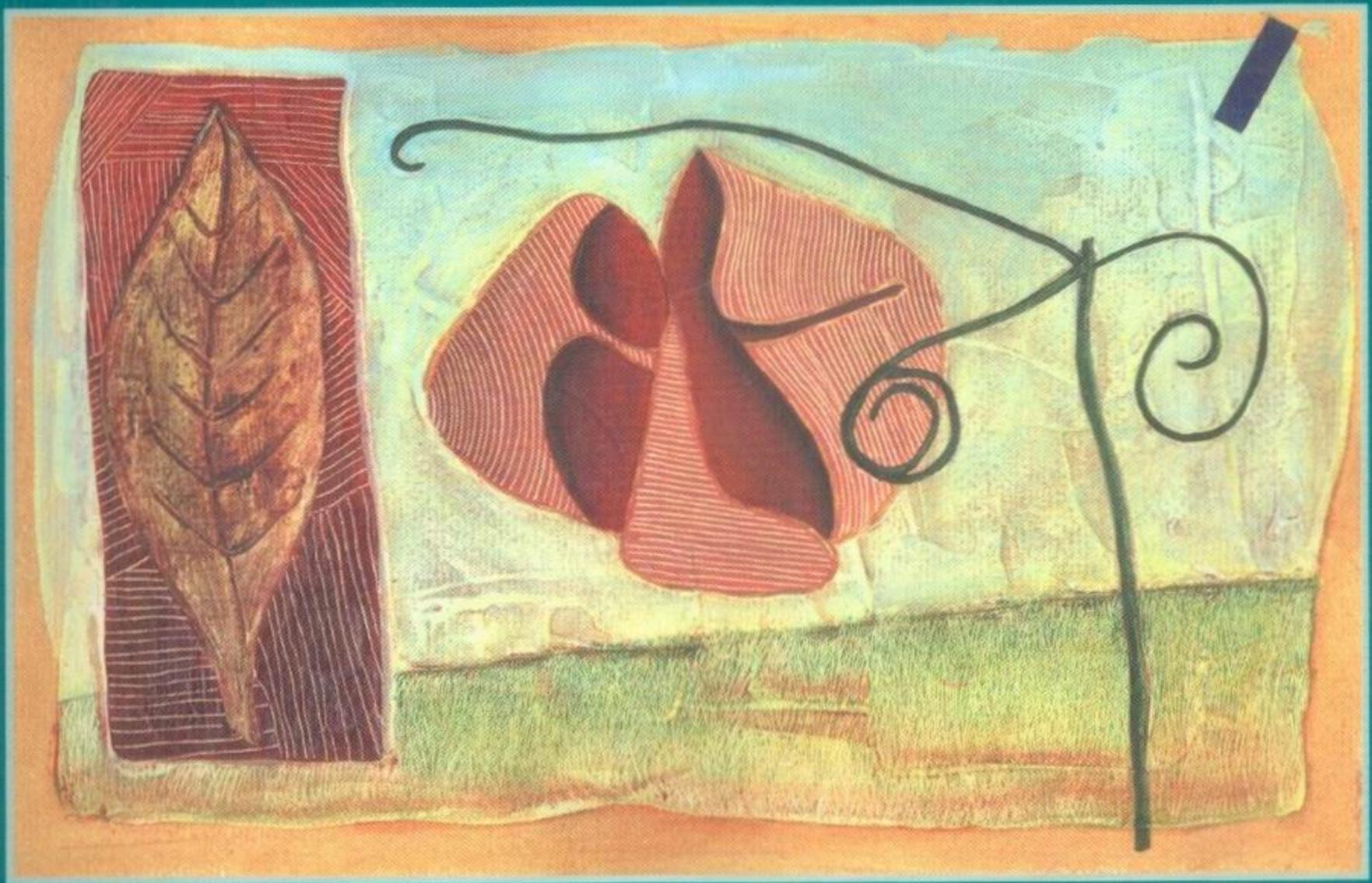


Fundamentos de Fisiología Vegetal

Joaquín Azcón-Bieto
Manuel Talón



Mc
Graw
Hill



McGRAW - HILL
INTERAMERICANA

U
B

E

EDICIONS
UNIVERSITAT DE
BARCELONA

LA FISIOLOGÍA VEGETAL Y SU IMPACTO SOCIAL. LA CÉLULA VEGETAL

Gloria Revilla e Ignacio Zarra

1. ¿Qué es la Fisiología Vegetal? 2. Las células de las plantas. 3. Las membranas son la base de la compartimentación celular. 4. La pared celular permite la supervivencia en ambientes hipotónicos.

1. ¿QUÉ ES LA FISIOLOGÍA VEGETAL?

La Fisiología Vegetal es la ciencia que estudia cómo funcionan las plantas, esto es, qué ocurre en las plantas que las mantiene vivas. Explica a través de leyes físicas y químicas cómo las plantas son capaces de utilizar la energía de la luz para, a partir de sustancias inorgánicas, sintetizar moléculas orgánicas con las que construir las complejas estructuras que forman el cuerpo de la planta. Explica también cómo las plantas, siguiendo un programa de desarrollo endógeno, son capaces de reproducirse y cómo adaptan dicho programa al ambiente particular de cada momento. Pero el aspecto más importante no es el cúmulo de procesos físicos y químicos que tienen lugar en cada punto concreto de la planta y en cada momento de su programa de desarrollo, sino cómo se integran dichos procesos en el espacio y en el tiempo y su modulación por el medio ambiente para llevar a buen término el desarrollo del organismo planta.

1.1. ¿Son las plantas las fábricas del futuro?

El hombre, desde el inicio de los tiempos, ha utilizado las plantas para su beneficio como alimento, vestido, material de construcción, fuente de energía, obtención de productos terapéuticos, ornamento, etc. El mayor conocimiento, no sólo de la diversidad de las plantas, sino también de su funcionamiento en los distintos niveles de integración (molecular, celular, organismo y población) ha permitido diseñar mejores estrategias para aumentar su producción, así como mejorar su calidad. En los últimos años hemos asistido al vertiginoso des-

pegue de la biología molecular de las plantas y su aplicación biotecnológica (véase Capítulo 29). Al menos en teoría, cualquier ruta metabólica puede someterse a manipulación, para modificar la producción de los distintos metabolitos primarios y secundarios. Así, se está investigando con cierto éxito en el enriquecimiento en vitaminas (como el ácido ascórbico o vitamina C) de los alimentos vegetales, plantas con ligninas más fácilmente degradables para reducir la contaminación industrial en la preparación de pasta de papel, etc. Sin embargo, hay al menos cuatro aspectos que pueden afectar al resultado de estos experimentos: 1) no siempre es posible predecir el resultado global en el organismo de la manipulación puntual de la actividad de una enzima concreta, ya que los distintos mecanismos de control del metabolismo, todavía no bien conocidos, pueden afectar al resultado final; 2) la manipulación del metabolismo primario puede afectar, de forma todavía no bien conocida, al crecimiento y desarrollo de la planta; 3) el crecimiento y desarrollo de las plantas naturales y, por supuesto, de las manipuladas genéticamente está afectado por las fluctuaciones ambientales que pueden influir adversamente sobre el objetivo perseguido, y 4) muchas de las aplicaciones de la ingeniería genética requieren que el producto objeto de manipulación se produzca en el lugar y en el momento adecuado de la vida de la planta, esto es, debe incorporarse de forma adecuada en el programa de desarrollo de la planta (véase Capítulo 18).

Por todo ello, parece evidente que en estos momentos, el punto crítico en el que se encuentra la Biología de las Plantas no es tanto el conocer los genes o las reacciones concretas que tienen lugar en las plantas, sino cómo se integran espacial y temporalmente en el

programa de desarrollo del organismo. Como hemos indicado al inicio de este capítulo, la integración tanto espacial como temporal de los distintos procesos que tienen lugar en la planta es el objetivo último de la ciencia que nos ocupa, la Fisiología Vegetal.

En estos momentos, el gran reto que se plantea la Biología de las Plantas no es sólo mejorar los productos agronómicos o forestales, sino la obtención de nuevos productos o procesos: nuevos polímeros, fármacos, absorción de metales contaminantes (biorremediación), etc. Sirva como ejemplo la obtención de patatas transformadas genéticamente para ser capaces de sintetizar una vacuna contra la diarrea, cuyas primeras pruebas clínicas se han llevado a cabo en Estados Unidos en 1997. La distribución de vacunas mediante frutas y hortalizas para consumo en fresco puede resolver muchos de los problemas que encuentran los programas de vacunación en los países del tercer mundo: costes de transporte, conservación bajo refrigeración, riesgos de infección por agujas hipodérmicas, etc.; sin olvidar que probablemente en los países desarrollados los niños prefieran comerse la vacuna que recibir un pinchazo.

2. LAS CÉLULAS DE LAS PLANTAS

La unidad funcional básica de las plantas, como en todos los organismos vivos, es la célula. Por ello, el estudio de la fisiología de las plantas es, en gran parte, el estudio de la fisiología de las células de las plantas y su integración en el organismo. La gran diversidad ecológica de las plantas está directamente relacionada con la enorme variedad de formas, estructuras y funciones de las células individuales que las forman. Esta diversidad hace difícil generalizar las características de una célula. Así, nos encontramos las células del **xilema** que son bioquímicamente inactivas (muertas), pero que cumplen una importante función en el transporte del agua (véase Capítulo 4). Las células del **floema**, los elementos cribosos, son anucleadas y han perdido su sistema de membranas a excepción de la membrana plasmática; sin embargo, están perfectamente adaptadas para permitir el transporte de asimilados (véase Capítulo 5). En cuanto a las células del parénquima, que podemos considerar funcionalmente completas, son el tipo más común de células y constituyen aproximadamente el 80 por 100 del total de las células que forman la planta.

Sin embargo, a pesar de las diferencias, la mayoría tiene una organización estructural común. Así, en general, las células presentan una **pared celular** que rodea el **protoplasto**, delimitado externamente por la **membrana plasmática**. El material vivo en el interior del protoplasto recibe el nombre de protoplasma. El protoplasma no posee una estructura homogénea sino que, inmersas dentro de una masa relativamente indiferenciada (citoplasma), pueden distinguirse estructuras perfectamente diferenciadas y delimitadas por membranas (simples o dobles), que cumplen funciones específicas

(orgánulos). A su vez, el citoplasma todavía contiene en suspensión distintas estructuras no rodeadas de membrana, como ribosomas, microtúbulos e inclusiones. La fase acuosa del citoplasma recibe el nombre de **citosol** (Fig. 1-1, Cuadro 1-1).

En términos generales, podemos considerar la célula como una estructura compleja, constituida por distintos compartimentos con funciones diferentes y separados entre sí por membranas. La membrana plasmática establece la primera división en compartimentos: por una parte, el protoplasma, tradicionalmente identificado con el interior de las células; por otra, el espacio externo o **espacio extracelular**, aunque no parece adecuado contemplar este espacio como algo externo a la célula ya que, si bien en principio presenta continuidad en el seno del tejido y sirve como vía de difusión de diversas sustancias, posee estructuras, como la pared celular, así como sistemas enzimáticos cuya síntesis depende de las células, además de cumplir funciones esenciales para las mismas (crecimiento, modificación de ciertos nutrientes, reacciones defensivas, etc.). Por ello, el espacio extracelular debe describirse como un compartimento más de las células, con la peculiaridad de continuarse con el de las células adyacentes, recibiendo el nombre de **apoplasto**.

Por otra parte, el espacio rodeado externamente por la membrana plasmática, el protoplasma, no aparece siempre como un espacio individualizado e independiente de las células contiguas, sino que puede estar interconectado a través de los **plasmodesmos**, lo que origina un compartimento continuo que recibe el nombre de **simplasto**. A su vez, el protoplasma está subdividido en distintos compartimentos separados del citoplasma

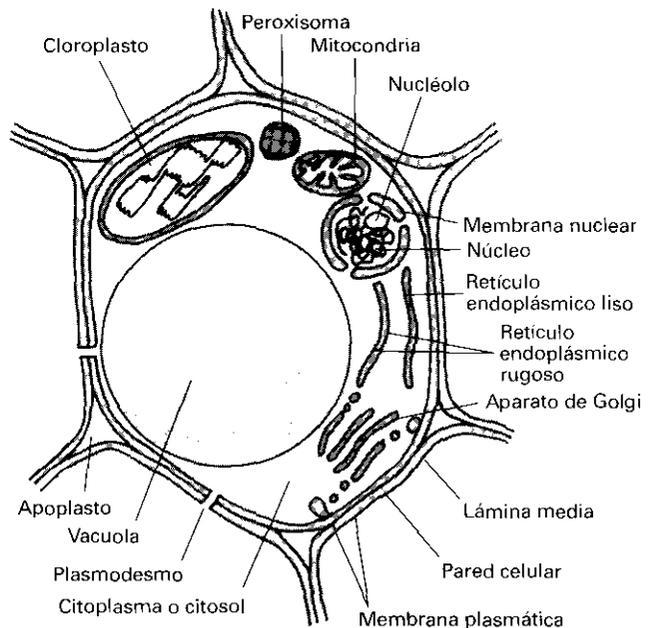


Figura 1-1. Representación esquemática de una célula del parénquima de una planta.

Cuadro 1-1. Definiciones de algunos términos utilizados para describir los componentes celulares

Término	Definición
Protoplasto	Contenido de la célula, excluida la pared celular
Apoplasto	Espacio externo a la membrana plasmática donde se encuentra la pared celular y que puede presentar continuidad en el seno del tejido
Protoplasma	Material vivo en el interior del protoplasto
Orgánulos	Estructuras rodeadas por una o dos membranas presentes en el interior del protoplasto
Citoplasma	Protoplasma, excluidos los orgánulos
Simplasto	Espacio constituido por el citoplasma de las distintas células que presenta continuidad a través de los plasmodesmos
Inclusiones	Estructuras presentes en el citoplasma que no están rodeadas por una membrana
Citosol	Fase acuosa del citoplasma, excluido el material particulado (inclusiones)

por membranas dobles o sencillas, que constituyen los orgánulos (núcleo, plastos, mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vacuolas y microsomas), cada uno de ellos con funciones específicas.

Debido a que los distintos orgánulos serán objeto de estudio en capítulos posteriores, aquí nos centraremos en dos aspectos de las células que serán básicos para entender los múltiples procesos fisiológicos que tienen lugar en las plantas: las membranas y su papel en la compartimentación celular (apartado 3) y la pared celular, que confiere características únicas a las células de las plantas (apartado 4).

3. LAS MEMBRANAS SON LA BASE DE LA COMPARTIMENTACIÓN CELULAR

Las membranas son componentes esenciales de las células que permiten su autonomía respecto al medio en que se encuentran, así como la existencia de distintos compartimentos en su interior. El modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicholson, y ampliamente aceptado en nuestros días, establece que las membranas están constituidas por una bicapa lipídica en la que las proteínas pueden estar tanto embebidas en dicha bicapa como asociadas a su superficie (Fig. 1-2).

3.1. Los lípidos de membrana son anfipáticos

Los glicerolípidos polares son los principales constituyentes de las membranas de las células vegetales. Están

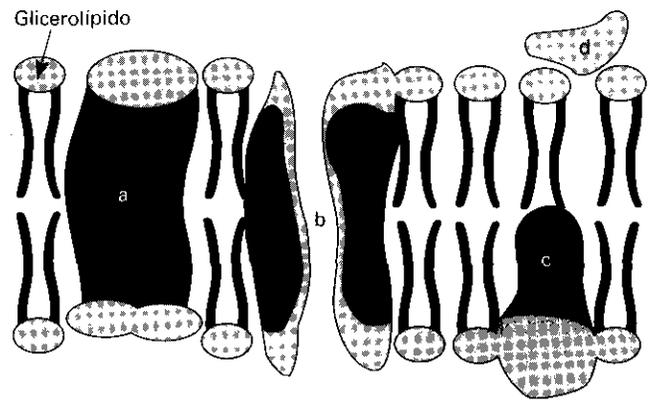


Figura 1-2. Representación esquemática del modelo fluido de membrana. $\{$, cadena hidrófoba de ácido graso; \cdot , cabeza polar de glicerolípidos; \blacksquare , región hidrofóbica y \circ , región polar de: a) proteína intrínseca con dominios transmembrana; b) proteína intrínseca que forma un canal polar a través de la membrana; c) proteína intrínseca anclada parcialmente en la membrana; d) proteína extrínseca.

formados por dos cadenas de ácidos grasos esterificados a dos de los grupos hidroxilo del glicerol. El tercer hidroxilo sirve de unión a distintos grupos que confieren cierta polaridad a la molécula: azúcares (**glicolípidos**) y ésteres fosfato (**fosfolípidos**) (Fig. 1-3). Los esteroides, como sitosterol, estigmasterol, colesterol, etc., aunque minoritarios, también son componentes de las **membranas vegetales**.

La bicapa lipídica está constituida por lípidos polares que presentan una cabeza polar y una cola hidrófoba. Esta característica les permite formar bicapas lipídicas en las que las colas hidrófobas de los ácidos grasos se mantienen unidas, mientras que las cabezas polares se orientan hacia la fase acuosa (Fig. 1-2).

3.2. Las proteínas originan dominios específicos en las membranas

Las proteínas presentes en las membranas biológicas se pueden dividir en dos tipos según el tipo de asociación que presenten: a) **proteínas intrínsecas**, atrapadas físicamente en la fase lipídica y que sólo podrán solubilizarse mediante tratamientos que disuelvan dicha fase lipídica, y b) **proteínas extrínsecas**, ligadas iónicamente a los grupos polares de los lípidos y que pueden liberarse fácilmente mediante tratamientos con soluciones de mayor o menor fuerza iónica. La estructura química y la distribución espacial de las cadenas laterales de los distintos restos aminoácil que constituyen la cadena peptídica son las responsables no sólo de las propiedades físico-químicas de la proteína, sino también de la aparición en la misma de regiones con características específicas. Así, regiones enriquecidas en aminoácidos con cadenas laterales no polares (alanina, leucina, triptófano, etc.) darán lugar a la aparición de dominios hidrófobos que permiten su anclaje en la membrana. La

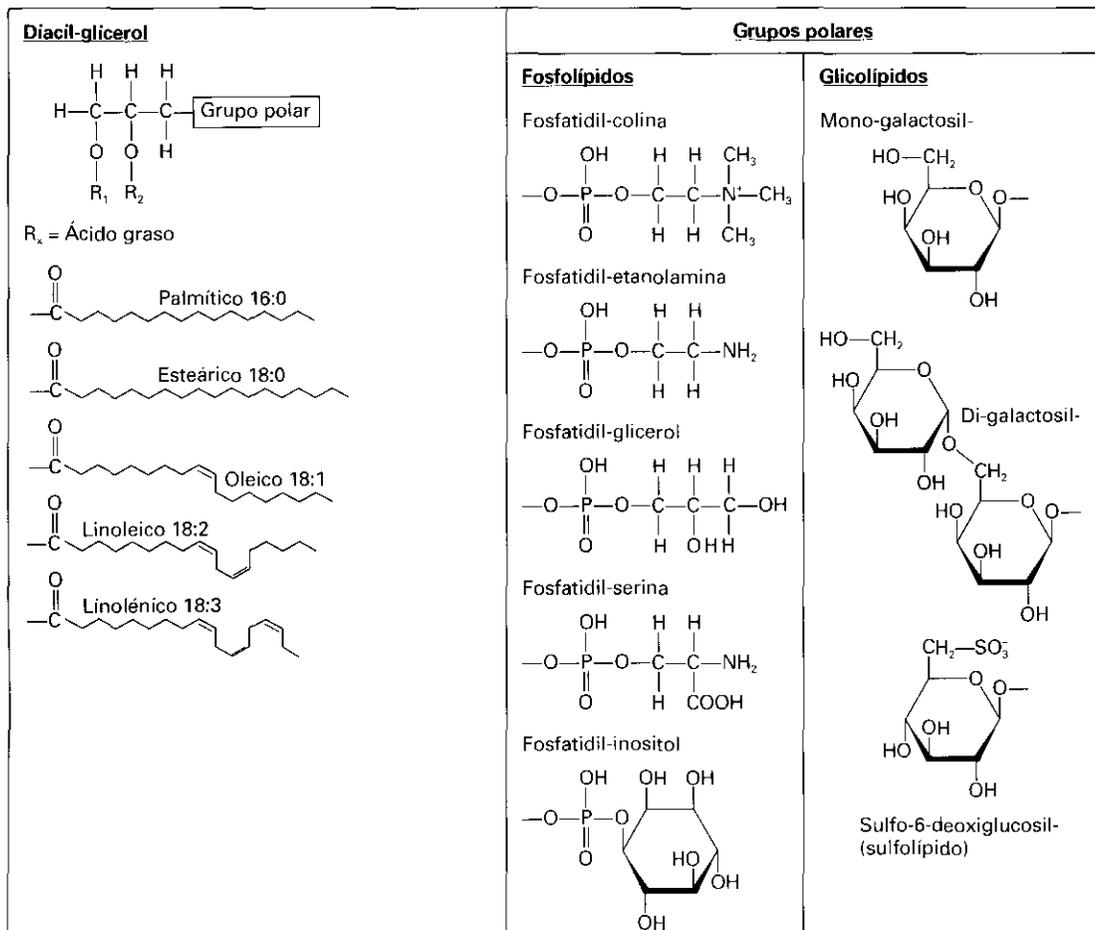


Figura 1-3. Estructura química de los glicerolípidos más frecuentes encontrados en las membranas de las células de las plantas.

distribución y extensión de dichos dominios hidrófobos serán las responsables de la localización de las proteínas en la membrana (Fig. 1-2). Así, con frecuencia los dominios hidrófobos pueden extenderse desde la superficie externa hasta la interna, constituyendo un dominio transmembrana. Por el contrario, aquellas proteínas sin dominios hidrófobos pero con dominios cargados eléctricamente se asociarán a los grupos polares de los lípidos de membrana para constituir las proteínas extrínsecas.

3.3. La fluidez de las membranas depende de la insaturación

Las cadenas hidrófobas de los ácidos grasos que constituyen la fase hidrófoba de las membranas tendrán propiedades de gel o de líquido, dependiendo de la temperatura. A bajas temperaturas estarán en fase gel y conforme aumente la temperatura, se producirá la transición a fase líquida. La temperatura a la que se produce la transición gel-líquido recibe el nombre de temperatura de cambio de fase (T_c). La funcionalidad de las membranas biológicas requiere una cierta fluidez que permita el movimiento transversal y lateral no sólo de las

moléculas lipídicas, sino también de una serie de sustancias: proteínas transportadoras, sustratos y productos de las enzimas asociadas a las membranas, transporte de electrones, etc. Por ello, será necesario que las membranas biológicas se encuentren a una temperatura superior a su T_c. Este requisito va a tener una gran importancia en la sensibilidad o resistencia de las plantas a bajas temperaturas (véase Capítulo 30). La T_c depende de la estructura de las cadenas de los ácidos grasos, así como de su disposición relativa en la unión a la molécula de glicerol. La aparición de dobles enlaces en *cis* en las cadenas de los ácidos grasos (véase Fig. 1-3) provoca dobleces en la cadena y disminuye el grado de empaquetamiento de la misma lo que hace que su T_c sea menor y permite mantener la **fluidez de las membranas** a temperaturas más bajas. Si tenemos en cuenta que las plantas son organismos poiquiloterms, esto es, que no pueden regular su propia temperatura, el aumento de la insaturación de los ácidos grasos de sus membranas catalizado por las **desaturasas** les permitirá mantener la funcionalidad (fluidez) de sus membranas a temperaturas ambiente relativamente bajas. Así, mediante técnicas de ingeniería genética, se ha logrado aumentar la tolerancia de plantas de tomate a bajas temperaturas al

incrementar la proporción de ácidos grasos insaturados en sus membranas.

3.4. Las membranas son impermeables a las sustancias polares

La fase hidrófoba constituida por las colas de los ácidos grasos establece una barrera a la difusión de las sustancias polares que separa la fase acuosa en dos, una a cada lado de la membrana. En términos generales, la permeabilidad de las membranas está relacionada con el coeficiente de partición de las distintas sustancias entre la fase lipídica y la fase acuosa. La fase lipídica hidrófoba confiere a las membranas cierta impermeabilidad frente a las moléculas polares, lo que hace necesaria la existencia de mecanismos relativamente específicos para su transporte que sean susceptibles de regulación (véase Capítulo 7). Así, los distintos compartimentos separados por membranas podrán mantener ambientes químicos diferentes para poder llevar a cabo los distintos procesos metabólicos. Además, este ambiente hidrófobo proporciona el medio adecuado para que tengan lugar aquellas reacciones en las que participan moléculas hidrófobas (lípidos, cadenas transportadoras de electrones, etc.).

3.5. Las membranas presentan asimetría

La distribución de las proteínas, intrínsecas o extrínsecas, depende de las interacciones entre dominios específicos de las mismas y las cadenas hidrófobas de los ácidos grasos, y también los grupos polares de los lípidos de las membranas. La extensión de los dominios hidrófobos de las proteínas les permitirán una mayor o menor penetración en la bicapa lipídica, lo que establece distintas localizaciones en el interior de la membrana para las distintas proteínas. Mediante diversas técnicas (criofractura, utilización de sondas no permeantes, etc.) se ha podido demostrar **asimetría en las membranas**, esto es, la existencia de diferencias entre sus dos mitades, externa e interna. Esta asimetría no sólo se refiere a las proteínas, sino también a los lípidos. Así, en los tilacoides de cloroplastos de espinaca, mientras el monogalactosildiacilglicerol está mayoritariamente localizado en la mitad externa, el digalactosildiacilglicerol lo está en la interna.

3.6. Las membranas difieren en su composición

Aunque todas las membranas presentes en las células tienen la misma estructura básica, las diferentes membranas tienen también diferentes proporciones de proteínas y lípidos, así como entre los distintos tipos de lípidos y proteínas. Si tenemos en cuenta que las diferentes membranas de las células tienen funciones cata-

líticas y de transporte diferentes, parece lógico que no sólo presenten distinta relación proteína/lípidos, sino también distintos tipos de polipéptidos según sus funciones específicas. Pero no son éstas las únicas diferencias entre las membranas; también varía su composición lipídica, tanto en el tipo de lípidos como en el grado de insaturación de los ácidos grasos (Cuadro 1-2). Así, mientras las membranas mitocondriales están enriquecidas en fosfolípidos, las cloroplásticas lo están en glicolípidos (principalmente galactolípidos) (véase Capítulo 9). En general, cuanto mayor sea la fluidez de las membranas, la actividad metabólica en su fase hidrófoba será mayor.

3.7. Las membranas permiten el establecimiento de distintos compartimentos en las células

El sistema de membranas de las células, al separar distintas fases acuosas, establece distintos compartimentos en las células: citoplasma, espacio interno de los orgánulos y apoplasto. Esto, unido a la existencia de mecanismos específicos de transporte para cada sustancia según el tipo de membrana, permite que se encuentren diferentes concentraciones de metabolitos en los distintos compartimentos estableciendo ambientes químicos especializados en los que tendrán lugar las distintas vías metabólicas. La estructura y funciones de cada uno de los compartimentos celulares serán objeto de estudio en capítulos posteriores. El Cuadro 1-3 resume los compartimentos subcelulares de una célula típica del mesófilo fotosintético. La división de la célula en pequeños compartimentos también puede servir para conseguir altas concentraciones de metabolitos sin necesidad de producir grandes cantidades del metabolito en cuestión.

