

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE BIOLOGIA

" ESTUDIOS BIOQUIMICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA SENESCENCIA
FOLIAR EN HORDEUM Y TRITICUM "

Vº Bº

EL DIRECTOR



Tesis presentada por
ISABEL FLECK BOU
para optar al grado
de Doctor en Biología,
dirigida por el Catedrático
Prof. Dr. Arturo
Caballero López.

INDICE

	<u>INTRODUCCION</u>	PAGINA
1.		
1.1	SENESCENCIA	1
1.2	CAUSAS DE SENESCENCIA	6
1.3	CONSECUENCIA DEL PROCESO DE SENESCENCIA	10
1.3.1	CAMBIOS ANATOMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES	10
1.3.2	CLOROFILAS	14
1.3.3	PROTEINAS Y ACIDOS NUCLEICOS	18
1.3.4	ACTIVIDAD ENZIMATICA	23
1.3.5	PROCESOS DE INTERCAMBIO GASEOSO	38

1.4	REGULACION HORMONAL DE LA SENESCENCIA :	51
1.4.1	CITOQUININAS	51
1.4.2	GIBERELINAS	56
1.4.3	AUXINAS	57
1.4.4	INDUCTORES DE LA SENESCENCIA : ABA Y ETILENO	59
2.	<u>MATERIAL Y METODOS</u>	61
2.1	MATERIAL VEGETAL	62
2.1.1	LOCALIZACION DE LOS ENSAYOS	62
2.1.2	CONDICIONES DE CULTIVO EN CAMPO	62
2.1.3	CONDICIONES DE CULTIVO EN LABORATORIO	63
2.1.4	INDUCCION DE LA SENESCENCIA FOLIAR EN CONDICIONES DE LABORATORIO	63
2.2	MEDIDA DEL INTERCAMBIO GASEOSO FOLIAR	65
2.2.1	FOTOSINTESIS NETA, FOTORRESPIRACION, P.C.CO ₂ Y RESPIRACION DE OSCURIDAD	65

2.2.2	EQUIPO PARA LA MEDICION DEL INTERCAMBIO GASEOSO.....	68
2.3	MEDICIONES REALIZADAS CON EL EQUIPO DESCRITO.....	73
2.3.1	EMPLAZAMIENTO DEL MATERIAL.....	73
2.3.2	DETERMINACION DEL P.C.CO ₂	73
2.3.3	DETERMINACION DE LA FOTOSINTESIS NETA	74
2.3.4	DETERMINACION DE LA RESPIRACION	77
2.3.5	SATURACION LUMINOSA	77
2.4	DETERMINACION DE CLOROFILAS	79
2.5	DETERMINACION DE PROTEINAS SOLUBLES	79
2.6	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RIBULOSA 1,5- DIFOSFATO CARBOXILASA	80
2.6.1	METODO ESPECTROFOTOMETRICO	80
2.6.2	METODO RADIOQUIMICO	83
2.7	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RIBULOSA 1,5- DIFOSFATO OXIGENASA	83
2.8	METODOS ESTADISTICOS UTILIZADOS	85
3.	<u>RESULTADOS</u>	
3.1	SENESCENCIA FOLIAR EN <u>HORDEUM VULGARE</u> L. CULTIVADO EN CONDICIONES DE LABORATORIO	86
3.1.1	EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KINETINA SOBRE EL RETRASO DE LA SENESCENCIA EN <u>HORDEUM VULGARE</u> L.	87

3.1.2	VARIACIONES EN FOTOSINTESIS NETA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR	95
3.1.2.1	EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA (10ppm).....	95
3.1.2.2	EFEECTO DEL OXIGENO AL 2,5% SOBRE HOJAS CONTROL Y CON KINETINA	106
3.1.2.3	EFEECTO CONJUNTO DEL TRATAMIENTO HORMONAL Y DE LA CONCENTRACION DE OXIGENO SOBRE LA FOTOSINTESIS A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR	116
3.1.2.4	INDICE DE INHIBICION POR OXIGENO Y DEFICIT DE CARBONO	122
3.1.3	VARIACIONES EN EL PUNTO DE COMPENSACION DE CO ₂ A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR	126
3.1.3.1	EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA (10ppm)	126
3.1.3.2	EFEECTO DEL OXIGENO AL 2,5% SOBRE HOJAS CONTROL Y CON KINETINA	134
3.1.3.3	EFEECTO CONJUNTO DEL TRATAMIENTO HORMONAL Y LA CONCENTRACION DE O ₂ SOBRE EL P.C.CO ₂ A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR	141
3.1.3.4	RELACION ENTRE LAS VARIACIONES EN LOS PUNTOS DE COMPENSACION DE CO ₂ Y LA FOTOSINTESIS NETA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR	147
3.1.3.5	RELACION DEL P.C.CO ₂ CON LA CONCENTRACION DE OXIGENO	157
3.1.4	VARIACIONES EN LA RESPIRACION DE OSCURIDAD A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR	163
3.1.4.1	EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA	163
3.1.5	VARIACIONES EN EL CONTENIDO EN CLOROFILA A, CLOROFILA B, Cl A / Cl B, D 430 / D 665 A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR	166

3.1.5.1	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA (10 ppm)	166
3.1.5.2	RELACION DE LAS CLOROFILAS A Y B CON LAS VARIACIONES FOTOSINTETICAS	185
3.1.6	VARIACIONES EN EL CONTENIDO EN RIBULOSA, 1,5 DIFOS- FATO CARBOXILASA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR	193
3.1.6.1	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA	193
3.1.6.2	RELACION CON LAS VARIACIONES FOTOSINTETICAS	206
3.1.6.3	RELACION CON LAS VARIACIONES EN P.C.CO ₂	215
3.1.6.4	RELACION CON LAS VARIACIONES EN PROTEINAS SOLUBLES ..	221
3.1.7	VARIACIONES EN PROTEINAS SOLUBLES A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR	224
3.1.7.1	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA	224
3.1.7.2	RELACION CON LAS VARIACIONES FOTOSINTETICAS	231
3.1.8	RELACION ENTRE LAS MEDICIONES BIOQUIMICAS Y DE IN- TERCAMBIO GASEOSO REALIZADAS	235
3.2	SENESCENCIA FOLIAR EN <u>TRITICUM AESTIVUM</u> CV KOLIBRI CULTIVADO EN CONDICIONES DE CAMPO	243
3.2.1	VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA RuBP CARBOXILASA ..	245
3.2.1.1	EFFECTO DE LA EXTIRPACION DE LA ESPIGA	245
3.2.2	VARIACIONES EN FOTOSINTESIS NETA	253
3.2.2.1	RELACION DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA CON LA	

	ACTIVIDAD CARBOXILASICA	256
3.2.3	VARIACIONES EN EL PUNTO DE COMPENSACION DE CO ₂	258
3.2.3.1	EFEECTO DEL OXIGENO AL 2,5%	258
3.2.3.2	RELACION DEL P.C.CO ₂ CON LA CONCENTRACION DE OXIGENO	264
3.2.4	RELACION ENTRE LAS MEDICIONES BIOQUIMICAS Y DE IN- TERCAMBIO GASEOSO REALIZADAS	266
3.2.5	VARIACIONES EN RESPIRACION DE OSCURIDAD (R _n)	273
3.2.6	VARIACIONES EN EL CONTENIDO EN PROTEINAS SOLUBLES (DE LA HOJA BANDERA DE TRIGO A LO LARGO DE SU CI- CLO BIOLOGICO)	275
3.2.6.1	RELACION CON LA ACTIVIDAD CARBOXILASICA	275
3.2.7	EFEECTO DE LA IRRADIACION SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA RuBP CARBOXILASICA	277

4.-	<u>DISCUSION</u>	
4.1.-	DISCUSION DE RESULTADOS DE SENESCENCIA FOLIAR EN <u>HORDEUM VULGARE</u> L. CULTIVADO EN CONDICIONES DE LABORATORIO.	286
4.1.1.-	EFECTO DE LA KINETINA Y CONCENTRACIONES OPTIMAS PARA LA RETENCION DE CLOROFILAS.	286
4.1.2.-	FOTOSINTESIS NETA EN HOJAS ESCINDIDAS DE <u>HORDEUM VULGARE</u> L.	289
4.1.2.1.-	EFECTO DE LA KINETINA Y DE LA CONCENTRACION DE OXIGENO.	289
4.1.2.2.-	VARIACIONES EN LOS INDICES DE INHIBICION POR O ₂ Y DEFICIT DE CARBONO.	294
4.1.3.-	P.C.CO ₂ EN HOJAS ESCINDIDAS DE <u>HORDEUM VULGARE</u> L.	297
4.1.3.1.-	EFECTO DE LA KINETINA Y DE LA CONCENTRACION DE O ₂	297
4.1.3.2.-	RELACIONES DEL P.C.CO ₂ CON LA FOTOSINTESIS NETA Y LA CONCENTRACION DE OXIGENO.	298
4.1.4.-	RESPIRACION DE OSCURIDAD EN HOJAS ESCINDIDAS DE <u>HORDEUM VULGARE</u> L.	305
4.1.5.-	PIGMENTOS CLOROFILICOS Y SU RELACION CON LA FOTOSINTESIS NETA EN HOJAS ESCINDIDAS DE <u>HORDEUM VULGARE</u> L.	306
4.1.6.-	ACTIVIDAD DE RuBP - CARBOXILASA EN HOJAS ESCINDIDAS DE <u>HORDEUM VULGARE</u> L.	310

4.1.6.1.-	RELACIONES CON LA FOTOSINTESIS NETA Y LOS P.C.CO ₂ .	
4.1.7.-	PROTEINAS SOLUBLES EN HOJAS ESCINDIDAS DE <u>HORDEUM VULGARE L.</u>	316
4.1.8.-	RELACION ENTRE MEDIDAS BIOQUIMICAS Y DE INTERCAMBIO GASEOSO EN HOJAS ESCINDIDAS DE <u>HORDEUM VULGARE L.</u>	317
4.2.-	DISCUSION DE RESULTADOS DE SENESCENCIA FOLIAR EN <u>TRITICUM AESTIVUM</u> CV KOLIBRI CULTIVADO EN CONDICIONES DE CAMPO.	319
4.2.1.-	ACTIVIDAD DE LA RuBP - CARBOXILASA EN HOJAS DE <u>TRITICUM AESTIVUM</u> CV KOLIBRI. EFECTO DE LA EXTIRPACION DE LA ESPIGA.	319
4.2.2.-	FOTOSINTESIS NETA EN HOJAS DE <u>TRITICUM AESTIVUM</u> CV KOLIBRI Y SU RELACION CON LA ACTIVIDAD CARBOXILASICA.	322
4.2.3.-	P.C.CO ₂ EN HOJAS DE <u>TRITICUM AESTIVUM</u> , CV KOLIBRI.	325
4.2.4.-	RELACION ENTRE MEDIDAS BIOQUIMICAS Y DE INTERCAMBIO GASEOSO EN HOJAS DE <u>TRITICUM AESTIVUM</u> CV KOLIBRI.	327
4.2.5.-	RESPIRACION DE OSCURIDAD EN HOJAS DE <u>TRITICUM AESTIVUM</u> CV KOLIBRI.	327
4.2.6.-	PROTEINAS SOLUBLES EN HOJAS DE <u>TRITICUM AESTIVUM</u> CV KOLIBRI.	327
4.2.7.-	EFECTO DE LA IRRADIACION SOBRE LA ACTIVIDAD CARBOXILASICA EN HOJAS DE <u>TRITICUM AESTIVUM</u> CV KOLIBRI.	328
5.-	CONCLUSIONES	330
6.-	BIBLIOGRAFIA	334

1. INTRODUCCION

1.1. SENESCENCIA

En general, se acepta como definición de senescencia los procesos progresivos y de deterioro que preceden a la muerte de una célula madura, órgano u planta entera (Wareing y Phillips, 1971, Beevers 1976, Thimann et al 1982)

En las hojas, la senescencia va estrechamente asociada al amarilleamiento y pérdida de clorofilas que aparecen antes de la abscisión o bien de la marchitez de una hoja que no esté a la sombra.

Estos síntomas pueden ser eliminados en algunos casos mediante hormonas o nutrientes, lo cual significa que la degradación del cloroplasto no lleva a una muerte inevitable.

Se ignora, si la senescencia en las hojas es una secuencia programada de acontecimientos, siempre los mismos, independientes del factor ambiental que ha sido la causa. También se discute si una simple falta específica metabólica lleva a una senescencia celular irreversible o si las lesiones que aparecen son varias (Osborne, 1967).

La literatura inicial sobre senescencia es debida principalmente a Mölich, 1928 (Die Lebensdauer der Pflanze), traducida al inglés diez años más tarde, y también a Chibnall, 1939.

El hecho de que cada especie vegetal posea un tiempo vital característico, llevó ya a Molisch (1938) a sugerir que la longevidad podía estar determinada genéticamente, aunque las causas que implican cambios que conducen a la muerte parecen estar bajo control hormonal (Noodén y Leopold, 1978).



Leopold y Kriedeman 1975 son del parecer que la función principal de la senescencia es la de facilitar un reciclado ("turnover") de individuos, hecho en el que se basa la evolución y la selección natural. Según ellos, así como la mayor parte de animales experimentan "turnover" como consecuencia de predación o parasitismo, las plantas llegan a éste a través de una senescencia programada.

También se interpreta la senescencia como una estrategia para la supervivencia (Thomas y Stoddart, 1980). Muchas plantas evitan la dureza de la climatología de forma parcial como en las plantas anuales o bien de forma total, manteniendo únicamente estructuras resistentes como semillas o bulbos.

Se ha mostrado la importancia de la selección respecto a retraso en la implantación de la senescencia en algunos programas de mejora (Wittenbach et al 1980). Según Noodén y Lindoo 1978, sería interesante el considerar como factor de selección para la senescencia monocárpica de especies de cultivo, el hecho de poder limitar su producción a un período determinado de tiempo, acompañado de la comodidad de la recolección en plantas secas y sin hojas.

SENESCENCIA DE PLANTA ENTERA

Las especie monocárpicas (una sola floración y frutación), incluyen plantas anuales y bianuales y cierto número de plantas perennes que crecen de forma vegetativa durante una serie de años y después florecen, forman frutos y mueren. En dichas especies la muerte está estrechamente ligada con la reproducción. Algunos autores (Wareing 1971, Leopold y Kriedemann 1975) hablan de que poseen una "muerte programada" cuando alcanzan un cierto momento de su ciclo vital. Existe una determinación genética, por supuesto variable, dentro de los individuos de una misma especie (Wareing y Seth, 1967, Purohit, 1982)

Normalmente, dentro de este grupo de plantas, se dá la llamada senescencia secuencial. Se puede observar en plantas, cuyas hojas van envejeciendo y muriendo progresivamente a partir de las de la base y antes de que la planta haya empezado a florecer.

Después de la floración, en las especies anuales, la planta entera muere. Este tipo de senescencia está asociada con procesos de desarrollo que tienen lugar en otras partes de la planta.

La muerte en especies monocárpicas había sido atribuída con frecuencia al efecto de semillas en desarrollo, hasta que se demostró que algunas plantas con solo flores masculinas y por tanto sin semillas, envejecían de forma idéntica a las que poseían flores femeninas.

Ya Mölich en 1938 sospechó que la actividad reproductora iba ligada a la senescencia de la planta y observó que la extirpación de flores y frutos en varias especies evitaba o aplazaba la senescencia.

Creyó que la movilización de nutrientes fuera de las partes vegetativas a los frutos inducía senescencia debida a inanición. A partir del conocimiento de que las citokininas retrasaban la senescencia, se pensó que la floración podría estar asociada a una disminución en el contenido en citokininas. Efectivamente, Sitton et al 1967 analizaron el contenido en citokininas del exudado de raíz de girasol durante los períodos vegetativo y de floración, encontrando que el contenido descendía rápidamente al desarrollarse las flores.

Es conocido el hecho de que en especie monocárpicas, la senescencia se evita con la extirpación de flores y frutos (Mölich, 1928, Lindoo y Nooden, 1976, 1977, Derman et al, 1978). Algunas

plantas bianuales y perennes herbáceas, las hojas muestran senescencia secuencial, pero ésta no lleva a la muerte de la planta entera, sino que los órganos que se mantienen vivos, sirven de base de suministro, de nutrientes para el próximo período de crecimiento en el año siguiente.

Al mismo tiempo que se liberan desde las partes más viejas reservas nitrogenadas y otros metabolitos destinados a las hojas en desarrollo, también existe una mayor utilización de carbohidratos en las hojas viejas, que en cierto modo podrían convertirse en parásitas (Hopkinson, 1966), al importar o almacenar productos fotosintéticos que solamente serían utilizados en la respiración.

SENESCENCIA EN ORGANOS AISLADOS

En general, la senescencia de un órgano es seguida por la abscisión de éste (hojas, cotiledones, flores, frutos, yemas apicales) aunque no siempre ocurre (como en el caso de las gramíneas pratenses) (Nooden et al, 1978).

Según Simon, 1967, los patrones de senescencia en órganos están perfectamente determinados.

La senescencia simultánea se dá como caso típico en plantas leñosas en otoño con la caída de todas las hojas. También es un ejemplo la maduración y caída de los frutos. Las plantas con dicho tipo de senescencia corresponden a especies policárpicas (tanto leñosas como herbáceas). La senescencia simultánea puede formar parte de la senescencia total de un organismo o ser solo parcial. La muerte de la planta entera, en este caso, no está ligada a la reproducción. En principio, aparte de un accidente o de una epidemia, parece como si no hubiese razón o, en comparación con el otro tipo de senescencia, una "pro-

gramación" para que la planta dejase de vivir. Se puede alegar, que un árbol a la larga tendría problemas mecánicos debido al peso de sus propias ramas.

La ventaja biológica en dichas especies policárpicas, es la pérdida de las hojas, lo cual permite la supervivencia en climas en los que se dan heladas en invierno. Por otra parte, la descomposición de las hojas en el suelo libera nutrientes minerales que podrán ser utilizados posteriormente.

Otro ejemplo de senescencia simultánea es la que afecta a las partes aéreas de la planta (hojas y tallos), dejando un rizoma o bulbo para un posterior desarrollo

SENESCENCIA CELULAR

En algunos casos tiene lugar senescencia después de la maduración de ciertas células. En tejidos vegetales tiene lugar una diferenciación que incluye a veces la muerte de ciertas células, como son los elementos conductores del xilema o el felodermo, mientras que las células parenquimatosas pueden seguir viviendo durante años (Butler y Simon, 1971, Carr y Pate, 1967).

Así pues, la senescencia y muerte a nivel celular pueden ir regidas por unos mecanismos internos que por sí solos no tengan un efecto deletéreo sobre la planta.

La senescencia y muerte de la planta no aparece debida a factores intrínsecos en la células individuales sino a condiciones de todo un órgano, (Wareing y Phillips, 1971, Bonner y Varner, 1978).

1.2.- CAUSAS DE SENESCENCIA

FACTORES GENETICOS

El inicio de la senescencia puede considerarse como el momento en el que aparece la transición entre estado de la hoja como fuente de elaboración de productos fotosintéticos a fuente de movilización de N y otros elementos minerales. A pesar de que la secuencia parece ser invariable para especies determinadas, la duración relativa de cada fase viene determinada por factores ambientales.

La senescencia forma parte del proceso de desarrollo y por tanto está sujeto a un control genético directo; existiendo variación genética para la expresión del síndrome como un todo (Kahavak et al 1978) y también por componentes individuales del síndrome como degradación de clorofilas (Thomas y Stoddart 1975 1980).

En el desarrollo de las células foliares interactúan por lo menos los genomas del cloroplasto y del núcleo. El genoma cloroplástico codifica una serie de componentes cloroplásticos como el RNA ribosómico, las subunidades mayores de la RuBP carboxilasa y ciertas proteínas estructurales de las membranas del cloroplasto y ribosomas.

Batt y Woolhouse 1976 encontraron que los enzimas sintetizados en parte, o completamente dentro del cloroplasto (RuBP casa, triosa fosfatodeshidrogenasa) empezaron a declinar en su actividad a partir de la expansión foliar completa.

Sin embargo, los enzimas sintetizados por los ribosomas 80s del citoplasma (fosfoglicerokinasa, fructosa 1,6 difosfatasa) se mantuvieron durante mucho más tiempo en actividad.

Ello induce a pensar que el DNA cloroplástico codifica los procesos componentes de la organización del cloroplasto en las primeras etapas del desarrollo foliar y al llegar a la madurez queda completamente reprimido.

El cese de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas lleva consigo el declive en actividad enzimática y fotosintética y posteriormente la desintegración del plástido y visualización de la senescencia.

A partir de este momento en el que la senescencia se inicia, empieza a intervenir el control de los genomas nucleares siendo una de sus primeras manifestaciones la degradación de clorofilas.

LUZ

El efecto de la luz ha sido muy utilizado en estudios del efecto del sombreado de hojas inferiores por parte de las superiores (Goldthwaite y Laetsch 1967); mostrando la efectividad de la luz blanca en retrasar la senescencia en discos de Phaseolus vulgaris, también hallado en hojas de tabaco.

Los efectos de la luz sobre la senescencia son complejos, siendo fuentes de variación, su duración, intensidad, calidad, e interacción con otras variables ambientales.

En general, se acepta que la oscuridad induce el proceso de senescencia, mientras que la luz lo retrasa.

La senescencia en Lolium temulentum es sensible a la duración del día, induciéndola los días largos (Hedley y Stoddart 1972).

El papel de retardante de la senescencia de la luz, puede ser debido a su efecto sobre el mantenimiento de la fotosíntesis (Goldthwaite y Laetsch 1967, Thimann et al 1977, Lloyd 1980).

Algunos autores como Sugiura 1963, y De Greef et al 1971, en el líquen Marchantia demuestran la intervención del fitocromo en el fotocontrol de la senescencia. Existen trabajos sobre inhibición de la senescencia por luz roja y su reversibilidad por infrarroja con participación del fitocromo (De Greef et al 1971, Sugiura 1963).

La canopy funciona como un filtro, de forma que a las hojas inferiores no solo llega menos intensidad de luz sino que la relación Rojo/Infrarrojo desciende (Holmes y Smith 1977). Así pues, las hojas superiores influyen en la senescencia de las inferiores al alterar la cantidad y calidad de la luz.

NUTRIENTES

En el proceso de senescencia, los nutrientes pasan de las hojas viejas a los tejidos en desarrollo.

Desde los estudios de Molisch 1928 se han realizado en numerosas ocasiones trabajos en los que se provocaba un retraso en la senescencia mediante la extirpación de flores, frutos u hojas debido a competencia (Hedley y Stoddart 1972, Lindoo y Noodén 1977, Wareing y Seth 1967, Woolhouse 1967, 1978).

Sin embargo, existen especies en que hojas de plantas en fructificación son más duraderas (Perilla, Woolhouse 1974, Capsicum Hall y Brady 1977, Zea, Allison y Weinmann 1970, y Hordeum Mandahar y Gorg 1975).

Según Thomas y Stoddart 1980, en trigo, el llenado de grano depende más de la fase fotosintética del desarrollo foliar que de las variaciones en la movilización de nutrientes inducidas por senescencia.

Extirpando la semilla se frena la fotosíntesis (King et al 1967 Neales y Incoll 1968) y empieza la señal de la senescencia.

Los requerimientos en C y N de las partes de la planta en el desarrollo están estrechamente vinculadas a la etapa de madurez o senescencia en que esté la hoja suministradora o "fuente".

El tipo de mecanismo y el posible mecanismo feed-back debido al sumidero son cuestiones no resueltas (Neales y Incoll 1968 Evans 1975).

Otro factor importante en la regulación de la senescencia lo constituye la disponibilidad de agua.

Entre otros efectos, el stress hídrico reduce la incorporación de aminoácidos en RuBP carboxilasa y otras proteínas y reduce la actividad de la nitrato reductasa al reducir el flujo de nitratos.

También existe senescencia foliar como consecuencia de una deficiencia en nutrientes. Existe una redistribución del nutriente limitante desde el tejido senescente hasta la estructura en desarrollo (N,P,K,Mg,Na,Cl). Si los síntomas de deficiencia aparecen en los tejidos jóvenes, el nutriente limitante será inmóvil como Ca o B.

Finalmente, otra posible causa de implantación de la senescencia es la causada por infecciones.

1.3.- CONSECUENCIAS DEL PROCESO DE SENESCENCIA

1.3.1.- CAMBIOS ANATOMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES

Durante la expansión de las hojas se observan una serie de cambios anatómicos que pueden contribuir a cambios en su fisiología, como es por ejemplo el incremento de la actividad fotosintética a medida que va aumentando la talla foliar. Los cambios bioquímicos transcurren de forma paralela a las modificaciones ultraestructurales y a las pérdidas secuenciales de distintos orgánulos celulares (Biswal y Mohanty, 1978, Lee et al, 1980).

La hoja en rápida expansión muestra un parénquima en empalizada y mesófilo densamente empaquetados en comparación con una hoja senescente, hecho que implica una mayor impedancia física al paso del CO₂. Cuando la hoja alcanza su talla máxima, se observa un aumento de espacios intercelulares, con lo cual se facilitará el flujo de CO₂ hacia el interior.

El primer signo visible del asentamiento de la senescencia en una hoja es su amarilleamiento, debido a la descomposición de clorofilas, con lo que se hacen visibles xantofilas y carotenoides.

El contenido en clorofilas, carotinoides y galactolípidos disminuye (Ferguson y Simon, 1973) mientras que el de plastoquinonas aumenta (Lichtenthaler, 1969).

La secuencia de cambios ultraestructurales que tiene lugar durante la senescencia foliar varía entre las especies vegetales, pero los síntomas se expresan siempre en primer lugar en el cloroplasto. Uno de los primeros síntomas de la senescencia cloroplástica es la reducción en volumen (Ljubesic, 1968). En principio, el cloroplasto joven posee una membrana intacta

y las láminas del estroma están orientadas más o menos paralelamente al diámetro mayor del plástido. La matriz es densa y no está vacuolada.

Al iniciarse la senescencia, los cloroplastos muestran una forma esférica, apareciendo hinchados (Dodge, 1970). Tiene lugar una reorientación de los tilacoides hacia la periferia del cloroplasto, mientras que la matriz va perdiendo densidad.

Las membranas del grana e intergrana se van distanciando y dissociando posteriormente en forma de vesículas periféricas (Harris, 1978, Descomps y Deroche, 1973, Laetsch, 1974, Cunninghame et al 1979).

Aparecen unos glóbulos densos de material lipídico, posiblemente formados a partir de las membranas degradadas (Biswal y Mohanty 1978)

La aparición de dichos glóbulos osmiofílicos sin membranas externas ni estructura interna dentro del cloroplasto es el indicador más fiable del inicio de la alteración de la estructura cloroplástica (Hurkman, 1979).

A medida que avanza la senescencia, dichos glóbulos van aumentando en talla y número (Makovec y Wolfova, 1981) y finalmente grana y láminas del estroma no se distinguen de los glóbulos osmiofílicos (Butler y Simon, 1970, 1971). Se pierden los granos de almidón, desaparecen los ribosomas del plástido y finalmente se rompe la envoltura del cloroplasto, dispersándose el contenido por el interior de la célula (Hernández Gil y Schaedle, 1973).

En hojas que envejecen debidas a una escisión, en las primeras fases aparecen también los glóbulos osmiofílicos, aunque las

etapas posteriores son distintas. El hinchamiento de grana o intergrana no es pronunciado y además el sistema tilacoidal degenera sin formar vesículas o glóbulos osmiofílicos numerosos.

Según los estudios de Butler, 1967, existe una secuencia bien definida en la que los primeros en degenerar son los cloroplastos y ribosomas libres, a continuación las mitocondrias y finalmente rotura del plasmalemma y núcleo. Durante la senescencia existe un declive en proteínas aunque la hoja no ha perdido su capacidad de síntesis. Los cambios que tienen lugar en los ribosomas con la edad no son muy conocidos. Se ha visto una disminución de ellos (Eilam et al, 1971) y también de los polisomas con la edad. Butler, 1970, cita la presencia de agregados parecidos a polisomas en cotiledones de pepino.

Membranas y permeabilidad:

Uno de los primeros cambios que se observan al iniciarse la senescencia son a nivel de membrana. La primera que se rompe es el tonoplasto, vertiendo su contenido en el citoplasma. La membrana del cloroplasto es también rápidamente afectada declinando sus sulfo y galactolípidos antes que los lípidos de otras membranas (Nooden y Lindoo, 1978).

En la membrana plasmática, al igual que en la microsomal se observa una menor capacidad enzimática. El estado físico de los lípidos es un factor importante que determina la actividad enzimática y la permeabilidad. El aumento de la permeabilidad de membrana debida a senescencia lleva a una pérdida de función y precede a los descensos en tasa respiratoria.

Los cambios en membrana son importantes, muestra de ello lo es la habilidad de los iones de calcio retrasando la senescencia ya que ayudan a mantener la integridad de ésta (Poovaiah y Leopold, 1973).

El declive en la funcionalidad de la membrana está asociada a una alteración en las proteínas de ésta (Lees y Thompson, 1979) a una pérdida en fluidez, debido al hecho de que los lípidos al iniciarse la senescencia pasan a cristalinos (fase de gel) a temperaturas fisiológicas (Mc Kersie y Thompson, 1977 a,b, 1978 a,b). Dicha transformación lleva en cotiledones de Phaseolus vulgaris a una permeación de la membrana ,

con pérdida de compartimentización intracelular y celular. De este modo, se facilita la translocación de metabolitos que en el caso de cotiledones pasan a los ejes embrionarios.

Gilbert et al 1980 muestran que la utilización de benziladenina retrasa la cristalización de membrana aunque el mecanismo no está claro.

Según Pauls y Thompson, 1980, se debe a su habilidad en reparar daños por radicales libres.

1.3.2.- CLOROFILAS

El hecho más evidente del asentamiento de la etapa correspondiente a la senescencia de las hojas es sin duda el amarilleamiento del tejido, debido a la descomposición de las clorofilas (revisión Sestak 1977 a,b) Por esta razón, la evolución y disminución de la cantidad de clorofilas con la edad de la planta se ha tomado en numerosas ocasiones como índice de senescencia (Salih, 1977, Jenkins et al, 1981).

Thomas y Stoddart, 1975, trabajando con hojas de Festuca de genotipos normal y mutante, observó que los niveles de clorofila del segundo permanecían muy parecidos a los iniciales, tras 6 días de excisión. Concluyó advirtiendo que la rotura del pigmento que es ampliamente utilizado como índice de senescencia foliar, puede no ser una parte indispensable del proceso de senescencia.

También Martin y Thimann, 1972, cuestionan el hecho de la fiabilidad de la clorofila como medida de senescencia y en qué forma ilustra la integridad funcional y estructural del cloroplasto. En sus trabajos, utilizando inhibidores del RNA y síntesis de proteínas como la cicloheximida, no observaron pérdida de clorofilas durante un período de 8 días, aunque ya al quinto día el tejido se había vuelto más frágil. También después de cuatro días, tras la escisión foliar no se detectó actividad de RNA-asa en las secciones tratadas con cicloheximida, hecho que indica que después de cuatro días la cicloheximida había dañado la función de los sistemas enzimáticos, aunque los niveles de clorofila podrían sugerir que la hoja estaba saludable y no senescente.

Según Rhodes y Yemm, 1963, los cloroplastos son mayores y más largos y se desarrollan más rápidamente en la células viejas

de las puntas de las hojas de cebada que en las células jóvenes de la base.

También la concentración de clorofila es del 50 al 60% más elevada en hojas adultas que en jóvenes. La síntesis de ésta es siempre más rápida en las hojas jóvenes que en las viejas.

Un índice comúnmente utilizado es también la relación del cociente clorofila a/clorofila b. Al decrecer las cantidades de clorofilas con la edad, la clorofila a disminuye más rápidamente que la clorofila b, por ello las cantidades en clorofila b en tejidos viejos son proporcionalmente más elevadas que las de clorofila a. Dicho índice, siempre superior a 1, oscila entre 3 y 6 siendo valores altos representativos de una elevada actividad del tejido (Margalef, 1974). También en plantas C_4 es más elevado que en plantas del ciclo C_3 (Chang y Troughton, 1972).

Este índice ha sido utilizado por numerosos autores (entre otros Sestak, 1969 en Spinacia oleracea y Raphanus sativus, Dickmann, 1971 a, en Populus deltoides) observando valores elevados en las primeras etapas del desarrollo foliar, debidos principalmente a un incremento en clorofila a.

Otro índice (Margalef, 1974) utilizado en esta tesis, es el cociente de la densidad óptica de los pigmentos a las longitudes de onda de 430 y 665 nanómetros (D_{430}/D_{665}).

En las plantas superiores oscila entre 1.8 y 2.5 y expresa la proporción entre clorofila a y el resto de los pigmentos que persisten en la planta, que en el caso de plantas superiores se trata esencialmente de carotinoides.

Se han realizado numerosos trabajos correlacionando la cantidad



dad en clorofilas de un vegetal con su actividad fotosintética. Los estudios de Sestak (1963, 1966) y Kriedemann et al, 1970, demuestran una carencia de linealidad entre concentración de clorofilas y fotosíntesis neta a lo largo del desarrollo. Al madurar las hojas, la tasa fotosintética fue proporcionalmente mayor que el incremento en clorofilas. Por otra parte, al empezar los procesos degradativos en éstas se observa que la disminución en clorofilas es más gradual que la de la fotosíntesis, la disminución en fotosíntesis puede preceder a la de clorofilas (Hardwich et al, 1968). La concentración máxima en clorofilas no se encuentra tampoco necesariamente en el momento en que la hoja alcanza su talla final.

En 1967 Sestak y Catsky, realizaron un estudio sobre variaciones en clorofilas y fotosíntesis neta durante el crecimiento y envejecimiento de las hojas, con una extensa recopilación de trabajos realizados sobre el tema en diversos materiales vegetales, llegando a la conclusión de que los pigmentos clorofílicos existen en mayor abundancia que la precisa para la fotosíntesis que tiene lugar.

También se ha correlacionado el índice Clorofila a/clorofila b con la ontogenia y la fotosíntesis neta. Según Dickmann, 1971, la relación es mucho más estrecha que en el caso de las clorofilas totales. Sin embargo, otros autores (Shanta Kumari y Sinha 1972) no encuentran relación entre el cociente clorofila a/clorofila b y la tasa fotosintética en 21 cultivos de Cicer Arietinum L.

Al trabajar con hojas escindidas o discos foliares se ha visto la importancia de la edad del material utilizado y del mantenimiento en luz u oscuridad sobre la degradación de las clorofilas.

Laetsch, 1968 trabajando con discos de hojas de tabaco, encuentra que mantenidos en oscuridad, la pérdida en clorofilas es más lenta en las hojas más jóvenes. En trabajos con cloroplastos se ha observado que la clorofila del material bajo oscuridad se mantiene estable (Choe y Thimann, 1975). Sin embargo, observaron un retraso en hojas de avena sometidas a una exposición moderada de luz blanca.

Indican que el curso de la senescencia en cloroplastos separados del resto de la célula debe ser bastante distinto del de la hoja entera.

Concluyen diciendo que la síntesis proteica que se había encontrado previamente y que tenía lugar en hojas senescentes en oscuridad, también ocurría en parte en los cloroplastos. La estabilidad de éstos depende de factores externos.

Las proteasas por sí solas no justifican la rotura de las clorofilas. Por lo menos deben atacarse tres puntos: la membrana cloroplástica mediante fosfolipasas, el complejo proteína-clorofila por proteasas y la molécula de clorofila en parte por acidez y en parte por otros reactivos (no peroxidasas) que deben ser elucidados.

1.3.3.- PROTEINAS Y ACIDOS NUCLEICOS

Durante el crecimiento y desarrollo foliar se observan variaciones en los niveles de proteínas (Mothes, 1959, Osborne, 1962). En plantas anuales el contenido va aumentando hasta que la hoja posee su talla máxima, descendiendo a continuación (Beevers, 1976 b). Dicho descenso tiene lugar antes de que aparezca ningún signo de senescencia.

Según Carr y Pate, 1967, cuando la hoja alcanza su máxima talla ya se ha perdido una cuarta parte de las proteínas. A lo largo del envejecimiento no todas las fracciones proteicas descienden por un igual. Las proteínas solubles descienden más rápidamente que las insolubles. La proteína del cloroplasto RuBP carboxilasa declina mucho más rápidamente que el resto (Kannangara y Woolhouse, 1968, Kawashima y Mitake, 1969).

Asimismo, las isoenzimas de la fracción soluble proteica aumentan o disminuyen según el tipo (Chen et al, 1971). Aumentan principalmente los enzimas degradativos como la RNA asa y los proteolíticos, La polifenol oxidasa puede aumentar con la edad (Spencer y Titus, 1973).

En planta entera una explicación del declive proteico es por disminución de la cantidad de aminoácidos (Simon, 1967). En senescencia secuencial, los aminoácidos pasan de las partes más inferiores del vegetal a las partes jóvenes en desarrollo, implicando un envejecimiento del órgano fuente. Se ha sugerido (Wareing y Phillips, 1971) que el rápido transporte de aminoácidos a otras partes de la planta impide que existan aminoácidos suficientes para la síntesis. Sin embargo, según Bidwell et al, 1964, los aminoácidos derivados de la degradación de proteínas no son los de la síntesis proteica. El turnover proteico por hora en tejidos vegetales es del 2%, anu-

lándose con el proceso de senescencia .

El efecto de todo ello en hojas escindidas es la acumulación de aminoácidos debido a una degradación de las proteínas.

Existe polémica en dilucidar si la disminución en proteínas es debida a una disminución en la capacidad de síntesis o bien a un incremento en la velocidad de degradación de éstas (Shibaoka y Thimann, 1970). Existen numerosos trabajos apoyando ambas tesis. Los equipos que apoyan la tesis de que es debido a disminución en la síntesis están basados en los trabajos de Osborne, 1967 y Wollgiehn, 1967.

Ambos observaron en hojas escindidas y mantenidas en agua que la capacidad en incorporar aminoácidos marcados disminuye y es revertida por citokininas. Parece que el descenso en la capacidad de síntesis es un acontecimiento temprano dentro del proceso de senescencia.

Por otro lado también existen numerosos trabajos en que se observa un aumento de la actividad proteolítica en tejidos senescentes (Anderson y Rowan, 1965, Beever, 1968, Martin y Thimann, 1972, Spencer y Titus, 1973). Esta hipótesis también viene apoyada por el hecho de que inhibidores de la síntesis proteica pueden retrasar la senescencia aunque no es general (Wollgiehn, 1967). Ejemplos lo son los trabajos de Thomas, 1976 utilizando (2-4 metil, 2,6, dinitroanilino)-N-metil-propionamida y Martin y Thimann, 1972 con cicloheximida.

A ser degradadas más rápidamente las proteínas en los tejidos senescentes se podría pensar que ha disminuido su síntesis, mientras que en realidad sería debido a un incremento en proteolisis (Shibaoka y Thimann, 1970, Soong et al,

1977).

La actividad proteásica parece también incrementarse en hojas viejas (De Jong, 1972, Drivdahl y Thimann, 1978), aunque es desmentido en los trabajos de Anderson y Rowan, 1965 y Matile y Winkenbach, 1971).

Se ha sugerido que en el centro activo de las proteasas se incorporan aminoácidos como L-serina y con menos efecto D-serina, cisteína, treonina, alanina y glicina (Martin y Thimann 1972)

Wittenbach, 1977 a,b, señala en hojas de tabaco senescentes una mayor actividad de proteasas con grupos sulfidrilos, con probablemente con serina

Por otra parte, Van Loon y Haverkort, 1977 trabajando con hojas de avena demuestran que la actividad proteásica de hojas escindidas es distinta si se trabaja en posición horizontal sobre placas de Petri o en posición vertical con sus extremos en agua. Estas últimas no muestran actividad proteásica hasta el cuarto día, aunque el contenido en proteínas había sufrido una disminución del 80%. Sugieren a raíz de ello, que la síntesis de proteasas no es un requisito indispensable para la rotura de las proteínas durante la senescencia.

Es interesante el considerar un posible papel de los lisosomas en la senescencia foliar (Noodén y Leopold, 1978). Estos orgánulos son muy abundantes en los animales, poseyendo un elevado nivel de fosfatasas ácidas y otros enzimas hidrolíticos ácidos.

No se sabe si existen en los vegetales aunque existen orgánu-

los unidos a membranas con enzimas hidrolíticos que son muy parecidos (Matile y Winkenbach, 1971), abundantes sobre todo en plantas senescentes (Butler y Simon, 1970, 1971). Los esferosomas podrían considerarse lisosomas (Buler, 1967), pero sin embargo se rompen ya muy adentrado el proceso de la senescencia.

Conjuntamente con los cambios mencionados en el contenido en proteínas a lo largo de la senescencia, se observa en los tejidos vegetales un descenso en el contenido en ácidos nucleicos. (Mothes, 1959).

DNA y RNA disminuyen a velocidades distintas, siendo mucho más estable el primero (Osborne, 1962, Woolhouse, 1967, Wollgiehn, 1967). También las distintas fracciones del RNA disminuyen de forma diferente (Jupp 1980 y Ness 1980)

Las más lábiles son las de cloroplastos y ribosomas, siendo las más estables las de mitocondrias y RNA soluble, manteniéndose prácticamente este último (Butler y Simon, 1971, Eilam et al, 1971).

Se ha observado que el declive en RNA durante la senescencia es debido a un descenso en la capacidad de síntesis. Así la benziladenina BA, una citokinina que posee carácter de retardante de la senescencia, aumentó considerablemente la producción de RNA en Lemna, mientras que el ácido abscísico lo redujo.

Gorter, 1972, observó que la incorporación de adenina marcada se reducía notablemente en hojas maduras. También se ha observado que el tipo de síntesis de RNA también varía con la senescencia, en hojas jóvenes es preponderantemente el de alto peso molecular, mientras que en hojas viejas lo es el de bajo peso molecular. Algunos autores opinan que el descenso en

ácidos nucleícos es debido a un aumento de la hidrólisis (alto nivel de ribonucleasas) y no a una reducción de la síntesis tal como se discutió para las proteínas.

1.3.4.- ACTIVIDAD ENZIMATICA

RuBP CARBOXILASA - OXIGENASA

Al estudiar los cambios en niveles de proteínas solubles a lo largo del ciclo vital de una hoja, se observó que cuando ésta poseía su máxima expansión, la mayor parte de su proteína se recogía en una banda de elevado peso molecular que incluía a la llamada "fracción I" activa fotosintéticamente y relacionada con la fase oscura.

Los primeros trabajos al respecto datan de 1947 en que Wildman y Bonner observaron que más del 70% de la proteína soluble de hojas de espinacas era homogénea electroforéticamente y disminuía progresivamente a lo largo de la vida de la hoja.

Demostraron que dicha fracción denominada "fracción I" era un componente enzimático cloroplástico que catalizaba la carboxilación de ribulosa 1,5-difosfato a ácido fosfoglicérico.

Weissbach y col. 1956 purificaron el enzima mostrando que formaba PGA a partir de CO₂ y RuBP. Sus propiedades físicas, incluyendo el coeficiente de sedimentación fueron idénticos a los de la fracción I de Wildman y Bonner.

En los estudios realizados hace años se consideró que fracción I y la RuBP carboxilasa eran distintas.

Haselkorn y col., 1965, proponían que la RuBP carboxilasa era una molécula activa únicamente cuando estaba asociada a la fracción I proteica.

También Kawashima y Mitake, 1960, Kawashima y Wildman, 1970,

estudiando la asociación de la RUBP carboxilasa y la fracción I proteica, sugirieron que la actividad del enzima viene regulada por cambios conformacionales de la fracción I que tienen lugar con la senescencia. En hojas de tabaco observó que la tasa de disminución de dicha fracción era parecida o algo menor que la del contenido en proteína total, pero mayor que el de la actividad de la RuBP carboxilasa.

Actualmente (Kleinkopf et al, 1970, Huber et al, 1976 y Ogren y Hunt, 1978) no han dudado en afirmar que la fracción I proteica corresponde a la RuBP carboxilasa, responsable de la reacción de carboxilación del ciclo de Calvin.

Dicho enzima está presente en la mayoría o probablemente en todos los vegetales y microorganismos que realizan fotosíntesis. Corresponde aproximadamente a un 50% de la proteína soluble de una planta C_3 siendo la proteína más abundante. (Pheloung y Brady 1979). Las hojas de tabaco contienen unos 10 mg de proteína por gramo de peso fresco y constituye igualmente un 16% de la proteína soluble de hojas de espinacas (Wildman y Kwanyen, 1978).

Toda la RuBP casa está localizada en el estroma de los cloroplastos y puede alcanzar valores de 240 mg de enzima por ml de volumen de estroma, situándose la concentración del enzima entre 2 y 3 mM (Jensen y Bahr, 1977).

