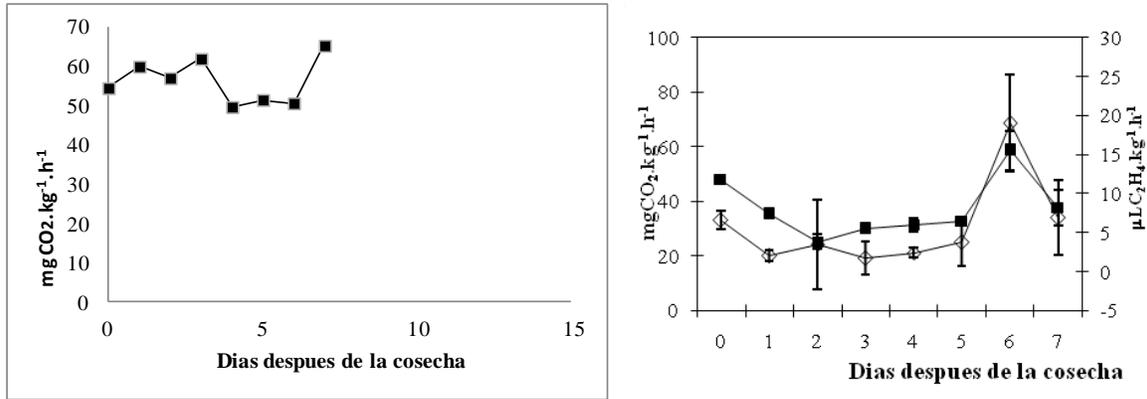


Figura 1. Intensidad respiratoria (Cuadros) y etileno (Rombos) en frutos de cocona (*Solanum* sp) no climatérico (Izquierda), y arazá (*Eugenia stipitata*) climatérico (Derecha) durante la maduración a 20°C. Fuente: Ruiz *et ál.* 2010; Hernández *et ál.* 2009).

Etileno, hormona de la maduración

En las plantas la hormona etileno (C₂H₄) desempeña un papel importante en el proceso de maduración de frutos climatéricos. Parámetros tales como el reblandecimiento de la pulpa (Haji *et ál.* 2003; Hiwasa *et ál.* 2003), el cambio de color (Flores *et ál.* 2002), y la producción de volátiles (aroma) dependen en gran medida de la producción de C₂H₄ (Rupasinghe *et ál.* 2000; Alexander y Grierson 2002; Flores *et ál.* 2002).

El etileno tiene, entre otras, la característica de aumentar la actividad metabólica de los frutos, acelerando su maduración y senescencia. El etileno aun en bajas concentraciones tiene efectos marcados sobre los frutos, especialmente en los climatéricos, de forma tal que aumenta su tasa respiratoria y ayuda a la degradación de la clorofila. En algunos casos, es necesario el uso suplementario de este compuesto para uniformizar el color, la maduración de un producto o mejorar su presentación.

Los efectos negativos o positivos del etileno dependen del producto; en hortalizas de hoja puede ser nocivo, puesto que si se degrada la clorofila toman una tonalidad amarillenta que no es adecuada, en flores acelera la caída de los pétalos y en algunas frutas ayuda a desarrollar el color característico de las mismas. Así mismo, existen diferentes niveles en la producción de etileno como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de especies hortícolas de acuerdo a la producción de etileno

Clase	Rango a 20°C ($\mu\text{L de C}_2\text{H}_4/\text{Kg}^*\text{hr}$)	Especie
Muy bajo	Menor a 0,1	Alcachofa, uva, espárrago, coliflor, cereza, fresa, granada, cítricos, raíces, papa, la mayoría de flores de corte, ají, cocona
Bajo	0,1 - 1,0	Mora, arándano, melón, cocombro, oliva, pimienta, pina, tamarindo, papa criolla
Moderado	1,0-10,0	Banano, guayaba, higo, melón Honeydew, mango, lychhee, plátano, tomate, copoazu
Alto	10,0-100,0	Manzana, albaricoque, melón cantaloupe, feijoa, kiwi, nectarin, papaya, durazno, pera, ciruela, araza, uchuva
Muy alto	Mayor de 100,0	Chirimoya, maracuyá, zapote, gulupa, cholupa

Fuente: Kader 1994; Hernández *et ál.* 2007; Hernández *et ál.* 2009; Ruiz *et ál.* 2010

Las condiciones óptimas cuando se desea tratar productos hortifrutícolas para acelerar la maduración, son: temperatura entre 18 y 25 °C, humedad relativa entre 90 y 95%, concentración de etileno entre 10 y 100 ppm, duración del tratamiento de 24 a 72 horas (dependiendo del tipo de fruta y el estado de madurez), una circulación del aire suficiente para garantizar la distribución del etileno dentro del cuarto de maduración y una ventilación que permita un adecuado intercambio del aire para evitar la acumulación del CO₂, el cual reduce los efectos del etileno (Kader 1994).

Debido a que el etileno comercial es tóxico, se deben tener las siguientes precauciones: Evitar el contacto directo con el etileno comercial, no permitir fuentes de fuego (personas fumando o chispas) en el cuarto de maduración o cerca de los dispensadores, usar un sistema seguro para medir el gas y para inyectarlo en las cámaras, asegurarse de eliminar el peligro de cargas electrostáticas y almacenar los cilindros o dispensadores de acuerdo a las instrucciones del proveedor o en su defecto de acuerdo a los estándares de la National Board of Fire Underwrites de los Estados Unidos. De igual manera, las instalaciones eléctricas deben cumplir los

estándares internacionales de seguridad. Se sugiere tener detectores de etileno con alarma para concentraciones altas y peligrosas.

Cambios químicos durante el desarrollo y maduración de frutos

En cuanto a los carbohidratos, hay una alteración durante la etapa de maduración, ya que se presenta un aumento en el contenido de azúcares, bien por la degradación casi total de las reservas amiláceas en frutos climatéricos, o por la degradación de los productos de la fotosíntesis en frutos no climatéricos. Esta transformación conduce a cambios en el sabor, la textura y la consistencia del fruto. El cambio en la consistencia se da principalmente por la degradación de pectinas y hemicelulosas (Wills *et ál.* 1998; Seymour *et ál.* 1993).

A medida que avanza la maduración, los ácidos orgánicos son respirados o convertidos en azúcares, disminuyendo su contenido. Ácidos como el málico, succínico y cítrico, se encuentran con frecuencia en la mayoría de los frutos (Seymour *et ál.* 1993). Sin embargo, la concentración de ácidos orgánicos no siempre decrece con la maduración en todos los frutos. En banano hay un significativo incremento en la concentración de ácido málico y un descenso en el pH (Kays 1997; Wills *et ál.* 1998). Es evidente que el balance entre síntesis y consumo de ácidos orgánicos durante la maduración depende directamente de las características metabólicas de la especie. La modificación del contenido de ácidos orgánicos es de gran importancia a nivel bioquímico, ya que el pH condiciona la actividad de un gran número de enzimas responsables de los sucesos claves (ablandamiento, color, entre otros) asociados a la maduración.

Manejo poscosecha

Los frutos y verduras, en general, productos hortifrutícolas son cosechados cuando alcanzan el estado de desarrollo apropiado para el mercado y el consumidor final. La recolección genera estrés o lo que es lo mismo una tensión en el producto, que desencadena incrementos en la respiración, maduración acelerada y muerte del producto de manera rápida. La tecnología de poscosecha es aplicada para disminuir el incremento en el metabolismo de los productos cosechados. Para ello se emplean

diferentes tratamientos que incluyen preferiblemente el uso de baja temperatura, preenfriamiento, atmósferas modificadas, retardantes de maduración, ceras y películas comestibles entre otras que contribuyen a hacer lentos los cambios asociados con la senescencia del producto hortícola.

Preenfriamiento

Un incremento en la temperatura de los productos hortícolas recién cosechados (calor de campo) se genera como resultado de las acciones de recolección, acopio y transporte hasta la central de distribución. Cuando sea posible, conviene eliminar mediante un proceso de pre-refrigeración el calor de campo, hasta obtener la temperatura de almacenamiento y la humedad relativa recomendadas para mantener la calidad de las frutas y hortalizas. En general, altas temperaturas deterioran la calidad de la mayoría de los productos durante estos primeros eslabones de la cadena. La pre-refrigeración alarga la duración del producto al reducir: el calor del campo; la tasa de respiración y el calor generado por el producto; la velocidad de maduración; la deshidratación; la producción de etileno y la pudrición.

La pre-refrigeración será exitosa siempre y cuando el tiempo entre la cosecha y la operación sea corto, y se tengan en cuenta: el contenedor para el transporte, la temperatura inicial del producto, la velocidad o cantidad de aire frío, agua o hielo suministrados. Se requiere, así mismo, que el agua o el aire sean limpios a fin de evitar la contaminación del producto tratado. La cadena de frío no debe interrumpirse en ninguna etapa.

Almacenamiento de productos perecederos

La producción mundial de frutas está dominada por los cítricos, las uvas, las bananas, las frutas de pepita (principalmente manzanas) y las frutas de hueso. De las especies de origen tropical de mayor importancia en los mercados mundiales se pueden destacar el aguacate, la papaya, el mango y la piña.

Paull (1994) y Nakasone y Paull (1998) afirman que la fisiología de las frutas tropicales no difiere de la fisiología de los frutos de clima templado y subtropical, por lo que se pueden implementar tecnologías ya probadas y conocidas en ellos. Sin embargo, es posible encontrar diferencias en la velocidad de maduración y en la

senescencia, y en algunos casos en el orden cronológico de los eventos que ocurren en el proceso de maduración. Las diferencias más relevantes que Paull (1990) anota entre los frutos tropicales y los de clima templado son, entre otras, la mayor velocidad de maduración de los frutos de tipo climatérico.

Existe una brecha considerable entre la tecnología desarrollada para frutos de los países desarrollados y climas templados, y los frutos de los países en desarrollo y de origen tropical. Las pérdidas postcosecha en estos últimos pueden superar el 50%.

La refrigeración es el método de conservación para frutas y hortalizas más empleado; sin embargo, su implementación requiere de conocimiento previo de la fisiología del producto a fin de no generar daños irreversibles.

Conservación de frutas a bajas temperaturas

La maduración de los frutos ocurre en un estrecho rango de temperatura. A temperaturas inferiores a la temperatura crítica se interrumpe el proceso de maduración. Similarmente, a temperaturas superiores a 35°C no se presentan cambios de color característico y en frutos de tipo climatérico no se presenta el alza climatérica. La maduración normal de los frutos y hortalizas se produce entre los 10 y 25°C (Rhodes 1980; Thompson 1996).

La vida útil de los frutos durante la poscosecha puede ser aumentada mediante tratamientos como la refrigeración. Disminuir la temperatura contribuye a controlar la síntesis de etileno, que es la hormona encargada de regular la síntesis de las enzimas hidrolíticas que degradan la lamela media de la pared celular, las clorofilasas y amilasas; en consecuencia, se prolonga la vida de poscosecha del producto (Alique y Zamorano 2000).

La temperatura es un factor decisivo en la actividad respiratoria en particular, y en el metabolismo, en general. Una disminución de 10°C trae consigo una reducción en la velocidad de las reacciones a aproximadamente la mitad (Wills *et ál.* 1998). El objetivo de conservar los productos de origen vegetal, regulando el metabolismo durante la poscosecha es prolongar su vida útil, así como procurar el suministro

permanente de éstos productos y con ello la satisfacción de un mercado en constante demanda, con lo cual se consolidan las cadenas de comercialización (Marangoni *et ál.* 1996; Alique y Zamorano 2000).

En los frutos climatéricos la regulación de la maduración puede lograrse con mayor éxito y por tanto optimizar su comercialización. Éstos pueden ser recolectados de manera anticipada, consiguiendo así, una mejor regulación de la maduración. En éstos, se reduce tanto la hidrólisis de almidón como el consumo de azúcares monosacáridos glucosa y fructosa y se mantienen los ácidos orgánicos, aunque en frutos tropicales se ha encontrado que éstos pueden llegar a aumentar (Thompson 1996; Alique y Zamorano 2000).

Daño por frío

El frío causa daños fisiológicos permanentes en tejidos, células y órganos de las plantas sensibles a temperaturas por debajo de la temperatura crítica. Lyons y Breidenbach (1987) afirman que los factores que determinan la magnitud del daño por frío son la temperatura, la duración de la exposición a la baja temperatura, la exposición continua o intermitente y la edad fisiológica del órgano. Wang (1994) afirma que el estrés por frío está influenciado por la temperatura de campo durante la precosecha y que el daño por frío puede iniciarse desde que el fruto es sometido a la baja temperatura, aun desde la precosecha.

La hipótesis más reciente del desarrollo del daño por frío afirma que se produce en dos etapas, en la primera hay una modificación física de la membrana celular, la cual pierde su fluidez y se torna rígida, solidificada y gelatinosa (Wang 1983; Marangoni *et ál.* 1996). Las membranas de los organelos y el citoplasma se modifican y permiten la salida de iones y de compuestos orgánicos; la descompartimentalización a nivel celular conduce a la liberación de enzimas, las cuales reunidas con los sustratos aceleran la velocidad de senescencia (Marangoni *et ál.* 1996). Parkin *et ál.* (1989) mencionan que las bajas temperaturas inducen cambios en las enzimas solubles, la actividad de la fenil amonio liasa aumenta, mientras que las actividades

de la superóxido dismutasa y la catalasa disminuyen, facilitando la acumulación de compuestos cuyos niveles pueden resultar tóxicos. En la segunda etapa, se da la separación de la membrana plasmática (Thompson 1996) y tienen lugar las manifestaciones externas asociadas al cambio de la conformación de membranas dentro de las que se destacan la estimulación a la producción de etileno, incrementos en la tasa de respiración y aumento del gasto de energía.

Reducción del daño por frío

Wang (1983) afirma que un objetivo primordial en referencia al daño por frío es encontrar métodos efectivos de reducción o de retraso de la aparición de la lesión. Las técnicas pueden ser agrupadas en acondicionamiento a la temperatura, calentamientos intermitentes, pretratamientos térmicos, atmósferas controladas o modificadas, tratamientos químicos como el calcio, aceites minerales o vegetales y algunos fungicidas, encerado, películas de recubrimiento y empaque. Las atmósferas controladas o modificadas cambian la composición gaseosa, los primeros modifican el ambiente de almacenamiento, mientras que los otros son tratamientos que se aplican directamente sobre el fruto.

Atmósferas modificadas

El O₂ y el CO₂ son moléculas fundamentales en el metabolismo primario y secundario de frutas y hortalizas. Su influencia radica en la modificación del comportamiento de la planta que se traduce en la prolongación de la vida comercial. Los bajos niveles de O₂ retardan la respiración y el metabolismo de carbohidratos, y los altos niveles de CO₂ empleados en la atmósfera de almacenamiento actúan eficientemente en retardar los mecanismos dependientes de la síntesis de etileno, como la degradación de la pared celular y los cambios de color. En especies como manzana y pera la degradación de ácidos orgánicos se reduce en condiciones de atmósfera modificada o controlada, dicha reducción puede ser explicada como un incremento en la fijación del CO₂, reducción de la respiración y un menor consumo de los mismos (Beaudry 1999; Hernández *et ál.* 2000; Castro *et ál.* 2009).

Beaudry (1999) agrupa los efectos de la manipulación del O₂ y el CO₂ en efectos sobre la producción de etileno, efectos sobre el metabolismo primario y efectos

sobre el metabolismo secundario. En el primer caso, el aumento de la presión parcial del CO₂ y la disminución de la presión parcial de O₂ disminuyen la respuesta del etileno; si la presión parcial del O₂ disminuye a 2,8 kPa o si la del CO₂ aumenta hasta 1,55 kPa el etileno se inhibe, con lo cual se puede afirmar que la modificación de la atmósfera retrasa el proceso de maduración en frutos climatéricos, no sólo porque disminuye la actividad respiratoria, sino porque se disminuye la acción del etileno.

En cuanto al metabolismo primario, Beaudry (1999) anota que el primer efecto es la reducción de la respiración y la disminución de la actividad de algunas enzimas como la piruvato kinasa que cataliza el paso final de la glicólisis. Si la presión parcial de O₂ se reduce a niveles menores de 2 kPa, disminuyen la disponibilidad de esqueletos de carbono y la energía para la síntesis de proteínas, induciéndose la fermentación. Dicha condición puede agravarse si las presiones parciales de CO₂ alcanzan niveles de 20 kPa; aún con concentraciones de 5 kPa de CO₂ se ha encontrado que se disminuye la utilización de azúcares.

La disminución de O₂ y el aumento de CO₂ en la generación de las atmósferas modificadas afectan tres procesos del metabolismo secundario, como son el metabolismo de pigmentos, el de fenoles y el de compuestos volátiles. En general, la degradación de la clorofila, el pardeamiento por acción de la polifenoloxidasas y la síntesis de compuestos volátiles disminuyen con la baja de la presión parcial de O₂ (Mathooko 1996).

La atmósfera modificada se logra envasando órganos vegetales en una película de polímero plástico de dimensiones reducidas, relativamente permeable a los gases del aire (O₂, CO₂, N₂, Vapor de H₂O y C₂H₄) y provista de un cierre hermético. Es un método complementario del frío y su principal efecto es la reducción de la intensidad respiratoria, retrasando la aparición del climaterio, o en algunos casos, desapareciendo el pico climatérico (Kader 1986; 1992). En la figura 2 se muestra la evolución del O₂ y CO₂ de una fruta tropical bajo las condiciones de atmósfera modificada empacada en dos tipos de polietileno de baja densidad (LDPE) de calibres 2 y 3 de densidad.

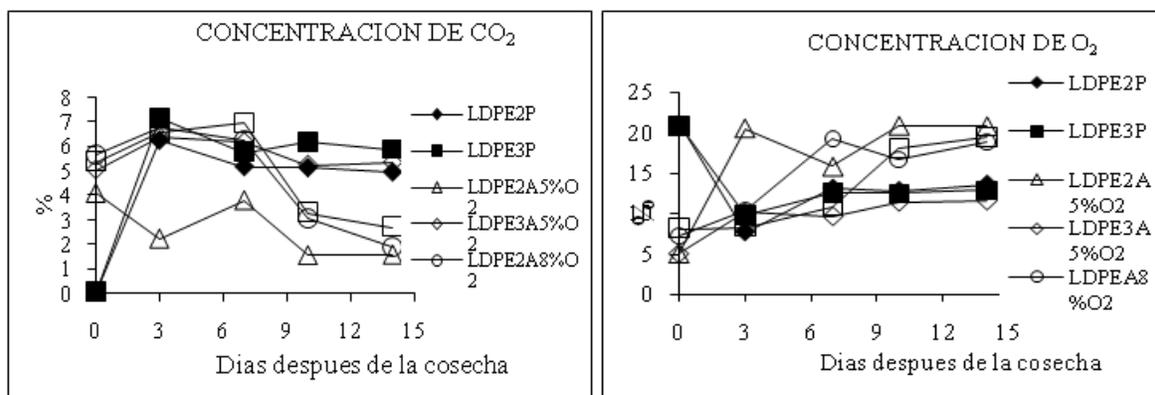


Figura 2. Evolución del O₂ y CO₂ durante el empacado de frutos de arazá en atmósferas modificadas pasivas y activas. Uso de polietilenos de calibre (LDPE) 2 y 3 (Hernández *et ál.* 2000). Las atmósferas activas se alcanzaron inyectando en las bolsas gases Mapax™ de la empresa Agafano, Bogotá, con 5 y 8% de O₂ previamente preparadas. En las atmósferas pasivas, el cambio en el CO₂ y O₂ se dieron como resultado de la respiración del fruto.

Fase experimental

Ensayo 1. Preenfriamiento de productos hortifrutícolas

*Material*es

Material biológico: Productos de diferente naturaleza, como hojas, frutos y algunas flores comestibles

Otros materiales: Tinas con hielo, tinas con agua, bolsas para conservación de muestras extraídas, toallas absorbentes

Equipos: Termocuplas, termómetros, pH metro, refractómetro

Metodología

Seleccionar productos recién cosechados, sanos y sin pudriciones. Dividir en dos grupos los frutos, uno se preenfriará con agua helada (tratamiento 1) y el otro con hielo (tratamiento 2).

Para el tratamiento 1, verter grandes cantidades de agua helada sobre los productos colocados en depósitos, recipientes o contenedores plásticos simulando las condiciones para transporte a granel. Para el tratamiento 2, en el envase colocar

hielo triturado en cada uno de los contenedores de productos. Para algunas operaciones se utilizan contenedores a granel.

El seguimiento de la temperatura se hará con las termocuplas insertadas hasta el centro de al menos cinco frutos por cada uno de los tratamientos. Terminado el tratamiento el cual se llevará a cabo hasta que el centro del producto alcance la temperatura deseada, almacenar los productos en condiciones de refrigeración y determinar el efecto del preenfriamiento tras tres y siete días, con el fin de evaluar los efectos de los dos métodos sobre las siguientes variables de respuesta: Pérdida de peso, cambio de color medido con el colorímetro Hunter lab, pH, °Brix, acidez total titulable, ácidos orgánicos, vitamina C, azúcares reductores, azúcares totales, presencia de microorganismos, presencia de daños por frío.

Ensayo 2. Operaciones de selección, clasificación, lavado y desinfección de productos hortifrutícolas

Materiales

Material biológico: Hortalizas y frutas desde central de abastos o detallistas de diferente naturaleza y origen.

Otros materiales: Tabla de colores y anillos de clasificación, mesas de clasificación y mesones, norma técnica colombiana NTC para los productos seleccionados (web site del ICONTEC).

Reactivos: hipoclorito comercial

Equipos: Calibradores o nonios, colorímetro Hunter lab, balanza

Metodología

Realizar los siguientes pasos:

Recepción de frutos y hortalizas en centro de acopio. Los productos son recibidos en el centro de acopio, generalmente llegan a granel en canastas de plástico de capacidades variables entre 10 y 25 kilos. Realizar la recepción el mismo día de la recolección o en algunos casos transcurridas 12 horas después de la cosecha. Los productos pueden tener cambios de temperatura mientras son transportados, dependiendo de la distancia del centro de consumo.

Pesaje de la materia prima. Es una operación indispensable una vez que el producto es recibido en el centro de acopio, y con el fin de conocer las pérdidas. Una vez que

el producto sea pesado, en balanzas de capacidad apropiada proceder a realizar operaciones de acondicionamiento.

Operación de Selección. Separar las unidades buenas de aquellas que se encuentran dañadas. Identificar los principales daños que se presentan en el producto los cuales pueden clasificarse en daños mecánicos (cortaduras, golpes), daños biológicos (daños por insectos, daños por hongos y levaduras, pudriciones). Para los daños biológicos clasificar en leves (si el porcentaje de incidencia es menor al 10% en la totalidad de los frutos), o en graves (si la incidencia se encuentra entre el 10 y el 25% de la totalidad de los frutos).

Operaciones de clasificación. La clasificación es la operación que agrupa el producto en categorías, puede ser por grado de madurez o por calidad. Inicialmente realizar por métodos visuales, o en el caso de categorías por peso o talla, para ello utilizar balanza y anillos de clasificación. En el caso de hacer la clasificación por coloración utilizar el colorímetro Hunter lab. La muestra para llevar a cabo la clasificación por medio de estos métodos corresponderá al 10% de la muestra recibida. Separar por grupos afines para ello, pesar los nuevos grupos, identificar el % de pérdida e indicar los rendimientos.

Operación de lavado y desinfección. Esta operación busca retirar impurezas del producto, tierra, microorganismos, residuos de productos de síntesis utilizados durante la etapa de precosecha. Realizar con agua clorada o químicamente pura.

Para la desinfección de productos con vocación de orgánicos y/o amigables con el ambiente se recomienda el uso de hipoclorito de sodio, el cual está registrado dentro de la legislación para productos orgánicos, para ello preparar una solución de 8 mL de hipoclorito comercial por cada 10 L de agua, durante 10 minutos, posteriormente lavar con agua pura.

Ensayo 3. Índices de recolección

Materiales

Material biológico: frutos y vegetales que presenten maduración de diferentes grados de madurez

Otros materiales: Erlermeyers, bureta, coladores

Reactivos: Solución NaOH 0,1 N valorada

Equipos: Extractor de jugo, pH metro, refractómetro, balanza, texturómetro Effegi, colorímetro Hunter lab, titulador, calibrador

Metodología

Evaluar material de algunas especies hortifrutícolas y ornamentales, en lo posible con por lo menos dos grados de desarrollo en el caso de foliáceas, y dos grados de madurez en el caso de frutas. Identificar previamente los métodos y protocolos más apropiados para realizar una caracterización del estado de desarrollo, el grado de madurez y la calidad en general del producto recibido.

Se sugieren inicialmente los siguientes métodos:

i) Visual. Clasificar los frutos de acuerdo con el avance en el cambio de color en 3 grupos preferiblemente verde-maduro, pintón y maduro. De no encontrarse 3 grados de madurez, clasificar la muestra en dos grados de madurez, pintón y maduro.

ii) Físicos. Determinar el peso, longitud, diámetro (con calibrador), y color. Este último medirlo con las cartas de color y con el colorímetro Hunter Lab, con el fin de establecer una comparación. Para la medición de color seleccionar tres unidades en tres estados sucesivos de maduración y realizar dos mediciones en cada una de las unidades.

Para determinar la firmeza del fruto medir con un penetrómetro, el cual indica la resistencia que opone la fruta a ser perforada, dicha resistencia será equivalente a la fuerza que debe ejercerse con el equipo, que se hará realizando una fuerza en sentido perpendicular sobre la fruta. Realizar el ensayo sobre dos puntos del mismo fruto y en dos frutos de cada estado de madurez.

Para el caso de verduras de hoja, realizar las pruebas de elasticidad con ayuda de un texturómetro. Todas las medidas de las propiedades físicas realizarlas con un mínimo de tres repeticiones.

iii) Fisiológicos. El método de mayor confiabilidad y precisión es la medición de la respiración y la producción de etileno, en los estados de desarrollo identificados, por cromatografía de gases. Determinar la actividad respiratoria (AR) según el método estático (Kader, 1994) en tres individuos. Cerrar las cámaras con los frutos individuales por 30 minutos a 20°C. Inyectar una muestra de 1 mL del espacio de cabeza en un cromatógrafo de gases HP 4890 (Avondale, PA, USA), las respuestas se recibirán en un integrador 3395. Los patrones de calibración a utilizar deben ser

certificados. Determinar la concentración de etileno empleando condiciones semejantes y utilizando el detector de ionización de llama.

iv) Químicos. Determinar pH, acidez total titulable (ATT), °Brix (sólidos solubles), y la relación de madurez °Brix/ATT, que es una medida que indica el avance de la madurez en los frutos.

Sólidos solubles. Extraer el jugo de la fruta, en forma manual o con la licuadora y efectuar las lecturas en el refractómetro ABBE (2 lecturas para cada estado).

pH. Extraer jugo de las muestras de cada grado de madurez y realizar la lectura con el pHmetro

Acidez titulable. Titular 5 mL de jugo con NaOH 0,1N en presencia de fenolftaleína o hasta un pH de 8,2, punto de viraje del indicador de fenolftaleína. Calcular la acidez expresada como porcentaje del ácido predominante en 100 g de producto según:

$$\% \text{ ácido predominante} = \frac{A \times B \times C}{D} \times 100$$

Donde:

A=Volumen gastado del hidróxido de sodio en mL

B=Normalidad del hidróxido de sodio (NaOH)

C= Peso del equivalente expresado en gramos de ácido predominante del fruto

D= peso en gramos de la muestra titulada

Ácidos orgánicos y azúcares. Congelar tres bolsas de tejido de los diferentes productos, en dos estados sucesivos de madurez. Cada bolsa conteniendo 10 g con el fin de hacer determinación de ácidos orgánicos y azúcares por HPLC.

Relación de madurez.

$$RM = \frac{\text{Sólidos Solubles (Brix)}}{\% \text{ ácido predominante}}$$

Calcular los valores promedio de los parámetros evaluados en los individuos caracterizados, según su grado de madurez.

Ensayo 4. Maduración de frutos

Materiales

Material biológico: frutos de las especies curuba (*Passiflora mollissima*) o tomate (*Lycopersicon esculentum*), considerados frutos climatéricos, e higo (*Ficus carica*) o mandarina (*Citrus reticulata*) considerados no climatéricos. Los frutos deberán ser adquiridos en al menos tres estados de madurez (Verde-Pintón-Maduro)

Otros materiales: bureta, Erlenmeyer, cámaras herméticas con dispositivo para inyectar jeringa de 1mL

Reactivos: solución de hipoclorito de sodio 200 ppm, solución de NaOH 0,1 N, agua destilada.