4. LA PARED CELULAR PERMITE LA SUPERVIVENCIA EN AMBIENTES HIPOTÓNICOS

Las células provistas de pared celular, a diferencia de las células desnudas de los organismos animales, no necesitan un ambiente isotónico para sobrevivir. La **pared celular** les permite acumular solutos en su protoplasto a concentraciones mayores que las presentes en el medio externo (apoplasto). En estas condiciones, el agua tenderá a entrar en el protoplasto por ósmosis (véase Capítulo 2), provocando un aumento de volumen por la elasticidad de la membrana plasmática. El aumento de volumen está limitado por la pared celular que, debido a su resistencia mecánica, ejerce una presión sobre el protoplasto que equilibra los potenciales hídricos entre la célula y el medio externo.

Aunque la pared celular es una estructura común a todos los organismos del reino Planta, su composición varía entre especies, entre tejidos de una misma especie, entre células... En la célula vegetal, la pared se va depositando como una serie de capas. Así, durante la

Cuadro 1-2. Composición lipídica relativa (%) de las membranas vegetales

	Lípidos neutros y esteroides	Glicolípidos	Fosfolípidos	Índice de insaturación ^a
M. plasmática	50	1	49	144
Mitocondria				
m. externa	0		99	156
m. interna	0		99	186
Cloroplasto				
m. externa		56	29	94 ^b
m. interna		84	13	
tilacoide		83	17	263
Tonoplasto	18	31	51	

^a Representa el número de dobles enlaces en 100 restos de ácidos grasos.

^b Corresponde a las dos membranas de la cubierta del cloroplasto.

división celular se deposita la primera capa originando la **lámina media**, formada fundamentalmente por polisacáridos pécticos, que mantiene la unión entre las células adyacentes. Entre la lámina media y la membrana plasmática, se continúa depositando el material que va a constituir la pared celular. Una vez que la placa celular está completa, en las células hijas tiene lugar el depósito del material que constituye la **pared celular primaria**, de escaso grosor (0.1-1.0 μm). Las paredes primarias son de gran importancia en el proceso de extensión o expansión celular, pues controlan el crecimiento (véanse apartado 4.4 y Capítulos 18 y 19). En algunos tipos de células especializadas, una vez que dejan de crecer, se depositan nuevas capas de material en la cara interna de la pared, lo que constituye la **pared secundaria**, más gruesa que la primaria.

La pared celular es una estructura altamente organizada, formada por una red tridimensional de microfibrillas de celulosa embebida en una matriz constituida por polisacáridos (hemicelulosas y pectinas), proteínas y fenoles en una solución ligeramente ácida. A diferencia de lo que sugiere su nombre, no es una estructura estática sino un compartimento metabólico dinámico y mantiene continuidad molecular con la membrana plasmática y el citoesqueleto.

La pared tiene una gran resistencia mecánica, y define el tamaño y la forma de la célula, al controlar en gran parte el crecimiento celular (véase Capítulo 18). Tiene también un papel importante en la defensa de las plantas frente a organismos potencialmente patógenos, al actuar como barrera física y como fuente de moléculas con actividad biológica (oligosacarinas), implicadas en el control de mecanismos de defensa (véanse Capítulos 22 y 30).

4.1. Los polisacáridos son los componentes mayoritarios de las paredes

Muchas de las características fisiológicas y morfológicas de los tejidos vegetales resultan de las propiedades

de las paredes de sus células. Por tanto, las células que realizan diferentes funciones tienen paredes con distinta composición y estructura. Sin embargo, en general, podemos considerar que una pared celular está formada mayoritariamente por polisacáridos (celulosa, hemicelulosas y pectinas), que constituyen alrededor del 90 % del peso seco de las paredes celulares primarias y entre el 65 y el 85 % de las secundarias. En la Figura 1-4 se detallan los azúcares constituyentes de dichos polisacáridos y sus estructuras más frecuentes. Las proteínas, tanto estructurales como enzimáticas, constituyen hasta un 10 % del peso seco de las paredes, mientras que las ligninas pueden tener una presencia importante (hasta un 35 %) en algunos tipos de paredes secundarias.

4.1.1. La celulosa constituye la fase fibrilar de las paredes celulares de todas las plantas

La **celulosa** está constituida por una larga secuencia lineal de restos de D-glucosa unidos por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ (Fig. 1-5). Cada resto presenta una rotación de 180° respecto a los restos contiguos, estabilizada por puentes de hidrógeno intramoleculares. El grado de polimerización medio en paredes secundarias es alto, aproximadamente 10^4 , mientras que en paredes primarias es más bajo, entre 2.6 y 6×10^3 . Debido a su estructura, las cadenas de celulosa (40-70) se unen por puentes de hidrógeno intermoleculares formando agregados (**microfibrillas**), en su mayor parte cristalinos, en los que las cadenas individuales de celulosa se disponen de forma paralela. Estas microfibrillas están separadas entre sí unos 30 nm, espacio ocupado por los polisacáridos matriciales y lignina o suberina, lo que confiere gran resistencia mecánica a la pared. Las microfibrillas de celulosa están presentes en las paredes de todas las plantas superiores, constituyendo el 30-40 % de peso de las paredes de tejidos leñosos, mientras que en paredes primarias se encuentran en menor proporción.

Cuadro 1-3. Volumen relativo de los principales compartimentos de una célula del mesófilo de hojas de espinaca

Compartimento	Volumen relativo (%)	Algunas de las funciones más características
Vacuola	57.2	Mantenimiento de la turgencia celular
Cloroplasto	21.3	Fotosíntesis
Citosol	4.5	Metabolismo de azúcares, síntesis de sacarosa
Mitocondria	0.7	Respiración celular
Núcleo	0.4	Material genético, replicación y transcripción
Retículo endoplásmico		Procesado y transporte de proteínas
Aparato de Golgi		Síntesis de polisacáridos estructurales no celulósicos
Peroxisomas		Destoxificación fotorrespiratoria del glicolato
Glioxisomas		β -oxidación de ácidos grasos, ciclo del glioxilato
Apoplasto	16.0	Reacciones que modifican la pared celular

Adaptado de Winter *et al.* *Planta* 193: 530-535, 1994.

4.1.2. Las hemicelulosas entrelazan las microfibrillas de celulosa

Los polisacáridos hemicelulósicos están constituidos por una cadena lineal relativamente larga sobre la que pueden aparecer cadenas laterales relativamente cortas. En la mayoría de las plantas, excepto gramíneas, el **xi-**

loglucano es el polisacárido no celulósico más abundante, aunque dependiendo de las especies y de los tejidos presenta unidades estructurales diferentes. Está constituido por un eje central de $\beta(1 \rightarrow 4)$ glucano idéntico al de la celulosa, pero bastante más corto. Además, a diferencia de ésta, gran parte de los restos de glucosa están unidos a restos de xilosa mediante un enlace

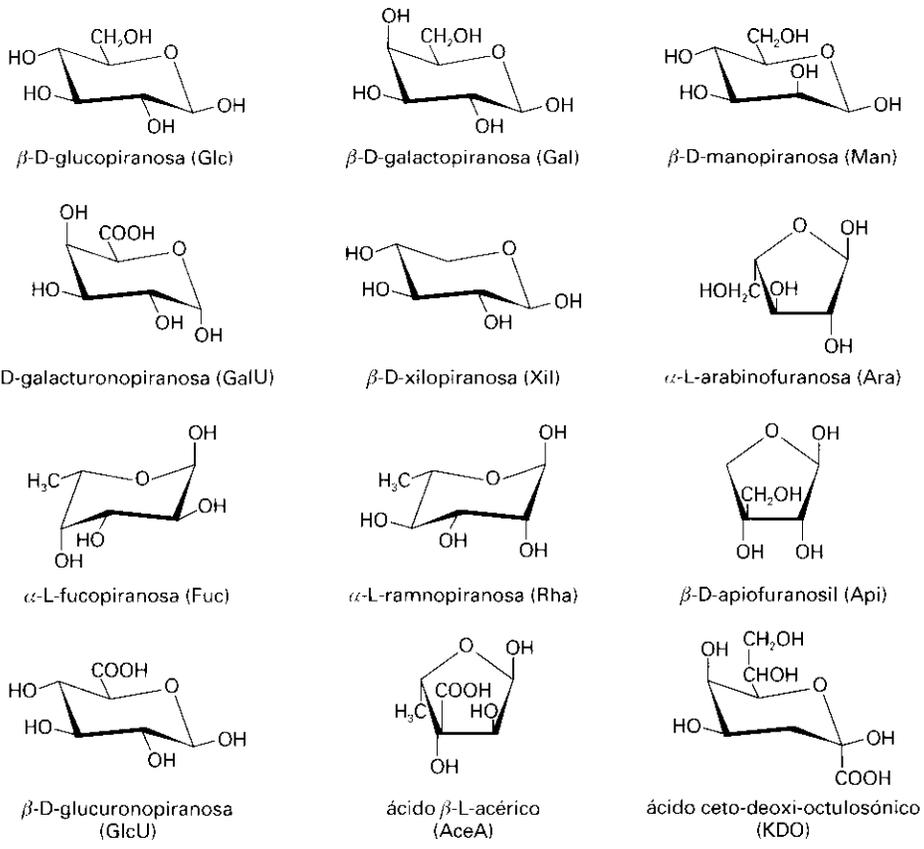


Figura 1-4. Estructura de los principales monosacáridos presentes con mayor frecuencia en las paredes celulares.

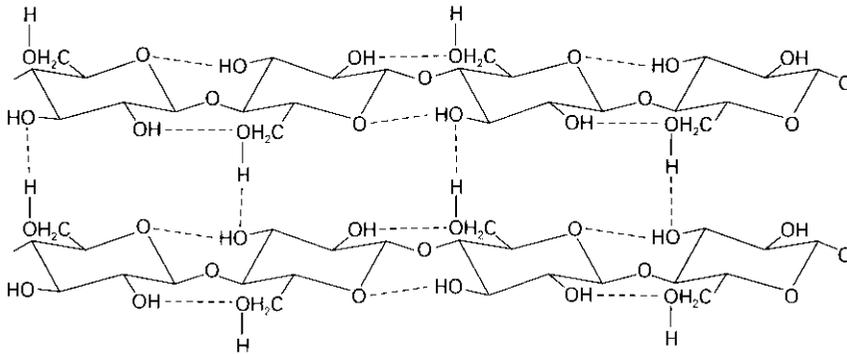


Figura 1-5. Conformación de las cadenas de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucano de las microfibrillas de celulosa mostrando los puentes de hidrógeno intra e intermoleculares (líneas de puntos).

$\alpha(1\rightarrow6)$ (Fig. 1-6). Estas sustituciones suelen disponerse ordenadamente, de manera que la unidad estructural básica está formada por 3 restos de glucosa sustituidos, enlazados a un cuarto resto no sustituido ($\text{Glc}_3\text{-Xil}_1$). A su vez, parte de los restos de xilosa pueden llevar unidos al C-2 cadenas laterales de β -D-galactosa o, en menor proporción, de L-fucosa- $\alpha(1\rightarrow2)$ -D-galactosa. El xiloglucano de las *Solanaceae* no presenta fucosa y los restos de xilosa se encuentran sustituidos de forma predominante por α -L-arabinosa-(1→2)- o α -L-arabinosa-(1→2)- y β -D-galactosa-(1→2)-. En todos los casos los restos de galactosa pueden estar acetilados. El hecho de que los sustituyentes estén distribuidos de una forma precisa a lo largo de la molécula indica que su síntesis está sometida a un control estricto. Las paredes celulares de gramíneas (*Poaceae*) presentan pequeñas cantidades de xiloglucano con una estructura menos regular, menor contenido en xilosa y galactosa y sin fucosa.

Las cadenas de xiloglucano pueden unirse mediante puentes de hidrógeno a la celulosa y cubrir las microfibrillas con una monocapa de hemicelulosa. Teniendo en cuenta que, en la mayoría de las plantas (excepto gramíneas), la celulosa y el xiloglucano están presentes en la pared celular en cantidades casi iguales, sólo una parte del xiloglucano puede enlazarse directamente a la celulosa, mientras que el resto estaría situado en los espacios entre las microfibrillas, pudiendo una molécula de xiloglucano unir 2 o más microfibrillas para formar la red xiloglucano-celulosa.

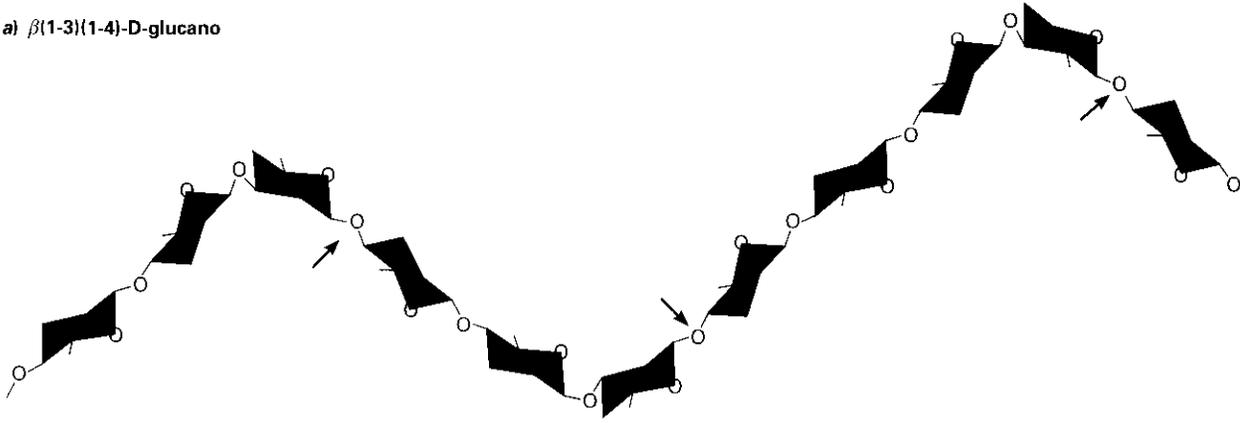
Los **xilanos** están constituidos por una cadena lineal de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-xilosa con sustituciones de arabinosa, ácido glucurónico y ácido metilglucurónico mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$ o $\alpha(1\rightarrow3)$ (Fig. 1-6). El tipo y la distribución de los sustituyentes son muy variables, dependiendo de su origen. En las paredes primarias de gramíneas, donde el glucuronoarabinoxilano es el polisacárido no celulósico más abundante, presentan su estructura más compleja, con un alto contenido en arabinosa. El xilano puede unirse a las microfibrillas de celulosa y representar, en cierta forma, en las gramíneas el papel del xiloglucano en dicotiledóneas. Sin embargo, las ramificaciones limitan esta unión, por lo que en

paredes primarias de células en crecimiento de gramíneas es de poca importancia cuantitativa, si bien como las ramificaciones disminuyen conforme avanza la edad de la célula puede tener mayor importancia en células ya maduras. Además, parte de los restos de arabinosa se encuentran unidos a ácido ferúlico, lo que posibilita la creación de enlaces entre varias cadenas de xilanos mediante puentes diferulil, cuya formación aumenta al final del crecimiento. En las paredes primarias de otras especies, la arabinosa aparece en menor cantidad, pero está presente en cantidades importantes en las paredes secundarias de todas las plantas, aunque en este caso se encuentra una mayor sustitución por ácido glucurónico o metilglucurónico en los xilanos.

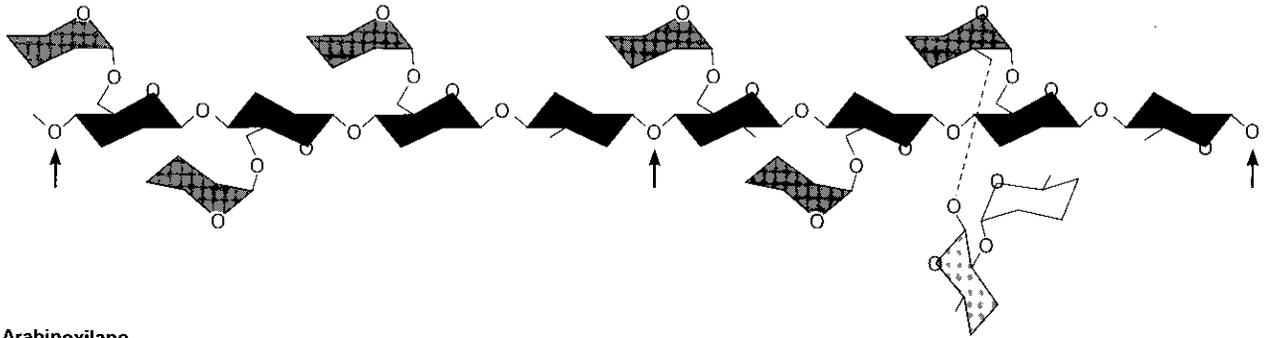
Un polisacárido característico de las paredes celulares de las gramíneas es el $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ glucano o **glucano mixto** (Fig. 1-6). Está formado por una cadena lineal de restos de β -D-glucosa unidos por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y $\beta(1\rightarrow3)$ en una relación aproximada de 2.3. La distribución de los dos tipos de enlace presenta un cierto orden, de manera que la molécula está formada por bloques de enlaces (1→4) (2 ó 3) separados por un único enlace (1→3). Sin embargo, cada 50-80 restos pueden aparecer irregularidades en la secuencia, consistentes en una serie del orden de 10 restos contiguos unidos por enlaces (1→4).

Otros polisacáridos hemicelulósicos presentes en las paredes celulares son los **mananos**, que constituyen un grupo muy heterogéneo en el que la manosa es el componente mayoritario. Su cadena central puede estar formada únicamente por restos de D-manosa unidos por un enlace $\beta(1\rightarrow4)$ o presentar restos de D-glucosa intercalados (glucomananos). Ambos tipos pueden presentar sustituciones de D-galactosa unidas por un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ a los restos de manosa (galactomananos y galactoglucomananos). Aunque su presencia es muy escasa en paredes celulares primarias, los (galacto)mananos tienen importancia cuantitativa como componentes de reserva de algunas semillas, mientras que los (galacto)glucomananos están presentes en cantidades significativas en paredes secundarias de tejidos lignificados de coníferas (12-15 %) y, en menor cantidad, de angiospermas (3-5 %).

a) $\beta(1-3)(1-4)$ -D-glucano



b) Xiloglucano



c) Arabinoxilano

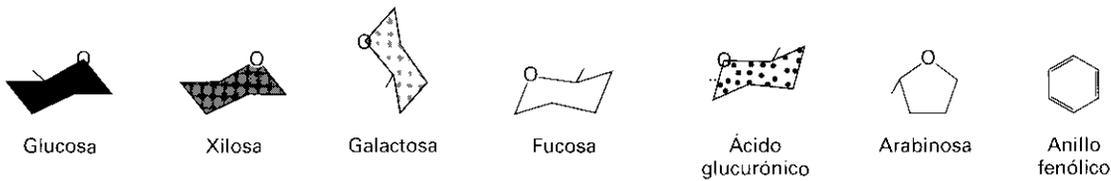
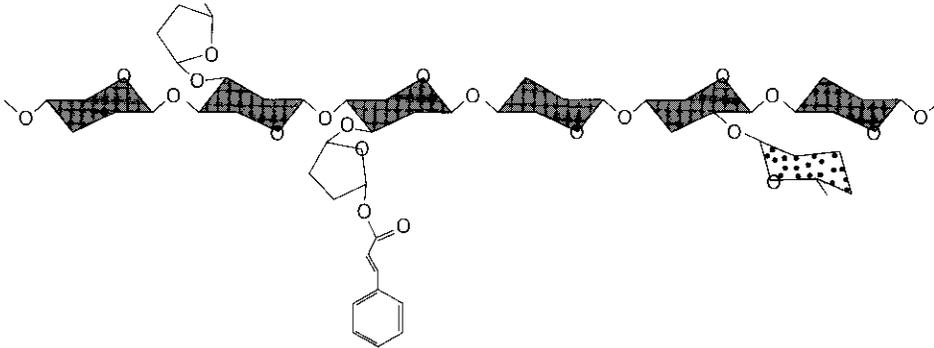


Figura 1-6. Estructura de los principales polisacáridos hemicelulósicos. a) $\beta(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)$ -D-glucano. b) Xiloglucano. c) Glucuroarabinoxilano. En el caso del xiloglucano, para mayor claridad del esquema, se ha separado por una línea discontinua de mayor longitud el enlace glicosídico entre la galactosa y la xilosa de la cadena lateral. Las flechas indican los enlaces susceptibles de hidrólisis por endo- $\beta(1-3)$, (1-4)-D-glucanasa en a) y endo- $\beta(1-4)$ -D-glucanasa en b).

4.1.3. Las pectinas presentan una gran complejidad estructural

Los polisacáridos pécticos o **pectinas** son unos de los polímeros conocidos más complejos, constituidos por una mezcla de polímeros ácidos y neutros. Están presentes en las paredes celulares de todas las plantas, aunque su importancia cuantitativa varía desde alrededor

del 35% en paredes primarias de dicotiledóneas hasta el 5% en las de gramíneas. Se caracterizan por su capacidad de formar geles y se considera que su presencia en las paredes celulares determina su porosidad, proporciona superficies cargadas que modulan el pH y el balance iónico y sirven como moléculas de reconocimiento a señales tales como organismos simbióticos, patógenos e insectos.

Las pectinas ácidas están constituidas por una alta proporción de restos de ácido D-galacturónico unidos mediante un enlace $\alpha(1\rightarrow4)$ (Fig. 1-7). Las cadenas constituidas únicamente por ácido galacturónico reciben el nombre de **homogalacturonanos** y su longitud es muy variable. Los grupos carboxilo de los restos galacturonosil pueden encontrarse esterificados con metanol o libres. Los grupos carboxilo libres pueden estar disociados y dar lugar a la formación de puentes de Ca^{2+} , que constituyen la estructura conocida como **caja de huevos** (Fig. 1-7).

Sin embargo, las cadenas de homogalacturonano no son muy frecuentes en las paredes celulares ya que normalmente presentan restos de L-ramnosa intercalados, enlazados en $\alpha(1\rightarrow2)$. El **ramnogalacturonano I** (RG I) presenta una mayor proporción de ramnosa, a menudo en posición alternante, y son estos restos de ramnosa los puntos de anclaje de las cadenas laterales (Fig. 1-7). Así, aproximadamente la mitad de los mismos puede estar unida en posición C-4 a cadenas constituidas por L-arabinosa y D-galactosa, con un grado de polimerización variable. Debido a que los restos de ramnosa se presentan con una frecuencia variable, dentro de las pectinas hay regiones mucho más ramificadas que otras. El **ramnogalacturonano II** (RG II) es un polisacárido relativamente pequeño (grado de polimerización aproximado de 60), con una estructura muy compleja ya que es el que presenta mayor número de azúcares y enlaces diferentes. Así, está constituido por ácido galacturónico, ramnosa, arabinosa y galactosa junto a pequeñas cantidades de azúcares poco frecuentes como 2-O-metilfucosa, 2-O-metilxilosa, apiosa, 3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilosa y ácido 3-deoxi-mano-octulosónico (KDO). A diferencia del RG I, los restos de ramnosa

pueden presentar enlaces en 3, 3,4 y 2,3,4 o ser terminales. También se pueden formar enlaces con boro entre cadenas del RG II, posiblemente a través de la apiosa.

Las pectinas de naturaleza neutra están constituidas por L-arabinosa, D-galactosa o ambas. Los **arabinanos** están formados por restos de L-arabinosa unidos mayoritariamente por un enlace $\alpha(1\rightarrow5)$, algunos unidos en 2 y 3 a otros restos de arabinosa. Los **galactanos** están formados por una cadena de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-galactano con algunas ramificaciones de galactosa enlazadas en 6. Puede haber sustituciones de $\alpha(1\rightarrow5)$ arabinano en proporción variable en el carbono 3 de los restos de galactosa, lo que recibe el nombre de arabinogalactano I. El **arabinogalactano II** es más abundante y contiene restos de D-galactosa enlazados en 3, 6, y 3, 6, y de L-arabinosa enlazados en 3 y 5. Tanto la arabinosa como la galactosa pueden asociarse a ácido ferúlico mediante un enlace éster, lo que posibilita la formación de enlaces entre distintas cadenas mediante puentes diferulil por la acción de las peroxidasas presentes en las paredes celulares.

4.1.4. Las proteínas estructurales presentan secuencias repetitivas

Las paredes celulares contienen también diferentes proteínas, tanto estructurales como enzimáticas, que en las paredes primarias llegan a constituir el 10% de su peso. La mayoría corresponde a glicoproteínas, aunque el grado de glicosilación es muy variable, caracterizándose también por la presencia de secuencias repetitivas que pueden ser compartidas entre varias. Entre las proteínas estructurales, **la proteína rica en hidroxipropi-**

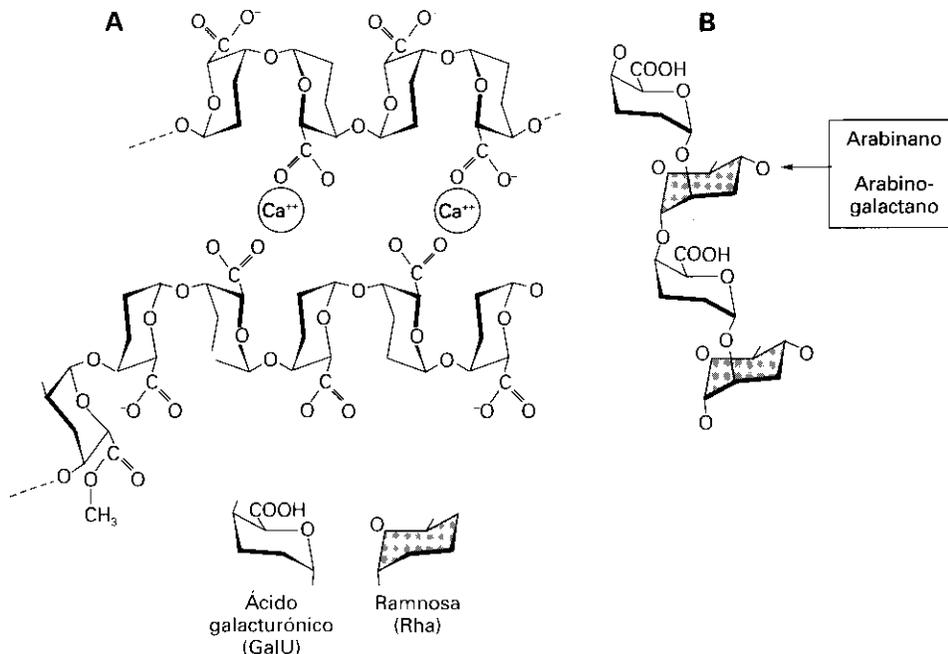


Figura 1-7. Estructura de los principales polisacáridos pécticos. **A)** Región de homogalacturonano formando puentes de calcio. **B)** Ramnogalacturonano I.

na (**extensina**) es la mejor caracterizada de todas ellas. Esta glicoproteína debe su nombre a la presencia de hidroxiprolina (Hyp) como aminoácido mayoritario (~46%), que junto a otros cinco aminoácidos (serina, histidina, valina, tirosina y lisina) constituye más del 90% de la misma. Está formada por numerosas secuencias repetidas de serina-(Hyp)₄ y tirosina-lisina-tirosina, responsables de su estructura secundaria y terciaria. Los residuos de tirosina pueden formar puentes intramoleculares de isoditrosina, que aumentan la rigidez y el carácter hidrófobo de la molécula. La glicosilación de la proteína tiene lugar a través de serina e hidroxiprolina, de manera que la serina se encuentra unida a un resto de galactosa, mientras que la hidroxiprolina sirve de anclaje a tri o tetraarabinanos que sirven para estabilizar la estructura de la proteína. Otras proteínas relacionadas son las proteínas ricas en prolina y las proteínas ricas en glicina, mientras que las gramíneas contienen proteínas ricas en treonina y proteínas ricas en histidina, similares a la extensina de dicotiledóneas. Todas estas proteínas se presentan en diferentes cantidades en las paredes de los diferentes tipos de células, por lo que se asume que tienen funciones específicas en cada tipo de células. Aunque no hay pruebas directas de cuáles pueden ser estas funciones, probablemente todas tengan importancia estructural, así como en la morfogénesis (véase Capítulo 18). Por el contrario, las **proteínas-arabinogalactano** son proteínas solubles que no están covalentemente enlazadas a la pared celular, por lo que no tienen una función estructural y, posiblemente, participen en la diferenciación (véase Capítulo 18).