Este enzima ha sido utilizado entre otros temas, como marcador genético, para comprobar relaciones citoplasmáticas, para seguir la evolución de la autotrofia (Kung, 1976) y en estudios taxonómicos (Wildman, 1979). La enzima posee un peso molecular de $500.000 + 50.000$, con 8 subunidades grandes ($55.000 + 4.000$) y 8 de pequeñas ($15.000 + 3.000$) ($L_8 S_8$). Esta estructura está presente en todos los organismos eucariota fotosintéticas.

Las subunidades mayores y menores están dispuestas en dos planos formando un prisma de base aproximadamente cuadrada de anchura algo mayor que de altura (ver Akazawa et al, 1978, Jensen y Bahr, 1977).

Las subunidades grandes son muy parecidas entre distintas especies, mientras que las pequeñas poseen aminoácidos distintos. Parece que durante la evolución filogenética de la molécula de RuBP-casa se conservó la información genética en el cloroplasto para las subunidades mayores, mientras que la variabilidad tuvo lugar debido a las subunidades menores.

No se conoce hasta ahora el papel de la subunidad menor. Se sabe que las moléculas L_8 tienden a unirse en agregados mayores. Por ello puede especularse que las subunidades pequeñas sirven como delimitante espacial entre moléculas L_8 y evitan su asociación en el gel del estroma (Wildner, 1981, Wildner y Henkel, 1979, Jacquot et al 1982, Schmidt y Mishkind 1983)

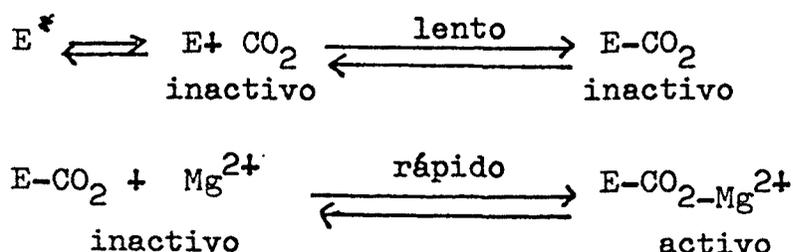
También se sabe que la pérdida de las unidades pequeñas lleva a un cambio en el pH óptimo, con el aspecto regulador que ello comporta.

Síntesis y regulación:

La unidad mayor es sintetizada en ribosomas 70s en el cloroplasto, mientras que la pequeña se sintetiza como precursor (pS) en ribosomas 80s en el citoplasma, se procesa después de su transporte en el cloroplasto y se une a la unidad mayor (Chua y Schmidt, 1978, Wildner, 1981, Roy et al, 1977).

El enzima purificado muestra distintos grados de activación que dependen de las concentraciones de CO_2 y Mg^{2+} , del pH y de la temperatura (Bahr y Jensen, 1978 y 1974, Braun et al 1983)

A partir de una serie de estudios cinéticos se puede describir el proceso de activación como:



(Jensen et al, 1978, Kung et al, 1980, Perchorowicz et al, 1982, Kawashima y Wildman, 1970, Chollet, 1978, Buchanan y Schurman, 1973, Lorimer et al, 1978, Lorimer, 1981, Hall et al 1981, Martin y Tabita 1981, Meyers et al 1983, Sicher et al 1981)

La primera etapa puede ser un cambio conformacional de la proteína y viene influido por la temperatura (Mächler y Nosberger, 1980). En esta reacción de preactivación posiblemente se modifica el grupo ϵ -amino de una lisina para dar un carbamato al que se unen rápidamente los iones Mg^{2+} (Wildner et al, 1980, Mizioroko, 1978).

Según Henkel et al, 1980, para la activación completa del enzima es necesaria la presencia de oxígeno. En la segunda etapa tiene lugar una unión lenta pero reversible entre enzima y CO_2 seguida por una reacción rápida con Mg^{2+} .

El Mg^{2+} es necesario para la activación del enzima pero no interviene directamente en la reacción de carboxilación y las moléculas de CO_2 que intervienen en la activación no toman parte en la carboxilación (Lorimer et al, 1976, Paech et al 1978).

Parece que la temperatura afecta cambiando la afinidad por el Mg^{2+} , pero no por el CO_2 (Mächler et al 1980 b). La luz produce una activación probablemente debida a un aumento en Mg^{2+} y pH en el estroma (Mächler y Nosberger 1980, Weis 1981, Sicher 1982)

Se ha visto que después de la iluminación tiene lugar una toma de H^+ a través de la membrana del tilacoide acompañado de una alcalinización del estroma. Con ello aumenta el pH en éste hasta 8, que es el óptimo para la fijación del CO_2 . Al movimiento de H^+ a través del tilacoide se opone un movimiento contrario de Mg^{2+} al estroma.

El enzima también puede inhibirse debido a sustrato a altas concentraciones (Jensen et al 1978), y activarse mediante fosfato de piridoxal (Whitman et al 1979).

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA SINTESIS:

Uno de los factores fundamentales lo constituye la luz.

La RuBP-casa se sintetiza en la oscuridad, dependiendo de las reservas energéticas almacenadas (Huffaker 1982).

Kleinkopf et al mostraron que plantas de cebada crecidas en oscuridad aumentaban su concentración en RuBP-casa al pasarlas a la luz, siendo este aumento relacionado con el inicio de la actividad fotosintética.

Asimismo, la concentración de RuBP-casa depende de otras condiciones ambientales como disponibilidad de nitrógeno y edad foliar (Huffaker 1980).

Turnover de la RuBP-casa: (ver revisión Peoples 1980)
cabe distinguir tres fases distintas :

- Durante la síntesis no se observa ninguna presencia de degradación, desconociéndose si existe turnover de las subunidades de la RuBP-casa antes de su unión definitiva en el cloroplasto.
- Durante la fase de máxima concentración de RuBP-casa, el turnover es lento o apenas detectable con los métodos utilizados (Huffaker 1983).
- Durante la senescencia, la degradación es rápida. Este hecho se conoce desde los estudios de Kawashima et al (1967) en tabaco y de Kannangara y Woolhouse en Perilla (1968), observando la disminución de la llamada fracción I proteica.

Es de destacar, que durante esta etapa rápida de degradación de RuBP-casa y que corresponde al envejecimiento foliar, se observó que la concentración foliar de proteínas que no eran RuBP-casa permanecía constante.

Huffaker (1982) ha observado cierta síntesis de RuBP₂ durante dicha etapa senescente; las hojas incorporaban lentamente aminoácidos, mientras que la incorporación en proteínas no RuBP₂ fue mucho mayor, a pesar de mantenerse constante su concentración.

La RuBP carboxilasa cataliza una doble reacción:

- a) carboxilación de la ribulosa 1,5 difosfato para dar dos moléculas de D-3 fosfoglicerato.
- b) oxigenación de la ribulosa 1,5-difosfato para formar una molécula de fosfoglicolato y una de 3-D fosfoglicerato.

La función carboxilásica era conocida desde hacía tiempo, pero sólo recientemente se ha estudiado su función oxigenásica.

En 1949 Tamiya y Huzisige propusieron ya que CO_2 y O_2 competían en el mismo lugar del enzima de la carboxilación. Esta idea fue olvidada hasta que en 1971 Ogren y Bowes llegaron a la misma conclusión al observar que el oxígeno inhibía la fijación del CO_2 por el enzima. Los trabajos posteriores de este equipo (Bowes et al 1971, 1972 a), b), 1975, Jordan y Ogren 1981) han demostrado que el oxígeno no solo era un inhibidor competitivo de la carboxilación sino también un sustrato para la formación de P-glicolato a partir de RuBP (ver revisión de trabajos de competitividad O_2 - CO_2 en Henkel et al 1980, Lorimer 1981, Bird et al 1982)

Se ha probado que la carboxilación y oxigenación tienen lugar en el mismo lugar activo del enzima (Lane y Mizioroko 1978) apoyado por varios hechos como son la competitividad por el O_2 - CO_2 y que el CO_2 en presencia de iones Mg^{2+} activa tanto la actividad carboxilásica como oxigenásica. Laing et al 1974 y Badger y Andrews 1974, Badger y Collatz 1977, estudiando el efecto de la temperatura sobre la actividad de la RuBP carboxilasa y oxigenasa respectivamente, concluyen que el balance entre fotosíntesis y fotorrespiración es un reflejo de la relación entre ambas actividades. Las tasas relativas de las dos reacciones vienen reguladas por la concentración de O_2 y CO_2 .

También en frutos se ha discutido si el balance de actividades entre RuBP carboxilasa/oxigenasa es el que contribuye a alcanzar el climacterio respiratorio que se observa en la madurez (Bravdo et al 1977). El ácido glicólico, producto de la reacción de la oxigenasa es el precursor de la formación de H_2O_2 . La formación de peróxidos y peroxidases en frutos está relacionado

con la maduración de éstos y su climacterio.

Bränden en 1978 y Bränden 1978 sugirieron la posibilidad de que la RuBP carboxilasa/oxigenasa fuese en realidad dos enzimas distintos. Al realizar una filtración en gel de Sepharose 6B a pH 7.4 obtuvo un único pico, pero sin embargo, al elevar el pH a 8.3 se separaron ambas actividades. Según este autor la oxigenasa sería un enzima que contendría cobre. Sin embargo, Mc Curry et al 1978, repitiendo el procedimiento experimental de Bränden fueron incapaces de separar la actividad oxigenásica de la carboxilásica.

Recientemente se ha podido observar una fluctuación diurna en actividad de la RuBP - casa en hojas de la planta del cacahuete, dependiendo de la concentración de metabolitos como 6 - fosfogluconato, fructosa 1,6 - bifosfato y sedoheptulosa 1,7 - bifosfato (Ku et al 1982).

Respecto a la temperatura, su óptimo es amplio y se sitúa entre 40°C y 50°C por lo que no constituye un factor limitante en los estudios que se han realizado sobre su actividad (Gerwick y Williams 1979, Magalhaes y Hageman 1978, Stamp 1979, Monson et al 1982). Culton et al 1979 tampoco observaron en tres poblaciones de Taraxacum officinale un papel de la RuBP carboxilasa en la inhibición de la fotosíntesis a altas temperaturas, aunque sugieren que la elevada resistencia del mesófilo a estas temperaturas implicaría la participación de un componente bioquímico de tipo parecido.

Parece que existe una aclimatación de la RuBP-casa a bajas temperaturas de crecimiento (Huner y Mc Dowall 1979, Sosinska y Kacperska-Palacz 1979, Sawada et al 1974). Este hecho podría contribuir al conocido incremento en capacidad fotosintética de plantas crecidas a baja temperatura (Björkman et al 1975, Berry y Björkman 1980, Monson et al 1982)

SENESCENCIA Y PERDIDA DE RuBP CARBOXILASA. RELACION CON CAMBIOS EN OTROS PROCESOS, ESPECIALMENTE FOTOSINTESIS :

La pérdida de RuBP-casa originada por envejecimiento foliar va ligada a otros cambios que tienen lugar simultáneamente como son la pérdida de clorofilas, el aumento del cierre estomático, el aumento de la actividad proteolítica y el descenso en fotosíntesis.

La tasa de degradación de clorofilas sigue según Stoddart 1975, 1981 y Hall et al. 1978 un proceso diferente del de la RuBP-casa, mostrando en hojas "flag" de trigo una desaparición más rápida de la clorofila.

Sin embargo, Wittenbach 1979 en el mismo material encontró descensos simultáneos en ambos niveles. Tanto las pérdidas en clorofilas como en RuBP-casa son más rápidas en hojas escindidas.

La actividad proteolítica (endopeptidásica) es suficientemente elevada como para responsabilizarse de la degradación de la RuBP-casa con el envejecimiento (Peterson y Huffaker 1980 Wittenbach et al. 1980), demostrando que su actividad aumenta antes que otros signos de senescencia y antes de la desaparición de RuBP-casa.

Debe tenerse en cuenta, que antes del envejecimiento, la RuBP casa se encuentra protegida de la degradación, dentro del cloroplasto, por tanto depende de la integridad de membrana de éste.

Thomas y Huffaker 1980, encontraron que la RuBP casa en hojas escindidas de cebada poseía cierta actividad endógena endopeptidásica que podría responsabilizarse de la hidrólisis completa de RuBP casa en unos doce días, tiempo parecido a la pérdida in vivo de RuBP casa encontrada por los mismos .

Definen, además tres tipos de parámetros fisiológicos basados en su tasa de cambio a lo largo de la senescencia foliar de cebada en hojas escindidas :

- Aumento en la resistencia estomática y disminución de la transpiración.
- Descenso en proteína RuBP casa, fotosíntesis y actividad carboxilásica. Aumento de la resistencia del mesófilo.
- Disminución de clorofilas y aumento de la actividad proteínica.

FOTOSÍNTESIS

Uno de los primeros autores en mostrar una correlación entre RuBP casa y la actividad fotosintética de CO_2 fue Smillie (1962), en hojas de guisante, observando que coincidían los máximos de ambas actividades.

A continuación se han realizado muchos estudios sobre el tema siendo ratificado por distintos autores (Mc Mahon y Bogorad 1965, Eagles y Treharne 1969, Wareing 1968, Peterson y Huffaker 1975, Medina y Delgado 1976). Otros como Thomas y Thorne 1975, Frey y Moss 1976, Wittenbach 1979, Sinha y Rajagopal 1980 y Friedrich y Huffaker 1980) no han encontrado una correlación estrecha entre ambos factores.

Dickmann 1971 en Populus deltoides observó que la actividad enzimática transcurrió de forma paralela a la fotosíntesis al ir madurando la hoja, siendo los niveles de enzima bajos en las primeras etapas cuando aún no se realizaba fotosíntesis neta. Bowes et al 1972 b) en hojas de soja sólo observaron una buena correlación entre ambos parámetros en hojas crecidas en cámara. En condiciones de campo vieron que la fotosíntesis de hojas sombreadas, al contrario de las hojas de cámara, era más reducida que la actividad carboxilásica, sugiriendo que factores indeterminados pueden tener una importancia decisiva en el máximo de la fotosíntesis bajo condiciones de campo.

Durante la senescencia foliar se observa un descenso en actividad de la RuBP casa y de la fracción I proteica. Según Gorter 1972, la disminución en el contenido en proteínas con la edad era debido al cese en la síntesis de la fracción I y posterior degradación, teniendo lugar al alcanzar la hoja su máxima expansión y coincidiendo con el momento en que la fotosíntesis neta alcanza su máximo para ir disminuyendo progresivamente (Blenkinsop y Dale 1974 b), Callow 1974).

También Batt y Woolhouse 1975 con Perilla frutescens llegan a las mismas deducciones, sugiriendo que la cantidad de RuBP-casa es el factor limitante durante la senescencia foliar.

Antes de la senescencia, la RuBP-casa funciona proveyendo productos originados en la fotosíntesis a los lugares donde existen órganos en desarrollo. Su papel durante la senescencia se basa probablemente en que con la rotura del enzima se abastece a la planta de N y C adicional para la formación de la semilla.

Por tanto, la lisis de este enzima tendrá un papel importante en el control de la senescencia. (Wittenbach, 1979).

Hall et al 1978 estudiando las variaciones de la RuBP casa con la senescencia de la hoja flag de trigo observó que la RuBP casa no declina hasta bien avanzada ésta, mientras que su actividad sufre cambios notables durante el desarrollo del fruto. Parecería como si las plantas sufrieran una senescencia irreversible durante la antesis y que se encuentran disminuciones rápidas en las cantidades de clorofilas, fotosíntesis y actividad de RuBP casa.

Estos resultados de cambios en la actividad antes de la senescencia son contrarios a los de Wittenbach (1978,1979). En sus trabajos observó que la actividad específica de la carboxilasa no cambió hasta el inicio de la etapa irreversible de la senescencia, después de que el 50% de la RuBP casa había sido degradada. La RuBP casa permaneció estable tanto en la hoja flag como en la segunda. Después, conjuntamente con la citada disminución de la actividad de la RuBP casa en la etapa irreversible, se observó una disminución en fotosíntesis con elevada correlación entre ambos parámetros. También en este caso los resultados de Hall son distintos ya que encuentra que el descenso en la actividad de la RuBP casa fue mayor que el descenso en fotosíntesis.

Una cuestión interesante es si las carboxilasas constituyen un factor limitante de la fotosíntesis. Diversos autores afirman este hecho bajo condiciones de saturación de luz y concentraciones de CO_2 de 360 ppm (Eagles 1969, Neales et al 1971, Batt 1975, Black 1973, Ku et al 1979, Crews et al 1980). La limitación sería debida a la carboxilación y no a diferencia en la difusión del CO_2 hasta los centros fotosintéticos, pues no pudieron encontrar correlaciones entre fotosíntesis y resistencias estomáticas.

Otros autores no están de acuerdo con ello, al menos en según que fases de ontogenia (Blenkinsop y Dale 1974, Thomas y Thorne 1975, Wirth et al 1977). Ello puede ser debido a que se pue-

den encontrar distintas actividades de carboxilación si la extracción del material vegetal no es completa. Por otra parte Gordon et al 1978 concluyen que la RuBP-casa no es el factor limitante sino que lo es la capacidad fotofosforilativa del cloroplasto.

Para algunos autores como Salin y Homan 1971, 1973 y Passera 1973 la disminución de la actividad de la RuBP-casa en las plantas más viejas puede ser atribuida en parte a un incremento de afinidad del enzima por el oxígeno, demostrado por el hecho de que se sintetiza mayor cantidad de glicólico con la edad.

Por otra parte, Thomas y col 1978 y Hall y col 1978, observaron que la relación entre actividades de la RuBP-casa/oxigenasa permaneció constante o sea, declinaron ambas con la misma tasa. Se sugiere que el descenso relativamente más lento en fotorrespiración respecto a fotosíntesis encontrado por diversos autores no refleja los cambios obtenidos "in vitro" de las actividades enzimáticas. Intentan explicarlo alegando que "in vivo", las actividades pueden estar influenciadas por condiciones cloroplásticas que no tienen lugar "in vitro".

Al principio, a pesar de encontrarse correlación entre actividad de la RuBP casa in vitro y fotosíntesis, la baja actividad del enzima y su elevado Km no podían responsabilizarse de la fijación fotosintética de CO_2 encontrada.

Cuando se empezó a tener en cuenta el verdadero sustrato, o sea el CO_2 , se determinó un Km mucho menor: 10 - 20 mM (Jensen y Bahr 1977), siendo la concentración en el cloroplasto 2 - 3 mM y con ello capaz de responsabilizarse de la fijación fotosintética.



Según Salin y Homan 1971, 1973, las hojas jóvenes de tabaco se comportan de manera muy parecida a las plantas C_4 , formando oxalacético como primer producto de la fotosíntesis. La actividad del enzima fue efectivamente de dos a tres veces superior en hojas jóvenes sin embargo se continuaban manifestado diferencias respecto a la actividad de una planta C_4 típica. Esta mayor actividad de la PEP-casa sugiere una mayor eficiencia en las hojas jóvenes con un probable reciclaje interno de CO_2 .

La salinidad provoca un descenso en la relación RuBP/PeP-casa estimulando la fotorrespiración e inhibiendo el mecanismo de desprendimiento de oxígeno (Osmond y Greenway 1972, Passera y Albuzio, 1978).

Al ir madurando las hojas de Zea mays, Williams y Kennedy 1978 observaron que las actividades de los enzimas no cloroplásticos aumentaron precediendo a los del enzima cloroplástico RuBP casa. Fox y Naylor 1978, también en Zea Mays observaron que la actividad de la RuBP-casa aumentaba desde la base de la hoja hacia el ápice, en cambio la actividad de la P P-casa aumentaba al revés, desde la base hacia el ápice.

OTROS ENZIMAS

Durante el crecimiento, expansión y envejecimiento de las hojas tienen lugar variaciones en las actividades de numerosos enzimas. Aparte de los estudios realizados sobre la RuBP carboxilasa, enzima muy relacionado con la pérdida de productividad de las hojas al envejecer, debido a su acción sobre la fijación fotosintética de CO_2 , existen trabajos que intentan relacionar los cambios en algunas actividades enzimáticas con el asentamiento de la etapa senescente. Con ello se pretende encontrar índices de senescencia nuevos, no habiéndose logrado de forma satisfactoria hasta el momento.

Se pueden citar los estudios de Weston 1969 y Kar y Mishra 1976 sobre la polifenol oxidasa y peroxidasa observando ambos equipos un incremento significativo de su actividad durante la senescencia. Sin embargo, en 1979, Patra y Mishra vieron que

el aumento en actividad se dá únicamente en hojas escindidas y no en las unidas a la planta, por lo que ellos mismos dejan de considerarlo como un índice de senescencia.

También se ha investigado sobre las actividades de las pirofosfatasa ácida y alcalina y catalasa (Kar y Mishra 1975), observando en este caso una disminución en actividades, ratificado en el caso de la pirofosfatasa alcalina en 1979 por miembros del mismo equipo (Patra y Mishra 1979).

Evans y Haber 1977 trabajando con fosfatasa ácida observó variaciones entre la utilización del tejido escindido e intacto, por lo que advertían de los posibles errores que se pueden originar al utilizar material escindido en estudios de senescencia. Pollock y Lloyd 1977, 1978, estudiaron la distribución de la invertasa ácida en hojas en desarrollo de Lolium temulentum observando una correlación entre niveles altos de invertasa ácida y niveles bajos de sacarosa durante el desarrollo.

Feller et al 1977 identificaron y caracterizaron algunos enzimas proteolíticos mayoritarios en hojas de maiz (aminopeptidasa y carboxipeptidasas). También sugirieron un papel importante de los enzimas caseolíticos en iniciar una hidrólisis rápida de proteínas foliares. En 1978, el mismo equipo realizó un estudio en trigo sobre las actividades de la aminopeptidasa, carboxipeptidasa y endopeptidasa. La aminopeptidasa aumentó durante el desarrollo foliar, alcanzó el máximo y decreció con la movilización del N foliar.

La carboxipeptidasa también aumentó durante el desarrollo de las hojas y disminuyó durante la senescencia, pero de forma más lenta, comparativamente con la aminopeptidasa. La endopeptidasa aumentó por el contrario al iniciarse la senescencia y tuvo su máximo durante la movilización proteica. La actividad máxima empezó en la primera hoja siguiendo hacia las superiores y también desde la punta a la base.

Parece que la actividad de la endopeptidasa es la única de las

tres estudiadas que estuvo asociada a la movilización de la proteína foliar durante la senescencia.

1.3.5.- PROCESOS DE INTERCAMBIO GASEOSO: FOTOSINTESIS

Las variaciones en las tasas fotosintéticas que sufren las especies vegetales no pueden relacionarse exclusivamente con diferencias en las condiciones ambientales en que han crecido o han sido medidas las plantas. Factores importantes que muchas veces han sido ignorados son la ontogenia foliar y la posición de una hoja en la planta.

Durante la ontogenia, la planta pasa por distintas fases de crecimiento y desarrollo y al mismo tiempo, van sufriendo variaciones los factores internos que afectan a la fotosíntesis. Por tanto, es de esperar que los cambios mayores observados en actividad fotosintética se observen en el momento en que la planta pasa de una fase de crecimiento o desarrollo a otra, o bien cuando se forman nuevos órganos. En general, se está de acuerdo, en que en las hojas, las tasas de fotosíntesis máximas se observan en el momento o poco antes de que alcancen su máxima talla o expansión foliar.

Existen numerosos trabajos al respecto, destacándose la recopilación hecha por Sestak 1967, 1979, y los posteriores trabajos de Kriedemann 1968, Kriedemann et al 1970 en hojas de vid, Cornic et al 1970 en Sinapis alba, Dickman 1971 y Isebrands 1973 en Populus deltoides, Fraser, Bidwell 1974 en Phaseolus vulgaris, Jewiss y Woledge 1967 en Festuca, Rawson y Woodward 1976 y Woodward y Rawson 1976 en tabaco y soja, Smillie 1962 en guisante. Algunos autores (Hopkinson 1964 en pepino) han encontrado que la fotosíntesis máxima se encuentra sin embargo cuando se alcanza el 20-50% del área máxima. A partir del momento de máxima actividad fotosintética, ésta se mantiene durante un tiempo variable, según la especie y la edad de la hoja, descendiendo después con la senescencia (Kriedemann 1968, 1970). Las variaciones van desde pocas semanas en plantas anuales como

Phaseolus a meses o años como en Phoenix dactylifera (Hardwick et al 1968).

Woolhouse, en Perilla, observó un declive gradual y lento en fotosíntesis hasta siete días antes de la abscisión, siendo a partir de entonces mucho más rápido. Hopkinson 1964 y Kriedeman 1968, 1970 observaron que cuanto más vieja era una hoja, el declive en fotosíntesis se adelantaba. En condiciones de laboratorio, las máximas fotosintéticas se alcanzaban a los pocos minutos en hojas jóvenes, mientras que las hojas maduras necesitaban 2-3 horas para alcanzar su máximo. Isebrands 1973 observa que la fijación de CO_2 en hojas jóvenes, aunque siendo baja, estaba reducida casi exclusivamente a las porciones apicales maduras, declinando rápidamente hacia la base inmadura.

Según Sestak y Catsky 1967 la actividad fotosintética es mayor en la base de los limbos, en la zona de crecimiento en extensión que es donde la actividad fotosintética es más elevada.

Woodward 1976 realizó un trabajo con soja relacionando fotosíntesis neta, área y edad de las hojas del tallo principal en invernadero y cámara. En la primera hoja, la fotosíntesis se alcanzó el tiempo de posesión de la máxima talla foliar, ocurriendo solamente en las dos primeras hojas; en la última la fotosíntesis iba retrasada. Un hecho observado solo en las plantas de invernadero fueron unas depresiones de la fotosíntesis a mitad de la vida foliar, posiblemente debidos a cambios en niveles hormonales o demandas por parte de sumideros. En las hojas crecidas en cámara, la fotosíntesis máxima se alcanzó al tiempo del área máxima, declinando posteriormente en todas las hojas pero siendo el máximo mucho más prolongado en las superiores. Este autor lo relaciona con cambios en las resistencias foliares, disminuyendo al expansionarse la hoja, llegando a un mínimo al alcanzar la talla máxima y aumentar a continuación.

Hopkinson 1964 realizó un estudio sobre el curso diario de fotosíntesis en Cucumis sativus. Existía un aumento en fotosíntesis hasta llegar a un valor máximo al cabo de un período lumi-

noso de 16 horas y lo relacionó como consecuencia de la apertura estomática, también vió una caída gradual de la fotosíntesis al final del período luminoso. Otros autores han observado que con un nivel adecuado de agua se podía mantener un nivel constante de fotosíntesis a lo largo de períodos largos.

Parece que existe un patrón de fotosíntesis con el envejecimiento que se repite en cada hoja de la planta. Esto sugiere que la fotosíntesis es a cierto nivel controlada o dependiente de factores intrínsecos de cada hoja.

Sin embargo, hay desviaciones del patrón que están correlacionadas con acontecimientos en otras partes de la planta como floración, emergencia de hojas nuevas, y rebrotes en gramíneas, posiblemente influido por la difusión de hormonas como citokininas y auxinas (Turner 1965 y Bidwell 1966). Neales 1968, apoya esta hipótesis afirmando que la tasa de fotosíntesis está regulada por interacciones en la acumulación de asimilados dentro de la hoja, su tasa de transpiración y la demanda de asimilados en otras partes de la planta.

Cuando se desarrolla un nuevo sumidero ("sink"), como una hoja nueva o una flor, las tasas de intercambio gaseoso en las hojas ya existentes se alteran debido a la demanda de liberación de productos asimilados. También aumenta la translocación y los asimilados van desde la hoja más vieja, al sumidero.

El incremento de la actividad fotosintética en los momentos de floración y formación de frutos de una planta es un hecho muy conocido (Chandler y Heinicke, 1926, Maggs 1963, Maggs 1965, Hansen 1969, Jesko et al 1971, Latsko y Seeley 1978, Barden 1978). Es de interés en la práctica el averiguar en qué medida la inhibición en exportación de asimilados causa una reducción en la fotosíntesis y con ello un descenso en productividad. El tema es muy conflictivo y no se ha llegado a una explicación clara para establecer correlaciones entre fotosíntesis neta en hojas "fuente" con demanda de asimilados por parte de otros "órganos sumidero" (Mae y Ohira 1981, Peoples et al 1980)

En 1965 Maggs sostenía que la translocación de carbohidratos venía determinada por un gradiente de concentración desde hojas que contenían un exceso hasta regiones cuya eficiencia iba declinando. Con CO_2^{14} mostró que en el manzano, al igual que en muchas otras plantas, las hojas que empezaban su expansión obtenían asimilados de las inmediatamente debajo de ellas. Se ha observado que las tasas de fotosíntesis de hojas cercanas al fruto son las más elevadas de la planta. Wardlaw en 1968 relacionó los factores que controlaban la translocación como la etapa de desarrollo y la demanda de asimilados por parte de otras hojas, así como la temperatura, estado nutritivo e hídrico.

La primera recopilación de trabajos que relacionan los niveles de asimilados y la fotosíntesis fue realizada por Neales e Incoll 1968. Geiger 1976 distingue entre el efecto por sí solo la exportación de asimilados sobre la fotosíntesis y el efecto de la demanda por parte del sumidero. En el primer caso podría deberse a un exceso de carga floemática o a una disminución en el flujo de los haces conductores debida a la formación de azúcares. En el segundo caso, podrían intervenir procesos hormonales.

Del primer caso de control de la fotosíntesis debida al nivel de asimilados en la hoja fuente, existen trabajos en los que se observa que la tasa de fotosíntesis es inhibida por la acumulación de asimilados (Upmeyer y Koller 1973, Hilliard y West 1970, Mondal et al 1978, Peet y Kramer 1980), mientras que en otros la tasa fotosintética no se inhibe por dicha acumulación (Flinn 1974, Milford y Pearman 1975).

Del segundo caso de control de la fotosíntesis por demanda por parte de un sumidero existen a su vez numerosos trabajos:
 - unos observan un incremento en la demanda de exporte de asimilados que lleva a un incremento en fotosíntesis neta. (Spence y Humphries 1972, Flinn 1974, Wareing et al 1968, King et al 1967, Thorne y Koller 1974). En algunos casos, han hallado coincidencias en el tiempo entre el factor y la respuesta fotosintética, en otros el período de respuesta osciló entre 2 horas y 5 días según el material utilizado.

- Otros trabajos observan una inhibición de la fotosíntesis al reducirse la demanda (King et al 1967, Ong y Marshall 1975). Finalmente Apel et al 1973 y Austin y Edrich 1975 observan poco efecto en la F_n por demanda del sumidero.

Un patrón de envejecimiento muy estudiado últimamente respecto a la fotosíntesis es el de hojas bandera de gramíneas, especialmente la del trigo. Ello es debido a que dicha hoja es la principal contribuyente al desarrollo del grano en los cereales y su longevidad ha sido utilizada por expertos en mejora genética ("plant breeders") como criterio de selección. Ver discusión en esta tesis, capítulo II.

En general, las tasas fotosintéticas en el período anterior a la anthesis son elevadas. Después de éste la fotosíntesis se mantiene aproximadamente durante unos diez días descendiendo después con rapidez (Peisker, Ticha y Apel 1979, Migus y Hunt 1980, Aslam y Hunt 1978) o según otros autores de forma constante y paulatinamente (Wittenbach 1979, Aslam y Hunt 1978, Migus y Hunt 1980, Winzeler y Nosberger 1980). Este declive más o menos rápido parece ser dependiente de la variedad (Thomas et al 1978, Sinha y Rajagopal 1980). Algunos autores han encontrado incluso un cierto incremento de la fotosíntesis durante el período de llenado de grano (Wittenbach 1979, Patterson y Moss 1979).

Estos cambios en fotosíntesis pueden ser debidos a cambios en resistencias estomáticas, aumento o descenso en las actividades de enzimas fotosintéticas o bien a combinaciones de todos estos factores. Numerosos autores consideran la apertura estomática como el factor limitante más importante (Rawson et al 1976, Peisker y Apel 1976, Frank 1981, Gifford y Musgrave 1973), para otros, sin embargo lo es la actividad carboxilativa (Neales et al 1971, Jones 1973, Homgren et al 1965, Rawson et al 1977, Wong et al 1979).

Según Tichá et al 1980, el flujo de CO_2 desde la atmósfera externa hasta los lugares de carboxilación en los cloroplastos viene controlado por una serie de conductancias asociadas por cam-

bios ontogénicos en las tasas fotosintéticas (Catsky et al 1976, Tichá y Catsky 1977, Catsky y Tichá 1980). La conductancia general al paso de CO_2 dada por la pendiente de la parte lineal de la curva que relaciona la fotosíntesis neta con la concentración ambiental de CO_2 es pues una característica fotosintética importante.

Se han propuesto tres mecanismos para explicar el declive en conductancias con la edad (David y Mc Cree 1978):

- Un incremento en grosor de la pared de las células de guarda
- Un descenso en la habilidad de las células de guarda en el control osmótico.
- Cambios en los balances hormonales de las hojas.

En contra de lo que opinaban Woolhouse y Batt 1976, el descenso en fotosíntesis no parece ser debido enteramente a incrementos en la resistencia del mesófilo sino parcialmente a un incremento en resistencias estomáticas (Thomas et al 1978, Wilhelm y Nelson 1978, Constable y Rawson 1980, Frank 1981).

Según Lurie et al 1978, los factores limitantes no son siempre los mismos a lo largo de la ontogenia. En hojas maduras la resistencia estomática es muy baja y el factor determinante es la actividad de carboxilación. En hojas muy jóvenes la actividad enzimática es elevada y el factor limitante parece ser las resistencias del mesófilo y estomáticas, y finalmente, en hojas senescentes, tanto el factor aumento de resistencias estomáticas como el descenso en actividad enzimática se combinan para reducir la fotosíntesis de las hojas.

FOTORRESPIRACION

El curso de desprendimiento de CO_2 en la luz (fotorrespiración) a lo largo de la ontogenia foliar sigue un patrón parecido al de la fotosíntesis. Al igual que ocurre a ésta, las tasas de fotorrespiración son muy variables y dependen de las especies, genotipo y condiciones bajo las que creció la planta (Wilson 1972).

Cuando las hojas son jóvenes, la tasa fotorrespiratoria es baja (Salin y Homann 1971, 1974, Cornic et al 1970, Kasaki et al 1973, Lurie et al 1978). A medida que la hoja se va expandiendo, va aumentando la fotorrespiración, de forma paralela a la fotosíntesis, decreciendo a continuación (Mulchi et al 1971 en judía, Mahon y Canvin 1972, Kasaki 1973 en tabaco, Cornic et al 1970 en Sinapis, Salin y Homann 1974 en Sinapis).

Los distintos autores llegaron a la misma conclusión utilizando métodos distintos: Mulchi midiendo la toma de oxígeno a 4% O₂, Kasaki et al midiendo el desprendimiento de CO₂ en aire libre de oxígeno, formación de glicolato o bien descarboxilación del glicolato y la glicina, Salin y Homann con la actividad de la glicolato oxidasa o la dependencia al oxígeno de la fijación de CO₂ y Cornic midiendo el desprendimiento de CO₂ después de ensombrecer la hoja.

Ozbun et al 1964 utilizando el método de diferencia entre ¹²CO₂-¹⁴CO₂ y ¹⁸O₂ observó un descenso en la toma de oxígeno con la edad, mientras que el desprendimiento de CO₂ en la luz no cambió notablemente. Mulchi 1971 observó que las hojas en rápida expansión poseían una fotorrespiración unas tres veces superior a la de las hojas que habían cesado de crecer.

Según Fraser y Bidwell 1974 y Smith et al 1976 no hay correlación entre fotosíntesis y fotorrespiración y por tanto, o no tienen el mismo factor limitante durante la ontogenia o bien responden de forma distinta. Acontecimientos ontogénicos como emergencia foliar y floración se ha visto que afectan la fotosíntesis en hojas unidas a la planta, pero no hay documentación sobre lo que ocurre sobre la tasa de fotorrespiración. El descenso de la fotorrespiración con la ontogenia se discute si posee igual tasa que la fotosíntesis o no (Bravdo y Pallas 1982)

Peisker y Apel 1976 en hojas bandera de trigo observaron que el declive en fotorrespiración a lo largo del período de llenado de grano fue igual que el de la fotosíntesis, atribuyéndolo mayoritariamente a un aumento en la resistencia intracelular.

Lurie et al 1978 midiendo la fotorrespiración como actividad de la RuBP oxigenásica y fotosíntesis como actividad de la RuBP carboxilásica muestran que ambas descienden pero con tasas distintas. Si las actividades carboxilásica y oxigenásica regulan las tasas de fotosíntesis y fotorrespiración, es de esperar que varíen con el envejecimiento foliar. También Salin y Homann 1973 sugieren que con la edad hay una mayor afinidad de las hojas por el oxígeno lo que implicaría variaciones en la relación carboxilasa/oxigenasa.

Sin embargo, Thomas y Thorne 1975, Hall et al 1978, Thomas et al 1978 observan que al envejecer las hojas bandera de trigo las actividades como carboxilasa y oxigenasa de la RuBP declinan de forma similar, pero que la fotorrespiración declina más lentamente que la fotosíntesis. Este último hecho también ha sido encontrado por Mahon y Calvin 1972). Thomas et al 1978 alegan que quizás los cambios en las tasas de fotosíntesis y fotorrespiración no reflejan las variaciones in vitro de la RuBP carboxilasa/oxigenasa. Alegan también que las diferencias encontradas a lo largo de la ontogenia de la relación carboxilasa/oxigenasa por otros autores pueden ser debidas a una inactivación del enzima durante la extracción (Koivumäki et al 1980, Badger y Lorimer 1976). Tampoco Ogren y Jordan 1980 encuentran variaciones en las constantes cinéticas de carboxilación y oxigenación con la edad.

PUNTO DE COMPENSACION DE CO₂

En 1953 Egle y Schenk definieron al P.C. CO₂ como un balance entre fotosíntesis y respiración. Efectivamente, se trata de la concentración en equilibrio entre consumo de CO₂ causado por el proceso de fotosíntesis y desprendimiento de CO₂ por fotorrespiración y respiración oscura.

Según Hatch es la concentración mínima que debe mantenerse en los espacios intercelulares para que se dé una asimilación suficientemente alta para poder contrarrestar la tasa de respiración. Este parámetro ha sido cada vez más estudiado y utilizado

conociéndose actualmente bastante bien el efecto sobre él de factores externos (ver revisiones: Canvin 1979, Smith et al 1976, Sirohi y Shirvastava 1978, Tichá y Castský 1981, Meidner 1970, Apel y Ohle 1979, Bauer y Martha 1981, Bauer et al 1983)

Aquí nos referimos exclusivamente a las variaciones que sufre durante la ontogenia foliar. En hojas jóvenes en expansión los valores encontrados son muy altos (incluso por encima del nivel atmosférico) (Kriedemann 1968). Según Catský et al 1976 también contribuye a ello una baja conductancia intracelular en las hojas en desarrollo.

Los P.C. CO_2 van descendiendo a medida que la hoja se va expandiendo, por un lado aumenta la fotosíntesis y por otra la respiración de oscuridad va descendiendo hasta un mínimo. Los mínimos en P.C. CO_2 se obtienen cuando las hojas alcanzan su máxima talla foliar (Fair et al 1972, 1973, Dickman y Gjerstad 1973, Dickman y Gordon 1975, Bethlenfalvay y Phillips 1977, O'Toole et al 1977, Dougherty et al 1979).

La estabilización del P.C. CO_2 en estos niveles mínimos duran un cierto tiempo más o menos largo hasta que se instaura la senescencia, que al provocar cambios tanto en la asimilación fotosintética como al aumentar la fotorrespiración, conjuntamente con un incremento en resistencias al paso del CO_2 , vuelve a aumentar (Smith et al 1976, Catský y Tichá 1979, Tichá et al 1980, Feller y Erismann 1978, Raggi 1978 a, b, Imai y Murata 1979).

El P.C. CO_2 indica el balance entre fotosíntesis y fotorrespiración, por tanto dependerá de la relación entre las constantes cinéticas de carboxilación y oxigenación de la RuBP. Lurie et al 1978 encontraron correlación significativa entre P.C. CO_2 y la relación oxigenasa a carboxilasa. P.C. CO_2 bajos implican una actividad elevada de la RuBP carboxilasa (Farquhar et al 1980) mientras que P.C. CO_2 elevados significarán en parte un aumento en fotorrespiración, discutido por algunos autores como un incremento en la fracción de respiración oscura que tiene lugar en la luz (Azeón-Bieto et al 1981, Peisker y Apel 1980).

Ver discusión en esta tesis

Los trabajos realizados por algunos autores en los que no encontraron cambios con el envejecimiento en los P.C. CO₂ (Bauer y Bauer 1980, Slatyer 1970) se atribuyen en general a que no fueron estudiados durante un período suficientemente largo.

RESPIRACION OSCURA ("DARK RESPIRATION")

Para diferenciar la respiración que tiene lugar en condiciones de luz (fotorrespiración) a expensas de una serie de reacciones que tienen lugar a partir del sustrato formado en las primeras fases de la fotosíntesis (ácido glicólico) y de origen extra-mitocondrial en su mayor parte, se ha utilizado la denominación de respiración oscura o basal para aquella de origen mitocondrial (ver revisión trabajos Goldsworthy 1970, Ludwig y Canvin 1971, D'Acoust y Canvin 1972, Mangat et al 1974, Canvin et al 1979, Brando 1968, Canvin et al 1980).

En realidad, en la fotorrespiración, aparte de la formación de sustrato, que forzosamente tiene lugar en condiciones lumínicas, la serie de reacciones que dan lugar posteriormente a un desprendimiento de CO₂ se realizan en la oscuridad.

Desde hace tiempo está en discusión la proporción respectiva entre fotorrespiración y respiración oscura situándose los valores entre 3 (Ludwig y Canvin 1971), y 8.5 veces (Zelitch 1975) superior la primera respecto a la segunda. Por otra parte, no se admite que la respiración basal tenga lugar únicamente en condiciones de oscuridad, sino que dentro de la magnitud de CO₂ desprendido en la luz, existe un componente aunque reducido de respiración basal. Sin embargo, autores como Jackson y Volk 1970 indican que toda la respiración que se dá a la luz es fotorrespiración, al igual que Forrester et al 1966. Mangat y col 1974 concluyeron que la respiración oscura en la luz es solo 1/4 parte mayor en la oscuridad. Raven 1972 y Graham y Chapman 1979 observan que la tasa es la misma en la luz que en la oscuridad.

Una fuente que puede inducir a error es la fijación interna del CO_2 fotorrespirado por la carboxilasa antes de que salga de la hoja. Según Samish y Koller 1968 dos tercios del CO_2 fotorrespirado son fijados de nuevo, Ludwig y Canvin 1971 calcularon que sólo correspondía a $1/3$ y que la respiración oscura era igual a la luz que en la oscuridad. (ver revisión sobre esta cuestión en Graham y Chapman 1979).

Otra característica importante que diferencia la fotorrespiración de la respiración de oscuridad es que ambas responden de forma distinta a la concentración de oxígeno, la fotorrespiración se estimula al aumentarla entre un 1-100%, mientras que la respiración oscura no se ve afectada (Forrester et al 1966, Tregunna et al 1966).

Bajo condiciones de concentración de oxígeno del 2%, no se manifiesta fotorrespiración, habiéndose saturado ya la respiración oscura, con lo cual la medición del CO_2 desprendido corresponde únicamente a respiración mitocondrial.

Variaciones con la ontogenia:

Las hojas jóvenes respiran en general de forma más intensa, siendo las tasas altas durante la expansión (Kriedemann 1968, Sestak 1967, Salin y Homann 1971). Después, con la madurez la respiración va disminuyendo (Sestak 1967, Ozbun et al 1964, Dickmann 1971 b), Kriedemann 1968).

Hopkinson (1964) y Ho (1978) observaron una dependencia de la respiración oscura con la tasa precedente de fotosíntesis que habían realizado las hojas de tabaco y tomate, respectivamente.

Woolhouse 1967 vió en Perilla frutescens que la tasa de respiración no siguió el mismo patrón que la fotosíntesis a lo largo del tiempo. La respiración oscura permaneció relativamente cons-

tante durante 20 días después del cese de la expansión y después cayó al mismo tiempo que la fotosíntesis. Observó un pequeño, pero significativo aumento en la respiración de 2 a 3 días antes de la abscisión (recuerda al climacterio de los frutos). Otros autores, sin embargo, han visto un declive constante de fotosíntesis y otro declive gradual al mismo tiempo en la respiración.

Hardwich et al 1968 también en Perilla frutescens observaron un comportamiento parecido: una tasa aproximadamente constante en respiración oscura hasta una semana antes de la abscisión, después tuvo lugar un incremento seguido de un descenso final.