Equipos: Cromatógrafo de gases, penetrómetro, potenciómetro, balanza de precisión, colorímetro, refractómetro.

Metodología

Lavar por inmersión los frutos de cada especie en la solución de hipoclorito 200 ppm durante tres minutos, enjuagar con agua limpia para lavar el exceso de cloro y secar los frutos con papel absorbente.

Separar en tres grupos cada especie de fruta de acuerdo al estado de madurez (Verde-Pintón-Maduro). Confirmar al menos la existencia de un número no inferior a 12 frutos por cada grupo y por cada especie. Separar tres frutos de cada grupo para la evaluación de la intensidad respiratoria y la emisión de etileno en el cromatógrafo de gases, color por medio del colorímetro y pérdida de peso por balanza de precisión.

Determinar la intensidad respiratoria y la emisión de etileno de los frutos mediante el método de atmósfera confinada propuesto por Hernández *et ál.* (2007), el cual consiste en la introducción de cada uno de los frutos previamente pesados en cámaras herméticas, durante un período de una hora, posteriormente tomar una muestra de 10mL de gases e inyectarla en un cromatógrafo acoplado con un software de adquisición de datos. La intensidad respiratoria de los frutos se reporta como dióxido de carbono producido por unidad de volumen y tiempo, mL CO₂/kg.h (Kader 1994).

Los otros 9 frutos serán utilizados para seguimiento químico. Almacenar en bolsas microperforadas a 20°C, tomando tres frutos por vez cada tres días hasta completar 9 días. A cada fruto muestreado determinarle penetrometría con el penetrómetro,

acidez total titulable mediante titulación con NaOH 0,1 N, sólidos solubles mediante refractometría y pH con el potenciómetro.

Determinar Acidez Total Titulable (ATT) con base en lo propuesto en la norma técnica colombiana 440. Titular 5 gramos de la fruta previamente homogenizada y diluida con 50mL de agua destilada. El punto final de titulación se determina por el viraje a color rosa del indicador fenolftaleína, adicionado en solución etanólica al 1%, 2 gotas de éste a la fruta homogeneizada y diluída. La titulación se realiza con hidróxido de sodio 0,1N. La acidez titulable se calcula como peso en gramos del ácido predominante por cada 100g de fruta, mediante la ecuación indicada en el ensayo 3:

Determinar la acidez iónica según el protocolo propuesto en la NTC 440, utilizando un potenciómetro con electrodo de vidrio a 20°C sobre la pulpa de la fruta. El resultado se expresa en unidades de pH.

Registrar los sólidos solubles mediante lectura refractométrica directa del jugo de la fruta a 20°C, en un refractómetro portátil con escala de 0 – 32 brix. Cuando la lectura se realice a una temperatura diferente a 20°C se aplica el factor de corrección correspondiente (NTC 440).

Determinar el color de los frutos con el uso de un espectro-colorímetro portátil, previamente calibrado mediante una trampa de color y un estándar blanco (Iluminante D65, Observador 2). Medir el color en dos puntos opuestos de la franja ecuatorial de cada réplica y reportar el resultado para cada réplica como promedio del valor encontrado para los dos puntos (Tadesse *et ál.* 2002; Hernández *et ál.* 2007).

Graficar los valores medios obtenidos de las tres réplicas contra una escala de tiempo, para cada especie. Analizar y concluir.

Ensayo 5. Uso del etileno como acelerador de la madurez

Material

Material biológico: productos no maduros para analizar, y productos con alta producción de etileno

Otros materiales: Bala de gas etileno a 100 ppm, cámara hermética, canastillas, bolsas de polietileno calibre 2 perforadas en un 20%, bureta graduada, carta de colores

Reactivos: Solución de NaOH 0,1 N valorada, hipoclorito de sodio de 200ppm

Equipos: Penetrómetro, refractómetro, potenciómetro, cromatógrafo de gases, balanza de precisión, cronómetro, 2 cámaras de almacenamiento de igual volumen y características, Colorímetro Hunter lab

Metodología

Disponer 50 frutos que se encuentren en estado de maduración temprano o productos climatéricos en madurez fisiológica.

Seleccionar, lavar los frutos con agua potable, desinfectar con solución de hipoclorito de sodio de 200ppm, secarlos usando aire o toallas absorbentes. Tomar una muestra de mínimo tres frutos y evaluar directamente las características fisicoquímicas (°Brix, respiración, acidez, pH, color, dureza y apariencia). Registrar los datos de los diferentes parámetros.

Disponer una muestra para análisis de textura inicial con texturómetro, color por colorimetría, azúcares y vitamina C por cromatografía líquida de alta precisión.

Dividir la muestra en dos grupos de 25 frutos cada uno, uno de ellos constituirá el testigo, y el otro será tratado con etileno. Colocar el producto testigo en bolsas de polietileno perforadas, tres frutos por bolsa, para permitir el intercambio de gases y evitar la deshidratación. Las bolsas que se utilizan son de polietileno de baja densidad calibre 2 (LDPE) de capacidad para 500 g. Con ello se asegura que el espacio de cabeza es dos veces el espacio ocupado por el producto

Colocar el producto a tratar con etileno en las cámaras de vidrio de 2245 mL de capacidad, que permiten generar atmósfera confinada. Dicha cámara dispone de una entrada conectada a una manguera de látex, en la cual se llevarán a cabo las inyecciones del gas etileno de concentración conocida. Disponer de una fuente de concentración de 50 ppm de etileno e inyectar 20 jeringas de 10mL para el tratamiento. La inyección se llevará a cabo al inicio del tratamiento y 24 horas después se repetirá nuevamente, tras un aireamiento del producto. Realizar evaluaciones periódicas dos veces por semana de las variables fisicoquímicas y la apariencia del producto. Registrar los datos. Evaluar el cambio de color con colorímetro.

Registrar el tipo de daños que se presenten durante el almacenamiento y su evolución en porcentaje.

Ensayo 6. Almacenamiento de productos frescos, temperatura crítica y atmósfera modificada

Materiales

Material biológico: frutas sanas y en grado de madurez fisiológico, en *ripening* o en madurez comercial, acondicionadas debidamente, esto es con grado de madurez homogéneo y sin daños.

Otros materiales: bolsas de polietileno de calibres 1 y 2, toallas desechables, cuchillos, tablas de picar

Reactivos: hipoclorito de sodio 200 ppm

Equipos: Cámara refrigerada, balanzas, pHmetro, titulador, refractómetro, penetrómetro de reloj o de varilla.

Metodología

Determinación de temperatura crítica de almacenamiento. Los frutos previamente acondicionados, se lavan con agua, se desinfectan con hipoclorito de sodio 200 ppm, se enjuagan y secan. Distribuir los frutos (tres tratamientos, con tres repeticiones), en cantidades exactamente iguales entre las dos temperaturas de refrigeración y la temperatura control. Tratar los frutos a granel a temperatura de $10\pm 1^{\circ}\text{C}$, a temperatura inferior entre 6 y $8^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, y a temperatura de maduración a 20°C , que se constituye en el control absoluto. Realizar seguimiento periódico dos veces por semana, de los cambios en peso, pH, °Brix, % de Acidez Total Titulable, ácidos orgánicos, vitamina C y azúcares. Bajo este modelo determinar la sensibilidad del fruto a las bajas temperaturas y la velocidad de maduración en condiciones control a 20°C .

Uso de atmósferas modificadas pasivas. Los frutos previamente acondicionados y secos distribuirlos en bolsas de polietileno de dos calibres y bolsas microperforadas. Empacar frutos de madurez homogénea en las bolsas, de manera aleatoria y manteniendo un mismo número de réplicas, a fin de generar tres tratamientos: atmósferas con bolsa de polietileno calibre 1, atmósfera con bolsa de polietileno calibre 2, y una bolsa microperforada que constituye una simulación de condición control. Estos tres tratamientos con sus tres repeticiones, distribuirlos en las temperaturas previamente indicadas.

Determinar las variables antes mencionadas y la evolución de gases O_2 y CO_2 con medidor de gases o cromatografía de gases, según se disponga, con el fin de

establecer la estabilidad de las atmósferas en las condiciones de atmósfera y temperatura.

Uso de atmósferas modificadas activas. Se procederá de la misma manera que en el ensayo previo, esto es acondicionar los frutos bajo las operaciones previas de lavado, desinfección, enjuague, secado y selección por sanidad. Distribuir en las bolsas de los calibres mencionados en el ensayo previo, guardar una proporción en la bolsa de espacio libre de dos partes frente a una parte ocupada por el producto. Planificar los ensayos para que se disponga de tres repeticiones para cada una de las fechas de evaluación (cuatro fechas de evaluación que corresponderá a dos semanas por lo menos). En total son por lo menos 12 bolsas de la misma condición y tres más para evaluar la calidad del producto. Una vez preparadas las unidades en sus respectivas bolsas, hasta completar un número de 15 bolsas por tratamiento, inyectar con la campana de empacado HENKOVAK (Noruega) una mezcla del gas Mapax® certificada.

Distribuir las bolsas debidamente selladas en las tres condiciones de temperatura, realizar seguimiento a la estabilidad de las atmósferas y evaluar los parámetros fisicoquímicos de los ensayos previamente descritos.

Para cada uno de los ensayos calcular la pérdida de peso diario en % durante el tiempo de almacenamiento. Realizar análisis estadístico de los parámetros evaluados para identificar diferencias entre las fechas evaluadas. Establecer pruebas de comparación múltiple para determinar entre cuáles tratamientos hay diferencias. Graficar los resultados de pH, °Brix, % de Acidez Total Titulable, ácidos orgánicos, vitamina C y azúcares. Graficar la evolución de los gases O₂ y CO₂ en las condiciones de atmósfera tanto pasiva como activa (inyectada). Interpretar los resultados alcanzados, sustentar las respuestas a partir de las variables de respuesta analizadas.

X. PRUEBAS BIOQUÍMICAS COMO HERRAMIENTAS PARA ESTUDIOS EN FISIOLOGÍA

Leonardo Moreno¹, Sandra Crespo¹, Walter Pérez¹ y Luz Marina Melgarejo^{1,2}

Respuesta bioquímica al estrés. azúcares, prolina y sistema antioxidante

Marco conceptual

Azúcares y prolina:

Los azúcares y la prolina son osmolitos compatibles que disminuyen el potencial osmótico de la célula (Gomes *et ál.* 2010). Los osmolitos compatibles son compuestos orgánicos altamente solubles que no poseen carga a pH fisiológico y que se almacenan en altas concentraciones dentro de las células sin ser tóxicos; entre sus funciones se reporta que disminuyen el ψ_s de la célula, estabilizan proteínas y membranas, cumplen funciones de osmoprotección, entre otros.

Los azúcares o hidratos de carbono cumplen funciones muy complejas y desempeñan un papel vital para los sistemas vivos; además de funcionar como osmolitos, como reserva de energía y como parte de la estructura molecular, son importantes por su uso en un sinnúmero de procesos metabólicos como transporte y señalización, entre muchos otros (Dewick 2002). Se han reportado varios procesos bioquímicos y moleculares (Koch *et ál.* 1995) que se ven afectados por procesos como la disminución del contenido de azúcares en la fotosíntesis, este es el caso del

¹Contribución por igual en la preparación de este tema.

²Autor para correspondencia: lmelgarejom@unal.edu.co

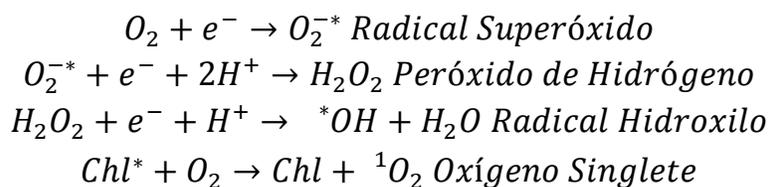
rompimiento y movilización del almidón, el metabolismo de lípidos, el metabolismo de sacarosa y manitol; y por el aumento del contenido de azúcares en la biosíntesis del almidón y los polisacáridos, los pigmentos, los mecanismos de defensa y el metabolismo de sacarosa. Bajo ciertas condiciones ambientales que favorecen el desbalance hídrico se ven afectados los niveles de azúcares; por ejemplo, en estrés por patógenos (Hare *et ál.* 1998; Moller *et ál.* 2007), en estrés oxidativo (Shen *et ál.* 1997; Hare *et ál.* 1998; Moller *et ál.* 2007), en estrés hídrico (Hare *et ál.* 1998; Moller *et ál.* 2007; Hessini *et ál.* 2009) y en estrés salino (Shen *et ál.* 1997; Hajlaoui *et ál.* 2010), entre otros.

Por otra parte, la prolina es un iminoácido que se encuentra en las plantas en cantidades muy pequeñas, en condiciones adecuadas para el desarrollo y crecimiento. Bajo algunas tensiones, se ha reportado que el contenido de prolina libre puede aumentar con el fin de proteger a la planta contra algunos tipos de estrés. Se ha propuesto, que la prolina participa con múltiples funciones y que está relacionada con la expresión de genes de tolerancia de las plantas a diferentes condiciones de estrés, actuando como osmorregulador (Kavi Kishor *et ál.* 1995; Toshiba *et ál.* 1997), estabilizador de proteínas y membranas, inductor de genes relacionados con estrés osmótico (Iyer y Caplan 1998), fuente de carbono y nitrógeno fácilmente disponible en la rehidratación celular (Brugière *et ál.* 1999), fuente de equivalentes de reducción (del catabolismo de prolina) para sostener la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP durante la recuperación del estrés (Hare y Cress 1997; Hare *et ál.* 1998). También existe evidencia de su función en el control de la acidosis del citosol y en la regulación de la relación NADH/NAD⁺ a valores compatibles con el metabolismo (Hare y Cress 1997); en la detoxificación del exceso de NH₄⁺ y en eventos de estrés oxidativo (Ramanjulu y Sudharkar 2000; Moller *et ál.* 2007). Muchas especies de plantas acumulan prolina libre en respuesta a la salinidad (Jiménez-Bremont *et ál.* 2006), deficiencia hídrica (Avendaño *et ál.* 2005) y frío (Konstantinova *et ál.* 2002).

Sistema antioxidante

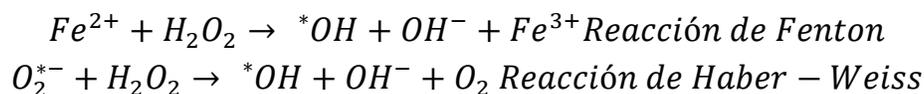
El O₂ es una molécula relativamente estable que puede generar especies mucho más reactivas por transferencia de electrones (anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo), o por alteración del estado del espín (oxígeno

singlete). Estos compuestos químicos son denominados especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son moléculas con moderada o elevada reactividad química que se producen como parte del metabolismo celular y que tienen la capacidad de dañar una variedad de biomoléculas de la célula (Sweetlove y Moller 2009). Sin embargo, actualmente se les está considerando como moléculas señal para el crecimiento y desarrollo de la planta (D'Autréaux y Toledano 2007; Brosché *et ál.* 2010). El oxígeno se convierte en ROS por reacciones de reducción univalente, y por reacciones de dismutación del radical superóxido.



Reacciones de producción de ROS. Reacciones de reducción univalente

Las ROS actúan como intermediarios en muchos procesos metabólicos (Naqui y Chance 1986) y para su control natural existen diversos mecanismos que permiten conservar a la célula en un estado redox equilibrado acorde al estadio metabólico. Cuando se incrementa el contenido de ROS, por alguna tensión biótica o abiótica, las ROS entran en un proceso de ceder la energía ganada para restablecer su estado basal. En este proceso reaccionan con un gran número de moléculas (Moller *et ál.* 2007), generando un desbalance en el estado redox de la célula el cual es a su vez contrarrestado por la activación de diversos mecanismos de defensa. En general, existen dos tipos de mecanismos de respuesta ante estos estados redox alterados: el sistema no enzimático (ácido ascórbico, polifenoles, chalconas, tocoferoles, antocianinas, carotenoides, glutatión, entre otros), y el sistema enzimático (catalasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, entre otras).



Reacciones de dismutación del radical superóxido. Alternativa de producción de ROS

El sistema enzimático antioxidante para el control de especies reactivas de oxígeno es el conjunto de enzimas que en común tienen la utilización de alguna ROS como sustrato o cofactor y que al final produce especies no reactivas o reactivas en una menor proporción, regulándose de esta forma la cadena incontrolada de oxidación. Dentro del sistema enzimático antioxidante se han identificado dos grandes grupos, cada uno relacionado con familias de genes (Kliebenstein *et ál.* 1998; Tognolli *et ál.* 2002; Rodríguez *et ál.* 2003; Dietz 2003; Mittler *et ál.* 2004; Vandenabeele *et ál.* 2004):

i) Enzimas que usan H_2O_2 como sustrato o cofactor, las cuales son capaces de remover/neutralizar de forma directa el H_2O_2 : Ascorbato Peroxidasas APX, Catalasas CAT, Glutatión Peroxidasa GPOD, Peroxiredoxinas PRX, Peroxidasas POD tipo III.

ii) Enzimas que usan otras especies reactivas de oxígeno como sustrato o cofactor: superóxido dismutasa SOD y glutatión reductasa GR.

Algunas de las propiedades de las enzimas relacionadas con estos procesos neutralizadores son:

Catalasas (CAT): Encargadas de descomponer el peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua, no requiere un sustrato que se reduzca para lograrlo. Existen tres grandes grupos de catalasas (Nicholls *et ál.* 2001): monofuncionales, bifuncionales (catalasa/peroxidasa), mono y bifuncionales sin grupo hemo-Mn.

Su reacción catalítica se lleva a cabo en dos pasos, en un primer paso una ferri-catalasa es oxidada por una primera molécula de H_2O_2 resultando en un intermediario I, formado por la adición de un electrón al Fe (III) que genera un grupo oxoferril $Fe(IV)=O$ y la adición de otro electrón en el centro porfirínico formándose un radical π -catiónico. En un segundo paso, una segunda molécula de H_2O_2 dona otro par de electrones para reducir el intermediario I, con lo cual la ferri-catalasa es regenerada y se produce oxígeno y agua. Por otra vía, el intermediario I, al ser también un antioxidante fuerte, puede reaccionar con otros donores de electrones (polifenoles, polioles, etc.) que se encuentren en la célula y que compiten con el H_2O_2 , que de forma similar logra regenerar la ferri-catalasa. Las catalasas se

localizan en peroxisomas de forma mayoritaria y en menor proporción en mitocondria (Smirnoff 2005; Carpena *et ál.* 2003).

Peroxidasas (POD)

Las peroxidasas son una serie de metaloenzimas de tipo oxido-reductasa que tienen un átomo de Fe^{3+} coordinado con dos átomos de nitrógeno de anillos pirrólicos de residuos de histidina. Se localiza en el citoplasma de forma soluble y en la pared celular mediante enlaces iónicos o covalentes (Grisom y Pilet 1984). El Fe^{3+} cambia de estado de oxidación a Fe^{2+} como consecuencia de la reducción del H_2O_2 formando un catión (oxo fenil protofirina), que en el siguiente paso es reducido aceptando un electrón de una molécula donora de hidrógenos (Smith *et ál.* 2002).

Ciclo enzimático ascorbato peroxidasa-glutati3n reductasa o ciclo de Halliwell-Asada: Tiene lugar en el cloroplasto, la matriz mitocondrial y el citosol. Es el encargado de regular en gran parte el estado redox del cloroplasto (Alscher *et ál.* 2002; Tausz *et ál.* 2004). En el cloroplasto el exceso de energía se disipa para la formación de oxígeno singlete en el fotosistema II (PSII) y en la donación de electrones al fotosistema I (PSI) el cual los distribuye entre la fotorrespiración y el oxígeno molecular presente, el último trae consigo la formación del radical superóxido el cual por disminución de pH o por acción de la superoxido dismutasa (SOD) dismuta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este peróxido es a su vez usado por la ascorbato peroxidasa (APX) para oxidar el ascorbato (Asc) a dehidroascorbato DHAsc. El DHAsc es a su vez usado junto con el glutati3n reducido GSH por la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) para producir glutati3n oxidado GSSG, el cual es reducido por la acción de la glutati3n reductasa (GR) que oxida el NADPH para producir NADP (Asada 1999; Teixeira *et ál.* 2005).

Superóxido dismutasas SODs: Constituyen la primera línea de defensa de las plantas contra el radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$. Este radical se presenta en todos los organelos celulares donde tenga lugar una cadena de transporte de electrones, incluyendo: mitocondria, cloroplastos, microsomas, glicosomas, peroxisomas, apoplasto y citosol. Es una metaloenzima que convierte el radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . El proceso de dismutación es promovido por un i3n metálico (Cu, Mn o Fe) en el sitio catalítico.

Fase experimental

Con el fin de implementar algunos parámetros bioquímicos como herramientas en el estudio de la fisiología en plantas, se presentan la adecuación y normalización de protocolos que se han realizado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia en las especies: *Espeletia corymbosa* (Bayona *et ál.* 2005), *Senecio niveo aureus* (Alvarez *et ál.* 2006), *Racomitrium crispipilum* (Barón *et ál.* 2009), *Theobroma grandiflorum* (Copoazú) y *Eugenia stipitata* (Arazá) (Barrera *et ál.* 2009), *Myrcianthes leucoxylla*, *Abatia parviflora*, *Alnus acuminata* (Aliso), y *Cedrela montana* (cedro) (Melgarejo *et ál.* 2010c), *Elaeis guineensis* (Palma de aceite) (Melgarejo *et ál.* 2010e), *Psidium guajava* (Guayaba) (Melgarejo *et ál.* 2010a), *Rhizophora mangle* (mangle rojo) y *Avicennia germinans* (mangle negro) (Melgarejo *et ál.* 2010d), *Passiflora edulis* (gulupa) (Melgarejo *et ál.* 2010f,g), entre otros. Las metodologías se han probado en los tejidos: hoja, tallo y raíz de varias de las especies mencionadas, y pueden ser utilizados en otras plantas de interés. A continuación se presentan una serie de ensayos en los que se reporta como ejemplo de datos y de cálculos los obtenidos en extracción a partir de hojas de *Gmelina arborea* (Melgarejo *et ál.* 2010b)

Ensayo 1. Determinación del contenido de azúcares totales mediante el método de Dubois *et ál.* (1956)

La metodología consiste en la extracción con agua destilada de los azúcares solubles, y su posterior cuantificación mediante el método de Dubois *et ál.* (1956). El principio de la determinación propone la formación de furfural (aldosas) y de 5-hidroximetilfurfural (cetosas) en medio fuertemente ácido y deshidratante, condición proporcionada por el ácido sulfúrico. El derivado formado entra en procesos de protonación/desprotonación debido al medio fuertemente ácido y es reconocido por el fenol en exceso, presente en el medio, formándose compuestos de color amarillo/café que se pueden leer a 490nm. Sólo los azúcares o compuestos que forman este tipo de derivados de furfural pueden ser determinados con esta técnica.

Mecanismo de Reacción. En presencia de medio ácido el oxígeno carbonílico, presente como aldehído o cetona, es protonado por ser la base más fuerte del medio, después de lo cual suceden una serie de re-arreglos electrónicos que terminan con el

ataque de los electrones del hidroxilo del carbono 5 al carbono 2 deficiente de carga, formando un heterociclo de cinco átomos. En el caso de las pentosas se produce furfural y en el caso de las hexosas 5-hidroximetilfurfural. Durante el proceso se da la pérdida de agua, debido al medio fuertemente ácido (Dubois *et ál.* 1956). El furfural o el 5-hidroximetilfurfural formado posee carácter básico en su oxígeno formílico, que en medio ácido se protona generando un carbocatión que reacciona con el fenol presente en el medio formando un compuesto resonante que absorbe a 490nm.

Materiales

Material biológico: tejido del material a analizar

Otros materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL, tubos de reacción tipo eppendorf de 2,0 mL, juego de micropipetas de rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L, puntas para micropipetas de rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L, vasos de precipitados, celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico para espectrofotómetro, gradilla para tubos de 15 mL y de 2,0 mL, espátula, mortero, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas o máscara antigases), toallas de papel absorbente.

Equipos: Agitador horizontal, centrífuga, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, cabina de extracción, agitador tipo vórtex, potenciómetro, tanque para transporte de nitrógeno líquido.

Reactivos grado analítico y preparación de soluciones:

Nitrógeno líquido (se debe transportar en el tanque respectivo y manipularse con el equipo de protección adecuado).

Ácido sulfúrico concentrado > 98% (se debe contar con un ácido destilado, incoloro, que no presente sólidos en suspensión). Fenol 80 %: Pesar 8,0 g de fenol en un frasco ámbar de 25mL, disolver el fenol en agua agitando fuertemente y completar a 10 mL con agua destilada. Se forma una emulsión lechosa que debe agitarse antes de usar. Se requiere preparar cada día de uso.

Patrón de calibración: Pesar 0,0250 g de D-glucosa, disolver con 10 mL de agua destilada y luego aforar a 25mL con agua destilada (Glucosa= 1,0 mg/mL). Anotar en el cuaderno de laboratorio la cantidad exacta pesada. Almacenar la solución en un tubo falcon debidamente rotulado y en nevera a 4 °C.

Metodología

Curva de calibración: Utilizar como patrón la solución de D-glucosa de aproximadamente 1,00 mg/mL previamente preparada (Registrar en el cuaderno de laboratorio la cantidad exacta pesada). Realizar las respectivas mezclas de reacción (por triplicado) indicadas en la tabla 1, teniendo en cuenta las siguientes indicaciones: En un tubo de reacción de 2,0 mL agregar el volumen respectivo de agua destilada y las diferentes cantidades de patrón con ayuda de micropipeta, hasta expulsión completa del volumen del patrón. Posteriormente, en cabina de extracción y con el equipo de protección adecuado, agregar 200 μ L de fenol 80%, recién preparado y agitado. Posteriormente, adicionar 1,0 mL (1000 μ L) de ácido sulfúrico concentrado, para ello sumergir la punta con el ácido sin tocar las paredes del tubo y expulsarlo completamente. Agitar fuertemente con vórtex por un minuto. Tener cuidado debido a que la reacción es altamente exotérmica. Dejar enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad, el compuesto que se forma es estable por 36 horas. Leer absorbancia a 490 nm contra el blanco de reactivos, el cual debe prepararse al mismo tiempo que la curva de calibración y que corresponde al primer tubo de la tabla 1. Elaborar la gráfica: azúcar total (mg/mL o μ g/ μ L) Vs. A_{Promedio} 490 nm.

Tabla 1. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración para azúcares solubles totales por el método de Dubois *et ál.* (1956). Glc= glucosa.

Agua destilada (μ L)	Volumen Patrón Glc (μ L)	Fenol 80% (p/v) (μ L)	H ₂ SO ₄ > 98% (μ L)
210	0	200	1000
205	5	200	1000
200	10	200	1000
195	15	200	1000
190	20	200	1000
185	25	200	1000
180	30	200	1000

Preparación de muestras: Las muestras son el tejido de interés a analizar. Para el caso, macerar hojas frescas sin nervaduras con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino y conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Procesamiento de muestras: Pesar aproximadamente 100,0 mg de material vegetal fresco (Registrar en el cuaderno de laboratorio la cantidad exacta pesada). Colocar la masa de material vegetal en un tubo de reacción de 15 mL. La extracción se debe realizar por triplicado. Agregar a cada tubo 5,0 mL de agua destilada y agitar fuertemente a temperatura ambiente en agitador horizontal por 60 minutos. Luego centrifugar a 6000 rpm durante 30 minutos a 12 ± 2 °C. Separar el sobrenadante (extracto) del sedimento.