4.1.5. *La diversidad de las enzimas asociadas a las paredes es una muestra de su dinamismo*

Las paredes celulares contienen también diferentes tipos de enzimas que les confieren una alta actividad metabólica. Prácticamente todas son glicoproteínas, aunque su grado de asociación, tipo de acción y función pueden ser muy diferentes. Todas ellas son enzimas que utilizan sustratos sencillos (O₂, H₂O₂, H₂O) compatibles con las condiciones existentes en el apoplasto, con pH óptimo entre 4.0 y 6.0. La misma actividad enzimática suele estar presente en las paredes con diferente grado de asociación; así, las mismas enzimas pueden estar solubles en el apoplasto y enlazadas a las paredes de forma iónica y covalente. Aunque esta diversidad en el grado de asociación es un hecho generalizable a la mayoría de las enzimas de la pared, no se conoce su significado funcional.

El Cuadro 1-4 resume los principales grupos de enzimas presentes en las paredes. En general, se han detectado actividades enzimáticas capaces de actuar sobre prácticamente todos los componentes estructurales de las paredes celulares, incluidas las de los patógenos, así como sobre distintas sustancias presentes en el apoplas-

to. Si consideramos los polisacáridos estructurales, la dotación de glicanasas presentes en las paredes sería suficiente para degradarlos casi completamente. Sin embargo, esto no ocurre *in vivo*, es decir, la regulación de su actividad es un imperativo biológico. Las pruebas experimentales sobre la regulación de dichas enzimas, la accesibilidad del sustrato, la actividad *in vivo* de las distintas formas presentes, etc., todavía son escasas y no permiten establecer un mecanismo generalizable de regulación de su actividad.

En la pared celular se encuentran también las **expansinas**, proteínas de pequeño tamaño que inducen la extensión de la pared *in vitro*, probablemente rompiendo los enlaces de hidrógeno entre los polisacáridos de la matriz y la celulosa. No tienen actividad hidrolítica ni transglicosilasa y son las únicas proteínas asociadas a la pared capaces de inducir la extensión de la misma *in vitro* (véase Capítulo 19).

4.1.6. *La presencia de lignina proporciona una mayor resistencia y rigidez a las paredes celulares*

La **lignina** es un polímero complejo constituido a partir de los alcoholes aromáticos *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos entre sí por enlaces éter o carbono-carbono (véase Capítulo 17). La composición monomérica, así como el tipo de enlaces entre ellos y su organización en la macromolécula varían entre las diferentes especies. La polimerización puede tener lugar mientras estén disponibles tanto precursores activados como espacio en la pared, de manera, que la molécula tiende a llenar todo el espacio en la pared no ocupado por otras macromoléculas, desplazando el agua. La estructura polimérica de la lignina no sólo se entrelaza con las microfibrillas de celulosa, sino que también se une a las hemicelulosas (arabinoxilano) y pectinas (arabinogalactano) mediante enlaces éster a través de sus restos hidroxicinnámicos.

El resultado es una red hidrófoba que rodea los demás componentes de la pared a la que confiere una mayor resistencia tanto física como química, además de una gran rigidez. Es especialmente abundante (20-30% del peso de la pared) en células conductoras (vasos xilemáticos) y estructurales (fibras) con engrosamiento secundario.

4.2. **La estructura de las paredes es el resultado de una serie de redes poliméricas entrelazadas**

La pared celular es una entidad molecular compleja, formada por distintos componentes capaces de autoensamblarse. A pesar del avance en el conocimiento de la pared celular durante los últimos 30 años, la estructura de la pared celular primaria sigue sin conocerse com-

Cuadro 1-4. Principales tipos de enzimas asociadas a las paredes celulares

Enzima	Sustrato	Función
Oxidorreductasas		
Peroxidasas	Tirosina (proteínas ricas en hidroxiprolina)/H ₂ O ₂ Fenil ésteres (pectinas, arabinxilano)/H ₂ O ₂ Monolignoles/H ₂ O ₂	Formación de puentes de isoditrosina Formación de puentes difenil Lignificación
Malato dehidrogenasa	Malato/NAD ⁺	Formación de NADH
NADH oxidasa	NADH/O ₂	Formación de H ₂ O ₂
Lacasas	Monolignoles/O ₂	Lignificación
Hidrolasas		
Exo-glicanasas	Hemicelulosas y pectinas	Eliminación de monosacáridos de los extremos no reductores
Endo-glicanasas	Hemicelulosas y pectinas	Despolimerización
Pectín-metil esterasa	Poligalacturonosil metil ésteres	Desesterificación de pectinas
Transglicosilasas		
Xiloglucano endo-transglicosilasa	Xiloglucano	Extensión de la pared celular Incorporación de nuevas cadenas de xiloglucano

pletamente. Desde el primer modelo propuesto por el grupo de Albersheim, los distintos modelos que se fueron proponiendo al conocerse más los distintos componentes de la pared se basaban en que los polisacáridos matriciales estarían unidos entre sí por enlaces covalentes y a las microfibrillas de celulosa por puentes de hidrógeno a través del xiloglucano. Sin embargo, los enlaces covalentes entre hemicelulosas y pectinas no se han podido confirmar y los modelos actuales se basan en la existencia de redes independientes pero que interactúan entre sí: una formada por la unión de celulosa y hemicelulosas (generalmente xiloglucano y, en gramíneas, glucuronoarabinxilano); otra formada por polisacáridos pécticos que estaría embebiendo a la anterior y una tercera formada por proteínas o fenilpropanoides (Fig. 1-8). Sin embargo, aunque se conocen los tipos de dominios estructurales presentes en hemicelulosas y pectinas, no sabemos cómo contribuyen individualmente al establecimiento y mantenimiento de las redes o cómo influyen en las propiedades de la pared. En los últimos años, la utilización de técnicas no destructivas (RMN, FTIR) en el estudio de las paredes celulares está permitiendo un mayor conocimiento de los tipos de enlaces entre los distintos componentes de la pared, así como la disposición de los mismos.

4.3. Biogénesis de la pared celular

A lo largo de la vida de una célula, desde su formación (citoquinesis) hasta que alcanza su forma y tamaño de-

finitivos, la composición y estructura de su pared sufren cambios continuos, que implican la síntesis e incorporación de nuevos componentes (polisacáridos, proteínas y fenoles) en la misma. En esta sección trataremos la síntesis de los polisacáridos estructurales (celulosa y polisacáridos matriciales), ya que la síntesis del resto de los componentes se trata en otros capítulos.

4.3.1. La celulosa se sintetiza en la superficie de la membrana plasmática

La síntesis de **celulosa** en las plantas tiene lugar en la membrana plasmática, catalizada por un complejo multienzimático (roseta), que sintetiza de forma simultánea numerosas cadenas de β-glucano que se asocian para formar una microfibrilla de celulosa cristalina. Estas rosetas se observan por criofractura en el extremo de las microfibrillas en crecimiento y su aparición en las membranas coincide con la síntesis de celulosa. Sin embargo, aunque la celulosa es una molécula relativamente simple, y su biosíntesis tiene lugar en casi todas las células de las plantas, la síntesis *in vitro* de este polímero ha tenido un éxito muy escaso, probablemente debido a que la actividad depende de la orientación de las rosetas en la membrana, por lo que el aislamiento de las membranas provoca la pérdida de la capacidad de síntesis de celulosa. De todas formas, se ha podido identificar la UDP-glucosa, originada a partir de la sacarosa por la acción de la sacarosa sintasa, como el precursor más probable (Cuadro 1-5).

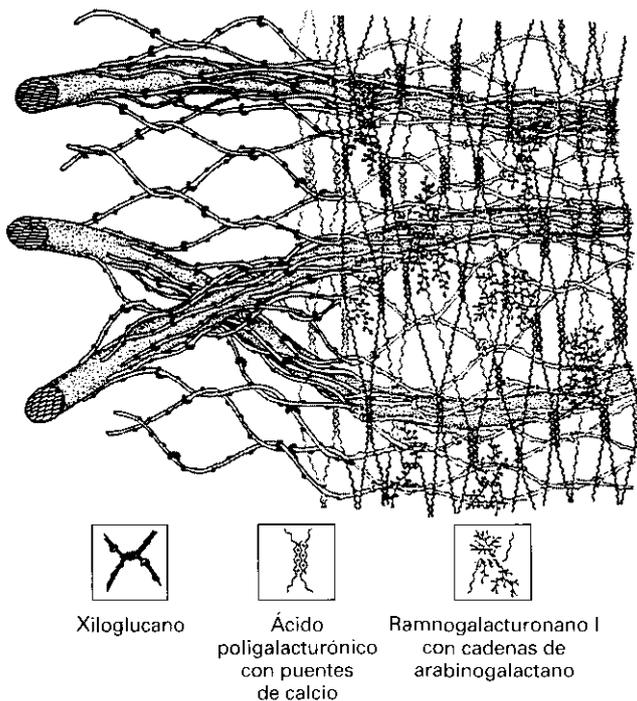


Figura 1-8. Representación esquemática de la estructura de la pared celular primaria de una planta dicotiledónea. Modelo de redes interdependientes entre los distintos componentes de la pared celular. Adaptado de: Carpita, N. C. y Gibeaut, D. M. *Plant J*, 3: 1-30, 1993.

Por el contrario, la síntesis de celulosa por la bacteria *Acetobacter xylinum* ha sido completamente caracterizada, lo que ha permitido conocer la secuencia genómica que codifica esta proteína. Desgraciadamente, la utilización de la secuencia de la subunidad catalítica de la celulosa sintasa de *A. xylinum* como sonda en las genotecas de cDNA vegetal no ha permitido hasta el momento identificar ningún gen homólogo. Sin embargo, recientemente se ha caracterizado un mutante termo-sensible de *Arabidopsis thaliana* alterado en la síntesis de celulosa. Este mutante (*rsw1*), a temperatura restrictiva (31°C) presenta menores niveles de celulosa cristalina que la variedad silvestre al tiempo que acumula β(1→4)-glucano no cristalino, observándose también la disgregación de los complejos (rosetas) de la celulosa sintasa en la membrana plasmática. Los resultados ob-

Cuadro 1-5. Nucleótidos utilizados como precursores en la síntesis de los polisacáridos estructurales

Nucleótido precursor	Polisacárido
UDP-glucosa, UDP-xilosa, GDP-fucosa UDP-glucosa	xiloglucano celulosa, glu- cano mixto
UDP-xilosa, UDP-arabinosa, UDP-glucurónico	xilanos
UDP-galactosa, UDP-galacturónico GDP-glucosa, GDP-manosa	pectinas mananos

tenidos indican que la cristalización de las **microfibrillas** requiere la unión correcta del producto del gen *RSW1* en los complejos, mientras que la biosíntesis del β-glucano no la necesita. Por otra parte, la transformación del mutante con el gen *RSW1* restaura el fenotipo normal. Esta complementación es la primera evidencia de la participación de un gen en la formación de las microfibrillas de celulosa. Por otra parte, en plantas de algodón se han identificado dos genes (*CelA1* y *CelA2*) que presentan regiones muy conservadas relacionadas con la subunidad catalítica de β-glicosiltransferasas de bacterias. Aunque la expresión de estos genes presenta una alta correlación con la velocidad de síntesis de celulosa, todavía no hay pruebas concluyentes de su intervención en este proceso.

4.3.2. El aparato de Golgi se encarga de la síntesis de los polisacáridos matriciales

Los polisacáridos no celulósicos se sintetizan en el **aparato de Golgi**, se empaquetan en vesículas secretoras y se exportan a la superficie donde se integran con las microfibrillas de celulosa. A pesar de que su estructura es más compleja que la de la celulosa, se ha conseguido la síntesis *in vitro* de la mayor parte de ellos, ya que las membranas aisladas retienen gran parte de la actividad de las glicosiltransferasas implicadas, lo que ha permitido su caracterización, al menos parcial. En todos los casos identificados hasta el momento se ha comprobado que se trata de proteínas unidas a membranas que utilizan como precursores los nucleótidos de los monosacáridos (Cuadro 1-5). Sin embargo, aunque las preparaciones de membranas son capaces de incorporar precursores marcados en polisacáridos, no se han caracterizado los productos en todos los casos, por lo que no es posible asegurar qué tipos de glicosiltransferasas están actuando. Las síntesis mejor conocidas son las de los glucanos no celulósicos (xiloglucano, galactomananos y glucano mixto) entre las de hemicelulosas y la del homogalacturonano entre las de pectinas.

El **xiloglucano** se sintetiza por la acción simultánea de glucosil y xilosiltransferasas que utilizan UDP-glucosa y UDP-xilosa, respectivamente, mientras que el resto de los azúcares de las cadenas laterales se une de forma independiente. Así, aunque no se tiene mucha información acerca de la unión de galactosa, se sabe que la adición de fucosa tiene lugar por una fucosiltransferasa que transfiere un resto de fucosa a partir de GDP-fucosa al xiloglucano previamente galactosilado.

El **glucano mixto**, polisacárido típico de las paredes celulares de gramíneas, está constituido por restos de glucosa unidos por enlaces β(1→3) y β(1→4), distribuidos regularmente a lo largo de la molécula. Las membranas aisladas sintetizan, a partir de UDP-glucosa, un polisacárido idéntico al producido *in vivo*; sin embargo, todavía no se sabe si una única glucosiltrans-

ferasa cataliza la formación de los dos tipos de enlaces, o si se trata de dos glucosiltransferasas, cada una responsable de uno de los dos tipos de enlace, que actúan de forma coordinada.

La síntesis de **galactomananos** se ha estudiado en endospermo de semillas que lo acumulan como sustancia de reserva. Interactúan dos enzimas, una $\beta(1\rightarrow4)$ -manosiltransferasa dependiente de GDP-manosa y una $\alpha(1\rightarrow6)$ -galactosiltransferasa dependiente de UDP-galactosa muy específica, que regula el grado de sustitución y la distribución de los sustituyentes a lo largo de la cadena de manano.

En cuanto a las **pectinas**, se ha demostrado que la síntesis de homogalacturonano a partir de UDP-galacturónico tiene lugar en el aparato de Golgi. Por otra parte, también se ha identificado una metiltransferasa que, utilizando S-adenosil metionina como donador de los grupos metilo, da lugar a la metil-esterificación de los restos galacturonosil de las pectinas. En general, las pectinas se sintetizan en el aparato de Golgi con un alto grado de metilesterificación, que disminuye posteriormente en la pared celular por la acción de pectinmetil-esterasas.

4.4. Las paredes celulares primarias son capaces de extenderse

Como hemos visto al inicio del apartado 4 de este capítulo, la pared celular limita el volumen de las células. Sin embargo, las células, una vez que se forman por división celular, han de crecer, esto es, aumentar irreversiblemente de tamaño. Así, nos encontramos con la paradoja de que las paredes celulares han de limitar el aumento de volumen del protoplasto, al mismo tiempo que han de permitir el crecimiento de las células. Únicamente las paredes primarias serán capaces de disminuir su rigidez, permitiendo un cierto grado de extensión por la presión de turgencia, para volver a aumentar su rigidez a continuación, fijando dicha extensión y evitando el aumento ilimitado del volumen del protoplasto y, por tanto, su explosión. Además, la pared no sólo controla el crecimiento de la célula, sino que también condiciona su dirección. La anisotropía de las paredes, basada fundamentalmente en la disposición de las microfibrillas de celulosa, será la responsable de la dirección del crecimiento.

La pared celular primaria está constituida por celulosa, hemicelulosas, pectinas y una pequeña cantidad de proteínas estructurales. Dicha pared, inicialmente rígida, ha de sufrir una serie de modificaciones bioquímicas que disminuyan su rigidez, aumenten su capacidad de extenderse bajo la acción de la **presión de turgencia**, que actúa como fuerza conductora, y permitan el incremento en volumen del protoplasto. La formación de nuevos enlaces y la incorporación de nuevos componentes a la pared la transformará otra vez en una pared rígida, lo que convierte el incremento de volumen en un

proceso irreversible, esto es, en crecimiento (véanse Capítulos 18 y 19).

En paredes celulares primarias, la red polimérica que mantiene la cohesión de su estructura y le confiere rigidez es la red celulosa-hemicelulosas que, excepto en gramíneas, está constituida por las microfibrillas de celulosa unidas entre sí por cadenas de xiloglucano mediante puentes de hidrógeno. Así, las cadenas de xiloglucano impedirán la separación de las microfibrillas. La ruptura y el alargamiento de las cadenas de xiloglucano y la ruptura de los puentes de hidrógeno entre dicho polímero y la celulosa permitirían la separación de las microfibrillas y, por tanto, la **extensión de la pared**.

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, se han postulado tres posibles mecanismos que podrían estar involucrados en la pérdida de rigidez de las paredes primarias. 1) La acción puntual de una endo- $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucanasa que rompiera la cadena de xiloglucano permitiría la separación de las microfibrillas. Este mecanismo necesitaría la incorporación de nuevas cadenas de xiloglucano para evitar el progresivo debilitamiento de la estructura. 2) La xiloglucano-endotransglicosilasa (XET), al alargar las cadenas de xiloglucano, permitiría una mayor separación entre las microfibrillas sin debilitar la estructura de la red polimérica. Esta misma enzima participaría en la incorporación a la red de las cadenas de xiloglucano sintetizadas *de novo*. 3) Las expansinas romperían puntualmente los puentes de hidrógeno entre las cadenas de glucano de las microfibrillas y las cadenas de xiloglucano. Al estar la pared sometida a tensión, aunque dichos puentes se volverían a formar de manera espontánea, lo harían en distinta posición, contribuyendo a fijar la extensión.

Los factores necesarios para que los tres mecanismos propuestos anteriormente puedan tener lugar, parecen estar presentes en todas las paredes celulares. Sin embargo, ni la glucanasa ni la XET son capaces de inducir *in vitro* la extensión de las paredes aisladas, mientras que la expansina sí lo hace. Por ello, actualmente se piensa que la expansina es imprescindible para que tenga lugar la extensión de la pared, si bien tanto las glicanasas como la XET cooperarían en la modulación del mecanismo de pérdida de rigidez de la pared celular.

Al mismo tiempo que las paredes primarias se extienden por la repetición del ciclo de extensión de la misma, la síntesis de nuevos componentes así como su incorporación en la estructura de la pared con la formación de puentes interpoliméricos, puentes diferulil e isoditrosina, catalizada por la acción de las peroxidases, disminuyen progresivamente su extensibilidad y dan lugar al cese del crecimiento celular. La red de pectinas, unida por puentes diferulil, y la de proteínas ricas en hidroxiprolina, unida por puentes de isoditrosina, se entrelazan con la red celulosa-hemicelulosas y restringen la separación de las microfibrillas y, por tanto, la extensión de la pared.

4.5. Las propiedades físico-químicas de las paredes celulares dependen de su composición

La abundancia relativa de los diversos componentes poliméricos de las paredes celulares les confiere diferentes propiedades que determinan las funciones de los distintos tipos celulares presentes en las plantas (Cuadro 1-6).

Porosidad. El entramado de redes poliméricas que constituyen la pared celular representa un filtro que limita la difusión de las moléculas en función de su tamaño. La determinación experimental del diámetro de los poros de las paredes celulares presenta variaciones relativamente importantes, no sólo entre los distintos tipos de células, sino también dependiendo del método utilizado. En general, el diámetro de dichos poros oscila entre 3.5 y 6.0 nm, que corresponde aproximadamente a un abanico de masas moleculares entre 13 y 65 kDa. Evidentemente, el tamaño de los poros no supone ninguna restricción a la difusión de las moléculas de pequeño tamaño como sacarosa, aminoácidos, fitohormonas, etc. Sin embargo, tendrá una gran importancia en el caso de macromoléculas como proteínas y polisacáridos, al restringir su movilidad a través de la pared.

Carga eléctrica. En general, las paredes celulares en el margen de su pH fisiológico (4.5-6.0) tienen una carga neta negativa debido a los grupos carboxilo de los restos galacturonosil de las pectinas y glucuronosil de los xilanos. Esta carga eléctrica puede contrarrestarse, en parte, por las proteínas cargadas positivamente y por la presencia de cationes, fundamentalmente Ca²⁺.

Cohesión celular. La zona más externa de las paredes celulares, la **lámina media**, está enriquecida en pectinas que, a través de la formación de puentes de calcio en las regiones de homogalacturonano (estructura en

caja de huevos), actúan como sustancias cementantes, uniendo las paredes de las células contiguas.

Hidratación y naturaleza hidrófoba. En general, los polisacáridos son hidrófilos de tal forma que las paredes, en principio, presentarán una fase acuosa que permitirá el movimiento de los solutos, siempre y cuando su difusión no se vea restringida por la carga eléctrica o superen el tamaño de los poros. Así, las paredes primarias presentan un contenido en agua de alrededor del 65%. Sin embargo, las paredes celulares secundarias, según el patrón de diferenciación celular que sigan, pueden acumular lignina que, al ser de naturaleza hidrófoba desplaza el agua e impermeabiliza la pared. El depósito de **suberina** (paredes radiales de las células de la endodermis) y **cutina** (células epidérmicas), compuestos de naturaleza hidrófoba, también impermeabiliza la pared. La impermeabilidad de las paredes, que impide el tráfico de sustancias hidrosolubles entre las distintas células, hace necesaria la aparición de estructuras especiales como plasmodesmos, punteaduras, placas cribosas, etc., que permitan dicho transporte en zonas localizadas.

Resistencia química. Las paredes, además de constituir una barrera física que limita el acceso de patógenos al protoplasto, contienen estructuras relativamente resistentes a la degradación química. Así, las **microfibrillas de celulosa**, al presentar un alto grado de empaquetamiento de las cadenas de β-(1→4)-D-glucano, dificultan la degradación por celulasas de origen bacteriano. Otro polímero resistente a la degradación enzimática es la **lignina**. Las **proteínas ricas en hidroxiprolina**, insolubles en las paredes celulares por la existencia de puentes de isoditrosina, constituyen una estructura altamente resistente a la degradación por proteasas debido a la abundancia de restos de hidroxiprolina. La acumulación de estos compuestos, proteínas ricas en hidroxiprolina en paredes primarias y lignina en las secundarias, ofrece una barrera pasiva a la penetración de microorganismos. Sin embargo, la pared no sólo es una barrera pasiva, sino que también puede responder activamente a estímulos externos, aumentando la síntesis de proteínas ricas en hidroxiprolina, la síntesis de fitoalexinas (véanse Capítulos 17 y 30), etc.

Resistencia mecánica. Los dos polímeros que confieren resistencia mecánica a las paredes celulares son la celulosa y la lignina. Consideradas individualmente cada una de las microfibrillas de celulosa, y debido a su estructura de tipo **pseudocristalino**, ofrecen gran resistencia mecánica en la dirección de la fibra, mientras que en la dirección perpendicular la resistencia será mínima. Es decir, el ordenamiento paralelo de las microfibrillas da lugar a una gran resistencia mecánica en la dirección de las microfibrillas. La combinación de capas sucesivas de pared celular, cada una de ellas con

Cuadro 1-6. Relación entre los componentes de las paredes celulares y las propiedades funcionales de las mismas

Componente	Propiedades funcionales
Pectinas	Porosidad. Carga eléctrica. Cohesión celular
Celulosa	Resistencia mecánica en la dirección en la que están orientadas las microfibrillas
Lignina	Carácter hidrófobo. Resistencia mecánica
Cutina	Impermeabilización
Suberina	Impermeabilización
Proteínas ricas en hidroxiprolina	Resistencia química

ordenamiento paralelo de sus microfibrillas, pero con diferente orientación entre sí, conferirá al conjunto de la pared celular una gran resistencia mecánica en las distintas direcciones. Aunque no se conoce el mecanismo de control de la dirección en que se depositan las microfibrillas sintetizadas *de novo* por los complejos terminales (rosetas) de la membrana plasmática, sí se sabe que está relacionado con la disposición de los microtúbulos.

RESUMEN

Las células están constituidas por distintos compartimentos con funciones diferentes. Esta compartimentación está basada en las características estructurales y funcionales de las membranas. El carácter hidrófobo de las membranas permite separar las fases acuosas de los distintos compartimentos, al mismo tiempo que constituye el soporte físico de aquellas reacciones que no tendrían lugar en presencia de un medio hidrófilo. Además, la diferente dotación proteica de las distintas membranas de la célula permite diferentes mecanismos específicos de transporte a través de las mismas y, en consecuencia, la existencia de ambientes químicos diferenciados en cada uno de los compartimentos. Este diferente ambiente químico, a su vez, permite la especialización metabólica de los distintos compartimentos.

Por otra parte, la pared celular de las células vegetales les permite independizarse de las condiciones osmóticas del apoplasto, a la vez que les proporcionan la forma y el tamaño. Además, las diferencias en la composición y estructura de las paredes, al condicionar sus propiedades, determinan la funcionalidad de los distintos tipos celulares presentes en las plantas.

En resumen, podríamos decir que mientras que las membranas permiten la especialización de los distintos compartimentos celulares, las paredes son uno de los rasgos más característicos de la especialización celular.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Defina los conceptos de simplasto y apoplasto.
2. ¿Qué ventajas tienen las plantas cuyas células presentan membranas con un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados?
3. ¿Qué características de las membranas permiten la compartimentación celular?
4. ¿Podrían sobrevivir las células vegetales sin pared celular?
5. ¿Dónde tiene lugar la síntesis de los polisacáridos estructurales de las paredes celulares?
6. ¿Qué papel se ha postulado para las expansinas en el crecimiento celular?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Carpita, N.: «Structure and biosynthesis of plant cell walls». En: *Plant Metabolism*. 2.^a ed. D. T. Dennis, D. H. Turpin, D. D. Lefebvre y D. B. Layzell (eds.). pp. 124-147. Addison Wesley Longman, Essex (Inglaterra), 1997.
2. Chapple, C., Carpita, N.: «Plant cell walls as targets for biotechnology». *Curr Opin Plant Biol* 1: 179-185, 1998.
3. Cosgrove, D. J.: «Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants». *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13: 171-201, 1997.
4. Murata, N., Los, D. A.: «Membrane fluidity and temperature perception». *Plant Physiol*, 115: 875-879, 1997.
5. Nicol, F., Höfte, H.: «Plant cell expansion: scaling the wall». *Curr Opin Plant Biol*, 1: 12-17, 1998.
6. Nishitani, K.: «Construction and restructuring of the cellulose-xyloglucan framework in the apoplast as mediated by the xyloglucan-related protein family-A hypothetical scheme». *J Plant Res*, 111: 159-166, 1998.
7. Reid, J. S. G.: «Carbohydrate metabolism: Structural carbohydrates». En: *Plant Biochemistry*, P. M. Dey y J. B. Harborne (eds.). pp. 205-236. Academic Press, San Diego (USA), 1997.
8. Taylor, C. B.: «Factories of the future? Metabolic engineering in plant cells». *Plant Cell*, 10: 641-644, 1998.
9. Zarra, I., Revilla, G.: «Pared celular. Estructura y función». En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. J. Azcón-Bieto y M. Talón (eds.). pp. 1-24. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.