Goldwaithe 1974, estudiando la respiración en hojas de Rumex escindidas vió que el consumo de oxígeno podía mostrar un máximo durante el amarilleamiento, similar al climacterio de frutos. Finalmente hay un declive a cero, coincidiendo con la muerte aparente del tejido. También Macnicol 1976 vió que la escisión foliar era seguida al cabo de 1.5 días por un fuerte incremento en respiración y amarilleamiento. Después de 3 días cuando la tasa inicial se había doblado, el curso respiratorio mostró una caída gradual acompañada por necrosis de la lámina. Los niveles de ATP siguieron una curva similar a la de la respiración.

Existen actualmente una serie de líneas de estudio en las que se relaciona P.C. CO₂ y respiración oscura (Peisker y Apel 1980) Mediante modelos matemáticos complejos (Peisker et al 1981, Bauwe et al 1980, Laing et al 1974, Farquhar 1979) intentan averiguar qué componentes del P.C. CO₂ varían con la edad foliar dando especial atención a la fracción oscura que según ciertos autores tiene lugar en la luz (ver discusión en esta tesis)

Algunos autores interpretan los cambios ontogénicos en P.C. CO₂ por cambios correspondientes en respiración oscura. Smith et al 1976, Charles-Edwards 1978, Peisker y Apel 1980 encuentran correlaciones lineales significativas entre ambos factores, encontrando cambios ontogénicos paralelos. Sin embargo, cabe acordar-

se de las variaciones con la edad de la resistencia intracelular al paso del oxígeno así como su dependencia al envejecimiento (Catský et al 1976 en Phaseolus vulgaris, Peisker y Apel 19 en hojas bandera de trigo). También según otros autores puede cambiar el grado de inhibición de la respiración oscura en la luz con la edad (Graham y Champan 1979, Peisker et al 1981).

1.4.- REGULACION HORMONAL DE LA SENESCENCIA

Las primeras hipótesis al respecto mantenían que el asentamiento de la senescencia provocado por escisión foliar, tenía lugar después del agotamiento de carbohidratos por parte de la planta, siendo esta teoría desmentida ya en 1939 por Chibnall, al no encontrar ninguna relación entre ambos.

También dicho autor en 1939, al observar que la formación de raíces en peciolos de hojas escindidas retrasaba la senescencia, sugirió que las raíces debían suministrar alguna hormona esencial para mantener el metabolismo normal en las hojas.

Este hecho fue la primera intuición acerca de un posible control hormonal del proceso.

Los cambios bioquímicos que aparecen en las hojas al asentarse la senescencia han sido caracterizados extensamente, pero sin embargo, los factores endógenos que regulan dichos cambios sólo han sido comprendidos en parte. (Moore 1979).

1.4.1.- CITOQUININAS

El contenido proteico de las hojas tras escisión decrece muy rápidamente, siendo un signo visible el amarilleamiento del tejido debido a la degradación de clorofilas.

La degradación de éstas y de proteínas puede retardarse suministrando a hojas escindidas la hormona kinetina, (6-furfuril aminopurina).

Esta observación fue hecha por primera vez en hojas primarias de Xanthium por Richmond y Lang en 1957.

En los años siguientes se realizaron numerosos estudios en este sentido, avanzando espectacularmente en Alemania en 1959 gracias al equipo de K. Mothes.

Observaron que la aplicación de la hormona en forma de "spray", sobre las hojas, poseía un efecto muy localizado, permaneciendo de color verde la zona suministrada.

Según Kursanov et al., 1964, incluso este tratamiento era capaz de enverdecer tejidos que ya amarilleaban.

Suministrando aminoácidos marcados, vieron que se acumulaban en las zonas tratadas, creándose nuevas relaciones fuente-sumidero y se mantenían los niveles de ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas.

Un paso importante en la caracterización del carácter regulador de la senescencia de las citoquininas fue dado por Leopold y Kawase 1964, que observaron que en Phaseolus vulgaris al tratar una hoja con kinetina, se originaba la inhibición del crecimiento y la aceleración de la senescencia en hojas de la planta escindida que no habían sido tratadas.

Actualmente es un hecho extensamente estudiado el papel de las citoquininas como retardante de la aparición de síntomas de senescencia en tejidos vegetales escindidos (Skoog y Armstrong 1970, Varner 1961, Varner y Tuan-Hua-Ho 1976, Tavares y Kende 1970), a pesar de no ser efectiva en algunas especies como Prunus (Osborne y Hallaway 1964).

Sus efectos fisiológicos más importantes son : el transporte dirigido y activo de distintas sustancias como aminoácidos y fosfatos; la retención de sustancias acumuladas y la estimulación de la absorción.

A partir de los experimentos de Sitton et al, 1967, se dedujo que la reducción en el suministro de citoquininas a las hojas cuando empezaba la floración era uno de los factores que llevaba a senescencia.

Los mismos autores fueron de la opinión de que en este momento, la síntesis de citoquininas se realizaba en los frutos en desarrollo.

Gracias a la habilidad de las citoquininas en atraer metabolitos, aminoácidos, azúcares e iones inorgánicos (Mothes 1959, Mothes et al 1961, Muller y Leopold 1966), el flujo de asimilados es dirigido desde las hojas a los frutos, llevando a un envejecimiento del vástago y pudiéndose eliminar éste con la extirpación del fruto (Lindoo y Nooden 1976, 1977).

Sin embargo, otros resultados llevan a interpretaciones ligeramente distintas, siendo el punto conflictivo el origen de citoquininas en los frutos en desarrollo.

Tras las observaciones de Beever y Woolhouse 1973 en Perilla frutescens y de Wareing y Seth 1967, se sugiere que las citoquininas pueden ser desviadas hacia los frutos en desarrollo a expensas de las hojas mostrando éstas niveles bajos de hormona durante la fructificación (Fletcher 1969).

De todo ello se deduce que la senescencia es debida a interacciones entre distintos órganos de las plantas, producidas por citoquininas de origen radicular.

En planta escindida, los efectos bioquímicos inducidos por suministro de citoquininas son numerosos :

- Retraso de la degradación de clorofilas. Según Tetley y Thimann 1974, (en contraposición del argumento de Kursanov et al 1964, que afirma que no sólo retrasan la clo-

-rosis, sino que las hojas recuperan su color verde,) demuestran que en segmentos de hoja de trigo, una vez iniciada la senescencia, solo se retrasa en parte por tratamiento con kine- tina, pero no se restituye.

Wittenbach 1977, en trigo, sugiere que el asentamiento de una etapa irreversible de senescencia con incapacidad de recupe- rar los niveles de clorofilas, proteínas y fotosíntesis, empie- za al cabo de 4 días en oscuridad.

- Retraso de la degradación de RNA y proteínas (Richmond y Lang 1957, Wollgiehn 1967) evitando un incremento en acti- vidad de enzimas degradativos de éstos (Srivastava y Ware 1965, Anderson y Rowan 1966).

- Inducción de la síntesis de RNA, proteínas y almidón.

No existe un acuerdo claro entre investigadores. Según Skoog y Armstrong 1970, Grierson et al 1977, creen más en un e- fecto directo de citoquininas sobre la síntesis que sobre la supresión de la degradación.

Sin embargo, Kuraishi 1968, 1976, Mizrahi et al 1970, Shiba- oka y Thimann 1970, Tavares y Kende 1970 son de la opinión contraria.

La acción primaria de las citoquininas es una incógnita (Gals- ton y Davis 1970) pero es obvio que retrasan la senescencia aumentando la síntesis de todas las fracciones del RNA, bien incorporándose en alguna de ellas o no.

En material vegetal sin escindir, la regulación hormonal es aún más desconocida, las hojas escindidas responden en ge- neral de forma más exagerada a los tratamientos. Ilan y Go- ren 1979 en hojas de limonero y Van Staden 1976 en Gingko biloba, no observaron cambios en la actividad de las citoqui- ninas cuando las hojas pasaron del estado maduro a senescente.

Otros efectos de las citoquininas son :

- Supresión de la actividad ribonucleásica y desoxiribonucleásica.
- Mantenimiento de la integridad de membrana (Gilbert et al. 1980).
- Inducción de la utilización de ATP. Según Malik y Thimann 1980, los niveles bajos de ATP están asociados a una "prevención" de la senescencia.
- Inhibición de la degradación oxidativa de la adenina.
- Depresión del incremento respiratorio asociado a la senescencia en discos foliares así como la supresión del acoplamiento mitocondrial (Tetley y Thimann 1974, Wittwer et al. 1961, Mc Lean y Dedolph 1964).

En algunos casos puede inhibir la respiración al retrasar la senescencia como en Brassica (Dedolph et al 1961), a pesar de que Halevy et al. 1966, tratando con benziladenina hojas de lechuga vieron resultados completamente opuestos a los anteriores; estimulación de la respiración y aceleración de la senescencia.

Mc Lean 1964 sugiere que el modo de acción de las citoquininas sobre la respiración debe ejercerse sobre la conservación de ATP en los tejidos tratados.

Moore y Miller 1972 estudiaron el efecto de las citoquininas sobre la respiración en tejidos de callo de soja (Glycine max).

Observaron que, según la concentración utilizada, se inducía o inhibía la toma de oxígeno o desprendimiento de CO_2 .

- Efecto sobre la transpiración. La kinetina contribuye a un

incremento en la apertura estomática debido a una reducción de la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares por incremento de la actividad fotosintética del mesófilo (Meidner 1967, Thimann et al. 1974).

Kuraishi 1976 observó también que existe una relación entre apertura estomática y kinetina, indicando que los estomas de la superficie superior de la hoja anfiestomática responden mejor a las citoquininas.

- Efecto de las citoquininas sobre la abscisión foliar.

Es parecido al efecto de las auxinas y giberelinas, acelerando o retrasando ésta según la concentración y sentido del transporte o lugar de aplicación.

Por todo lo expuesto anteriormente se pone ampliamente de manifiesto los numerosos efectos de las citoquininas sobre procesos que retrasan la implantación de la senescencia. Los innumerables trabajos realizados en material vegetal sobre la acción de dicha hormona han sido recopilados ampliamente en la revisión hecha por Nooden y Leopold 1978, y actualizados en 1982 por Stoddart y Thomas.

1.4.2.- GIBERELINAS

El retraso en el proceso de senescencia mediante la aplicación de giberelinas no es un fenómeno general. En la mayoría de las especies es inefectivo, aunque en algunas, el efecto puede ser más pronunciado que el de las citoquininas como ocurre en el caso de Taraxacum (Fletcher y Osborne 1965), Nasturtium (Beever 1966), Tropaeolum v Rumex (Beever 1968).

En este último material, la pérdida de clorofilas en discos se retrasó incluso cuando la aplicación de la hormona tenía lugar en la fase logarítmica de amarilleamiento.

En general, los tejidos que responden a las giberelinas también lo hacen frente a citoquininas, sin embargo, los efectos fisiológicos de giberelinas en tejidos senescentes han sido menos estudiados.

Las relaciones entre giberelinas y citoquininas no se conocen bien. La kinetina es capaz de incrementar los niveles de giberelinas en discos de Nasturtium y sería posible que el retraso de la senescencia en este tejido fuese debido a ello. Paradójicamente, la senescencia puede ser retrasada mediante CCC o AMO 1618, que actúan bloqueando la síntesis de GA (Halevy 1966); en Tropaeolum tanto CCC como GA actúan como retardante de la senescencia (Beever 1968). Por todo ello parece improbable que el retraso de la senescencia sea debida a una inhibición de la síntesis de giberelinas.

El papel exacto de las giberelinas sobre el retraso de la senescencia no es bien conocido. Recientemente, Stoddart y Thomas 1982 apuntaron un posible papel de giberelinas sobre extensibilidad de pared celular. Observaron en tejidos de hipocotilo de lechuga el aumento de la plasticidad de la pared con giberelinas, retrasando el proceso de envejecimiento al prolongar la fase de expansión foliar.

1.4.3.- AUXINAS

Skoog en 1957, observó que al igual que las citoquininas, las auxinas afectaban el contenido en RNA y DNA, viéndose en estudios posteriores que aumentaban la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, especialmente la síntesis de RNA ribosómico.

Las auxinas han sido reconocidas como retardante de senescencia en las zonas de abscisión de hojas de plantas leñosas (Wareing et al. 1971) y cotiledones (Osborne y Hallaway 1964). También en secciones foliares de Rhoeo se encontró efecto de los ácidos indolacético y naftalenacético reduciendo la senescencia (Sacher 1969).

Sin embargo, en algunos materiales vegetales, las auxinas pueden incluso acelerar la senescencia, variando el efecto según la concentración; como en el caso de discos de Xanthium en los que se observó una aceleración en la pérdida de clorofilas (Osborne 1967).

También dicha investigadora realizó en 1967 una serie de pruebas sobre el distinto modo de acción de las auxinas sintéticas, como 2,4,- diclorofenoxiacético (2,4,D) y 2,4,5- triclorofenoxiacético (2,4,5,D), sobre hojas perennes (vivaces), como Euonymus europea, o en hojas de árboles caducifolios, como Prunus. Observó que en las primeras había retención de clorofilas mientras que en las segundas el tratamiento, era inefectivo.

En los tejidos que envejecen, se ha observado disminución en el transporte basipéto de auxinas (Osborne et al 1968, Veen 1969, Veen y Jacobs 1969 a,b), a pesar de que la auxina extractable podía aumentar (Sheldrake y Northcote 1968).

El inicio del descenso en auxinas empieza en el momento que aumenta el nivel de ácido abscísico endógeno, observándose al mismo tiempo un incremento en IAA oxidasa y Peroxidasa.

No se ha adelantado mucho en el conocimiento del efecto de las auxinas sobre la senescencia desde los estudios de Skoog en 1953. Durante el crecimiento se sabe que el IAA o ácido indolacético acopla directamente al RNA soluble, mientras que parte del IAA es degradado y los productos de degradación son utilizados en la síntesis de RNA.

Stoddart y Thomas 1982 apuntan la posibilidad de interacción de las auxinas con el aparato de síntesis protéica.

1.4.4.- INDUCTORES DE LA SENESCENCIA; ABA y ETILENO

ABA (ACIDO ABCISICO)

El ácido abcísico es el inductor más importante de senescencia en hojas, acelerando la pérdida de clorofilas, proteínas, aumentando la actividad nucleásica y alterando la ultraestructura del tejido.

A pesar de que el ABA reduce la incorporación de algunos aminoácidos en las proteínas, no se ha demostrado que su efecto primario sea sobre DNA o RNA. Sus efectos se basan más sobre enzimas como pectinasas, celulasas e invertasas, así como la inhibición del enzima responsable de la biosíntesis de giberelinas.

Su máxima efectividad es en hojas escindidas, como en Nasturtium (Beevers 1968), siendo menor mediante la aplicación de "spray" en hojas intactas y pudiendo ser contrarrestado de forma competitiva por ciertas concentraciones de citoquininas (Woolhouse y Batt 1976, Aspinall et al.1967).

Los niveles de ABA endógenos aumentan de forma rápida en condiciones de "stress" en Coleus, Glycine, Nasturtium y Nicotiana (Lindoo y Nooden 1978).

Existe poca información acerca del modo de acción subcelular del ABA. Algunos autores apuntan un posible papel a nivel de regulación de la transcripción y de la unión a un componente subcelular (Stoddart y Thomas 1982).

Las afinidades estructurales y de biosíntesis que existen entre ABA y GA, así como su papel antagónico en muchos casos, deja abierta la posibilidad de que operen en lugares celula-

res relacionados (Evans y Varner 1971).

ETILENO

Las primeras observaciones del efecto del etileno sobre senescencia de pétalos y hojas y sobre abscisión fueron realizadas en invernaderos con introducción de gas en la atmósfera (ver revisión Abeles 1972, 1973, Hall et al 1980). Causaba marchitez y decoloración en flores (Kende y Hanson 1976) y clorosis en hojas, como Beta, Nicotiana y Phaseolus (Aharoni et al 1978), siendo estas últimas menos sensibles a su efecto (Aharoni et al 1979).

Sin embargo, su papel preponderante y más ampliamente estudiado ha sido en relación con la abscisión (Osborne 1977) y maduración de frutos (Nichols 1968).

Su papel según Kawase (1974), podría ser el de respuesta a condiciones adversas, como anegamiento radicular y posiblemente regulado por auxinas (Osborne 1977). También se empiezan a estudiar las relaciones entre etileno y ABA, ya que el incremento en desprendimiento de etileno precede al incremento en ABA (Mayak y Halevy 1970).

Según Hall et al. 1980, podría existir un efecto del etileno modulando aspectos de la síntesis de proteínas, debido a la acción observada por ellos sobre endomembranas.

Otras sustancias inductoras de la senescencia lo constituyen algunos aminoácidos y otros metabolitos.

El más activo es la L-serina (Shibaoka y Thimann 1970, Carr y Pate 1976). Posiblemente actúa al ser incorporada en las proteínas sintetizadas durante la senescencia, ocupando un lugar crítico cerca del centro activo del enzima.

Otros inductores de la senescencia son la L-ornitina, L-lisina, y el L-diaminobutírico.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 - MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado para la realización de esta tesis fué la cebada (Hordeum vulgareL. var Hop) y el trigo (Triticum aestivum var Kolibri).

2.1.1 - LOCALIZACION DE LOS ENSAYOS

Los ensayos en condiciones de campo se realizaron en Pedralbes, en los Campos Experimentales de la Facultad de Biología. Se trata de un suelo sobre materiales aluvio-coluviales más o menos carbonatados. La textura es franco-arenosa-arcillosa y los PH son próximos a neutro.

2.1.2 - CONDICIONES DE CULTIVO EN CAMPO

EPOCA DE SIEMBRA :

La variedad de trigo estudiada se sembró respectivamente el 24 de febrero de 1981 y el 2 de febrero de 1982.

DISPOSICIONES DE LA SIEMBRA

La siembra se realizó en parcelas de 1,20 x 1,20 m² separadas entre sí 30 cm. Cada parcela llevó 7 x 7 = 49 golpes y cada golpe 2 semillas. Una vez emergidas las plantas, se dejó una sola por golpe, trasplantando en algunos casos la que sobraba a lugares donde no había nacido.

PREPARACION DEL TERRENO Y ABONADO

El campo, previamente arado se desinfectó con bromuro de metilo

en cantidad de 900 Kg Ha⁻¹.

El abonado de fondo consistió en 1500 Kg Ha⁻¹ de superfosfato de cal.

El abonado de cobertera se realizó en una o tres fases respectivamente, cada una de ellas mediante 60 Kg N Ha⁻¹cm.

NO₃ K y NO₃ Na (1 : 1).

TRATAMIENTOS FITOSANITARIOS

Como prevención contra la roya se aplicó Bayletón y contra el pulgón Metosystox.

2.1.3 - CONDICIONES DE CULTIVO EN EL LABORATORIO

CEBADA :

La germinación tuvo lugar en tiestos de plástico con un sustrato formado por turba y perlita en proporción 3 : 1.

Las plantas se regaron tres veces por semana, una de ellas con una solución nutritiva completa (Bayfolán; Bayer).

La cámara de crecimiento se mantuvo a una temperatura de 25° (±) 2° C y una intensidad luminosa de 15000 lux suministrada por 6 tubos fluorescentes Sylvania VHA y tres bombillas Phillips Superlux de 60 Watios para proporcionar iluminación por incandescencia.

El régimen luminoso fué de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

(el cultivo de trigo fué exclusivamente en condiciones de campo).

2.1.4 - INDUCCION DE LA SENESCENCIA FOLIAR EN CONDICIONES DE LABORATORIO

A los 15 días después de cada siembra, las hojas primarias de la planta de cebada, que se hallaba en el estado de dos hojas fueron cortadas y colocadas en cubiletes que contenían respectivamente agua destilada (control) y Kinetina (6-furfuril

amino purina $C_{10}H_9N_5O$, producto Fluka). Debido al efecto puntual y local de dicha citokinina sobre el mantenimiento estructural del tejido, se aplicó también en forma de spray sobre las hojas. A continuación, los cubiletes se mantuvieron en oscuridad y saturación de humedad a $25^{\circ}C$, hasta el día de la realización de los distintos análisis.

En las fotos siguientes se puede observar las diferencias entre hojas primarias de cebada con tratamiento hormonal y sin, el día de la escisión, y al cabo de ocho días en oscuridad.



DIA CERO



DIA OCHO

2.2 - MEDIDA DEL INTERCAMBIO GASEOSO FOLIAR

2.2.1 - FOTOSINTESIS NETA, FOTORRESPIRACION, PUNTO DE COMPENSACION DE CO₂ Y RESPIRACION OSCURA

En condiciones de iluminación superiores al punto de compensación luminoso, el intercambio de gases global implica captación de CO₂ y desprendimiento de oxígeno. La medida de dicho intercambio nos indica la Fotosíntesis neta que realiza la planta bajo dichas condiciones. No obstante, debemos tener en cuenta, que la planta, al mismo tiempo, realiza procesos respiratorios por lo que el valor de la Fotosíntesis neta (PN) no expresa el total de CO₂ fijado por la planta al que denominamos Fotosíntesis bruta (PB), sino la diferencia entre éste y los procesos respiratorios (R).

$$PN = (PB) - (R)$$

Existe una imposibilidad real de determinar la componente respiratoria en condiciones de iluminación, por lo que una primera aproximación al conocimiento de su tasa debería realizarse en condiciones de oscuridad, obteniéndose la respiración de oscuridad o basal.

Por diversos métodos se ha demostrado que la magnitud respiratoria a la luz es superior que en condiciones de oscuridad; de donde surge el concepto de Fotorrespiración, magnitud total de la respiración a la luz - (DOWNTON Y TREGUNNA 1968, BULLEY Y TREGUNNA 1970, D'AOUST Y CANVIN 1972, CORNIC 1973, CHOLLET 1977, CORNIC 1978, CHAMPIGNY Y MOYSE 1979, GERBAUD Y ANDRE 1979).

En un recinto de atmósfera confinada y bajo condiciones de iluminación no limitantes, la asimilación fotosintética provoca disminución de la concentración de CO_2 hasta un nivel en el que se establece un equilibrio entre fotosíntesis y fotorrespiración. Dicha concentración se denominó punto de compensación de CO_2 (Γ gamma). Las plantas C_4 o de la vía fotosintética de Hatch y Slack exhiben un componente fotorrespiratorio prácticamente nulo, con lo que sus puntos de compensación se sitúan entre 0 y 10 ppm.

Por el contrario, las plantas C_3 o de la vía Calvin-Benson alcanzan puntos de compensación entre 30 y 100 ppm. (APEL Y OHLE 1979, BYKOV et al 1981)

Las variaciones de temperatura influyen claramente sobre la fotosíntesis, la fotorrespiración, la respiración y el punto de compensación de las distintas especies vegetales. En las plantas C_3 , los óptimos térmicos para la fotosíntesis se establecen entre 15° y 25° C, mientras que en las plantas C_4 se sitúan entre 30°- 47° C.

El efecto de la temperatura sobre el punto de compensación es muy acusado en las plantas C_3 , observándose un aumento directamente proporcional, con un $Q_{10} = 2$. Por el contrario, en las plantas C_4 , el punto de compensación resulta muy poco afectado (Keys et al 1977, BIRD et al 1977)

En las plantas C_3 y a temperatura óptima, la fotosíntesis aumenta con el incremento de intensidad luminosa, alcanzándose el punto de saturación de luz de $1/2$ a $1/3$ de la intensidad solar máxima, existiendo amplias diferencias según se trate de plantas u hojas de sol o de sombra.

En las plantas C_4 , la intensidad de saturación es igual o superior a la solar máxima, por lo que se observa una proporcionalidad directa entre radiación y rendimiento fotosintético.

El punto de compensación de CO_2 se muestra independiente de la iluminación siempre que ésta no sea limitante; en este caso disminuye la fotosíntesis por lo que el punto de compensación de CO_2 aumenta.

En condiciones de laboratorio, las plantas C_3 sufren una reducción en la Fotosíntesis neta al aumentar la concentración de oxígeno (efecto Warburg) (BJÖRKMAN 1965 a) HEW Y KROTKOV 1968 CORNIC Y JARVIS 1972, AKITA Y MOSS 1973, SERVAITES Y OGREN 1978 KN Y EDWARDS 1978, CANVIN et el 1980.)

Dicho comportamiento se justifica porque a concentraciones altas, la fotorrespiración se exalta debido a la competencia entre O_2 y CO_2 por la Ribulosa difosfato carboxilasa/oxigenasa. Las plantas C_4 son altamente insensibles a las variaciones de O_2 debido a que no manifiestan fotorrespiración. El punto de compensación en las plantas C_3 , por las razones anunciadas anteriormente, aumenta linealmente con la concentración de oxígeno, mientras que en las plantas C_4 se mantiene insensible. Las plantas C_3 con niveles de O_2 cercanos al 2% exhiben un punto de compensación parecido al de las C_4 . La respiración basal no se ve afectada por las variaciones de O_2 para valores superiores al 2%.

En condiciones naturales, el nivel de CO_2 de la atmósfera (330 ppm) es un factor limitante de la fotosíntesis, por lo que en ambientes confinados, el aumento del CO_2 provoca un incremento positivo de la fotosíntesis. Dicho aspecto tiene una utilización práctica en cultivos hortícolas de invernadero (abonado en carbónico) (HEATH Y MEIDNER 1967, HICKLETON Y JOL-

IFFE 1978). A concentraciones de CO_2 bajas y en experiencias a corto plazo, la fotosíntesis disminuye debido a una mayor producción de glicólico, lo que ocasiona mayor fotorrespiración.

2.2.2 - EQUIPO PARA LA MEDICION DEL INTERCAMBIO GASEOSO

Para el estudio de las variaciones en el intercambio gaseoso que tiene lugar a lo largo de la senescencia de hojas escindidas de Hordeum vulgare se utilizó un equipo (Fig. 1) constituido por:

- A) Analizador de CO_2 IRGA Leeds and Northrup modelo 7864 provisto de registradores (A_1 y A_2) (Speedomax H, Leeds and Northrup).
- B) Bomba de membrana impulsora del aire en el circuito (DIA Pump Air Control Inc.)
- C_1 y C_2) Filtros de partículas
- D_1 y D_2) Rotámetros para conocer el flujo del aire en circulación: uno a la entrada del analizador de CO_2 y otro incorporado en el analizador de O_2 .
- E) Desecador de Cl_2 Zn anhidro con válvula para sobrepresión (E_2) para evitar la interferencia del vapor de agua en el analizador. (Caballero A y Gil F. 1978).
- F_1 y F_2) Dos cámaras de asimilación de vidrio (467 ml de volumen) compuestas por dos cilindros concéntricos lo cual permite circular dentro de dicha camisa, "Water-jacket" (Bosien 1955, agua a temperatura controlada.
- G_1) Baño con acondicionador de temperatura (termostato HETO Denmark)
- G_2) y refrigerador (P-Selecta 398) (G_3) conectado con el circuito de agua de las cámaras. De esta manera se regula la temperatura del interior de éstas y se mide la de las hojas con ayuda de un sistema de termopares Speedomax H de Leeds and Northrup. (G_4).
- H) Fuente luminosa : lámpara de incandescencia de 500 watios situada a una misma distancia de ambas cámaras y que propor-

ciona una intensidad luminosa de 20000 lux. En el caso de desear intensidad de luz más elevadas (hasta 100000 lux) se substituyó por una lámpara de proyección Sylvania DXW de cuarzo halógena de 800 watios.

I) Cubeta de 10 cm de espesor con una solución de agua y sulfato de cobre (2-5%) acidificado, a fin de filtrar la radiación infrarroja. Encima de ella está situado un ventilador para reducir el calentamiento de la disolución.

J_1 y J_2) Dos válvulas solenoides Asco de 3vías que regulan sucesivamente y con independencia la entrada y salida de aire en ambas cámaras, permitiendo, por lo tanto, lecturas alternas y sucesivas.

K) Temporizador Sauter JRW 30/ 1 que gobierna la abertura y cierre de las válvulas anteriores y que permite establecer periodos de tiempo alternativos, iguales o distintos de lectura de cada cámara.

L_1 y L_2) Humidificadores con perlita situados a la entrada de aire en las cámaras.

Opcionalmente y en caso de desear trabajar con atmósferas enriquecidas o empobrecidas con O_2 o CO_2 se pueden intercalar en el circuito (M).

-absorbente de anhídrido carbónico (soda verde o cal baritada)
-Botella de N_2 puro con reductor de presión y llave de dos vías que permite cambiar la concentración de O_2 del circuito cuando interese.

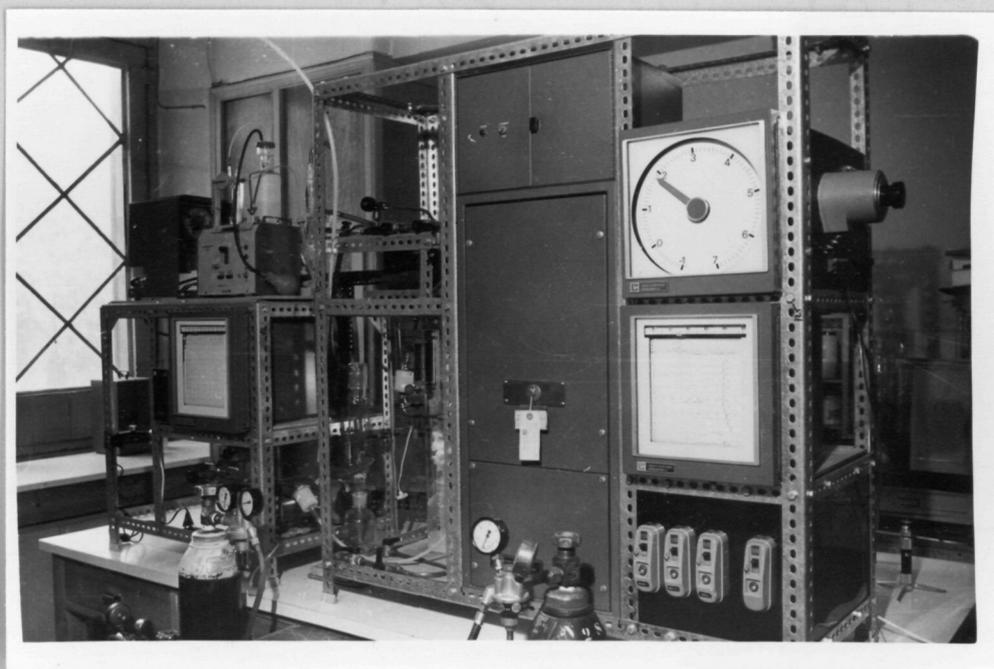
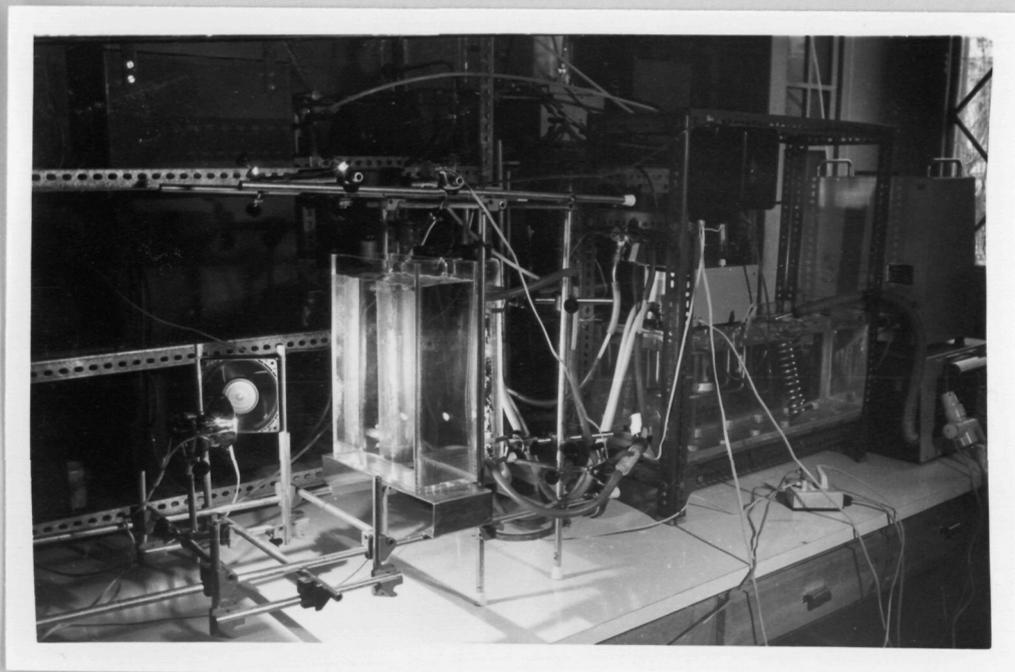
-Botella de O_2 puro que permite elevar la concentración de oxígeno por encima de la atmósfera.

P) Botellas con distintas concentraciones de CO_2 y O_2 a fin de calibrar los analizadores y registros, y asimismo estudiar el efecto de las mismas sobre la fotosíntesis.

N) Analizador de O_2 paramagnético Leeds and Northrup con registrador, filtro y rotámetro que permite conocer las variaciones de O_2 en la atmósfera circundante.

Para detalles adicionales del equipo utilizado existen ante-

riores descripciones (Fleck 1976, Azcón y Simmonneau 1978, Azcón tesina 1979). La metodología de sistemas de intercambio gaseoso con utilización de equipos IRGA son descritos ampliamente por Bate et al 1969, Sestak et el 1971, Sestak y Cat-sky 1980).



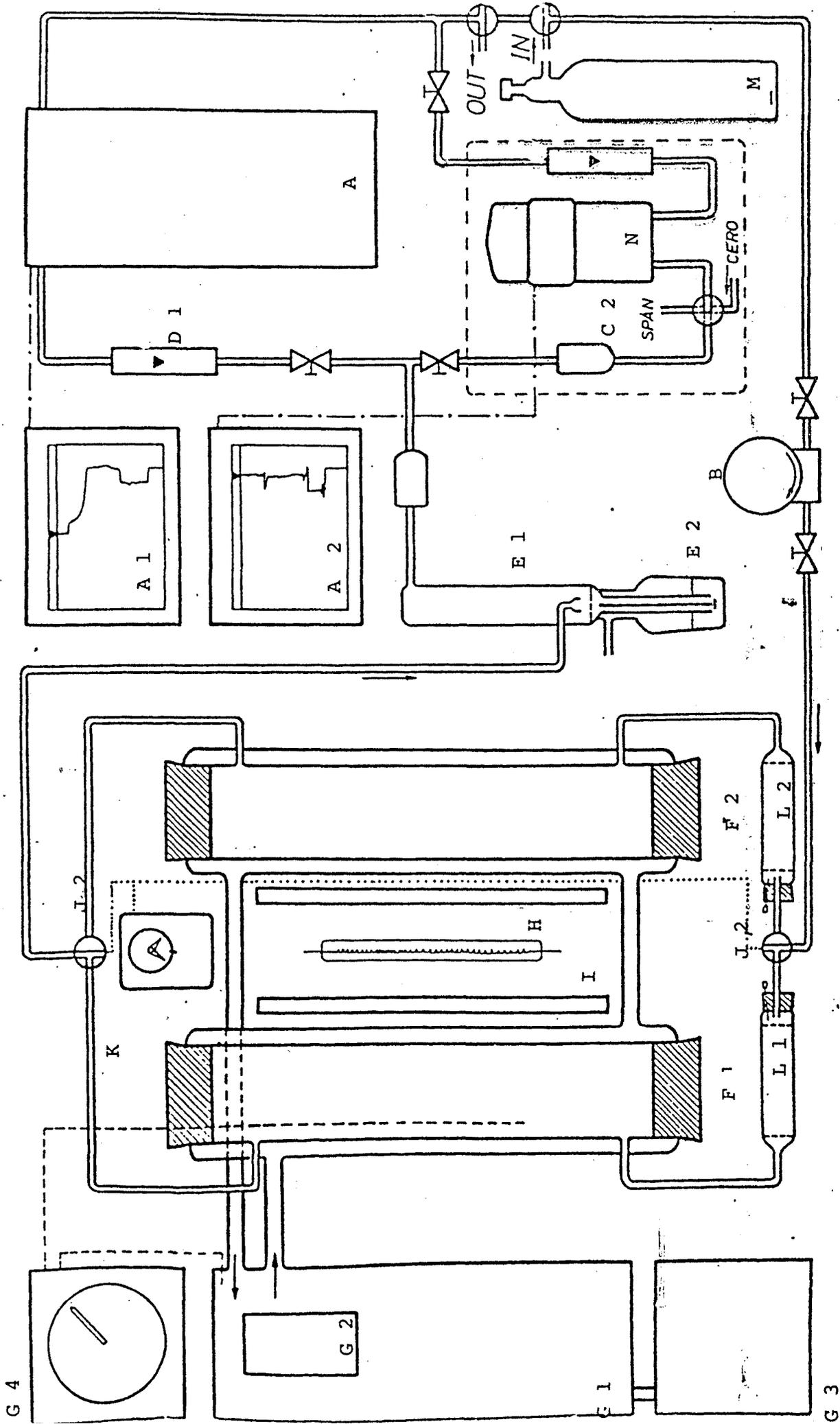


FIG. 1

2.3 - MEDICIONES REALIZADAS CON EL EQUIPO DESCRITO

2.3.1 - EMPLAZAMIENTO DEL MATERIAL

Las hojas a analizar se situaron en un soporte a base de unos hilos de nylon ("lira"), lo cual permitía que las hojas se mantuvieran erguidas y orientadas. En cada lira se situaron cuatro hojitas. Antes de introducir las en las cámaras, se les aplicó un "Spray" con agua destilada o bien con una solución hormonal (kinetina 10 ppm), según la medición que se deseaba realizar. En el fondo de las cámaras se aplicó también unos mililitros de agua destilada o de solución hormonal. De esta forma y con la ayuda de los humidificadores situados a la entrada del aire a las cámaras, las hojas no sufrieron desecación durante las mediciones, hecho que podría implicar la obtención de resultados erróneos, importante al tratarse de un estudio sobre senescencia foliar.

2.3.2 - DETERMINACION DEL PUNTO DE COMPENSACION DE CO₂

Mediante un sistema de llaves, el equipo del IRGA puede utilizar sistema de circuito abierto o cerrado .

Para la medición del punto de compensación del CO₂ se utilizó circuito cerrado. El aire confinado en éste fué pasando repetidamente por las cámaras mientras que las hojas van fotosintetizando. Al cabo de un cierto tiempo, que depende de características del circuito y de la planta, se llegó a un equilibrio en el cual el CO₂ utilizado en fotosíntesis se igualó al CO₂ desprendido en la fotorrespiración.

La concentración de CO₂ en este punto de equilibrio entre dichos procesos se denomina punto de compensación de CO₂ . Para obtener como referencia la concentración cero de CO₂ se acopló a la entrada de una de las cámaras un absorbente de carbónico. Ello permitía a su vez ir reduciendo a voluntad la concentración de CO₂ circulante por el circuito, con lo que se podía acelerar la obtención del punto de compensación de CO₂ evitando a la planta un "stress" prolongado.

Se realizaron mediciones del punto de compensación de CO_2 bajo condiciones normales de concentración de oxígeno (21%) y bajo condiciones de bajo contenido (2,5%) observándose el efecto del oxígeno (efecto Warburg) a lo largo de la senescencia de las hojas.

2.3.3 - DETERMINACION DE LA FOTOSINTESIS NETA

Para la medición de la Fotosíntesis neta se utilizó el equipo IRGA en circuito abierto. El flujo de aire que atravesó las cámaras osciló, se ajustó para que la desviación no fuera excesiva (25 ppm). En una de las cámaras se dispuso el material vegetal, utilizándose la otra como referencia de la concentración atmosférica de CO_2 . Fue necesario realizar varias mediciones de la actividad fotosintética al inicio del programa diario, ya que existe un tiempo de ajuste de la hoja a las nuevas condiciones (aproximadamente 1 hora) hasta que ésta estabiliza su capacidad de asimilación.

Al igual que en las determinaciones de puntos de compensación de CO_2 , se realizaron pruebas utilizando concentraciones de aire con niveles normales (21%) y modificados de O_2 .

La disminución expresada en partes por millón (ppm) de la concentración de CO_2 atmosférico debida a la asimilación fotosintética por parte de las hojas, con respecto al área foliar y al tiempo, nos dará la medida de fotosíntesis neta realizada. La fórmula de cálculo utilizada procede de una ecuación simple: (Gaastra 1959)

$$F = \frac{A \cdot C \cdot J}{A}$$

en que :

F = densidad del flujo de CO_2 ($\text{cm}^3 \times \text{cm}^{-2} \times \text{seg}^{-1}$)

A = área foliar (normalmente una sola cara (cm^2))

J = flujo de aire a través de la cámara ($\text{cm}^3 \times \text{seg}^{-1}$)

AC = diferencia de concentración de CO_2 entre el aire antes de entrar en la cámara y el aire de salida ($\text{cm}^3 \times \text{cm}^{-3}$)

Sin embargo, como es aconsejable expresar el intercambio de CO_2 en términos de flujo de masa CO_2 , se precisa también conocer la temperatura y la presión atmosférica durante la medición.

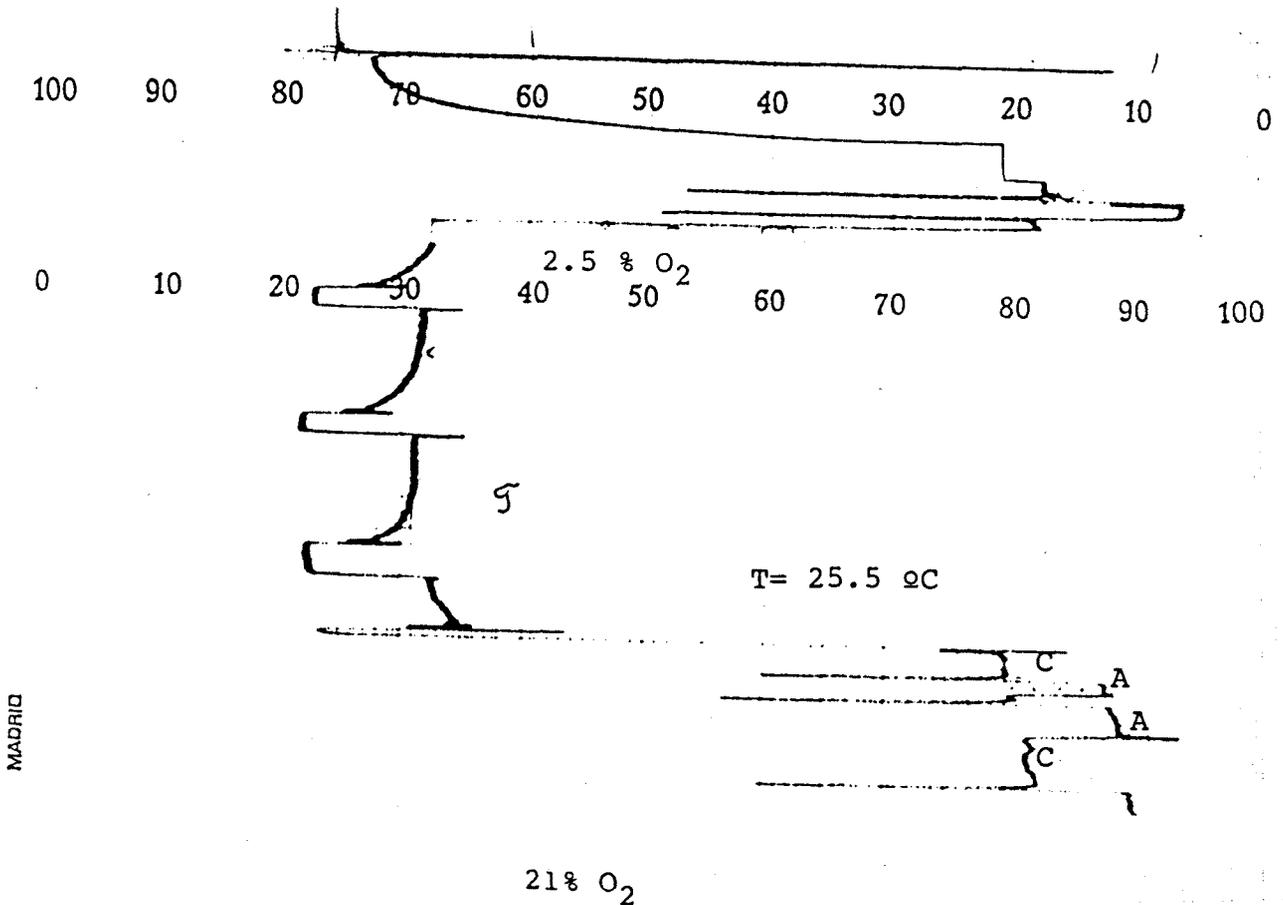
La expresión utilizada, es pues finalmente :

$$F = \frac{A C_x J_x 44}{A_x 22414} \times \frac{273}{T(\text{seca})} \times \frac{P}{1013} \text{ g x cm}^{-2} \text{ x seg}^{-1}$$

T = Temperatura en grados K, bajo la cual fue calibrado el medidor de flujo y a la cual se realiza la medida (si ambas son muy distintas, es necesario introducir una corrección)

P = Presión barométrica (mbares) durante la determinación (el medidor de flujo debe estar calibrado a 1013 m b = 760 torr)





En el gráfico adjunto se puede observar un registro de la medición de fotosíntesis y punto de compensación al 21% y 2,5% de concentración de oxígeno en hojas control.