En un tubo de reacción de 2,0 mL mezclar 180 μ L de agua destilada y 30 μ L del extracto, la determinación se debe realizar por triplicado. Sobre cada mezcla, en cabina de extracción y con el equipo de protección adecuado adicionar 200 μ L de fenol 80% recién preparado y agitado. Posteriormente adicionar 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, para ello sumergir la punta hasta la mitad del volumen que esté presente en el tubo de reacción, sin tocar las paredes del tubo, y expulsarlo completamente. Agitar fuertemente con vórtex por 1 minuto y tener cuidado debido a que la reacción es altamente exotérmica. Dejar enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad, el compuesto que se forma es estable por 36 horas. Leer absorbancia a 490nm. El blanco de la determinación es: 210 μ L de agua destilada, 200 μ L de fenol 80 % (p/v) y 1,0 mL de ácido sulfúrico >98%, el cual debe prepararse al mismo tiempo que las muestras, se recomienda realizar blanco cada 30 lecturas. Interpolar directamente en la curva de calibración, pues se conserva el mismo volumen de reacción y las mismas cantidades de reactivos. Si las muestras registran absorbancias que no se encuentran dentro de la curva de calibración, se debe diluir con una solución de agua:ácido sulfúrico concentrado (v:v 0,41:1). De cada dilución realizar triplicado. Calcular el contenido de azúcares totales solubles detectables por esta metodología. El contenido se expresa: Azúcares totales/Material vegetal fresco (μ g /mg) referidos al patrón.

Ejemplo de cálculos relacionado con la preparación de la curva de calibración:

Para la elaboración de la curva de calibración, primero se calcula el contenido de glucosa presente en cada tubo (Tabla 2), tal y como se presenta a continuación:

Por ejemplo, si se partió de un patrón de glucosa de 1,01 mg/mL o μ g/ μ L, para encontrar la cantidad de glucosa que se adiciona a cada tubo de la curva, se multiplica la concentración 1,01 μ g/ μ L por el volumen respectivo del patrón

aplicado, de esta forma se encuentra la masa de glucosa (μg). En el caso donde se aplican $10,00\mu\text{L}$ se tiene que:

$$1,01 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \times 10,00\mu\text{L} = 10,1 \mu\text{g Glucosa}$$

Para encontrar la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de glucosa en el medio de reacción, se divide la cantidad encontrada (μg) por el volumen total de reacción ($1410 \mu\text{L}$):

$$\frac{10,1 \mu\text{g}}{1410 \mu\text{L}} = 7,16 \times 10^{-3} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$$

Luego se realiza el promedio de las absorbancias leídas a 490 nm y se grafica (Figura 1) concentración de glucosa ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (eje X), contra $A_{\text{Promedio } 490\text{nm}}$ (eje Y). Se debe obtener una línea recta con un coeficiente de correlación adecuado ($> 0,98$), cuando las muestras se interpolen en la curva de calibración se deben obtener resultados con %CV menor al 10% y % error estándar menor al 5% , estos se calculan como sigue:

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

$$\% \text{ error estándar} = \frac{S}{\sqrt{n}} \times 100$$

Donde %CV es el coeficiente de variación, S es la desviación estándar, \bar{X} es el valor promedio de las réplicas medidas y n es el número de réplicas.

Tabla 2. Curva de calibración para azúcares totales. Glc= glucosa, RX= reacción, A= absorbancia

Volumen Stock Glc (μL)	Masa de Glc en Rx (μg)	Concentración de Glc en RX ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	$A_1 490 \text{ nm}$	$A_2 490 \text{ nm}$	$A_3 490 \text{ nm}$	A Promedio 490 nm
0,0	0,0	0,00	0,009	0,025	0,016	0,017
10,0	10,1	$7,16 \times 10^{-3}$	0,320	0,325	0,303	0,316
15,0	16,2	$1,07 \times 10^{-2}$	0,531	0,542	0,510	0,528
20,0	21,6	$1,43 \times 10^{-2}$	0,824	0,839	0,810	0,824
25,0	27,0	$1,79 \times 10^{-2}$	1,008	1,019	1,004	1,010
30,0	32,4	$2,15 \times 10^{-2}$	1,267	1,254	1,293	1,271

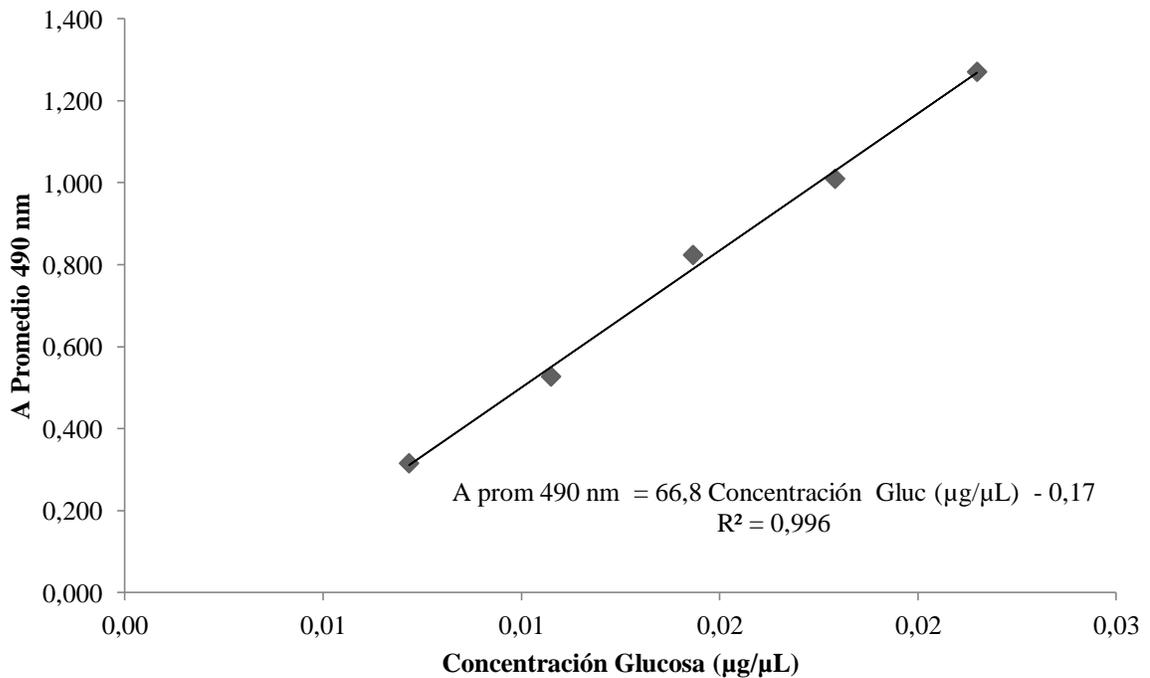


Figura 1. Curva de calibración de azúcares solubles totales por el método de Dubois *et ál.* (1956)

Ejemplo de cálculos procesamiento de muestras:

Se procesaron 0,1012g de tejido foliar de *Gmelina arborea* (Tabla 3) con 5,0 mL de agua destilada. Del extracto se tomaron 30 µL para la determinación. Se realizó por triplicado n=3.

Tabla 3. Ejemplo para la determinación de azúcares solubles totales en la muestra problema por método de Dubois *et ál.* (1956). A= absorbancia. Se midió contra blanco de reactivos

Masa (g)	A ₁ 490 nm	A ₂ 490nm	A ₃ 490 nm	A Promedio 490nm
0,1012	0,501	0,545	0,599	0,548

La ecuación de la curva de calibración es:

$$A_{Promedio490nm} = 66,8C_{Azúcar Total} - 0,17$$

Para encontrar la concentración de azúcares totales ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se despeja la ecuación como sigue:

$$C_{Azúcar\ Total} = \frac{A_{Promedio\ 490nm} + 0,17}{66,8}$$

Se reemplaza la Absorbancia promedio 490nm por la generada en el procesamiento de las muestras menos la absorbancia del blanco tabla 5:

$$C_{Azúcar\ Total} = \frac{0,548 + 0,17}{66,8} = 1,07 \times 10^{-2} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$$

En caso que se use alguna dilución se debe multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución.

Para encontrar la cantidad de azúcar total en reacción se multiplica la concentración encontrada por el volumen total de la reacción (1410 μL):

$$1,07 \times 10^{-2} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \times 1410 \mu\text{L} = 15,2 \mu\text{g de Azúcar Total}$$

Cantidad que se encuentra en 30 μL de un total de 5000 μL de extracto, con lo cual:

$$15,16 \mu\text{g} \times \frac{5000 \mu\text{L}}{30 \mu\text{L}} = 2,53 \times 10^3 \mu\text{g de Azúcar Total}$$

Para determinar la relación entre la cantidad de azúcar extraída y la cantidad de material vegetal, en μg Azúcar Total extraído/mg material vegetal fresco, se toma la cantidad de azúcar encontrada y se divide por la cantidad de material vegetal que se sometió a extracción:

$$\frac{2,53 \times 10^3 \mu\text{g de Azúcar Total}}{101,2 \text{mg Material Vegetal Fresco}} = 25,0 \frac{\text{mg de Azúcar Total}}{\text{g Material Vegetal Fresco}}$$

Ensayo 2. Contenido de azúcares reductores mediante el método de Somogyi – Nelson

El método de Nelson (1944)-Somogyi (1952) propone la formación de un complejo entre el tartrato de sodio y potasio y el Cu^{2+} a pH menor a 7,0, el cual es capaz de

oxidar azúcares que contengan extremo reductor. El método se basa en la reducción cuantitativa del Cu^{2+} para la generación de óxido cuproso Cu_2O , el cual reacciona cuantitativamente para la formación de un complejo que puede ser seguido a 660nm.

Mecanismo de Reacción: aunque el mecanismo no se ha elucidado completamente, sí se conoce que todos los aldehídos y cetonas α - hidroxiladas, como lo son las aldosas y cetosas, pueden ser objeto de oxidación por el Cu^{2+} bajo las condiciones de pH y calentamiento adecuadas. El precipitado de Cu_2O (amarillo-naranja) puede aparecer, dependiendo de la cantidad de azúcar en la muestra, en ese caso es necesario centrifugar antes de hacer la medida espectrofotométrica.

Materiales

Material biológico: tejido del material a analizar

Otros materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL, tubos de reacción tipo eppendorf de 2,0 mL, juego de micropipetas (rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL), puntas para micropipetas (rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL), celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico para espectrofotómetro, gradilla para tubos de 15 mL y de 2,0 mL, espátula, mortero, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas o máscara antigases), toallas de papel absorbente, vasos de precipitados, papel aluminio.

Equipos: Agitador horizontal, centrífuga, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, potenciómetro, cabina de extracción, agitador tipo vórtex, tanque para transporte de nitrógeno líquido.

Reactivos grado analítico:

Nitrógeno líquido, agua destilada, tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, carbonato de sodio anhidro, sulfato de sodio anhidro, sulfato de cobre pentahidratado, molibdato de amonio tetrahidratado, ácido sulfúrico concentrado, arsenato mono ácido de sodio heptahidratado, acetato de sodio, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, soluciones de calibración de potenciómetro pH 4,0 y 7,0, glucosa.

Preparación de reactivos:

Somogyi I: Disolver 3,75 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (PM 282,23 g/mol), en 100,0 mL de agua destilada, adicionar 7,50 g de carbonato de sodio anhidro (PM 105,99 g/mol), agitar hasta que los sólidos se disuelvan completamente

y luego adicionar 4,50 g de sulfato de sodio anhidro (PM 142,04 g/mol), mezclar y llevar a un volumen de 250,0 mL en un balón aforado. Filtrar y almacenar en botellas ámbar cubiertas con papel aluminio en nevera a 4 °C, evitar contacto directo con la luz.

Somogyi II: Disolver 4,00 g de sulfato de cobre pentahidratado (PM 249,68 g/mol) en agua destilada, adicionar 36,00 g de sulfato de sodio anhidro (PM 142,04 g/mol), mezclar fuertemente y disolver totalmente. Llevar a volumen final en balón aforado de 200 mL. Filtrar la solución y almacenar en botellas ámbar cubiertas con papel aluminio a 4 °C, evitar contacto directo con la luz.

Reactivo de Nelson

Solución A: Disolver 25,0 g de molibdato de amonio tetrahidratado (PM 1235,86 g/mol) en 400 mL de agua destilada, adicionar gota a gota en agitación constante y sobre cama de hielo 21 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Solución B: Disolver 0,60 g de arsenato monoácido de sodio heptahidratado (PM 311,90 g/mol) en 25 mL de agua destilada, este procedimiento debe realizarse en cabina de extracción, es importante tomar la precaución de no adicionar ácido por accidente a la solución ya que se formaría un compuesto tóxico y volátil.

Mezclar la solución A y B, llevar a volumen final de 500 mL con agua destilada, incubar a 37 °C por 36 horas, filtrar la solución, almacenar en botellas ámbar cubiertas con papel aluminio a 4 °C, evitar el contacto con la luz. La solución debe presentar un color amarillo pálido para poder ser empleada en la determinación.

Buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,00: Disolver 3,40 g de acetato de sodio trihidratado (PM 136,08 g/mol) en 450 mL de agua destilada, ajustar el pH con ácido acético 0,1N y llevar a 500 mL con agua destilada. Almacenar a 4 °C.

Estándar de calibración: pesar 0,1000 g de glucosa y disolver en 80 mL de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0. Aforar a 100 mL con el buffer (patrón= 1,00 mg/mL). Almacenar en nevera a 4 °C.

Metodología

Curva de calibración: Se puede realizar usando un patrón de glucosa 1,00 mg/mL en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0 (anotar en el cuaderno de laboratorio el peso exacto que se toma como patrón). Todo el procedimiento debe realizarse en

cabina de extracción y con el equipo de protección adecuado. Realizar las mezclas de reacción presentadas en la tabla 4 por triplicado, teniendo en cuenta las siguientes indicaciones: en un tubo de reacción de 2,0 mL adicionar el volumen respectivo de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0 y la cantidad de patrón usando micropipeta y asegurando expulsión completa.

Sobre la mezcla anterior, agregar a cada tubo 250 μ L de reactivo somogyi I y rápidamente 50 μ L de reactivo somogyi II, agitar fuertemente con vórtex por 20 segundos y a temperatura ambiente. No permitir incidencia de luz directa al tubo de reacción. Luego, someter a calentamiento (85-90 °C) en agua por una hora, tener cuidado que los tubos no se destapen durante el proceso de calentamiento. Dejar enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad. Agitar con vórtex y agregar lentamente 500 μ L de reactivo de Nelson, agitar fuertemente la mezcla de reacción. Adicionar 500 μ L de agua destilada, agitar inmediata y fuertemente con vórtex por 30 segundos para retirar el CO₂ restante. Centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos a 12 \pm 2 °C. Leer absorbancia a 660 nm contra el blanco de reactivos, el cual debe prepararse al mismo tiempo que la curva de calibración y consiste en: 270 μ L de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0, 250 μ L de somogyi I, 50 μ L de reactivo somogyi II, 500 μ L de reactivo Nelson y 500 μ L de agua destilada siguiendo las indicaciones anteriores y bajo el mismo procedimiento. Construir la siguiente gráfica: Concentración de azúcares reductores (mg/mL o μ g/ μ L) Vs. A promedio 660 nm. Las absorbancias no deben sobrepasar 1,000 Unidades de Absorbancia.

Tabla 4. Preparación curva de calibración para azúcares reductores, método de Somogyi-Nelson

Volumen Buffer (μ L)	Volumen Patrón (μ L)	Somogyi I (μ L)	Somogyi II (μ L)	Nelson (μ L)	Agua destilada (μ L)
270	0	250	50	500	500
265	5	250	50	500	500
260	10	250	50	500	500
250	20	250	50	500	500
245	25	250	50	500	500
240	30	250	50	500	500
235	35	250	50	500	500
230	40	250	50	500	500

Preparación de muestras:

Las muestras son el tejido de interés a analizar. Para el caso, macerar hojas frescas sin nervaduras con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino y conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Procesamiento de muestras: Pesar 150,0 mg, aproximadamente, de material vegetal fresco y macerado (Anotar en el cuaderno de laboratorio el peso exacto), en un tubo de reacción de 15 mL. La extracción se debe realizar por triplicado. A cada tubo agregar 4,0 mL de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0. A temperatura ambiente y en agitador horizontal agitar fuertemente por 60 minutos. Luego centrifugar a 6000 rpm durante 30 minutos a 12 ± 2 °C, y separar el extracto del sedimento.

Con el fin de realizar la determinación de los azúcares reductores en el extracto, preparar la siguiente mezcla de reacción por triplicado en un tubo de reacción de 2,0 mL: 240 µL de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0 y 30 µL del extracto. Asegurar la expulsión completa de cada volumen y no sumergir toda la punta en la mezcla de reacción. Inmediatamente, adicionar 250 µL de reactivo somogyi I y 50 µL de reactivo somogyi II, agitar fuertemente con vórtex por 20 segundos. Luego, calentar en agua (85-90 °C) por 1 hora, tener cuidado que los tubos no se destapen durante el proceso de calentamiento. Dejar enfriar a temperatura ambiente y agitar fuertemente en vórtex, agregar lentamente 500 µL de reactivo de Nelson y agitar fuertemente la mezcla de reacción. Adicionar, en agitación constante, 500 µL de agua destilada, agitar inmediata y fuertemente en vórtex por 30 segundos para retirar el CO₂ restante. Centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos a 12 °C. Leer absorbancia a 660 nm contra el blanco de reactivos, que consiste en: 270 µL de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0, 250 µL de somogyi I, 50 µL de reactivo somogyi II, 500 µL de reactivo Nelson y 500 µL de agua destilada siguiendo las indicaciones anteriores y bajo el mismo procedimiento. Interpolar directamente en la curva de calibración, pues se conserva el mismo volumen de reacción y las mismas cantidades de reactivos. Si las muestras registran absorbancias que no se encuentran dentro de la curva, se debe diluir con buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0, de cada dilución realizar triplicado. Calcular el contenido de azúcares reductores detectables por esta metodología. Se expresa el contenido azúcares reductores/material vegetal fresco (µg/mg) referidos al patrón.

Ejemplo de cálculos relacionados con la curva de calibración:

Para la elaboración de la curva de calibración, primero se calcula el contenido de glucosa en el medio de reacción para cada punto de la curva (Tabla 5), así:

Se partió de un patrón de glucosa de 1,03 mg/mL o $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para encontrar la cantidad de glucosa en el medio de reacción, se multiplica la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por el volumen (μL) respectivo del patrón, de esta forma se obtiene la masa de glucosa (μg) en el medio de reacción:

$$1,03 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \times 10,00\mu\text{L} = 10,3 \mu\text{g Glucosa}$$

Para encontrar la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de glucosa en el medio de reacción, se divide la cantidad encontrada (μg) por el volumen total de reacción (1570 μL):

$$\frac{10,3 \mu\text{g}}{1570 \mu\text{L}} = 6,56 \times 10^{-3} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$$

Luego se calcula el promedio de las absorbancias leídas a 660 nm y por último se grafica la concentración de glucosa ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) o cantidad de glucosa (μg) (eje X) contra A promedio a 660 nm (eje Y). Se debe obtener una línea recta con un coeficiente de correlación adecuado ($> 0,98$). Cuando las muestras se interpolen en la curva de calibración se deben obtener resultados con %CV menor a 10% y % error menor a 5% (Figura 2).

Tabla 5. Resultados curva de calibración azúcares reductores por método de Somogyi-Nelson. Glc= glucosa, Rx= reacción, A= absorbancia

Vol. Stock Glc (μL)	Concetración Glc ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	A ₁ 660 nm	A ₂ 660 nm	A ₃ 660 nm	A Promedio 660nm
0	0,000	0,001	0,003	0,004	0,003
3	$1,97 \times 10^{-3}$	0,076	0,077	0,066	0,073
5	$3,28 \times 10^{-3}$	0,199	0,191	0,165	0,185
7	$4,59 \times 10^{-3}$	0,263	0,222	0,233	0,239
10	$6,56 \times 10^{-3}$	0,375	0,373	0,400	0,383
15	$9,84 \times 10^{-3}$	0,483	0,505	0,538	0,509
20	$1,31 \times 10^{-2}$	0,745	0,748	0,750	0,748
25	$1,64 \times 10^{-2}$	0,953	0,917	0,896	0,922
30	$1,97 \times 10^{-2}$	1,127	1,134	1,158	1,140

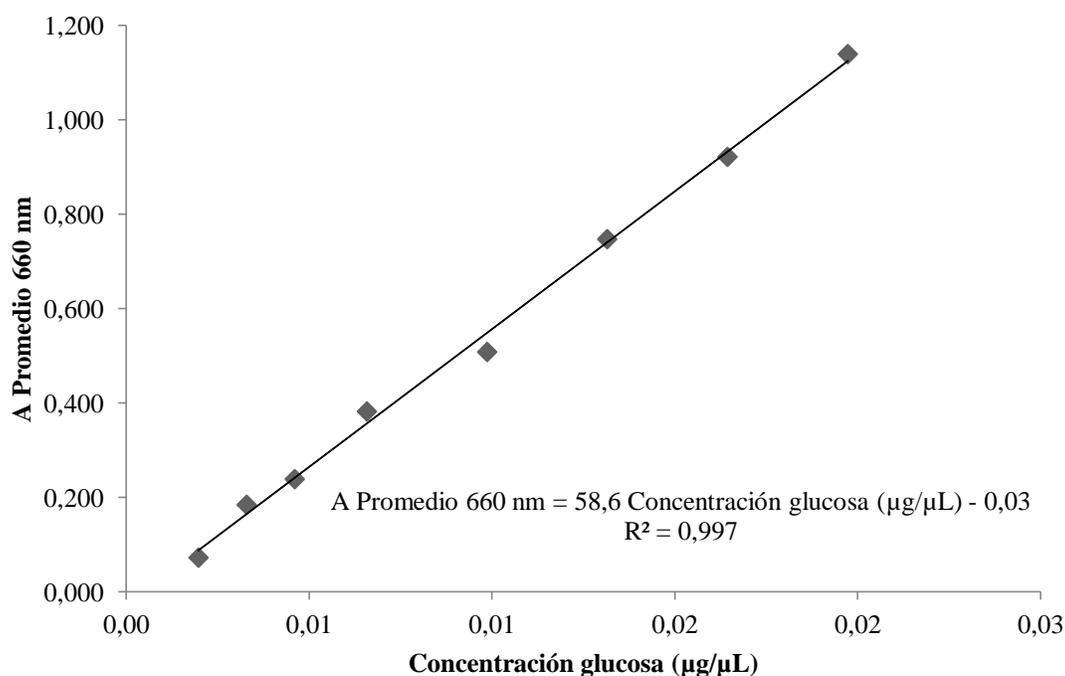


Figura 2. Curva de calibración azúcares reductores por método de Somogyi-Nelson

Ejemplo de cálculos procesamiento muestras:

Se procesaron 153,3 mg de tejido foliar fresco de *G. arborea* y se hizo la extracción con 4,0 mL de buffer acetato 50 mM pH 5,0. Del extracto se tomaron 30 µL para la determinación. Se realizaron réplicas n=3. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 6:

Tabla 6. Ejemplo para la determinación de azúcares reductores por método de Somogyi-Nelson. A= absorbancia

Masa (g)	A ₁ 660 nm	A ₂ 660nm	A ₃ 660 nm	A Prom 660nm
0,1533	0,719	0,740	0,737	0,732

La ecuación de la curva de calibración es:

$$A_{Promedio660nm} = 58,6 C_{Azúcar\ reductor} - 0,03$$

Para encontrar la $C_{\text{Azúcar reductor}}$ ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se despeja la ecuación como sigue:

$$C_{\text{Azúcar reductor}} = \frac{A_{\text{promedio } 660\text{nm}} + 0,03}{58,6}$$

Se reemplaza la absorbancia promedio 660 nm por la generada en el procesamiento de las muestras medidas contra el blanco de reactivos (Tabla 8).

$$C_{\text{Azúcar reductor}} = \frac{0,732 + 0,03}{58,6} = 1,30 \times 10^{-2} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$$

En caso que se use alguna dilución se debe multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución.

Para encontrar la cantidad de azúcar reductor en reacción se multiplica la concentración encontrada por el volumen total de la reacción ($1570 \mu\text{L}$):

$$1,30 \times 10^{-2} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \times 1570 \mu\text{L} = 20,4 \mu\text{g Azúcar reductor}$$

Cantidad que se encuentra en $30 \mu\text{L}$ de un total de $4000 \mu\text{L}$ de extracto, con lo cual:

$$20,4 \mu\text{g} \times \frac{4000 \mu\text{L}}{30 \mu\text{L}} = 2,72 \times 10^3 \mu\text{g Azúcar reductor}$$

Para determinar la relación entre la cantidad de azúcar extraída y la cantidad de material vegetal fresco, en μg Azúcar Reductor extraída/mg material vegetal fresco: Se toma la cantidad de azúcar encontrada y se divide entre la cantidad de material vegetal que se sometió a extracción:

$$\frac{2,73 \times 10^3 \mu\text{g Azúcar reductor}}{153,3 \text{ mg Material Vegetal Fresco}} = 17,7 \frac{\mu\text{g Azúcar reductor}}{\text{mg Material Vegetal Fresco}}$$

Ensayo 3. Contenido de prolina mediante el método de Bates

El método de determinación de prolina (Bates *et ál.* 1973) se fundamenta en que la ninhidrina es un agente oxidante fuerte que efectúa la descarboxilación de los aminoácidos. El amoniaco así formado reacciona con una segunda molécula de

ninhidrina protonada para producir un pigmento, del cual sólo el átomo de nitrógeno pertenece al aminoácido. Esta es una metodología específica para determinar el contenido de prolina.

Materiales

Material biológico: tejido del material a analizar

Otros materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL, juego de micropipetas (rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL), puntas para micropipetas (rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL), macropipeta de 1000 a 5000 μL , puntas para macropipeta de 1000 a 5000 μL , vasos de precipitados, celda de cuarzo para espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico, gradilla para tubos de 15 mL, espátula, mortero, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas o máscara antigases), toallas de papel absorbente, tubos de reacción de vidrio tapa rosca 150 x 110 mm fondo redondo.

Equipos: Agitador horizontal, centrífuga, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, cabina de extracción, agitador tipo vórtex, tanque para transporte de nitrógeno líquido.

Reactivos grado analítico.

Nitrógeno líquido, agua destilada, ácido acético glacial, ácido fosfórico 85%, tolueno, ninhidrina, ácido sulfosalicílico monohidratado, patrón: Prolina

Preparación de reactivos:

Ácido fosfórico 3M: Adicionar 2,88 mL de ácido fosfórico 85% (PM 98,00g/mol, densidad 1,71 kg/L) a un balón aforado de 10 mL y completar a volumen con agua destilada.

Ninhidrina (0,1 M): Pesar 0,1561 g de ninhidrina (PM 248,1 g/mol). En cabina de extracción y con el equipo de protección adecuado, disolver la ninhidrina en 3,75 mL de ácido acético glacial caliente (70-75°C). Luego de disolución completa, adicionar 2,5 mL de ácido fosfórico 3 M (70-75°C), gota a gota y con agitación constante. La preparación de la solución de ninhidrina se debe realizar directamente en un frasco ámbar cubierto con papel aluminio y debe ser conservada en baño maría y agitada antes de usar. Se recomienda su uso recién preparada.

Ácido sulfosalicílico 3% (p/v): Pesar 1,50 g de ácido sulfosalicílico y disolver en 50 mL de agua destilada. Se debe conservar a 4 °C, y agitar antes de usar.

Patrón de prolina (40 µM): Pesar 0,0023 g de prolina y disolver en 400 mL de ácido sulfosalicílico 3%, luego aforar a 500,0 mL con la misma solución. Se debe conservar a 4 °C. Agitar fuertemente antes de usar.

Metodología

Curva de calibración: Se realiza usando el patrón de prolina (40 µM) previamente preparado evaluando cada nivel de concentración por triplicado. En un tubo de reacción de vidrio con rosca de 13x100mm cubierto con papel aluminio, adicionar el volumen respectivo de ácido sulfosalicílico 3% (p/v) (Tabla 7) y las diferentes cantidades del patrón para cada caso usando micropipeta. Adicionar 1,0 mL de ninhidrina y 1,0 mL de ácido acético glacial, agitar vigorosamente en vórtex por 15 segundos, evitando la incidencia directa de luz a la mezcla de reacción. Tapar los tubos de ensayo, colocar en forma vertical en una gradilla y posteriormente a ebullición por una hora en agua. Luego, enfriar bruscamente sobre hielo-agua. Una vez se encuentre a temperatura ambiente, adicionar 3,0 mL de tolueno. El Tolueno se seca previamente por adición de 5,0 g de sulfato de sodio anhidro a un litro de tolueno, se agita vigorosamente por 10 minutos y se deja en reposo toda la noche y se filtra para luego utilizar en la mezcla de reacción. Agitar vigorosamente con vórtex por 20 segundos dos veces cada media hora. Dejar reposar por 25 minutos en oscuridad y a no más de 10°C. Colectar la fase orgánica (fase superior) y leer su absorbancia a 520 nm, usando como blanco tolueno. Construir la gráfica: Prolina (mM) Vs. Abs. 520 nm.