EL AGUA EN LA PLANTA

Manuel Sánchez-Díaz y Jone Aguirreolea

1. Introducción. 2. Propiedades del agua. 3. Cuantificación y terminología del estado hídrico en la planta. 4. Relaciones hídricas en células y tejidos. 5. Medida del potencial hídrico y sus componentes. 6. Movimiento del agua.

1. INTRODUCCIÓN

La vida está íntimamente asociada al agua, muy especialmente en su estado líquido, y su importancia para los seres vivos es consecuencia de sus propiedades físicas y químicas exclusivas. El agua es la forma en la cual el átomo de H, elemento esencial en todas las moléculas orgánicas, es absorbido y, posteriormente, asimilado durante la fotosíntesis (véanse Capítulos 10 y 11). Por tanto, ha de considerarse como un nutriente para la planta, de la misma manera que lo son el CO_2 o el NO_3^- . No obstante, la cantidad de agua que se requiere para el proceso fotosintético es pequeña y sólo constituye, aproximadamente, un 0.01 % de la cantidad total utilizada por la planta. La razón de esta baja utilización es que la mayoría de las funciones en las cuales participa son de naturaleza física. El agua es un disolvente para muchas sustancias tales como sales inorgánicas, azúcares y aniones orgánicos y constituye un medio en el cual tienen lugar todas las reacciones bioquímicas. Las moléculas de agua se adsorben en las superficies de las partículas formando capas de hidratación, que influyen en las reacciones físicas y químicas. El agua, en su forma líquida, permite la difusión y el flujo masivo de solutos y, por esta razón, es esencial para el transporte y distribución de nutrientes y metabolitos en toda la planta. También es importante el agua en las vacuolas de las células vegetales, ya que ejerce presión sobre el protoplasma y la pared celular, manteniendo así la turgencia en hojas, raíces y otros órganos de la planta. Con excepción de algunos tipos de semillas y unas pocas especies vegetales, la deshidratación de los tejidos por debajo de un nivel crítico se acompaña de cambios irreversibles en la estructura y, finalmente, de la muerte de la planta.

El agua, que es el componente mayoritario en la planta (aproximadamente un 80-90 % del peso fresco en plantas herbáceas y más del 50 % de las partes leñosas) afecta, directa o indirectamente, a la mayoría de los procesos fisiológicos. Por todo ello, la fisiología vegetal es, en gran medida, el estudio de las relaciones hídricas.

2. PROPIEDADES DEL AGUA

El agua es un compuesto muy peculiar. A diferencia de los hidruros de no metales (por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno, H_2S , o el amoníaco, NH_3), que son gases a temperatura ambiente, el agua es líquida. La razón de ello y de la mayoría de las propiedades poco corrientes del agua es que sus moléculas son **polares** y forman **puentes de hidrógeno** entre sí (Fig. 2-1); esto ocasiona un aumento en las temperaturas de fusión y ebullición.

Se denomina **cohesión** a la tendencia de las moléculas de agua a permanecer unidas por los puentes de hidrógeno. Esta es la razón de por qué las columnas finas de agua en los vasos xilemáticos pueden ascender sin romperse hasta la cima de un árbol; la cohesión imprime a la columna una tensión muy alta (véase Capítulo 4). Las moléculas de agua son también atraídas por otras moléculas polares y, por tanto, mojan superficies sólidas tales como el vidrio o las paredes celulares y forman **capas de hidratación** alrededor de iones y de macromoléculas tales como proteínas.

La cohesión de las moléculas de agua hace que se requiera una cantidad de energía muy elevada para provocar la evaporación; ésta es la razón de por qué la transpiración en las hojas tiene un efecto importante de

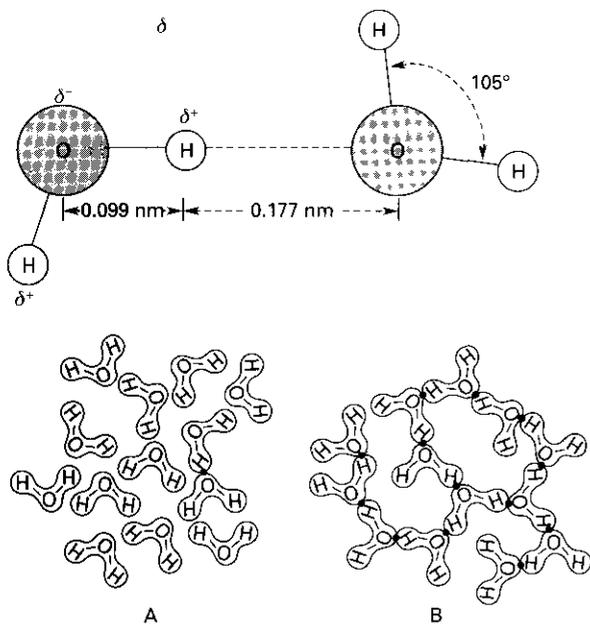


Figura 2-1. Parte superior. Diagrama esquemático de dos moléculas de agua unidas por un puente de hidrógeno. Este puente electrostático se basa en la naturaleza dipolar de la molécula: exceso de carga positiva en el H; exceso de carga negativa en el O. El puente posee una energía relativamente menor (aproximadamente 20 kJ mol⁻¹) que el enlace covalente (aproximadamente 400 kJ mol⁻¹). Parte inferior. Estructura del agua en la proximidad de a) 100 °C y b) 0 °C. Los puentes de H se indican mediante puntos negros (adaptado de Nobel 1974, Meidner y Sheriff 1976).

enfriamiento (véase Capítulo 3). Por otra parte, el empaquetamiento de las moléculas de agua en el estado líquido mediante puentes de hidrógeno es, de hecho, más eficaz (más moléculas por unidad de volumen) que en el estado sólido (hielo). Por ello el agua se expande cuando se congela, y existe riesgo de lesión tisular si se congela el agua celular.

3. CUANTIFICACIÓN Y TERMINOLOGÍA DEL ESTADO HÍDRICO EN LA PLANTA

Como base para comprender las relaciones planta-agua, se hace necesario definir y determinar el estado hídrico a nivel de célula, de órgano o, incluso, de planta entera.

3.1. El contenido hídrico relativo representa la cantidad de agua de un tejido en comparación con la que podría contener en hidratación completa

El estado hídrico de las plantas se puede estudiar en términos de **contenido hídrico** (CH), expresado como porcentaje del peso seco:

$$CH = \frac{P_f - P_s}{P_s} 100 \quad [2-1]$$

siendo:

P_f, peso fresco de la muestra

P_s, peso seco de la muestra, determinado después de mantenerla en estufa a 80 °C durante 24 horas.

No obstante, debido a que el peso seco puede experimentar cambios diarios y estacionales, las determinaciones comparativas del contenido hídrico basadas en el peso seco no son satisfactorias. Igualmente, si se expresa el contenido hídrico en relación al peso fresco, persisten los problemas que conlleva la modificación del peso seco y, además, se minimizan los cambios en el contenido hídrico. Así, por ejemplo, una reducción del 85 al 80 % en el contenido hídrico, expresado en función del peso fresco, parece una disminución muy pequeña y, sin embargo, puede suponer una pérdida del 30 % en relación con el contenido hídrico original.

Una forma de eliminar estos problemas consiste en expresar el contenido hídrico sobre la base del contenido hídrico a **plena turgencia**, es decir, al peso turgente (P_t), pasando a denominarse **contenido hídrico relativo** (CHR) o el parámetro complementario **déficit de saturación hídrica** (DSH):

$$CHR = \frac{P_f - P_s}{P_t - P_s} 100 \quad [2-2]$$

$$DSH = \frac{P_t - P_f}{P_t - P_s} 100 \quad [2-3]$$

El CHR y el DSH están relacionados de la siguiente manera:

$$CHR = 100 - DSH \quad \text{ó} \quad CHR + DSH = 100 \quad [2-4]$$

Por tanto, el CHR adquiere valores comprendidos en el siguiente intervalo:

$$0 < CHR \leq 100 \quad [2-5]$$

La relación que existe entre CHR y CH es:

$$CHR = CH \frac{P_s}{P_t - P_s} \quad [2-6]$$

Determinar el CHR requiere, por tanto, el conocimiento del estado de plena turgencia de la muestra, es decir, del grado de hidratación máxima de las células. La gran ventaja de la plena turgencia es que corresponde a un estado hídrico determinado, independientemente de la especie vegetal.

3.2. La capacidad de las moléculas de agua para moverse en un sistema particular se define como potencial hídrico (Ψ), que es una medida de la energía libre del agua en el sistema

Los conceptos anteriormente descritos (CHR y CH) no permiten determinar el sentido de los intercambios hídricos entre las diferentes partes de una planta ni entre el suelo y la planta. La magnitud que rige los movimientos del agua y que, de manera más frecuente, se ha venido utilizando para expresar el estado hídrico de la planta es el **potencial químico** μ , es decir, la variación de la energía libre (**energía libre de Gibbs**) del agua en un punto, debido a una variación, δn , de moles de agua que entran o salen de este punto, siendo constantes los otros parámetros (temperatura, presión, etc.). De donde:

$$\mu = (\partial G / \partial n) \quad [2-7]$$

El agua circula entre dos puntos siempre que su potencial termodinámico no sea idéntico entre dichos puntos. El potencial hídrico, Ψ , utilizando por los fisiólogos deriva de esta magnitud. Constituye la resultante de fuerzas de orígenes diversos (osmótica, capilar, de imbibición, turgente...) que liga el agua al suelo o a los diferentes tejidos del vegetal.

El **potencial hídrico** corresponde desde el punto de vista energético al trabajo que habría que suministrar a una unidad de masa de agua «ligada» al suelo, o a los tejidos de una planta, para llevarla de este estado de unión a un estado de referencia, correspondiente al del agua pura (a menudo denominada «libre» por oposición a «ligada») a la misma temperatura y la presión atmosférica. Como se adopta el valor cero para este potencial de referencia, todos los Ψ que caracterizan al agua ligada son negativos, puesto que sería necesario suministrar un trabajo para llevar este agua a un $\Psi = 0$.

La relación entre Ψ y μ se describe,

$$\Psi = \frac{\mu - \mu^0}{V} \quad [2-8]$$

siendo:

- Ψ , potencial hídrico de la muestra
- μ , potencial químico del agua en la muestra
- μ^0 , potencial químico de referencia del agua
- V , volumen molar del agua.

La ecuación dimensional del Ψ corresponde a la de una energía o trabajo, por unidad de volumen, es decir $FL/L^3 = F/L^2$. Es la ecuación dimensional de una presión lo que explica que las unidades en las cuales se expresa Ψ sean, frecuentemente, unidades de presión (en unidades SI, la energía se expresa en julios por metro cúbico, $J \cdot m^{-3}$, y la presión en pascals, Pa).

El potencial hídrico puede expresarse, asimismo, en función de la presión de vapor de la atmósfera en equilibrio con la de disolución acuosa, de acuerdo con la expresión:

$$\Psi = \frac{RT}{V} \ln(e/e_0) \quad [2-9]$$

Siendo R , la constante de los gases ($8.31 J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$); T , la temperatura absoluta ($^{\circ}K$); e y e_0 , la presión de vapor de la atmósfera y de saturación, respectivamente.

En muchos casos, se suele utilizar indistintamente el **volumen molar parcial** y el **volumen molar parcial del agua**. Por definición, el volumen molar parcial es el aumento en volumen de una cantidad infinita de solución molar, V_p , cuando se añade un mol de un componente A , permaneciendo constante el resto:

$$V_A = \partial V_v / \partial n_A \quad [2-10]$$

Por el contrario, el volumen molar parcial es el aumento en volumen de una cantidad infinita de solución molar, V_p , cuando se añade un mol de un componente A , permaneciendo constante el resto:

$$V_A = \partial V_1 / \partial n_A \quad [2-11]$$

No obstante, en la práctica, hay poca diferencia entre el uso de cantidades molares y molales cuando se describe el volumen ocupado por un mol de agua en el sistema ya que, en la mayoría de las ecuaciones que describen las relaciones hídricas, se consideran las disoluciones como ideales.

Si bien el término potencial y, en general, el tratamiento más antiguo que se conoce sobre el uso de los conceptos termodinámicos en plantas corresponde a Tang y Wang (1941), la gran aceptación de estos conceptos se debió a la propuesta conjunta de Taylor y Slatyer sobre una terminología unificada en los estudios de las relaciones planta-suelo-agua, en un congreso sobre Zonas Áridas celebrado en Madrid en 1959.

En un sistema particular, el potencial hídrico total es la suma algebraica de varios componentes:

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_s + \Psi_m + \Psi_g \quad [2-12]$$

Siendo Ψ_p , Ψ_s , Ψ_m y Ψ_g , respectivamente, componentes debidos a fuerzas de presión, osmótica, mática y gravitacional. El componente de presión (Ψ_p) representa la diferencia en presión hidrostática con la referencia y puede ser positivo o negativo. El componente osmótico (Ψ_s) es consecuencia de los solutos disueltos, disminuye la energía libre del agua y es siempre negativo. Más bien que referirse al **potencial osmótico**, que es negativo, muchas veces se utiliza el término **presión osmótica** ($\Pi = -\Psi_s$). Se puede demostrar que el po-

tencial osmótico se halla relacionado con la **fracción molar del agua** (χ_a) o su **actividad** (a_a) mediante:

$$\Psi_s = \frac{RT}{V} \ln(\gamma_a \chi_a) = \frac{RT}{V} \ln a_a \quad [2-13]$$

siendo γ_a un coeficiente de actividad que mide la separación del comportamiento ideal por la solución. A medida que aumenta la concentración de solutos, disminuyen χ_a y Ψ_s . Aunque γ_a es igual a 1 en soluciones muy diluidas, la mayoría de los sistemas vegetales muestra alguna separación del comportamiento ideal. Una aproximación útil de la ecuación 2-13, razonablemente precisa para muchas soluciones biológicas, es la relación de van't Hoff:

$$\Psi_s = -RTc_s \quad [2-14]$$

Siendo c_s la concentración de soluto expresada como mol m^{-3} de disolvente (o, más precisamente, como mol por 10^3 kg de disolvente). El potencial osmótico del jugo celular es aproximadamente -1 MPa (Nota: 1MPa = 10^6 Pa). Utilizando la ecuación 2-14 y sustituyendo el valor de RT a 20 °C (2437 J mol $^{-1}$), da una concentración total de solutos del jugo celular de $-(-10^6/2437) \cong 410$ osmol m^{-3} .

El **potencial mátrico** es similar a Ψ_s , excepto que la reducción de a_a es consecuencia de fuerzas en las superficies de los sólidos. La distinción entre Ψ_s y Ψ_m es, hasta cierto punto, arbitraria puesto que, frecuentemente, es difícil decidir si las partículas son solutos o sólidos, de tal manera que, muy a menudo, se suele incluir Ψ_m en Ψ_s .

El componente gravitacional (Ψ_g) es consecuencia de diferencias en energía potencial debidas a diferencia de altura con el nivel de referencia, siendo positivo si es superior al de referencia, y negativo cuando es inferior:

$$\Psi_g = \rho_a g h \quad [2-15]$$

siendo ρ_a la densidad del agua y h la altura por encima del plano de referencia. Aunque frecuentemente ignorado en sistemas vegetales, Ψ_g aumenta 0.01 MPa m^{-1} por encima del nivel del suelo y, por tanto, ha de incluirse cuando se considera el movimiento en árboles (véase Capítulo 4).

El potencial hídrico caracteriza, igualmente, el estado del vapor en el aire, siendo función de la **humedad relativa**:

$$\Psi = \frac{RT}{V} \ln \frac{HR}{100} \quad [2-16]$$

$$\Psi = 4.608 T \ln HR/100 \quad [2-17]$$

siendo:

Ψ , potencial hídrico en MPa

R, constante de los gases perfectos

V, volumen molar del agua

T, temperatura en grados Kelvin

HR, humedad relativa: $e/e_s(T_a) \times 100$ [e , presión del vapor de agua en el aire; $e_s(T_a)$, presión del vapor saturante del vapor de agua en el aire, a la temperatura del aire, T_a].

3.3. El potencial hídrico en las células vegetales está determinado, fundamentalmente, por el potencial osmótico (Ψ_s) y por el potencial de presión (Ψ_p)

El potencial hídrico de la planta (Ψ), consta de tres componentes:

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_s + \Psi_m \quad [2-18]$$

siendo Ψ_p , Ψ_s y Ψ_m los potenciales de presión, solutos y mátricos, respectivamente, en una célula o tejido vegetal. Para entender la naturaleza y contribución de los diferentes potenciales componentes del Ψ , consideremos una célula adulta (Fig. 2-2) que consta de tres fases distintas: una pared celular elástica, el citoplasma con el núcleo y los orgánulos y, por último, una vacuola central que contiene una solución diluida de azúcares, iones, ácidos orgánicos, etc. (véase Capítulo 1). La vacuola, que llega a ocupar entre el 80 y el 90 % del volumen total de tal célula, se halla rodeada por el tonoplasto, que es también una membrana semipermeable. Se considera, por tanto, que los intercambios de agua celular están controlados por la vacuola y, además, que la célula parenquimatosa madura se comporta como un

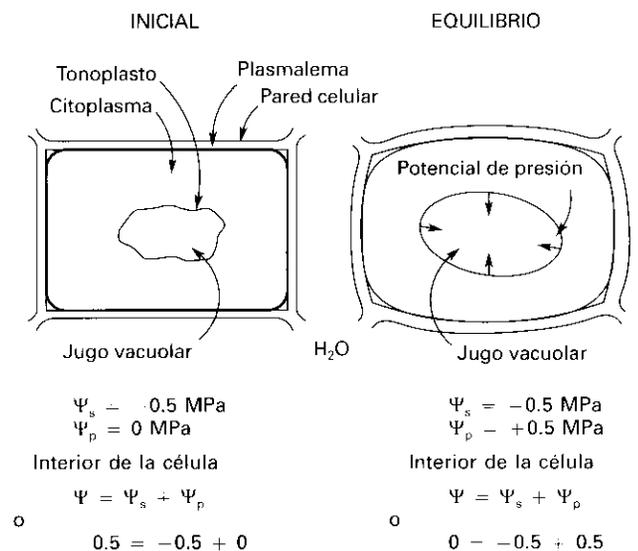


Figura 2-2. Movimiento del agua entre los distintos compartimentos de una célula vegetal adulta colocada en agua ($\Psi = 0$) (potencial osmótico del jugo vacuolar, $\Psi_s = -0.5$ MPa) (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

osmómetro. En tal situación, se desprecia la contribución de la matriz ($\Psi_m = 0$), quedando:

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_s \quad [2-19]$$

3.3.1. El potencial osmótico (Ψ_s) es negativo y expresa el efecto de los solutos en la disolución celular

El **potencial osmótico** está determinado por la concentración de sustancias osmóticamente activas en la vacuola y es idéntico a la presión osmótica del jugo vacuolar (ecuación 2-14). En una célula vegetal, Ψ_s siempre posee valores negativos, que varían con el volumen celular, siendo más próximo a cero en células totalmente hidratadas que en las deshidratadas. La dependencia de Ψ_s del volumen celular es, aproximadamente, lineal (Fig. 2-3).

Las membranas celulares no son nunca verdaderamente semipermeables sino, más bien, **diferencialmente permeables** (véase Capítulo 7). La extensión en la cual las moléculas de soluto se pueden difundir a su través se expresa multiplicando Ψ por el término σ , denominado **coeficiente de reflexión**, que adquiere valores entre 0 y 1; para una membrana verdaderamente semipermeable, $\sigma = 1$. Para una membrana que es igualmente permeable al agua y a los solutos (o si no se encuentra presente ninguna membrana), $\sigma = 0$. Entonces, la ecuación anterior se hace: $\Psi = \Psi_p + \sigma\Psi_s$.

3.3.2. El potencial de presión (Ψ_p) es positivo y representa la presión ejercida por el protoplasto contra la pared celular

Cuando el agua entra en la célula, aumenta el volumen vacuolar y se ejerce una presión, denominada **presión de turgencia**, sobre las paredes celulares. Al mismo tiempo, se desarrolla en dirección opuesta una presión igual a la presión de turgencia, es decir, desde las paredes al interior celular. Esta última presión, denominada presión de pared, actúa como una presión hidrostática, aumenta el estado energético del agua en la célula y representa el **potencial de presión celular** (Ψ_p). Naturalmente, Ψ_p adquiere valores positivos siempre que la vacuola ejerza una presión sobre las paredes circundantes. A medida que se pierde el agua de la célula, la vacuola se contrae progresivamente, con una caída concomitante en la turgencia celular y Ψ_p (Fig. 2-3). Ψ_p se hace cero en una etapa denominada **plasmólisis incipiente**, en la cual la vacuola cesa de presionar sobre las paredes (Fig. 2-3). Ocasionalmente, se ha informado de la existencia de valores negativos de Ψ_p , como un efecto ventosa sobre el interior de las paredes como consecuencia de la contracción vacuolar.

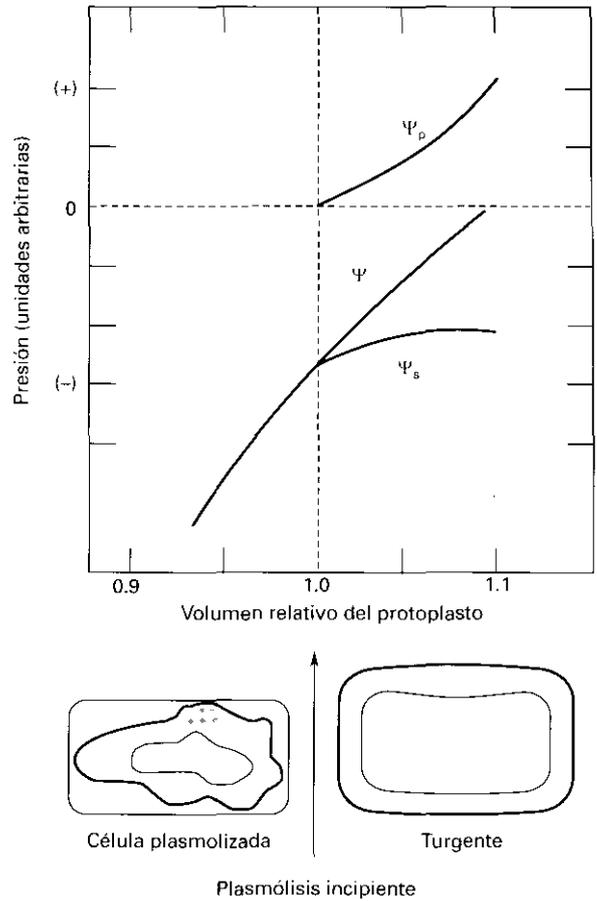


Figura 2-3. Diagrama de Höfler. Muestra las interrelaciones entre potencial de presión (Ψ_p), potencial de solutos (Ψ_s) y potencial hídrico (Ψ) a medida que se modifica el volumen del protoplasto. Se supone que la célula está sumergida en agua pura. Al volumen celular en el estado de plasmólisis incipiente se le asigna un volumen relativo de 1.0. En plasmólisis incipiente el potencial de presión es cero. Un 10% de aumento en el volumen celular originará una célula totalmente turgente con un cambio pequeño en el potencial osmótico (Ψ_s), pero con un gran aumento en el potencial de presión (Ψ_p). A plena turgencia, el potencial osmótico es contrarrestado por el potencial de presión, y el potencial hídrico de la célula (suma algebraica de Ψ_s y Ψ_p) es cero (adaptado de Hopkins, 1995).

3.3.3. El potencial mátrico (Ψ_m) es negativo y expresa el efecto de los microcapilares y las superficies de paredes y componentes celulares en la retención del agua

Surge como consecuencia de fuerzas que retienen moléculas de agua por capilaridad, adsorción e hidratación, principalmente, en la pared celular y el citoplasma (matriz). En el primer caso, las microfibrillas de celulosa entrelazadas crean numerosos microcapilares en los que el agua es retenida, fundamentalmente, por tensión superficial. En el citoplasma, el agua es adsorbida en varias macromoléculas y coloides. Ψ_m se estimó anteriormente como despreciable cuando se consideró la cé-

lula análoga a un osmómetro. Tal suposición es razonable en aquellos casos en los que la matriz celular constituye una fracción pequeña del volumen celular total, por ejemplo, en células jóvenes de paredes finas. No obstante, en tejidos con una elevada proporción de matriz (por ejemplo, en xerófitas y en meristemas de mesófitas), Ψ_m no se puede ignorar y, por tanto, el enfoque del osmómetro no es válido. En cualquiera de los casos, el efecto de Ψ_m se hace más pronunciado a medida que disminuye el contenido hídrico.

4. RELACIONES HÍDRICAS EN CÉLULAS Y TEJIDOS

Las relaciones hídricas de células y tejidos vegetales se pueden describir mediante el **diagrama de Höfler** (Fig. 2-3), que muestra la interdependencia entre el volumen celular, Ψ , Ψ_s y Ψ_p , a medida que la célula pierde agua. Al volumen del protoplasto se le asigna un valor relativo de 1.0 en la **plasmólisis incipiente**, condición en la cual el protoplasto rellena el volumen celular no ejerciendo presión contra la pared ni tampoco separándose de la misma. Por tanto, la presión turgente (Ψ_p) es cero y el potencial hídrico de la célula es igual a su potencial osmótico (Ψ_s). En cualquiera de los casos, el potencial hídrico de la célula (Ψ) viene determinado por la suma algebraica de la presión de turgencia (Ψ_p) y el potencial osmótico (Ψ_s) (compárese la ecuación 2-19 con la Fig. 2-3).

Los fenómenos de plasmólisis y de marchitez son aparentemente lo mismo, pero hay algunas diferencias importantes. La **plasmólisis** se puede estudiar en el laboratorio simplemente sometiendo los tejidos a soluciones hiperosmóticas y observando al microscopio cambios en el volumen del protoplasto. A medida que progresa la plasmólisis, el volumen del protoplasto disminuye, los plasmodesmos se rompen y el protoplasto se separa de la pared celular. El espacio existente entre la superficie externa del protoplasto (membrana plasmática) y la pared celular se llena con la solución externa, que fácilmente penetra la pared celular. Por esta razón, normalmente, la plasmólisis no origina sobre el protoplasto una presión negativa (o tensión) elevada. La plasmólisis constituye, esencialmente, un fenómeno de laboratorio y, con la posible excepción de condiciones extremas de déficit hídrico o de salinidad, rara vez, se presenta en la naturaleza.

Por otra parte, la **marchitez** es la respuesta típica a la deshidratación en el aire en condiciones naturales. Debido a su extrema tensión superficial, el agua de los pequeños poros de la pared celular ofrece resistencia a la entrada del aire y el protoplasto mantiene el contacto con la pared. Ello tiende a originar elevadas presiones negativas a nivel de la pared. El potencial hídrico de las células marchitas se hace aún más negativo, ya que representa la suma del potencial osmótico y del potencial de presión (ambos negativos).

Un factor importante que determina la forma de las curvas en la Figura 2-3 es la elasticidad de las paredes celulares. Si la pared celular es muy rígida, para una determinada pérdida de agua, el potencial hídrico y sus componentes cambian rápidamente. La rigidez de la pared se describe mediante el **módulo de elasticidad promedio de la célula** (ϵ) que se puede definir como:

$$\epsilon = \Delta P / (\Delta V / V) \quad [2-20]$$

Según la ecuación [2-20], un valor alto de ϵ quiere decir que ha de aplicarse una presión elevada para producir un determinado incremento en el volumen celular. Dicho de otra manera, cuanto mayor sea el valor de ϵ , tanto más resistente a la deformación será la pared celular.