A = nivel atmosférico de CO₂ (330 ppm)

C = fotosíntesis en el tratamiento control

cero = en concentración de CO₂ dado por el aire al atravesar el absorbente de CO₂.

g = P.C.CO₂

Observese el aumento en fotosíntesis y la disminución en el Punto de compensación de CO₂ al reducir la concentración de oxígeno.

2.3.4 - DETERMINACION DE LA RESPIRACION DE OSCURIDAD

Para la determinación de la respiración de oscuridad, se utilizó el equipo descrito en circuito abierto, cubriendo las cámaras donde se emplazaba el material con un paño negro. El cudal utilizado en este caso tuvo que reducirse para lograr la adecuada sensibilidad.

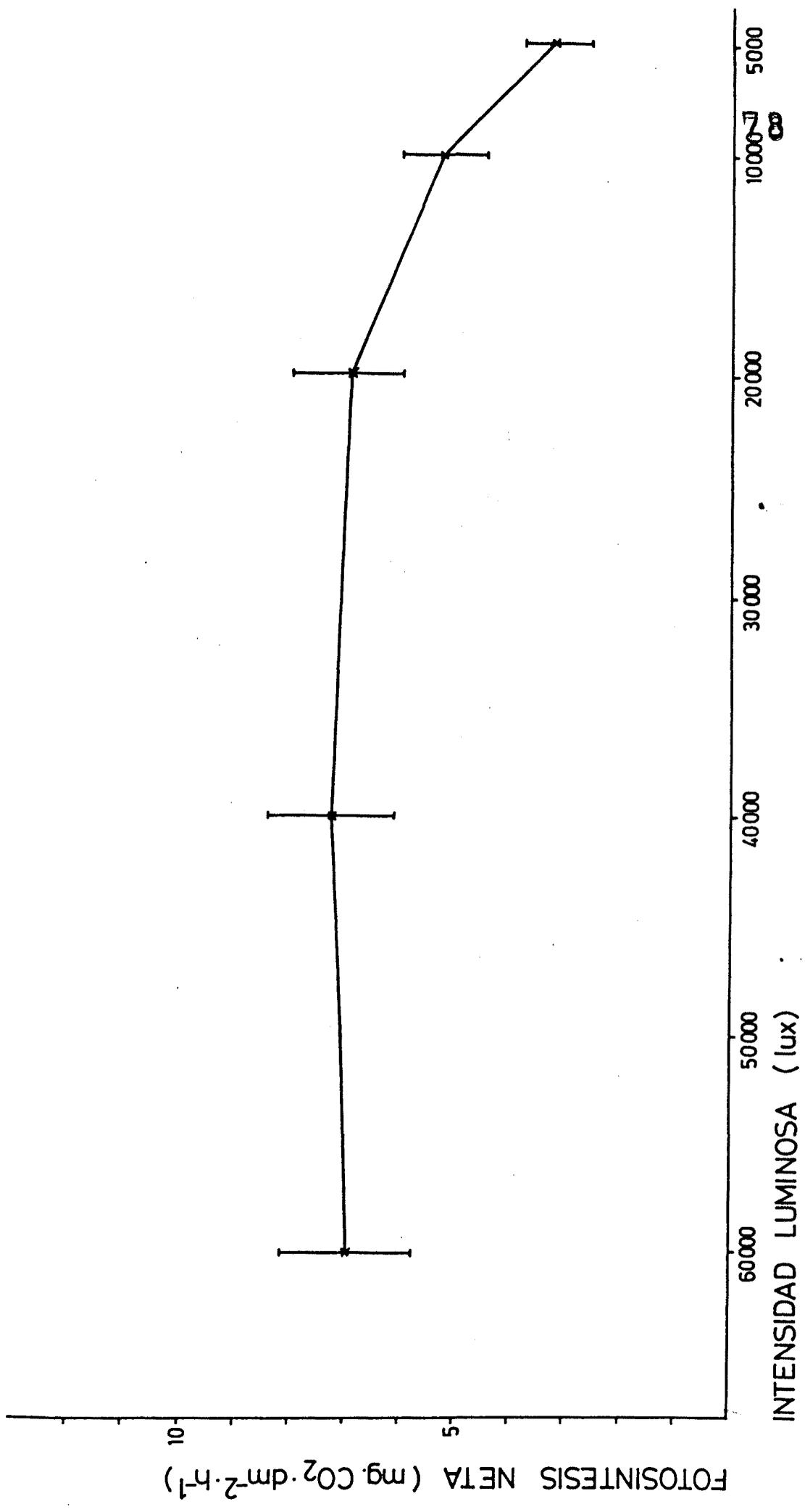
2.3.5 - SATURACION LUMINOSA

Se realizaron una serie de mediciones para observar el efecto de la intensidad luminosa sobre la fotosíntesis en hojas escindidas para fijar las condiciones óptimas para los ensayos posteriores.

Los resultados obtenidos fueron :

FOTOSINTESIS NETA :

	INTENSIDAD LUMINOSA (lux)				
	5000	10000	20000	40000	60000
	1,91	3,25	7,81	4,49	2,49
	2,00	2,50	5,73	6,79	9,06
	2,26	5,21	6,35	4,99	4,08
	4,09	7,48	9,06	10,57	9,65
	4,53	6,65	6,59	10,76	9,90
	4,43	6,59	2,29	6,59	6,59
			4,49		
			5,21		
\bar{x}	3,10	5,28	5,94	7,37	6,96
s	1,27	2,01	2,06	2,71	3,12
s.e	0,52	0,82	0,73	1,10	1,27



2.4.- DETERMINACION DE CLOROFILAS

Método de Richard y Thompson y adaptado por Rigau (1966). Se realiza mediante la homogenización de unos 70 mg de material fresco con 2 ml de acetona al 80%. Previa dilución se realiza la lectura de las densidades ópticas del extracto a 630, 645 y 665 nm,.

Para los cálculos las fórmulas utilizadas fueron:

$$Cl\ a = 15,6 D_{665}^{-2,00} D_{645}^{-0,80} D_{630} \quad (\text{mg/litro})$$

$$Cl\ b = 25,4 D_{645}^{-4,40} D_{665}^{-10,30} D_{630} \quad (\text{mg/litro})$$

que deberán corregirse en caso de turbidez ($D_{750} > 0,01$) aplicando el factor de corrección

$$D'\lambda = D\lambda - f (D_{750} - 0,002)$$

f depende de la longitud de onda

2.5.- DETERMINACION DE PROTEINAS SOLUBLES

Se realizó mediante el método de Lowry.

Día 1 : Homogenización de unos 200 mg de material fresco con TCA-acetona (6 ml). 17 horas a t : 0-4°C.

Día 2 :

Tres centrifugaciones a 1000g desechando el sobrenadante y añadiendo cada vez 6 ml de TCA-acetona. Finalmente se añadieron 2 ml de Na OH 0,1N, dejándose el precipitado 24 horas a temperatura ambiente.

Día 3 :

Modificación del método de Lowry:

Reactivos : 12,5% $\text{Na}_2 \text{CO}_3$, 0,1% Cu SO_4 , solución de Folin Ciocalteu (1:2), standard proteina (BSA albúmina de suero bovino).

Procedimiento:

A 0,2 ml de muestra adicionar 2 ml de $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ (agitar) y 0,5 ml de Cu SO_4 (agitar) dejando 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionar 0,5 ml del reactivo Folin diluido, agitar y dejar 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiental.

Leer las densidades ópticas a 660 nm (realización previa de una curva patrón para confirmar que el método sigue la Ley de Lamber-Beer).

2.6 - DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RIBULOSA 1,5-DIFOSFATO CARBOXILASA (RuBP carboxilasa)

2.6.1 - METODO ESPECTROFOTOMETRICO

El método utilizado (Di Marco et al 1979, 1983) es una variación del método óptico de Racker (1962) en la versión mejorada de Lilley y Walker (1974), basada en la reducción del D-3 PGA con la presencia de los enzimas fosfoglicerato kinasa y gliceraldehehido fosfato deshidrogenasa. El test se realiza midiendo el consumo del NADH a 340 nm.

En la variante de Di Marco et al se utiliza el método óptico en dos secuencias por separado, para poder realizar la reacción de carboxilación en las mismas condiciones en que se realiza el test radiométrico, determinando el D-3PGA formado por titulación "end-point".

Las ventajas de dicho método respecto al método clásico espectrofotométrico son:

- independencia a las sales presentes en las preparaciones comerciales de los enzimas y que son inhibidores de la reacción de la carboxilasa.
- realización de varias pruebas a la vez
- no se precisa del control de temperatura en el espectrofotómetro.
- obtención de resultados comparables con los obtenidos mediante el método radioquímico.

Metodología :

El material vegetal a utilizar (1 gramo aprox.), se homogeneiza en un mortero en hielo con una solución de extracción constituida por :

0,1 M Tris (pH 8,0), 1M Mg Cl₂ , 1M NaHCO₃ y 5 mM mercaptoetanol. La proporción respecto al peso fresco fué 1:2 para

hojas de cebada y 1:4 para hojas de trigo. A finales de la senescencia, las proporciones debieron ser modificadas.

Posteriormente, el extracto fué centrifugado a 30.000 g durante 20 minutos a 4°C. La centrífuga utilizada fué un modelo Beckman JC 21 y rotor JA 14.

El ensayo se realizó a 25°C en tubos conteniendo 0,5 ml de solución de extracción y 10 microlitros de bicarbonato.

Después de 5 minutos de incubación de 10 microlitros de extracto en el medio de reacción, se inició ésta adicionando 50 microlitros de RuBP. La reacción se bloqueó después de dos minutos adicionando 100 microlitros de 1N HCl.

A continuación, se neutralizó la reacción con 100 microlitros de 1N Na OH y se transfirió a una cubeta para la determinación espectrofotométrica, adicionando 1,3 ml de solución de extracción con mercaptoetanol.

Se añadieron a la cubeta : 10 microlitros de ATP en 100 microlitros del tampón Tris, 0,5 micromoles de NADH en 100 microlitros del mismo tampón, 5 unidades de creatina fosfokinasa y 10 micromoles de fosfocreatina en 50 microlitros del mismo tampón.

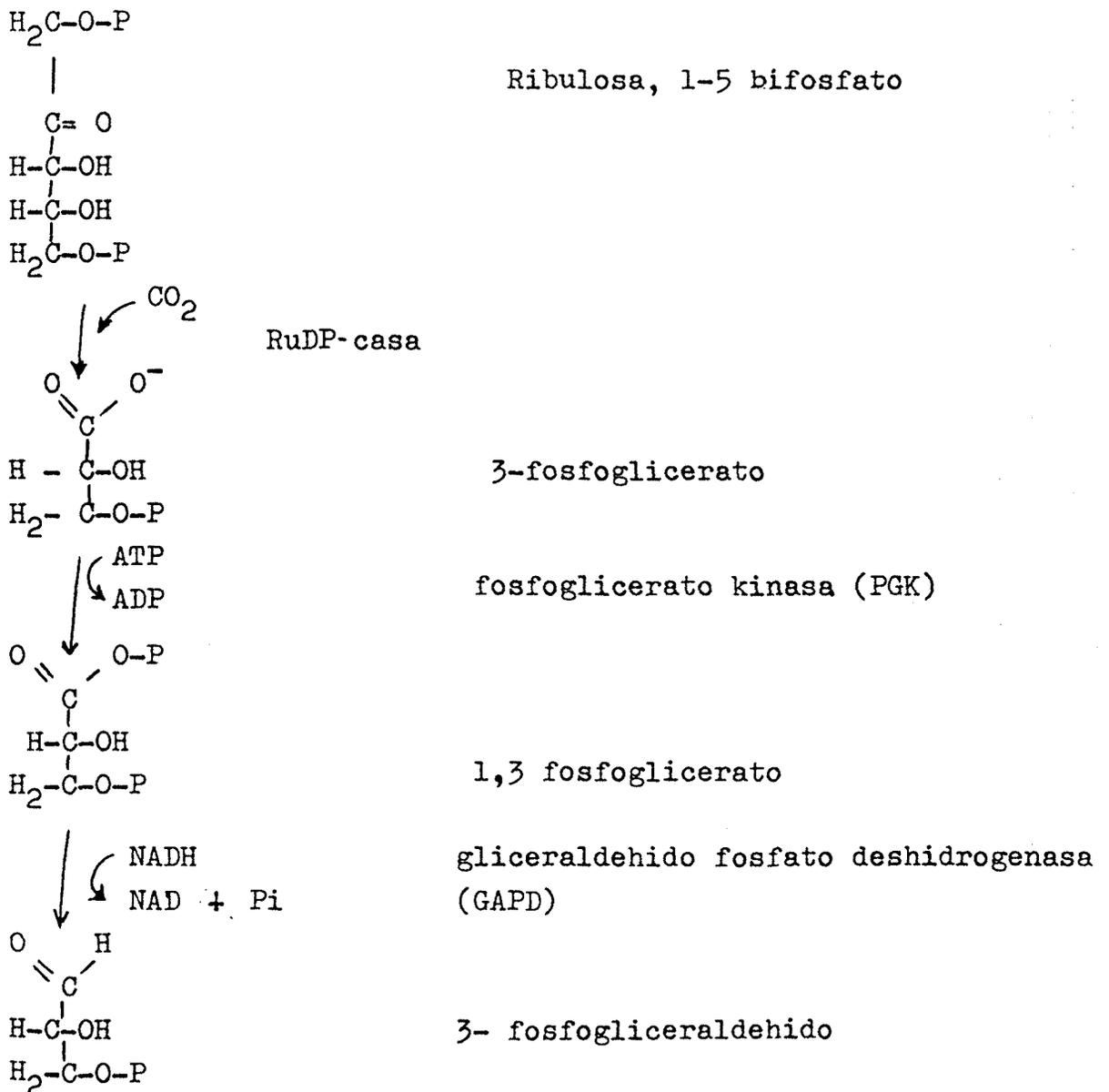
Después de obtener el registro de dicha solución respecto a un blanco conteniendo la misma cantidad de NADH en el tampón, se añadieron 5 unidades de fosfoglicerato kinasa (PGK) y 5 unidades de gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en forma de suspensión en sulfato amónico (10 microlitros).

La reducción del D-3 PGA duró unos 5 minutos a 28°C.

El espectrofotómetro utilizado fué el modelo, SP de Perkin Elmer del Servicio de Espectroscopia de la Universidad de Barcelona.

Posteriormente, se realizó la determinación de proteínas solubles del sobrenadante del centrifugado para referir la actividad carboxilásica tanto a g.p fresco como a mg de proteína.

La reacción seguida es :



2.6.2 - METODO RADIOQUIMICO

Se realizó en viales que contuvieron 0,5 ml de Bicina 100mM (libre de CO_2), Mg Cl_2 10 mM mercaptoetanol. En los cálculos de actividad enzimática se consideró la cantidad de bicarbonato adicionado (5×10^5 cpm en 10 ml de tampón Bicina, pH 8,2 conteniendo 20 μM NaHCO_3) y el bicarbonato contenido en el extracto (20 μl en la mayor parte de los experimentos). Después de 5 minutos de incubación del extracto en el medio de incubación, la reacción se inició adicionando 0,5 mol de RuBP en 50 ml de tampón de reacción sin NaHCO_3 . La reacción se paró a los dos minutos mediante adición de 100 μl de HCl 1M. Seguidamente los viales se dejaron evaporar hasta sequedad y se midieron en un contador de centelleo LKB. No se observó una incorporación significativa de carbono marcado al omitirse la RuBP.

La radioactividad total fué determinada en presencia del medio de reacción completo y del extracto. En este caso, el vial de centelleo (20 ml de volumen total) fué llenado por completo con líquido de centelleo. Si no se hiciera así, parte del carbono marcado se mantendría como CO_2 en fase gaseosa y no se contaría, con lo que habría una subestimación del número total de cuentas y una sobreestimación del CO_2 fijado. La eficacia del contaje se realizó por el método de relación entre dos canales.

2.7 - DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RIBULOSA DIFOSFATO OXIGENASA

El método utilizado se basó en la medida de la absorción de oxígeno mediante un electrodo de Clark. El modelo utilizado fué el 53 de Yellow Spring Instruments. Consiste en una célula electroquímica en la cual la corriente generada es proporcional a la cantidad de oxígeno presente en la solución.

El medio utilizado estuvo constituido por :

0,1 M Tris pH 8,3; Mg Cl_2 0,01 M y 100 RuBP 0,2 mM en un volumen final de 3 ml.

La temperatura del ensayo fué de 27°C.

Al medio utilizado se le inyectó durante un minuto una corriente de aire libre de CO₂ (utilizando como absorbente KOH al 40%). Seguidamente se inició la reacción añadiendo de 100 a 200 λ del mismo extracto utilizado para la reacción de la carboxilasa.

La absorción de Oxígeno se siguió en un registrador anexo al aparato.

Para los cálculos debe considerarse una solubilidad de 0,24 nmoles de O₂ por mililitro.

En la medición de la actividad oxigenásica existe el problema de que concentraciones elevadas de CO₂ podrían originar una inhibición de dicha actividad.

Para evitarlo se realizaron filtrados de la solución extractora a través de columna Sephadex G 25 de forma que el bicarbonato presente en ella no diera lugar a interferencias.

También se realizaron comprobaciones de que la actividad oxigenásica medida era real y no debida a procesos distintos de aprovechamiento de oxígeno. Para ello se realizaron cambios en la solución de extracción, utilizando bicarbonato en exceso, pero manteniendo el pH.

2.8 - MÉTODOS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS

No paramétricos :

Test Mann-Whitney

Test Kruskall-Wallis

Paramétricos :

T-Student

Análisis de la varianza de una vía y de dos vías con interacción.

Aproximación polinómica (Cuadras 1979)

Regresión lineal y correlación.

Ajuste de curvas

Suavizado de curvas : media móvil

Gran parte de los test se han realizado utilizando una calculadora HP 85 y otros mediante el ordenador del Centro de Cálculo de la Universidad de Barcelona

3. RESULTADOS

3.1.- SENESCENCIA FOLIAR EN HORDEUM VULGARE L. CULTIVADO EN CONDICIONES DE LABORATORIO

3.1.1.- EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KINETINA SOBRE EL RETRASO DE LA SENESCENCIA

El objeto de este apartado fué determinar las dosis óptimas de kinetina a aplicar, para obtener el máximo retraso en el envejecimiento de la primera hoja de cebada crecida en condiciones de laboratorio.

Se utilizaron concentraciones equivalente a 2,10 y 20 ppm y se observó como influían sobre el nivel de retención de clorofilas a y b e índice D430/D665 en hojas de 3 semanas escindidas y mantenidas en oscuridad a lo largo de seis días.

RESULTADOS

DIA CERO

	CLOROFILA a (mgxg.pf ⁻¹)	CLOROFILA b (mgxp.gf ⁻¹)	Cl a/Cl b	D430/D665
	1,87	0,42	4,45	1,92
	2,03	0,46	4,41	2,00
	1,94	0,44	4,40	1,92
	1,67	0,36	4,63	1,91
	1,89	0,36	5,25	1,96
	1,55	0,36	4,30	1,86
\bar{x}	1,83	0,40	4,57	1,93
s	0,18	0,05	0,34	0,05
s.e	0,07	0,02	0,14	0,02

DIA CINCO (6 días post-escisión)

CLOROFILA a (mg x g peso fresco⁻¹)

CONTROL	2ppm	10ppm	20ppm
0,37	0,93	0,92	0,80
0,46	0,89	1,15	0,88
0,73	0,77	1,05	1,22
0,43	1,19	1,36	0,75
\bar{x} 0,50	0,95	1,12	0,91
s 0,16	0,18	0,18	0,21
se 0,08	0,09	0,09	0,11

Se realizó un análisis de la varianza para observar si existían diferencias entre los tratamientos con kinetina y el control, obteniéndose :

$$\sigma_x = 0,03 ; \sigma_y = 0,28$$

F (para 3,12 g.d.1) = 8,25. Existen diferencias significativas $p < 0,001$

CLOROFILA b (mg x g peso fresco⁻¹)

	CONTROL	2ppm	10ppm	20ppm
	0,17	0,24	0,23	0,31
	0,14	0,26	0,24	0,24
	0,12	0,30	0,26	0,37
	0,07	0,22	0,25	0,22
\bar{x}	0,13	0,25	0,24	0,28
s	0,04	0,04	0,01	0,07
se	0,02	0,02	0,006	0,035

El análisis de la varianza dió unos valores de $\sigma_x = 0,0038$;
 $\sigma_y = 0,02$; F (3 y 12 g.d.1) = 5,08
 $p < 0,01$. Diferencias significativas.

INDICE Cl_a/Cl_b

	CONTROL	2ppm	10ppm	20ppm
	2,17	2,87	4,00	2,58
	3,29	3,42	4,79	2,67
	6,08	2,57	4,04	3,30
	6,14	5,41	5,44	3,24
\bar{x}	4,49	3,81	4,57	3,24
s	1,99	1,19	0,69	0,47
se	0,99	0,60	0,34	0,23

El análisis de la varianza dió unos valores de $\sigma_x = 1,19$;
 $\sigma_y = 1,10$; $F(3 \text{ y } 11 \text{ g.d.l.}) = 0,92$.
 $P > 0,01$. No existen diferencias significativas.

INDICE D 430/D665

	CONTROL	2ppm	10ppm	20ppm
	2,92	2,31	2,09	2,21
	3,31	2,19	2,17	2,05
	2,36	2,28	2,05	2,14
	2,86	2,18	2,07	3,14
\bar{x}	2,86	2,24	2,10	2,39
s	0,39	0,06	0,05	0,51
se	0,195	0,030	0,025	0,255

El análisis de la varianza dió unos valores de :
 $\sigma_x = 0,10$; $\sigma_y = 0,44$; $F (3 \text{ y } 12 \text{ g.d.l.}) = 4,26$
 $P > 0,05$. Diferencias significativas.

Variaciones en % después de seis días tras la escisión foliar:

CLOROFILA a

Control :	disminución del	73,26%
2ppm K :	"	48,09%
10ppm K :	"	38,80%
20ppm K :	"	50,27%

CLOROFILA b

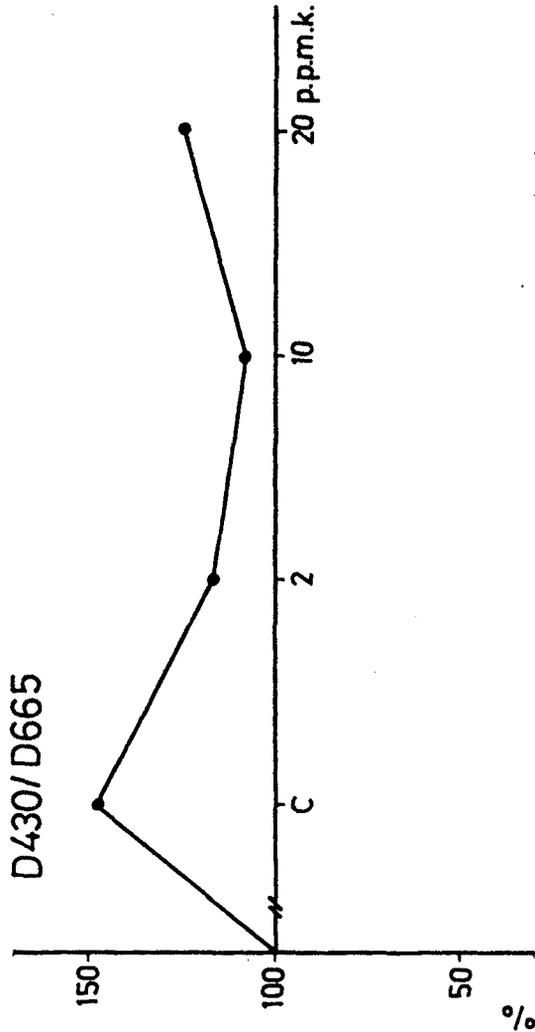
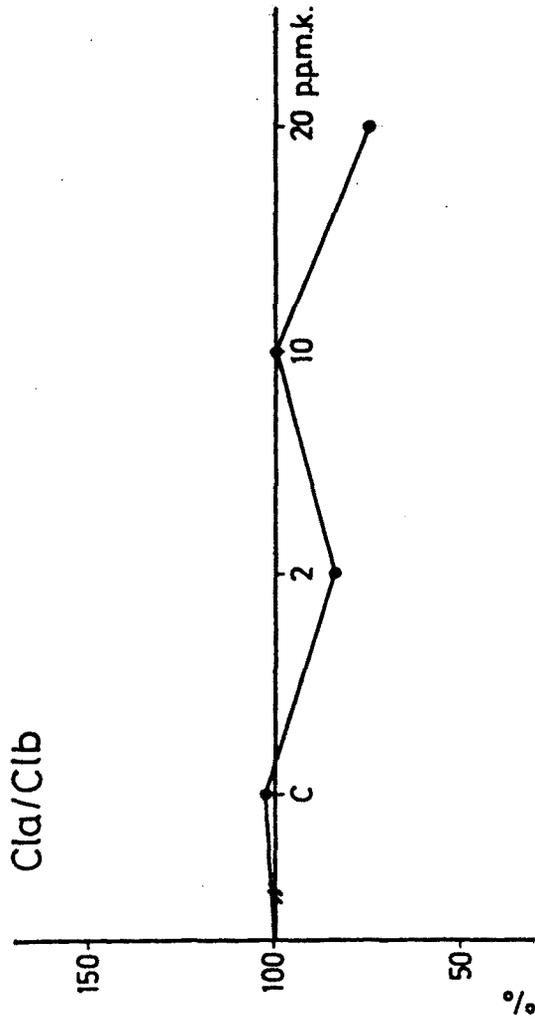
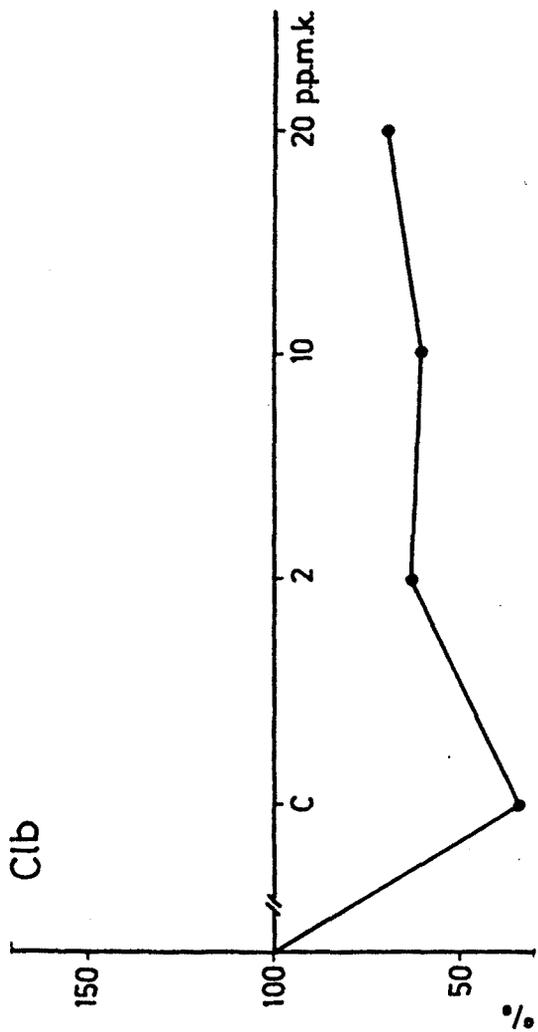
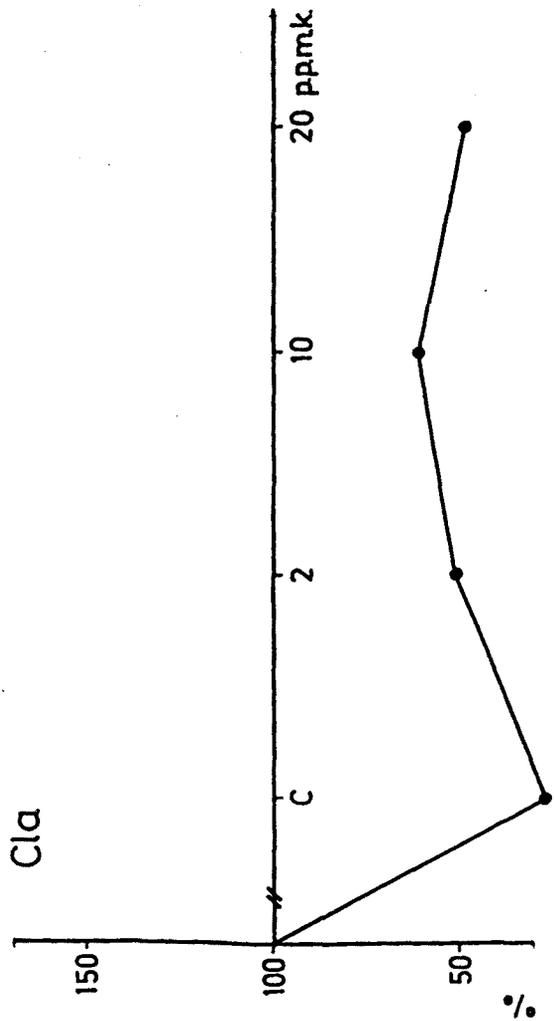
Control :	disminución del	67,50%
2ppm K :	"	37,50%
10ppm K :	"	40,00%
20ppm K :	"	30,00%

Cl_a/Cl_b

Control :	aumento	del	1,75%
2ppm K :	disminución		16,63%
10ppm K :	-		0,00%
20ppm K :	dsiminucidn		29,10%

D430/D665

Control :	aumento del	48,19%
2ppm K :	"	16,06%
10ppm K :	"	8,81%
20ppm K :	"	23,83%



VARIACIONES EN% RESPECTO A LOS VALORES INICIALES. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE KINETINA.

3.1.2.- VARIACIONES EN FOTOSINTESIS NETA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR

3.1.2.1.- EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA (10 ppm)

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA ($\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
0	7,71	7,71
0	9,24	9,24
0	10,04	10,04
0	8,76	8,76
0	8,21	8,21
0	6,98	6,98
0	6,58	6,58
0	7,11	7,11
0	8,47	8,47
0	8,81	8,81
2	6,43	7,19
2	8,01	8,97
2	5,22	6,39
2	5,51	4,76
2	4,84	8,96

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA ($\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
2	4,85	9,99
2	5,62	-
2	7,32	-
2	7,47	-
4	2,05	3,74
4	3,97	6,85
4	2,26	4,58
4	1,93	3,76
4	4,41	5,28
4	3,27	6,97
4	4,05	7,87
4	3,86	6,00
6	2,09	4,83
6	1,18	5,32
6	3,01	3,34
6	2,55	5,22
6	2,55	7,33
6	2,00	4,14

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA ($\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
6	1,82	4,13
6	1,81	5,00
6	-	2,86
6	-	3,41
8	0,50	3,61
8	0,40	4,31
8	0,55	3,08
8	0,43	4,06
8	1,06	2,81
8	0,78	2,74
8	0,58	2,61
8	0,26	6,76
8	-	2,86
10	No realiza Pn=0	4,61
10	"	0,32
10	"	1,02
10	"	1,90
10	"	0,50

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA ($\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
10	no realiza $P_n=0$	2,10
10	"	2,45
10	"	1,61
10	"	2,21
12	"	3,09
12	"	1,09
12	"	0,22
12	"	0,25
12	"	0,21
12	"	2,61
12	"	1,84
12	"	1,73
12	"	3,14
12	"	2,74
12	"	1,93
14	"	3,09
14	"	1,09
14	"	0,22

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA ($\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
14	no realiza $P_n=0$	0,25
14	"	0,21
14	"	2,61
14	"	1,84
14	"	1,73
14	"	3,14
14	"	2,74
14	"	1,93

Para el tratamiento estadístico, al precisarse un número de réplicas iguales, tuvo que prescindirse en algunos casos de algunos datos, eliminándolos al azar.

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA ($\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)					
	HOJAS CONTROL			HOJAS + KINETINA		
	\bar{X}	s	se	\bar{X}	s	se
0	8,44	1,04	0,42	8,63	0,95	0,39
2	5,82	1,23	0,50	8,87	2,05	0,84
4	3,19	0,96	0,39	5,19	1,44	0,59
6	2,18	0,61	0,25	4,15	0,75	0,31
8	0,62	0,25	0,10	3,28	0,75	0,31
10		-		1,77	1,59	0,65
12		-		1,23	1,28	0,52
14		-		0,75	0,56	0,23

Se buscaron las ecuaciones correspondientes a la relación entre fotosíntesis neta y días post-escisión para ambos tratamientos, utilizando el test de regresión lineal, obteniéndose :

$$\text{CONTROL } Y = 8.116 - 1.069 X ; \quad r = - 0.94$$

$$\text{KINETINA } Y = 8.121 - 0.579 X ; \quad r = - 0.90$$

(figura Pag. 102)

También se utilizó la expresión de los resultados en μ moles $\text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, obteniéndose :

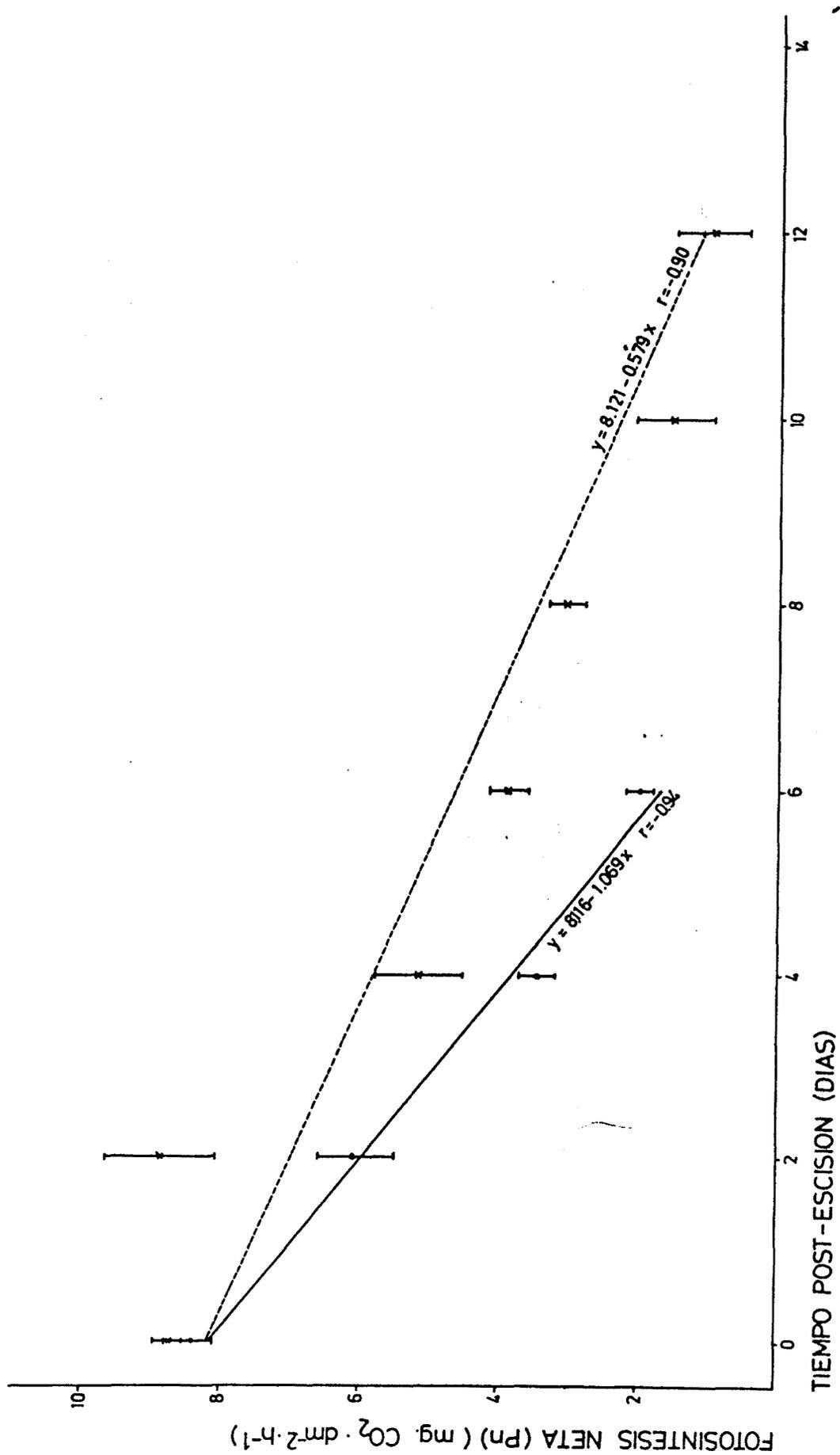
DIA	CONTROL	KINETINA
0	196	196
2	133	202
4	73	118
6	50	94
8	--	75
10	--	40

$$\text{CONTROL } Y = 184.48 - 24.30 X \quad (r = - 0.94)$$

$$\text{KINETINA } Y = 184.59 - 13.16 X \quad (r = - 0,90)$$

(figura Pag. 121)





TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)

FOTOSINTESIS NETA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION. EFECTO DE TRATAMIENTO CON KINETINA (10 ppm)

_____HOJAS CONTROL.HOJAS TRATADAS CON KINETINA.

Disminución en % de la actividad fotosintética respecto al día
cero :

CONTROL	KINETINA
DIA 2 : 31,04%	DIA 2 : 0,00%
Dia 4 : 62,20%	DIA 4 : 39,86%
DIA 6 : 74,18%	DIA 6 : 51,95%
DIA 8 : 92,65%	DIA 8 : 61,99%
	DIA 10 : 79,49%
	DIA 12 : 85,75%
	DIA 14 : 91,31%

Se realizó el test t de Student para averiguar a partir de que día tras la escisión foliar aparecían diferencias en actividad fotosintética, en cada tratamiento por separado, y entre ellos, obteniéndose :

TRATAMIENTO CONTROL

- Diferencias significativas entre días 0 y 2
 $t = 3,83$ (5g.d.1) $p < 0,02$
- Diferencias significativas entre días 2 y 4
 $t = 4,73$ (5g.d.1) $p < 0,01$
- Diferencias sinificativas entre días 4 y 6
 $t = 2,28$ (5g.d.1) $p < 0,1$
- Diferencias significativas entre días 6 y 8
 $t = 6,16$ (5g.d.1) $p < 0,002$

TRATAMIENTO CON KINETINA

- Diferenciasno significativas entre días 0 y 2
 $t = 0,95$ (5g.d.1) $p > 0,1$
- Diferencias significativas entre días 2 y 4
 $t = 2,21$ (5g.d,1) $p < 0,005$
- Diferencias no significativas entre días 4 y 6
 $t = 1,43$ (5g.d.1) $p > 0,1$
- Diferencias significativas entre días 6 y 8
 $t = 3,75$ (5g.d.1) $p < 0,002$

- Diferencias significativas entre días 8 y 10
t = 2,10 (5g.d.1) p < 0,1
- Diferencias no significativas entre días 10 y 12
t = 1,37 (5g.d.1) p > 0,1
- Diferencias no significativas entre días 12 y 14
t = 1,08 (5g.d.1) p > 0,1

ENTRE TRATAMIENTOS

- Diferencias no significativas el día 0
t = -0,40 (5g.d.1) p > 0,1
- Diferencias significativas el día 2
t = -2,15 (5g.d.1) p < 0,1
- Diferencias significativas el día 4
t = -3,11 (5g.d.1) p < 0,05
- Diferencias significativas el día 6
t = -3,02 (5g.d.1) p < 0,05
- Diferencias significativas el día 8
t = -7,11 (5g.d.1) p < 0,001

3.1.2.2.- EFEECTO DEL OXIGENO AL 2,5% SOBRE HOJAS CONTROL Y CON KINETINA

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA ($\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
0	10,15	10,15
0	12,47	12,47
0	12,59	12,59
0	12,12	12,12
0	10,76	10,76
0	11,62	11,62
2	7,28	7,17
2	7,38	9,39
2	8,54	6,14
2	8,01	11,83
2	8,03	10,10
2	8,09	8,61
2	7,70	-
2	11,46	-
4	3,43	4,14
4	6,38	8,37

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA ($\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
4	7,67	9,84
4	4,23	4,70
4	3,49	10,18
4	5,37	6,44
4	6,29	7,71
4	5,89	8,08
6	2,52	4,27
6	4,19	7,64
6	4,08	5,56
6	2,62	5,22
6	2,67	7,96
6	3,37	5,71
6	-	8,47
6	-	7,77
8	0,54	4,95
8	0,41	4,58
8	0,78	8,11
8	0,33	8,06

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA ($\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
8	0,29	4,63
8	0,36	5,11
10	no realiza Pn = 0	6,17
10	"	1,49
10	"	2,76
10	"	3,80
10	"	1,27
10	"	2,21
10	"	4,49
10	"	4,07
12	no realiza Pn = 0	4,91
12	"	1,87
12	"	0,22
12	"	1,28
12	"	1,09
12	"	3,70
12	"	3,45
12	"	1,73

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA (mg CO ₂ · dm ⁻² · h ⁻¹)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
12	no realiza Pn = 0	4,71
12	"	6,07
14	no realiza Pn = 0	1,60
14	"	0,59
14	"	4,13
14	"	2,13
14	"	0,28
14	"	1,54
14	"	1,62

Para el tratamiento estadístico, al precisarse un número de réplicas iguales, tuvo que prescindirse en algunos casos de algunos datos, eliminándolos al azar.