Tabla 7. Curva de calibración para la determinación de prolina por el método de Bates *et ál.* (1973)

Ácido sulfosalicílico 3% (p/v) (µL)	Patrón(µL)	Ninhidrina (mL)	Ácido acético glacial (mL)	Tolueno (mL)
1000	0	1,0	1,0	3,0
975	25	1,0	1,0	3,0
950	50	1,0	1,0	3,0
900	100	1,0	1,0	3,0
800	200	1,0	1,0	3,0
500	500	1,0	1,0	3,0

0	1000	1,0	1,0	3,0
---	------	-----	-----	-----

Preparación de muestras:

Las muestras son el tejido de interés a analizar. Para el caso, macerar hojas frescas sin nervaduras con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino y conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Procesamiento de muestras: Pesar 500,0 mg aproximadamente de material vegetal fresco en un tubo de reacción tipo falcon de 15 mL. Anotar en el cuaderno de laboratorio la masa exacta del material vegetal. La extracción se debe realizar por triplicado. A cada tubo agregar 5,0 mL de solución extractora de ácido sulfosalicílico 3% (p/v). A temperatura ambiente y en agitador horizontal agitar fuertemente por 60 minutos. Luego centrifugar a 6000 rpm durante 30 minutos a 10 °C. En un tubo de vidrio cubierto con papel aluminio, tomar 1,0 mL del sobrenadante y adicionar 1,0 mL de ninhidrina (recién preparada) y 1,0 mL de ácido acético glacial tibio (no en ebullición). Tapar cada uno de los tubos, agitar vigorosamente con vórtex por 20 segundos y calentar en agua en ebullición por 1 hora. Enfriar bruscamente sobre hielo-agua y dejar reposar por 15 minutos. Una vez a temperatura ambiente adicionar 3,0 mL de tolueno previamente secado y agitar vigorosamente en vórtex por 60 segundos. Colectar la fase superior y leer absorbancia a 520 nm, usando como blanco tolueno. Interpolar directamente en la curva de calibración, pues se conserva el mismo volumen de reacción y las mismas cantidades de reactivos. Si las muestras registran absorbancias que no se encuentran dentro de la curva se debe diluir con tolueno. Calcular el contenido de prolina detectable por esta metodología; se expresa el contenido: µg prolina/g material vegetal fresco (µg/g).

Ejemplo de cálculos relacionado con la curva de calibración:

Se realiza la toma de datos para la elaboración de la curva de calibración de acuerdo a las especificaciones presentadas previamente. En primer lugar se debe calcular el contenido de prolina en el medio de reacción (Tabla 8), tal y como se presenta a continuación:

Para el ejemplo de cálculo tomamos la penúltima fila de la tabla 8, en este caso se toman 500 µL de un patrón de prolina de 40,0 µmoles/Litro. Posteriormente, para calcular la cantidad de prolina en este tubo en particular se multiplica la concentración por el volumen, como sigue:

$$40,0 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \times 500\mu\text{L} \times \frac{1\text{L}}{1 \times 10^6 \mu\text{L}} = 2,00 \times 10^{-2} \mu\text{mol de Prolina}$$

Luego, se calcula la cantidad de prolina que reacciona para formar la molécula coloreada, dividiendo los μmoles de prolina en el volumen de tolueno (3mL):

$$\frac{2,00 \times 10^{-2} \mu\text{mol Prolina}}{3,00 \text{ mL}} = \frac{6,67 \times 10^{-3} \mu\text{mol}}{\text{mL}} = 6,67 \times 10^{-3} \text{ mM}$$

Luego se realiza el promedio de las absorbancias leídas a 520 nm y por último se grafica concentración de prolina ($\mu\text{moles prolina/mL}$) (eje X) contra A promedio a 520 nm (eje Y) (Figura 3). Se debe obtener una línea recta con un coeficiente de correlación adecuado ($> 0,98$), cuando las muestras se interpolen en la curva de calibración se deben obtener resultados con %CV menor a 10% y % error menor a 5%.

Tabla 8. Resultados curva de calibración prolina método Bates *et ál.* (1973). A= absorbancia

Vol. Stock prolina (uL)	Prolina (mM)	A1 520 nm	A2 520nm	A3 520 nm	A Promedio 520nm
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25	$3,33 \times 10^{-4}$	0,011	0,010	0,012	0,011
50	$6,67 \times 10^{-4}$	0,023	0,024	0,026	0,024
100	$1,33 \times 10^{-3}$	0,045	0,043	0,046	0,045
200	$2,67 \times 10^{-3}$	0,094	0,096	0,099	0,096
500	$6,67 \times 10^{-3}$	0,230	0,236	0,233	0,233
1000	$1,33 \times 10^{-2}$	0,485	0,482	0,479	0,482

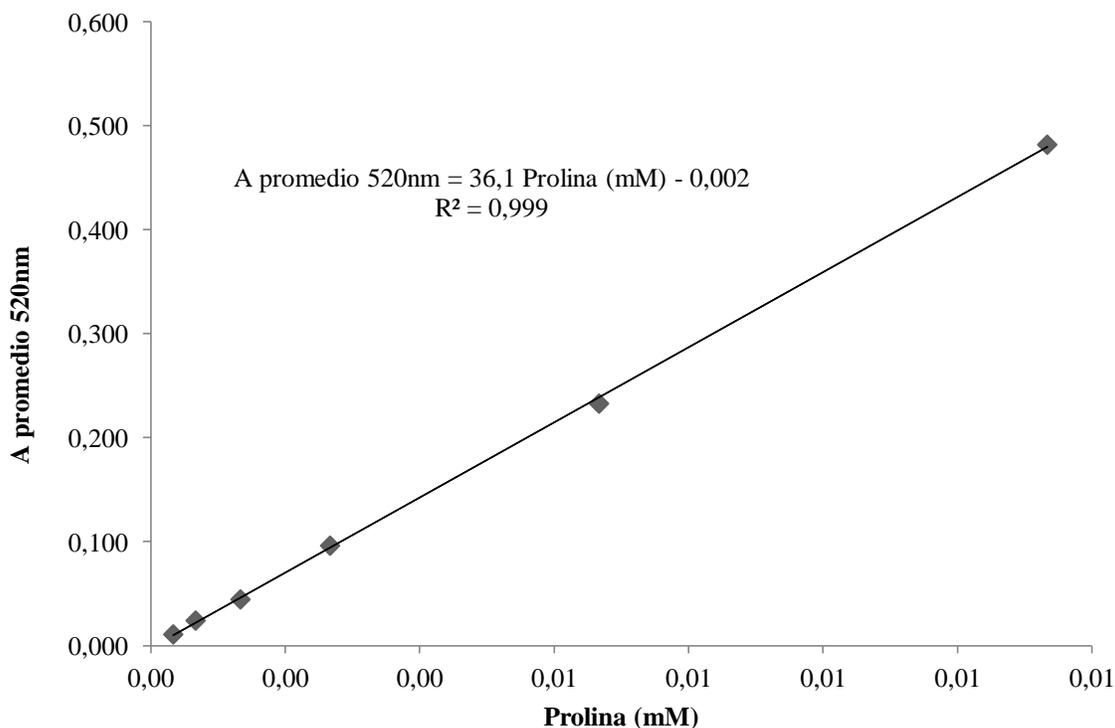


Figura 3. Curva de calibración para prolina mediante el método de Bates *et ál.* (1973)

Ejemplo de cálculos relacionado con procesamiento de muestras

Se procesaron 501,8 mg de tejido foliar de *G. arbórea* y se encontraron los resultados de la tabla 9:

Tabla 9. Ejemplo para la determinación de prolina mediante el método de Bates *et ál.* (1973)

Masa (g)	A 1 520nm	A 2 520nm	A 3 520nm	A Prom 520nm
0,5018	0,452	0,497	0,508	0,486

La ecuación de la curva de calibración es:

$$A_{Promedio520nm} = 36,1 C_{Prolina mM} - 0,002$$

Donde $C_{\text{Prolina mM}}$ es la concentración de prolina en mM y $A_{\text{Promedio } 520\text{nm}}$ es la absorbancia promedio de una muestra a 520nm. Para encontrar la concentración de prolina en las muestras se toma el promedio de las absorbancias de cada muestra, y este valor se reemplaza en la ecuación:

$$C_{\text{Prolina mM}} = \frac{A_{\text{Promedio } 520\text{nm}} + 0,002}{36,1}$$

Reemplazando los valores del ejemplo de la tabla 9, se tiene que:

$$C_{\text{Prolina mM}} = \frac{0,486 + 0,002}{36,1} = 1,35 \times 10^{-2} \text{ mM}$$

En caso que se use alguna dilución se debe multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución.

Para encontrar la cantidad de prolina en reacción se multiplica la concentración encontrada por el volumen total de la reacción (3 mL).

$$\frac{1,35 \times 10^{-2} \mu\text{mol}}{\text{mL}} \times 3,00 \text{ mL} = 4,06 \times 10^{-2} \mu\text{mol prolina}$$

Esta cantidad de prolina se encontraba en 1000 μL de ácido sulfosalicílico que se tomaron para hacer la determinación, el volumen total del extracto es 5000 μL , por lo tanto la cantidad de prolina extraída inicialmente es:

$$4,06 \times 10^{-2} \mu\text{mol prolina} \times \frac{5000 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 2,03 \times 10^{-1} \mu\text{mol Prolina}$$

El resultado final se debe expresar en microgramos de prolina por miligramo de material vegetal fresco, para lo cual se hace la conversión de micromoles a microgramos usando el peso molecular de la prolina (115,13 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$) y luego se divide sobre la masa en mg de material fresco de partida.

$$2,03 \times 10^{-1} \mu\text{mol Prolina} \times \frac{115,13 \mu\text{g}}{1 \mu\text{mol}} = 23,3 \mu\text{g Prolina}$$

$$\frac{23,3 \mu\text{g Prolina}}{501,8 \text{ mg Material Vegetal Fresco}} = 4,65 \times 10^{-2} \frac{\mu\text{g Prolina}}{\text{mg Material Vegetal Fresco}}$$

Ensayo 4. Determinación del contenido de proteína

La determinación del contenido de proteína de un extracto es importante durante estudios en los que se evalúen cambios metabólicos de los seres vivos en general y es fundamental para la determinación de actividades enzimáticas específicas.

Un proceso simple para la determinación del contenido de proteína es el descrito por Bradford 1976, el cual consiste en la formación de un complejo entre el colorante azul de coomassie G-250 con los residuos aromáticos de las proteínas. El colorante libre puede existir en cuatro diversas formas iónicas (pK_a 1,15, 1,82 y 12,4). Las formas más catiónicas poseen un máximo de absorbancia a 470nm y 650nm presentando un color rojo y verde. La forma más aniónica posee un máximo de absorbancia a 590nm, es de color azul y es la forma que se establece cuando se presenta interacción con las proteínas. De esta forma bajo ciertas condiciones se encuentra una proporcionalidad entre la concentración de proteína y el desarrollo del color (Bradford 1976; Zor y Selinger 1996).

El azul de Coomassie G-250 reacciona con los residuos de arginina y lisina con mayor afinidad, y con histidina, tirosina, triptófano y fenilalanina con afinidad de intermedia a baja (Bradford 1976).

Materiales

Material biológico: tejido del material vegetal a analizar

Materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL, tubos de reacción tipo eppendorf de 1,5 mL, juego de micropipetas (rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L), puntas para micropipetas (rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L), vasos de precipitados, celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico para espectrofotómetro, gradilla para tubos de 15 mL y de 2,0 mL, espátula, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio), toallas de papel absorbente, balón aforado de 1,0 L, agitador magnético, papel aluminio.

Equipos: Agitador horizontal, centrífuga refrigerada, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, tanque para transporte de nitrógeno líquido, potenciómetro, plancha de agitación magnética, cabina de extracción, vórtex.

Reactivos: Nitrógeno líquido, acetona, agua destilada, fosfato dibásico de potasio trihidratado, fosfato monobásico de potasio, fosfato monobásico de sodio trihidratado, fosfato dibásico de sodio anhidro, EDTA disódico, soluciones de HCl y NaOH para ajustar pH, etanol 98 %, ácido o-fosfórico 85%, Coomassie Brilliant Blue G-250, albúmina sérica bovina (Bio-Rad, protein assay standard II), HCl 37 %.

Preparación de reactivos:

Buffer de extracción de proteínas- Fosfato de potasio 100 mM pH 7,5, EDTA- Na_2 1 mM: Pesar KH_2PO_4 2,3135 g (PM 136,09 g/mol), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7,5316 g (PM 228,23 g/mol), 0,1861g EDTA- Na_2 (PM 372,23 g/mol). El conjunto de reactivos se deposita en un vaso de precipitados y se disuelve en 350 mL de agua destilada fría. Agitar hasta disolución completa. Luego ajustar pH a 7,5, aforar a 500 mL con agua destilada fría y almacenar a 4 °C. Para mayor información sobre cómo preparar un buffer revisar a Deutscher (1990).

Buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,80, para curva de calibración: Pesar 1,2444g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM 173,98 g/mol) y 0,4042 g de Na_2HPO_4 (PM 141,96 g/mol), el conjunto de reactivos depositarlo en un vaso de precipitados y disolver en 80 mL de agua destilada fría. Agitar hasta disolución completa. Luego ajustar a pH 6,8 y aforar a 100 mL con agua destilada fría. Conservar en un frasco debidamente rotulado a 4 °C.

Colorante Bradford: Pesar aproximadamente 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, disolver en 50 mL de etanol 95%, agitar fuertemente y en oscuridad, agregar 100 mL de ácido fosfórico 85%, agitar fuertemente y en oscuridad. Posteriormente aforar a 1,0 L con agua destilada fría, agitar por una hora, filtrar dos veces y almacenar en frasco ámbar debidamente rotulado a 4 °C.

Metodología

La determinación se realiza con base en la metodología descrita por Bradford (1976) y Zor y Selinger (1996).

Curva de calibración: Se realiza para cada nivel de concentración por triplicado con un patrón de BSA 1,45 mg/mL, preparando las mezclas de reacción que se presentan en la tabla 10 y el procedimiento que se presenta a continuación: colocar en un tubo de reacción de 2 mL la cantidad de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,8 y

posteriormente la cantidad de patrón de BSA. Homogenizar con vórtex por 10 segundos. Agregar 800 μL de reactivo de Bradford, tapar el tubo e invertir suavemente cinco veces para evitar la formación de espuma, dejar en reposo por 15 minutos y determinar la absorbancia a 590 nm y 450nm. Usando como blanco el buffer. Construir la gráfica: $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proteína (X) Vs. A 590nm /A 450nm (Y) (Figura 4).

Tabla 10. Curva de calibración para determinación de proteína. Método de Bradford modificado por Zor y Selinger

Volumen buffer fosfato de sodio 100mM pH 6,8 (μL)	Volumen BSA patrón (μL)	Reactivo de Bradford (μL)
200	0	800
198	2	800
196	4	800
194	6	800
192	8	800
190	10	800

Preparación de muestras: Las muestras son el tejido de interés a analizar. Para el caso, macerar hojas frescas sin nervaduras con N_2 líquido hasta obtener un polvo fino y conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Procesamiento de muestras: Pesar aproximadamente 0,50 g de macerado en un tubo de reacción de 15 mL tipo falcon de fondo cónico previamente rotulado. Realizar el procedimiento por triplicado. Adicionar sobre el macerado 5 mL de buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7,5. Homogenizar por dos minutos en vórtex sobre cama de hielo. Incubar durante 1 hora sobre cama de hielo en agitador horizontal. Centrifugar 30 minutos a 6000 rpm y 4°C . Separar el sobrenadante (extracto proteico), para la determinación inmediata del contenido de proteína.

Colocar en un tubo de reacción de 1,5 mL, 200 μL de extracto proteico y realizar determinación por triplicado. Agregar 800 μL de reactivo de Bradford, tapar el tubo e invertir suavemente cinco veces para evitar la formación de espuma, dejar en reposo por 15 minutos y determinar la absorbancia a 590nm y 450nm. Interpolar en la gráfica: $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proteína (X) Vs. A 590nm /A 450nm (Y).

En caso que se presenten valores por fuera de la curva de calibración se prefiere repetir el procedimiento con menos cantidad de extracto debido a que el proceso de dilución afecta la determinación.

Ejemplo de cálculos relacionados con la curva de calibración:

Se realiza la toma de datos para la elaboración de la curva de calibración de acuerdo a las especificaciones presentadas previamente. Para la elaboración de la representación gráfica de los resultados encontrados, primero se calcula el contenido de BSA en el medio de reacción (Tabla 11), tal y como se presenta a continuación:

Se parte de un patrón de BSA de 1,45 mg/mL. Para encontrar la cantidad de BSA que ha adicionado en cada tubo, se multiplica la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por el volumen (μL) respectivo del patrón, de esta forma se encuentran los μg de BSA en el medio de reacción. Por ejemplo:

$$1,45 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \times 10,00\mu\text{L} = 14,5 \mu\text{gBSA}$$

Para encontrar la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de BSA presente en la mezcla, se divide la cantidad encontrada (μg) por el volumen total de reacción (1000 μL):

$$\frac{14,5\mu\text{g}}{1000\mu\text{L}} = 1,45 \times 10^{-2} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$$

Luego se realiza el promedio de las absorbancias leídas a 450 y 590 nm, a cada promedio le se resta la absorbancia del blanco (primera fila tabla 11) y se grafica concentración de BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (eje X) contra el promedio de la relación $A_{\text{promedio } 590\text{nm}} / A_{\text{promedio } 450\text{nm}}$. Se debe obtener una línea recta con un coeficiente de correlación adecuado (> 0.98). Cuando las muestras se interpolen en la curva de calibración se deben obtener resultados con %CV menor a 10% y % error menor a 5%.

Tabla 11. Curva de calibración proteína método de Bradford modificado por Zor y Selinger. BSA= Albúmina sérica bovina, A= absorbancia

Volumen BSA patrón (μL)	[BSA] (μg/μL)	A 450 nm			A 590 nm			A promedio 450 nm	A promedio 590nm	A 590nm/A 450 nm
0	0	0,494	0,486	0,467	0,314	0,309	0,313	0,482	0,312	0,647
2	2,90x 10 ⁻³	0,516	0,495	0,440	0,397	0,379	0,382	0,484	0,386	0,798
4	5,80x10 ⁻³	0,444	0,440	0,437	0,401	0,400	0,416	0,440	0,406	0,921
6	8,70x10 ⁻³	0,433	0,434	0,421	0,462	0,462	0,445	0,429	0,456	1,063
8	1,16x10 ⁻²	0,409	0,409	0,415	0,464	0,467	0,475	0,411	0,469	1,140
10	1,45x10 ⁻²	0,390	0,396	0,395	0,514	0,512	0,530	0,394	0,519	1,318

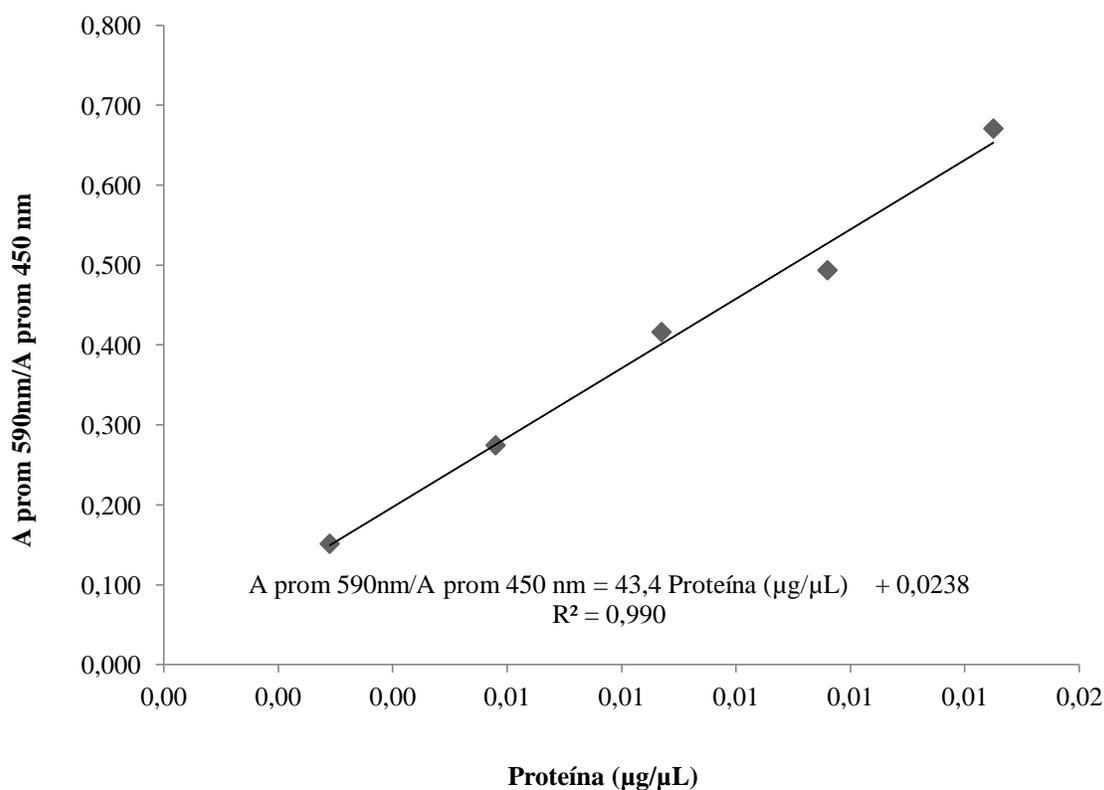


Figura 4. Curva de calibración obtenida por el método de Bradford modificado por Zor y Selinger (1996)

Ejemplo de cálculos relacionado con procesamiento de muestras:

Se procesaron 100,0 mg de tejido foliar de *G. arborea* y se hizo la extracción con 4,4 mL buffer fosfato de sodio 110mM pH 7,5 conteniendo PVP-40. Del extracto

proteico se tomaron 200 μL para la determinación. Se realizó triplicado $n=3$. Ejemplo (Tabla 12):

Para conocer la cantidad de proteína en el extracto se procede a promediar las absorbancias a las dos longitudes de onda medidas (450 y 590nm), después de lo cual se calcula la razón $A_{590\text{nm}}/A_{450\text{nm}}$, tal como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Determinación de proteína método de Bradford (1976) modificado por Zor y Selinger (1996) sobre el extracto

Vol. extracto (μL)	A 450 nm			A 590 nm			$A_{\text{prom } 450 \text{ nm}}$	$A_{\text{prom } 590 \text{ nm}}$	$A_{590\text{nm}}/A_{450 \text{ nm}}$
200	0,329	0,333	0,341	0,308	0,315	0,315	0,324	0,313	0,967

La ecuación de la curva de calibración es:

$$\frac{A_{590\text{nm}}}{A_{450\text{nm}}} = 43,4C_{\text{proteína}} + 0,0238$$

Para encontrar la concentración de proteína en las muestras se toma el promedio de las absorbancias de cada muestra, se le resta la absorbancia del blanco y se reemplaza en la ecuación obtenida de la curva de calibración.

$$C_{BSA} = \frac{\frac{A_{590\text{nm}}}{A_{450\text{nm}}} - 0,0238}{43,4} = \frac{0,967 - 0,0238}{43,4} = 2,17 \times 10^{-2} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$$

Como se realizó la determinación en $1000\mu\text{L}$, al igual que la curva de calibración, la cantidad de proteína en $1,0 \text{ mL}$ es:

$$2,17 \times 10^{-2} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \times 1000\mu\text{L} = 21,7\mu\text{g}$$

Esta cantidad de proteína se detectó en un volumen de $200 \mu\text{L}$ el cual provino de un volumen total de extracción de $4400 \mu\text{L}$, con lo cual la cantidad de proteína total extraída es:

$$21,7\mu g \times \frac{4400\mu L}{200\mu L} = 4,78 \times 10^2 \mu g = 4,78 \times 10^{-1} \text{ mg Proteína extraída}$$

Expresando la cantidad de proteína en referencia a la cantidad de material vegetal original (0,1000 g):

$$\frac{4,78 \times 10^{-1} \text{ mg Proteína Extraída}}{0,1000 \text{ g Material Vegetal Fresco}} = 4,78 \frac{\text{mg Proteína Extraída}}{\text{g Material Vegetal Fresco}}$$

Ensayo 5. Determinación de la actividad enzimática catalasa (CAT)

La actividad enzimática catalasa (CAT) se determina mediante el método modificado de permanganato/peróxido (Ulrich 1974).

El proceso consiste en la cuantificación de peróxido de hidrógeno consumido por una cantidad de extracto enzimático de CAT en un tiempo determinado, mediante una titulación (volumétrica) del peróxido de hidrógeno con permanganato de potasio estandarizado.

Para determinar la cantidad de peróxido de hidrógeno consumido en un tiempo determinado de reacción enzimática, se debe calcular la diferencia entre la cantidad de peróxido de hidrógeno disponible al inicio de la reacción y la cantidad de peróxido de hidrógeno remanente después de la reacción enzimática en presencia de la enzima. El peróxido de hidrógeno remanente se determina titulando el peróxido que no fue descompuesto por la enzima, con permanganato de potasio en medio ácido. El peróxido disponible inicialmente para la reacción se determina titulando el peróxido presente en una solución con las mismas características utilizadas para hacer la reacción enzimática, pero con la enzima inhibida por la adición de ácido sulfúrico antes de adicionar el peróxido de hidrógeno.

Para obtener resultados reproducibles en la determinación del contenido de peróxido de hidrógeno se debe contar con reactivos debidamente estandarizados.

El permanganato es un agente oxidante muy fuerte que bajo condiciones de calentamiento y agitación propicia la descarboxilación del oxalato en medio fuertemente ácido.

La unidad de actividad enzimática catalasa (CAT), se define como:

$$U_{\text{CAT}} = \mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ descompuesto /minuto}$$

La actividad enzimática específica es la unidad de actividad por miligramo de proteína.

La actividad enzimática total es la unidad de actividad por g de material vegetal analizado.

Materiales

Material biológico: tejido del material a analizar

Materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL, tubos de reacción tipo eppendorf de 2,0 mL, juego de micropipetas (rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL), puntas para micropipetas (rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL), vasos de precipitados, celda de cuarzo para espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico, gradilla para tubos de 15 mL y de 2,0 mL, espátula, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio), toallas de papel absorbente, balón aforado de 1,0 L, y magnetos.

Equipos: Agitador horizontal, centrífuga refrigerada, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, cabina de extracción, agitador tipo vórtex, potenciómetro, plancha de agitación magnética, tanque para transporte de nitrógeno líquido.

Reactivos: Todos los reactivos son grado analítico. Nitrógeno líquido, acetona, agua destilada, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de sodio, PVP-40 (Polivinilpirrolidona), soluciones de HCl y NaOH para ajustar pH, ácido sulfúrico concentrado, permanganato de potasio, oxalato de potasio, peróxido de hidrógeno 30% (v/v).

Preparación de reactivos:

Acetona 80 % (v/v): A 1,0 L de acetona agregar 5,0g de Na_2SO_4 anhidro por 24 a 36 horas con el fin de retirar el agua que pueda estar presente en el solvente (Vogel 1989). Posteriormente dejar decantar el sólido, tomar 80 mL de acetona y aforar a 100 mL con agua destilada, homogenizar y almacenar a -10°C .

Buffer de extracción enzimática. Fosfato de sodio 110 mM pH 7,2 PVP-40 3,8% (p/v): Pesar 0,9568 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM 173,98 g/mol), Na_2HPO_4 0,7808 (PM

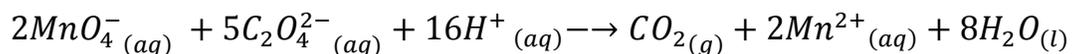
141,97 g/mol), 3,82 g PVP-40. El conjunto se disuelve en 80 mL de agua destilada fría en un vaso de precipitado. Agitar hasta disolución completa. Luego, con ayuda del potenciómetro ajustar a pH 7,2 con HCl 0,1 N, y llevar a un volumen de 100 mL con agua destilada. Conservar a 4 °C. Se recomienda su uso hasta por 15 días.