Hay que destacar que este módulo de elasticidad es diferente del módulo de elasticidad del material de la pared celular en sí mismo y que, además, depende en parte de la estructura del tejido y de la naturaleza de las interacciones entre las células. Normalmente, los valores de ϵ para las células vegetales se encuentran entre 1 y 50 MPa; valores mayores indican células relativamente inelásticas o tejidos con células pequeñas.

Representado la ecuación [2-20] como:

$$\epsilon (\Delta V / V) = \Delta P \quad [2-21]$$

y suponiendo un valor nominal de $\epsilon = 10$ MPa, una modificación en el volumen de un 1% ($\Delta V / V = 0.01$) originará un cambio de presión de turgencia (ΔP) de 0.1 MPa. Para una célula típica con una presión de turgencia de 0.3 a 0.5 MPa, esto origina un aumento de un 20 a un 30% en el potencial de presión. Al mismo tiempo, el potencial osmótico, que es proporcional al volumen, sólo cambiaría un 1% (véase Fig. 2-3). Por tanto, las alteraciones de potencial de presión constituyen el principal determinante del potencial hídrico a medida que cambia el contenido en agua de las células.

La tasa de aumento de volumen celular también depende de las propiedades reológicas de la pared (relacionadas con su bioquímica) (véase Capítulo 1).

$$(1/V) (dV/dt) = \oslash (P - Y) \quad [2-22]$$

en donde Y es la presión umbral (Pa), o turgencia que ha de superarse antes de que se presente ninguna extensión, y \oslash es la **extensibilidad** ($s^{-1} Pa^{-1}$), que describe la tasa con la cual las células experimentan expansión irreversible, siempre que se exceda Ψ . La extensibilidad contrasta con la elasticidad (ϵ), que se refiere a cambios reversibles en las dimensiones celulares.

Una consecuencia de la existencia de un módulo de elasticidad elevado es que las plantas, a diferencia de los animales, no necesitan **osmorregular** para mantener la integridad estructural de sus células. Para impedir la absorción continuada de agua y el posible riesgo de lisis de la membrana celular, las células animales han

de gastar continuamente energía metabólica para excluir solutos y mantener un potencial osmótico apropiado. En las células vegetales, dicha función es desempeñada por la pared celular (véase Capítulo 1). La **presión de turgencia** que se desarrolla por una pared celular fuerte y relativamente inelástica es normalmente suficiente para mantener un potencial hídrico apropiado e impedir un exceso de absorción de agua. No obstante, y ello es interesante, parece que muchas células vegetales mantienen el nivel determinado de presión que es inferior al máximo posible. Esto sugiere que las células han de poseer sensores a la presión que ayuden a regular el contenido de solutos y, por tanto, a mantener la turgencia en los límites apropiados.

El diagrama de Höfler es apropiado para células aisladas. Sin embargo, en cualquier tejido las células difieren en tamaño, elasticidad de pared y contenido en solutos. Además, existe un componente de presión provocado por las células circundantes. Por tanto, las propiedades de un tejido, aunque se puedan representar mediante este tipo de diagrama, pueden ser muy distintas de las correspondientes a sus células componentes.

5. MEDIDA DEL POTENCIAL HÍDRICO Y SUS COMPONENTES

Los tres instrumentos más importantes que se utilizan para la medida del potencial hídrico y sus componentes son el psicrómetro de termopares, la cámara de presión y la sonda de presión.

5.1. El método psicrométrico determina la presión de vapor relativa del aire en equilibrio con la del tejido

El **psicrómetro de termopares** se basa en el principio de que la presión de vapor relativa (e/e_0) de una solución, o muestra de material vegetal, se halla relacionada con su potencial hídrico (Ψ), según la ecuación 2-9.

La muestra de material vegetal se coloca en una cámara herméticamente cerrada; al cabo de un tiempo de equilibrio generará una presión de vapor relativa, o humedad relativa en la cámara, equivalente al potencial hídrico del tejido (Fig. 2-4 A).

Las medidas de Ψ_s y Ψ_p se pueden efectuar con los psicrómetros de termopares, eliminando uno de los componentes de la ecuación $\Psi = \Psi_s + \Psi_p$ y midiendo el otro. Corrientemente, se congela y descongela el tejido, rompiendo así las membranas. La rotura impide que se genere turgencia y, si bien la liberación de solución celular inunda la pared, los efectos mátricos son pequeños y, frecuentemente, se pueden ignorar. En este caso, $\Psi = \Psi_s$. El Ψ_p se calcula a partir de la diferencia entre el Ψ del tejido vivo y el Ψ del tejido congelado/descongelado.

Una de las razones de que se haya utilizado profusa-

mente la psicrometría de termopares para la determinación del potencial hídrico y sus componentes es que esta técnica se puede usar en cualquier parte del sistema suelo-planta. Además, sólo se necesita una pequeña porción de tejido; esto permite muestrear una hoja o raíz a medida que se somete la planta a diferentes condiciones. Los psicrómetros de termopares se han utilizado en hojas, tallos, raíces, nódulos de leguminosas, partes florales, polen y semillas en desarrollo.

5.2. El método de equilibrio de presión o cámara de presión es rápido y es el más utilizado en el campo

Durante muchos años, fisiólogos vegetales y ecólogos se han visto limitados en la investigación del estado hídrico de las plantas, debido a la carencia de un método sencillo, rápido, preciso y portátil. Para satisfacer esta necesidad, Scholander y cols. (1965) desarrollaron una técnica que mide el potencial hídrico en unidades de presión. El método consiste en aplicar presión sobre una hoja cortada hasta que aparezca el agua en el extremo seccionado del tallo o peciolo. Se interpreta que la presión positiva aplicada a la hoja corresponde a la presión que equilibra la presión negativa o tensión con la cual el agua estaba retenida en el interior del tallo antes del corte (Fig. 2-4 C) (véase Capítulo 4). La **cámara de presión** mide el potencial matricial del apoplasto o pared celular. El potencial matricial del apoplasto (τ) es similar al potencial hídrico (Ψ) del simplasto adyacente, siempre que la resistencia al flujo entre el simplasto y apoplasto no sea grande y que la presión osmótica (π) del agua apoplástica sea próxima a cero, es decir:

$$\Psi = P_c - \pi = \tau - \pi \quad [2-23]$$

siendo P_c , la presión aplicada en la cámara de presión. En la práctica, la presión osmótica del agua apoplástica es, ordinariamente, menor de 0.05 MPa, de tal manera que:

$$\Psi \cong \tau \cong P_c \quad [2-24]$$

Se ha demostrado que, cuando las células en el tejido alcanzan una presión de turgencia de cero, P_c se relaciona con el agua celular de la siguiente manera:

$$1/P_c = 1/\pi = (V_s - V)/RTN \quad [2-25]$$

siendo V_s , el volumen hídrico simplástico en la hoja turgente; V , el volumen de agua perdida en la hoja; R , la constante universal de los gases; T , la temperatura en °K y N , el número de moles de soluto en el simplasto. Se supone que las células actúan como osmómetros perfectos, y que el agua en el apoplasto no cambia durante la desecación de la hoja.

Una ventaja de la técnica de la cámara de presión es

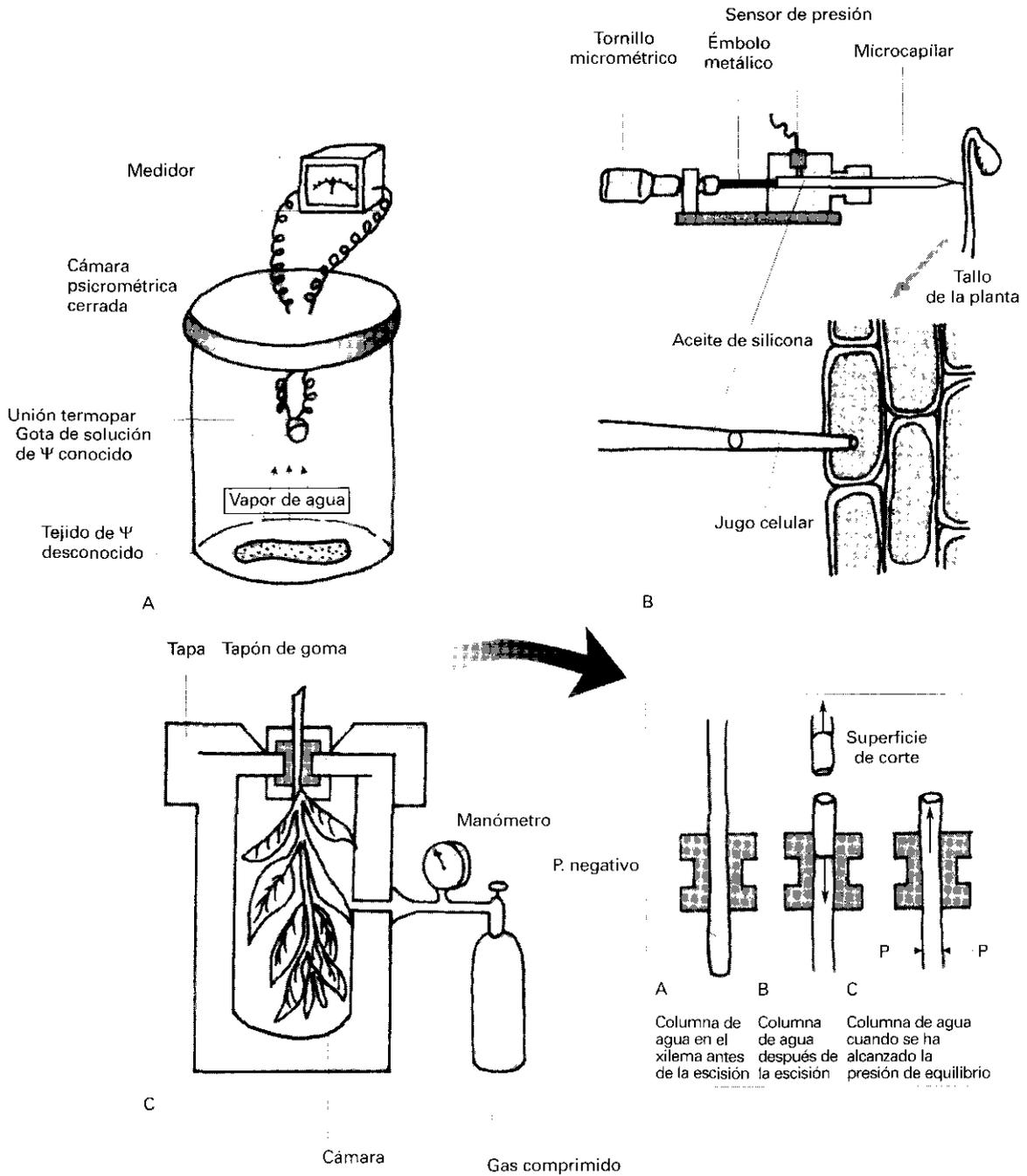


Figura 2-4. Diferentes métodos para la medida del potencial hídrico de la planta. A) Psicrometría. B) Sonda de presión. C) Cámara de presión (según Taiz y Zeiger, 1991). (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

que no sólo mide rápidamente el potencial hídrico, sino que también se puede utilizar para medir la relación presión-volumen del tejido vegetal. Se ha demostrado que si se aplica presión adicional a una hoja o rama por encima de la presión de equilibrio inicial, se obtiene líquido xilemático que se puede recoger para determinar su volumen. Haciendo esto de una manera progresiva, se puede establecer una **curva presión-volumen** (Fig. 2-5). Una vez que la presión de turgencia alcanza valor cero, la representación de $1/P$ en función de V se

hace lineal, como se indica en la ecuación anterior. Estas curvas posibilitan la determinación de un amplio espectro de parámetros hídricos en los tejidos tales como potenciales osmóticos, ajuste osmótico y propiedades elásticas.

Con algo de práctica, la cámara de presión puede constituir uno de los instrumentos disponibles más apropiados para la investigación en relaciones hídricas.

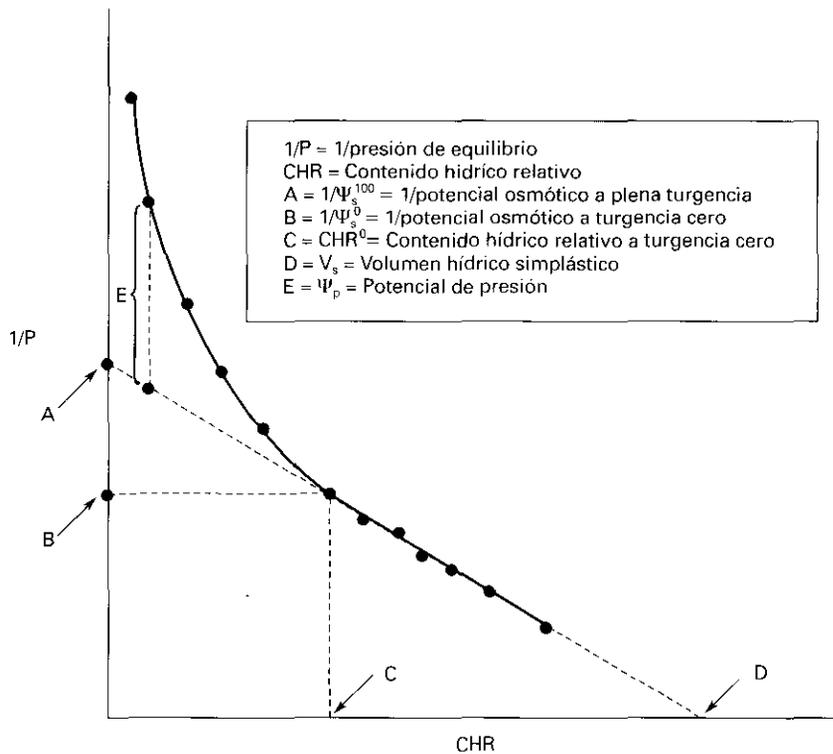


Figura 2-5. Curva de presión-volumen utilizada para determinar los componentes del potencial hídrico en plantas. El recuadro representa los tipos de información de relaciones hídricas en tejidos que se pueden obtener a partir de la curva presión-volumen (adaptado de Nilsen y Orcutt, 1996).

5.3. La sonda de presión es el único instrumento que puede medir el estado hídrico de células individuales

Los métodos convencionales, tales como la cámara de presión y los psicrómetros, determinan el potencial hídrico promedio del tejido completo, independientemente de que existan diferentes tipos de células. Además, dichos métodos requieren equilibrio del flujo hídrico en el interior del tejido y suponen que las membranas celulares son idealmente semipermeables a los solutos. En muchos casos, estas suposiciones no han sido comprobadas, y esto puede provocar errores, tanto en la medida como en la interpretación de los resultados. Además, la cámara de presión y los métodos psicrométricos no son adecuados para medir la cinética del movimiento del agua ni para evaluar las cantidades de agua transportadas en las diferentes vías de un tejido complejo.

En contraste con estos métodos, la técnica de la **sonda de presión** permite determinar los parámetros de relaciones hídricas a nivel celular. La sonda de presión (Fig. 2-4 B) consta de un microcapilar (diámetro de la punta: 2 a 7 μm) relleno con aceite de silicona y conectado a una cámara de presión pequeña que contiene un sensor de presión.

Cuando el extremo del microcapilar se introduce en la célula, la turgencia celular (Ψ_p) hace retroceder el aceite en el capilar, formando un menisco a nivel de la

interfaz entre el jugo celular y la capa de aceite. El menisco se puede situar en un punto concreto mediante un mecanismo manual o electrónico, y entonces se puede eliminar una determinada cantidad para modificar el volumen (V) y la turgencia celulares. Los cambios de volumen celular (ΔV) se obtienen a partir del diámetro del capilar y la distancia entre dos posiciones del menisco, mientras que el correspondiente cambio en la presión (ΔP) se registra mediante el sensor de presión. Cuando se conoce el volumen celular, se puede evaluar el **módulo de elasticidad** (ϵ) según la ecuación 2-20.

Una de las ventajas de la sonda de presión es que la presión de turgencia se puede medir con gran exactitud. Asimismo, la sonda de presión se puede utilizar para determinar el potencial hídrico de células individuales a partir de medidas directas de la presión de turgencia celular y del potencial osmótico del jugo extraído.

6. MOVIMIENTO DEL AGUA

6.1. El movimiento del agua en el suelo depende fundamentalmente de su potencial mátrico

El suelo es un sistema complejo que consta no sólo de proporciones variables de partículas de roca y materia orgánica que forman la matriz sólida, sino también de

la disolución del suelo y del aire que ocupa el espacio poroso. El tamaño y la naturaleza química de las partículas, en especial su carga eléctrica superficial y la manera en que se disponen, determinan cuánto agua se puede retener en el suelo en contra de la acción de la gravedad y con qué fuerza se retiene. Esta capacidad de retener el agua es una manera de describir el **potencial hídrico del suelo** y, como ya se mencionó anteriormente, depende en especial de las fuerzas de interfaz, representadas por el potencial mátrico. Puesto que existe poca variación en la presión hidrostática en las capas superficiales del suelo (de tal modo que $\Psi_p = \text{presión atmosférica} = 0$), y se encuentran pocos solutos presentes (excepto en suelos salinos), la ecuación [2-12] se simplifica a:

$$\Psi = -\Psi_m \quad [2-26]$$

Cuando un suelo está totalmente mojado después de haber drenado por gravedad, estado descrito como **capacidad de campo**, su potencial hídrico es cero. No obstante, a medida que el suelo se seca, bien por evaporación en su superficie, o bien porque las raíces absorben agua, descendiendo el potencial mátrico y el potencial hídrico se hace más negativo. Esto se ilustra en la Figura 2-6 donde se representa la relación entre el Ψ del suelo y el contenido hídrico. Se denomina **porcentaje de marchitez permanente** el contenido hídrico del suelo con el cual las plantas se marchitan. No obstante, con independencia del tipo de suelo, el potencial hídrico en el porcentaje de marchitez permanente es relativamente uniforme, aproximadamente -1.5 MPa . Aunque existen algunas excepciones, la mayoría de las

plantas son incapaces de extraer cantidades importantes de agua cuando el potencial hídrico del suelo se hace inferior a -1.5 MPa . En cierto modo, la capacidad de campo se puede considerar una propiedad del suelo, mientras que el porcentaje de marchitez permanente lo es de la planta. Tradicionalmente se ha definido como **agua disponible** la que exista entre la capacidad de campo y el porcentaje de marchitez permanente. Hay que decir, no obstante, que en este margen el agua no está uniformemente disponible. En un suelo que se seca, las plantas empezarán a mostrar signos de déficit hídrico y reducción del crecimiento mucho antes de que el potencial hídrico del suelo alcance el porcentaje de marchitez permanente.

La Figura 2-6 también muestra la gran diferencia que existe entre un suelo arenoso y un suelo rico en arcilla, tanto en la capacidad de retener agua como en el agua disponible, diferencia que se refleja en la denominación dada por jardineros y agricultores como «ligero» y «pesado», respectivamente. En la capacidad de campo, la arena contiene sólo un tercio de la cantidad de agua que posee la arcilla. Cuando tienen el mismo contenido hídrico, los suelos arcillosos poseen un potencial hídrico muy inferior al de los arenosos.

6.2. El movimiento del agua en la planta está regido por gradientes de potencial hídrico

Un aspecto general sobre el movimiento del agua en plantas es que es un proceso totalmente «pasivo». No existen bombas equivalentes a un corazón animal ni

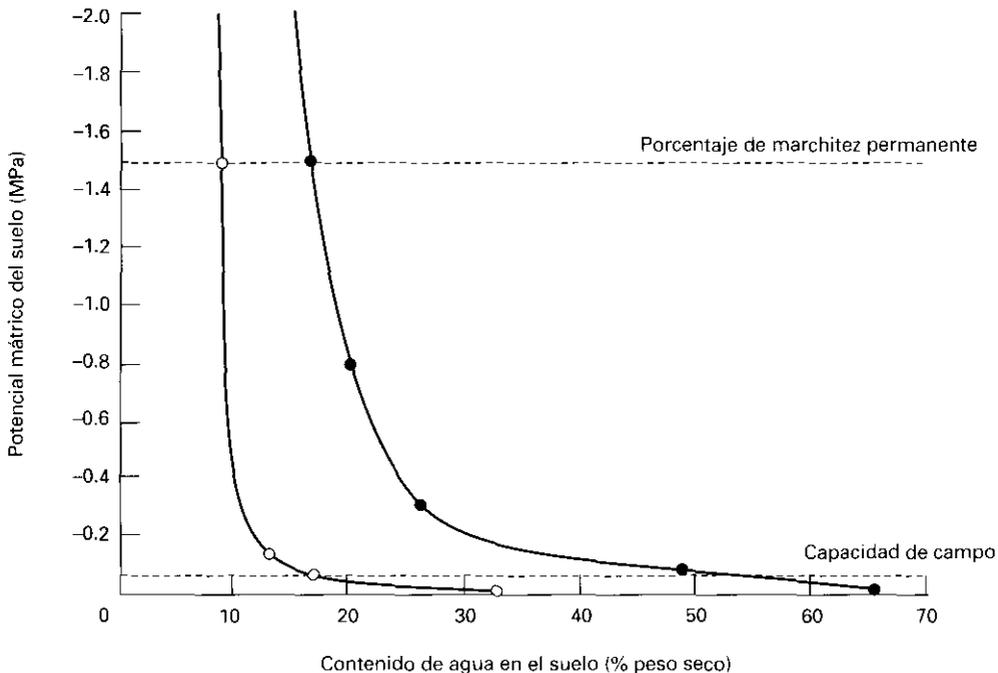


Figura 2-6. Potenciales mátricos de un suelo arenoso (o) y otro arcilloso (•) en función del contenido hídrico del suelo.

tampoco moléculas para el transporte activo primario o secundario del agua. El transporte activo de moléculas de soluto como, por ejemplo, iones o azúcares, puede originar condiciones que causan movimiento del agua; pero esto se considera también como un proceso pasivo. Podemos decir que, en general, existen dos tipos de movimiento del agua: **flujo masivo** y **difusión**. El **flujo masivo** es el movimiento de moléculas de agua y solutos de manera conjunta y en una dirección, debido a diferencias de presión. Ejemplos de ello son el flujo de agua en tuberías bajo gradiente de presión, la corriente de agua en un río provocada por la acción de la gravedad, la subida de la savia en el xilema de las plantas provocada por la evaporación del agua en la parte aérea (véase Capítulo 4), o el transporte de azúcares y otros asimilados en los tubos cribosos del floema (véase Capítulo 5).

Por el contrario, el movimiento del agua entre o hacia las células vivas, o a través del suelo tiene lugar, de ordinario, mediante **difusión**: en este caso, las moléculas de agua se mueven en todas las direcciones, si bien la mayoría de ellas en una dirección particular y, por tanto, existe un flujo neto en esa dirección. De hecho, la **ósmosis** es un ejemplo de difusión inducida por una diferencia de potencial hídrico entre los dos lados de una membrana provocada, normalmente, por diferencias en la concentración de solutos. La velocidad del movimiento de las moléculas de agua en estado líquido mediante difusión es la adecuada para realizar el transporte en las cortas distancias (micras) que existen a nivel celular.

En el transporte a larga distancia hay que resaltar la mayor importancia del flujo masivo comparado con el movimiento difusivo. Así, por ejemplo, se ha estimado que pequeñas moléculas de solutos en disoluciones acuosas requerirían unos ocho años para difundirse en una distancia de 1 m. Sin embargo, los solutos y el agua transportada con ellos se pueden mover mediante flujo masivo en el xilema a razón de muchos metros por hora.

Una de las razones que ha conducido a una aceptación generalizada de la determinación del potencial hídrico ha sido el hecho de que el movimiento del agua en la planta se presenta a lo largo de gradientes de disminución de energía libre, expresado de ordinario como diferencias de Ψ . El agua se mueve desde zonas de mayor a otras de menor potencial hídrico. En el interior de la planta, Ψ es más elevado en las raíces, disminuyendo progresivamente en el tallo, observándose los valores más bajos en las hojas (Fig. 2-7).

Por tanto, si se mide el Ψ en dos puntos de un sistema (por ejemplo, entre suelo y planta, o entre raíces y hojas), la dirección del flujo y del gradiente que determina los flujos se puede inferir fácilmente.

Además del movimiento del agua entre la planta y su ambiente, la difusión a lo largo de un gradiente de potencial hídrico puede explicar también el movimiento del agua entre las células (Fig. 2-8). Células individua-

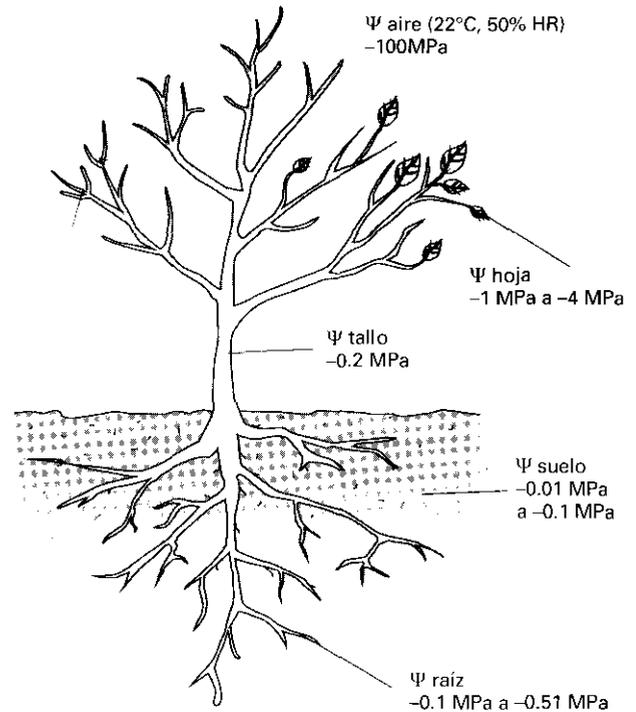


Figura 2-7. Potencial hídrico en el sistema suelo-planta-atmósfera. El valor más negativo de Ψ se encuentra en la atmósfera. En la planta existe un gradiente, siendo el potencial más negativo en las hojas y menos negativo en las raíces, donde Ψ se aproxima al del suelo.

les en un tejido pueden experimentar diferentes valores de Ψ_s y Ψ_p , dependiendo de las circunstancias específicas de cada célula. No obstante, el agua fluirá a través de la serie de células en tanto en cuanto se mantenga un gradiente continuo de potencial hídrico.