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	FOTOSINTESIS NETA (mg CO ₂ · dm ⁻² · h ⁻¹)					
	2,5% O ₂			HOJAS + KINETINA		
	HOJAS CONTROL			HOJAS + KINETINA		
	\bar{X}	s	se	\bar{X}	s	se
0	11,62	0,98	0,40	11,62	0,98	0,40
2	8,44	1,55	0,63	8,87	2,05	0,84
4	5,18	1,73	0,71	7,44	2,55	1,04
6	3,24	0,76	0,31	6,83	1,39	0,57
8	0,45	0,19	0,08	5,91	1,70	0,69
10		--		3,14	1,79	0,73
12		--		2,79	1,38	0,56
14		--		1,72	1,37	0,56

Se buscaron las ecuaciones correspondientes a la relación entre fotosíntesis neta a 2,5% O₂ y días post-escisión para ambos tratamientos, utilizando el test de regresión lineal, obteniéndose :

CONTROL : $Y = 11.376 - 1.419 X$ (r = - 0,96)

KINETINA : $Y = 10.769 - 0.675 X$ (r = - 0,88)

(ver figura Pag. 112)

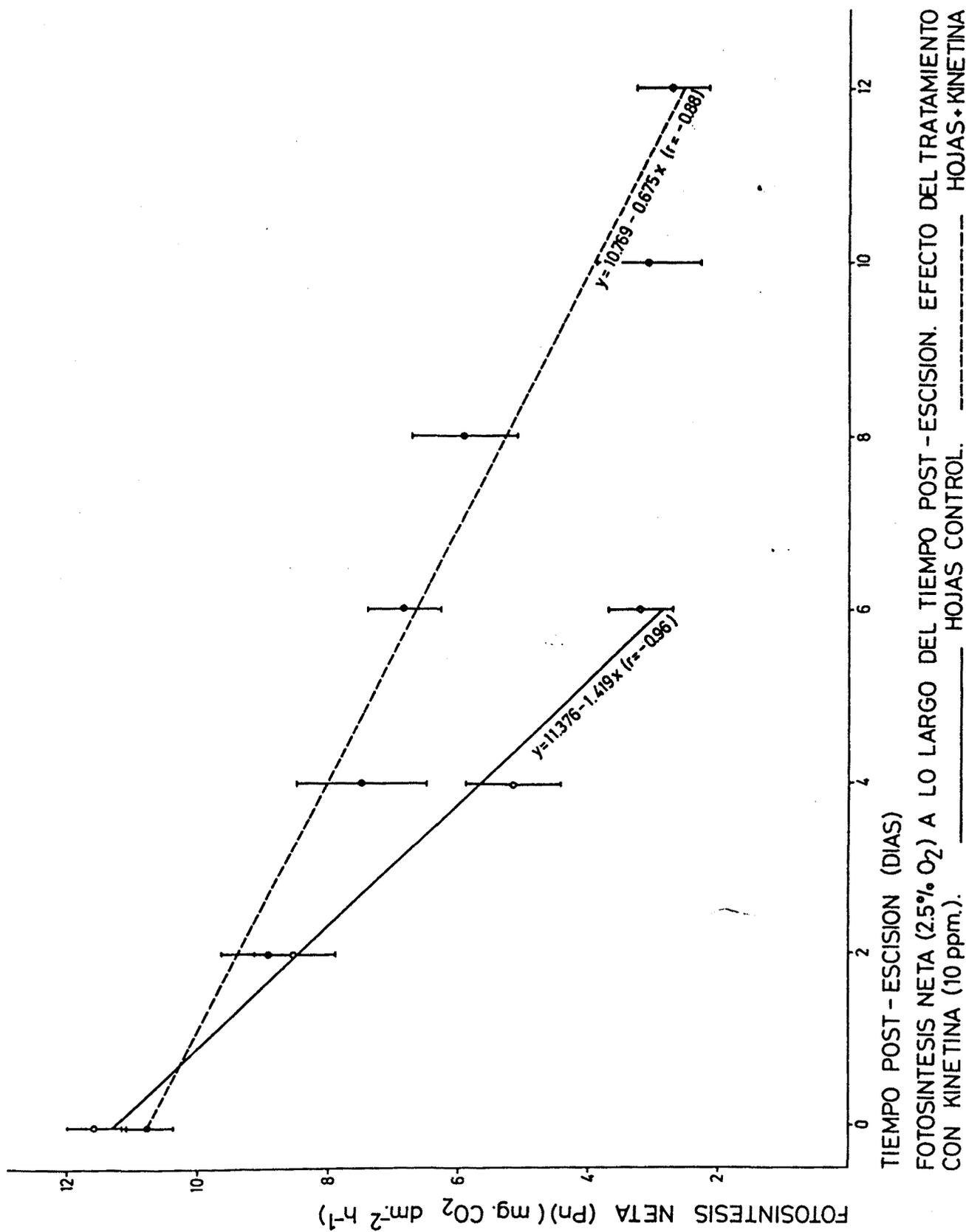
La expresión de los resultados en $\mu\text{moles CO}_2 \text{ dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$:

DIA	CONTROL	KINETINA
0	264	264
2	192	202
4	118	169
6	74	155
8	--	134
10	--	71

CONTROL : $Y = 258.58 - 32.25 X$ (r = - 0,86)

KINETINA : $Y = 244.78 - 15.34 X$ (r = - 0,88)

(ver figuras Pag. 121)



Disminución en % de la actividad fotosintética respecto al día
cero :

CONTROL	KINETINA
DIA 2 : 27.37%	DIA 2 : 23.67%
DIA 4 : 55.42%	DIA 4 : 35.97%
DIA 6 : 72.07%	DIA 6 : 41.30%
DIA 8 : 86.11%	DIA 8 : 49.14%
	DIA 10 : 72.98%
	DIA 12 : 75.99%
	DIA 14 : 85.20%

Se realizó el test t de Student para averiguar a partir de que día tras la escisión foliar aparecían diferencias en actividad fotosintética bajo una atmósfera del 2,5% en O₂, en cada tratamiento y entre ellos, obteniéndose :

TRATAMIENTO CONTROL

- Diferencias significativas entre días 0 y 2
t = 4,65 (5g.d.1) p < 0,01
- Diferencias significativas entre días 2 y 4
t = 4,18 (5g.d.1) p < 0,01
- Diferencias significativas entre días 4 y 6
t = 4,51 (5g.d.1) p < 0,01
- Diferencias significativas entre días 6 y 8
t = 9,94 (5g.d.1) p < 0,001

TRATAMIENTO CON KINETINA

- Diferencias significativas entre días 0 y 2
t = 3,05 (5g.d.1) p < 0,05
- Diferencias no significativas entre días 2 y 4
t = 1,05 (5g.d.1) p > 0,1
- Diferencias no significativas entre días 4 y 6
t = 0,54 (5g.d.1) p > 0,1
- Diferencias no significativas entre días 6 y 8
t = 1,04 (5g.d.1) p > 0,1
- Diferencias significativas entre días 8 y 10
t = 2,22 (5g.d.1) p < 0,05

- Diferencias no significativas entre días 10 y 12
t = 0,31 (5g.d.1) p > 0,1
- Diferencias significativas entre días 12 y 14
t = 2,18 (5g.d.1) p < 0,1

ENTRE TRATAMIENTOS

- Diferencias no significativas el día 0
t = 0,00 (5g.d.1) p > 0,1
- Diferencias no significativas el día 2
t = -0,40 (5g.d.1) p > 0,1
- Diferencias significativas el día 4
t = -2,59 (5g.d.1) p < 0,05
- Diferencias significativas el día 6
t = -5,55 (5g.d.1) p < 0,01
- Diferencias significativas el día 8
t = -8,23 (5g.d.1) p < 0,001



3.1.2.3.- EFECTO CONJUNTO DEL TRATAMIENTO HORMONAL Y LA CONCENTRACION DE OXIGENO SOBRE LA FOTOSINTESIS NETA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR

A partir de los resultados obtenidos en los apartados 2.1 y 2.2 se realizaron tests de análisis de la varianza de 2 vías (2 factores con interacción) obteniéndose :

TRATAMIENTO CONTROL

(ver figura Pag. 119 A)

Número de filas : 2 concentración O₂ (21%-2,5%)

Número columnas : 5 (días post-escisión)

Nº réplicas por casilla : 6

Media fila 1 (21%) = 4,05

Media fila 2 (2,5%) = 5,79

" Dia 0 = 10,03

" Dia 2 = 7,13

" Dia 4 = 4,19

" Dia 6 = 2,71

" Dia 8 = 0,54

Media general = 4,92

Análisis de la varianza :

Filas (concentración O₂) , F = 41,42 (1,50 g.d.l.)

p < 0,01 diferencias significativas

Columnas (días post-escisión), F = 152,84 (4,50 g.d.l.)

p < 0,01 diferencias significativas

Interacción (concentración de O₂-tiempo post-escisión)

F = 4,82 (4,50 g.d.l) p 0,01

diferencias significativas. Existe interacción

TRATAMIENTO CON KINETINA

(figura Pag. 119 B)

Número filas : 2 (concentración O_2 : 21%-2,5% O_2)
 Número columnas : 8 (días post-escisión)
 Nº réplicas por casilla : 6
 Media fila 1 (21% O_2) = 4,08
 Media fila 2 (2,5% O_2) = 6,04
 Media día 0 = 10,13
 Media día 2 = 8,26
 Media día 4 = 6,32
 Media día 6 = 5,49
 Media día 8 = 4,59
 Media día 10 = 2,46
 Media día 12 = 2,01
 Media día 14 = 1,23
 Media general = 5,06

Análisis de la varianza :
 Filas (concentración O_2 F = 52,09 (1,80 g.d.1)
 p < 0,01 diferencias significativas
 Columnas (Días post-escisión) F = 66,71 (7,80 g.d.1)
 p < 0,01 diferencias significativas
 Interacción F = 0,78 (7,80 g.d.1)
 p > 0,05 diferencias no significativas.

CONCENTRACION 21% O_2 :

(figura Pag. 119 C)

Número filas : (control-kinetina)
 Número columnas : 5 (días post-escisión)
 Nº réplicas por casilla : 6
 Media fila 1 : (control) = 4,05
 Media fila 2 : (Kinetina) = 5,79
 Media día 0 = 8,54
 Media día 2 = 6,76
 Media día 4 = 4,19
 Media día 6 = 3,16
 Media día 8 = 1,95
 Media general = 4,92

Análisis de la varianza :

Filas (efecto hormonal) $F = 18,05$ (1,50 g.d.1)

$p < 0,01$ diferencias significativas

Columnas (días post-escisión) $F = 34,23$ (4,50 g.d.1)

$p < 0,01$ diferencias significativas

Interacción (efecto hormonal-tiempo) $F = 2,04$ (4,50 g.d.1)

$p > 0,05$ diferencias no significativas.

CONCENTRACION 2,5%

(figura Pag. 119 D)

Número filas = 2 (control-kinetina)

Número columnas = 5 (días post-escisión)

Media fila 1 = (control) = 5,79

Media fila 2 (kinetina) = 8,13

Media día 0 = 11,62

Media día 2 = 8,65

Media día 4 = 6,31

Media día 6 = 5,03

Media día 8 = 6,96

Análisis de la varianza :

-Filas (efecto hormonal) $F = 35,23$ (1,50 g.d.1)

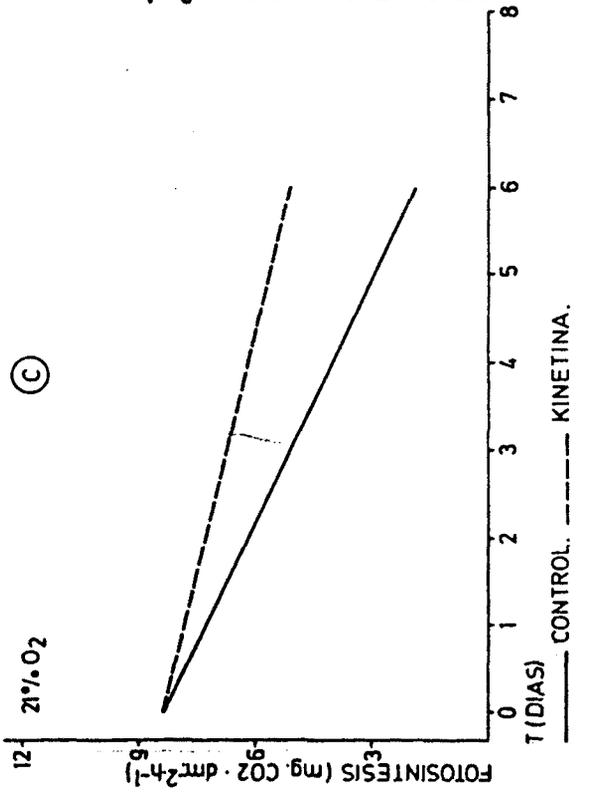
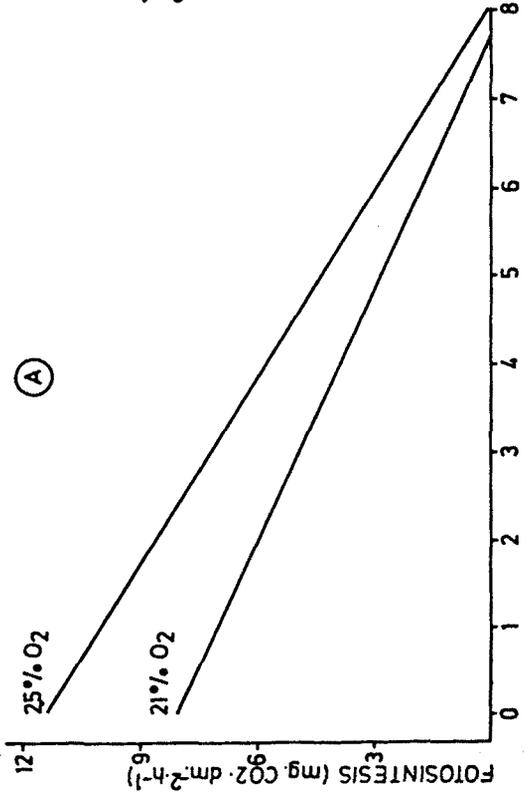
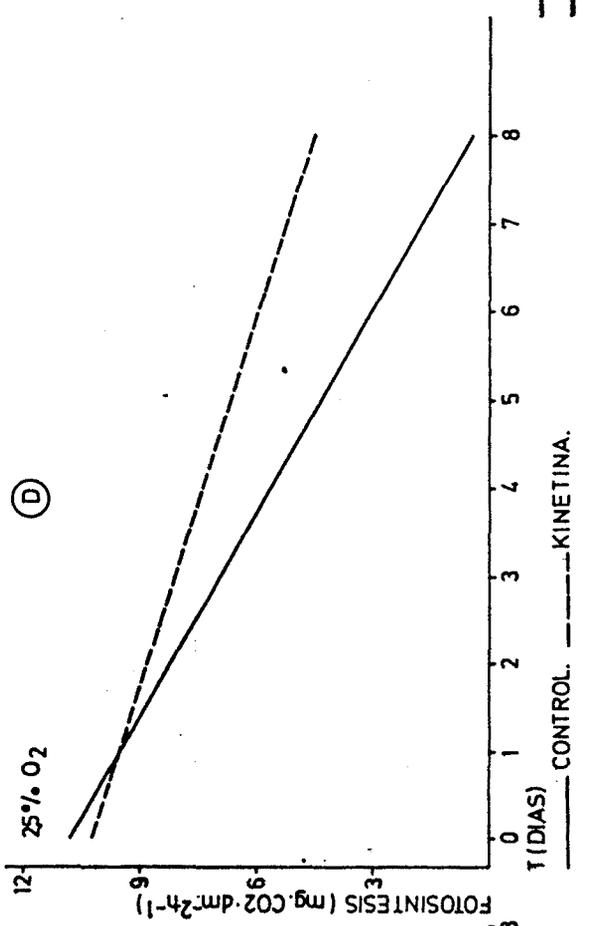
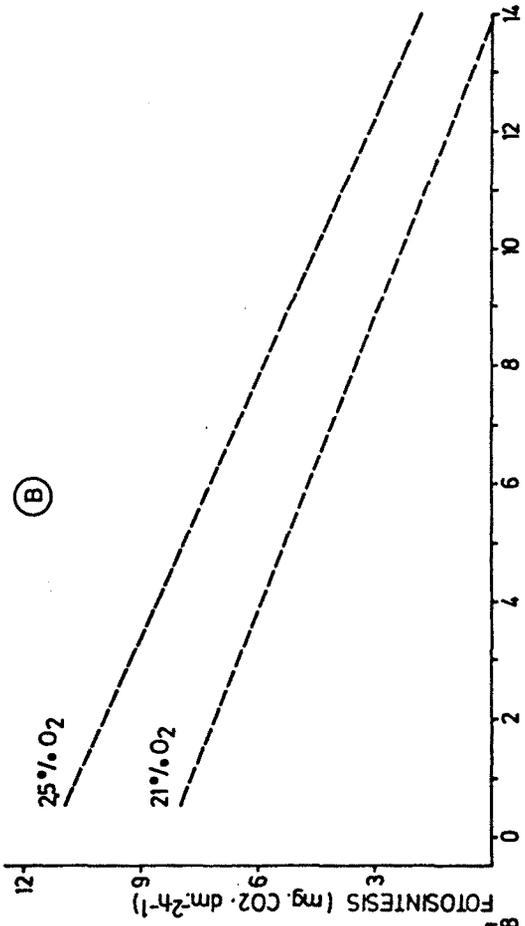
$p < 0,01$ diferencias significativas

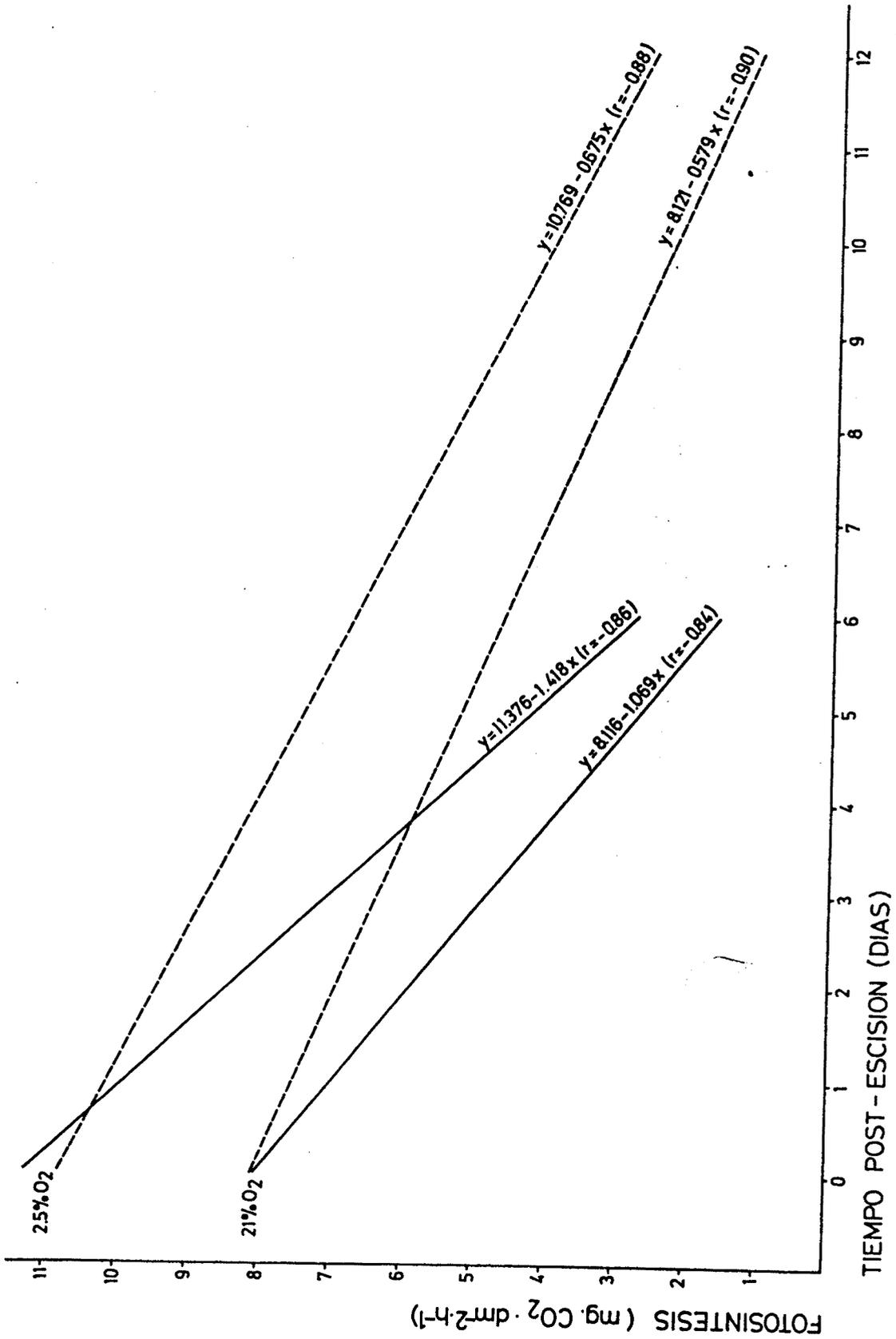
-Columnas (tiempo post-escisión) $F = 54,99$ (4,50 g.d.1)

$p < 0,01$ diferencias significativas

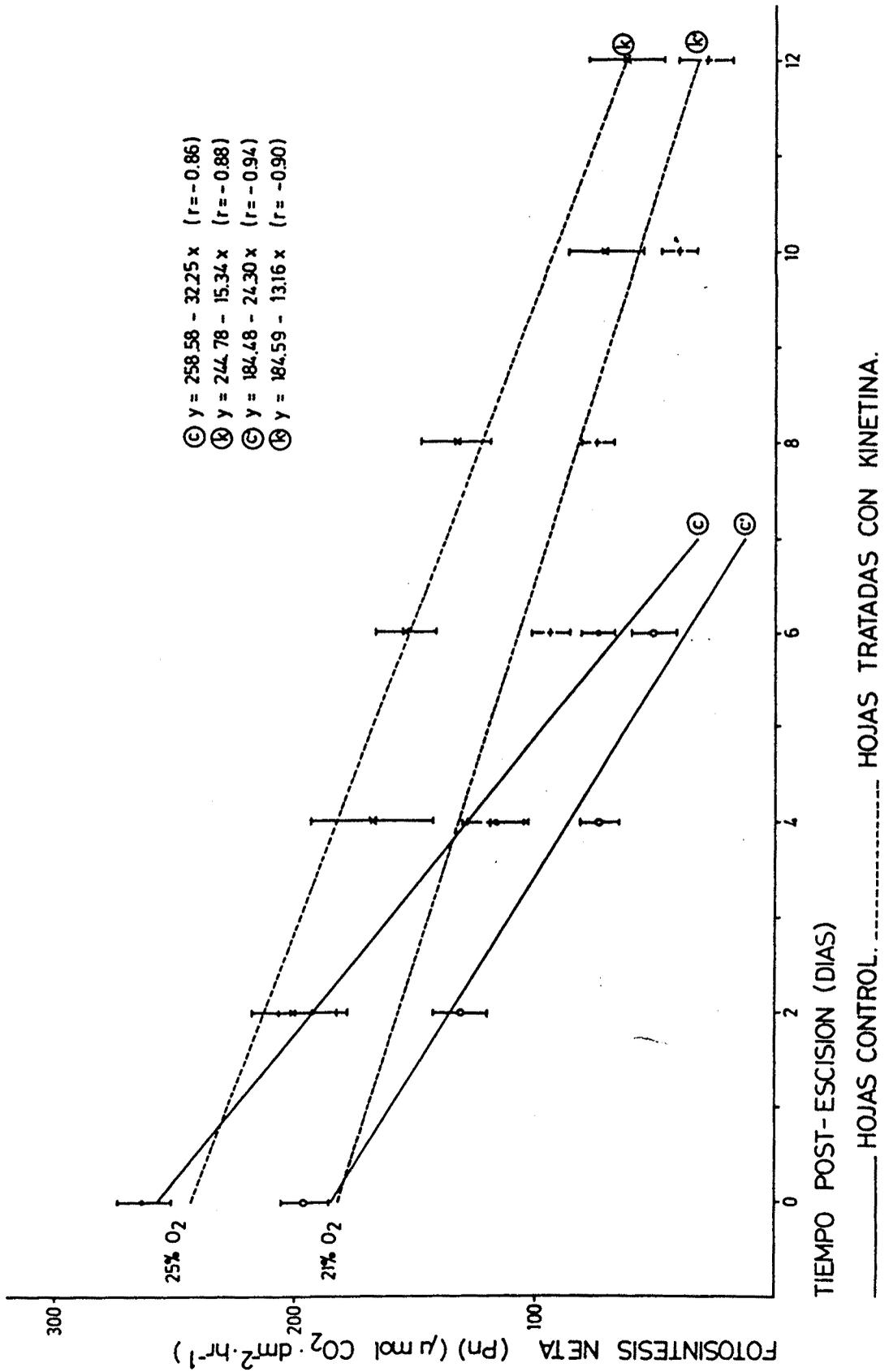
-Interacción (efecto hormonal-tiempo) $F = 6,51$ (4,50 g.d.1)

$p > 0,01$ diferencias no significativas. Existe interacción.





FOTOSINTESIS NETA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR. EFECTO HORMONAL Y DE LA CONCENTRACION DE O₂. _____ CONTROL. - - - - - KINETINA.



3.1.2.4.- INDICE DE INHIBICION POR OXIGENO Y DEFICIT DE CARBONO

El índice de inhibición por oxígeno (I) de la fotosíntesis viene expresado por :

$$I = P_n(2,5\%) - P_n(21\%) / P_n(2,5\%)$$

	CONTROL	KINETINA
DIA 0	0,287	0,246
DIA 2	0,300	0,261
DIA 4	0,326	0,281
DIA 6	0,405	0,308
DIA 8	-	0,350
DIA 10	-	0,420
DIA 12	-	0,561
DIA 14	-	0,989

Los ajustes e polinomios de 2º grado dieron las siguientes expresiones :

$$\text{CONTROL } Y = 0,29 + 0,1x + 0,004x^2 ; \quad (r = 0,995)$$

$$\text{KINETINA } Y = 0,30 - 0,04x + 0,01x^2 ; \quad (r = 0,963)$$

(figura Pag. 124)

El índice del déficit de carbono viene expresado por :

$$D = 12/44 \quad (P_n 2,5\% - P_n 21\%)$$

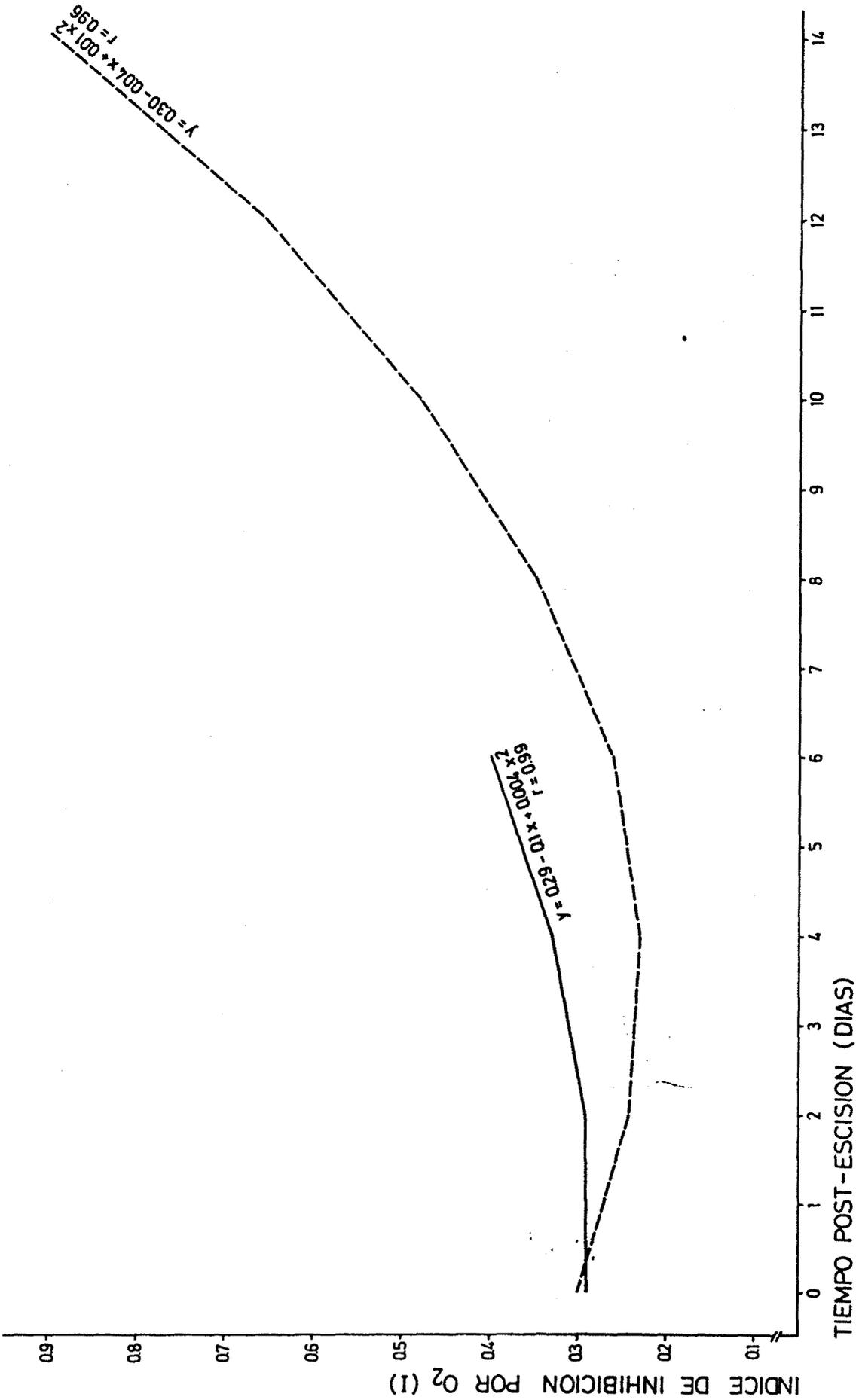
	CONTROL	KINETINA
DIA 0	0,889	0,722
DIA 2	0,698	0,669
DIA 4	0,507	0,617
DIA 6	0,316	0,565
DIA 8	-	0,512
DIA 10	-	0,460
DIA 12	-	0,408
DIA 14	-	0,355

Los ajustes lineales dieron como resultado :

$$\text{CONTROL : } Y = 0,985 - 0,096 X \quad (r = -1)$$

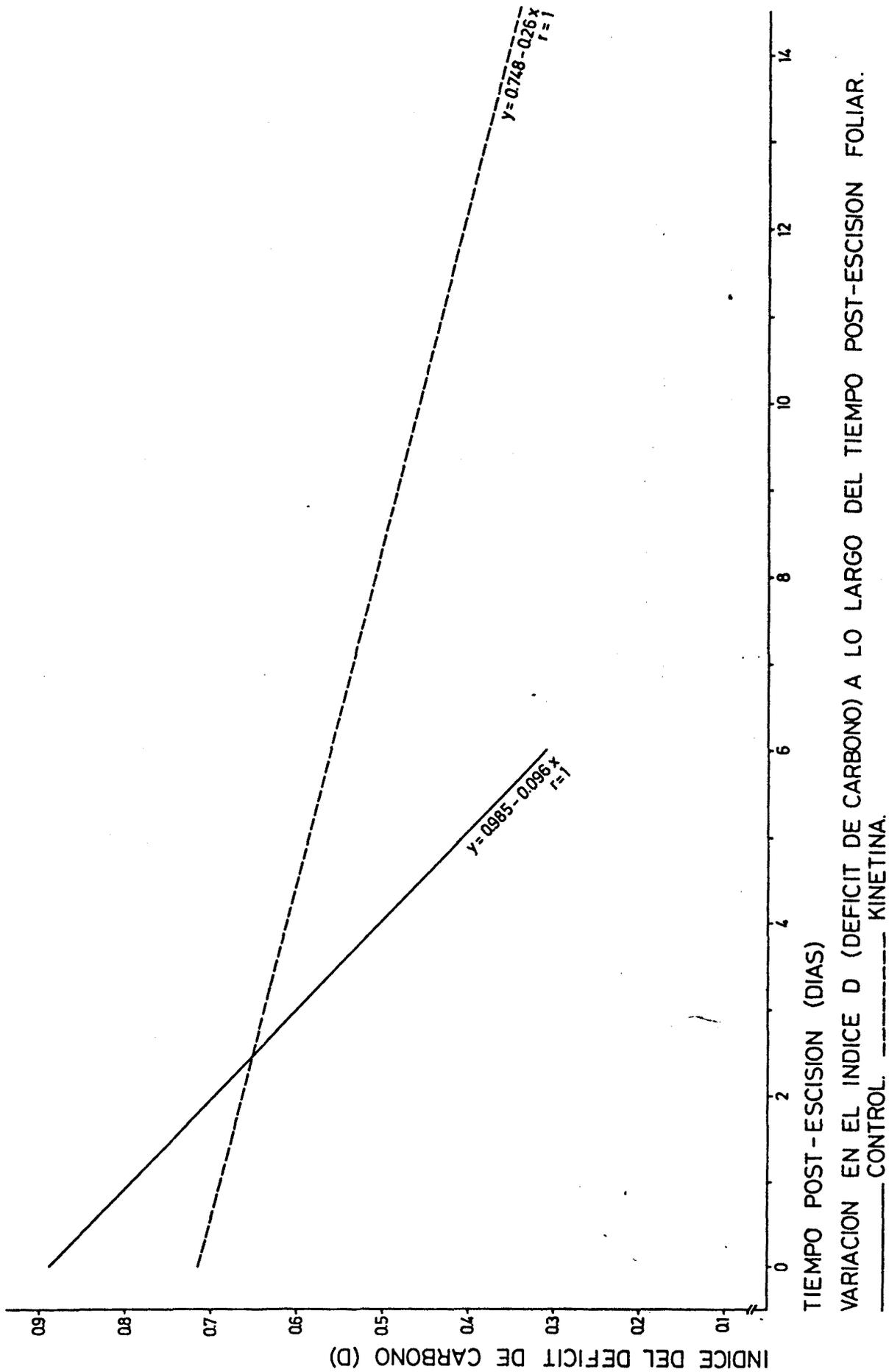
$$\text{KINETINA : } Y = 0,748 - 0,026 X \quad (r = -1)$$

(figura Pag. 125)



TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)

VARIACIONES EN EL INDICE DE INHIBICION POR O₂ (I) A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR. _____ CONTROL. - - - - - KINETINA.



3.1.3.- VARIACIONES EN EL PUNTO DE COMPENSACION DE CO₂ A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR

3.1.3.1.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA (10 ppm)

TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR (DIAS)	PUNTO COMPENSACION CO ₂ (P.C.CO ₂) ppm	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
0	45	45
0	48	48
0	45	45
0	62	62
0	40	40
0	55	55
0	40	40
0	35	35
2	50	45
2	50	50
2	60	56
2	45	45
2	72	48
2	64	50
2	-	45

TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR (DIAS)	PUNTO COMPENSACION CO ₂ (P.C.CO ₂) ppm	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
4	70	68
4	68	60
4	87	68
4	65	65
4	63	55
4	100	53
4	-	45
6	108	68
6	90	80
6	82	52
6	90	50
6	80	78
6	80	55
6	95	70
6	-	58
8	100ppm	92
8	"	78

TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR (DIAS)	PUNTO COMPENSACION CO ₂ (P.C.CO ₂) ppm HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
8	100ppm	120
8	"	60
8	"	55
8	"	73
8	"	75
10	"	55
10	"	70
10	"	60
10	"	110
10	"	80
10	"	110
12	"	125
12	"	160
12	"	78
12	"	100
12	"	85
12	"	105

Para el tratamiento estadístico, al precisarse un número de réplicas iguales, tuvo que prescindirse, en algunos casos de algunos datos, eliminándolos al azar.

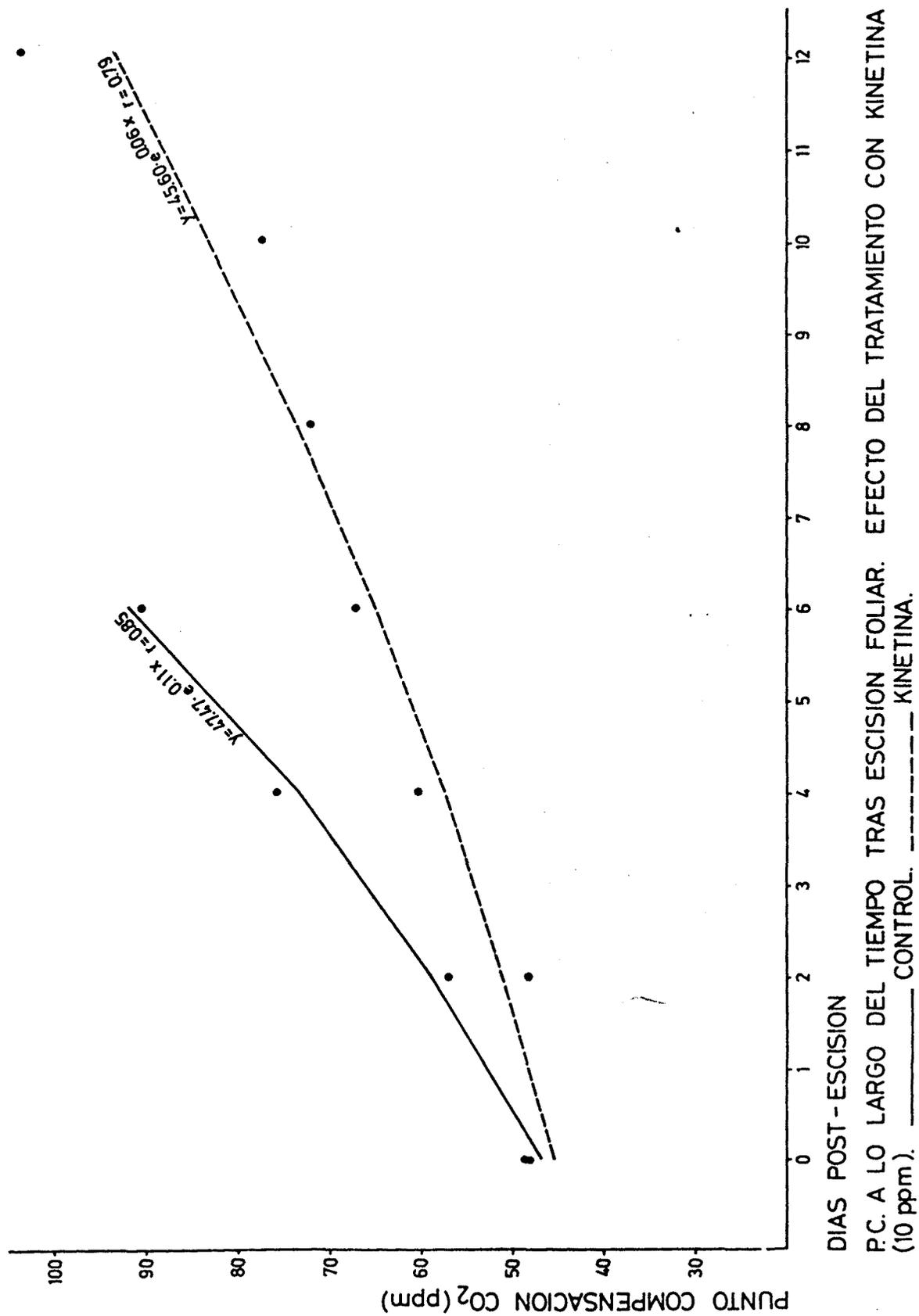
TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	PUNTO COMPENSACION CO ₂ (ppm)					
	HOJAS CONTROL			HOJAS + KINETINA		
	\bar{X}	s	se	\bar{X}	s	se
0	49,17	7,99	3,26	49,17	7,99	3,26
2	56,83	10,25	4,18	48,17	4,36	1,78
4	75,50	14,73	6,01	60,17	8,98	3,66
6	90,83	10,09	4,12	67,67	10,98	4,48
8		---		72,17	13,26	5,41
10		---		77,50	20,43	8,34
12		---		108,83	29,97	12,23

Los datos obtenidos se ajustaron a ecuaciones obteniéndose. :

CONTROL : $Y = 47,47 e^{0,11 X}$ $r = 0,85$ ($p < 0,01$)

KINETINA : $Y = 45,60 e^{0,06x}$ $r = 0,79$ ($p < 0,01$)

(ver figura Pag. 130)



Incrementos en % del P.C.CO₂ respecto al día cero :

CONTROL	KINETINA
DIA 2 : 15,58%	DIA 2 : 0%
DIA 4 : 53,55%	DIA 4 : 22,37%
DIA 6 : 84,73%	DIA 6 : 37,62%
	DIA 8 : 46,78%
	DIA 10 : 57,62%
	DIA 12 : 121,33%

Se realizó el test t de Student para averiguar a partir de que día tras la escisión foliar aparecían diferencias en los P.C.CO₂ obtenidos, en cada tratamiento por separado y entre ellos, obteniéndose :

TRATAMIENTO CONTROL

- Diferencias no significativas entre días 0 y 2
t = 1,45 (log.d.1) p > 0,1
- Diferencias significativas entre días 2 y 4
t = 2,54 (log.d.1) p < 0,01
- Diferencias significativas entre días 4 y 6
t = 2,10 (log.d.1) p < 0,05

TRATAMIENTO CON KINETINA

- Diferencias no significativas entre los días 0 y 2
t = 0,26 (log.d.1) p > 0,4
- Diferencias significativas entre días 2 y 4
t = 2,95 (log.d.1) p < 0,02
- Diferencias no significativas entre días 4 y 6
t = 1,30 (log.d.1) p > 0,10
- Diferencias no significativas entre días 6 y 8
t = 0,64 (log.d.1) p > 0,3
- Diferencias no significativas entre días 8 y 10
t = 0,5364 (log.d.1) p > 0,3
- Diferencias significativas entre días 10 y 12
t = 2,12 (log.d.1) p < 0,1

ENTRE TRATAMIENTOS

- Diferencias no significativas el día 0
t = 0,00 (10g.d.1) p > 0,1
- Diferencias significativas el día 2
t = 1,91 (10g.d.1) p < 0,1
- Diferencias significativas el día 4
t = 2,18 (10g.d.1) p < 0,1
- Diferencias significativas el día 6
t = 3,80 (10g.d.1) p < 0,01

3.1.3.2.- EFECTO DEL OXIGENO AL 2,5% SOBRE HOJAS CONTROL Y CON KINETINA

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	PUNTO COMPENSACION CO ₂ (P.C.CO ₂) ppm	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
0	15	15
0	13	13
0	25	25
0	22	22
0	20	20
0	12	12
0	25	25
0	15	15
0	19	19
2	15	15
2	10	22
2	12	12
2	15	28
2	20	18
2	18	30
2	25	-
2	45	-

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	PUNTO COMPENSACION CO ₂ (P.C.CO ₂) ppm	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
4	40	25
4	22	18
4	45	30
4	28	18
4	28	10
4	35	23
4	25	22
6	32	48
6	40	12
6	30	20
6	45	18
6	32	18
6	42	30
6	-	20
6	-	25
8	100ppm	45
8	"	25
8	"	20



TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	PUNTO COMPENSACION CO ₂ (P.C.CO ₂) ppm	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
8	100ppm	15
8	"	35
8	"	65
10	"	28
10	"	24
10	"	20
10	"	25
10	"	50
10	"	50
12	"	38
12	"	32
12	"	45
12	"	80
12	"	125
12	"	25
12	"	52
12	"	35

Para el tratamiento estadístico, al precisarse un número de réplicas iguales, tuvo que prescindirse de algunos datos, eliminándolos al azar.

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	PUNTO COMPENSACION CO ₂ (P.C.CO ₂) ppm (2,5%O ₂)					
	HOJAS CONTROL			HOJAS + KINETINA		
	\bar{X}	s	se	\bar{X}	s	se
0	18,83	7,99	3,26	19,83	5,34	2,18
2	21,67	12,52	5,11	20,83	7,17	2,93
4	32,50	9,01	3,68	20,67	6,92	2,82
6	36,83	6,27	2,56	25,50	12,61	5,15
8		--		30,00	11,83	4,83
10		--		32,83	13,54	5,53
12		--		60,83	36,38	14,85

Los datos se ajustaron a ecuaciones exponenciales obteniéndose :

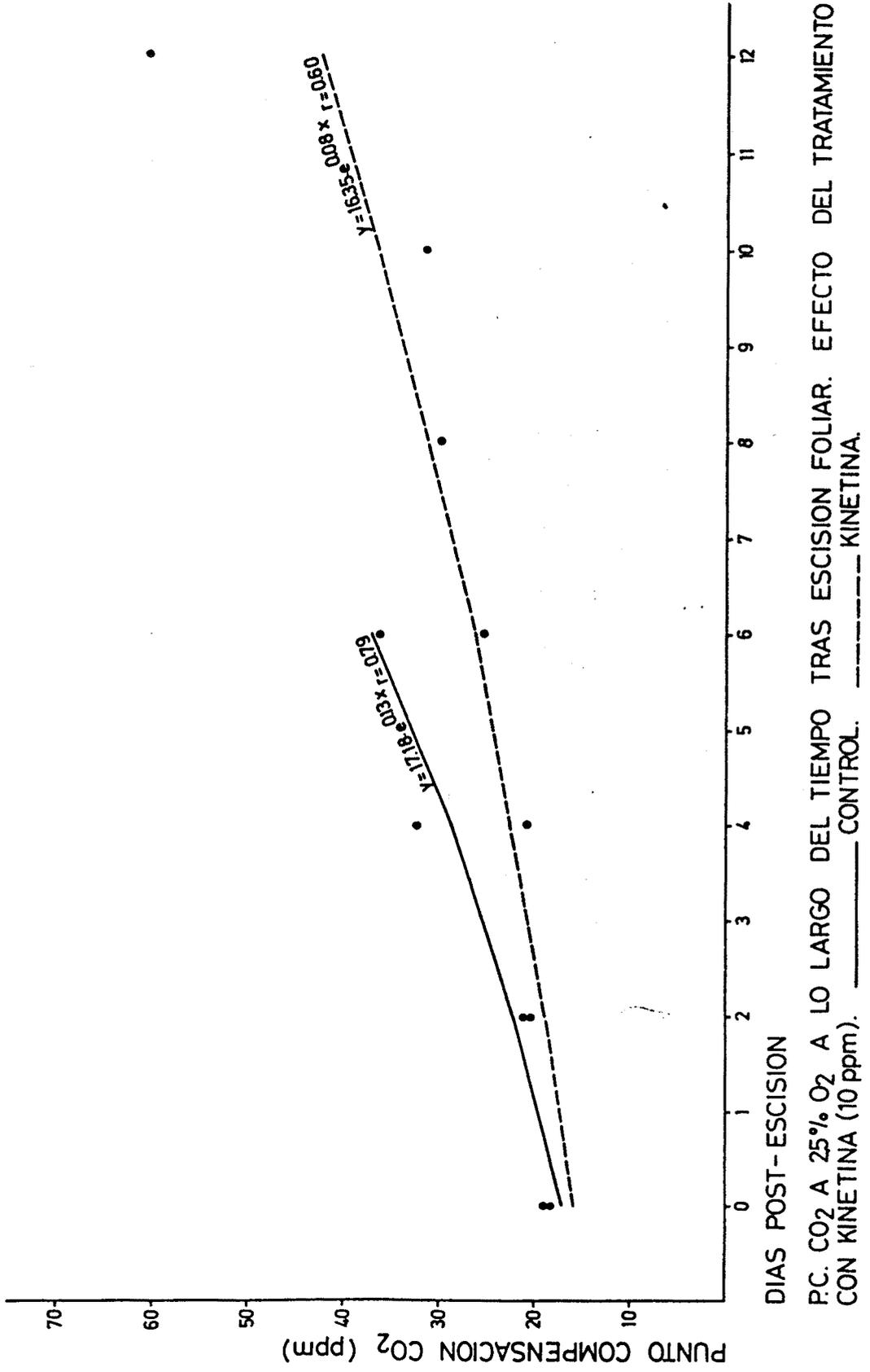
CONTROL :

$$Y = 17,18 e^{0,13x} \quad r = 0,67 \quad (p < 0,01)$$

KINETINA :

$$Y = 16,35 e^{0,08x} \quad r = 0,60 \quad (p < 0,01)$$

(figura Pag. 138)



P.C. CO₂ A 25% O₂ A LO LARGO DEL TIEMPO TRAS ESCISION FOLIAR. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA (10 ppm). _____ CONTROL. _____ KINETINA.