Buffer para determinación de actividad enzimática CAT. Fosfato de sodio 50 mM pH 7,6: Pesar $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,2477 g (PM 173,98 g/mol), Na_2HPO_4 0,5077 g (PM 141,96 g/mol). Disolver el conjunto en 80 mL de agua destilada fría en un vaso de precipitado. Agitar hasta disolución completa. Luego ajustar pH a 7,6 con HCl 0,1 N, llevar a un volumen de 100 mL con agua destilada fría. Conservar a 4 °C.

H_2O_2 3% (v/v) (1,235M, d = 1,10 kg/L) en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,6: Tomar 10 mL de H_2O_2 30% (v/v) y llevarlos a 100 mL con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,6. Para conservar el reactivo se debe mantener a 4°C. Usar solución recién preparada.

Solución 10 mM de KMnO_4 : Pesar 0,80g de KMnO_4 (PM 158,03 g/mol) en un vaso de precipitados de 500mL. Disolver en aproximadamente 300 mL de agua. Agitar durante 36 horas a 37°C. Dejar en reposo a temperatura ambiente y en la oscuridad por 1 ó 2 días. Filtrar a través de un embudo con lana de vidrio (no usar papel). Transferir cuantitativamente a un balón aforado de 500 mL y completar volumen. Almacenar en un frasco ámbar en oscuridad.

Estandarización de la solución de KMnO_4 : pesar 0,0300g de oxalato de potasio, disolver en 10 mL de agua dispuestos en un Erlenmeyer. Adicionar 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y homogenizar. Calentar el Erlenmeyer con su contenido sin permitir la ebullición de la solución. Titular el contenido del Erlenmeyer con la solución de permanganato de potasio (KMnO_4) 10 mM con calentamiento y agitación contante. Este procedimiento se realiza por triplicado. La concentración del KMnO_4 se expresará en mM. La reacción de la estandarización corresponde a:



Metodología

Preparación de muestras: Las muestras son el tejido de interés a analizar. Para el caso, macerar hojas frescas sin nervaduras con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino y conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Procesamiento de muestras: Pesar 0,1000g de macerado (anotar en el cuaderno de laboratorio el peso exacto), en un tubo de reacción tipo eppendorf de 2,0 mL, cubierto con papel aluminio y rotulado, trabajar sobre cama de hielo. Realizar procedimiento por triplicado. Adicionar 1,5 mL de acetona 80% v/v a -10°C (Lichtenhaler, 1987). Mezclar en vórtex por dos minutos. Asegurar el completo contacto del material vegetal con la acetona. Centrifugar durante tres minutos, a 8000 rpm y 4°C. Retirar el sobrenadante usando una micropipeta y colocarlo en un frasco ámbar rotulado y cubierto con papel aluminio, este proceso debe realizarse hasta obtener lavados incoloros. Transferir el sedimento a un tubo de reacción tipo falcon de 15 mL con lavados sucesivos con buffer fosfato de sodio 110mM pH 7,2 que contiene PVP-40, hasta completar 4,4mL. Agitar durante una hora sobre cama de hielo (4 °C) en agitador horizontal. Centrifugar una hora a 6000rpm y 4°C. Separar el sobrenadante (extracto proteico) para la determinación de proteína total y actividad enzimática catalasa. No se recomienda medir la actividad enzimática en un día diferente al de la extracción.

Determinación de la actividad enzimática catalasa: En el momento de la determinación las soluciones para determinar actividad enzimática y el extracto enzimático (por un tiempo máximo de 5min) se deben colocar entre 37-38°C, temperaturas fuera de este rango conducen a resultados poco reproducibles.

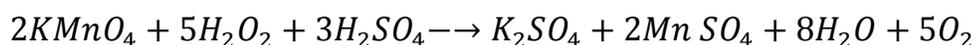
Determinación del peróxido remanente: En tres tubos de ensayo de vidrio colocar 1mL de buffer fosfato de sodio 50mM pH 7,6. Adicionar 250 µL de extracto enzimático. Adicionar 600 µL de H₂O₂ 3 % (v/v) (1,235M), en este momento inicia la reacción enzimática de descomposición del H₂O₂ por CAT. Después de cinco minutos exactos adicionar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, para desnaturalizar la enzima y detener la reacción. Previamente calentar un erlenmeyer que contenga 10 mL de agua destilada y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado hasta notar un reflujo en las paredes pero sin dejar llegar a la ebullición (70-75 °C). Verter el contenido del tubo de ensayo en el erlenmeyer. Titular gota a gota el contenido del erlenmeyer caliente con permanganato de potasio (KMnO₄) 10mM estandarizado.

Determinación del peróxido disponible: Se debe realizar un ensayo para conocer la cantidad inicial disponible de peróxido de hidrógeno, para lo cual se hace el mismo procedimiento que para el peróxido remanente (por triplicado), exceptuando, que antes de adicionar el extracto se adiciona 1 mL de ácido sulfúrico concentrado con el fin de inactivar la enzima.

La actividad específica de CAT UAE_{CAT} se reporta como:

$$UAE_{CAT} = \frac{\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2}{\text{minutos} \times \text{mg proteína}}$$

La reacción involucrada en la titulación se muestra a continuación:



Ejemplo de cálculos relacionados con la estandarización del $KMnO_4$ (Tabla 13)

Para el ejemplo de cálculo se toma la primera fila de la tabla 13, en donde se muestran los resultados para el triplicado del procedimiento. En primer lugar se deben calcular las moles de oxalato de potasio ($K_2C_2O_4$) que reaccionan con el permanganato de potasio ($KMnO_4$), para lo cual se divide la masa de $K_2C_2O_4$ por el peso molecular del compuesto.

$$0,0132 \text{ g } K_2C_2O_4 \times \frac{1 \text{ mol } K_2C_2O_4}{166,24 \text{ g } K_2C_2O_4} = 7,94 \times 10^{-5} \text{ mol } K_2C_2O_4$$

Tabla 13. Estandarización del permanganato de potasio con oxalato de potasio

Masa Oxalato de Potasio (g)	Volumen de $KMnO_4$ (mL)	Moles de Oxalato de potasio	Moles de Permanganato de potasio	Concentración Permanganato de potasio (mM)	Concentración Permanganato de potasio promedio (mM)
0,0132	4,24	$7,94 \times 10^{-5}$	$3,18 \times 10^{-5}$	7,49	7,34
0,0138	4,78	$8,30 \times 10^{-5}$	$3,32 \times 10^{-5}$	6,95	
0,0131	4,15	$7,88 \times 10^{-5}$	$3,15 \times 10^{-5}$	7,60	

Como muestra la reacción de estandarización por 2 moles de $KMnO_4$ reaccionan 5 moles de $K_2C_2O_4$, entonces las moles de $KMnO_4$ que reaccionan corresponden a:

$$7,95 \times 10^{-5} \text{ mol } K_2C_2O_4 \times \frac{2 \text{ mol } KMnO_4}{5 \text{ mol } K_2C_2O_4} = 3,18 \times 10^{-5} \text{ mol } KMnO_4$$

Los cuales están en un volumen de 4,24 mL (volumen gastado durante la titulación), por lo tanto para la calcular la concentración de $KMnO_4$ se dividen las moles en reacción en éste volumen en litros (0,00424 L):

$$\frac{3,18 \times 10^{-5} \text{ mol } KMnO_4}{0,00424 \text{ L}} = 7,49 \times 10^{-3} \text{ M} = 7,49 \text{ mM}$$

En la tabla 13 se hace el mismo cálculo para las tres filas, y se promedian los resultados en la última columna. El valor promedio de estas concentraciones es la concentración del permanganato de potasio que será usada para las determinaciones de actividad de catalasa.

Ejemplo de cálculos relacionados con determinación de actividad CAT:

Determinación del peróxido disponible antes de la reacción:

Los resultados de las titulaciones para la determinación del peróxido disponible antes de la reacción se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Determinación de la cantidad de peróxido de hidrógeno disponible antes de la reacción por titulación con permanganato de potasio estandarizado

Vol. H_2O_2 (μ L)	Volumen permanganato de potasio (mL)			Promedio de Volumen de permanganato de potasio (mL)
250	12,51	12,25	12,66	12,47

Para calcular las moles de $KMnO_4$ que reaccionaron con el H_2O_2 se multiplica la concentración del $KMnO_4$ (7,34 mM) por el volumen promedio de titulación en litros, $12,47 \times 10^{-3}$ L.

$$7,34 \frac{\text{milimol } KMnO_4}{L} \times 12,47 \times 10^{-3} \text{ L} = 9,15 \times 10^{-2} \text{ milimol de } KMnO_4$$

Para conocer las moles de H_2O_2 que reaccionaron se utiliza la relación de 2:5 entre $KMnO_4$ y H_2O_2 :

$$9,15 \times 10^{-2} \text{ milimol de } KMnO_4 \times \frac{5 \text{ milimol } H_2O_2}{2 \text{ milimol } KMnO_4}$$

$$= 0,229 \text{ milimol } H_2O_2 \text{ Disponible}$$

Determinación del peróxido remanente:

Los resultados de las titulaciones para la determinación del peróxido remanente se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Volúmenes de permanganato consumidos en la titulación de H_2O_2 remanente de la reacción enzimática

Vol. H_2O_2 (μL)	Volumen permanganato de potasio (mL)			Volumen Promedio (mL)
250	4,56	4,25	4,31	4,37

Para calcular la cantidad de peróxido remanente de la reacción enzimática se multiplica el promedio de los volúmenes consumidos de permanganato de potasio (4,37 mL) por la concentración del permanganato de potasio:

$$7,34 \frac{\text{milimol } KMnO_4}{L} \times 4,37 \times 10^{-3} L = 3,21 \times 10^{-2} \text{ milimol } KMnO_4$$

Ya que la relación entre $KMnO_4$ y H_2O_2 es de 2:5, la cantidad de peróxido que no reaccionó es:

$$3,21 \times 10^{-2} \text{ milimol } KMnO_4 \times \frac{5 \text{ milimol } H_2O_2}{2 \text{ milimol } KMnO_4}$$

$$= 8,02 \times 10^{-2} \text{ milimol } H_2O_2 \text{ Remanente}$$

Determinación actividad CAT:

La diferencia entre el peróxido de hidrógeno disponible y el remanente da como resultado el peróxido consumido por la enzima CAT:

$$0,229 \text{ milimol } H_2O_2 \text{ Disponible} - 8,02 \times 10^{-2} \text{ milimol } H_2O_2 \text{ Remanente}$$

$$= 0,149 \text{ milimol } H_2O_2 \text{ Consumido} = 149 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ Consumido}$$

La unidad de actividad enzimática catalasa (UA_{CAT}), se define como:

$$UA_{CAT} = \frac{\mu mol \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Consumido}}{\text{minuto}}$$

De manera que para el ejemplo la actividad enzimática corresponde a:

$$UA_{CAT} = \frac{149 \mu mol \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Consumido}}{5 \text{ minutos}} = 29,8 \frac{\mu mol \text{ H}_2\text{O}_2}{\text{minuto}}$$

La actividad específica de la CAT (UAE_{CAT}) está dada por:

$$UAE_{CAT} = \frac{\mu mol \text{ H}_2\text{O}_2}{\text{minuto} \times \text{mg proteína}}$$

Por tanto es necesario conocer la cantidad de proteína en 250 μ L de extracto que se usaron en la determinación, para esto se usa la metodología ya presentada previamente en este libro (Ensayo 4, Capítulo 10). En el ejemplo propuesto se encontró que en 200 μ L de extracto hay 3,62 μ g de proteína, por tanto para 250 μ L hay 4,50 $\times 10^{-3}$ mg de proteína. Así, la UAE_{CAT} es:

$$UAE_{CAT} = 29,8 \frac{\mu mol \text{ H}_2\text{O}_2 / \text{minuto}}{4,52 \times 10^{-3} \text{ mg proteína}} = 6,59 \times 10^3 \frac{\mu mol \text{ H}_2\text{O}_2}{\text{minuto} \times \text{mg proteína}}$$

Ensayo 6. Determinación de la actividad enzimática peroxidasa (POD)

La actividad enzimática peroxidasa se determina por medio del método modificado de *o*-dianisidina/peróxido (Dalisay y Kúc 1995; Kireyko *et ál.* 2006). La POD usa en su proceso catalítico una molécula de peróxido de hidrógeno la cual escinde homolíticamente (donor de electrones) y produce dos radicales hidroxilo que reaccionan con dos moléculas de *o*-dianisidina (donor de protones), formado un compuesto coloreado que puede ser seguido a 436 nm.

La unidad de actividad enzimática específica peroxidasa (POD) se define como:

$$U_{POD} = \frac{\Delta A \text{ 436 nm}}{\Delta \text{minuto} \times \text{mg Material Vegetal}}$$

La actividad enzimática total es la unidad de actividad por g de material vegetal fresco.

Materiales

Material biológico: Tejido del material a analizar

Materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL fondo cónico, tubos de reacción tipo eppendorf de 2,0 mL fondo cónico, juego de micropipetas (rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L), puntas para micropipetas (rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L), vasos de precipitados, celda de cuarzo para espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico, gradilla para tubos de 15 mL y de 2,0 mL, espátula, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas, máscara antigases), cabina de extracción, toallas de papel absorbente, balón aforado de 1L y magnetos.

Equipos: Agitador horizontal, centrífuga refrigerada, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, cabina de extracción, agitador tipo vórtex, potenciómetro, plancha de agitación magnética, tanque para transporte de nitrógeno líquido.

Reactivos: Todos los reactivos son grado analítico. Nitrógeno líquido, polivinilpirrolidona (PVPP), acetona, agua destilada, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de sodio, PVP-40 (Polivinilpirrolidona), soluciones de HCl y NaOH para ajustar pH, peróxido de hidrógeno 30% (v/v), o-dianisidina, metanol.

Preparación de reactivos:

Acetona 80 % (v/v): Se pone a secar acetona (1L/5 g Na_2SO_4) por 24-36 horas (Vogel 1989). Tomar 80 mL de acetona y aforar a 100 mL con agua destilada. Homogenizar y almacenar a -10°C .

Buffer de extracción enzimática. Fosfato de sodio 110 mM pH 7,2 PVP-40 3,8% (p/v): Pesar 0,9568 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM 173,98 g/mol), Na_2HPO_4 0,7808 (PM 141,97 g/mol), 3,82 g PVP-40. El conjunto se disuelve en 80 mL de agua destilada fría en un vaso de precipitado. Agitar hasta disolución completa. Luego, con ayuda del potenciómetro ajustar a pH 7,2 con HCl 0,1 N, y llevar a un volumen de 100 mL con agua destilada. Conservar a 4°C . Se recomienda su uso hasta por 15 días desde que se conserve en refrigeración.

Buffer actividad enzimática POD - Fosfato de sodio 100 mM pH 6,8: Pesar $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,2444 g (PM 173,98 g/mol), Na_2HPO_4 0,4042 g (PM 141,97 g/mol), y el conjunto se deposita en un vaso de precipitados y se disuelve en 80 mL

de agua destilada fría. Agitar hasta disolución completa. Luego ajustar pH a 6,8, llevar a un volumen de 100 mL con agua destilada fría y conservar a 4 °C.

o-dianisidina (0,5 mg /mL): Disolver 0,0010g de *o*-dianisidina en 2 mL de metanol, conservar en frasco ámbar, usar la solución recién preparada y por no más de seis horas. Tener cuidado en el manejo del reactivo pues es cancerígeno, se puede adecuar la técnica utilizando sustratos alternativos como el guaiacol.

H₂O₂ 3% (v/v) (1,235M) en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,8: Tomar 10 mL de H₂O₂ 30% (v/v) y llevarlos a 100 mL con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,6. Conservar en frasco ámbar a 37-38 °C. Usar solución recién preparada.

Metodología

Preparación de muestras: Las muestras son el tejido de interés a analizar. Para el caso, macerar hojas frescas sin nervaduras con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino y conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Procesamiento de muestras: Pesar 0,1000g de macerado en un tubo de reacción de 2,0 mL tipo eppendorf de fondo cónico, cubierto con papel aluminio y rotulado (procedimiento por triplicado), anotar en el cuaderno de laboratorio la masa exacta. Agregar 0,0220 g de PVPP (22,0% p/p), en referencia a la masa de material vegetal) a cada tubo, adicionar 1,5 mL de acetona 80% v/v a -10°C (Lichtenthaler 1987). Mezclar en vórtex por dos minutos sobre cama de hielo, asegurándose del completo contacto del material vegetal con la acetona. Centrifugar durante tres minutos, a 8000 rpm y 4°C. Retirar el sobrenadante usando una micropipeta y colocarlo en un frasco ámbar rotulado y cubierto con papel aluminio, este proceso debe realizarse hasta obtener lavados transparentes. Transferir el sedimento a un tubo de reacción tipo falcon de 15mL con lavados sucesivos en buffer fosfatos de sodio 100mM, 3,82% p/v PVP-40, pH 7,2 hasta completar 2,0mL a 4 °C (Este volumen final dependerá de la concentración del metabolito que se encuentre en la muestra, 2,0 mL es para una baja concentración). Agitar durante una hora sobre cama de hielo (4 °C) en constante agitación en agitador horizontal. Centrifugar una hora entre 8000 a 10000 rpm y 4°C. Separar el sobrenadante (extracto enzimático) para la determinación de proteína total y actividad enzimática peroxidasa. No se recomienda medir la actividad enzimática en un día diferente al de la extracción.

Determinación de la actividad enzimática peroxidasa: En el momento de la determinación las soluciones y el extracto enzimático se deben colocar entre 37-38°C, la cual es la temperatura de trabajo óptima de la enzima. En la celda de cuarzo para el espectrofotómetro adicionar 340 µL de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,8, 30 µL de *o*-dianisidina 0,5 mg/mL y agitar la mezcla. Añadir 150 µL de extracto enzimático y agitar la mezcla. Adicionar 80 µL de H₂O₂ 500 mM previamente estandarizado, agitar rápidamente volcando la celda previamente tapada. Leer absorbancia a 460 nm cada cinco segundos durante 120 segundos. El blanco es: 80 µL de H₂O₂ 50 mM, 490 µL de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,8, 30 µL de *O*-dianisidina 0,5 mg/mL. La actividad se reporta como el cambio de la absorbancia por minuto por miligramo de proteína.

Ejemplo de cálculo para la determinación de la actividad POD: Los resultados del seguimiento espectrofotométrico se muestran en la tabla 16, posteriormente se procede a graficar la absorbancia a 436 nm en el eje Y, y el tiempo en segundos en el eje X (Figura 5), la pendiente de esta gráfica corresponde al $\Delta A_{436nm} / \Delta t$, que presenta las unidades $\Delta A_{436nm} / \text{segundo}$ el cual se usa en el cálculo de la actividad.

Tabla 16. Seguimiento espectrofotométrico de la determinación POD.

Tiempo (segundos)	Absorbancia 436 nm
0	0,066
5	0,074
10	0,080
15	0,093
20	0,115
25	0,117
30	0,153
35	0,159
40	0,167
45	0,181
50	0,194
55	0,203

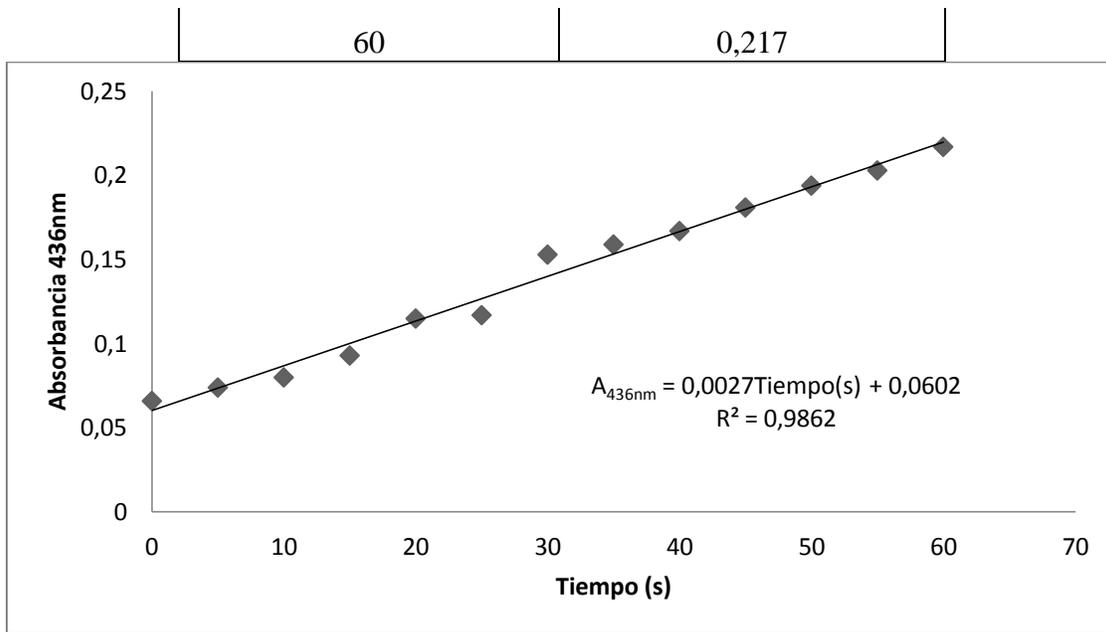


Figura 5. Seguimiento espectrofotométrico de la determinación POD.

La unidad de actividad enzimática peroxidasa (POD) se define como:

$$UA_{POD} = \frac{\Delta A_{436\text{ nm}}}{\Delta \text{minuto}}$$

Remplazando la pendiente de la figura 5:

$$UA_{POD} = \frac{\Delta A_{436\text{ nm}}}{\Delta \text{minuto}} = \frac{0,0027}{\text{segundo}} \times \frac{60 \text{ segundos}}{1 \text{ minuto}} = 0,162 \frac{\Delta A_{436\text{ nm}}}{\text{minuto}}$$

$$UA_{POD} = 0,162 \frac{\Delta A_{436\text{ nm}}}{\text{minuto}}$$

La actividad específica de la POD (UAE_{POD}) está dada por:

$$UAE_{POD} = \frac{\Delta A_{436\text{ nm}}}{\Delta \text{minuto} \times \text{mg Proteína}}$$

Por tanto es necesario conocer la cantidad de proteína en 30 μ L de extracto que se usaron en la determinación, para esto se usa la metodología ya presentada

anteriormente en este libro (Ensayo 4, capítulo 10). En el ejemplo propuesto se encontró que en 200µL de extracto hay 3,62µg de proteína, por tanto para 30µL hay $5,43 \times 10^{-4}$ mg de proteína. Así, UAE_{POD} es:

$$UAE_{POD} = 0,162 \frac{\Delta A_{436nm} / \text{minuto}}{5,43 \times 10^{-4} \text{mg proteína}} = 298 \frac{\Delta A_{436nm}}{\Delta \text{minuto} \times \text{mg Proteína}}$$

Ensayo 7. Determinación de la actividad enzimática ascorbato peroxidasa (APX)

La actividad enzimática ascorbato peroxidasa (APX) se determina mediante el método de ascorbato/peróxido propuesto por Nakano y Asada (1981) con algunas modificaciones. El proceso consiste en el seguimiento espectrofotométrico del ascorbato en su paso a monodehidroascorbato y dehidroascorbato a 290 nm.

Las plantas poseen una serie de isoformas de la APX que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno usando ascorbato como sustrato (Asada 1992).

La unidad de actividad enzimática ascorbato peroxidasa (**APX**) se define como:

$$UA_{APX} = \frac{\mu\text{moles ascorbato oxidado}}{\text{minuto}}$$

La actividad enzimática específica es la unidad de actividad por miligramo de proteína.

Materiales

Material biológico: Tejido del material a analizar

Materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL, tubos de reacción tipo eppendorf de 2,0 mL, juego de micropipetas (rangos de 2 a 20 µL, 20 a 200 µL y 100 a 1000 µL), puntas para micropipetas (rangos de 2 a 20 µL, 20 a 200 µL y 100 a 1000 µL), vasos de precipitados, balón aforado de 1L, celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico para espectrofotómetro, gradilla para tubos de 15 mL y de 2,0 mL, espátula, mortero, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas, máscara antigases), toallas de papel secante, magnetos.

Equipos: agitador horizontal, centrífuga refrigerada, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, cabina de extracción, agitador tipo vórtex, potenciómetro, tanque para transporte de nitrógeno líquido, plancha de agitación magnética.

Reactivos grado analítico: Nitrógeno líquido, polivinilpirrolidona (PVPP), acetona, agua destilada, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de sodio trihidratado, PVP-40 (Polivinilpirrolidona), soluciones de HCl y NaOH para ajustar pH, ácido sulfúrico concentrado, peróxido de hidrógeno 30% (v/v), ascorbato de sodio, ácido ascórbico, EDTA- Na_2 , fenilmetilsulfonilfluoruro-PMSE.

Preparación de reactivos:

Buffer de extracción APX. Fosfato de sodio 100 mM pH 7,8, ascorbato de sodio 2 mM, PMSF 0,5 mM, EDTA- Na_2 1 mM: Pesar en oscuridad 0,9680 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM 173,98 g/mol) y 0,7717 g de Na_2HPO_4 (PM 141,96 g/mol), 0,0087 g de PMSF (PM 174,19 g/mol), 0,0393g de ascorbato de sodio (PM 198,11 g/mol), 0,0380g de EDTA- Na_2 (PM 372.23 g/mol), colocar en un vaso de precipitados y disolver con 80 mL de agua destilada fría. Agitar hasta disolución completa en oscuridad. Ajustar a pH 7,8, aforar a 100 mL con agua destilada fría. Conservar en un frasco ámbar cubierto con papel aluminio, a 4 °C. Utilizar en el mismo día de preparación. Evitar que la solución se caliente. Si la solución presenta tono amarillento no se debe usar pues se altera el proceso de extracción y se pueden presentar resultados poco confiables.

Buffer para determinación de proteína. Fosfato de sodio 100 mM pH 7,8: Pesar 0,6321 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM 173,98 g/mol) y 0,9038 g de Na_2HPO_4 (PM 141,96 g/mol), depositar el conjunto en un vaso de precipitados cubierto con papel aluminio y disolver en 80 mL de agua destilada fría. Agitar hasta disolución completa. Ajustar a pH 7,8, llevar a 100 mL con agua destilada fría. Conservar en un frasco ámbar debidamente rotulado y cubrir con papel aluminio, a 4 °C. Utilizar en el mismo día de preparación.

Buffer para determinación de actividad enzimática. Fosfato de sodio 100 mM pH 7,6: Pesar 0,6321 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM 173,98 g/mol) y 0,9038 g de Na_2HPO_4 (PM 141,96 g/mol). Depositar en un vaso de precipitados. Disolver con 80 mL de agua destilada fría el conjunto de reactivos. Agitar hasta disolución completa. Ajustar a pH 7,5. Aforar a 100 mL con agua destilada fría. Conservar a 4 °C en un frasco debidamente rotulado.

H₂O₂ 3% (v/v) (1,235M) en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,6: Tomar 10 mL de H₂O₂ 30% (v/v) y llevarlos a 100 mL con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,6. Conservar en frasco ámbar a 37-38 °C. Usar solución recién preparada.

Ácido Ascórbico 50 mM: Pesar 0,8800 g de ácido ascórbico (>99%) (PM 175,12 g/mol), evitando el contacto directo con la luz y disolver en 80 mL de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,6, aforar a 100 mL con el mismo buffer. Conservar en un frasco ámbar a -20°C. Tomar espectro de absorción de 200 a 800 nm para controlar la calidad de la solución, registrar absorbancia a 290 nm como control. La solución puede usarse si las unidades de absorbancia no disminuyen más de un 10% de la inicial. Evitar temperaturas mayores a 30°C.

Metodología

Preparación de muestras: Las muestras son el tejido de interés a analizar. Para el caso, macerar hojas frescas sin nervaduras con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino y conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Procesamiento de muestras: Pesar 0,1500g de macerado en un tubo de reacción de 15 mL, cubierto con papel aluminio y rotulado (procedimiento por triplicado). Anotar en el cuaderno de laboratorio la masa exacta. Agregar 0,1350 g de PVPP (90,0% p/p, en referencia a la masa de material vegetal) a cada tubo. Adicionar a cada tubo 4,0 mL de buffer de extracción de APX (fosfato de sodio 100 mM pH 7,8, ascorbato de sodio 2 mM, PMSF 0,5 mM, EDTA-Na₂ 1 mM) a 4 °C. Agitar durante una hora sobre cama de hielo (4 °C) en agitador horizontal. Centrifugar una hora a 6000rpm y 4°C. Separar el sobrenadante (extracto enzimático) para la determinación de proteína total y actividad enzimática ascorbato peroxidasa. No se recomienda medir la actividad enzimática en un día diferente al de la extracción.