6.3. El concepto del continuo suelo-planta-atmósfera (SPAC) proporciona un modelo útil y unificado del flujo del agua desde el suelo a la atmósfera

Una contribución importante al estudio de las relaciones hídricas en las plantas es el tratamiento del movimiento del agua desde el suelo hacia las raíces, a través de la planta y hacia el aire, como una serie de procesos estrechamente interrelacionados. Este concepto, conocido como el continuo suelo-planta-atmósfera o SPAC (**Soil-Plant-Atmosphere Continuum**), permite considerar todos los aspectos de las relaciones hídricas al estudiar el **balance hídrico de las plantas** (véase Capítulo 4). El movimiento del agua en el sistema SPAC se considera similar al flujo de electricidad en un sistema conductor y, por tanto, se puede describir como un análogo a la ley de Ohm, es decir,

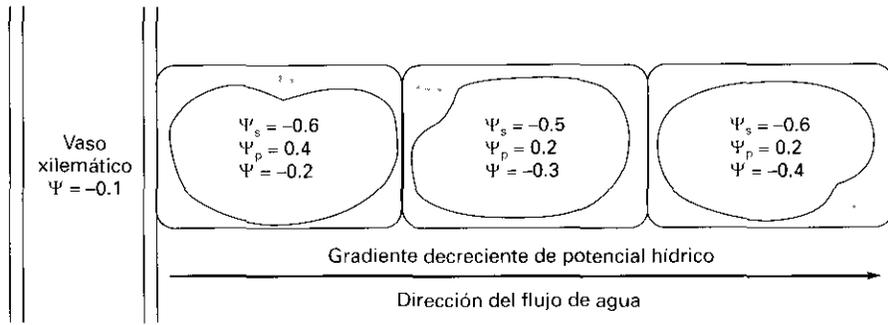


Figura 2-8. Diagrama donde se ilustran las contribuciones del potencial osmótico (Ψ_s), potencial de presión (Ψ_p) y potencial hídrico (Ψ) al movimiento del agua entre células. La dirección del movimiento del agua viene determinada únicamente por el valor del potencial hídrico entre células adyacentes (adaptado de Hopkins, 1995). Los valores de Ψ se expresan en MPa.

$$\text{Flujo} = \frac{\text{diferencia de } \Psi}{\text{resistencia}} \quad [2-27]$$

Este concepto se puede aplicar al flujo en equilibrio estable a través de la planta de la manera siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Flujo} &= \frac{\Psi_{\text{suelo}} - \Psi_{\text{raíz}}}{r_1} = \frac{\Psi_{\text{raíz}} - \Psi_{\text{tallo}}}{r_2} = \\ &= \frac{\Psi_{\text{tallo}} - \Psi_{\text{hoja}}}{r_3} = \frac{C_{\text{hoja}} - C_{\text{aire}}}{r_{\text{hoja}} + r_{\text{aire}}} \quad [2-28] \end{aligned}$$

donde r_1 , r_2 y r_3 constituyen las resistencias en las partes respectivas de la vía y C corresponde a la concentración de vapor de agua.

El concepto del continuo proporciona una teoría útil y unificadora en la cual el movimiento del agua a través de suelo, raíces, tallos y hojas, así como su evaporación hacia el aire, se pueden estudiar en términos de las fuerzas motrices y las resistencias que actúan en cada segmento. El concepto también es útil para analizar la manera en que diversos factores del ambiente afectan al movimiento del agua. Así, por ejemplo, la sequía en el suelo provoca tanto un aumento en la resistencia al flu-

jo de agua hacia las raíces como una disminución del potencial hídrico (véase Capítulo 4); una aireación deficiente y una disminución de la temperatura del suelo aumentan la resistencia al flujo de agua en las raíces, y un aumento en la temperatura de la hoja y del aire incrementa la transpiración al aumentar el gradiente de concentración de vapor de agua o fuerza motriz desde la hoja al aire (véanse Cuadro 2-1 y Capítulo 3). Asimismo, el cierre de los estomas aumenta la resistencia a la difusión del vapor de agua fuera de las hojas.

El concepto del continuo también facilita el desarrollo de modelos del movimiento del agua, tal como el ejemplo que se muestra en la Figura 2-9. Los modelos pueden referirse tanto a estomas individuales como a comunidades de árboles. Los investigadores en modelos esperan que, en el futuro, se podrá predecir el comportamiento de la planta para un amplio espectro de condiciones ambientales.

No obstante, es importante resaltar que esta discusión elemental sobre el concepto del **continuo suelo-planta-atmósfera** constituye, por una serie de razones, una simplificación excesiva. En primer lugar, supone la existencia en la planta de condiciones de equilibrio estable, lo cual rara vez se da. Incluso, en una misma

Cuadro 2-1. Efecto del aumento de temperatura en la concentración de vapor de agua en las hojas y gradiente de concentración de vapor desde la hoja al aire para una supuesta humedad relativa constante del 60%^a

Parámetro	Temperatura (°C)		
	10	20	30
Concentración de vapor de agua en el tejido ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	9.41	17.31	30.40
Concentración de vapor de agua en el aire al 60% de humedad relativa ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	5.65	10.39	18.24
Gradiente de concentración de vapor de agua ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	3.76	6.92	12.16

^a Se supone que la concentración de vapor de agua del tejido foliar corresponde a la concentración de vapor de agua a saturación, puesto que la disminución provocada por los solutos celulares es sólo, aproximadamente, del 3%.

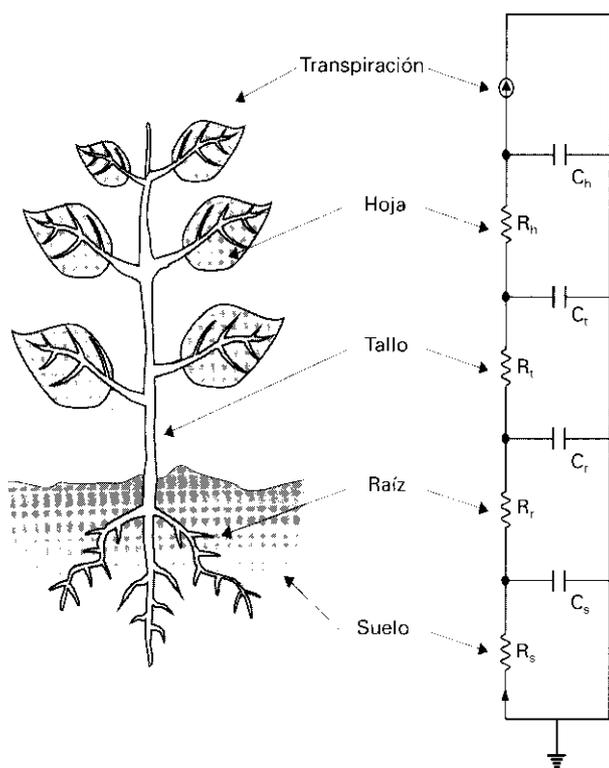


Figura 2-9. Vía del flujo de agua en el continuo suelo-planta-atmósfera (SPAC) que se describe utilizando una analogía con un circuito eléctrico. R se refiere a resistencia y C, a capacitancia (adaptado de Jones, 1992).

planta, especialmente cuando se trata de árboles, el flujo puede variar entre los diferentes segmentos del continuo, ya que las distintas zonas del dosel están sometidas a diferente régimen de radiación y demanda evaporativa. Por otra parte, el movimiento del agua en la fase líquida es proporcional a la diferencia de potencial hídrico, mientras que el movimiento en la fase de vapor es proporcional al gradiente de concentración de vapor de agua. Por último, en el caso de especies leñosas, el tronco también sirve como un complejo reservorio de agua que es vaciado y rellenado tanto a lo largo del día como en las diferentes estaciones del año. En este caso, dicho almacenamiento de agua se puede incorporar en el análogo eléctrico si se consideran los condensadores como parte del sistema (Fig. 2-9).

Dada la coherencia que el concepto SPAC da a las relaciones hídricas en plantas, lo incorporaremos tanto al estudiar la transpiración o pérdida de agua en las plantas (Capítulo 3) como al considerar la absorción y transporte del agua (Capítulo 4).

RESUMEN

El agua es esencial para la supervivencia, el crecimiento y la actividad metabólica de las plantas. La estructura

y propiedades del agua influyen en la estructura y propiedades de las proteínas, membranas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. La cuantificación apropiada del estado hídrico de las plantas depende de los objetivos de la investigación, pero los conceptos de contenido hídrico relativo y potencial hídrico han resultado ser los más útiles. Mientras que el contenido hídrico relativo deriva de la cantidad de agua en un tejido comparada con la contenida en hidratación completa, el concepto de potencial hídrico se basa en la energía libre del agua y consiguiente capacidad para predecir las direcciones del flujo a lo largo de gradientes decrecientes de energía libre. El potencial hídrico total comprende la influencia de varios potenciales componentes, como son los atribuibles a efectos de los solutos (potencial osmótico), efectos de la presión (potencial de presión o de turgencia) y efectos de las superficies (potencial mátrico). Existen numerosos métodos para cuantificar el potencial hídrico y sus componentes, siendo los instrumentos más empleados los psicrómetros, la cámara de presión y la sonda de presión.

El movimiento del agua en las plantas está regido por gradientes de potencial hídrico. La integración del concepto de potencial hídrico con las vías de flujo correspondientes ha originado el concepto del continuo suelo-planta-atmósfera, que constituye un modelo útil y unificado del flujo de agua desde el suelo hasta la atmósfera.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a Virginia Sobrini Lacruz su valiosa ayuda técnica en la elaboración de los manuscritos correspondientes a los Capítulos 2, 3 y 4.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Una célula vegetal de epidermis de cebolla tiene un intercambio neto nulo de agua con una solución de ClNa 0.164 M a 25°C . Al estudiar la plasmólisis incipiente (50% de células plasmolizadas), vemos que se presenta en una solución de ClNa 0.307 M, también a 25°C . Calcule los distintos componentes del potencial hídrico de la célula en el estado inicial y al final de la plasmólisis. Consideramos que el Ψ_m es despreciable y que las membranas no son permeables al ClNa .
2. Se deja que una hoja marchita que tiene un Ψ de -1.5 MPa absorba agua hasta que su Ψ sea de -0.5 MPa y su Ψ_s de -1.4 MPa. ¿Cuál es el módulo de elasticidad, ϵ , para esa hoja?
3. ¿Cuál es el gradiente de potencial hídrico existente entre una hoja de castaño de indias que tiene un Ψ de -1.0 MPa y la atmósfera que le rodea, si ésta tiene a 25°C una humedad relativa del 65%?
4. ¿En qué medida el concepto de potencial hídrico ayuda a los fisiólogos vegetales a explicar los movimientos del agua?

5. ¿Puede Ud. sugerir una función importante de la turgencia en la planta?
6. ¿Es el potencial osmótico o el potencial de presión el que tiene la función más importante en la regulación del potencial hídrico en las células vegetales?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Azcón-Bieto, J., y Talón, M.: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.
2. Boyer, J. S.: *Measuring the Water Status of Plants and Soils*. Academic Press, Nueva York, 1995.
3. Hopkins, W. G.: *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1995.
4. Jones, H. G.: *Plants and Microclimate*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
5. Kramer, P. J., y Boyer, J. S.: *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, Nueva York, 1995.
6. Meidner, H., y Sheriff, D. W.: *Water and Plants*. Blackie & Sons, Londres, 1976.
7. Nilsen, E. T., y Orcutt, D. M.: *The Physiology of Plants under Stress*. John Wiley & Sons Inc., Nueva York, 1996.
8. Nobel, P. S.: *Introduction to Biophysical Plant Physiology*. Freeman, San Francisco, 1974.
9. Salisbury, F. B., y Ross, C. W.: *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericana, México, 1994.
10. Taiz, L., y Zeiger, E.: *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Redwood City, California, 1991.

MOVIMIENTOS ESTOMÁTICOS Y TRANSPIRACIÓN

Manuel Sánchez-Díaz y Jone Aguirreolea

1. Introducción. 2. Movimientos estomáticos. 3. Transpiración.

1. INTRODUCCIÓN

El proceso dominante en las relaciones hídricas de una planta es la absorción de grandes cantidades de agua a partir del suelo, su transporte a través de la misma y la pérdida eventual de vapor de agua hacia la atmósfera circundante debida a la **transpiración**. La consecuencia de la transpiración es especialmente evidente en los cultivos, donde se pueden requerir varios centenares de litros de agua para producir un kilogramo de materia seca; con frecuencia, una transpiración excesiva origina reducciones importantes en la productividad. De hecho, la dificultad para desarrollarse debido a los déficit hídricos producidos por la transpiración es la causa principal de pérdida económica y fracaso de muchos cultivos en el mundo. Por ello, desde un punto de vista tanto teórico como práctico, la transpiración es, sin duda, un proceso de considerable importancia.

Este capítulo estudia el fenómeno de la transpiración así como los movimientos estomáticos, ya que la pérdida de agua a través de los estomas, o transpiración estomática, es el componente mayoritario de la transpiración.

2. MOVIMIENTOS ESTOMÁTICOS

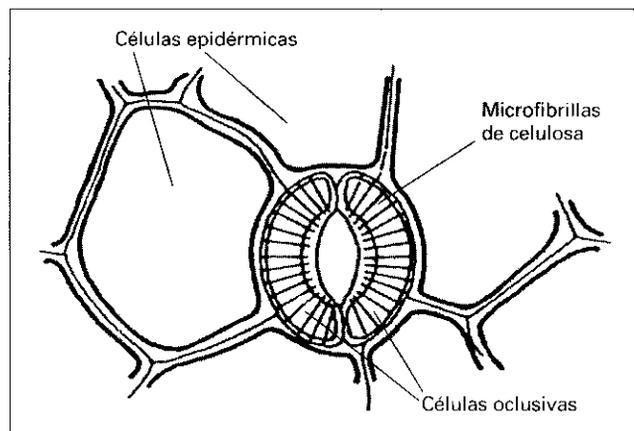
Las plantas terrestres se enfrentan con demandas opuestas. Por una parte, la atmósfera se encuentra tan alejada de la saturación de agua, que la planta corre peligro de deshidratación, a pesar de que la **cutícula** sirve como barrera efectiva a la pérdida de agua. Por otra parte, una barrera completa bloquearía el intercambio de O_2 y CO_2 , que es esencial para la respiración y fotosíntesis.

La solución funcional a este dilema es la **regulación temporal** de las aberturas estomáticas. Por la noche, cuando no hay fotosíntesis y, por tanto, no existe demanda por el CO_2 en el interior de la hoja, las aberturas estomáticas se reducen, impidiéndose la pérdida innecesaria de agua. Por la mañana, cuando el suministro de agua es abundante y la radiación solar favorece la actividad fotosintética, la demanda por el CO_2 en el interior de la hoja es grande, y los poros estomáticos están muy abiertos, disminuyendo la resistencia estomática a la difusión del CO_2 . En estas condiciones, la transpiración estomática también tiene un aspecto positivo. En primer lugar, origina la corriente transpiratoria que transporta rápidamente los nutrientes minerales desde las raíces a las partes aéreas en crecimiento y, en segundo lugar, enfría las hojas cuando el tiempo es caluroso, o la luz, potente. Por tanto, cuando el agua es abundante, los estomas pueden desempeñar un papel importante en la regulación térmica. No obstante, en su conjunto, la transpiración es más un mal necesario que una ventaja, y la necesidad de obtener CO_2 entra en conflicto directamente con la necesidad de conservar el agua. Muchas plantas, especialmente en hábitat secos, mantienen un equilibrio precario entre «inanición» y desecación y, asimismo, el riesgo de embolia en árboles requiere frecuentemente una disminución rápida de la transpiración (véase Capítulo 4). Estas son las razones de por qué la capacidad para abrir y cerrar los poros estomáticos es esencial, y de por qué los estomas se consideran como válvulas gobernadas por turgencia, que regulan el intercambio de gases. Por tanto, los estomas desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis de la planta, y de ahí la importancia de conocer, tanto la forma en que los poros se abren y se cierran, como los factores que controlan estos procesos.

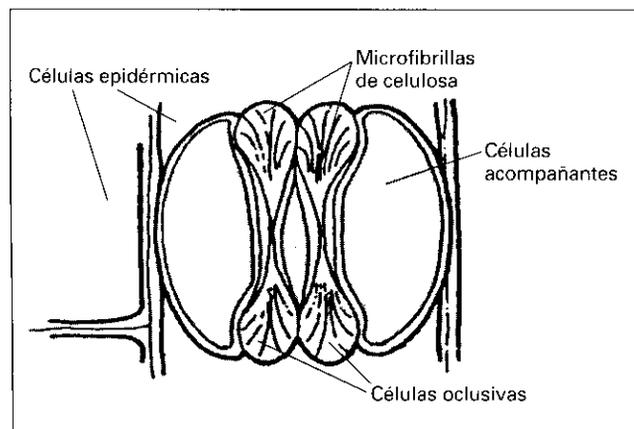
2.1. Los estomas son poros situados en la superficie foliar que permiten el intercambio de gases y cuyo diámetro varía por cambios en la turgencia de las células oclusivas

Los estomas se encuentran en las partes aéreas de prácticamente toda la flora terrestre, incluyendo esporofitos de musgos, helechos, gimnospermas y angiospermas. Aunque son más frecuentes en las hojas, también se presentan en otros tejidos verdes tales como tallos, frutos y partes de inflorescencias (por ejemplo, aristas de gramíneas y sépalos de angiospermas). Tienden a ser más frecuentes en la superficie inferior de las hojas y, en algunas especies, especialmente de árboles, sólo se presentan en la epidermis inferior. Las hojas con estomas en ambas caras se denominan anfiestomáticas, y las que los tienen restringidos a la epidermis inferior se denominan hipoestomáticas.

El **estoma** consta de un poro rodeado de dos células oclusivas o de guarda (Fig. 3-1) en forma de riñón o, en



a)



b)

Figura 3-1. Disposición radial de las microfibrillas de celulosa en células oclusivas y epidérmicas de estomas en forma arriñonada (a) y de tipo gramínea (b) (según Meidner y Mansfield, 1968). (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

gramíneas y ciperáceas, en forma de pesas de gimnasia. En muchas especies, los estomas poseen estructuras protectoras especiales, o el poro está parcialmente ocluido por **ceras** que contribuyen a aumentar la resistencia difusiva. Tanto la frecuencia como el tamaño pueden variar en función de la posición foliar y las condiciones de crecimiento e, incluso, dentro de una misma especie puede existir un gran componente genético de variación entre diferentes cultivares o ecotipos.

Los movimientos estomáticos dependen de cambios en la **presión de turgencia**, tanto de las células oclusivas como de las células epidérmicas adyacentes. Estas últimas a veces se modifican para formar células acompañantes diferentes. Al conjunto de células oclusivas y acompañantes se le denomina **aparato estomático**. Los cambios de turgencia pueden resultar bien de una modificación en el potencial hídrico (Ψ) de las células oclusivas (**mecanismo hidropasivo**), o bien de cambios activos en el potencial osmótico (Ψ_s) (**mecanismo hidroactivo**). Ambos mecanismos conllevan movimiento del agua hacia dentro o fuera de las células oclusivas. El diámetro del **poro estomático** depende de la forma de las células oclusivas que, a su vez, es función de las propiedades de las paredes celulares y de su turgencia, en relación con la turgencia de las células circundantes.

Los cambios en el tamaño del poro se presentan como consecuencia de ciertas propiedades peculiares de las células oclusivas:

- Pueden alterar rápida y reversiblemente su turgencia (es decir, su contenido hídrico) y, a medida que esto sucede, cambia el volumen de la célula.
- La forma de la célula oclusiva, a turgencia elevada y baja, depende de las propiedades de la pared. Las **microfibrillas de celulosa** se disponen en las paredes de las células oclusivas de forma que la pared interna (próxima al poro) es menos elástica, en sentido longitudinal, que la pared externa. Esto se debe, fundamentalmente, a la orientación de las microfibrillas, pero también a que, con frecuencia, la pared interna se halla engrosada. De esta manera, cuando aumentan la turgencia y el volumen celular, la pared externa se alarga más que la pared interna y las células oclusivas adquieren forma de arco (poros «abiertos»); cuando disminuye la turgencia, las células están más o menos rectas (poros «cerrados») (Fig. 3-1).
- El arqueado de las células oclusivas se produce porque alcanzan un mayor contenido de solutos y, por tanto, una mayor turgencia que las células epidérmicas circundantes. Los estudios efectuados sobre mecanismos estomáticos han demostrado que, en muchos casos, las células acompañantes poseen una ventaja mecánica sobre las oclusivas, de tal modo, que aumentos iguales de presión en las células oclusivas y acompañantes provocan el **cierre estomático**. Esto implica que

el cierre no se puede presentar como una simple respuesta hidráulica a la disminución del estado hídrico de la hoja y que, normalmente, todos los movimientos estomáticos son consecuencia de un proceso activo.

- d) Normalmente, las células oclusivas difieren del resto de las células adyacentes en otras características: no están comunicadas con las células adyacentes por medio de plasmodesmos y, por lo general, los cloroplastos son menos frecuentes, más pequeños y de diferente morfología que los de las células del mesófilo. Si se observa al microscopio una tira de epidermis foliar, las células oclusivas suelen ser las únicas células verdes presentes.

No obstante, a pesar de esta presencia generalizada de cloroplastos en las células oclusivas, no se ha confirmado que la reducción fotosintética del carbono participe directamente en el mecanismo de **abertura estomática**. Sin embargo, es bastante probable que la fotofosforilación y la reducción de NADP^+ proporcionen energía para la apertura estomática. Algunas orquídeas del género *Paphiopedilum* son peculiares, en el sentido de que sus células oclusivas carecen de clorofila, si bien sus estomas son funcionales. Como se puede observar, las células oclusivas son células epidérmicas muy especializadas y el problema de cómo los estomas cambian de tamaño, se reduce a la cuestión de cómo las células oclusivas cambian de turgencia relativa, siendo todo ello consecuencia de cambios activos en su potencial osmótico.

A medida que el **estoma se abre**, existe un aumento masivo del contenido en solutos de sus células oclusivas (de 1.8 a 7.2 pmol en hojas de *Vicia faba*). La disminución del potencial osmótico conlleva una emigración rápida de iones específicos hacia las células oclusivas, procedentes del tejido y paredes celulares (apoplasto) circundantes. Sin excepción, el catión dominante es el K^+ , aunque en halófitas, también pueden participar iones Na^+ .

El fenómeno clave que conduce a la absorción de K^+ es el bombeo activo de protones hacia fuera de las células oclusivas, mediante una **ATP hidrolasa protónica (H^+ -ATPasa)** ligada a membrana. El **gradiente electroquímico** que se desarrolla a través de las membranas (véase Capítulo 7) de las células oclusivas, como consecuencia de la salida de protones, permite la difusión pasiva de iones potasio hacia el interior, a lo largo de un gradiente de carga eléctrica. De esta manera, la absorción de K^+ es un proceso activo secundario, es decir, un proceso pasivo que depende directamente de un proceso activo, y se presenta a través de canales muy selectivos para el K^+ en el plasmalema, que se abren a medida que los potenciales de membrana se hacen más negativos.

Haciendo un análisis más detallado, los protones derivados del agua salen de las células oclusivas, quedan-

do en el interior iones hidroxilo (OH^-), de tal modo que, a medida que disminuye el pH externo, aumentan el pH intracelular y el potencial de membrana (más negativo en el interior de la célula), lo cual conduce a una entrada de K^+ (Fig. 3-2). No obstante, esto no puede continuar mucho tiempo; los iones OH^- no sirven como anión de equilibrio a largo plazo con el catión K^+ , ya que el pH intracelular está estrictamente controlado y, por tanto, deben existir otros aniones que lo equilibren. Cuando los estomas se abren, los niveles de Cl^- suben considerablemente, aunque no tanto como los niveles de K^+ . La absorción de cloruros por parte de las células oclusivas también tiene lugar a través de cambios específicos, pero no es provocada por un gradiente eléctrico (que favorecería la salida de Cl^-), sino por un gradiente de pH. El mecanismo preciso no se conoce aún, pero en la Figura 3-2 se ilustran dos posibilidades: que el Cl^- se intercambie con el OH^- , o que la entrada esté ligada a la absorción de protones (co-transporte con H^+). No obstante, rara vez es el Cl^- el anión más importante que equilibre el K^+ . Normalmente esta función la cumple el anión orgánico malato, que deriva del ácido málico (Fig. 3-2), cuya síntesis se asocia a la apertura estomática de una manera muy peculiar: a medida que aumenta el pH intracelular, se activa la enzima PEP-carboxilasa. Esta enzima fija CO_2 para producir ácido oxalacético, que se puede reducir a ácido málico (de la misma manera que en las plantas C_4) (véase Capítulo 12). El ácido málico se ioniza al pH dominante, proporcionando no sólo aniones que equilibran el K^+ , sino también iones hidrógeno para la bomba protónica. Alternativamente, el malato es generado en las células oclusivas a partir de hidratos de carbono almacenados, tales como el almidón, aunque en especies de *Allium* (que carecen de almidón en sus células oclusivas), los iones Cl^- proporcionan el contraíón para el K^+ .

Según el modelo quimiosmótico, el **estoma se cierra** cuando la bomba protónica se desconecta. Con tal de que sus canales específicos permanezcan abiertos, el K^+ y el Cl^- se mueve pasivamente fuera de las células oclusivas, a lo largo de gradientes electroquímicos. Algo de malato se puede metabolizar en las células oclusivas, pero también se tiene constancia de que durante el cierre hay salida de malato. No obstante, hay que decir, que el cierre estomático no sólo depende de la pérdida pasiva de iones, sino que también constituye un proceso metabólico activo.

Una cuestión importante y muy debatida se refiere a la fuente energética para la apertura estomática, es decir, ¿de dónde procede el ATP que alimenta la bomba protónica?; todo hace pensar que existen dos y, posiblemente, tres fuentes separadas de ATP, que se utilizan en diferente grado, en distintas ocasiones. Una es la fotofosforilación por parte de los cloroplastos, que funciona a intensidades luminosas medias a elevadas (véase Capítulo 10); otra es la fosforilación oxidativa (respiración) (véase Capítulo 14), que puede actuar en oscuri-

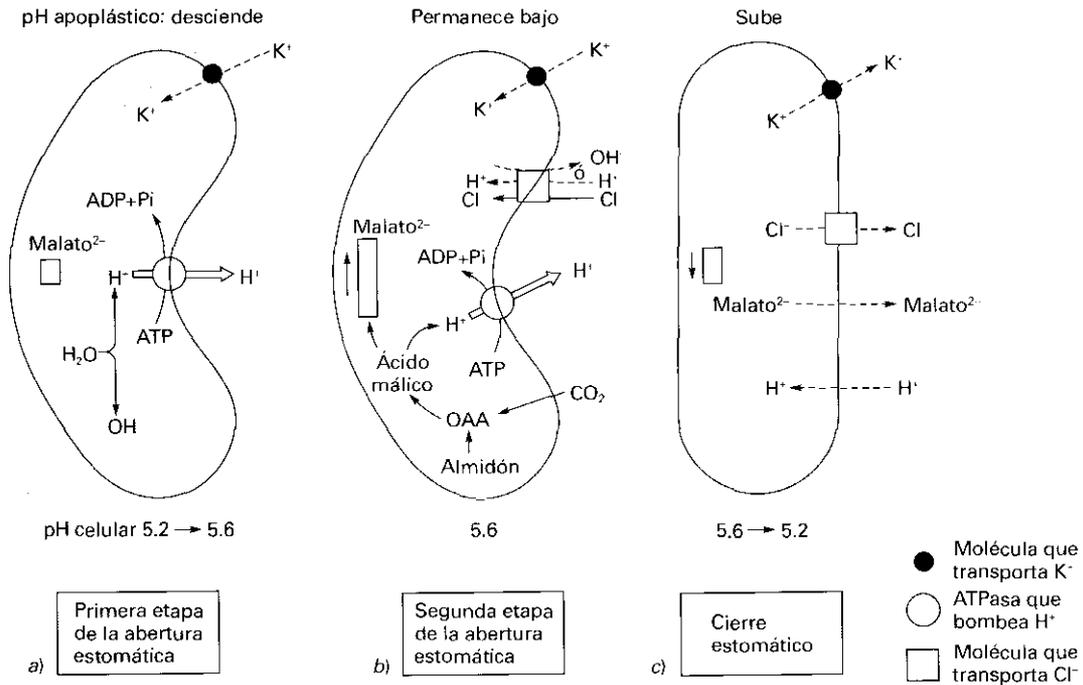


Figura 3-2. Movimiento de iones y metabolismo en las células oclusivas durante la apertura y el cierre estomáticos (según Ridge, 1991). (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

dad; y una tercera (cuya existencia es aún incierta) es un fotosistema accionado por la luz azul y muy separado de la fotosíntesis, que podría funcionar a niveles de intensidad luminosa baja, tal como ocurre en la sombra o al amanecer. Existe una fitotoxina, la fusicoccina, que es un terpenoide producido por el hongo *Fusicoccum amygdali*, que activa fuertemente la ATPasa de la membrana en todo tipo de vegetales. Su toxicidad se basa en que al activar constantemente la ATPasa de los estomas, éstos permanecen abiertos y la planta pierde excesiva agua. Se han hecho análisis minuciosos de los costes energéticos para el mantenimiento de las células oclusivas, y para los cambios en la apertura estomática, pero se sabe poco sobre los procesos que relacionan los mecanismos de percepción de estímulos (por ejemplo, el fotosistema de la luz azul) y la provisión de energía para realizar cambios en la turgencia de las células oclusivas.