Incrementos en % del P.C.CO₂ respecto al día cero :

CONTROL		KINETINA	
DIA 2 :	15,08%	DIA 2 :	5,04%
DIA 4 :	72,60%	DIA 4 :	4,24%
DIA 6 :	95,59%	DIA 6 :	28,59%
		DIA 8 :	51,29%
		DIA 10 :	65,56%
		DIA 12 :	206,76%

Se realizó el test t de Student para averiguar a partir de que días tras la escisión foliar aparecían diferencias en los P.C.CO₂ bajo una atmósfera del 2,5% O₂, en cada tratamiento por separado y entre ellos obteniéndose :

TRATAMIENTO CONTROL

- Diferencias no significativas entre días 0 y 2
t = 0,52 (10 g.d.1) p > 0,3
- Diferencias no significativas entre días 2 y 4
t = 1,72 (10 g.d.1) p > 0,1
- Diferencias no significativas entre días 4 y 6
t = 0,97 (10 g.d.1) p > 0,2
- Diferencias significativas entre días 0 y 6
t = - 9,96 (5 g.d.1) p < 0,001

TRATAMIENTO CON KINETINA

- Diferencias no significativas entre días 0 y 2
t = 0,27 (10 g.d.1) p > 0,4
- Diferencias no significativas entre días 2 y 4
t = 0,41 (10 g.d.1) p > 0,5
- Diferencias no significativas entre días 4 y 6
t = 0,82 (10 g.d.1) p > 0,2
- Diferencias no significativas entre días 6 y 8
t = 0,64 (10 g.d.1) p > 0,3
- Diferencias no significativas entre días 8 y 10
t = 0,39 (10 g.d.1) p > 0,4
- Diferencias significativas entre días 10 y 12
t = - 2,15 (5 g.d.1) p < 0,1

ENTRE TRATAMIENTOS

- Diferencias no significativas el día 0
t = 0,34 (10 g.d.1) p > 0,4
- Diferencias no significativas el día 2
t = 0,14 (10 g.d.1) p > 0,4
- Diferencias significativas el día 4
t = 2,55 (10 g.d.1) p < 0,05
- Diferencias significativas el día 6
t = 1,97 (10 g.d.1) p < 0,1

3.1.3.3.- EFECTO CONJUNTO DEL TRATAMIENTO HORMONAL Y LA CONCENTRACION DE O₂ SOBRE EL P.C.CO₂ A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR .-

TRATAMIENTO ESTADISTICO.-

A partir de los resultados obtenidos en los apartados 3.1.3.1 y 3.1.3.2 , se realizaron test de análisis de la varianza de 2 vías (2 factores con interacción) obteniéndose :

TRATAMIENTO CONTROL

(figura Pag. 145 A)

Número filas : 2 (concentración O₂ : 21% - 2,5%)

Número columnas : 4 (días post-escisión)

Número réplicas por casilla : 6

Media fila 1 (21% O₂) = 68,08

Media fila 2 (2,5% O₂) = 27,46

Media día 0 = 34

Media día 2 = 39,25

Media día 4 = 54

Media día 6 = 63,83

Media general = 47,77

ANALISIS DE LA VARIANZA :

- Filas (concentración O₂) = F = 201,34 (1,40 g.d.1)

p < 0,01 diferencias significativas

- Columnas (días post-escisión) F = 22,73 (3,40 g.d.1)

p < 0,01 diferencias significativas

- Interacción (concentración O₂ - tiempo post-escisión)

F = 3,26 (3,40 g.d.1) p < 0,5

diferencias significativas . Existe interacción.

TRATAMIENTO KINETINA

(figura Pag. 145 B)

Número filas : 2 (concentración O_2 : 21% - 2,5%)

Número columnas : 5 (días post-escisión)

Número réplicas por casilla : 6

Media fila 1 (21% O_2) = 61,03

Media fila 2 (2,5% O_2) = 24,20

Media día 0 = 34,50

Media día 2 = 34,50

Media día 4 = 40,42

Media día 6 = 46,58

Media día 8 = 57,08

Media general = 42,62

ANALISIS VARIANZA

- Filas (concentración O_2) $F = 103,15$ (1,50 g.d.l)
 $p < 0,01$ diferencias significativas

- Columnas (días post-escisión) $F = 5,5$ (4,50 g.d.l)
 $p > 0,01$ < diferencias significativas

- Interacción $F = 1,34$ $p > 0,05$ diferencias no significativas . No existe interacción.

CONCENTRACION 21% O_2

(figura Pag. 145 C)

Número filas = 2 (control-kinetina)

Número columnas = 4 (días post-escisión)

Número réplicas por casilla = 6

Media fila 1 (control) = 68,08

Media fila 2 (kinetina) = 56,29

Media día 0 =49,17
 Media día 2 =52,50
 Media día 4 =67,83
 Media día 6 =79,25
 Media general=62,19

ANALISIS DE LA VARIANZA

- Filas (efecto hormonal) $F = 17,3$ (1,40 g.d.1)
 $p < 0,01$ diferencias significativas
- Columnas (días post-escisión) $F = 24,32$ (3,40 g.d.1)
 $p < 0,01$ diferencias significativas
- Interacción (efecto hormonal-tiempo)
 $F = 3,01$ (3,40 g.d.1) $p < 0,05$ diferencias significativas.
 Existe interacción

CONCENTRACION 2,5% O₂

(figura Pag. 145 D)

Número filas : 2 (control-kinetina)
 Número columnas : 4 (días post-escisión)
 Número réplicas por casilla : 6
 Media fila 1 (control) = 27,46
 Media fila 2 (kinetina) = 21,71
 Media día 0 = 19,33
 Media día 2 = 21,25
 Media día 4 = 26,58
 Media día 6 = 31,16
 Media general = 24,58

ANALISIS VARIANZA

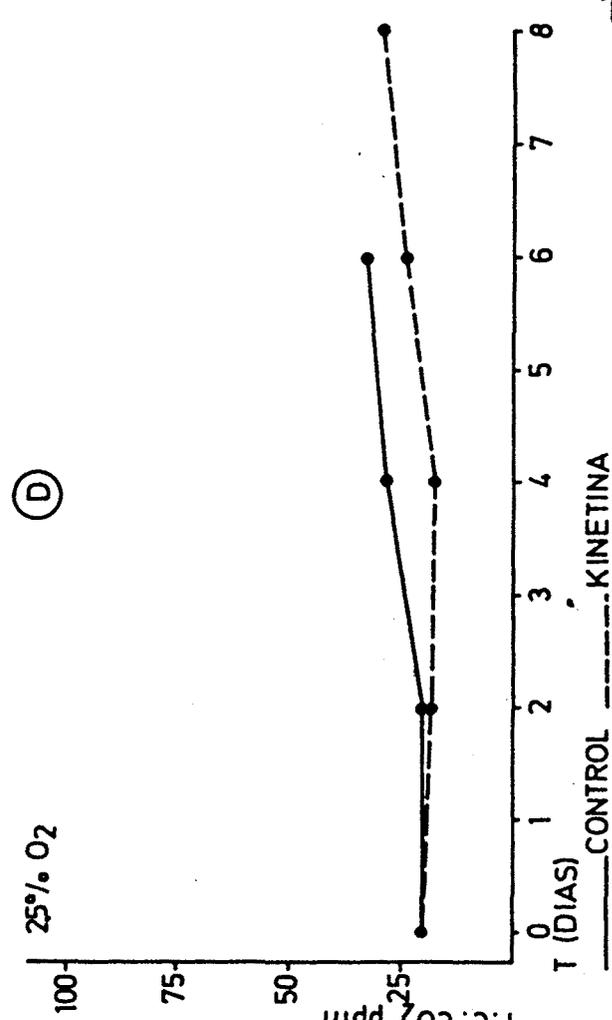
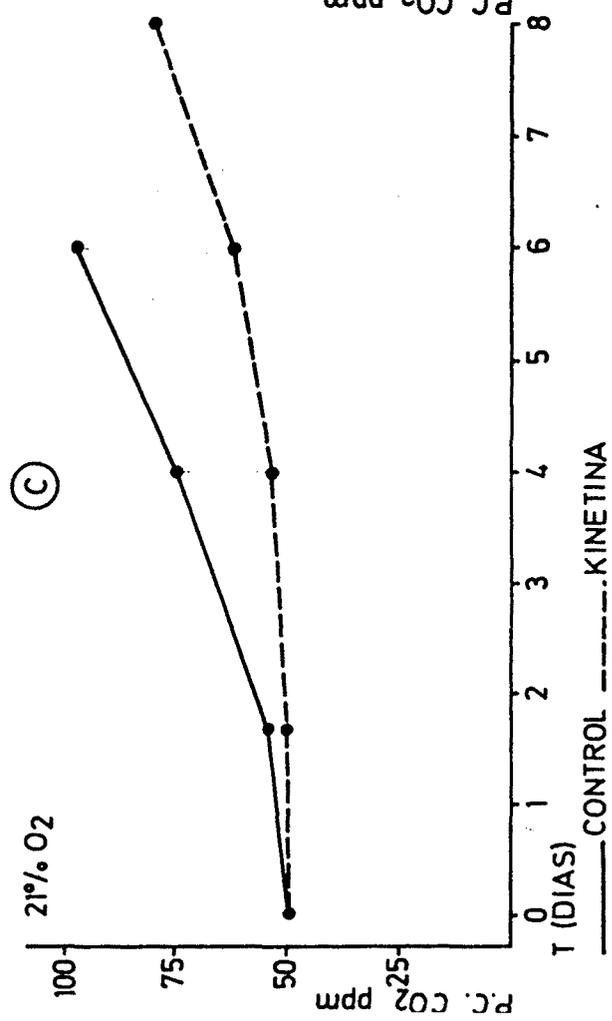
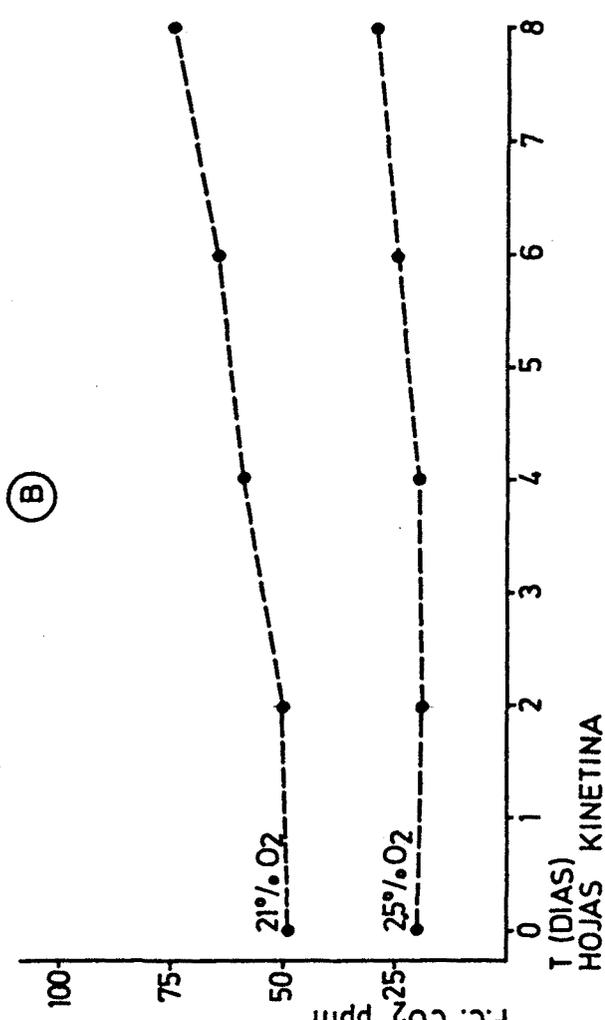
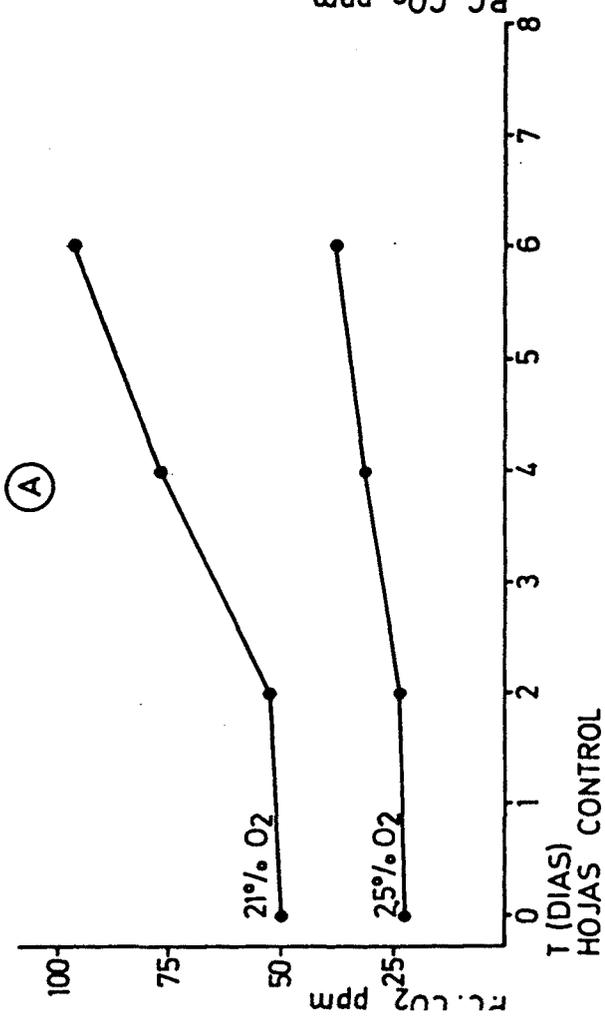
- Filas (efecto hormonal) $F = 5,4$ (1,40 g.d.1)
 $p < 0,05$ diferencias significativas

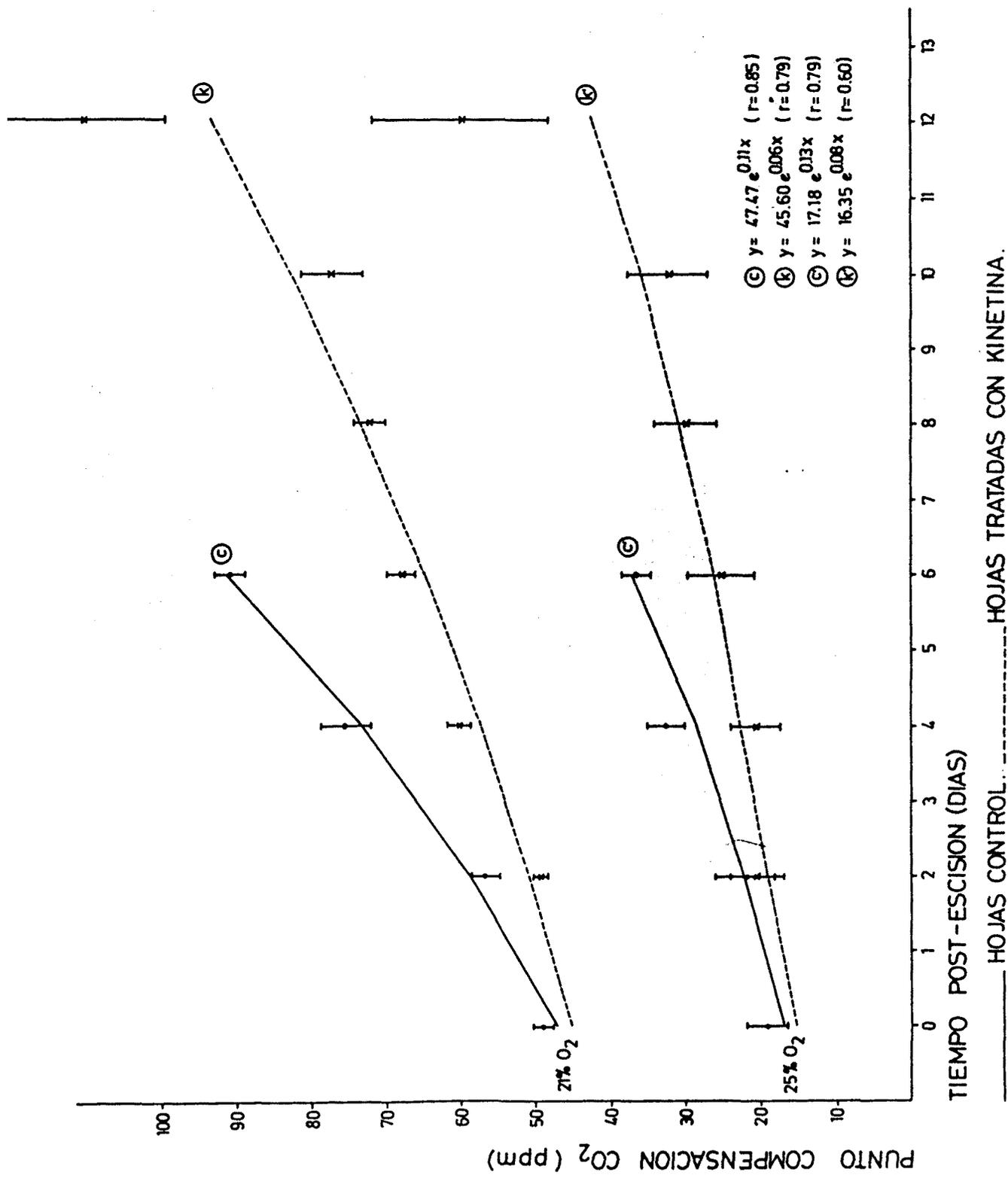
- Columnas (tiempo post-escisión)

F = 4,70 (3,40 g.d.1) p > 0,05 diferencias significativas

- Interacción (efecto hormonal-tiempo post-escisión)

F = 1,88 (1,40 g.d.1) p > 0,05 No existe interacción.





3.1.3.4.- RELACION ENTRE LAS VARIACIONES EN LOS P.C. CO₂ Y LA FOTOSINTESIS NETA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR

A partir de los resultados obtenidos en los apartados 3.1.2.1, 3.1.2.2, 3.1.3.1, y 3.1.3.2, se estudiaron las siguientes relaciones :

- Pn - P.C. CO₂ al 21% O₂ en hojas control :
 $y = 101,188 - 22,756 \log x \quad (r = - 0,70 ; \quad p < 0,001)$

(ver figura Pag. 148)

- Pn - P.C. CO₂ al 21% en hojas con kinetina :
 $y = 82,631 - 11,623 \log x \quad (r = - 0,51; \quad p < 0,001)$

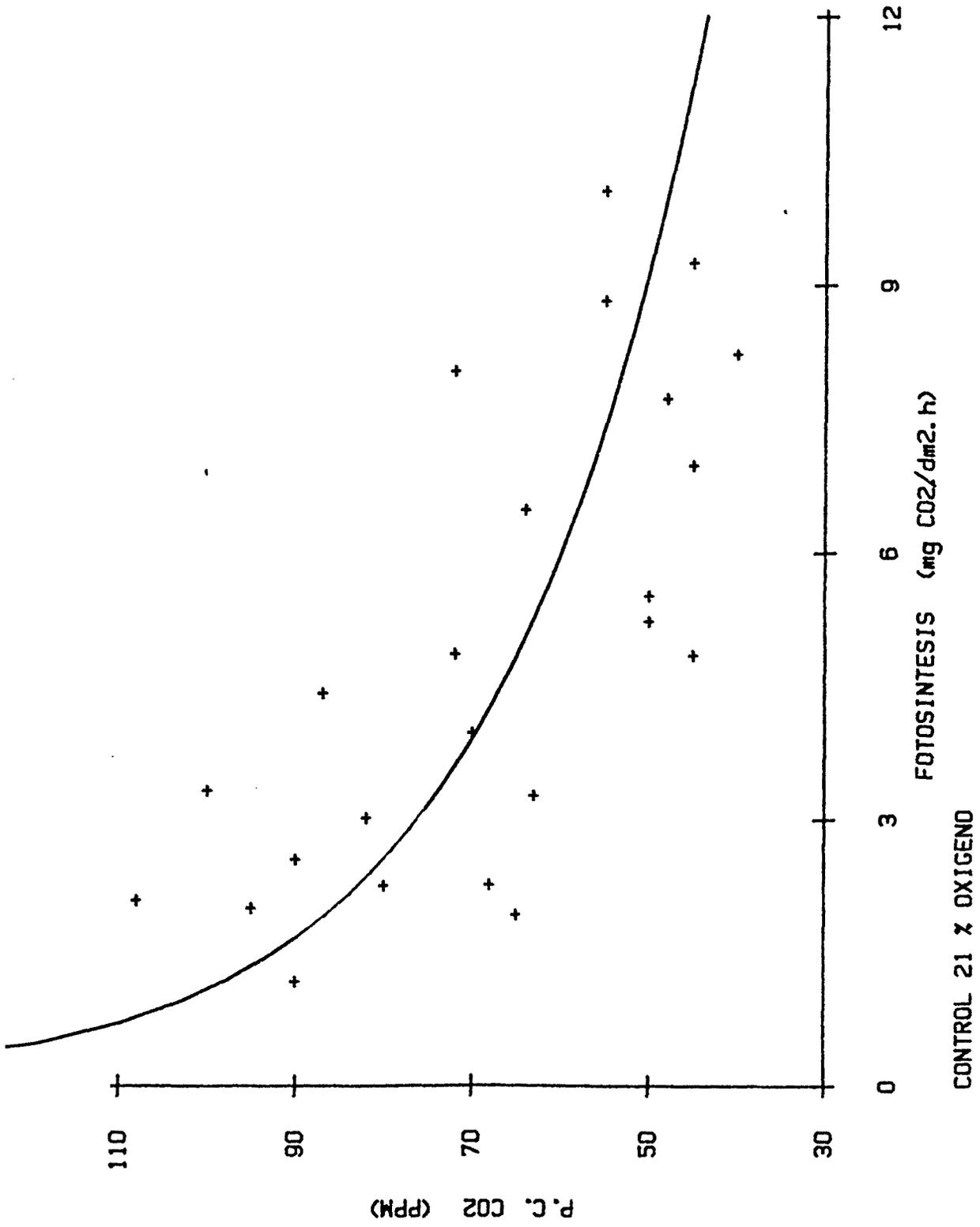
(ver figura Pag. 149)

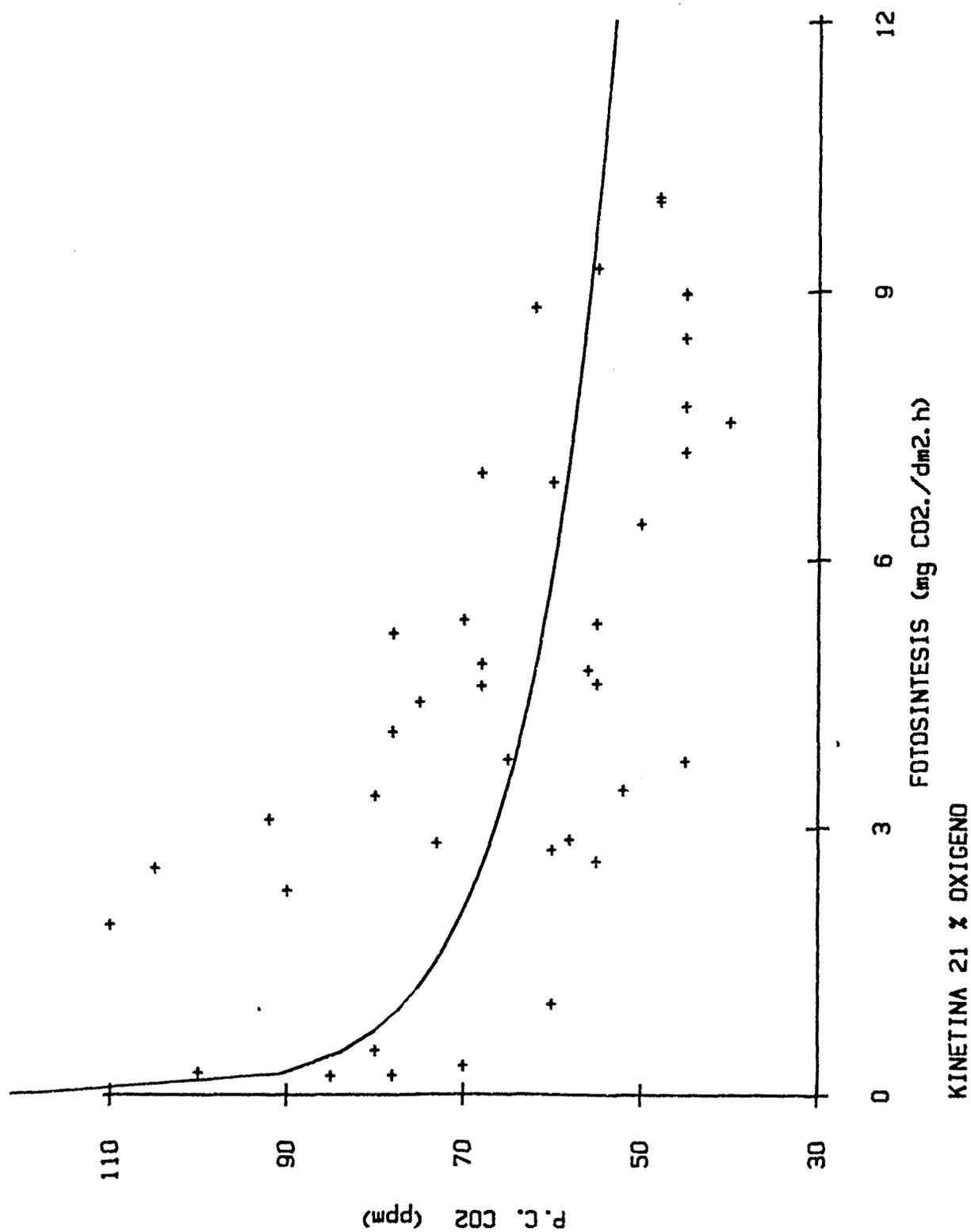
- Pn - P.C. CO₂ al 2,5% O₂ en hojas control :
 $\bar{y} = 53,397 - 14,17 \log x \quad (r = - 0,70; \quad p < 0,001)$

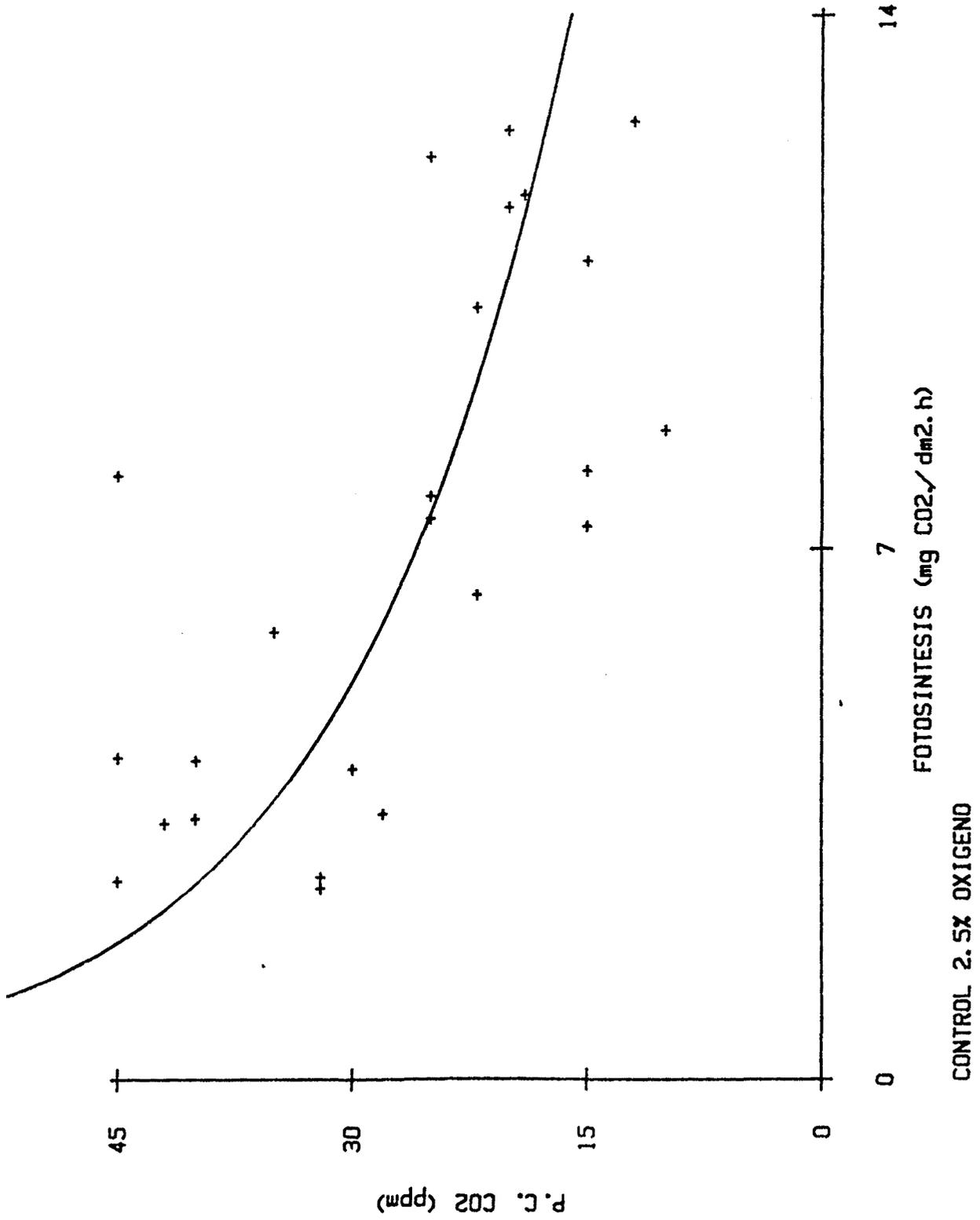
(ver figura Pag 150)

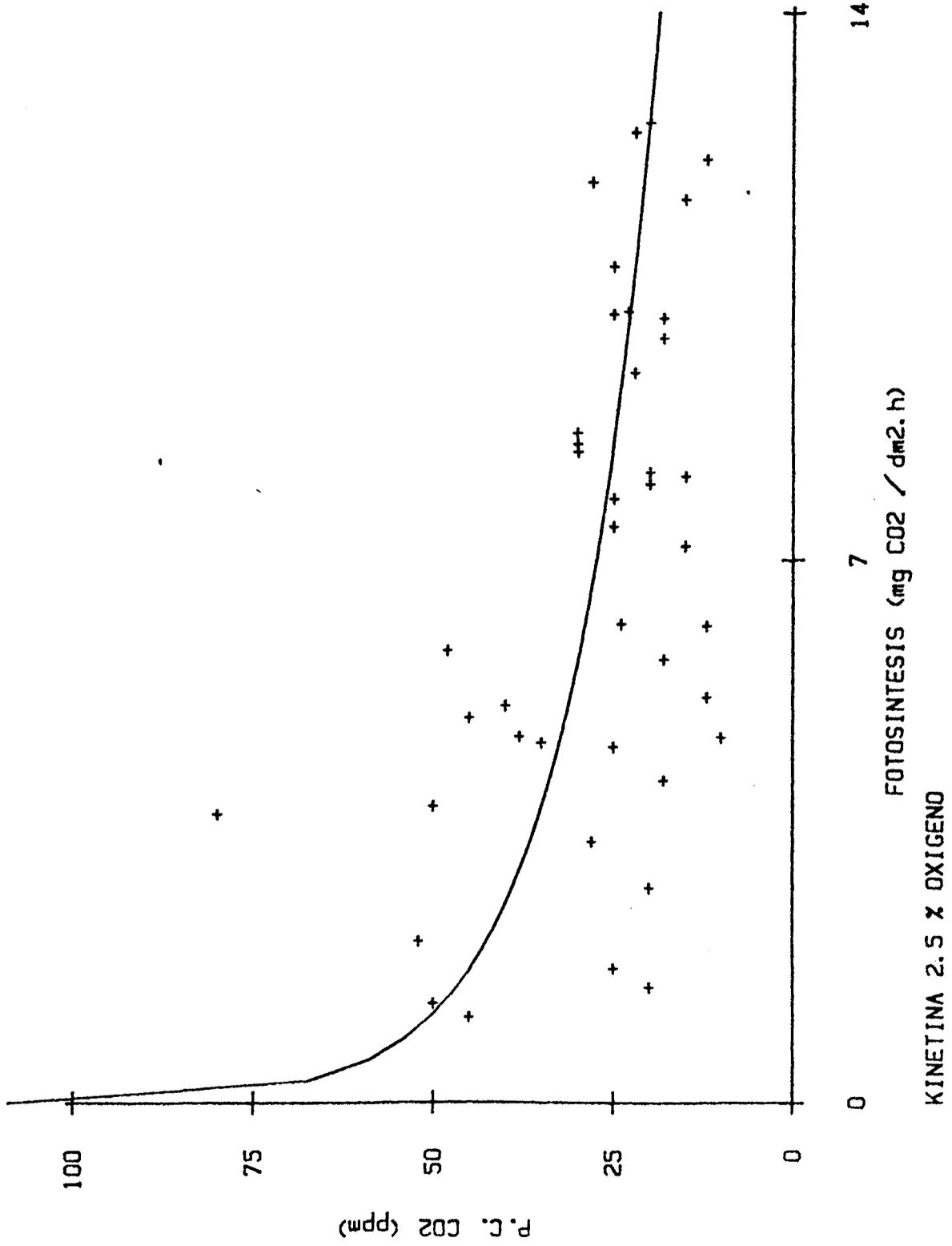
- Pn - P.C. CO₂ al 2,5% O₂ en hojas con kinetina :
 $\bar{y} = 51,532 - 12,464 \log x \quad (r = 0,39; \quad p < 0,01)$

(ver figura Pag 151)









Asimismo, se realizó la correlación entre los parámetros : fotosíntesis neta y P.C.CO₂ tomando como valores, pares de puntos deducidos a partir de las ecuaciones teóricas de ambas variables :

ECUACIONES TEORICAS

- Tratamiento control :

Fotosíntesis (mg CO₂ dm⁻².h⁻¹)

$$21\% O_2: y = 8,116 - 1,06 px \quad (r = - 0,94)$$

$$2,5\% O_2 : y = 11,376 - 1,419 x \quad (r = - 0,96)$$

P.C.CO₂ (ppm)

$$21\% O_2 \quad y = 47,47 e^{0,11x} \quad (r = 0,85)$$

$$2,5\% O_2 \quad y = 17,8 e^{13x} \quad (r = 0,67)$$

- Tratamiento con kinetina :

Fotosíntesis (mg CO₂. dm⁻².h⁻¹)

$$21\% O_2 y = 8,121 - 0,579 x \quad (r = -0,10)$$

$$2,5\% O_2 y = 10,769 - 0,675 x \quad (r = -0,88)$$

P.C.CO₂ (ppm)

$$21\% O_2 \quad y = 45,60 e^{0,06x} \quad (r = 0,79)$$

$$2,5\% O_2 \quad y = 16,35 e^{0,08x} \quad (r = 0,60)$$

Correlaciones :

Los mejores ajustes se obtuvieron a ecuaciones logarítmicas (Pag. 153, 154, 155, 156)

Tratamiento hormonal :

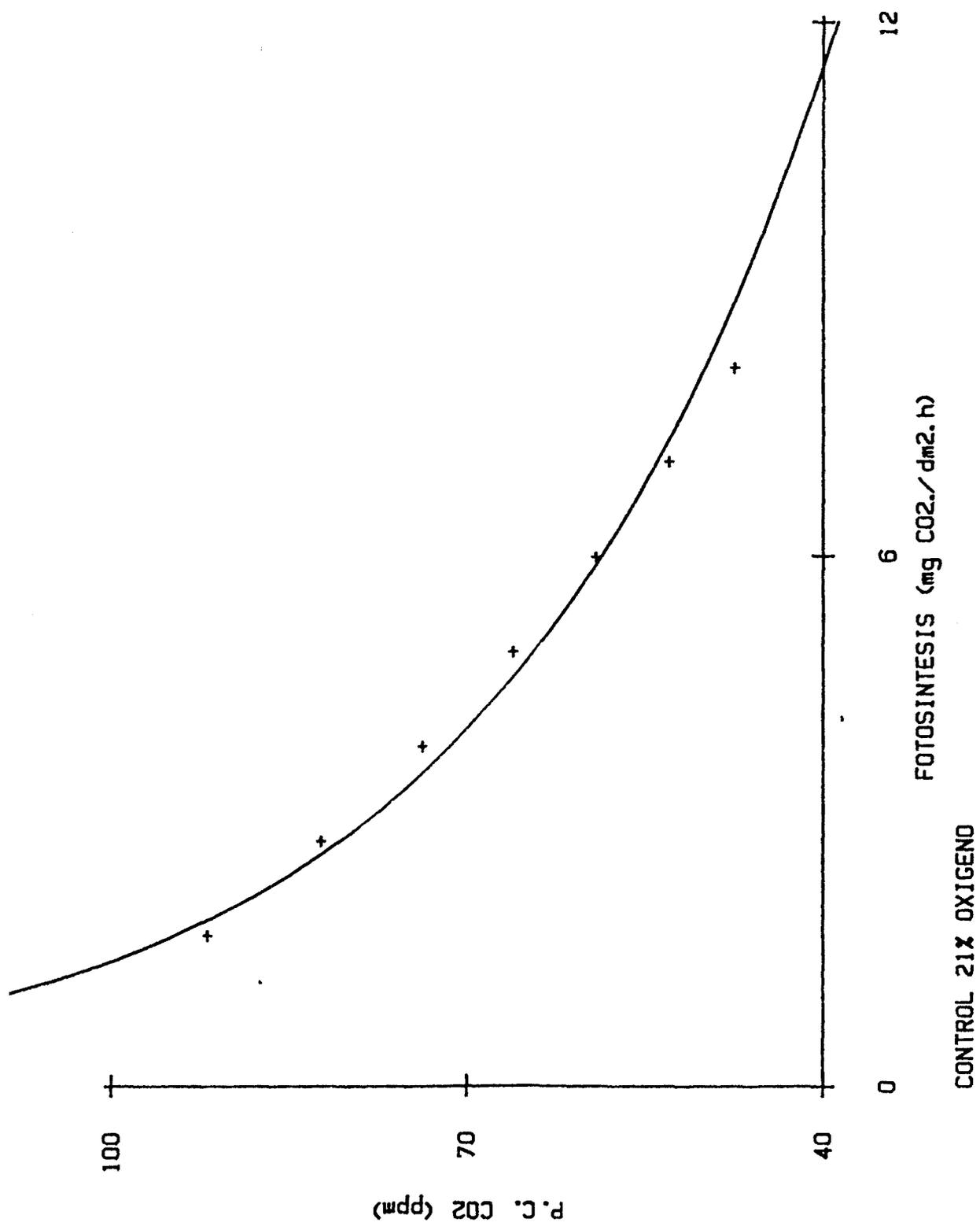
$$21\% O_2 \quad y = 101,495 - 25,036 \log x \quad (r = -0,18)$$

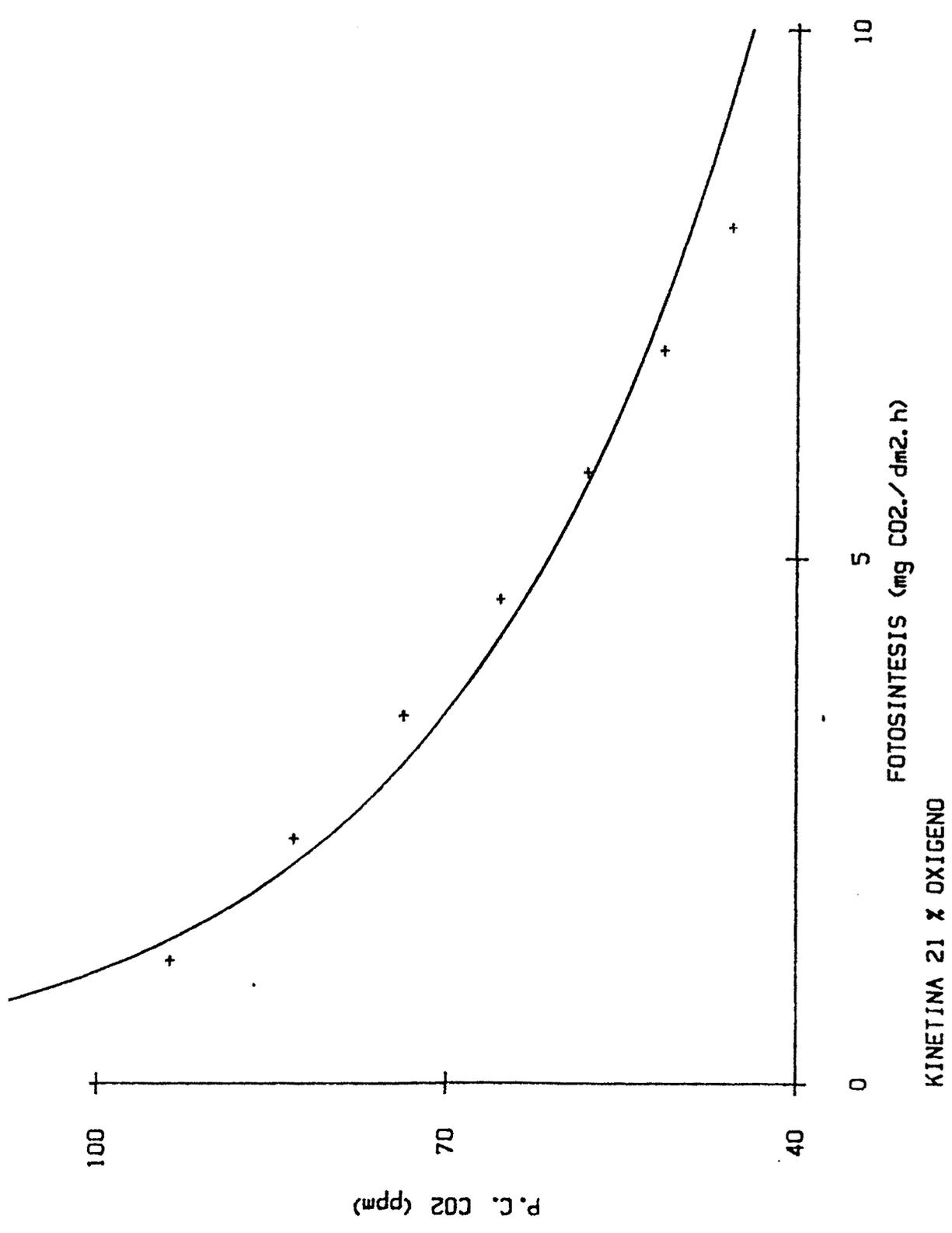
$$2,5\% O_2 \quad y = 62,409 - 19,127 \log x \quad (r = -1,00)$$

Tratamiento control :