Determinación de la actividad enzimática ascorbato peroxidasa: En el momento de la determinación las soluciones y el extracto enzimático se deben mantener entre 25-27°C. En la celda de cuarzo adicionar 50 µL de extracto enzimático. Luego, depositar fuertemente 400 µL de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,6. Agregar 100 µL de ascorbato de sodio 50 mM, y 50 µL de peróxido de hidrógeno 3% (v/v). El volumen final de reacción es 600 µL. Homogeneizar la mezcla y de forma rápida leer absorbancia a 290nm durante 240 segundos cada 10 segundos. La actividad de APX se reporta como µmol de ascorbato oxidado / (minxmg proteína).

Ejemplo de cálculo para la determinación de la actividad APX

La técnica consiste en la medición de la oxidación del ascorbato a mono y dehidroascórbico. El ascorbato tiene $\lambda_{\text{máx}}$ a 290 nm y un coeficiente de extinción (ϵ) de $0,28 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano y Asada 1981). Con lo cual se calcula la concentración de ácido ascórbico en cada muestra medida en el tiempo usando la ley de Beer, como sigue:

$$A = \epsilon \times 1 \text{ cm} \times C$$

$$C = \frac{A}{\epsilon \times 1 \text{ cm}}$$

$$C = \frac{A}{0,28 \times 1 \text{ cm}}$$

Un ejemplo de datos obtenidos se muestra en la tabla 17, tomando como ejemplo el tiempo en 10 segundos (Tabla 17):

$$C = \frac{0,141}{0,28 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = 0,504 \text{ M}$$

Ya que el volumen en reacción de extracto enzimático es de $600 \mu\text{L}$ (6×10^{-4}) se calculan los μmoles de ácido ascórbico en reacción como sigue:

$$0,504 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 6 \times 10^{-4} \text{ L} = 3,02 \times 10^{-4} \text{ mol} = 302 \mu\text{mol ácido ascórbico}$$

Tabla 17. Seguimiento espectrofotométrico de la determinación APX.

Tiempo (seg)	Absorbancia 290 nm	Cantidad de ascorbato μmol
0	0,159	341
5	0,147	315
10	0,141	302
15	0,127	272
20	0,112	240
25	0,103	221
30	0,085	182
35	0,080	171
40	0,064	137

45	0,051	109
50	0,042	90
55	0,030	64
60	0,010	21

La actividad enzimática se expresa en μmoles de ascorbato oxidado /min.

$$UA_{APX} = \frac{\mu\text{mol ascorbato}}{\text{minuto}}$$

Con el valor absoluto de la pendiente de la figura 6 se obtiene las μmoles de ascorbato oxidado/segundo; para transformarlo a las unidades apropiadas se sigue la siguiente ecuación:

$$UA_{APX} = 5,23 \frac{\mu\text{mol}}{\text{segundo}} \times \frac{60 \text{ segundos}}{1 \text{ minuto}} = 314 \frac{\mu\text{mol ascorbato}}{\text{minuto}}$$

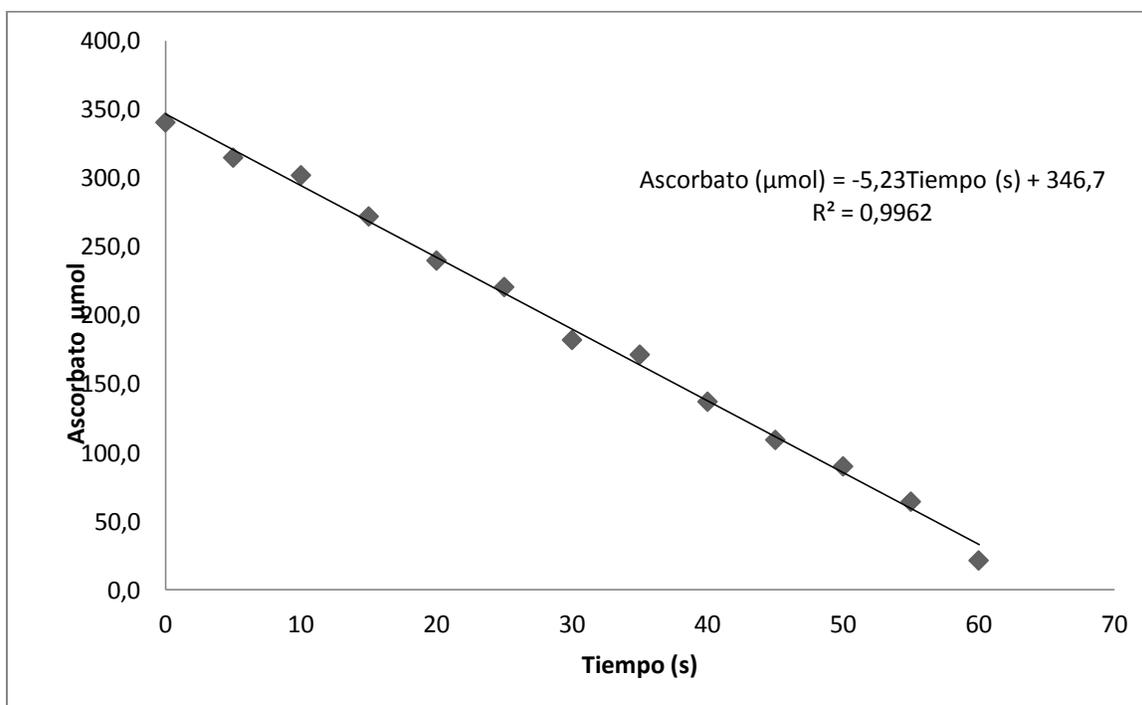


Figura 6. Seguimiento espectrofotométrico de la determinación APX transformando las absorbancias a μmoles de ascorbato oxidado a 290nm.

Para hacer la determinación de la actividad se usa 50 μL de extracto, para conocer la cantidad de proteína en este volumen se usa la metodología ya presentada en este

libro (Ensayo 4, Capítulo 10). En el ejemplo propuesto en la sección de determinación del contenido de proteína se encontró que en 200µL de extracto hay 0,00362mg de proteína, por tanto para 50µL hay $9,04 \times 10^{-4}$ mg de proteína. Por tanto la unidad de actividad específica APX (UAE_{APX}) es:

$$UAE_{APX} = 313,9 \frac{\mu mol \text{ ascorbato} / \text{minuto}}{9,04 \times 10^{-4} \text{ mg proteína}} = 3,47 \times 10^5 \frac{\mu mol \text{ ascorbato}}{\text{minuto} \times \text{mg Proteína}}$$

Ensayo 8. Determinación de la actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD)

La medida de la actividad de SOD presenta un gran problema derivado de la inestabilidad en medios acuosos de su sustrato, el radical superóxido. Por esto, las determinaciones de la actividad de SOD se han tenido que apoyar en la producción de concentraciones constantes del radical superóxido. Por lo tanto, todos los métodos diseñados, que son comúnmente utilizados, necesitan de dos componentes: un generador del radical superóxido, que puede ser enzimático (xantina oxidasa), fotoquímico (riboflavina) o químico (pirogalol); y un detector del mismo, para lo cual se usan ampliamente las sales de tetrazolio como el NBT (nitroblue tetrazolium) (McCord *et al.* 1977).

El generador produce el radical superóxido a una velocidad controlada y constante. En ausencia de la enzima SOD, el radical superóxido se acumula hasta llegar a una concentración tal que la velocidad de reacción con el detector se iguale con la velocidad de producción, consiguiéndose este estado de equilibrio en más o menos un segundo. Si la SOD está presente, compite con el detector por el radical superóxido, produciéndose una disminución del radical captado por el detector, manifestándose en una inhibición del nivel de detección (McCord *et al.* 1977).

La actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) se determina mediante el método desarrollado por Giannopolitis y Ries (1977), propuesto por primera vez por Beauchamp y Fridovich (1971) utilizando NBT como detector del radical superóxido, en presencia de riboflavina que actúa como generador del radical superóxido.

La riboflavina absorbe luz visible, alrededor de los 450 nm, hasta llegar a ser excitada a su estado triplete. En presencia de un sustrato apropiado, como la metionina, la riboflavina se reduce completamente, al mismo tiempo que la metionina se oxida a metional. En presencia de oxígeno, la riboflavina reducida es oxidada de nuevo espontánea y univalentemente al radical flavín, con la formación del anión superóxido (Korycka y Richardson 1978). La reacción total es:



Donde $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$ es la flavina reducida y Fl_{ox} es la flavina oxidada.

Tras la formación del anión superóxido, este reacciona con el NBT con una estequiometría de 4 a 1 respectivamente para formar un mol de diformazan, producto que genera el color y que se detecta por espectrofotometría de absorción a una longitud de onda de 560 nm (Korycka y Richardson 1978), de acuerdo a la siguiente ecuación química:



En presencia de la enzima superóxido dismutasa la reacción anterior es inhibida debido a la competencia por el sustrato (radical superóxido) y por lo tanto la absorbancia de la muestra va a disminuir. Finalmente, se va a cuantificar el porcentaje de esta disminución de absorbancia respecto a una muestra sin enzima SOD, es decir el porcentaje de inhibición de la reacción.

La unidad de actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD), se define como la cantidad de enzima que inhibe la reducción del NBT en un 50% según la definición de Beauchamp y Fridovich (1971).

Según Krishnan *et ál.* (2002) la correlación entre el porcentaje de inhibición y la concentración de enzima no es lineal. Asada *et ál.* (1974) encontraron una relación lineal usando SOD purificada de espinaca, y encontraron la siguiente ecuación:

$$\frac{V}{v} = 1 + k'[\text{SOD}]$$

Por tanto tenemos que:

$$k'[SOD] = \frac{V}{v} - 1$$

Donde V y v representan la absorbancia en ausencia y en presencia de SOD respectivamente. De acuerdo a la definición de que una unidad de actividad es igual al 50 % de inhibición, el producto $k'[SOD]$ es igual a una unidad. Entonces, la actividad enzimática se determina de acuerdo a la ecuación:

$$\text{Actividad Enzimática SOD} = UA_{SOD} = \frac{V}{v} - 1$$

La actividad enzimática específica es la unidad de actividad por miligramo de proteína.

La actividad enzimática total es la unidad de actividad por g de material vegetal fresco.

Materiales

Material biológico: Tejido del material a analizar

Materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL, tubos de reacción tipo eppendorf de 2,0 mL, juego de micropipetas (rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L), puntas para micropipetas (rangos de 2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 100 a 1000 μ L), vasos de precipitados, celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico para espectrofotómetro, gradilla para tubos de 15 mL y de 2,0 mL, espátula, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas, máscara antigases), toallas de papel absorbente, balón aforado de 1L, magnetos, tubos de ensayo de 13 mm por 120 mm de características similares

Equipos: Agitador horizontal, plancha de agitación magnética, cabina de extracción, agitador tipo vórtex, potenciómetro, tanque para transporte de nitrógeno líquido, centrífuga refrigerada, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, lámpara de luz fluorescente de 39 Watts.

Reactivos grado analítico. Nitrógeno líquido, polivinilpolipirrolidona (PVPP), acetona, agua destilada, fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio,

PVP-40 (polivinilpirrolidona), soluciones de HCl y NaOH para ajustar pH, ascorbato de sodio, ácido ascórbico, EDTA-Na₂, fenilmetilsulfonilfluoruro-PMSF, Nitro Blue Tetrazolio NBT, riboflavina, carbonato de sodio, Tris, cianuro de potasio, L-metionina, TEMED, NaCl.

Preparación de reactivos:

Buffer extracción SOD. Tris-HCl 100 mM pH 7,5: Pesar 6,057 g de trisma base (PM 121,14 g/mol) y disolverlos en 300 mL de agua destilada. Ajustar a pH 7,5 con HCl al 10 %, llevar a un volumen de 500 mL. Almacenar en un frasco debidamente rotulado a 4°C.

Buffer para determinación de actividad enzimática. Fosfato de potasio 50 mM pH 7,8: Pesar 0,6941 g de KH₂PO₄ (PM 136,09 g/mol) y 4,5418 g de K₂HPO₄·3H₂O (PM 228,23 g/mol). Disolver en 400 mL de agua destilada fría. Agitar hasta disolución completa. Ajustar a pH 7,8, aforar a 500 mL con agua destilada fría. Conservar en un frasco debidamente rotulado a 4 °C.

Carbonato de sodio 50 mM pH 10 para determinación de actividad enzimática: Pesar 0,530 gramos de carbonato de sodio (PM 106 g/mol) en un vaso de precipitado. Disolver con 80 mL de agua destilada. Ajustar a pH 10 y aforar a 100 mL con balón aforado. Conservar en frasco debidamente rotulado a 4 °C.

Riboflavina 2 µM para determinación de actividad enzimática: La solubilidad de la riboflavina (PM 376,37 g/mol) en agua es de aproximadamente 7,5 mg en 100 mL de agua. Preparar solución stock de riboflavina de una concentración 0,133 mM, para ello pesar 0,0075 g y disolver en 150 mL de agua. A partir de ésta se prepara la solución 2 µM tomando 150 µL de la solución stock y llevando a 10 mL con agua. Las soluciones de riboflavina se almacenan en botellas ámbar debidamente rotuladas a 4 °C.

NBT 75µM para determinación de actividad enzimática: la presentación comercial del reactivo es de 1,0 mg de NBT (PM 817,7 g/mol). Este se disuelve para lograr la concentración requerida con 16,32 mL de agua destilada. La solución se almacena a 4 °C.

Metionina 20 mM para determinación de actividad enzimática: Pesar 0,149 g de metionina (PM 149,21 g/mol), disolver en 40 mL de agua destilada, completar a 50 mL en balón aforado. La solución se almacena en un frasco debidamente rotulado a 4 °C.

Cianuro de potasio 5 mM para determinación de actividad enzimática: Pesar 0,0326 g de cianuro de potasio (PM 65,12 g/mol), en un vaso de precipitado. Disolver en 80 mL de agua destilada y aforar a 100 mL en un balón aforado. La solución se almacena en un frasco debidamente rotulado a 4 °C.

La extracción y determinación se deber realizar en cuarto oscuro.

Metodología

Preparación de muestras: Las muestras son el tejido de interés a analizar. Para el caso, macerar hojas frescas sin nervaduras con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino y conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Procesamiento de muestras: Pesar 0,5000g de macerado en un tubo de reacción de 15 mL tipo falcon, cubierto con papel aluminio y rotulado (procedimiento por triplicado). Anotar en el cuaderno de laboratorio la masa exacta del macerado. Pesar PVPP de tal forma que quede al 5% p/p referidos al peso de la muestra de tejido (0,025g de PVPP) y adicionar sobre el macerado. Mantener las muestras y realizar extracciones sobre cama de hielo. Homogenizar por dos minutos en vórtex. Adicionar sobre la mezcla anterior 14 mL de buffer tris-HCl 100 mM pH 7,5. Incubar durante 2 horas sobre cama de hielo en agitación horizontal. Centrifugar 30 minutos a 6000 rpm y 4°C. Tomar 5 mL del sobrenadante (extracto enzimático) para la determinación inmediata de la actividad SOD. Con el sobrenadante restante determinar la proteína total por el método de Bradford (1976). No se recomienda medir la actividad enzimática en un día diferente al de la extracción.

Determinación de la actividad enzimática SOD: En un tubo de ensayo colocar las cantidades de reactivos señaladas en la tabla 18 para la determinación de la actividad enzimática SOD total, o las de la tabla 19 para la determinación enzimática de la MnSOD.

Tabla 18. Reactivos para determinación de la actividad enzimática SOD total.

Reactivo	Volumen en reacción (µL)	Volumen en Blanco iluminado (µL)
Buffer fosfato	1470	2270

EDTA	100	100
Na ₂ CO ₃	200	200
Riboflavina	100	100
TEMED R.A.	30	30
NBT	800	800
Metionina	500	500
Extracto enzimático	800	0
Total	4000	4000

Tabla 19. Reactivos para determinación de la actividad enzimática Mn-SOD.

Reactivo	Volumen en reacción (μL)	Volumen en Blanco iluminado (μL)
Buffer fosfato	977	2270
EDTA	100	100
Na ₂ CO ₃	200	200
Riboflavina	100	100
TEMED R.A.	30	30
NBT	800	800
Metionina	500	500
KCN	500	500
Extracto enzimático	800	0
Total	4000	4000

Para cada extracto separar tres tubos correspondientes al triplicado de la determinación que van a ser iluminados, y uno más de las mismas características de los anteriores, pero que no va a ser iluminado, el cual servirá como blanco de procedimiento, y finalmente un tubo más el cual no lleva enzima y que será el blanco iluminado que corresponde al 100% de formación del diformazan, sobre el cual se va a cuantificar la actividad enzimática. Colocar los tubos que no van a ser iluminados en la oscuridad (que corresponden al blanco de procedimiento). Colocar los tubos que van a ser iluminados a 5 cm de una lámpara de 39 watos. La reacción empieza cuando se enciende la lámpara. La reacción se termina 30 minutos después apagando la lámpara y cubriendo las muestras con una tela negra. Homogenizar y de

forma rápida leer absorbancia a 560 nm tanto de las muestras iluminadas como de las muestras en oscuridad.

Ejemplo de cálculo para la determinación de la actividad SOD: La tabla 20 muestra los resultados obtenidos de determinación de SOD en muestras de *G. arborea*.

Tabla 20. Absorbancia a 560 nm de las muestras para la determinación de la actividad enzimática de SOD.

Blanco iluminado	Blanco no iluminado	Muestra
0,099	0,116	0,138
0,099	0,116	0,142
-----	-----	0,137
Promedio: 0,099	Promedio: 0,116	Promedio: 0,139

Proceder a restar de la absorbancia obtenida para la muestra, la absorbancia del blanco no iluminado (en el cual no se desarrolla color puesto que no se lleva a cabo la reacción), con esto obtenemos el valor de absorbancia debido a la formación del diformazan en la muestra. A partir de este valor se puede hallar el porcentaje de inhibición mediante la ecuación:

$$\% I = \frac{A \text{ blanco iluminado} - (A \text{ muestra} - A \text{ blanco no iluminado})}{A \text{ blanco iluminado}} \times 100$$

Donde % I es el porcentaje de inhibición. Una unidad de actividad es igual al 50 % de inhibición. Según los datos mostrados en la tabla 20, el porcentaje de inhibición de la muestra:

$$\% I = \frac{0,099 - (0,138 - 0,116)}{0,099} \times 100$$

$$\% I = 76,8 \%$$

La actividad se determina:

$$UA_{SOD} = \frac{V}{v} - 1$$

Donde V y v representan la absorbancia en ausencia y presencia de SOD respectivamente. De la tabla 20 se tiene que:

$$V = 0,099 \text{ (A blanco iluminado)}$$
$$v = A \text{ muestra} - A \text{ blanco no iluminado} = 0,139 - 0,116 = 0,023$$

Entonces:

$$UA_{SOD} = \frac{0,099}{0,023} - 1 = 3,304$$

Para hallar la actividad enzimática específica UAE_{SOD} se divide por la cantidad de proteína en el volumen de extracto usado; por ejemplo, si tenemos que este valor es de 0,193 mg de proteína, entonces:

$$UAE_{SOD} = \frac{3,304}{0,193 \text{ mg proteína}} = 17,112$$

Ensayo 9. Determinación de la actividad enzimática glutatión reductasa (GR)

La Glutatión reductasa, es miembro de la familia de flavoenzimas piridín-nucleótido disulfuro oxidoreductasas, que catalizan la conversión de glutatión disulfuro GSSG (glutatión oxidado) a su forma reducida GSH en presencia de NADPH. La enzima desempeña un papel crucial en mantener la alta relación $[GSH]/[GSSG]$ en el interior de la célula (Arias *et ál.* 2010).

La actividad de la enzima glutatión reductasa se determina siguiendo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm la oxidación de NADPH a $NADP^+$ durante la reducción del glutatión oxidado mediante la siguiente reacción (Figura 7):

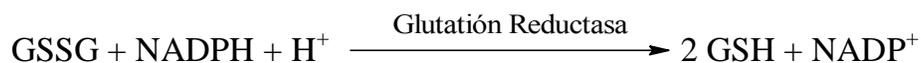


Figura 7. Reacción catalizada por la glutatión reductasa (GR)

La unidad de actividad enzimática glutatión reductasa (GR) se define a 25 °C y pH 7,5 como:

$$UA_{DR} = \frac{\mu\text{mol NADPH oxidado}}{\text{minuto}}$$

La actividad enzimática específica es la unidad de actividad por miligramo de proteína.

Materiales

Material biológico: Tejido del material a analizar.

Materiales: Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL fondo cónico, tubos de reacción tipo eppendorf de 2,0 mL fondo cónico, juego de micropipetas: rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL , puntas para micropipetas: rangos de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL , vasos de precipitados, celda de cuarzo para espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico de 1 mL de volumen, espectrofotómetro, gradilla para tubos de 15 mL y de 2,0 mL, espátula, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas máscara antigases), cabina de extracción, toallas de papel secante, balón aforado de 1L, magnetos.

Equipos: Agitador horizontal, cabina de extracción, agitador tipo vórtex, potenciómetro, tanque para transporte de nitrógeno líquido, centrífuga refrigerada, espectrofotómetro, balanza analítica o semianalítica, plancha magnética, tanque para transporte de nitrógeno líquido.

Reactivos: Todos los reactivos son grado analítico. Nitrógeno líquido, polivinilpirrolidona (PVPP), acetona, agua destilada, fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio, PVP-40 (polivinilpirrolidona), soluciones de HCl y NaOH para ajustar pH, EDTA- Na_2 , NaCl, glutatión oxidado sal sódica, NADPH, DTT.

Preparación de reactivos:

Buffer de extracción GR- Fosfato de potasio 100 mM pH 7,5, EDTA- Na_2 1 mM, DTT 1 mM: Pesar KH_2PO_4 2,3135 g (PM 136,09 g/mol), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7,5316 g (PM 228,23 g/mol), 0,1861g EDTA- Na_2 (PM 372,23 g/mol), 77 mg de DTT (PM 154,25 g/mol), y el conjunto se deposita en un vaso de precipitados y se disuelve en 350 mL agua destilada fría. Se agita hasta disolución completa. Luego se ajusta pH a 7,5, se afora a 500 mL con agua destilada fría. Se conserva a 4 °C.

Buffer para determinación de actividad enzimática-Fosfato de potasio 100 mM pH 7,5 y EDTA- Na_2 1 mM: Pesar KH_2PO_4 2,3135 g (PM 136,09 g/mol), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7,5316 g (PM 228,23 g/mol), 0,1861g EDTA- Na_2 (PM 372,23 g/mol); el conjunto se deposita en un vaso de precipitados y se disuelve en 350 mL de agua destilada fría.

Se agita hasta disolución completa. Luego se ajusta pH a 7,5, se afora a 500 mL con agua destilada fría. Se conserva a 4 °C.

Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato NADPH 2 mM: Pesar 0,0052 gramos de NADPH al 96 % de pureza (833,4 g/mol); disolver en 3 mL de buffer de actividad enzimática. Almacenar en botella ámbar y mantener siempre en hielo. Esta solución se prepara a diario.

Glutación Oxidado (GSSG) 20 mM: Pesar 0,0398 gramos de GSSG al 99 % de pureza (PM 656,6 g/mol), y disolver en 3 mL de buffer de actividad enzimática. Almacenar en botella ámbar. Esta solución se prepara a diario.

Metodología

Preparación de muestras: Las muestras son el tejido de interés a analizar. Para el caso, macerar hojas frescas sin nervaduras con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino y conservar a -80°C hasta su tratamiento final.

Tratamiento de muestras (Yannarelli et ál. 2007): Pesar 0,5000 g de macerado en un tubo de reacción de 15 mL tipo falcon de fondo cónico, rotulado (procedimiento por triplicado). Pesar 0,005 g de PVPP de tal forma que quede al 1% p/p referidos al peso de la muestra y adicionarlos sobre el macerado. Homogenizar por dos minutos en vórtex, sobre cama de hielo. Adicionar sobre la mezcla anterior 5 mL de buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA-Na₂ 1 mM a 4 °C. Homogenizar por dos minutos en vórtex, sobre cama de hielo. Incubar durante una hora sobre cama de hielo en agitador horizontal. Centrifugar 30 minutos a 6000rpm y 4°C. Separar 2 mL de sobrenadante (extracto enzimático) para la determinación inmediata de la actividad GR. Con el sobrenadante restante se determina la proteína total. No se recomienda medir la actividad enzimática en un día diferente al de la extracción

Determinación de la actividad enzimática GR: Incubar los reactivos a utilizar a excepción del NADPH a una temperatura de 25 °C. La solución de NADPH se conserva sobre hielo. En la celda del espectrofotómetro adicionar 450 µL de buffer fosfato 100 mM y EDTA 1mM, 280 µL de agua destilada, 50 µL de GSSG 20 mM, 70 µL de extracto enzimático o agua destilada para el blanco, 50 µL de NADPH 2mM. Homogeneizar la mezcla y de forma rápida leer absorbancia a 340 nm durante 240 segundos cada 10 segundos. La actividad de GR se reporta como µmol de NADPH / (min x mg proteína) (Keles y Oncel 2002).

Ejemplo de cálculo para la determinación de la actividad GR:

Luego de realizar el ensayo se tabula (Tabla 21) y se grafica la absorbancia a 340 nm en el eje Y y tiempo en el eje X, de donde se obtiene una gráfica como la de la figura 8. La pendiente de la curva en esta gráfica representa el cambio en absorbancia por segundo, por lo tanto para hallar el cambio de absorbancia por minuto para hallar la actividad enzimática, se multiplica por el factor de conversión:

$$\frac{0,00013\Delta A_{340nm}}{\text{segundo}} \times \frac{60 \text{ segundos}}{1 \text{ minuto}} = 0,0078 \frac{\Delta A_{340nm}}{\text{minuto}}$$

De la misma forma lo hacemos para el blanco, para el que se tuvo una ecuación de la recta igual a $A_{340 \text{ nm}} = -2 \times 10^{-5}t + 0,408$, el cual tiene una pendiente de 0,0012 $\Delta A_{340}/\text{min}$ realizando el cálculo anterior

Tabla 21. Seguimiento espectrofotométrico de la determinación GR.

Tiempo (s)	A 340 nm
0	0,976
10	0,972
20	0,974
30	0,972
40	0,974
60	0,968
70	0,966
80	0,963
90	0,966
100	0,963
120	0,963
140	0,961
150	0,955
160	0,957
170	0,951
180	0,951
190	0,951
200	0,951

210	0,948
220	0,946
240	0,946

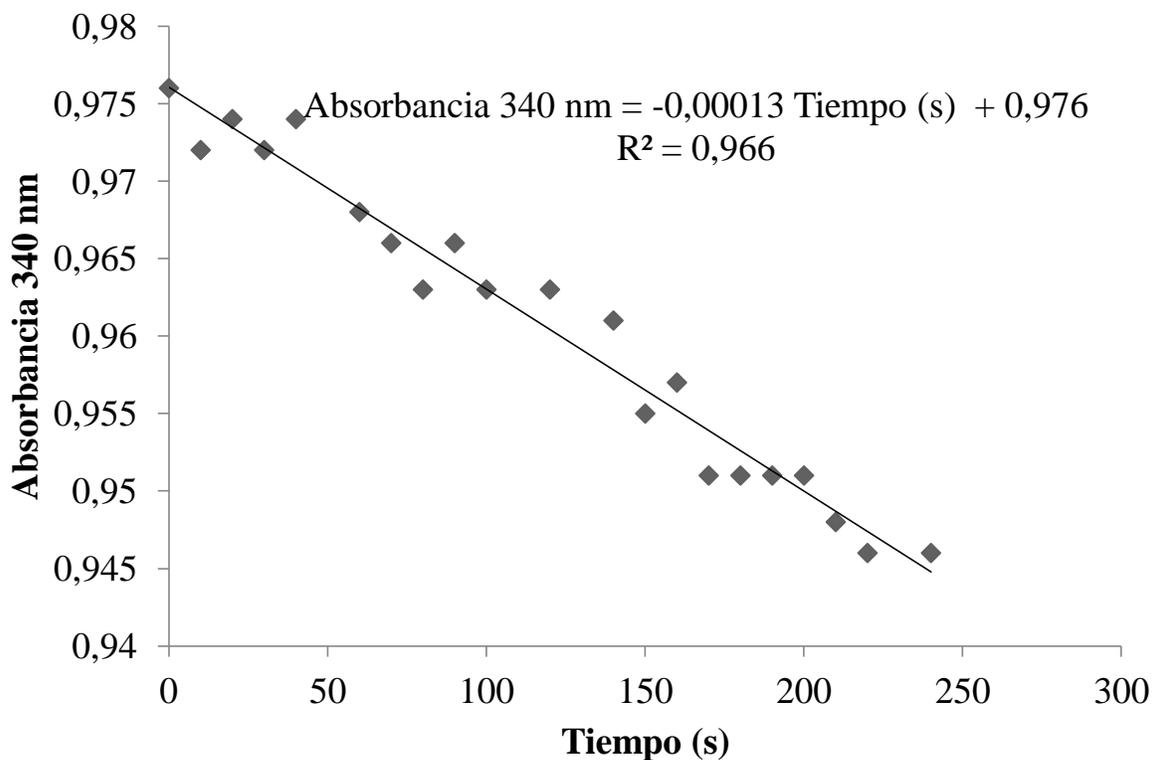


Figura 8. Determinación enzimática Glutación Reductasa.