2.2. El control estomático equilibra dos requisitos contrapuestos: conservación de agua y obtención de CO_2 para la fotosíntesis

Los estomas proporcionan a las plantas un mecanismo fundamental para adaptarse a un ambiente continuamente cambiante (véase Capítulo 13), permitiendo el intercambio físico activo entre las partes aéreas de la planta y la atmósfera. Puesto que el papel más notable

de los estomas es la regulación de la pérdida de agua (transpiración) y la absorción de CO_2 (asimilación fotosintética del carbono), el estudio de los factores que controlan la apertura estomática lo vamos a analizar, esencialmente, en relación con el requerimiento de CO_2 y la conservación del agua.

2.2.1. La luz y la concentración intercelular de CO_2 controlan la apertura estomática en relación con la demanda fotosintética de CO_2

Bajas concentraciones de CO_2 intercelular (C_i) estimulan la apertura estomática, y viceversa. Los estomas responden al CO_2 tanto con luz como en la oscuridad y, por tanto, la respuesta no puede depender únicamente de la fotosíntesis. Sin embargo, la manera en que el CO_2 provoca los movimientos estomáticos está todavía por resolver. Una hipótesis sugiere que, debido a que el CO_2 es fijado (vía PEP-carboxilasa) en las células oclusivas en forma de ácido málico, el nivel de uno o ambos de los productos de disociación, malato e iones H^+ (es decir, el pH citoplasmático), refleja el nivel de CO_2 , e influye en la permeabilidad de las membranas o en el desnivel del gradiente de protones. Otra hipótesis sugiere que, en presencia de luz, el CO_2 afecta al grado de fotofosforilación y al suministro de ATP para el bombeo de protones.

El valor de C_i se mantiene sorprendentemente cons-

tante (alrededor de 230 ppm en especies C_3 y 130 ppm en especies C_4) para un amplio espectro de condiciones y tasas fotosintéticas. Esto ocurre así siempre que la conductancia estomática varíe en proporción con la tasa de asimilación, y ha llevado a sugerir que una señal procedente del mesófilo controlaría la abertura estomática. Sin embargo, no existe un mecanismo que explique dicha hipótesis y, además, el descubrimiento de la existencia de heterogeneidad en la conductancia estomática (véase apartado 2.2.3) ha puesto en duda el concepto de la existencia de un valor constante de C_i .

La abertura estomática es estimulada por la luz de dos formas diferentes. En primer lugar, la radiación fotosintéticamente activa (PAR) inicia la fotosíntesis, disminuyendo el CO_2 intercelular y, por tanto, estimulando la abertura estomática. Este efecto indirecto de la luz se considera importante en las plantas C_4 , pero no en las C_3 . Estas últimas están muy influidas por el segundo efecto de la luz, que funciona directamente sobre las células oclusivas y es independiente de la concentración de CO_2 .

De nuevo, no existe acuerdo sobre la manera en que actúa la luz, pero la hipótesis más sencilla es que proporciona ATP para el funcionamiento de las bombas de protones. Además, hay que considerar la participación de dos sistemas diferentes para la absorción de luz; uno es el sistema clorofílico ordinario de los cloroplastos (fotosistema PAR), y el otro es un sistema que absorbe la luz azul, basado en un pigmento (probablemente del tipo flavina) unido a la membrana, en el interior de los cloroplastos. Parece ser que el **fotosistema PAR** domina a irradiancias medias a elevadas y suministra ATP mediante fotofosforilación siendo, aparentemente, esencial para una abertura muy amplia a la luz. El **fotosistema de la luz azul** no estimula tal abertura estomática amplia, y se satura a irradiancias muy bajas; se encuentra presente en gramíneas (con células oclusivas en forma de pesas de gimnasia), pero no en especies con células oclusivas en forma arriñonada; se ha sugerido que este sistema es responsable de la abertura rápida de los estomas al amanecer. En orquídeas del género *Paphiopedilum*, que se desarrollan en hábitat muy sombríos, las células oclusivas de forma arriñonada carecen de cloroplastos y, al parecer, su respuesta a la luz está mediada, en gran parte, por el fotosistema de la luz azul. Respuestas rápidas de los estomas a la luz anticipan la demanda fotosintética de CO_2 y pueden describirse, por tanto, como respuestas de «antealimentación» (circuito abierto).

Aunque en la mayoría de las plantas los estomas se abren en presencia de la luz y se cierran en la oscuridad, ocurre lo contrario en plantas que poseen la vía fotosintética del metabolismo ácido de las Crasuláceas (CAM) (véase Capítulo 12). En esas plantas, la abertura máxima tiene lugar en la oscuridad, especialmente al comienzo del período nocturno. En este caso, se contrarrestan completamente las respuestas normales a la luz, pero el CO_2 y la humedad continúan siendo reguladores

estomáticos importantes. Durante la noche, se produce la fijación y el almacenamiento (como ácido málico vacuolar) de CO_2 y, por tanto, la C_i será baja, estimulándose la abertura estomática. Durante el día, cuando se libera ácido málico procedente de las vacuolas y, posteriormente, se descarboxila para dar CO_2 , los niveles elevados de CO_2 interno estimularán el cierre estomático. La elevada humedad atmosférica nocturna también tiende a estimular la abertura estomática contribuyendo al ajuste fino de los movimientos estomáticos.

2.2.2. Por lo menos tres señales, la diferencia de presión de vapor entre la hoja y el aire, los niveles de ácido abscísico en el apoplasto foliar y alguna señal no bien conocida procedente de las raíces, controlan la abertura estomática en relación con el suministro de agua

En la Figura 3-3 se muestran los tipos de comportamiento estomático que normalmente se presentan en condiciones de sequía o cuando las tasas transpiratorias superan el suministro de agua a las raíces. El modelo con dos máximos (curva superior de la Fig. 3-3), con cierre estomático parcial o completo al mediodía, es muy corriente en árboles. El dosel de un bosque puede llegar a transpirar una cantidad considerable de agua, especialmente si el aire está seco y la temperatura es elevada. En estos casos, el **cierre estomático al mediodía** puede impedir la **embolia** y la **cavitación** (véase Capítulo 4, apartados 3.4 y 3.5). Muchas plantas herbáceas que se desarrollan en hábitats estacionalmente secos también muestran este modelo con dos máximos al comienzo de la estación seca. No obstante, al final de la misma, cuando el suelo está más seco, los estomas sólo se abren por la mañana, se observa una curva con un solo máximo y la abertura estomática durante este máximo es menor al final que al comienzo de la estación.

Se pueden plantear dos interrogantes: ¿qué señal(es)

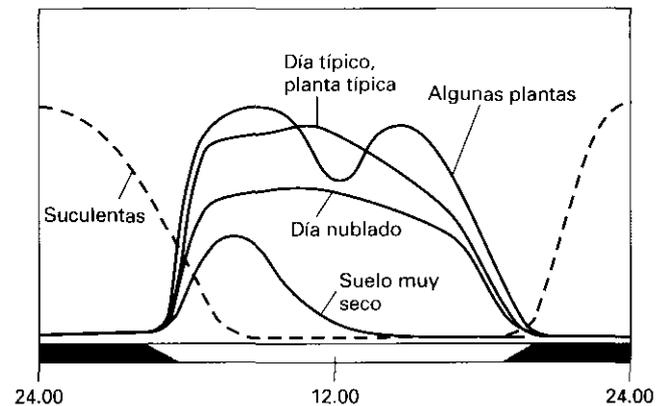


Figura 3-3. Respuesta estomática a diversas condiciones ambientales (según Salisbury y Ross, 1994). (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

contrarresta(n) la baja concentración de CO_2 y la elevada intensidad luminosa que existen al mediodía, e induce(n) el cierre estomático?, ¿por qué, ordinariamente, los estomas se abren menos si el suelo está seco?

Con respecto al cierre estomático al mediodía, parece estar controlado por el ambiente externo, principalmente la **humedad relativa del aire** y, en cierto grado, la **temperatura foliar**. Se sabe que los estomas de muchas especies se cierran en respuesta a un aumento en la diferencia de presión de vapor entre la hoja y el aire. La magnitud de esta respuesta depende de la especie, de las condiciones de crecimiento y, especialmente, del estado hídrico de la planta, siendo menor la respuesta a temperatura elevada o en plantas sometidas a sequía. No está claro todavía cómo la humedad relativa ejerce este efecto, pero una hipótesis es que afecta a la tasa de pérdida de agua a través de la cutícula y, por tanto, a la turgencia de la epidermis, desencadenándose por ello el cierre estomático. Debido a que la respuesta a la humedad es previa a cualquier cambio en el estado hídrico de la hoja, se considera, al igual que en el caso de la luz, como una respuesta de «antealimentación» (circuito abierto).

La señal procedente de la hoja que provoca el cierre estomático en caso de déficit hídrico es el inhibidor del crecimiento ácido abscísico (ABA) (véase Capítulo 22). Su sistema de control es bastante peculiar. Las hojas e, incluso, la epidermis superior e inferior de una misma hoja pueden variar su sensibilidad al ABA. Cuando las hojas se marchitan (turgencia cero), se desencadena la síntesis de ABA en los cloroplastos de las células del mesófilo. En un primer momento, esto no tiene efecto sobre los estomas, pero al cabo de varios ciclos de marchitamiento y recuperación, los niveles de ABA aumentan y, al final, una caída de la turgencia foliar (no necesariamente hasta el porcentaje de marchitez) provoca la liberación del ABA almacenado en las paredes celulares (apoplasto). El ABA puede transportarse hasta la plasmalema de las células oclusivas en las que, incluso en cantidades mínimas, afecta al bombeo de iones y provoca el cierre estomático. En este caso, el papel del ABA parece ser verdaderamente hormonal. A medida que la hoja se rehidrata, se degrada el ABA apoplástico.

En los últimos años, además de conocerse mejor el papel del ABA en la regulación del consumo de agua por la planta, se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de su mecanismo de acción a nivel celular. Se ha demostrado que el cierre estomático inducido por la oscuridad o por el ABA depende del suministro de iones calcio. Muchas hormonas animales utilizan **mensajeros secundarios** a nivel celular, y parece ser que los iones calcio pueden tener esta función con respecto al ABA. Asimismo, se ha visto que la proteína **calmodulina**, que liga iones calcio, también está presente en las células oclusivas y puede participar en la regulación de la abertura estomática. El tratamiento de tiras epidérmicas con inhibidores de la calmodulina provoca un aumento de la abertura estomática. Por otra

parte, se sabe que en las plantas las ATPasa cálcicas están reguladas por el calcio y la calmodulina, si bien no se ha estudiado suficientemente su función en las células oclusivas.

Como se ha indicado anteriormente, los estomas tienden a cerrarse con la disminución del potencial hídrico foliar. El cierre se produce para un amplio espectro de Ψ y esta relación se puede modificar por la exposición a un estrés previo o por la velocidad de desecación. No obstante, la **conductancia estomática** es relativamente insensible a la fluctuación diaria del Ψ ; esta respuesta es la que cabe esperar si suponemos que, durante el día, es la conductancia estomática la que controla el potencial hídrico foliar (mediante una alteración de la tasa transpiratoria), más bien que al revés.

Aunque se ha comprobado que los estomas responden al estado hídrico foliar a través de efectos sobre la acumulación activa de solutos en las células oclusivas (véase apartado 2.1), varios estudios han puesto de manifiesto que la respuesta estomática a la sequía edáfica puede estar controlada por otros factores. Así, por ejemplo, cuando se modificó el estado hídrico foliar de plantas de *Helianthus annuus* y *Nerium oleander*, alterando la transpiración mediante cambios en la humedad atmosférica, se encontró que la conductancia foliar estaba más relacionada con el estado hídrico del suelo que con el de la hoja. Esta hipótesis se ha comprobado también presurizando el sistema radical hasta alcanzar presión cero en el xilema (células foliares turgentes) y, al mismo tiempo, dejando secar el suelo. De nuevo, la conductancia foliar parece responder mejor al **contenido hídrico del suelo** que a la turgencia foliar.

Por otra parte, si bien se ha observado que la conductancia estomática está mejor relacionada con Ψ_p que con Ψ , es muy posible que dicha relación sea indirecta y que se realice a través de un efecto sobre el bombeo de iones en las células oclusivas. Finalmente, otro hecho observado normalmente es que, cuando una planta se riega después de un período de sequía, los estomas pueden tardar varios días en recuperarse (dependiendo de la intensidad y duración del estrés), a pesar de que el potencial hídrico foliar se recupere rápidamente.

2.2.3. *La heterogeneidad de la conductancia estomática, la temperatura y otros factores también afectan a la abertura estomática*

Heterogeneidad de la conductancia estomática. Estudios realizados sobre el efecto de la aplicación de ABA en hojas sugirieron que no tenía acción inhibitoria directa sobre la fotosíntesis, aunque la supresión de la abertura estomática podía ejercer un efecto indirecto, al restringir la difusión de CO_2 . Ulteriores análisis de la relación existente entre tasas de fotosíntesis y **concentración de CO_2 intercelular** (C_i), en hojas a las que se había suministrado ABA exógeno para provocar cierre

estomático, sugerían que C_i permanecía constante o, incluso, aumentaba. Estos resultados no dejaban de ser sorprendentes, ya que lo lógico hubiese sido que C_i disminuyera a medida que los estomas se cerraban. Al no ser así, se dedujo que la exposición breve al ABA podía tener efecto inhibitorio directo sobre la fotosíntesis, independientemente del cierre estomático.

Actualmente, se sabe que la contradicción aparente es consecuencia de los errores que surgen cuando se utiliza el método convencional de estimar C_i a partir de los datos de intercambio gaseoso. La **tasa transpiratoria** se calcula como un promedio para toda la superficie foliar (véanse apartados 3.1 y 3.2); esto proporciona la base para estimar la conductancia total de la hoja al vapor de agua (g_w). A partir de ese valor se calcula la relación:

$$C_i = C_a - 1.6 A/g_w \quad [3-1]$$

siendo C_a , la concentración de CO_2 en el aire exterior a la hoja y A , la tasa de asimilación neta de CO_2 (véase también Capítulo 13).

No obstante, este método de estimar C_i resulta incorrecto si el comportamiento de los estomas no es uniforme en las diferentes partes de la hoja, obteniéndose valores superiores a los reales y dando la impresión de que la fotosíntesis disminuye más de lo que se podría atribuir al cierre estomático. Estudios hechos con hojas cortadas de *Vitis vinifera* y *Helianthus annuus*, a las que se les suministraba ABA a través del peciolo, han demostrado que el cierre estomático se produce de forma heterogénea. Lo mismo se ha observado al inducir el aumento de ABA endógeno mediante sequía edáfica en especies de *Vitis vinifera*, *Nerium oleander* y *Eucalyptus ficifolia*, explicándose así la aparente inhibición estomática de la fotosíntesis mediante el ABA. No obstante, en el caso de *Medicago sativa*, se ha observado que cuando el estrés hídrico se impone de manera cíclica, la actividad de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (rubisco) disminuye considerablemente, y la limitación estomática de la fotosíntesis sólo es del 15%. Vemos, por tanto, que la limitación estomática de la fotosíntesis depende de la especie y de la forma de imponer el déficit hídrico. Ahora bien, ¿por qué responden los estomas de esa manera tan poco uniforme? En muchas hojas, la red de haces vasculares provoca el aislamiento de zonas de espacios intercelulares y existe una restricción en la difusión lateral de CO_2 entre dichas zonas. Se cree que las hojas con tal anatomía («heterobárica») son proclives al cierre estomático no uniforme, mientras que esto no ocurre en aquellas que poseen espacios intercelulares bien conectados («homobárica»), que proporcionan elevada movilidad gaseosa.

La **heterogeneidad del cierre estomático** conduciría no sólo a variaciones en la C_i sino, también, a diferencias importantes en el metabolismo del carbono, resultantes de cambios en la fijación del CO_2 y en la

fotorrespiración. Un grado elevado de heterogeneidad probablemente conlleva una ineficiencia en el funcionamiento de la hoja, que habría que considerar en relación con la productividad vegetal. Por todo ello, la heterogeneidad del comportamiento estomático es un aspecto que merece una investigación más detallada.

Temperatura y otros factores. Muchos estudios sobre las respuestas estomáticas a la temperatura han dado resultados contradictorios. A menudo, el efecto de la temperatura se confunde con el efecto de variaciones en la diferencia de presión de vapor entre la hoja y el aire. Por tanto, es necesario efectuar estudios de respuesta a la temperatura en condiciones constantes de déficit de presión de vapor. En general, los estomas tienden a abrirse a medida que aumenta la temperatura. No obstante, la magnitud de la respuesta depende de la presión de vapor.

Por último, la abertura estomática también depende de otros muchos factores tales como edad foliar, nutrición y enfermedades, así como de la influencia de contaminantes gaseosos tales como el O_3 , el SO_2 y los óxidos de nitrógeno, probablemente debido a sus efectos sobre la integridad de las membranas.

En la Figura 3-4 se resumen los factores más importantes que controlan la abertura estomática.

3. TRANSPIRACIÓN

Se define la transpiración como la pérdida de agua en la planta en forma de vapor. Aunque una pequeña cantidad del vapor de agua se puede perder a través de aberturas pequeñas (denominadas **lenticelas**) en la corteza del tallo y ramas jóvenes, la mayor proporción (más del 90%) se escapa por las hojas. En realidad, el proceso de la transpiración está muy ligado a la anatomía (Fig. 3-5). Las superficies externas de una hoja típica de planta vascular están recubiertas de un depósito céreo dispuesto en varias capas, denominado **cutícula**. El componente principal de la cutícula es la **cutina**, un polímero heterogéneo de ácidos grasos hidroxilados de cadena larga (típicamente, 16 ó 18 carbonos). La formación de ésteres entre grupos hidroxilos y carboxilos de ácidos grasos próximos forma un entramado, originando una extensa red de polímeros.

La red de cutina se halla inmersa en una matriz de **ceras cuticulares**, que son mezclas complejas de hidrocarburos de cadena larga (hasta 37 átomos de carbono), alcoholes, aldehídos y cetonas. Debido a que las ceras cuticulares son muy hidrófobas, ofrecen una resistencia muy elevada a la difusión, tanto de agua líquida como de vapor de agua procedente de las células subyacentes. Por tanto, la cutícula sirve para restringir la evaporación del agua de las superficies externas de las células epidérmicas foliares, y protege tanto las células epidérmicas como las del mesófilo subyacente de una potencial desecación letal.

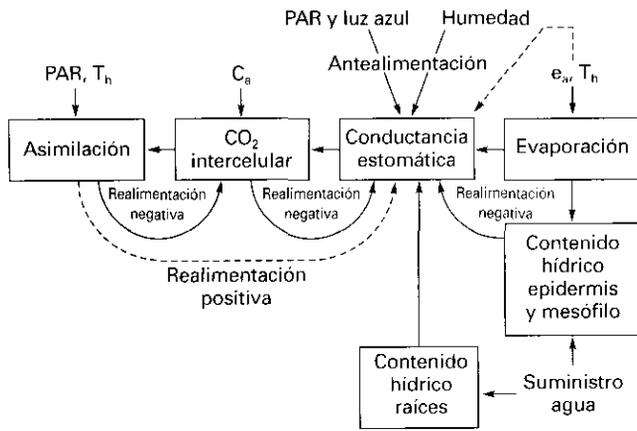


Figura 3-4. Factores que controlan la conductancia estomática. PAR, radiación fotosintéticamente activa; T_h, temperatura foliar; C_a y e_a, concentración atmosférica de CO₂ y presión de vapor de agua, respectivamente (según Raschke, 1979). (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

La integridad de la epidermis y de la cutícula que la recubre es interrumpida por los estomas. El interior de la hoja está constituido por células fotosintéticas del mesófilo; la disposición algo dispersa de estas células origina un sistema interconectado de espacios aéreos intercelulares. Este sistema puede llegar a ser muy extenso, constituyendo en algunos casos hasta un 70 % del volumen foliar total.

Los sitios de evaporación están localizados tanto en las **cavidades sub-estomáticas**, sobre todo en la pared epidérmica interna próxima al poro estomático, como en las paredes celulares externas de las células epidérmicas,

siempre que no exista un engrosamiento secundario importante (Fig. 3-6). Esto se ha deducido a la vista de la gran diferencia de densidad de vapor creada entre estos puntos, así como por la diferente suberización de las paredes de las células del mesófilo.

Una superficie mojada, expuesta al aire, cede tanto más vapor de agua por unidad de tiempo y área cuanto mayor sea el **gradiente de presión de vapor** entre la superficie y el aire. Por otra parte, la radiación intensa calienta la superficie foliar lo que origina un gradiente de presión de vapor más acusado. Por tanto, las propiedades radiativas de la hoja (especialmente su albedo) desempeñan un papel esencial en la evaporación del agua en el mesófilo. La transpiración y el movimiento del agua a través de la planta se presentan incluso, en condiciones de humedad elevada, cuando el aire está saturado con vapor de agua.

A lo largo de la vida de una planta, aproximadamente un 95 % del agua absorbida pasa simplemente a través de ella y se pierde por transpiración. No obstante, hay que decir también que la evaporación del agua en las hojas proporciona la mayor parte de la energía para el movimiento del agua, dado que establece el gradiente de potencial hídrico (Capítulos 2 y 4).

3.1. El vapor de agua fluye de la hoja a la atmósfera mediante difusión a través de los estomas

La transpiración se puede considerar como un proceso de difusión (véase Capítulo 2). Su intensidad depende tanto del suministro de energía para vaporizar el agua,

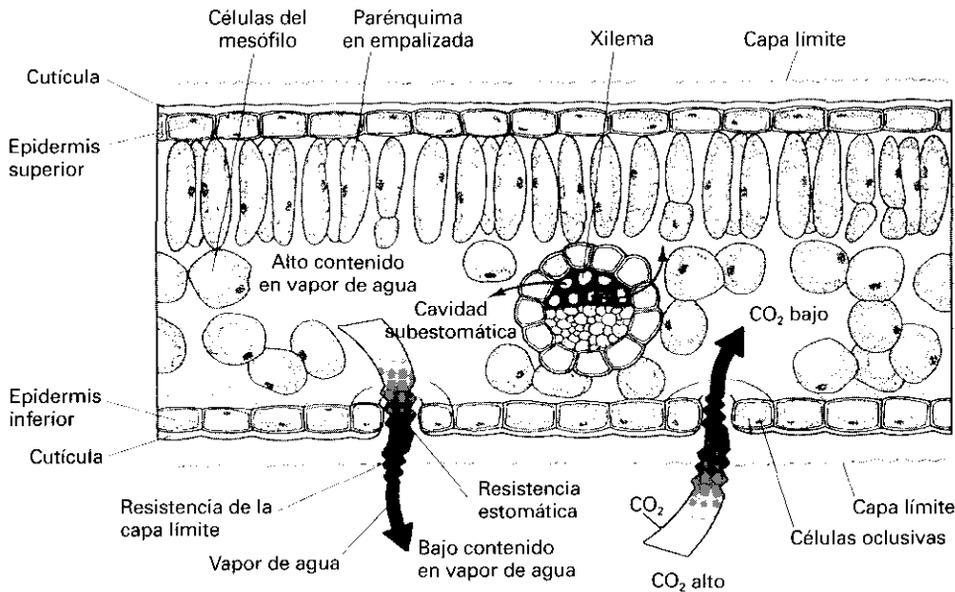


Figura 3-5. Ruta del agua a través de la hoja. El agua fluye desde el xilema hacia las paredes celulares del mesófilo, donde se evapora en los espacios aéreos en el interior de la hoja. El vapor de agua se mueve por difusión a través del espacio aéreo hacia el poro estomático, y atraviesa la capa límite de aire en contacto con la superficie de la hoja. El CO₂ también difunde hacia la hoja a través del estoma, según un gradiente de concentración (adaptado de Taiz y Zeiger, 1991).

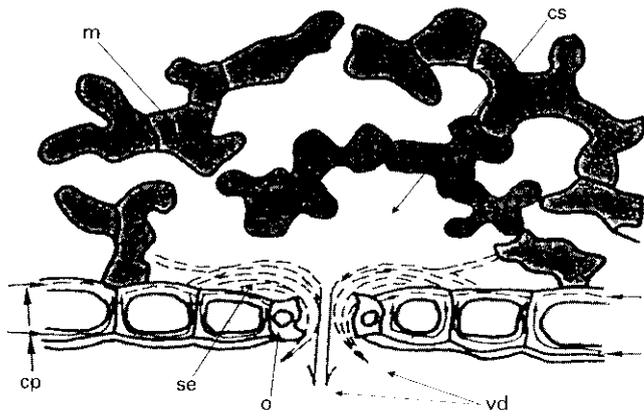


Figura 3-6. Representación de los trayectos del flujo de vapor de agua entre los espacios aéreos de la hoja y la atmósfera exterior; cs, cavidad subestomática; m, células del mesófilo; se, principales sitios de evaporación; o, célula oclusiva; vd, vía de difusión hacia el exterior; cp, corriente principal del agua líquida (según Meidner y Sheriff, 1976) (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

como del gradiente de concentración o presión de vapor y la magnitud de las resistencias. La fuerza motriz para el movimiento de agua líquida a través del tejido es la **diferencia de potencial hídrico** ($\Delta\Psi$), pero la fuerza motriz para el movimiento del vapor de agua es el **gradiente de concentración o presión de vapor** que, además de elevado, frecuentemente es constante. Por tanto, lo que determina el flujo variable de vapor de agua en la transpiración es la resistencia a la difusión de vapor hacia el exterior o **resistencia difusiva** (r) ($s \cdot m^{-1}$). (Frecuentemente se utiliza $1/r =$ **conductancia**, g , $m \cdot s^{-1}$). La transpiración difiere de la evaporación en que el escape del vapor de agua está controlado, en gran medida, por las resistencias foliares a la difusión, las cuales no participan en la evaporación de una superficie de agua libre. Utilizando la ley de Ohm, que es un análogo eléctrico a la ley de Fick de la difusión, tendremos:

$$T = \frac{C_h - C_a}{r_h + r_a} = \frac{273 \rho_v e_h - e_a}{PT (r_h + r_a)} \quad [3-2a]$$

$$T = (C_h - C_a) g_w \quad [3-2b]$$

siendo T , la transpiración ($g \cdot m^{-2} s^{-1}$); C_h y C_a , la concentración de vapor de agua ($g \cdot m^{-3}$); r_h y r_a , las resistencias al vapor de agua de la hoja y de la capa límite (véase apartado 3.2); $g_w = 1/(r_h + r_a)$, conductancia total al vapor de agua; e_h y e_a , la presión de vapor (mbar) de las superficies evaporantes en el interior de la hoja (h) y en el aire (a). El término $273 \rho_v/PT$ (en el que ρ_v es la densidad del vapor de agua en $g \cdot m^{-3}$; P , es la presión atmosférica en mbar y T , la temperatura absoluta en $^{\circ}K$) convierte la concentración de vapor en presión de vapor.

La temperatura foliar determina el valor de C_h y e_h , dado que la concentración de vapor en las cavidades subestomáticas se considera similar a la del aire saturado (Cuadro 2-1). Con respecto a C_a y e_a , dependen tanto de la temperatura como de la humedad relativa del aire.