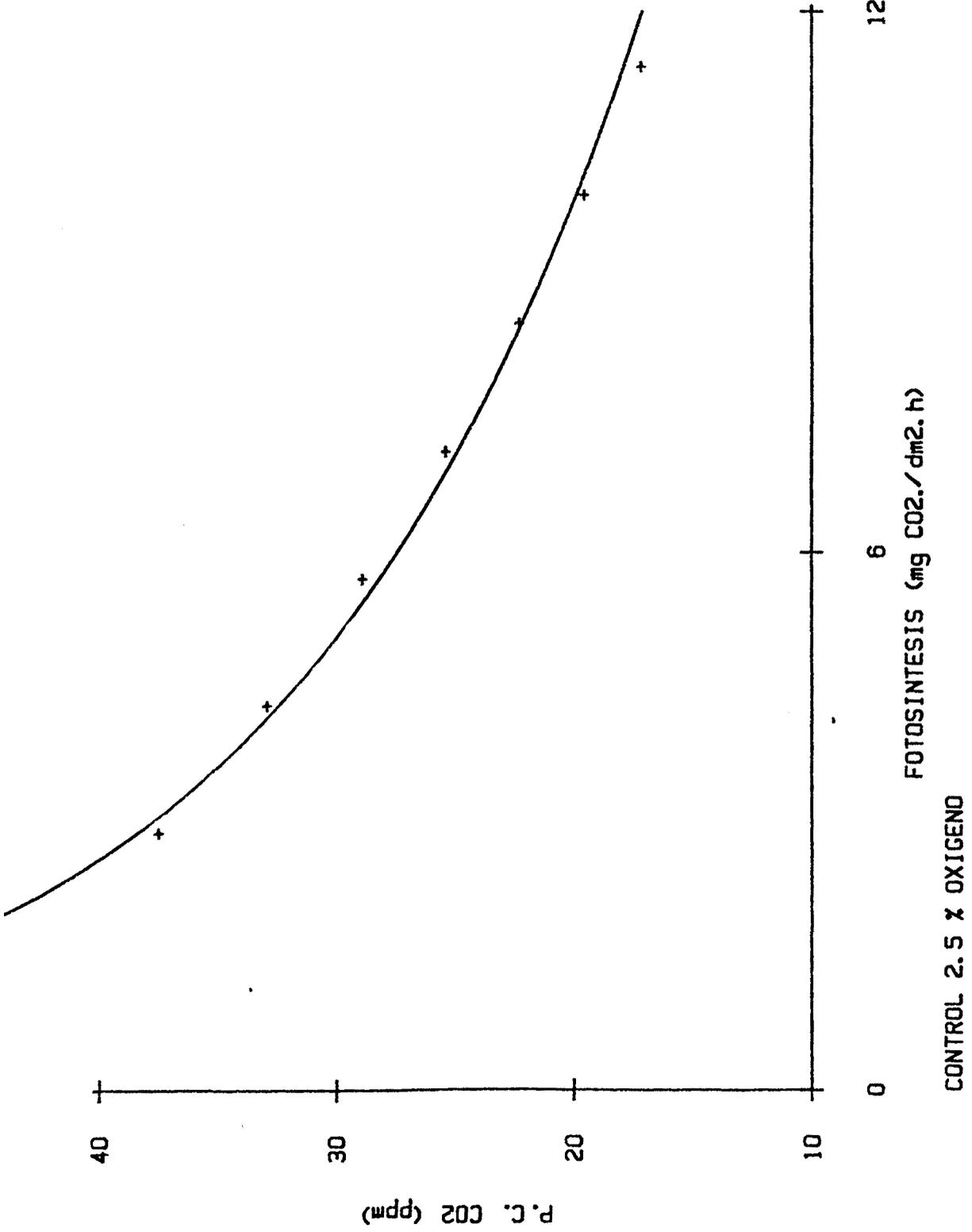
$$21\% O_2 \quad y = 109,829 - 28,612 \log x \quad (r = -0,99)$$

$$2,5\% O_2 \quad y = 54,058 - 14,879 \log x \quad (r = -1,00)$$

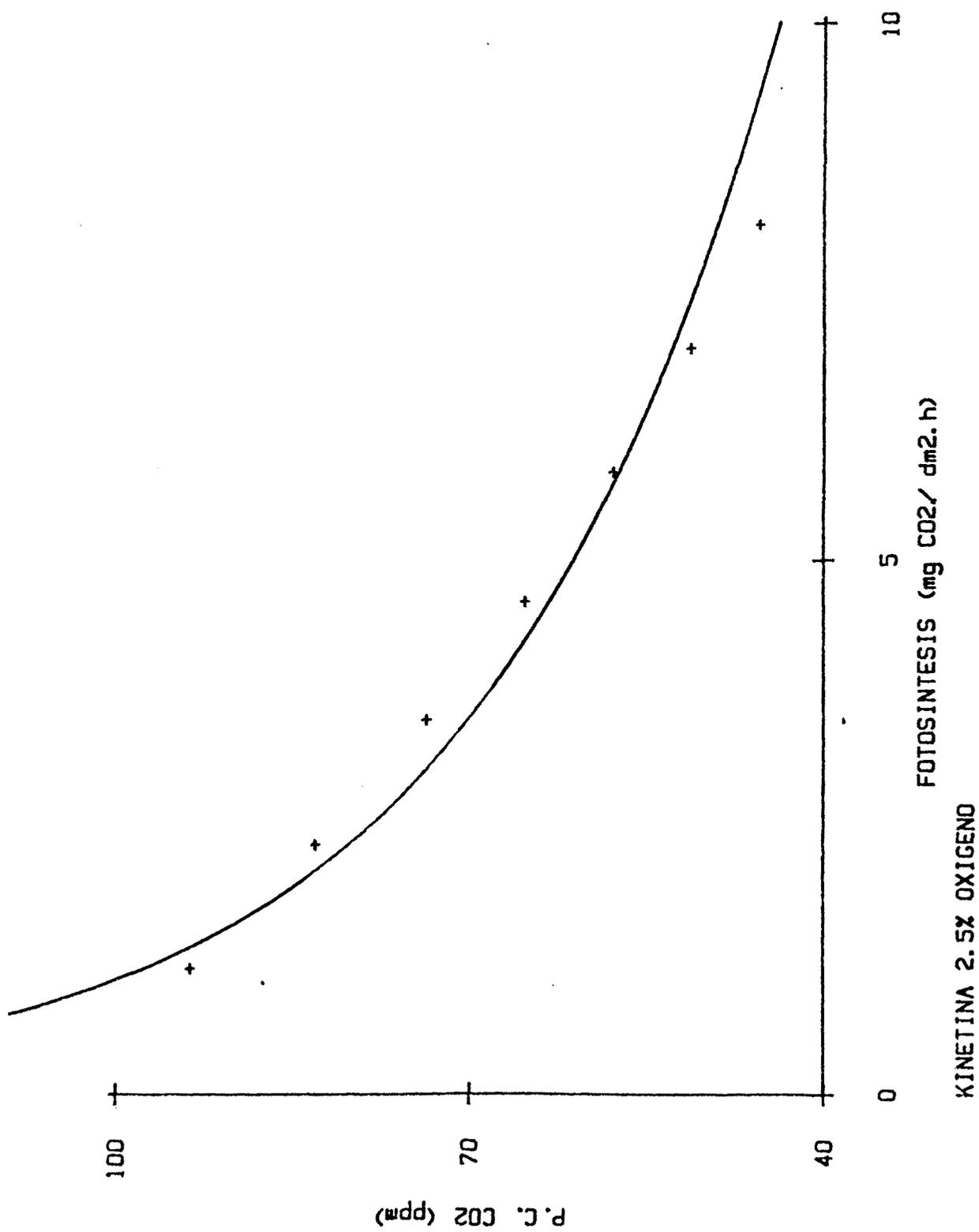




KINETINA 21 % OXIGENO



CONTROL 2.5 % OXIGENO



3.1.3.5.- RELACION DEL P.C.CO₂ CON LA CONCENTRACION DE OXIGENO

Considerando que el P.C.CO₂ (\bar{Y}) depende linealmente de la concentración ambiental de O₂ (Forrester et al 1966) a partir de la ecuación $\bar{Y} = \bar{Y}_0 + \gamma [O_2]$ se obtuvo :

CONTROL

DIA 0 $Y = 14,33 + 1,64X$

DIA 2 $Y = 16,93 + 1,90X$

DIA 4 $Y = 26,78 + 2,32X$

DIA 6 $Y = 29,51 + 2,92X$

(figura Pag. 158)

KINETINA

DIA 0 $Y = 15,78 + 1,59X$

DIA 2 $Y = 17,09 + 1,48X$

DIA 4 $Y = 15,23 + 2,14X$

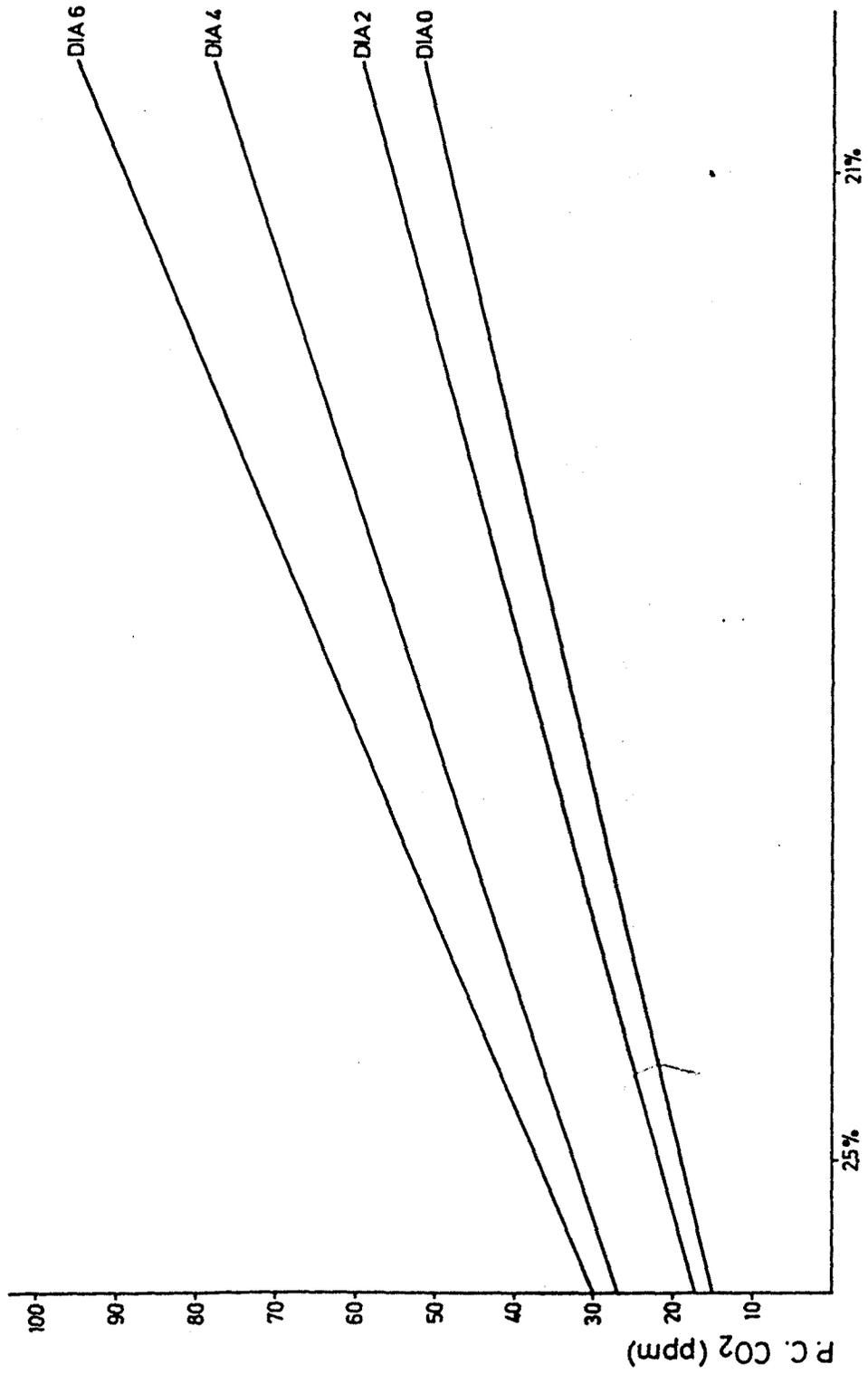
DIA 6 $Y = 19,79 + 2,28X$

DIA 8 $Y = 24,29 + 2,28X$

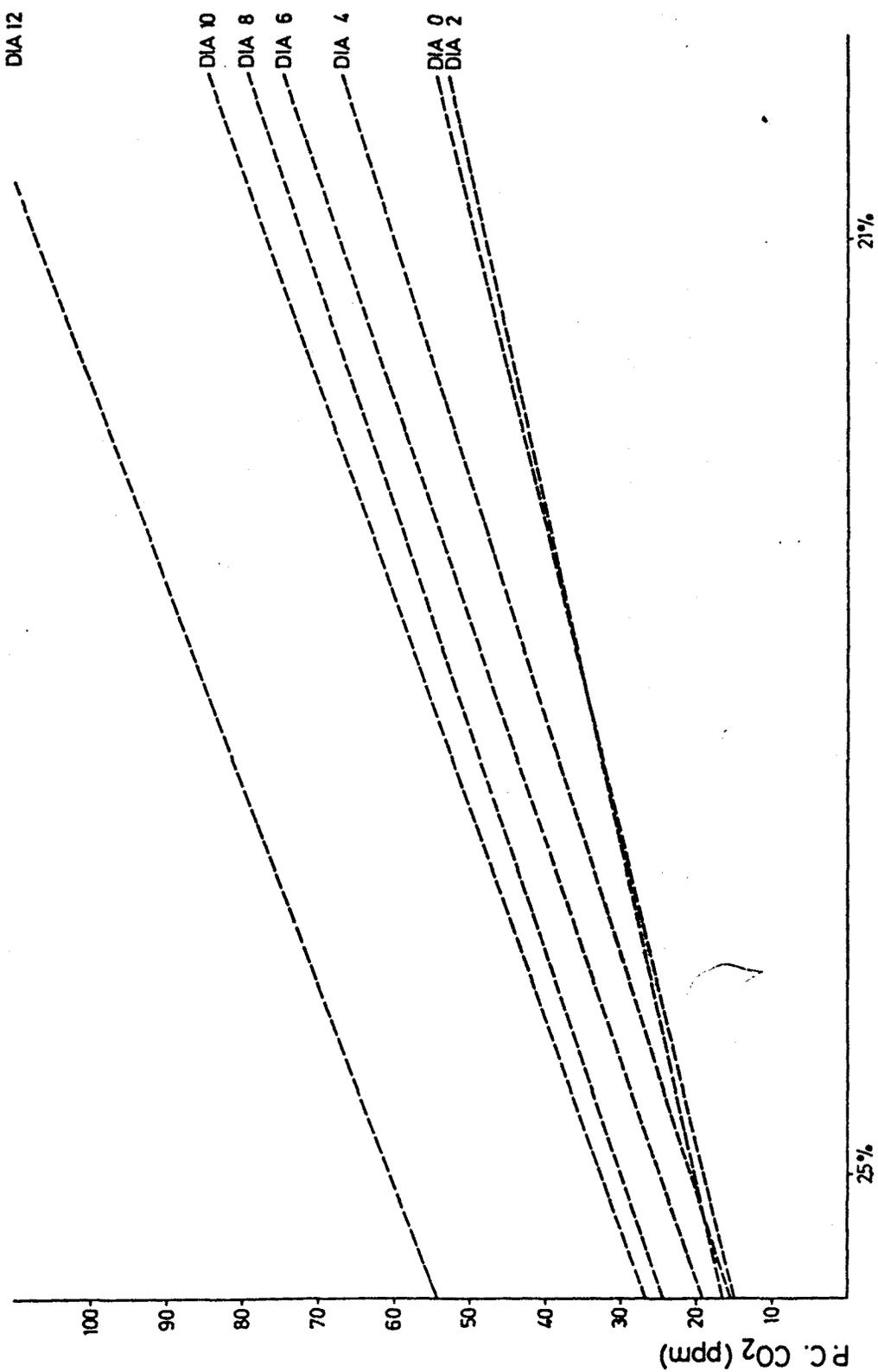
DIA 10 $Y = 26,89 + 2,41X$

DIA 12 $Y = 54,44 + 2,59X$

(figura Pag. 159)



CONCENTRACION O₂
HOJAS CONTROL



CONCENTRACION O₂
HOJAS CON KINETINA

Los parámetros ξ_0 y χ obtenidos, corresponden respectivamente a los componentes O_2 dependiente y O_2 independiente del punto de compensación de CO_2 .

CONTROL

DIA	ξ_0 (1 CO_2 / 1 aire)	χ (10^{-4} 1 CO_2 / 1 O_2)
0	14,33	1,64
2	16,93	1,90
4	26,78	2,32
6	29,51	2,92

KINETINA

DIA	ξ_0 (1 CO_2 / 1 aire)	χ (10^{-4} 1 CO_2 / 1 O_2)
0	15,78	1,59
2	17,09	1,48
4	15,23	2,14
6	19,79	2,28
8	24,29	2,28
10	26,89	2,41
12	54,44	2,59

(figuras Pag. 162)

Los ajustes polinómicos de γ a lo largo del tiempo dieron :

TRATAMIENTO CONTROL :

$$Y = 1,56 + 0,21X \quad (r = 0,98)$$

TRATAMIENTO CON KINETINA :

$$Y = 1,56 + 0,10X \quad (r = 0,92)$$

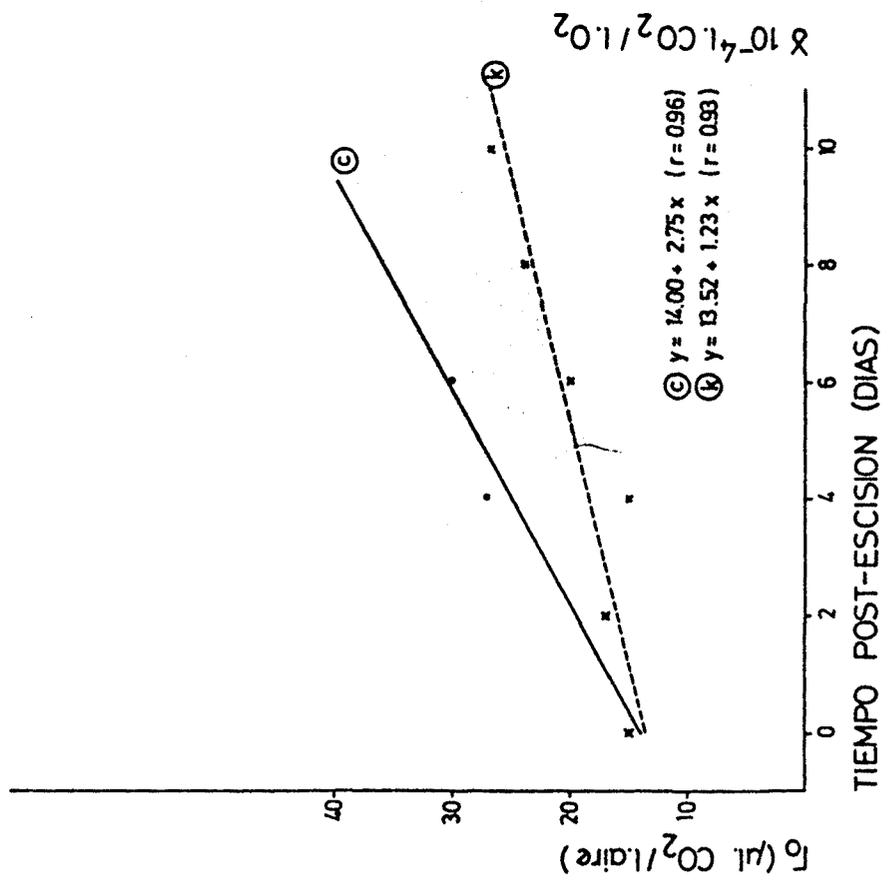
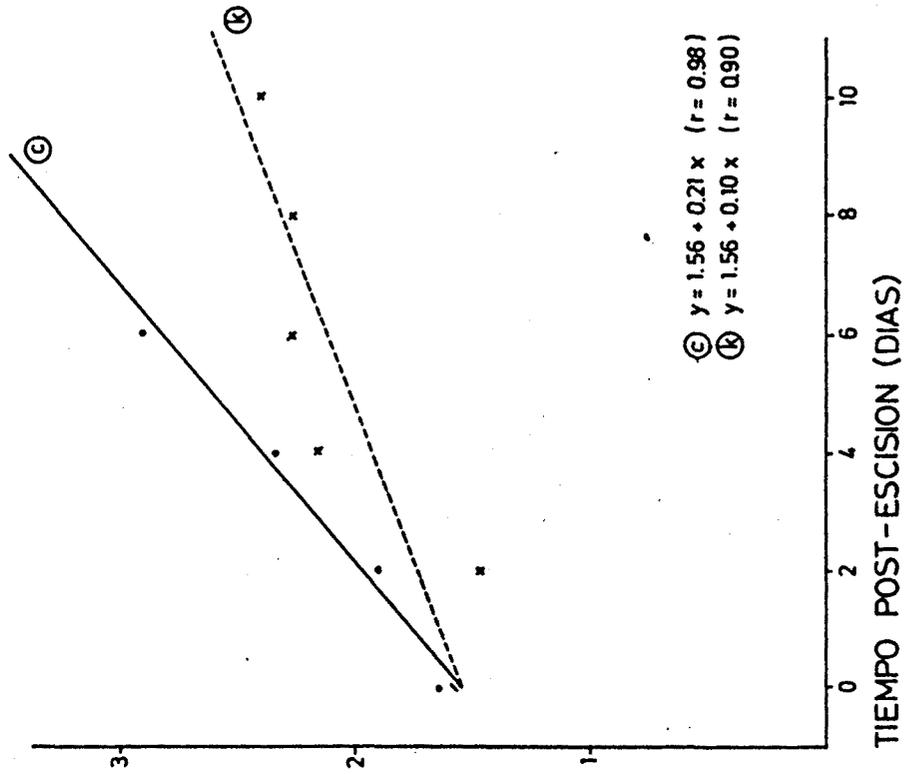
Los ajustes para fueron :

TRATAMIENTO CONTROL :

$$Y = 14,00 + 2,75X \quad (r = 0,96)$$

TRATAMIENTO CON KINETINA :

$$Y = 13,52 + 1,23X \quad (r = 0,93)$$



3.1.4.- VARIACIONES EN LA RESPIRACION DE OSCURIDAD (Rn) A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR

3.1.4.1.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA (10ppm)

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	RESPIRACION OSCURA (mg CO ₂ .dm ⁻² .h ⁻¹)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
0	-2,59	-1,63
0	-1,13	-1,18
0	-0,74	-0,86
0	-0,86	-
3	-1,64	-0,64
3	-1,36	-0,66
3	-0,59	-1,17
4	-1,74	-3,12
4	-0,65	-0,78
4	-0,74	-1,94
4	-0,96	-1,38
5	-2,75	-3,37
6	-0,68	-1,09
7	-1,31	-2,67

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	RESPIRACION OSCURA (Rn) (mg CO ₂ .dm ⁻² .h ⁻¹)	
	HOJAS CONTROL	HOJAS + KINETINA
7	-1,93	-0,65
8	-0,66	-0,59
8	-1,75	-1,45
8	-1,49	-0,66

Los ajustes de los resultados dieron como expresión :

CONTROL : $Y = - 1,25 - 0,01X$ $r = 0,02$

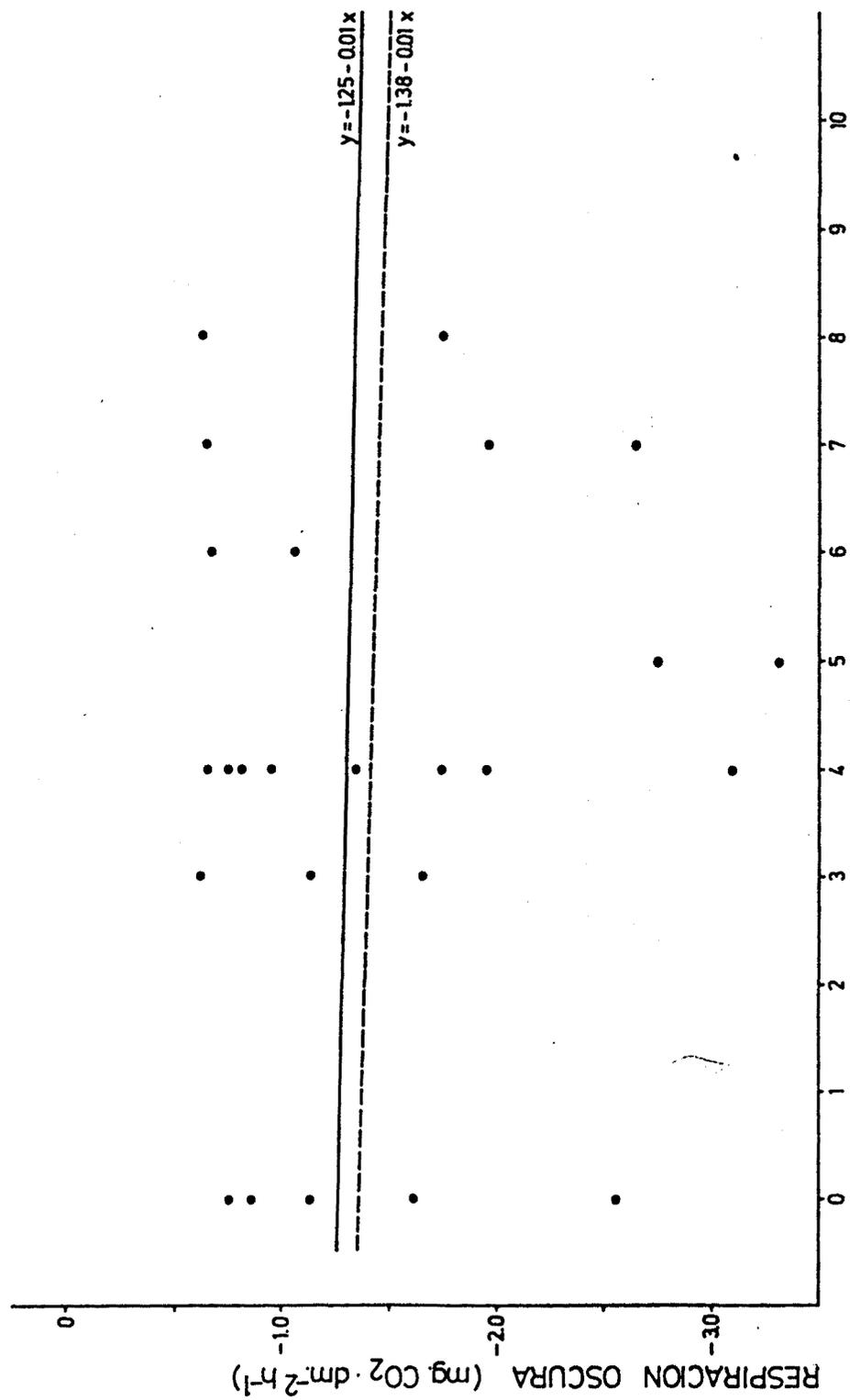
KINETINA : $Y = - 1,38 - 0,01X$ $r = 0,00$

(ver figuras Pag. 165)

Se realizó el test de la t de Student para observar si había diferencias entre los 2 tratamientos, obteniéndose :

$t = 0,3825$ (32 g.d.1) $p > 0,1$

Las diferencias no son significativas.



TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)
VARIACIONES EN RESPIRACION OSCURA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR

3.1.5.- VARIACIONES EN EL CONTENIDO EN CLOROFILA A, CLOROFILA B
CL A/ CL B ES D 430/ D 665 A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION
FOLIAR

3.1.5.1.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA (10ppm)

Clorofila a y clorofila b

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	TRATAMIENTO	CLOROFILA a mgxg.p.f ⁻¹	CLOROFILA b mgxg.p.f ⁻¹
0	control	1,62	0,36
0	"	1,98	0,97
0	"	2,36	0,67
0	"	2,18	0,40
0	"	2,07	0,52
0	"	1,96	0,42
0	"	1,66	0,36
0	"	1,84	0,40
0	"	2,59	0,59
1	control	1,78	0,38
1	"	1,40	0,34
1	"	1,76	0,44
1	kinetina	2,04	0,45
1	"	1,88	0,36

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	TRATAMIENTO	CLOROFILA a mgxg.p.f ⁻¹	CLOROFILA b mgxg.p.f ⁻¹
1	kinetina	1,95	0,41
4	control	1,03	0,18
4	"	0,86	0,13
4	"	1,15	0,22
4	"	1,01	0,22
4	"	0,82	0,18
4	"	0,81	0,20
4	"	0,85	0,31
4	"	0,94	0,19
4	"	0,76	0,16
4	kinetina 10ppm	1,02	0,21
4	"	1,18	0,24
4	"	1,04	0,22
4	"	1,66	0,37
4	"	1,71	0,38
4	"	1,55	0,32
4	"	1,35	0,32
4	"	1,44	0,32

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	TRATAMIENTO	CLOROFILAa mgxg.p.f ⁻¹	CLOROFILA b mgxg.p.f ⁻¹
4	kinetina 10ppm	1,35	0,28
8	control	0,16	0,07
8	"	0,13	0,02
8	"	0,11	0,02
8	"	0,60	0,17
8	"	0,36	0,12
8	"	0,42	0,12
8	"	0,17	0,08
8	"	0,24	0,08
8	"	0,33	0,15
8	kinetina	0,35	0,20
8	"	0,20	0,05
8	"	0,52	0,08
8	"	0,72	0,13
8	"	1,38	0,30
8	"	1,47	0,33
8	"	0,97	0,22
8	"	0,97	0,22

C1 a / C1 b	y	D 430 / D 665		
TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	TRATAMIENTO	C1 a/ C1 b	D 430/ D 665	
0	control	4,51	1,98	
0	"	5,07	1,94	
0	"	3,52	1,73	
0	"	5,46	1,96	
0	"	3,98	1,97	
0	"	4,66	1,96	
0	"	4,60	2,19	
0	"	4,60	2,03	
0	"	4,39	1,96	
1	control	4,67	1,98	
1	"	4,13	1,55	
1	"	4,00	1,92	
1	kinetina	4,52	2,00	
1	"	5,21	1,89	
1	"	4,76	1,97	
4	control	5,73	1,80	
4	"	6,58	1,75	

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	TRATAMIENTO	C1 a/ C1 b	D 430/ D665
4	control	5,24	1,78
4	"	4,60	2,19
4	"	4,56	2,43
4	"	4,06	2,32
4	"	2,75	2,45
4	"	4,93	2,54
4	"	4,75	2,50
4	kinetina	4,88	1,80
4	"	4,93	1,76
4	"	4,71	1,82
4	"	4,48	2,00
4	"	4,05	2,00
4	"	4,85	1,83
4	"	4,23	2,13
4	"	4,49	2,16
4	"	4,81	2,13
8	control	2,39	5,93

TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)	TRATAMIENTO	C1a/ C1b	D 430/ D665
8	control	6,50	5,42
8	"	5,50	7,40
8	"	3,55	3,05
8	"	3,00	4,38
8	"	3,53	4,60
8	"	2,10	6,33
8	"	2,95	7,48
8	"	2,21	4,33
8	kinetina	1,75	3,55
8	"	3,92	5,49
8	"	6,45	3,00
8	"	5,53	2,76
8	"	4,60	2,30
8	"	4,45	2,20
8	"	4,42	2,41
8	"	4,42	2,71

HOJAS CONTROL

TIEMPO POST-ESCISION (DIA)	Cl a mg.p.p.f ⁻¹		Cl b mg.p.p.p.f ⁻¹		Cl a / CL b		D 430 / D 665					
	\bar{X}	se	\bar{X}	se	\bar{X}	s	\bar{X}	s				
0	2,03	0,32	0,11	0,52	0,20	0,07	4,53	0,56	0,19	1,97	0,12	0,04
1	1,65	0,21	0,12	0,39	0,05	0,03	4,26	0,36	0,21	1,82	0,23	0,13
4	0,91	0,13	0,04	0,20	0,05	0,02	4,80	1,07	0,36	2,20	0,33	0,11
8	0,28	0,16	0,05	0,09	0,05	0,02	3,53	1,52	0,51	5,44	1,49	0,50

HOJAS + KINETINA 10ppm

TIEMPO POST-ESCISION (DIA)	C.l a mg.p.p.f ⁻¹		C.l b mg.p.p.p.f ⁻¹		C.l a / C.l b		D 430 / D 665	
	\bar{X}	se	\bar{X}	se	\bar{X}	s	\bar{X}	s
1	1,96	0,08	0,41	0,08	4,83	0,35	1,95	0,04
4	1,37	0,25	0,30	0,06	4,60	0,31	1,96	0,16
8	0,82	0,46	0,19	0,10	4,44	1,35	3,05	1,08

INCREMENTOS Y DECREMENTOS EN% RESPECTO AL DIA CERO:

CLOROFILA a

CONTROL

DIA 4 : 55,17%

DIA 8 : 86,21%

KINETINA

DIA 4 : 30,10%

DIA 8 : 58,16%

CLOROFILA b

CONTROL

DIA 4 : 61,54%

DIA 8 : 42,31%

KINETINA

DIA 4 : 82,69%

DIA 8 : 63,46%

Cl a / Cl b

CONTROL

DIA 4 : 5,96%

DIA 8 : 1,55%

KINETINA

DIA 4 : 22,08%

DIA 8 : 1,99%

D 430 / D 665

CONTROL

DIA 4 : 11,68%

DIA 8 : 0,01%

KINETINA

DIA 4 : 76,14%

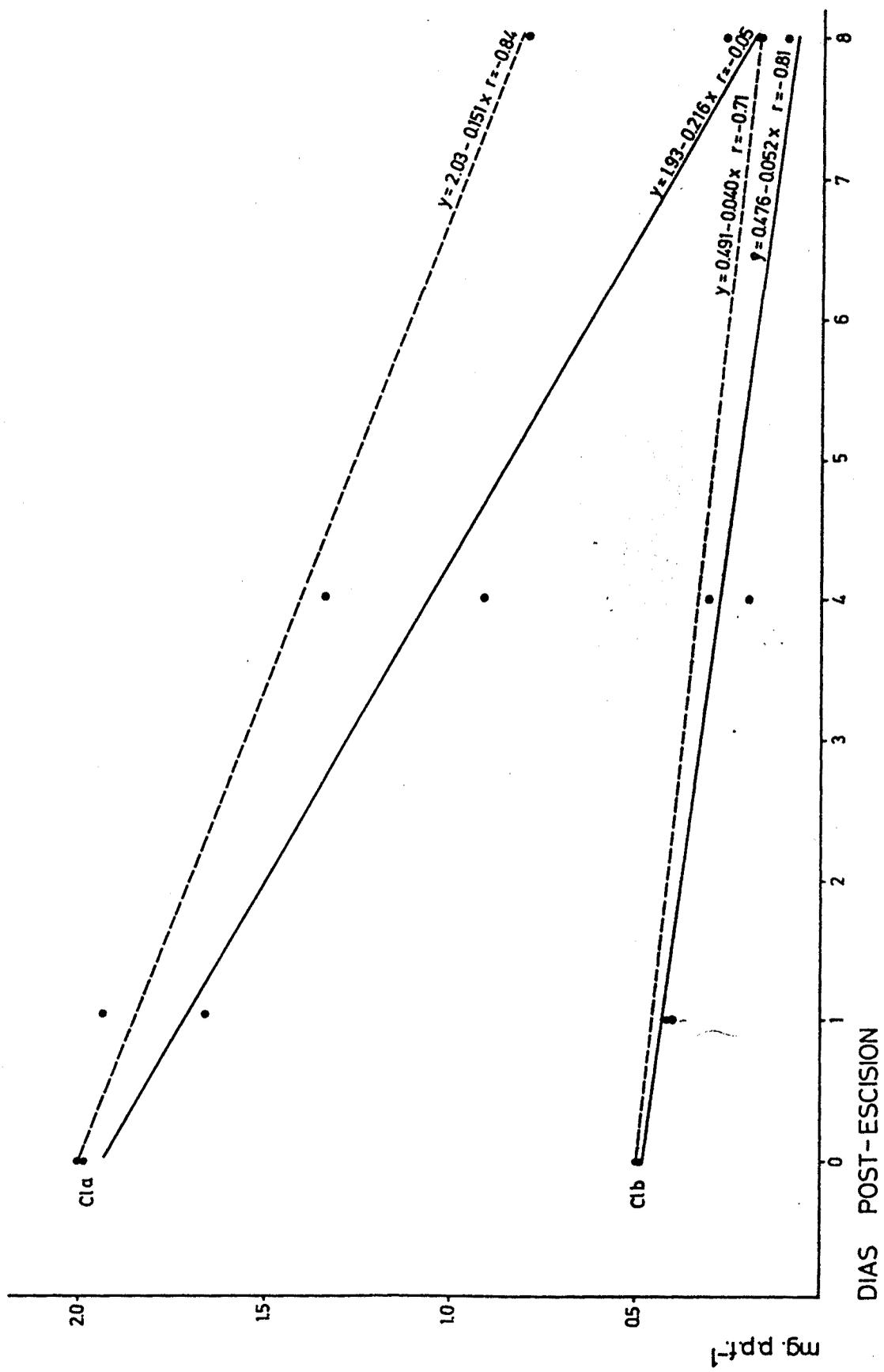
DIA 8 : 54,82%

LOS AJUSTES POLINOMICOS DE LOS DISTINTOS PARAMETROS A LO LARGO DEL TIEMPO DIERON :

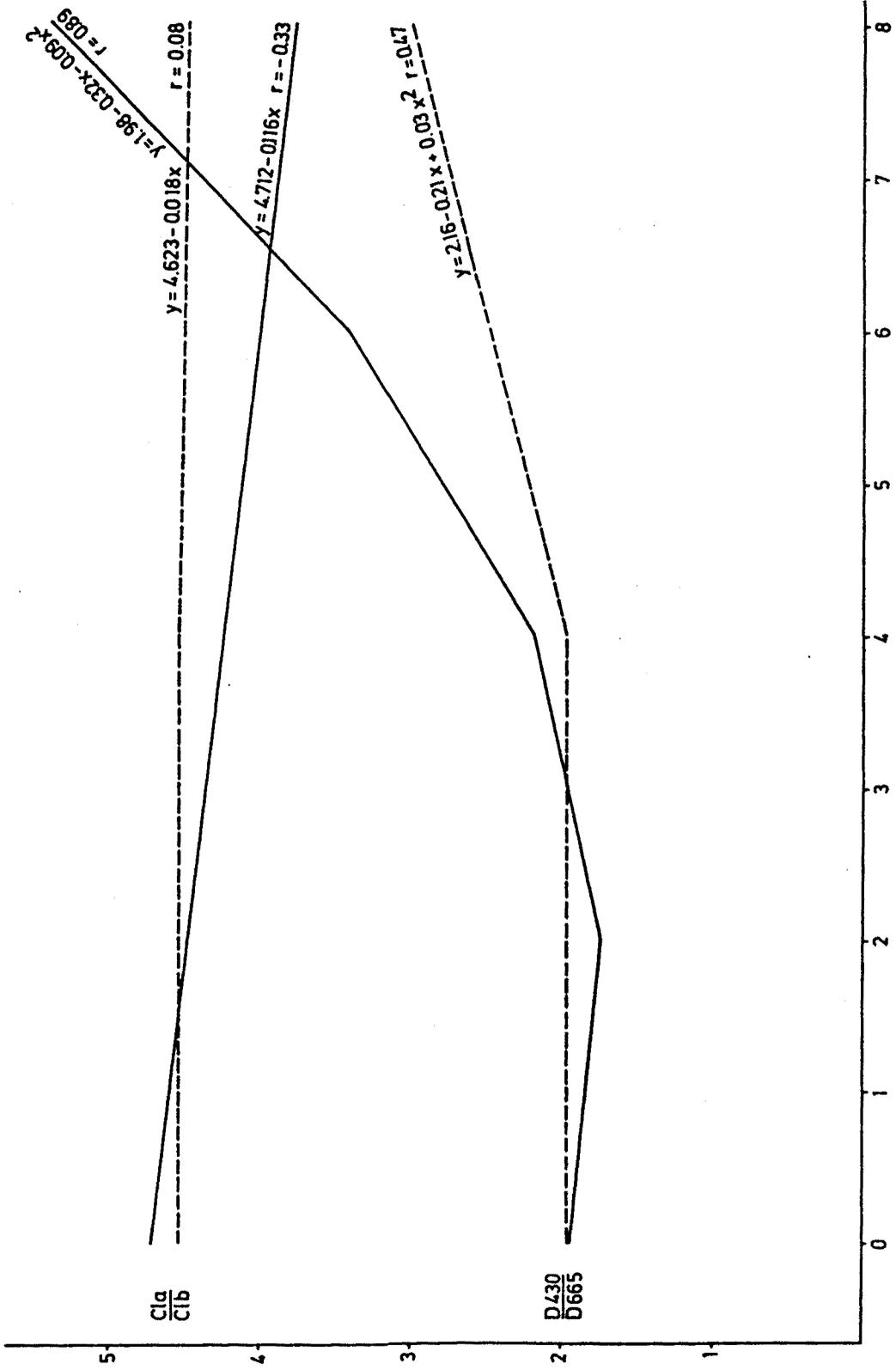
	TRATAMIENTO CONTROL	TRATAMIENTO CON KINETINA
clorofila a	$Y = 1,93 - 0,216X$ ($r = + 0,95$)	$Y = 2,025 - 0,151X$ ($r = - 0,84$)
clorofila b	$Y = 0,48 - 0,052X$ ($r = - 0,81$)	$Y = 0,491 - 0,040X$ ($r = - 0,714$)
C1 a / C1 b	$Y = 4,71 - 0,116X$ ($r = - 0,33$)	$Y = 4,62 - 0,018X$ ($r = - 0,08$)
D 430 / D 665	$Y = 1,98 - 0,32X - 0,09X^2$ ($r = 0,89$)	$Y = 2,16 - 0,21X + 0,03X^2$ ($r = 0,47$)

(figuras Pag. 176,177).





DIAS POST-ESCISION
 VARIACIONES EN EL CONTENIDO EN CLOROFILAS A Y B TRAS LA ESCISION FOLIAR. EFECTO DE LA KINETINA AJUSTE LINEAL. _____ CONTROL. ----- KINETINA.



DIAS POST-ESCISION
 VARIACIONES EN LOS INDICES C1a/C1b Y D430/D665 TRAS LA ESCISION FOLIAR. EFECTO DE LA KINETINA (10ppm). _____ CONTROL. - - - - - KINETINA.

TRATAMIENTO ESTADISTICO

Se realizó un análisis de la varianza de 2 vías (clasificación .
doble) para observar :

- a) Efecto del tiempo tras escisión
- b) Efecto del tratamiento con kinetina
- c) Interacción entre ambos factores (tiempo y tratamiento)

CLOROFILA a

Nº filas : 3 (días 0,4 y 8 post-escisión)

Nº columnas : 2 (control-kinetina)

Nº réplicas : 9 (por casilla)

Media fila 1 : 2,029

Media fila 2 : 1,141

Media fila 3 : 0,561

Media columna 1 : 1,074

Media columna 2 : 1,413

Media general : 1,244

ANALISIS DE LA VARIANZA

	G.d.l.	ss	ms	F
TOTAL	53	26,0		
FILAS	2	19,7	9,8	119,6
COLUMNAS	1	1,5	1,5	18,8
F X C	2	0,8	0,4	4,9
ERROR	48	3,9	0,1	

Efecto filas : F (2,48) $p < 0,01$ diferencias significativas
(días)

Efecto columnas (tratamiento) : F (1,48) p < 0,01 diferencias significativas

Interacción : f (2,48) p < 0,01 diferencias significativas

CLOROFILA b

Nº filas : 3 (días 0,4 y 8 post-escisión)

Nº columnas : 2 (control-kinetina)

Nº réplicas : 9 (por casilla)

Media fila 1 : 0,521

Media fila 2: 0,247

Media fila 3 : 0,142

Media columna 1 : 0,271

Media columna 2 : 0,336

Media general : 0,304

ANALISIS DE LA VARIANZA

	G.d.l.	ss	ms	F
TOTAL	53	2,2		
FILAS	2	1,4	0,7	42,3
COLUMNAS	1	0,1	0,0	3,6
F x C	2	0,0	0,0	0,9
ERROR	48	0,8	0,0	

Efecto filas (días) : F (2,48) p < 0,01 diferencias significativas

Efecto columnas (tratamiento) : F (1,48) p > 0,05 diferencias no significativas

Interacción : F (2,48) $p > 0,05$ diferencias no significativas

INDICE C1 a / C1 b

Nº filas : 3 (días 0,4 y 8 post-escisión)

Nº columnas : 2 (control-kinetina)

Nº réplicas : 9 (por casilla)

Media fila 1 : 4,532

Media fila 2 : 4,702

Media fila 3 : 4,015

Media columna 1 : 4,286

Media columna 2 : 4,547

Media general : 4,416

ANALISIS DE LA VARIANZA

	G.d.l.	ss	ms	F
TOTAL	53	55,5		
FILAS	2	4,6	2,3	2,4
COLUMNAS	1	0,9	0,9	1,0
F x C	2	3,6	1,8	1,8
ERROR	48	46,4	1,0	

Efecto filas (días) : F (2,48) $p > 0,05$ diferencias no significativas

Efecto columnas (tratamiento) : F (1,48) $p > 0,05$ diferencias no significativas

Interacción : F (2,48) $p > 0,05$ diferencias no significativas

INDICE D 430 / D 665

Nº filas : 3 (días 0,4 y 8 post-escisión)

Nº columnas : 2 (control-kinetina)

Nº réplicas : 9 (por casilla)

Media fila 1 : 1,969

Media fila 2 : 2,077

Media fila 3 : 4,241

Media columna 1 : 3,200

Media columna 2 : 2,325

Media general : 2,762

ANALISIS DE LA VARIANZA

	G.d.l.	ss	ms	F
TOTAL	53	112,3		
FILAS	2	59,1	29,6	52,2
COLUMNAS	1	10,3	10,3	18,2
F x C	2	15,6	7,8	13,8
EROR	48	27,2	0,6	

Efecto filas (días) : F (2,48) $p < 0,01$ diferencias significativas

Efecto columnas (tratamiento) : F (1,48) $p < 0,01$ diferencias significativas

Interacción : F (2,48) $p < 0,01$ diferencias significativas

A continuación, se realizó el test "t" de Student para observar a partir de que día empezaban las diferencias, tanto a lo largo del tiempo, como entre tratamientos.