Para hallar la actividad se utiliza la siguiente ecuación:

$$\frac{Unidad\ GR}{mL\ de\ extracto} = \frac{\left(\frac{\Delta A\ 340nm\ muestra}{min} - \frac{\Delta A\ 340\ blanco}{min} \right) \times 0,9 \times fd}{6,22 \times 0,07}$$

Donde:

0,9 es el volumen final de reacción en mL.

Fd es el factor de dilución (900 μ L de volumen final/70 μ L de extracto = 12,86).

6,22 es el coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm en milimolar.

0,07 es el volumen utilizado de extracto enzimático en mL.

Reemplazando los valores obtenidos tenemos:

$$\frac{\text{Unidad GR}}{\text{mL de extracto}} = \frac{\left(\frac{0,0078}{\text{min}} - \frac{0,0012}{\text{min}}\right) \times 0,9 \times 12,86}{6,22 \times 0,07}$$

$$\frac{\text{Unidad GR}}{\text{mL de extracto}} = 0,175 \frac{\mu\text{moles de NADPH oxidadas}}{\text{min}} \frac{1}{\text{mL de extracto}}$$

Para hallar la actividad enzimática específica dividimos el valor anterior por los miligramos de proteína por mL de extracto, En el ejemplo propuesto se encontró que en 1mL de extracto hay 0,241 mg de proteína, entonces:

$$\frac{\text{Unidad GR}}{\text{mg de proteína}} = \frac{\frac{\text{Unidad GR}}{\text{mL de extracto}}}{\frac{\text{mg de proteína}}{\text{mL de extracto}}}$$

$$\frac{\text{Unidad GR}}{\text{mg de proteína}} = \frac{0,175}{0,241}$$

$$\frac{\text{Unidad GR}}{\text{mg de proteína}} = 0,728 \frac{\mu\text{moles de NADPH oxidadas}}{\text{min}} \frac{1}{\text{mg de proteína}}$$

Para hallar la actividad enzimática total dividimos la actividad enzimática por los gramos de proteína por mL de solución de extracción, el cual es 0,125 ya que se usaron 0,5000 gramos de material vegetal por 4 mL de solución de extracción (0,5000g/4mL = 0,125 g de peso fresco/mL de extracto):

$$\frac{\text{Unidad GR}}{\text{g peso fresco}} = \frac{\frac{\text{Unidad GR}}{\text{mL de extracto}}}{\frac{\text{g de peso fresco}}{\text{mL de extracto}}}$$

$$\frac{\text{Unidad GR}}{\text{g peso fresco}} = \frac{0,175}{0,125}$$

$$\frac{\text{Unidad GR}}{\text{g peso fresco}} = 1,40 \frac{\mu\text{moles de NADPH oxidadas}}{\text{min}} \frac{1}{\text{g peso fresco}}$$

De acuerdo a las metodologías adecuadas y normalizadas determinar algunos osmolitos y enzimas del sistema antioxidantes en material de interés. Analizar resultados y discutir.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP** (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91–94
- Ackerly D, Dudley S, Sultan J, Schmitt JS, Coleman CR, Linder DR, Sandquist MA, Geber AS, Evans TE, Dawson L, Lechowicz MJ** (2000) The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions. *Bioscience* **50**, 979-995
- ADC Bioscientific** (2004) LC Pro + Portable photosystem system instruction manual. UK. 83pp
- Aleric KM, Kirkman LK** (2005) Growth and photosynthetic responses of the federally endangered shrub, *Lindera melissifolia* (Lauraceae), to varied light environments. *American Journal of Botany* **92**, 682-9
- Alexander L, Grierson D** (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2039-2055
- Alique LR, Zamorano R** (2000) Productos vegetales: regulación de los procesos fisiológicos postrecolección. En: Lamúa M (Ed) Aplicación del frío a los alimentos. Madrid Vicente, Ediciones y Mundi-Prensa España, pp 69-104
- Alleva K, Marquez M, Villareal N, Mut P, Bustamante C, Bellati J, Martínez G, Civellos M, Asmodeo G** (2010) Cloning functional characterization and co-expression studies of a novel aquaporine (FaPIP2:1) of a strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany* **61**, 3935-3945

- Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M** (1998) Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and Drainage Paper 56. FAO, Roma 300pp
- Alonso JM, Stepanova AN** (2004) The ethylene signaling pathway. *Science* **306**, 1513-1515
- Alscher R, Neval E, Lenwood SH** (2002) Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1331-1341
- Alvarez-Flórez F, Melgarejo LM, Romero HM, Doucet L** (2006) Protein electrophoretic patterns and anti-freezing activity in the leaf apoplast of the tropical Andean species *Senecio niveoaurus*. *Acta Biológica Colombiana* **11**, 103-111
- Arias DG, Márquez V, Beccaria A, Guerrero SA, Iglesias A** (2010) Purification and characterization of a Glutathione Reductase from *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist* **161**, 91-101
- Asada K, Takahashi M, Nagate N** (1974) Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agricultural and Biological Chemistry* **38**, 471-473
- Asada K** (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia plantarum* **85**, 235-241
- Asada K** (1999) The water – water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 601-639
- Atkin OK, Tjoelker MG** (2003) Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* **8**, 343-351
- Avenidaño CH, Trejo C, López C, Molina JD, Santacruz A, Castillo F** (2005) Comparación de la tolerancia a la sequía de cuatro variedades de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con la acumulación de prolina. *Interciencia* **9**, 560-564
- Azcón-Bieto, Talón M** (2000) Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España. 522 pp
- Baker N** (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 89-113
- Balaguer L** (2004) Ecophysiology. En: Encyclopedia of Plant and Crop Science. Goodman RM ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-4pp
- Bardales XI, Carrillo MP, Hernández MS, Barrera JA, Fernández-Trujillo JP, Martínez O** (2008) Camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*) a new option for productive systems in Colombian Amazonian Region. *Acta horticultrae* **773**, 173-178

- Barón AF, García W, Melgarejo LM, Montenegro LC** (2009) Physiological aspects of *Racomitrium crispipilum* Taylor A. (Jaeger) during dry season in Páramo de Chingaza, Colombia. *Tropical Bryology* **30**, 1-7
- Barrera JA, Orjuela N, Melgarejo LM, Caicedo D, Hernández MS** (2009) Efecto de deficiencias minerales y de la luz en arazá (*Eugenia stipitata*) y copoazú (*Theobroma grandiflorum*). En: Frutas amazónicas: competitividad e innovación. Hernández MS, Barrera J (Compiladores) Editorial Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas **Sinchi, Bogotá, Colombia, pp 11-34**
- Barrera JA, Hernández MS, Melgarejo LM, Martínez O, Fernández-Trujillo JP** (2008) Physiological behavior and quality traits during fruit growth of four Amazonic hot pepper accessions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**, 847-857
- Bartoli CG, Gomez F, Gergoff G, Guiame JJ, Puntarulo S** (2005) Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1269-1276
- Bassham JA, Benson AA, Kay LD, Harris AZ, Wilson AT, Calvin M** (1954) The path of carbon in photosynthesis. XXI The cyclic regeneration of carbon dioxide acceptor. *Journal of the American Chemical Society* **76**, 1760-1770
- Baskin CC, Baskin JM** (2001) Seeds ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. School of Biological Sciences. University of Kentucky, Academic Press San Diego USA. 627 pp.
- Bates LS, Walderen RP, Teare ID** (1973) Rapid determination of free proline in water stress studies. *Plant and Soil* **39**, 205-208
- Bauer G, Weilenmann E, Peretti A, Monterrubianesi** (2003) Germinación y vigor de semillas de soja del grupo de maduración III cosechadas bajo diferentes condiciones climáticas. *Revista Brasileira de Sementes* **25**, 53-62
- Bayona C, Melgarejo LM, Marquinez X, Grajales F** (2005) Fluctuaciones de potencial hídrico, prolina y azúcares reductores en *Espeletopsis corymbosa*. En: Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bonilla A (Ed.). Capítulo **1**, 25-36. Editorial Unibiblos, Universidad Nacional de Colombia

- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276-286
- Beaudry RM** (1999) Effect of O₂ and CO₂ partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharvest Biology and Technology* **15**, 293-303
- Ben-She A, Nelson N** (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 971-982.
- Bewley JD, Black M** (1994) Seeds: Physiology of development and germination. Plenum press, New York, 445pp
- Bilger W, Björkman O** (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* **25**, 173-85
- Björkman O, Demmig B** (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**, 489-504
- Black M, Bradford KJ, Vasquez-Ramos J** (2000) Seed biology advances and applications. CABI Publishing, 508 pp
- Borecký J, Nogueira FTS, Oliveira KAP, Maia IG, Vercesi AE, Arruda P** (2006) The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 849-864
- Bourguignon F, Chakravarty SR** (2003) The measurement of multidimensional poverty. *Journal of Economic Inequality* **1**, 25-49
- Bradford KJ, Nonogaki H** (2007) Seed development, dormancy and germination. Blackwell publishing, oxford, UK, 307 pp
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254
- Breda NJ** (2003) Ground-based measurements of leaf area index: a review of methods, instruments and current controversies. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2403-2417
- Brosché M, Overmyer K, Wrzaczek M, Kangasjarvi M, Kangasjarvi S** (2010) Stress signaling: reactive oxygen species (ROS). En: Pareek A, Sopory HJ, Bohnert HJ, Govindjee (eds). Biotic stress adaptation in plants: physiological, molecular and genomic foundation. Springer Dordrecht, The Netherlands, pp 91-102

- Browse J** (2009) Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 183-205
- Browse J, Howe GA** (2008) New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiology* **146**, 832-838
- Brugière N, Dubois F, Limami AM, Lelandais M, Roux Y, Sangwan RS, Hirel B** (1999) Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant cell* **11**, 1995-2011
- Campbell GS** (1986) Extinction coefficients for radiation in plant canopies using an ellipsoidal inclination angle distribution. *Agricultural and forest meteorology* **36**, 317-321
- Carpena X, Soriano M, Klotz MG, Duckworth HW, Donald LJ, Melik-Adamyan W, Fita I, Loewen PC** (2003) Structure of the class 1 catalase, CatF of *Pseudomonas syringae*, at 1.8 Å resolution. *Proteins: structure, function, and genetics* **50**, 423-436
- Carreras ME, Pascualides AL, Planchuelo AM, Carvalho NM, Nakagawa J** (1983) Comportamiento germinativo de las Sementes: ciencia, tecnologia e producao. Fundacao Cargill, Campinas. 429 pp
- Castelfranco P, Beale S** (1983) Chlorophyll biosynthesis: recent advanced and areas of current interest. *Annual Review of Plant Physiology* **34**, 241-276
- Castellanos C, Barrera J, Hernández MS, Melgarejo LM, Carrillo M, Rodríguez L, Martínez O** (2009) Efecto de la densidad de plantación sobre el crecimiento, producción y calidad de cinco accesiones de ají (*Capsicum* spp) cultivadas en la Amazonia Occidental Colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* **3**, 95-109
- Castro E, Hernández MS, Melgarejo LM, Carrillo MP, Martínez O, Fernández-Trujillo JP** (2009) Physiological behavior and quality during growth of purple passion fruit. 8th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene. Ithaca, NY, EEUU, Libro de resúmenes (CD)
- Chapin III FS** (1980) The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematic* **11**, 233-260

- Chen JM, Rich PM, Gower ST, Norman JM, Plummer S** (1997) Leaf area index of boreal forests: theory, techniques and measurements. *Journal of Geophysical Research* **102**, 429-443
- Christmann A, Weiler E, Steudle E, Grill E** (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal* **52**, 167-174
- Clarkson D, Hanson T** (1980) The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 239-298
- Colmenares S, Romero HM, Melgarejo LM** (En revisión). Balance hídrico e intercambio de gases de *Abatia parviflora*.
- Coopeland LO, McDonald MB** (1995) Principles of seed science and technology. Kluwer Academic Publishing Third edition, Massachusetts, USA. pp 59-111
- Cooper A** (1979) The ABC of NFT (nutrient film technique). Grower Books. Londres, 181 pp
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic Acid: Emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 651-679
- D'Autréaux B, Toledano M** (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* **8**, 813-821
- Dalisay RF, Kúc JA** (1995) Persistence of reduced penetration by *Colletotrichum lagenarium* into cucumber leaves with induces systemic resistance and its relation to enhanced peroxidase and chitinase activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **47**, 336-341
- Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L** (2010) An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell and Environment* **33**, 1419-1438
- Delouche J, Wayne M, Raspert M, Lienhard M** (1971) Prueba de la viabilidad de la semilla con tetrazol. 1 edición. Mexico/Buenos Aires, 71pp
- Delta T Devices Ltda** (1995) Sunscan Canopy Analysis System. User Manual. Cambridge, UK, 86 pp
- Demmig-Adams BW, Adams III** (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 599-626

- Desai BB, Kotecha PM, Salunkhe DK** (1997) *Seeds Handbook: Biology, Production, Processing, and Storage*. New York Marcel Dekker, Inc., 513pp
- Deutscher M** (1990) Setting Up a Laboratory. In: *Methods in enzymology: Guide to protein purification*. Academic Press, San Diego, USA. **182**, 24-38
- Dewick PM** (2002) *Medicinal Natural Products*. John Wiley and Sons, Ltd. ISBNs: 0471496405 (Hardback); 0471496413 (paperback); 0470846275 (Electronic). Chapter 7) pp 125-127
- Dietz KJ** (2003) Plant peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 93-107
- Dodd IC, Davies WJ** (2010) Hormones and the regulation of water balance. Pp 519-538. En: Davies PJ (Ed) *Plant hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Third Edition. Springer, Netherlands. 802 pp
- Domec JC, King JS, Noormets A, Treasure E, Gavazzi MJ, Sun G, McNulty SG** (2010) Hydraulic redistribution of soil water by roots affects whole-stand evapotranspiration and net ecosystem carbon exchange. *New Phytologist* **187**, 171-183
- Douce R, Neuburger M** (1989) The uniqueness of plant Mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 371-414
- Dry PR, Loveys BR** (1998) Factors influencing grapevine vigour and the potential for control with partial rootzone drying. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **4**, 140-148
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356
- Eberhard S, Finazzi G, Wollman FA** (2008) The Dynamics of Photosynthesis. *Annual Review of Genetics* **42**, 463-515
- Echavarria C, Morilla A, Serrano M** (1988) Cuatro nuevas especies con anatomía foliar tipo Kranz: *Salsola vermiculata* L, *Cyperus capitatus* Vendelli, *Sporobolus pungens* (Schreber) Kunth, *Spartina densiflora* Broung. *Lagascalia* **15**, 527-533
- El-Sharkawy MA, Cock JH, Hernandez AP** (1985) Stomatal response to air humidity and its relation to stomatal density in a wide range of warm climate species. *Photosynthesis Research* **7**, 137-149
- Emerson R, Arnon W** (1932) A separation of the reactions in photosynthesis by means of intermittent light. *Journal of General Physiology* **15**, 391-420

- Etherington JR** (1982) Environment and plant ecology. Willey & Sons. New York, 487 pp
- Evans GC** (1972) The quantitative analysis of plant growth. Studies in ecology. Vol 1 Blackwell Scientific Publication. London 45-68 pp
- Evans JR** (1983) Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* **72**, 297-302.
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Land and water development division (1998) Guide to efficient plant nutrition management. Rome, 28 pp
- Farquhar G, von Caemmerer S, Berry J** (1980) A Biochemical model of photosynthesis CO_2 fixation in leaves of C2 species. *Planta* **149**, 78-90
- Fenner M** (2000) Seeds the ecology of regeneration in plant communities. Second edition. New York, CABI publishing. 410 pp
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**, 501-523
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C** (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 387-415
- Flexas J, Escalona JM, Medrano H** (1998) Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**, 893-900
- Flexas J, Escalona M, Evain S, Gulías J, Moya I, Osmond CB, Medrano H** (2002) Steady-state chlorophyll fluorescence (Fs) measurements as a tool to follow variations of net CO_2 assimilation and stomatal conductance during water-stress in C3 plants. *Physiologia Plantarum* **114**, 231-240
- Flores F, El-Yahyaoui F, de Billerbeck G, Romojaro F, Latché A, Bouzayen M, Pech JC, Ambid C** (2002) Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *Journal of Experimental Botany* **53**, 201-206.
- Flórez V, Fernández A, Miranda D, Chaves B, Guzmán J** (2006) Avances sobre fertirriego en la floricultura Colombiana. 1ª edición. Unibiblos. Bogotá, Colombia, pp 43-52
- Follet RH, Follet RF, Halverson AD** (1992) Use a chlorophyll meter to evaluate the nitrogen status of dryland winter wheat. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **23**, 687-697

- Foth HD, Ellis BG** (1997) Soil Fertility. 2nd Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, 290 pp
- Fournier RA, Maily D, Walter JM, Soudani K** (2003) Indirect measurement of forest canopy structure from *in situ* optical sensors. In: Wulder M, Franklin S (Eds.), Methods for Remote Sensing of Forests: Concepts and Case Studies. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp 77-114
- Fox RH, Piekielek P, MacNeal KM** (1994) Using chlorophyll meter to predict nitrogen fertilizer needs of winter wheat. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **25**, 171-181
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009) Photorespiratory Metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 455-84
- Fryer MJ, Andrews JR, Osborough K, Blowers DA, Baker NR** (1998) Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* **116**, 571-580
- Fujioka S, Yokota T** (2003) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 137-164
- Galmés J** (2006) Ecophysiological traits and their responses to drought in species from the Balearic Islands with different growth forms. PhD Thesis. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universitat de les Illes Balears, España, 365 pp
- Gardner FP, Pearce RB, Mitchell RL** (1985) Physiology of crop plants. Iowa State University press, AIMES, pp187-208
- Gardner FP, Pearce RB, Mitchell RL** (2003) Physiology of crop plants. Blackwell publishing company. Iowa, 326 pp
- Gary C, Jones JW, Tchamitchian M** (1998) Crop modeling in horticulture: state of the art. *Scientia Horticulturae* **74**, 3-20
- Gemel J, Waters-Earhart B, Ellersieck MR, Asfaw A, Krause GF, Puri V, Lower WR** (1997) Photosynthetic electron transport as a bioassay. En: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS. Plants for environmental studies. CRC Press LLC. New York, pp 209-224
- Genty B, Briantais JM, Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**, 87-92

- Geydan T, Melgarejo LM** (2005) Metabolismo ácido de las crasuláceas. *Acta Biológica Colombiana* **10**, 3-15
- Giannopolitis C, Ries S** (1977) Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. *Plant Physiology* **59**, 309-314
- Gierth M, Mäser P** (2007) Potassium transporters in plants – Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. Federation of European Biochemical Societies. *FEBS Letters* **581**, 2348-2356
- Givnish TJ, Montgomery RA, Goldstein G** (2004) Adaptive radiation of photosynthetic physiology in the Hawaiian Lobeliads: light regimes, static light responses, and whole-plant compensation points. *American Journal of Botany* **91**, 228-246
- Godoi S, Takaki M** (2004) Effects of light and temperature on seed germination in *Cecropia hololeuca* Miq. (Cecropiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **47**, 185-191
- Gomes F, Oliva M, Mielke M, Almeida A, Aquino L** (2010) Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. *Scientia Horticulturae* **126**, 379-384
- González L, González-Vilar M** (2001) Determination of relative water content. En: Reigosa, MJ. Handbook of plant ecophysiology techniques. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherland. 452pp.
- Goudriaan JY, Van Laar HH** (1995) Modelling potential growth processes. Textbook with exercises. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 238 pp
- Graves CJ** (1983) The nutrient film technique. *Horticultural Reviews* **5**, 1-44
- Grissom Y, Pilet R** (1984) Cytoplasmic and wall isoperoxidases in growing maize roots. *Journal of Plant Physiology* **18**, 189-199
- Haji T, Yaegaki H, Yamaguchi M** (2003) Softening of stony hard peach by ethylene and the induction of endogenous ethylene by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). *Journal Japan Society Horticultural Science* **72**, 212-217
- Hajlaoui H, El Ayeb N, Garrec J, Denden M** (2010) Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. *Industrial crops and products* **31**, 122-130

- Hare PD, Cress WA** (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**, 79-102
- Hare PD, Cress WA, Van Standen J** (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* **21**, 535-554
- Hatch MD, Slack CR** (1966) Photosynthesis in sugar cane leaves: a new carboxylation reaction and the path of sugar formation. *The Biochemical Journal* **101**, 103-111
- Hatch MD, Slack CR, Johnson HS** (1967) Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar cane and its occurrence in other plant species. *The Biochemical Journal* **102**, 417-422
- Hernández MS, Fernández-Trujillo JP, Martínez O, Barrera J, Watkins CB** (2000) Modified atmosphere packaging of arazá fruit. *Refrigeration Science & Technology Proceedings. Improving Postharvest Technologies of fruits, vegetables and ornamentals*. **2**, 666-673
- Hernández MS, Martínez O, Fernández-Trujillo JP** (2007) Behavior of arazá fruit quality traits during growth, development and ripening. *Scientia Horticulturae* **111**, 220-227
- Hernández MS, Barrera JA, Martínez O, Fernández-Trujillo JP** (2009) Postharvest quality of arazá fruit during low temperature storage. *LWT - Food Science and Technology* **42**, 879-884
- Herramienta para el análisis clásico en el crecimiento vegetal** en <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/content/full/90/4/485>, consultado julio 2009.
- Herrera A, Rengifo E, Tezara W** (2010) Respuestas ecofisiológicas a la inundación en árboles tropicales tolerantes de un iguapó. *Ecosistemas* **19**, 37-51
- Herrero A, Guardia J** (1991) Conservación de frutos. Manual Técnico. Ediciones Mundi prensa. Grafo S.A. Bilbao 409pp
- Herron PM, Gage DJ, Cardon ZG** (2010) Micro-scale water potential gradients visualized in soil around plant root tips using microbiosensors. *Plant, Cell and Environment* **33**, 199-210
- Hessini K, Martínez J, Gandour M, Albouchi A, Soltani A, Abdelly C** (2009) Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water-use efficiency in *Spartina alterniflora*. *Environmental and Experimental Botany* **67**, 312-319

- Hiderman J, Makino A, Kurita Y, Masa T, Ojima K** (1992) Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PS II in senescence. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1209-1214
- Hill R, Bendal F** (1960) Function of the two cytochrome components in chloroplast: a working hypothesis. *Nature* **186**, 136-137
- Hiwasa K, Kinugasa Y, Amano S, Hashimoto A, Nakano R, Inaba A, Kubo Y** (2003) Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *Journal of Experimental Botany* **54**, 771-779
- Hoagland DR, Arnon DI** (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* **347**, 1-32.
- Hossain D, Hanafi M, Talib J, Hamdan J** (2010) Effects of nitrogen, phosphorus and potassium levels on kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Growth and photosynthesis under nutrient solution. *Journal of Agricultural Science* **2**, 49-56
- Howe GA, Jander G** (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 41-66
- Hunt R, Caustor DR, Shipley B, Askew P** (2002) A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany* **90**, 485-488
- Hunt R** (1978) Plant grow analysis. Studies in biology. Number. 96 Edward Arnold publishers, London. 67pp
- Hunt R** (1982) Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold publishers. London, 248 pp
- Hunt R, Warren-Wilson J, Handy DW, Sweeney DG** (1984) Integrated analysis of growth and light interception in winter lettuce. I. analytical methods and environmental influences. *Annals of Botany* **54**, 743-757
- Hunt R** (1990) Basic growth analysis. Academic division of Unwin Hyman. London, 112 pp
- Hunt R, Caustor DR, Shipley B, Askew P** (2002) A Modern Tool for Classical Plant Growth Analysis. *Annals of Botany* **90**, 485-488
- Hunt R (2003) Plant growth analysis: individual plants. En: Thomas B, Murphy DJ, Murray D (Eds.). Encyclopedia of applied plant sciences. Academic Press, London, pp 579-588
- Iyer S, Caplan A** (1998) Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes. *Plant Physiology* **116**, 203-211

- Izumi Y, Okazawa A, Bamba T, Kobayashi A, Fukusaki E** (2009) Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* **648**, 215-225
- J. van der Merwe M, Osorio S, Araújo WL, Balbo I, Nunes-Nesi A, Maximova E, Carrari F, Bunik VI, Persson S, Fernie AR** (2010) Tricarboxylic Acid Cycle Activity Regulates Tomato Root Growth via Effects on Secondary Cell Wall Production. *Plant Physiology* **153**, 611-621
- Jiménez SP, Hernández MS, Carrillo MP, Barrera JA, Martínez O, Fernández-Trujillo JP** (2008) Puntos críticos en la fisiología y la conservación postcosecha de dos mirtáceas amazónicas (arazá y camu camu). X Symposium Nacional y VI Ibérico sobre Maduración y Postcosecha. Zaragoza, España. En: Oria, R., Val, J., Ferrer, A. *Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas*. pp 410-417
- Jiménez-Bremont JF, Becerra-Flora A, Hernández-Lucero E, Rodríguez-Kessler M, Acosta-Gallegos JA, Ramírez-Pimentel JG** (2006) Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum* **50**, 763-766
- Jones C, Jacobsen J** (2001) Plant Nutrition and Soil Fertility. In: Nutrient Management Module No. 2. (ED) *Montana State University – Extension Service*, 12 pp
- Jones HG** (1992) *Plants and Microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge University Press, UK, pp 131-162
- Jones HG, Tardieu F** (1998) Modelling water relations of horticultural crops: a review. *Scientia Horticulturae* **74**, 21–45
- Jones JB Jr** (1983) *A Guide for de hydroponic and soilless culture grower*. Timber press. Portland, 124pp
- Jones JB Jr** (1982) Hydroponics: Its history and use in plant studies. *Journal of Plant Nutrition* **5**, 1003-1030.
- Kadenbach B, Ramzan, R, Wen L, Vogt S** (2010) New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1800**, 205-212

- Kader AA** (1992) Modified atmosphere during transport and storage . En: Kader AA (Ed) *Postharvest technology of horticultural crops*. (2^{ed}) University of California, Oakland pp. 85-92
- Kader AA** (1986) Biochemical and physiological and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology* **5**, 99-104
- Kader AA** (1994) Modified and controlled atmosphere storage of tropical fruits. In: Champ, BR (Ed) *Postharvest handling of tropical fruits: Proceedings of and international conference held at Chiang Mai* ACIAR Proceedings ACIAR, Thailand **50**, 239-249
- Kalacska M, Calvo-Alvarado JC, Sánchez-Azofeifa GA** (2005) Calibration and assessment of seasonal changes in leaf area index of a tropical dry forest in different stages of succession. *Tree Physiology* **25**, 733-744
- Kalaycia M, Torunb B, Ekerb S, Aydina M, Ozturkb L, Cakmak I** (1999) Grain yield, zinc efficiency and zinc concentration of wheat cultivars grown in a zinc-deficient calcareous soil in field and greenhouse. *Field Crops Research* **63**, 87-98
- Kamiya Y** (2010) Plant Hormones: Versatile Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Biology* **61**, Special Online Compilation
- Kantety RV, van Santen E, Woods FM, Wood CW** (1996) Chlorophyll meter predicts nitrogen status of tall fescue. *Plant Nutrition* **19**, 881-889
- Kavi Kishor PB, Hong Z, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS** (1995) Overexpression of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* **108**, 1387-1394
- Kays SJ** (1997) *Postharvest physiology of perishable plant products* Exon Press Athens, Georgia 532 pp
- Keles Y, Öncel I** (2002) Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings *Plant Science* **163**, 783-790
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI** (2010) Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 561-591
- Kim TW, Wang ZY** (2010) Brassinosteroid Signal Transduction from Receptor Kinases to Transcription Factors. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 681-704

- Kireyko AV, Veselova IA, Shekhovtsova TN** (2006) Mechanisms of peroxidase oxidation of *o*-dianisidine, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, and *o*-phenylenediamine in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **32**, 71-77
- Klee H, Estelle M** (1991) Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Annual Review of Plant Physiol* **42**, 529 – 551
- Kleine-Vehn J, Friml J** (2008) Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24**, 447-473
- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL** (1998) Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* **118** 637–650.
- Knowles L, Trimble R, Knowles R** (2001) Phosphorus status affects postharvest respiration, membrane permeability and lipid chemistry of European seedless cucumber fruit (*Cucumis sativus* L.). *Postharvest Biology and Technology* **21**, 179-188.
- Koch KE, Xu J, Duke ER, McCarty DR, Yuan CX** (1995) Sucrose provides a long distance signal for coarse control of genes affecting its metabolism. In: Ed. HG Pontis, G Salerno, E Echeverria. Rockville *Sucrose Metabolism, Biochemistry, and Molecular Biology*, MD: American Society of Plant Physiology, Rockville, pp 266-277
- Konstantinova T, Parvanova D, Atanassov A, Djilianov D** (2002) Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science* **163**, 157-164
- Korycka M, Richardson T** (1978) Photogeneration of Superoxide Anion in Serum of Bovine Milk and in Model Systems Containing Riboflavin and Amino Acids. *Journal of Dairy Science* **61**, 400-407
- Kovacik J, Klejdus B, Backor M, Repečak M** (2007) Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science* **172**, 393-399
- Kramer PJ, Boyer J** (1995) *Water relations of plants and soils*, Academic Press, San Diego, 495 pp
- Kraub N** (2003) Mechanisms for photosystems I y II. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**, 540-550

- Krause GH, Weiss E** (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 249-313.
- Krishnan N, Chattopadhyay S, Kundu JK, Chaudhuri A** (2002) Superoxide dismutase activity in aemocytes and haemolymph of *Bombix mori* following bacterial infection. *Current Science* **83**, 321-325
- Krugh B, Bichham L, Miles D** (1994) The solid-state chlorophyll meter, a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves. Maize genetics cooperation. *News Letter*. **68**, 25-27
- Kuntz M, Chen H, Simkin A, Shipton C, Drake R, Schuch W, Bramley M** (1998) Upregulation of two ripening-related genes from a non climacteric plant (pepper) in a transgenic climacteric plant (tomato). *The Plant Journal* **13**, 351-361
- Lake JA, Quick WP, Beerling DJ, Woodward FI** (2001) Signals from mature to new leaves *Nature* **411**, 154
- Lambers H, Chapin III FS, Pons TL** (1998) *Plant Physiological Ecology* Springer-Verlag, New York, 540 pp.
- Larcher W** (2003) *Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional group* (4th Ed), Editorial Springer Verlag, Berlin, pp 1-163
- Larsen RU** (1990) Plant growth modelling by light and temperature. *Acta Horticulturae* **272**, 235-242.
- Le Bot J, Adamowicz S, Robin, P** (1998) Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. *Scientia Horticulturae* **74**, 47-81
- Lee HY, Chow WS, Hong YN** (1999) Photoinactivation of photosystem II in leaves of *Capsicum annum*. *Physiologia Plantarum* **105**, 377-384
- Lenton J** (1998) Plant hormones on the move! *Trends in plant science* **3**, 457-458
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc **148**, 350-382
- Lichtenthaler HK, Buschmann C** (2001) Chlorophylls and carotenoids – measurement and characterisation by UV-VIS. Current protocols in food analytical chemistry. In: Wiley J. *Current Protocols in Food Chemistry*, New York, F4.3.1–F4.3.8 pp

- Licor Inc** (1989) *Steady State Porometer Instruction Manual*, Nebraska, 87pp
- Littke KM, Zabowaki D** (2007) Influence of calcium fertilization on Douglas-fir foliar nutrition, soil nutrient availability, and sinuosity in coastal Washington *Forest Ecology and Management* **247**, 140-148
- Lyons JM, RW, Breidenbach** (1987) Chilling injury. In: Weichman, J.(ed.) *Postharvest Physiology of Vegetables*. Marcel Dekker Inc., NY, pp 305-326
- Marangoni AG, Palma T, Stanley DW** (1996). Membrane effects in postharvest physiology *Postharvest Biology and Technology* **7**, 193-217
- Marcelis LFM, Heuvelink E, Goudriaan J** (1998) Modelling biomass production and yield of horticultural crops: a review. *Scientia Horticulturae* **74**, 83-111
- Marenko RA, Antezana-Vera SA, Nascimento HCS** (2009) Relationship between specific leaf area, leaf thickness, leaf water content and SPAD-502 readings in six Amazonian tree species. *Photosynthetica* **47**, 184-190
- Marschner H** (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants* (2nd Ed), Academic Press, London, 889 pp
- Marshall JD, Waring RH** (1986) Comparison of methods of estimating leaf area index in old-growth douglas fir. *Ecology* **67**, 975-979
- Mathooko FM** (1996) Regulation of respiratory metabolism in fruit and vegetables by carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology* **9**, 247-264
- Maxwell K, Johnson G** (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659-668
- McCord JM, Crapo JD, Fridovich I** (1977) Superoxide dismutase assay: A review of methodology. In: Michelson AM, McCord JM, Fridovich I (Eds). *Superoxide and superoxide dismutases*, Academic press, NewYork, pp 11-17
- McCourt P** (1999) Genetic analysis of hormone signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 219-243
- McSteen P, Zhao Y** (2008) Plant Hormones and Signaling: Common Themes and New Developments. *Developmental Cell* **14**, 467-473
- Mediavilla S, Escudero A** (2004) Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. *Forest Ecology and Management* **187**, 281-294
- Melgarejo LM, Romero HM, Solarte ME, Insuasty O** (2010a) Caracterización ecofisiológica de variedades de guayaba por función de uso. Informe final de proyecto financiado por Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Asofrucol, Universidad Nacional de Colombia, Corpoica, cooperativa comestibles El Exito. 186pp

- Melgarejo LM, Romero HM, Rojas YA, Moreno AL, Rodríguez M (2010b)** Utilización de indicadores ecofisiológicos y bioquímicos para la identificación en campo de clones de *Gmelina arborea* adaptados a las condiciones de la zona norte de Colombia. Informe de proyecto financiado por Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Universidad Nacional de Colombia, Pizano S.A. 254pp
- Melgarejo LM, Romero HM, Colmenares SL, Oliveros HM (2010c)** Estudio de fisiológico de las especies forestales *Myrcianthes leucoxylla*, *Abatia parviflora*, *Alnus acuminata*, y *Cedrela montana*. Bogotá Colombia. Informe final de proyecto financiado por Universidad Nacional de Colombia. 139pp
- Melgarejo LM, Matiz A, Moreno AL, Cruz M (2010d)** Absorción, traslocación y acumulación de cadmio en plantas de *Avicennia germinans* y *Rhizophora mangle*. Informe final de Proyecto financiado por Fundación para la promoción de la ciencia y tecnología Banco de la República, Universidad Nacional de Colombia. 125pp
- Melgarejo LM, Romero HM, Pérez WH, Jazayeri M (2010e)**. Caracterización de proteínas relacionadas con tolerancia a estrés hídrico en palma de aceite mediante proteómica. Informe de proyecto financiado por Colciencias, Universidad Nacional de Colombia y Cenipalma. 100p.
- Melgarejo LM, Hernández MS, Moreno AL, Orjuela N, Meneses M, Crespo S (2010f)**. Efecto de las condiciones poscosecha sobre la fisiología, bioquímica, conservación y análisis proteómico en frutos de gulupa *Passiflora edulis* Sims. Informe de proyecto financiado por Colciencias, Universidad Nacional de Colombia, OCATI SA. 120p
- Melgarejo LM, Pérez LV, Cruz M, Flórez L, Magnistkiy S, Moreno LP (2010g)** Caracterización ecofisiológica de gulupa bajo tres condiciones ambientales en el departamento de Cundinamarca. Informe de proyecto financiado por Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 150p
- Melgarejo LM, Pérez L, Hernández MS (2010h)** Ecophysiological characterization of purple passion plant (*Passiflora edulis* Sims) in three areas of Colombian Andean region. XXVIII International Congress ISHS. Lisboa, Portugal (en prensa) pp 752-753

- Mengel K, Kirkby EA** (1987) *Principles of Plant Nutrition*. Third edition. International Potash Institute. Worblaufen-Bern, Switzerland. 593 pp
- Mielke M S, Schaffer B, Li C** (2010) Use of a SPAD meter to estimate chlorophyll content in *Eugenia uniflora* L. leaves as affected by contrasting light environments and soil flooding. *Photosynthetica* **48**, 332-338
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) The reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490-498
- Mohr S** (1995) *Plant physiology*. Springer. Velllong. Berlin, 629pp
- Moller IM, Jesen PE, Hasson A** (2007) Oxidative modification to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 459-481
- Møller IM** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 561-91
- Moreira A, Gomez A, Duarte A, Coser C, Mendoca L, Souza L, Maia N, Duarte-da Silva P, Vale R** (1992) Regras para análise de sementes. Ministerio da agricultura e reforma agrária. Brasilia-D.F. 365pp
- Moreno F, Plaza GA, Magnitskiy SV** (2006) Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agronomía Colombiana* **24**, 290-295
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allahverdi VS** (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochemica et Biophysica Acta* **1767**, 414-421
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim Y, Park SHIN, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I** (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant Journal* **46**, 880-889
- Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* **22**, 867-880
- Nakasone HY, Paull RE** (1998) *Tropical fruits*. CABI publishing. Oxon UK, 445 pp
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 165-185
- Naqui A, Chance B** (1986) Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 137-166

- Negbi M, Black M, Bewley D** (1968) Far-red Sensitive Dark Processes Essential for Light- and Gibberellin-induced Germination of Lettuce Seed. *Plant Physiology* **43**, 35-40
- Nelson N, Yocum F** (2006) Structure and function of photosystems I and II *Annu. Annual Review of Plant Biology* **57**, 521-565
- Nelson N** (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* **153**, 257-262
- Nicholls P, Fita I, Loewen P** (2001) Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry* **51**, 51-106
- Niessen M, Thiruveedhi K, Rosenkranz R, Kebeish R, Hirsch HZ, Kreuzaler F, Peterhänsel C** (2007) Mitochondrial glycolate oxidation contributes to photorespiration in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2709-2715
- Nomiya H** (2010) Differentiation of seed germination traits in relation to the natural habitats of three *Ulmus* species in Japan. *Journal of Forest Research* **15**, 123-130
- Nuez F, Ortega R, Costa J** (1996) El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundi Prensa. Madrid. 607 pp
- Ogren W** (1984) Photorespiration: pathways, regulation, and modification. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 415-42
- Osmond CB** (1994) *What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants.* In *Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field.* Baker NR, Bowyer JR (Ed), Oxford, BIOS Scientific Publishers pp 1-24
- Páez A, Paz V, López J** (2000) Crecimiento y respuestas fisiológicas de plantas de tomate cv. 'Río Grande'. *Revista Facultad Agronomía (LUZ)* **17**, 173-184
- Parkin KL, Marangoni A, Jackman RL, Yada RY, Stanley DW** (1989) Chilling injury. A review of possible mechanisms. *Journal of Food Biochemistry* **13**, 127-153
- Parry MAJ, Flexas J, Medrano H** (2005) Prospects for crop production under drought: research priorities and future directions. *Annals of Applied Biology* **147**, 211-226
- Paull RE** (1990) Heat shock response in field grown, ripening papaya fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **115**, 623-631
- Paull RE** (1994) Tropical fruit physiology and storage potential. En: Champ BR (Ed). 184pp

- Piekielek WP, Fox RH** (1992) Use of a chlorophyll meter to predict nitrogen requirements for maize. *Agronomy Journal* **84**, 59-65
- Plumier JA, McChesney C, Bell T, David J** (1997) Germination in Photosensitive Seeds: Does Phytochrome Stimulate Metabolism of GA19 and GA20 to GA1 Australian. *Journal of Plant Physiology*. **24**, 389–394.
- Poni S, Bernizzonia F, Civardi S, Gatti M, Porro D, Camin F** (2009) Performance and water use efficiency (single leaf vs whole-canopy) of well watered and half stressed split root Lambrusco grapevines grown in Po Valley (Italy). *Agricultural, Ecosystems and Environment* **129**, 97-106
- Probert RJ** (2010) The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. Chapter 11. En: Fenner M. Seeds the ecology of regeneration in plant communities. Second edition. CABI Publishing. Wallingford U.K. 261-292 pp.
- Prusinkiewicz P** (1998) Modeling of spatial structure and development of plants: a review. *Scientia Horticulturae* **74**, 113-149
- Pyo YJ, Gierth M, Schroeder JI, Cho MH** (2010) High-affinity K(+) transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 are vital for seedling establishment and postgermination growth under low-potassium conditions. *Plant Physiology* **153**, 863-75
- Quick WP, Horton P** (1984) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplasts I. Factors affecting the observations of oscillations in the yields of chlorophyll fluorescence and the rate of oxygen evolution. *Proceedings of the Royal Society of London*. **220**, 361-370
- Radford PJ** (1967) Growth analysis formulae. Their use and abuse. *Crop Science* **7**, 171-174
- Radosevich SR, Holt J** (1984) World ecology, implications for vegetation management. John Wiley and Sons. New York, pp 25-32
- Ramanjulu S, Sudhakar C** (2000) Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* **157**, 81-85
- Rasmusson AG, Soole KL, Elthon TE** (2004) Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 23-39

- Rabaioli-Da Silva LC, Rebello-Dillenburg L** (2007) Water relation of three species growing on a rock outcrop in the "Parque Estadual de Itapua". *Revista Brasileira de Botanica* **30**,703-711
- Reeves WD, Mask PL, Wood CW, Delay DP** (1993) Determination of wheat nitrogen status with a handheld chlorophyll meter. Influence of management practices. *Journal of Plant Nutrition* **16**, 7781-7796
- Reigosa M, Pedrol N, Sánchez A** (2003). La Ecofisiología Vegetal: Una ciencia de síntesis. Thomson. España pp 17-30
- Repellin A, Laffray D, Daniel C, Braconnier S, Zuily-Fodil Y** (1997) Water relations and gas exchange in young coconut palm (*cocos nucifera* L.) as influenced by water deficit. *Canadian Journal of Botany*. **75**, 18-27.
- Resh HM** (1989) Hydroponic food production. Woodridge Press. Santa Barbara, California, 384pp
- Rhodes MJC** (1980) *The maturation and ripening of fruits*. En:Thimann, K.V. (eds). *Senescence in plants*. CRC Press. Boca Raton, Florida, 158-199 pp
- Richardson A, Duigan S, Berlyn G** (2002) An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* **153**, 185-194
- Rocha M, Licausi F, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR, van Dongen J** (2010) Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **152**, 1501-1513
- Rodriguez-Milla MA, Maurer A, Rodriguez-Huete A, Gustafson JP** (2003) Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal* **36**, 602-615
- Roelfsema M, Rob G, Rainer H** (2005) In the Light of Stomatal Opening: New Insights into 'The Watergate'. *New Phytologist* **167**, 665-691
- Rolando CA, Little KM** (2008) Measuring water stress in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden seedlings planted into pots. *South African Journal of Botany* **74**, 133-138
- Rossini O, Valdes MC, Marquez A, Bueso- López M** (2006) Germinación de las semillas en algunas especies americanas de Fabaceae y Bignoniaceae cultivadas en Sevilla España. *Lagascalia* **26**, 119-129
- Royer DL** (2001) Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology* **114**, 1-28

- Ruffel S, Krouk G, Coruzzi GM** (2010) A Systems View of Responses to Nutritional Cues in Arabidopsis: Toward a Paradigm Shift for Predictive Network Modeling. *Plant Physiology* **152**, 445-452
- Ruiz A, Cardona J, Carrillo MP, Hernández MS, Barrera J, Martínez O, Fernandez-Trujillo JP** (2010) Postharvest behaviour of three cocona ecotypes during low temperature storage. XXVIII International Congress ISHS. Lisboa, Portugal (en prensa)
- Rupasinghe HPV, Murr DP, Paliyath G, Skog L** (2000) Inhibitory effect of 1-MCP on ripening and superficial scald development in ‘McIntosh’ and ‘Delicious’ apples. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **75**, 271-276
- Russo VM, Bruton VD, Sams CE** (2010) Classification of temperature response in germination of Brassicas. *Industrial Crops and products* **31**, 48-51
- Ryding O** (1995) Pericarp structure and phylogeny of the Lamiaceae-Verbenaceae-complex. *Plant Systematic Evolution* **198**, 101-141
- Sack L, Holbrook NM** (2006) Leaf Hydraulics. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 361-381
- Sakakibara H** (2006) Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449
- Salisbury EJ** (1928) On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological Character* **216**, 1-65
- Salisbury F, Roos CW** (2000) *Fisiología de las plantas 1. Celulas: agua, soluciones y superficies*. Paraninfo- Thomson Learning, Primera edición, London, pp 171-197.
- Salveit ME** (1993) Internal Carbon Dioxide And Ethylene Levels In Ripening Tomato Fruit Attached To Or Attached From The Plant. *Physiology Plant* **89**, 204-210
- Sanabria D, Silva R, Oliveros M, Barrios R** (2001) Escarificación química y mecánica de semillas subterráneas de *Centrosema Rotundifolium*. *Bioagro* **13**, 117-124
- Santner A, Estelle M** (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* **459**, 1071-1078
- Schimel DS** (1995) Terrestrial ecosystems and the carbon cycle. *Global Change Biology* **1**, 77-91

- Schreiber U, Bilger WH, Hormann H, Neubauer C** (1998) Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool. Basics and some aspects of practical relevance. In: Raghavendra AS (eds) *Photosynthesis A Comprehensive Treatise*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 320-336
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W** (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* **10**, 51-62
- Schulze ED** (1986) Carbon Dioxide and Water Vapor Exchange in Response to Drought in the Atmosphere and in the Soil. *Annual Review of Plant Physiology* **37**, 247-274
- Schulze ED, Robichaux RH, Grace J, Rundel PW, Ehleringer JR** (1987) Plant Water Balance. *Bioscience* **37**, 30-37
- Sellin A** (1999) Does Pre-Dawn water potential reflect conditions of equilibrium in plants and soil water status?. *Acta Oecologica* **20**, 51-59
- Seymour G, Taylor J, Tucker G** (1993) Biochemistry of fruit ripening. Chapman & hall. Primera edición, London, pp 1-43
- Shanker D** (2005) Photosynthesis in Plants under Stressful Conditions. In Pessaralim. Handbook of photosynthesis. Second Edition. New York, pp 717-737
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhago CX** (2008) Water deficit stress induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 215-225
- Shen B, Jesen RG, Bohnert HJ** (1997) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplast. *Plant Physiology* **113**, 1177-1183.
- Shenker M, Plessner OE, Tel-Or E** (2004) Manganese nutrition effects on tomato growth, chlorophyll concentration, and superoxide dismutase activity. *Plant Physiology* **161**, 197-202
- Sieger SM, Kristensen BK, Robson CA, Amirsadeghi S, Eng EWY, Abdel-Mesih A, Møller IM, Vanlerberghe GC** (2005) The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1499-1515
- Slatyer RO** (1967) Plant-water relationships. Academic Press, London, England, 366pp
- Slatyer RO, Taylor SA** (1960) Terminology in plant and soil-water relations. *Nature*. **187**, 922-924

- Smart R, Bingham G** (1974) Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology* **53**, 258-260
- Smirnoff N** (2005) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Edited by school of biological and chemical sciences. University of Exeter. UK. Chapter 5, pp 125
- Smith K, Silvernail N, Roders K, Castro M, Parcher R, Elgren T** (2002) Soil-gel encapsulated peroxidase: a catalytic material for peroxidation. *Journal of the American Chemical Society* **124**: 4247-4252
- Snyder KA, Richards JH, Donovan LA** (2003) Night-time conductance in C3 and C4 species: do plants lose water at night?. *Journal of Experimental Botany*. 54 (383):861-865.
- Solarte ME, Romero HM, Melgarejo LM** (2010) Caracterización ecofisiológica de la guayaba de la hoya del río Suárez. En: *Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (Psidium guajava L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva*. Morales AL, Melgarejo LM (Eds) 200p. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia pp 25-56
- Somogyi M** (1952) Notes of sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* **195**, 19-23
- Steward FC** (1969) Analysis of grow. Behavior of plants and their organs physiology. New York Academic press. Pp 38-41
- Srivastava L** (2002) Plant growth and development. Hormones and environment. Academic Press Elsevier science. London, 772 pp
- Statistix 9.0** Copyright (C) 1985-2008 Analytical Software. All Rights Reserved
- Stitt M, Sulpice R, Keurentjes J** (2010) Metabolic Networks: How to Identify Key Components in the Regulation of Metabolism and Growth. *Plant Physiology* **152**, 428-444
- Suzuki LS, Herrig V, Ferrarese MLL, Rodrigues JD, Ferrarese-Filho O** (2003) Simultaneous effects of ferulic and vanillic acids on peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in soybean (*Glycine max*) roots. *Phyton* **43**, 179–185
- Sweetlove L, Moller I** (2009) Oxidation of Proteins in Plants-Mechanisms and Consequences., *Advances in Botanical Research* **52**, 1-24
- Tadesse T, Hewett EW, Nichols MA, Fisher KJ** (2002) Changes In Physicochemical Attributes Of Sweet Pepper Cv. Domino During Fruit Growth And Development. *Scientia Horticulturae* **93**, 91-103

- Taiz L, Zeiger E** (2006) *Plant physiology*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 764 pp
- Takaki M** (2001) New proposal of classification of seeds based on forms of phytochrome instead of photoblastism. *Revista Brasileira da Fisiologia Vegetal* **13**,104-108
- Tanaka R, Tanaka R** (2002) Tetrapyrrole evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 503-521
- Tardieu F, Patent B, Simmonneau T** (2010) Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non hydraulic processes?. *Plant, cell and Environment* **33**, 636-647
- Tausz M, Sircelj H, Dieter G** (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid?. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1955-1962
- Tay AC, Abdullah AM, Awang M, Rurukawa A** (2007) Midday depression of photosynthesis in *Ekleia malacensis* a woody climber in a tropical rainforest. *Photosynthetica* **45**, 189-193
- Taylor SH, Ripley BS, Woodward FI, Osborne CP** (2010) Drought limitation of photosynthesis differs between C3 and C4 grass species in a comparative experiment. *Plant, Cell and Environment* doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02226.x
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Costa Galvão V, Margis-Pinheiro M** (2005) Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. *Genetics and Molecular Biology* **28**, 529-538
- Thompson AK** (1996) *Postharvest technology of fruit and vegetables*. Blackwell Science Publishing, 410 pp
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P** (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **288**, 129-138
- Toshiba Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell and Physiology* **38**, 1095-1102
- Turner FT, Jund MF** (1991) Chlorophyll meter to predict nitrogen topdress requirement for semiwardf rice. *Agronomy Journal* **83**, 926-928

- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, Matsuoka M** (2007) Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 183-98
- Ulrich BH** (1974) *Method Enzimology*. New York. Academic Press pp 109-115
- Van Reuler H, Prins WH** (1993) The role of plant nutrients for sustainable food production in sub-Saharan Africa. Leidschendam, The Netherlands, VKP, 232 pp
- Vandeleur RK, Mayo G, Shelden M, Gillihan M, Kaiser B, Tyerman S** (2009) The role of intrinsic aquaporins in water transport through roots: Diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiology* **149**, 449-460
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M** (2004) Catalase deficiency drastically affects high light-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **39**, 45-58
- Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J** (2005) Molecular Mechanisms of Steroid Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 177-201
- Villavicencio LE, Blankenship SM, Sanders DC, Swallow YWH** (2001) Ethylene and carbon dioxide concentrations in attached fruits of pepper cultivars during ripening. *Scientia Horticulturae* **91**, 17-24
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF** (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 177-206
- Vogel AL** (1989) *Practical organic chemistry*, 5 ed. Longman Scientific & Technical. London, chapter 2, pp 45-47
- Wang CY** (1983) Postharvest responses of Chinese cabbage to high CO₂ treatment or low O₂ storage. *Journal American Society of Horticultural Science* **108**, 125-129
- Wang CY** (1994) Approaches to reduce chilling injury of fruit and vegetables. *Horticultural Reviews* **15**, 63-95
- Watson DJ** (1952) The physiological basis of variation in yield. *Advances in Agronomy* **4**, 101-145
- Werner H** (2002) *Measuring Soil Moisture for Irrigation Water Management*. FS876. Dakota SD: College of Agriculture and Biological Sciences, South Dakota State University, pp 1-5

- Wilhem WW, Ruwe K, Schlemmer M** (2000) Comparison of three leaf area index meters in a crop canopy. *Crop Science* **40**, 1179-1183
- Wills R, Mc Glasson B, Graham D, Joyce D** (1998) *Posharvest. An introduction to the physiology & handling of fruit, vegetables & ornamentals*. 4th edition CABI Publishing. pp 33-60, 97-112
- Wood CW, Tracy PW, Reeves DW, Edmisted KL** (1992) Determination of cotton nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter. *Journal of Plant Nutrition* **15**, 1435-1448
- Wyka TP, Lüttge UE** (2003) Contribution of C3 carboxylation to the circadian rhythm of carbon dioxide uptake in a Crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana*. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1471-1479
- Xiang-wen P, Wen-bin L, Qiu-ying Z, Yan-hua L, Ming-shan L** (2008) Assessment on Phosphorus Efficiency Characteristics of Soybean Genotypes in Phosphorus-Deficient Soils. *Agricultural Sciences in China* **7**, 958-969
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review Plant Biology* **59**, 225-251
- Yamaguchi S, Kamiya Y** (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiology* **41**, 251-257
- Yamasaki S, Rebello L** (1999) Measurement of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **11**, 69-75
- Yannarelli GG, Fernandez A, Santa-Cruz D, Tomaro M** (2007) Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* **68**, 505-512
- Yancey PH** (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Botany* **208**, 2919-2830
- Yoshida S** (1972) Physiological aspects of grain yield. *Annual Review of Plant Physiology* **23**, 437-464
- Yu DJ, Kim SJ, Lee HJ** (2009) Stomatal and non stomatal limitations to photosynthesis in field-grown grapevine cultivars. *Biologia Plantarum* **53**, 133-137
- Zazimalová E, Krecek P, Skupa P, Hoyerová K, Petrásek J** (2007) Polar transport of the plant hormone auxin-the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 1621-1637

- Zeinalov Y** (2005) Mechanisms of photosynthetic oxygen evolution and fundamental hypotheses of photosynthesis. In Pessaraki M. *Handbook of photosynthesis*. Second Edition. New York, pp 3-19
- Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Read JJ, Carter GA** (2003) Corn (*Zea mays* L.) growth leaf pigment concentration, photosynthesis and leaf hyperspectral reflectance properties as affected by nitrogen supply. *Plant Soil* **257**, 205-217
- Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Read JJ, Koti S** (2005a) Selection of optimum reflectance ratios for estimating leaf nitrogen and chlorophyll concentrations of field-grown cotton. *Agronomy Journal* **97**, 89-98
- Zhao D., Reddy KR, Kakani VG, Read JJ, Koti S** (2005b) Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy* **22**: 391-403
- Zhao Y** (2010) Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 49-64
- Zimmermann G, Israeli Y, Zhou A, Schwartz A, Bamberg E, Zimmermann D** (2010) Effects of environmental parameters and irrigation on the turgor pressure of banana plants measured using the non-invasive, online monitoring leaf patch clamp pressure probe. *Plant Biology* **12**, 424-436
- Zor T, Selinger Z** (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity. Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry* **236**, 302-308
- Zsófi Z, Varadi G, Bálo B, Marschall M, Nagy Z, Dulaic S** (2009) Heat acclimation of grapevine leaf photosynthesis: meso- and macroclimatic aspects. *Functional plant Biology* **36**, 310-322