CLOROFILA a

Días 0 y 4 :

Control t = 9,66 (8g.d.1) p < 0,001 d.s

Kinetina t = 5,22 (8g.d.1) p < 0,002 d.s

Días 4 y 8 :

Control t = 8,33 (8g.d.1) p < 0,001 d.s

Kinetina t = 5,87 (8g.d.1) p < 0,01 d.s

Días 0 y 8

Control t = 16,92 (8g.d.1) p < 0,001 d.s

Kinetina t = 6,79 (8g.d.1) p < 0,001 d.s

CLOROFILA b

Días 0 y 4 :

Control t = 4,15 (9g.d.1) p < 0,01 d.s

Kinetina t = 2,90 (8g.d.1) p < 0,05 d.s

Días 4 y 8 :

Control t = 4,56 (8g.d.1) p < 0,02 d.s

Kinetina t = 3,97 (8g.d.1) p < 0,01 d.s

Días 0 y 8 :

Control t = 5,51 (8g.d.1) p < 0,001 d.s

Kinetina t = 3,67 (8g.d.1) p < 0,01 d.s

CLOROFILA a / CLOROFILA b

A pesar de no haberse encontrado diferencias mediante el análisis de la varianza, se realizaron test de "t" pues al ser de mayor potencia, se pueden comparar tramos pequeños de tiempo.

Días 0 y 4 :

Control t = -0,68 (8g.d.1) p > 0,1 n.s

Kinetina t = -0,64 (8g.d.1) p > 0,1 n.s

Días 4 y 8 :

Control $t = 3,228$ (8g.d.1) $p < 0,02$ d.s

Kinetina $t = 0,349$ (8g.d.1) $p > 0,1$ n.s

Días 0 y 8 :

Control $t = 1,866$ (8g.d.1) $p < 0,1$ d.s

Kinetina $t = 0,18$ (8g.d.1) $p > 0,1$ n.s

D 430 / D 665

Días 0 y 4 :

Control $t = -2,43$ (8g.d.1) $p < 0,05$ d.s

Kinetina $t = 0,37$ (8g.d.1) $p > 0,1$ n.s

Días 4 y 8 :

Control $t = -6,12$ (8g.d.1) $p < 0,001$ d.s

Kinetina $t = -2,99$ (8g.d.1) $p < 0,02$ d.s

Días 0 y 8 :

Control $t = -6,91$ (8g.d.1) $p < 0,001$ d.s

Kinetina $t = -3,13$ (8g.d.1) $p < 0,02$ d.s

Diferencias entre ambos tratamientos en periodos cortos de tiempo.

CLOROFILA a

Día 4 $t = -4,08$ (8g.d.1) $p < 0,01$ d.s

Día 8 $t = -4,32$ (8g.d.1) $p < 0,01$ d.s

CLOROFILA b

Día 4 $t = -4,25$ (8g.d.1) $p < 0,01$ d.s

Día 8 $t = -3,67$ (8g.d.1) $p < 0,01$ d.s

CL a / CL b

Día 4 $t = 0,65$ (8g.d.1) $p > 0,1$ n.s

Día 8 $t = -1,73$ (8g.d.1) $p > 0,1$ n.s

D 430 / D 665

Día 4 $t = 3,43$ (8g.d.1) $p < 0,01$ d.s

Día 8 $t = 4,15$ (8g.d.1) $p < 0,001$ d.s

3.1.5.2.- RELACION DE LAS CLOROFILAS A Y B CON LAS VARIACIONES FOTOSINTETICAS

Se compensaron los resultados de las tasas fotosintéticas obtenidas a lo largo del tiempo tras escisión foliar (apartado 3.1.2) con los niveles de clorofilas encontrados en el proceso de senescencia;

A lo largo del tiempo tras escisión foliar el descenso en Cl a Cl b y fotosíntesis tanto en hojas control como tratadas con kinetina 10ppm sigue ecuaciones

CLOROFILA A

Control	$Y = 1,93 - 0,216X$	$r = -0,95$
Kinetina	$Y = 2,03 - 0,151X$	$r = -0,84$

CLOROFILA B

Control	$Y = 0,476 - 0,052X$	$r = -0,81$
Kinetina	$Y = 0,491 - 0,040X$	$r = -0,71$

FOTOSINTESIS

Control	$Y = 8,116 - 1,069X$	$r = -0,94$
Kinetina	$Y = 8,121 - 0,579X$	$r = -0,90$

(figuras Pag. 187, 188)

Se realizaron test estadísticos para observar el grado de interdependencia de ambas variables (clorofila-fotosíntesis) obteniéndose :

TRATAMIENTO CONTROL

Clorofila A - Fotosíntesis

Recta de regresión : $Y = 0,227 + 0,216X$

Coefficiente de correlación : $r = 0,94$ ($p < 0,001$)

(figura Pag. 189)

Clorofila B - Fotosíntesis

Recta de regresión : $Y = 0,043 + 0,058X$

Coefficiente de correlación $r = 0,86$ ($p < 0,001$)

(figura Pag. 190)

TRATAMIENTO CON KINETINA

Clorofila A -Fotosíntesis

Recta de regresión $Y = 0,397 + 0,174X$

Coefficiente de correlación $r = 0,70$ ($p < 0,001$)

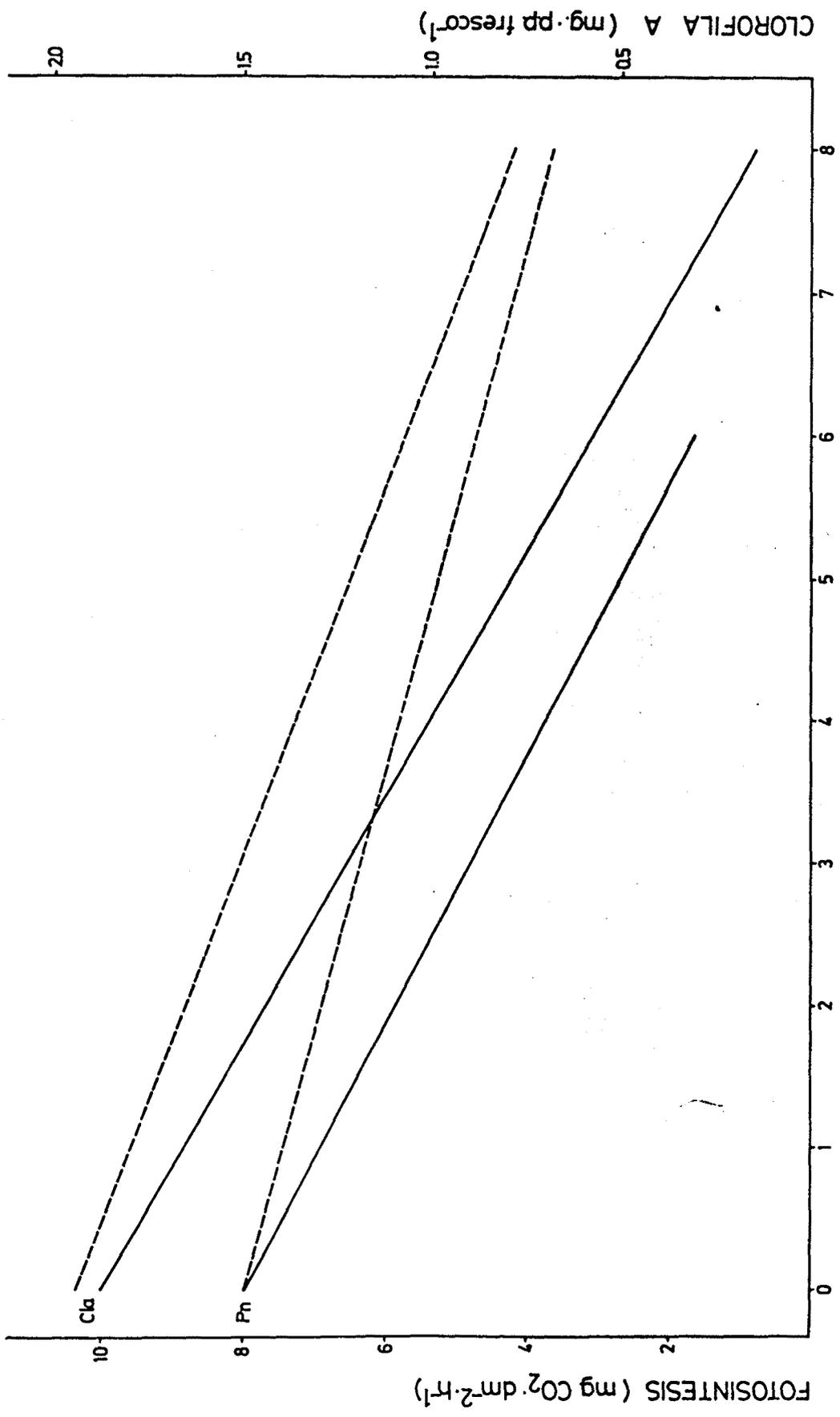
(figura Pag. 191)

Clorofila B - Fosíntesis

Recta de regresión $Y = 0,008 + 0,059X$

Coefficiente de correlación $r = 0,73$ ($p < 0,001$)

(figura Pag. 192)

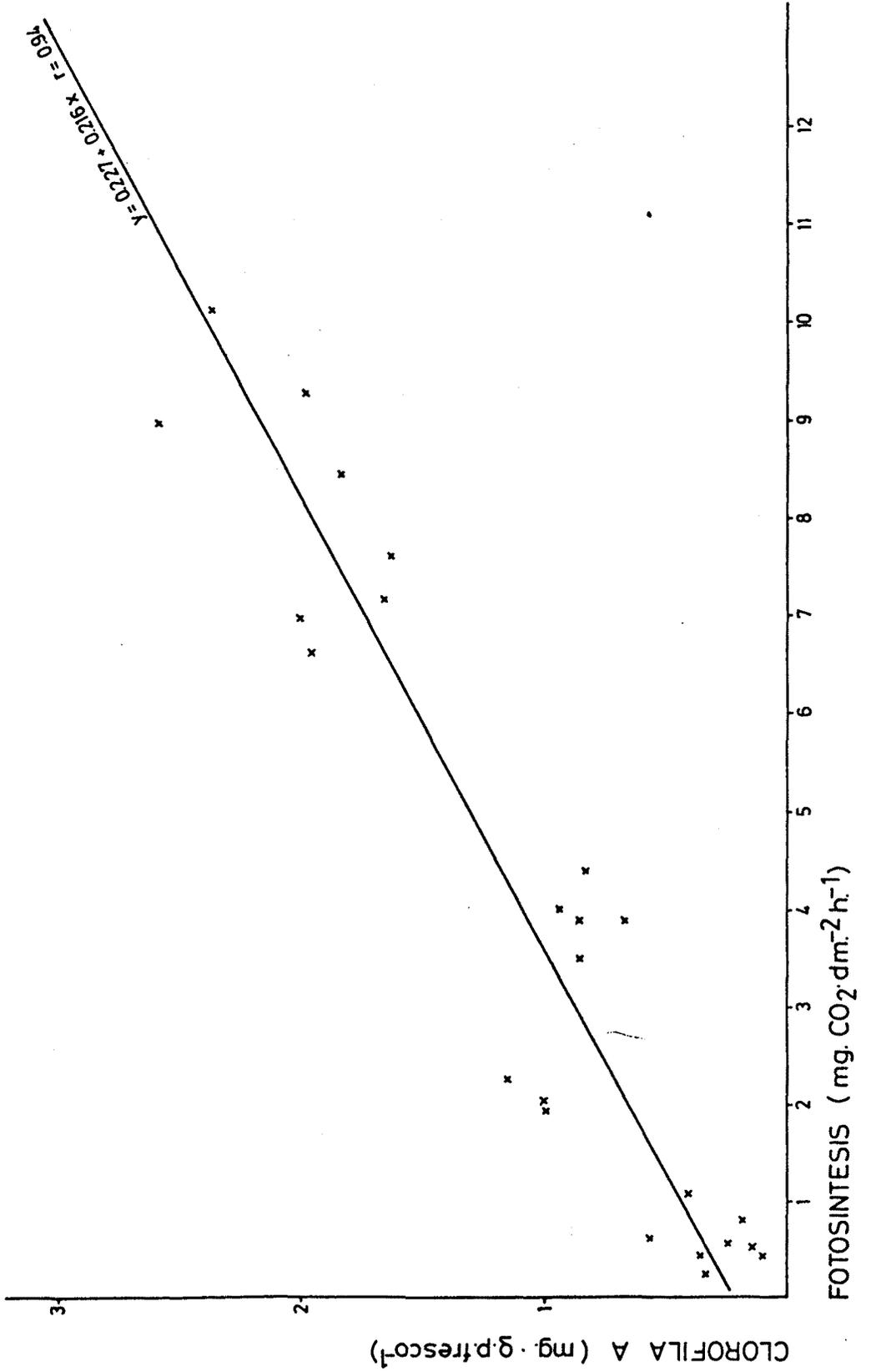


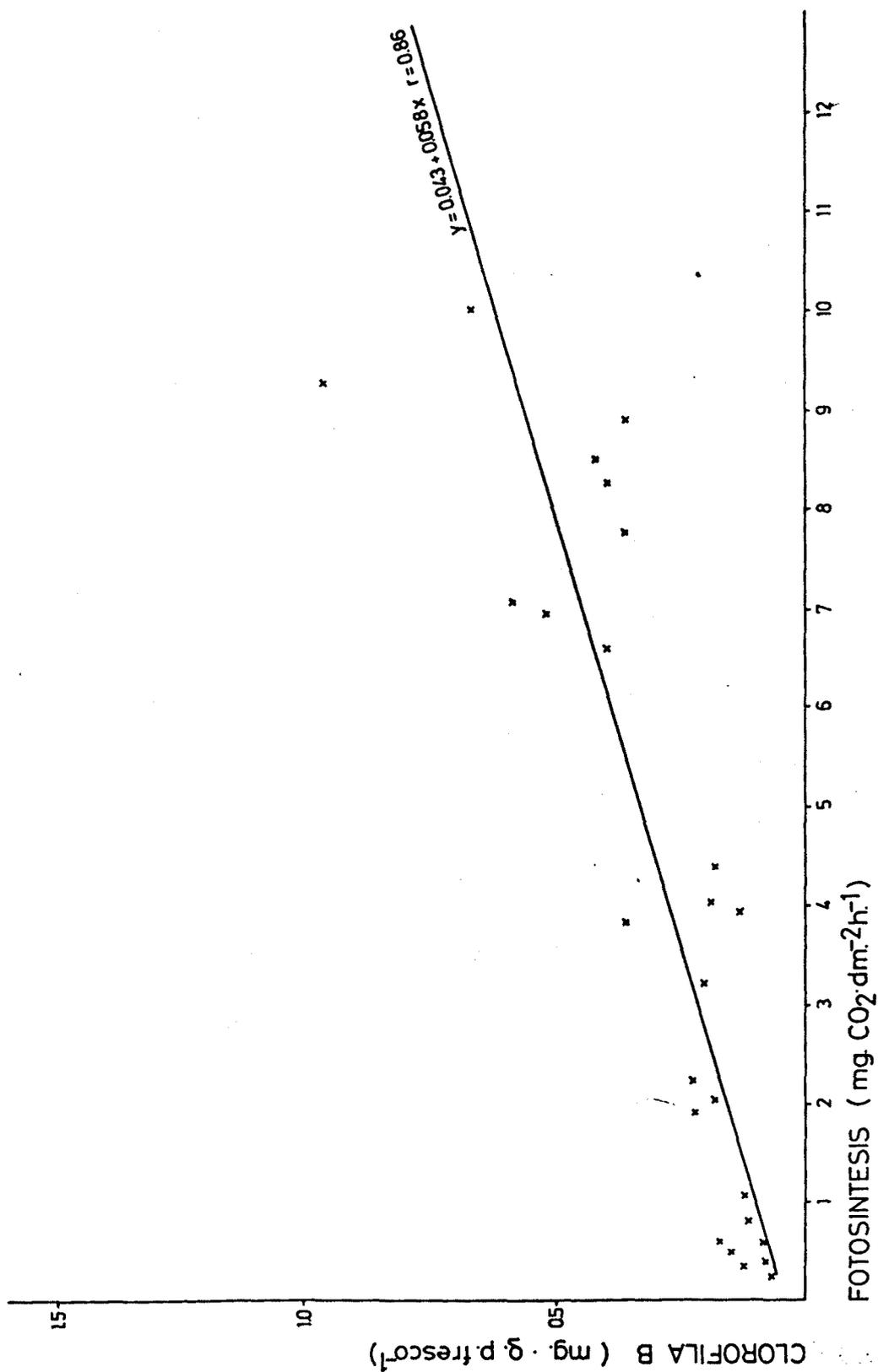
DIAS POST-ESCISION

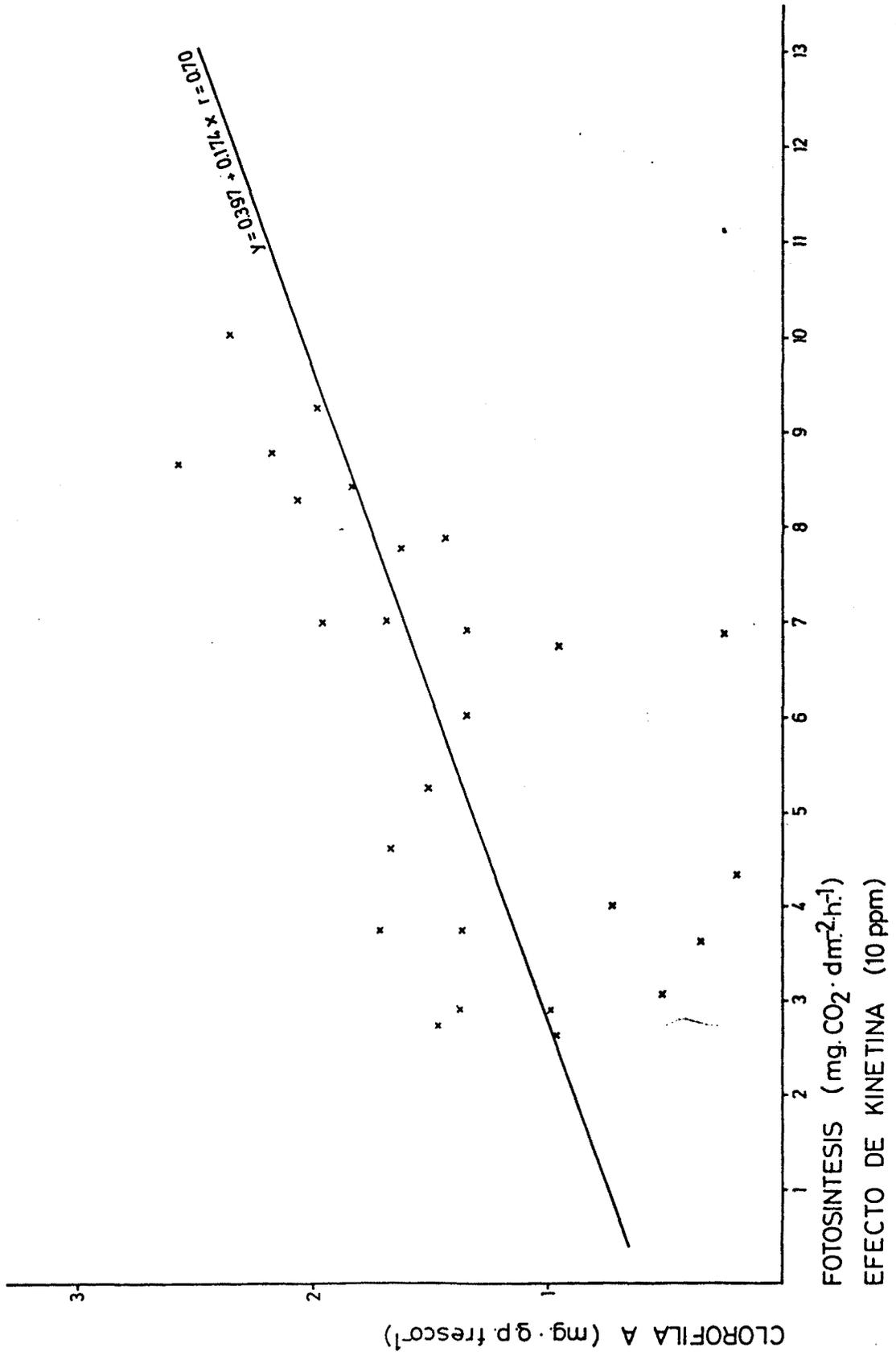
VARIACIONES EN CLOROFILA A Y FOTOSINTESIS TRAS ESCISION FOLIAR. — CONTROL. - - - KINETINA.

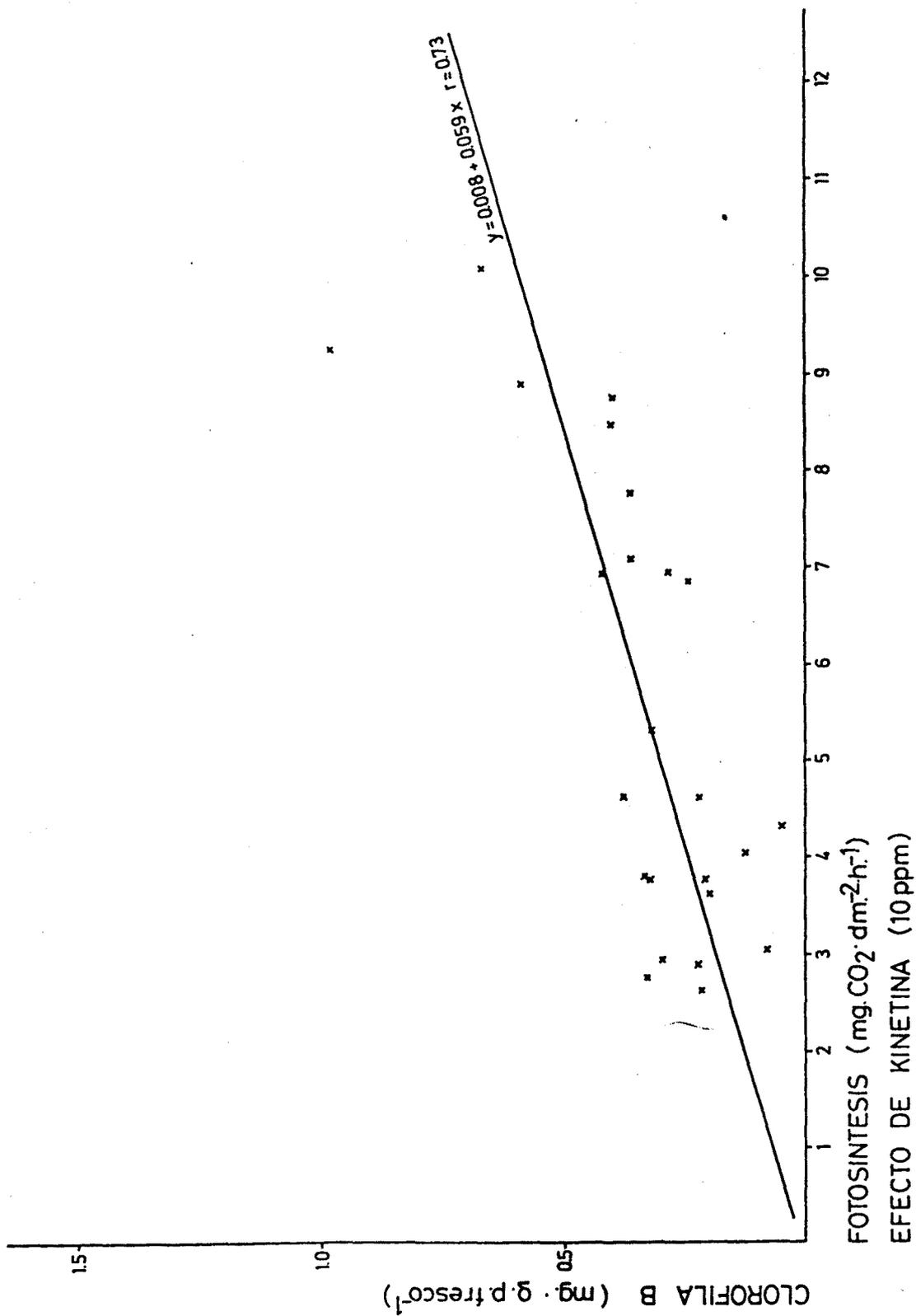


DIAS POST-ESCISION
 VARIACIONES EN CLOROFILA B Y FOTOSINTESIS TRAS ESCISION FOLIAR. ———CONTROL. - - - - - KINETINA.









3.1.6.- VARIACIONES EN EL CONTENIDO EN RIBULOSA 1,5 DIFOSFATO CARBOXILASA A LO LARGO DEL TIEMPO POST-ESCISION FOLIAR

3.1.6.1.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON KINETINA (10ppm)

DIA	ACTIVIDAD Ru BP casa ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g p f}^{-1}$)								
	CONTROL	\bar{X}	s	se	KINETINA	\bar{X}	s	se	
0	17,32				17,32				
0	13,28				13,28				
0	14,08				14,08				
0	14,08				14,08				
		14,69	1,79	0,90		14,69	1,79	0,90	
1	8,96				8,64				
1	8,96				8,24				
1	10,60				9,28				
1	10,96				9,28				
		9,87	1,06	0,53		8,87	0,50	0,29	
2	4,64				3,44				
2	3,84				3,96				
2	5,20				4,92				
2	4,76				6,00				
		4,61	0,57	0,29		4,58	1,13	0,36	
3	2,64				2,80				
3	2,52				3,20				

DIA	ACTIVIDAD Ru BP casa (μ mol CO ₂ . min ⁻¹ . g p f ⁻¹)								
	CONTROL	\bar{X}	s	se	KINETINA	\bar{X}	s	se	
3	2,24				4,64				
3	2,52				4,44				
		2,48	0,17	0,09		3,77	0,91	0,4	
4	1,60				3,96				
4	1,32				5,32				
4	1,32				3,24				
4	1,44				3,32				
		1,42	0,13	0,07		3,96	0,96	0,	
5	1,44				3,32				
5	1,40				3,44				
5	1,00				3,32				
5	1,44				2,84				
		1,32	0,21	0,11		3,23	0,27	0,	
6	0,40				1,96				
6	0,48				1,80				
6	0,36				0,92				
6	0,44				1,40				
		0,42	0,05	0,03		1,52	0,46	0,	
7	0,28				2,04				
7	0,32				1,84				

DIA	ACTIVIDAD Ru BP casa ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{g p f}^{-1}$)								
	CONTROL	\bar{X}	s	se	KINETINA	\bar{X}	s	se	
7	0,36				2,32				
7	0,44				2,84				
		0,35	0,07	0,04		2,26	0,43	0,2	

A partir de los resultados obtenidos de la cantidad de proteínas solubles contenida en los extractos, se pudo también expresar la actividad carboxilásica por mg. de proteína.

DIA	ACTIVIDAD Ru BP casa ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)								
	CONTROL	\bar{X}	s	se	KINETINA	\bar{X}	s	se	
0	0,430				0,430				
0	0,240				0,240				
0	0,390				0,190				
0	0,350				0,350				
		0,35	0,08	0,04		0,30	0,11	0,0	
1	0,230				0,228				
1	0,300				0,260				
1	0,320				0,230				
1	0,340				0,300				
		0,30	0,05	0,03		0,27	0,03	0,0	
2	0,098				0,082				
2	0,081				0,076				
2	0,109				0,095				

DIA	ACTIVIDAD Ru BP casa ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protefina}^{-1}$)								
	CONTROL	\bar{X}	s	se	KINETINA	\bar{X}	s	se	
2	0,164				0,130				
		0,11	0,04	0,02		0,10	0,02	0,01	
3	0,106				0,092				
3	0,146				0,157				
3	0,120				0,214				
3	0,194				0,212				
		0,14	0,04	0,02		0,17	0,06	0,03	
4	0,124				0,152				
4	0,097				0,237				
4	0,176				0,192				
4	0,144				0,137				
		0,14	0,03	0,02		0,18	0,04	0,02	
5	0,080				0,152				
5	0,074				0,100				
5	0,098				0,143				
5	0,102				0,123				
		0,09	0,01	0,01		0,13	0,02	0,01	
6	0,060				0,101				
6	0,039				0,129				

DIA	ACTIVIDAD Ru BP casa ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$)								
	CONTROL	\bar{X}	s	se	KINETINA	\bar{X}	s	se	
6	0,077				0,032				
6	0,033				0,047				
		0,05	0,02	0,01		0,08	0,05	0,02	
7	0,040				0,119				
7	0,023				0,069				
7	0,032				0,104				
7	0,024				0,124				
		0,03	0,01	0,01		0,10	0,03	0,02	

A partir de los resultados obtenidos se realizaron test de ajuste obteniéndose :

TRATAMIENTO CONTROL :

Ajuste lineal :

$$Y = 11,00 - 1,89X \quad r = -0,88$$

Polinomio de 2º grado :

$$Y = 14,26 - 5,15X + 0,47X^2 \quad r = -0,98$$

TRATAMIENTO CON KINETINA :

Ajuste lineal :

$$Y = 10,68 - 1,52X \quad r = -0,84$$

Polinomio de 2º grado :

$$Y = 13,47 - 4,31X + 0,40X^2 \quad r = -0,94$$

(figuras Pag. 199)

Actividad Ru BP casa ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$)

Se realizaron test de ajuste obteni\u00e9ndose :

TRATAMIENTO CONTROL :

Ajuste lineal :

$$Y = 29,96 - 4,24X \quad r = -0,61$$

Polinomio 2\u00b0 grado :

$$Y = 34,28 - 8,56X + 0,62X^2 \quad r = -0,89$$

TRATAMIENTO CON KINETINA :

Ajuste lineal :

$$Y = 25,84 - 2,65X \quad r = -0,68$$

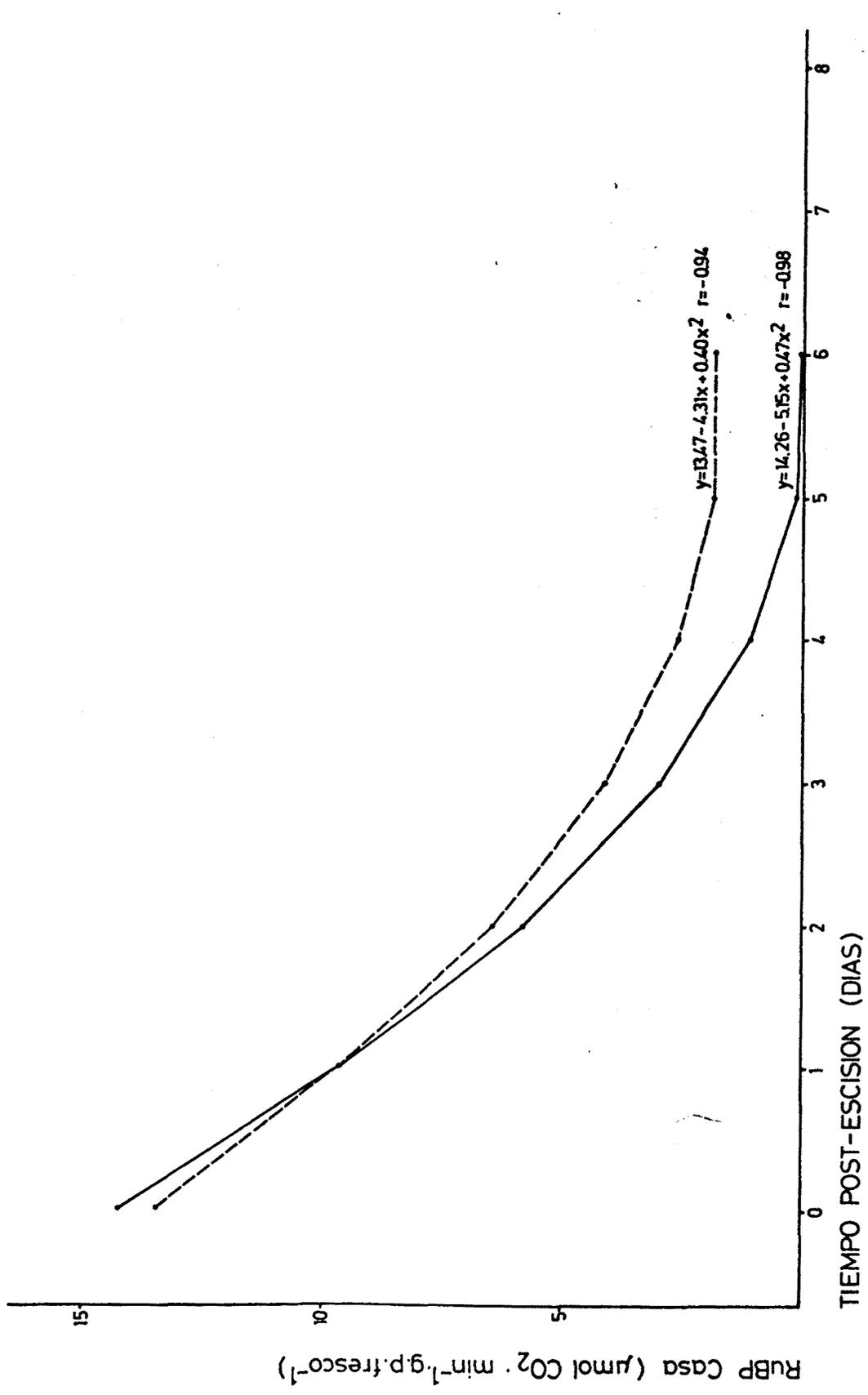
Polinomio 2\u00b0 grado :

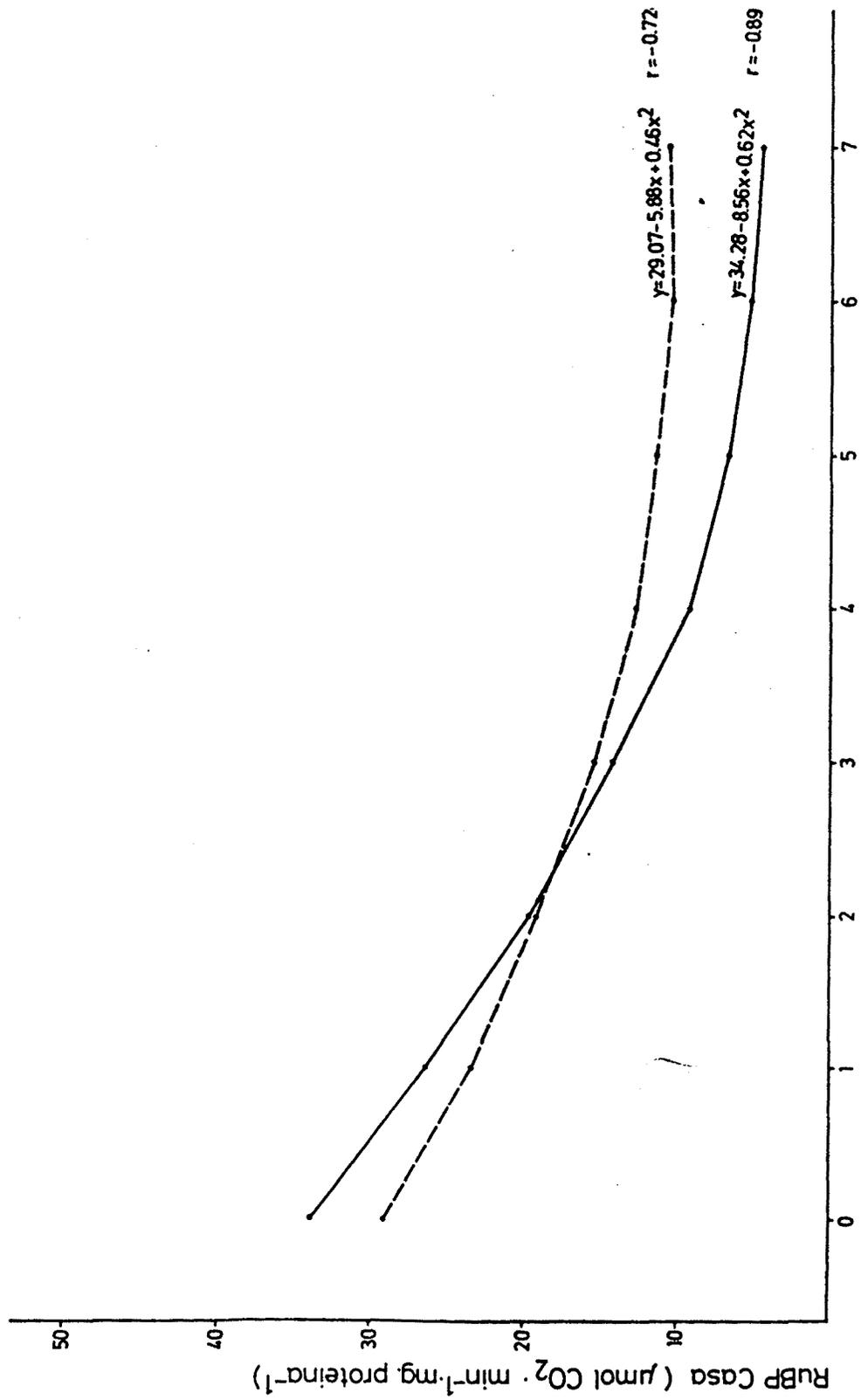
$$Y = 29,07 - 5,88X + 0,46X^2 \quad r = -0,72$$

(figuras Pag. 200)

DISMINUCIONES EN % DE LA ACTIVIDAD DE LA Ru BP CARBOXILASA RESPECTO AL DIA CERO :

CONTROL		KINETINA	
DIA 1 =	32,81%	DIA 1 :	39,62%
DIA 2 :	68,62%	DIA 2 :	68,82%
DIA 3 :	83,12%	DIA 3 :	74,34%
DIA 4 :	90,33%	DIA 4 :	73,04%
DIA 5 :	91,01%	DIA 5 :	78,01%
DIA 6 :	97,14%	DIA 6 :	89,65%
DIA 7 :	97,62%	DIA 7 :	84,62%





TIEMPO POST-ESCISION (DIAS)

VARIACION EN ACTIVIDAD DE LA RuBP Casa POST ESCISION FOLIAR. — CONTROL. - - - KINETINA.

TRATAMIENTO ESTADISTICO :

a) Análisis de la varianza de 2 vías con interacción

R.u BP carboxilasa ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 8 \text{ p fresco}^{-1}$)

Nº filas : 8 (días)

Nº columnas : 2 (control-kinetina)

Nº réplicas por casilla : 4

Los resultados fueron :

TIEMPO	\bar{X} Ru BP/ casa ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g.p.f}^{-1}$)
Día 0	14,69
Día 1	9,37
Día 2	4,59
Día 3	3,13
Día 4	2,69
Día 5	2,27
Día 6	0,97
Día 7	1,30
	\bar{X}
Tratamiento control	4,40
Tratamiento con kinetina	5,36
Media general	4,88

ANALISIS DE LA VARIANZA

- Filas (días) $F = 248,4$ (7,48 g.d.1)
 $p < 0,001$ diferencias significativas.



- Columnas (tratamiento) $F = 20,3$ (1,48g.d.1)
 $p < 0,001$ diferencias significativas.
- Interacción $F = 4,0$ (7,48g.d.1)
 $p > 0,5$ diferencias no significativas.

Ru BP carboxilasa ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$)

Nº filas : 8 (d\u00edas)

Nº columnas : 2 (control-kinetina)

Nº r\u00e9plicas por casilla : 4

Los resultados fueron :

TIEMPO	\bar{X} Rn BP casa ($\mu\text{mol CO}_2$)
D\u00eda 0	$32,75 \times 10^{-2}$
D\u00eda 1	$28,23 \times 10^{-2}$
D\u00eda 2	$10,44 \times 10^{-2}$
D\u00eda 3	$15,51 \times 10^{-2}$
D\u00eda 4	$15,74 \times 10^{-2}$
D\u00eda 5	$10,92 \times 10^{-2}$
D\u00eda 6	$6,48 \times 10^{-2}$
D\u00eda 7	$6,70 \times 10^{-2}$
	\bar{X}
Tratamiento control	15,13
Tratamiento con kinetina	16,56
Media general	15,85

ANALISIS DE LA VARIANZA

- Filas (d\u00edas) $F = 34,30$ (7,48g.d.1)
 $p < 0,001$ diferencias significativas.

- Columnas (tratamiento) $F = 1,5$ (1,48g.d.1)
 $p > 0,5$ diferencias no significativas.
- Interacción $F = 1,6$ (7,48g.d.1)
 $p > 0,5$ diferencias no significativas.

Para estudiar realmente si no existían diferencias entre tratamientos se realizó un test t de Student, por ser más potente;

y no precisar de un número fijo de datos por casilla, hecho que en el análisis de la varianza anterior, en algún caso se había tomado la media por faltar algún dato.

Se obtuvo :

$$t (26g.d.1) = -2,71$$

$p < 0,02$ Diferencias significativas

b) TEST DE STUDENT :

Para averiguar a partir de que día tras la escisión foliar aparecían diferencias en la actividad carboxilásica (expresado en $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gpf}^{-1}$ en cada tratamiento por separado y entre ellos, obteniéndose :

TRATAMIENTO CONTROL :

- Diferencias significativas entre días 0 y 1
 $t = 4,00$ (3g.d.1) $p < 0,05$
- Diferencias significativas entre días 1 y 2
 $t = 13,56$ (3g.d.1) $p < 0,001$
- Diferencias significativas entre días 2 y 3
 $t = 6,29$ (3g.d.1) $p < 0,01$
- Diferencias significativas entre días 3 y 4
 $t = 18,36$ (3g.d.1) $p < 0,001$
- Diferencias no significativas entre días 4 y 5
 $t = 1,13$ (3g.d.1) $p > 0,1$

- Diferencias significativas entre días 5 y 6
t = 9,98 (3g.d.1) p < 0, 01
- Diferencias no significativas entre días 6 y 7
t = 1,70 (3g.d.1) p > 0,1

TRATAMIENTO CON KINETINA

- Diferencias significativas entre días 0 y 1
t = 6,10 (3g.d.1) p < 0,01
- Diferencias significativas entre días 1 y 2
t = 10,91 (3g.d.1) p < 0,01
- Diferencias significativas entre días 2 y 3
t = 3,00 (3g.d.1) p < 0,1
- Diferencias no significativas entre días 3 y 4
t = -0,22 (3g.d.1) p > 0,1
- Diferencias no significativas entre días 4 y 5
t = 1,77 (3g.d.1) p > 0,1
- Diferencias significativas entre días 5 y 6
t = 7,20 (3g.d.1) p < 0,01
- Diferencias no significativas entre días 6 y 7
t = -1,88(3g.d.1) p > 0,1

ENTRE TRATAMIENTOS

- Diferencias no significativas en los días 0, 1 y 2
t = 1,51 (11g.d.1) p > 0,1
- Diferencias significativas en los días 2, 3 y 4
t = -3,07 (11g.d.1) p < 0,02

Día 2 t = 0,06 (3g.d.1); p > 0,1 no significativas

Día 3 $t = -2,47$ (3g.d.1); $p < 0,1$ significativas

Día 4 $t = -5,09$ (3g.d.1); $p < 0,02$ significativas