La ecuación anterior se puede expresar también en términos de diferencia de potencial hídrico ($\Delta\Psi$) entre la hoja y el aire. Si consideramos una situación en la que el aire tenga una humedad relativa (HR) del 50% y una temperatura de $20^{\circ}C$, su Ψ será -94.1 MPa (ecuación 2-17). Naturalmente, el Ψ de la atmósfera se hace más negativo, tanto con el aumento del **déficit de saturación de vapor** en la atmósfera como con el aumento de la temperatura. El valor tan negativo del potencial hídrico en la atmósfera, en comparación con los valores de potencial hídrico normalmente encontrados en los tejidos vegetales, indica que el mayor gradiente de potencial hídrico en todo el sistema se presenta en el segmento hoja-aire. Este hecho destaca la importancia de un control preciso, pero flexible, del flujo de vapor de agua en ese trayecto de la vía.

3.2. La resistencia estomática a la difusión limita la tasa transpiratoria

Las resistencias relacionadas con la transpiración requieren una atención especial. La **resistencia foliar** (r_h) se refiere al flujo de vapor a través de los estomas y la cutícula. Se considera que r_h consta de dos resistencias conectadas en paralelo:

$$1/r_h = 1/r_c + 1/r_e \quad [3-3]$$

En el caso de hojas anfiestomáticas:

$$1/r_h = 1/r_{\text{cara superior}} + 1/r_{\text{cara inferior}} \quad [3-4]$$

La **resistencia estomática** (r_e) depende del número de estomas por unidad de área foliar, así como de su geometría y del grado de abertura. Las variaciones en la abertura estomática se producen como consecuencia de cambios en la turgencia de las células oclusivas (véase Movimientos Estomáticos, apartado 2). La **resistencia cuticular** (r_c), depende de las características de la cutícula foliar. Una r_c elevada se asocia con cutículas gruesas o enriquecidas con materiales hidrófobos; no es controlada por la planta como lo es r_e y disminuye con el aumento de la temperatura y de la humedad relativa. Cuando se compara con los valores mínimos de r_c , r_c es de 1 a 2 órdenes de magnitud superior (Cuadro 3-1). Por tanto, durante el día, la **transpiración cuticular** es despreciable en relación con la **transpiración estomática**. La importancia ecológica de r_c es más aparente durante la noche, cuando los estomas se cierran, las **xerófitas** alcanzan valores mucho más elevados de r_c que las **mesófitas**, mostrando así tasas inferiores de transpiración cuticular.

Cuadro 3-1. Resistencias (r) al transporte de agua en hojas con saturación luminosa y 22 °C (según Holmgren, Jarvis y Jarvis, 1965). (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

Especie vegetal	Resistencias al transporte de vapor de agua (sm^{-1})		
	Cutícula r_c	Estoma (abierto) r_e	Capa límite r_a
<i>Helianthus annuus</i>	-	38	55
<i>Lamium galeobdolon</i>	3700	1060	73
<i>Circaea lutetiana</i>	9000	1610	61
<i>Acer platanoides</i>	8500	1470	69
<i>Quercus robur</i>	38 000	670	69
<i>Betula verrucosa</i>	8300	92	80

Además de las dos resistencias mencionadas, el vapor de agua que difunde fuera de la hoja encuentra una tercera resistencia, la de la capa límite de aire relativamente en calma, casi saturado de vapor de agua, que cubre la superficie foliar: la **resistencia de la capa límite o capa estacionaria** (r_a), que es proporcional al grosor de la capa de aire quieto (d) en contacto con la superficie foliar:

$$r_a = d/D \quad [3-5]$$

siendo D , el coeficiente de difusión del vapor de agua al aire (aproximadamente $0.24 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). La velocidad del viento afecta extraordinariamente al grosor de la capa límite, de tal forma que disminuye con el aumento de la velocidad. Por tanto, también se ha sugerido la siguiente expresión para calcular r_a :

$$r_a = 1.3 \sqrt{l/u} \quad [3-6]$$

siendo l el ancho de la hoja y u la velocidad del viento. Ordinariamente, r_a varía entre 10 y $100 \text{ s} \cdot \text{m}^{-1}$ para un espectro normal de velocidades del viento y formas foliares.

En la mayoría de las plantas la resistencia estomática es la que normalmente limita la tasa transpiratoria.

Nota: El inverso de la resistencia total al vapor de agua ($1/[r_h + r_a]$) es la conductancia total al vapor de agua (g_w).

3.3. La interacción entre factores ambientales y endógenos determina la intensidad transpiratoria

Los factores ambientales más importantes que afectan a la transpiración son: radiación, déficit de presión de vapor del aire, temperatura, velocidad del viento y suministro de agua. Entre los factores de la propia planta

figuran: área foliar, estructura y exposición foliares, resistencia estomática y capacidad de absorción del sistema radical. Las interacciones complejas entre estos factores se pueden describir en función de sus efectos sobre los componentes de resistencia y energía en la ecuación 3-2. El hecho importante es que un cambio en uno de los factores que afectan a la transpiración no produce, necesariamente, un cambio proporcional en la tasa transpiratoria porque la intensidad está controlada por más de un factor, y hay que tener en cuenta, además, que el factor controlador varía constantemente. Un buen ejemplo puede ser el efecto del viento. Si inicialmente las hojas están más frías que el aire, el viento puede aumentar la transpiración; si están más calientes, al enfriarlas, puede disminuirla. En la Figura 3-7 se indica el entramado complejo de la interacción de factores que determina la intensidad transpiratoria.

3.4. El método gravimétrico y el de medida de la pérdida de vapor de agua son los más utilizados para cuantificar la transpiración

El método gravimétrico consiste en determinar el peso que pierde la planta debido a la transpiración. Se parte de la planta bien regada en maceta, teniendo la precaución de cubrir la superficie del suelo con material impermeable. Este método puede utilizarse también en condiciones de campo, usando los denominados **lisímetros** que consisten en grandes recipientes rellenos de suelo (a veces varios metros cúbicos), que se apoyan sobre dispositivos de pesada y cuyo conjunto se entierra en el suelo. El lisímetro se suele considerar como el instrumento más apropiado y exacto para estudios de campo, especialmente en cultivos, pero es caro y no portátil.

Para cuantificar la transpiración mediante el estudio de la pérdida de vapor de agua, se encierra una hoja o

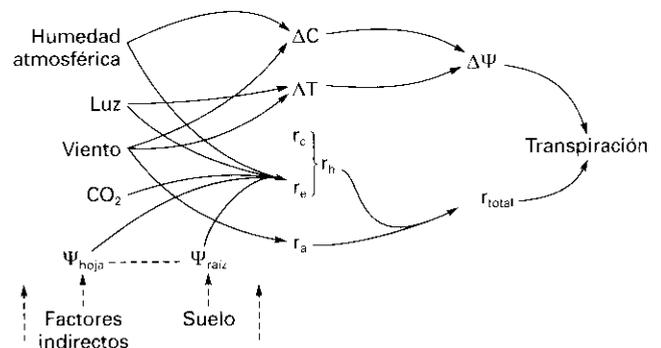


Figura 3-7. Interacción de factores que afectan a la transpiración (según Ridge, 1991). (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

rama en una cámara transparente dotada con flujo de aire. La transpiración se estima como la diferencia de contenido hídrico entre el aire que entra y sale de la cámara. También se pueden medir la temperatura, el contenido en anhídrido carbónico y otros parámetros, simultaneando las medidas de transpiración con las de abertura estomática y de tasas fotosintéticas (véase Capítulo 13). Este método se puede utilizar para estudios en condiciones de campo, encerrando árboles completos o un conjunto de plantas en el interior de una cubierta de plástico. Los **métodos de intercambio de gases**, bien a pequeña escala en el laboratorio, o en condiciones de campo, están limitados a estudios a corto plazo. El hecho de encerrar una planta puede, a largo plazo, alterar significativamente el microclima que rodea las hojas. Condiciones tales como temperatura, humedad y flujo del aire han de registrarse y controlarse cuidadosamente. No obstante, las cámaras y los sistemas de medida pueden hacerse muy portátiles y, en la actualidad, se dispone de un gran número de instrumentos comerciales que se pueden utilizar en estudios de campo. Una técnica que, probablemente, será de gran valor en el futuro se basa en la determinación de la intensidad transpiratoria a partir de estimaciones de la velocidad del **flujo de savia** (véase Capítulo 4).

La transpiración en ecosistemas naturales a gran escala es difícil de medir y, normalmente, se estima de forma indirecta. Aquí el investigador calcula esencialmente un **balance hídrico**, considerando tanto los aportes (precipitación) como las pérdidas (almacenamiento en el suelo, drenaje, escorrentía, etc.). Se considera que la transpiración equivale a la diferencia entre aportes y pérdidas.

3.5. La eficiencia en el uso del agua es una medida de la efectividad de los estomas en maximizar la fotosíntesis reduciendo, al mismo tiempo, la pérdida de agua

Existe un interés considerable en relacionar la producción vegetal con las medidas de pérdida de agua por evaporación correspondientes a la zona en que se desarrollan las plantas. Lógicamente, en sistemas manejados por el hombre, pertenecientes a ambientes con escasez de agua, existe una manifiesta necesidad de maximizar el crecimiento teniendo en cuenta la cantidad de agua disponible. La **eficiencia en el uso del agua**, WUE (*Water Use Efficiency*) se refiere precisamente a un parámetro de producción. Un objetivo importante de investigación en este área es alcanzar una elevada WUE manteniendo alta la productividad.

La eficiencia en el uso del agua es un parámetro que se puede considerar a diferentes niveles, y es necesario tener precaución a la hora de su utilización. En lo que se refiere a la hoja, la WUE (también denominada **eficiencia en el uso del agua de la fotosíntesis**, WUE_{ph}) es:

$$WUE_{ph} = \frac{\text{absorción neta de CO}_2 \text{ } (\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})}{\text{tasa transpiratoria } (\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})} \quad [3-7]$$

En lo que se refiere a una comunidad o cultivo, la WUE (también denominada **eficiencia en el uso del agua de la productividad**, WUE_p) es el total de materia seca producida por unidad de agua consumida en la **evapotranspiración** (evaporación del suelo y transpiración de las plantas):

$$WUE_p = \frac{\text{materia seca o rendimiento del cultivo } (\text{kg ha}^{-1})}{\text{agua consumida en evapotranspiración } (\text{kg ha}^{-1})} \quad [3-8]$$

En este último caso, la falta frecuente de datos sobre materia seca de raíces hace que los resultados se calculen teniendo en cuenta únicamente la materia seca de los órganos aéreos. Por ello, algunos autores han propuesto utilizar el término **eficiencia transpiratoria** más bien que eficiencia en el uso del agua, para referirse al total de la producción de materia seca por unidad de agua transpirada.

A nivel de la hoja se ha visto que tanto los factores ambientales como los de la propia planta influyen en la eficiencia transpiratoria. El factor ambiental más importante es la humedad atmosférica. Un aumento en el **déficit de presión de vapor de la atmósfera** (disminución de la humedad relativa) elevará la transpiración sin un aumento simultáneo en la fotosíntesis, lo cual conduce a una disminución en la eficiencia transpiratoria. Por tanto, una elevada temperatura del aire, a través de su efecto en el déficit de presión de vapor, reducirá la eficiencia transpiratoria. Asimismo, las plantas propias de regiones frías tendrán mayor eficiencia transpiratoria que las plantas propias de regiones cálidas, debido a la menor demanda evaporativa en la región fría. Los déficits hídricos, al originar cierre estomático, aumentarán la eficiencia transpiratoria, si bien un incremento simultáneo en la resistencia interna a la absorción de CO_2 pueda impedir tal aumento y, por tanto, hacer que los déficits hídricos afecten muy poco o casi nada a la eficiencia transpiratoria.

Por lo general, la eficiencia transpiratoria de especies C_4 suele ser el doble de la de las especies C_3 . Esta diferencia aumenta con la temperatura en el intervalo comprendido entre 20 y 35 °C. El mayor valor en las especies C_4 se debe, fundamentalmente, a las mayores tasas de fotosíntesis y crecimiento, sobre todo en condiciones de intensidad luminosa y temperatura elevadas (véanse Capítulos 12 y 13).

Se ha desarrollado una técnica que permite conocer la eficiencia transpiratoria de una manera integrada, a lo largo de todo el desarrollo y en condiciones de campo. La técnica de **discriminación isotópica del carbono**

no se basa en que la primera enzima que participa en la fijación de CO_2 en especies C_3 , la rubisco (véase Capítulo 11), discrimina fuertemente en contra del isótopo pesado $^{13}\text{CO}_2$ (1%) comparado con el isótopo más abundante $^{12}\text{CO}_2$ (99%), mientras que la difusión a través de los estomas sólo discrimina débilmente en contra del $^{13}\text{CO}_2$. Por tanto, con los estomas abiertos (y resistencias a la difusión bajas) hay una mayor discriminación en contra del $^{13}\text{CO}_2$ que cuando existe una limitación difusiva frente a la asimilación de CO_2 por cierre estomático. La teoría predice una relación lineal entre el grado de discriminación por el ^{13}C (Δ) y la concentración interna de CO_2 , ya que:

$$\Delta = (4.4 + 22.6 p_i/p_a) \times 10^{-3} \quad [3-9]$$

siendo, p_i = presión parcial interna del CO_2
 p_a = presión parcial externa del CO_2

Puesto que la eficiencia transpiratoria está también relacionada con la concentración de CO_2 en el interior de las hojas, existe una relación lineal de tipo negativo entre la discriminación por el ^{13}C (Δ) y la eficiencia transpiratoria. Se trata, por tanto, de una técnica francamente útil para estudiar diferencias genotípicas en la eficiencia transpiratoria. La técnica consiste en analizar, mediante espectrometría de masas, la relación de abundancia molar relativa de ^{13}C a ^{12}C en hojas viejas de plantas de la misma edad y pertenecientes a diversos genotipos. Las desigualdades que se presenten estarán relacionadas con diferencias en la eficiencia transpiratoria durante la acumulación de carbono atmosférico a lo largo de toda la vida de la hoja. Por esto se le denomina **eficiencia transpiratoria intrínseca o integrada**. Por el contrario, el método basado en determinar la eficiencia transpiratoria mediante intercambio de gases en un determinado momento de la vida de la planta servirá para obtener la denominada **eficiencia transpiratoria instantánea o actual**. Es decir, en este último caso, para tener una idea integrada de toda la vida de la planta, haría falta realizar dichas medidas a lo largo del día y en diferentes momentos del desarrollo, lo cual, teniendo en cuenta las limitaciones de la metodología del intercambio de gases, además de difícil sólo permitiría seguir simultáneamente un número muy limitado de individuos. Todo ello pone de manifiesto el interés actual por la determinación de la composición isotópica del carbono para estimar la eficiencia transpiratoria de una manera cómoda e integrada.

RESUMEN

La transpiración, es decir, la pérdida de vapor de agua en las plantas, es un proceso controlado, tanto por factores físicos externos, como factores fisiológicos. La ra-

diación solar proporciona la fuente de energía para la transpiración, siendo la evaporación del agua en la hoja la que establece el gradiente de potencial hídrico en la planta. La intensidad transpiratoria depende del suministro de energía, del gradiente de presión de vapor y de la magnitud de las resistencias. La resistencia difusiva al movimiento del vapor de agua desde la hoja al aire tiene tres componentes: cuticular, estomático y de capa límite. La resistencia cuticular es, ordinariamente, muy elevada y, por tanto, la mayor parte del vapor se mueve a través de los estomas. Las variaciones en la abertura estomática se producen como consecuencia de cambios en la turgencia de las células oclusivas. La regulación de la abertura estomática es muy compleja, ya que los estomas responden a una diversidad de influencias ambientales (por ejemplo, luz, humedad, temperatura, concentración de CO_2) y endógenas (tales como producción y liberación de hormonas en raíz y hoja, etc.). Todos estos factores actúan a través de complejos sistemas de anteaalimentación y realimentación.

Debido a que, con frecuencia, el agua es un recurso limitante de la producción vegetal, existe un interés considerable en determinar la eficiencia en el uso del agua en relación con la fotosíntesis y la productividad. Normalmente, la eficiencia en el uso del agua varía en los diferentes tipos fotosintéticos de acuerdo al siguiente orden: $\text{C}_3 < \text{C}_4 < \text{CAM}$, existiendo también diferencias importantes entre especies dentro de cada tipo.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

- Una planta de alubia creció bajo una campana de vidrio, con atmósfera saturada de vapor de agua a 25°C . Al incidir la radiación solar sobre la planta, su temperatura aumentó 10°C por encima de la del aire que se mantuvo a 25°C . Otra planta similar creció a la sombra a 25°C y con una humedad relativa del 70%. ¿Cuál de las dos plantas transpiró más? Los valores de las resistencias a la difusión de agua fueron $r_a = 0.5 \text{ s cm}^{-1}$, $r_c = 1 \text{ s cm}^{-1}$ y $r_{cs} = 45 \text{ s cm}^{-1}$. Suponemos que la resistencia del mesófilo (r_m) es despreciable. Las concentraciones de vapor de agua de saturación a 25 y 35°C son 23×10^{-6} y $40 \times 10^{-6} \text{ g H}_2\text{O cm}^{-3}$, respectivamente.
- Seleccione aquellos factores que pueden aumentar la tasa transpiratoria. Para cada factor seleccionado, indique cómo actúa para estimular la transpiración.
 - Viento fuerte.
 - Baja velocidad del viento.
 - Humedad relativa baja.
 - Humedad relativa elevada.
 - Temperatura foliar por encima de la temperatura ambiente.
 - Temperatura foliar por debajo de la temperatura ambiente.
 - Estomas cerrados.
 - Estomas muy abiertos.
- ¿Cuáles de las siguientes propiedades o características: 1) se encuentran ordinariamente en las células oclusivas, y

- 2) cuáles son esenciales si los estomas han de funcionar apropiadamente?
- Pared celular interior menos elástica que la exterior.
 - Bomba de K^+ en la membrana celular.
 - Capacidad para sintetizar malato.
 - Posesión de cloroplastos.
 - Bomba protónica en la membrana celular.
 - Capacidad para generar potenciales de presión superiores a los de las células adyacentes.
4. Describa una hoja que maximice o minimice la transpiración basándose sólo en las características foliares.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.
- Holmgren, P. *et al.*: «Resistances to carbon dioxide and water vapour transfer in leaves of different plant species». *Physiologia Plantarum*, 18: 557-573, 1965.
- Hopkins, W. G. (ed.): *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1995.
- Kozlowski, T. T., y Pallardy, S. G. (eds.): *Physiology of Woody Plants*. Academic Press, Nueva York, 1997.
- Kramer, P. J., y Boyer, J. S.: *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, Nueva York, 1995.
- Meidner, H., y Mansfield, T. A.: *Physiology of Stomata*. McGraw-Hill, Londres, 1968.
- Meidner, H., Sheriff, D. W. (eds.): *Water and Plants*. Blackie & Sons, Londres, 1976.
- Raschke, K.: «Movements of stomata». En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series vol. 7, *Physiology of Movements*. Haupt, W. y Feinleib, M. E. (eds.). Springer-Verlag, Berlín, pp. 383-441, 1979.
- Ridge, I.: *Plant Physiology*. Hodder and Stoughton, Londres, 1991.
- Salisbury, F. B., y Ross, C. W.: *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericana, México, 1994.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (eds.): *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Redwood City, California, 1991.

TRANSPORTE DE AGUA Y BALANCE HÍDRICO EN LA PLANTA

Manuel Sánchez-Díaz y Jone Aguirreolea

1. Introducción. 2. Absorción de agua por las raíces. 3. Flujo hídrico a través del xilema. 4. Movimiento del agua en la hoja. 5. Balance hídrico. 6. Déficit hídricos y crecimiento vegetal.

1. INTRODUCCIÓN

En una planta en crecimiento activo, existe una fase de agua líquida continua que se extiende desde la epidermis de la raíz hasta las paredes celulares del parénquima foliar. Generalmente, se acepta que el movimiento de agua desde el suelo al aire, a través de toda la planta, se puede explicar por la existencia de **gradientes de potencial hídrico** a lo largo de la vía (Capítulo 2). Debido a que el aire en los espacios intercelulares del parénquima lagunar en el mesófilo foliar está prácticamente a presión de vapor de saturación, mientras que el aire exterior rara vez está saturado de agua, el vapor de agua se mueve desde el interior de la hoja a la atmósfera exterior, siguiendo un gradiente decreciente de potencial hídrico. Este proceso, denominado **transpiración**, es la fuerza motriz más importante para el movimiento del agua a través de la planta (Fig. 4-1 y Capítulos 2 y 3).

2. ABSORCIÓN DE AGUA POR LAS RAÍCES

Para mantener la turgencia de la parte aérea, así como para posibilitar las actividades bioquímicas hasta un nivel que asegure la supervivencia, el agua perdida en la planta mediante transpiración ha de reponerse continuamente. Muchas plantas pueden absorber la humedad atmosférica en forma de niebla o rocío, pero la absorción foliar de agua es insignificante comparada con la absorción a través de las raíces.

2.1. El agua entra con mayor rapidez a través de aquellas regiones de la raíz que ofrecen menos resistencia

El agua entra en las raíces en respuesta a un gradiente de potencial hídrico en el xilema, establecido por la transpiración. Claramente, el agua entrará con mayor rapidez a través de aquellas regiones de la raíz que ofrecen menor resistencia, dependiendo de una diversidad de factores y de la especie de que se trate.

Experimentos realizados con raíces primarias jóvenes han demostrado que la región meristemática es relativamente impermeable al agua. En esta región, las células no están vacuoladas y contienen citoplasma denso; asimismo, en la proximidad del ápice radicular el tejido vascular no está diferenciado y, por tanto, si el agua llegase a entrar libremente no podría ascender. El máximo de absorción se presenta en la zona radical próxima a la región meristemática, pero distal a la región de intensa suberización y lignificación (Fig. 4-2). Aumentos en la tasa transpiratoria pueden provocar un desplazamiento de la zona de máxima absorción hacia la base de la raíz (Fig. 4-3).

Los pelos radicales pueden absorber agua, pero no son esenciales, puesto que las plantas cultivadas en un medio hidropónico, así como las plantas acuáticas, suelen carecer de ellos y tampoco están presentes en las raíces adventicias de bulbos, cormos o rizomas. Sin embargo, se sabe que los pelos sirven para fijar las raíces primarias jóvenes a medida que penetran en el suelo y, asimismo, segregan gotas de líquido conforme envejecen. Ambos efectos, a través de sus consecuencias en la

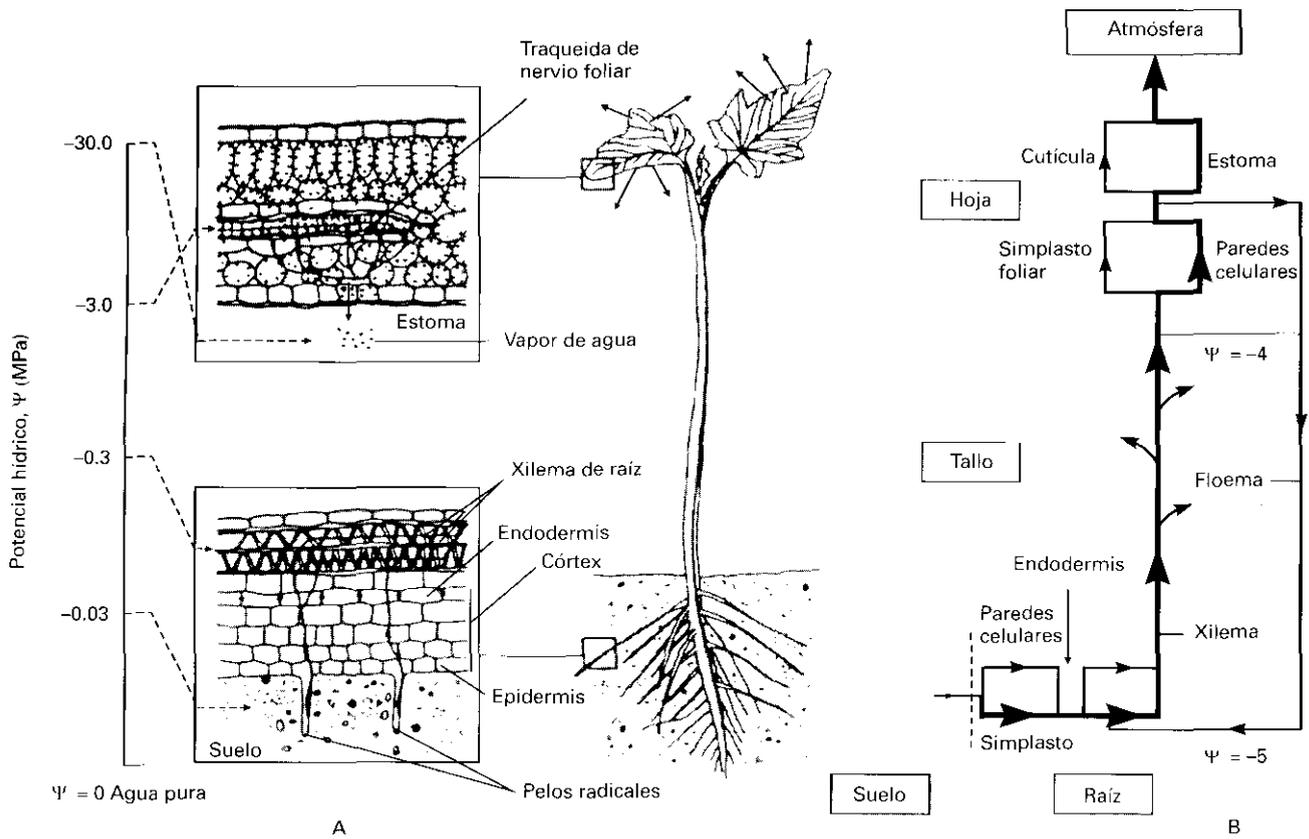


Figura 4-1. (A) Circulación del agua a través de la planta, desde las raíces a las hojas; en la escala de la izquierda se indican los potenciales hídricos aproximados en los diferentes puntos. (B) Rutas alternativas para el agua; la línea gruesa indica la vía más importante. También se muestra el transporte floemático (según Ridge, 1991). (Adap. de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

rizosfera, pueden influir indirectamente en la absorción de agua y nutrientes. En especies leñosas, la mayor parte del sistema radical consta de raíces viejas muy suberificadas. Probablemente, gran parte del agua absorbida por estas raíces penetrará a través de las numerosas fisuras que se originan en la peridermis y felodermis que rodea el tejido vascular secundario. Se ha observado que en raíces de *Pinus taeda* L. y *Liriodendron tulipifera* L., a mitad del verano, aproximadamente un 33 % del conjunto de las raíces está suberificado. Dado que en esa época tiene lugar el máximo de transpiración, se deduce, que la mayor parte del agua entraría a través de las raíces suberificadas. Esto puede ser de especial significado para muchas plantas en invierno, o durante períodos de sequía, cuando existe escaso desarrollo de nuevas raíces y se halla limitado el crecimiento de las ya existentes.

2.2. El movimiento radial del agua en la raíz tiene lugar a través del apoplasto y del simplasto

El valor de Ψ_s de la solución del suelo rara vez es inferior a -0.1 MPa. Puesto que la transpiración genera fácilmente un valor de Ψ para el xilema radical de -0.5 MPa hasta -2 a -3 MPa en la hoja, el gradiente

de potencial hídrico entre la disolución del suelo y los elementos xilemáticos puede ser muy acentuado. En consecuencia, el agua se moverá a través de la raíz en respuesta al gradiente de potencial.

El agua que entra en una raíz primaria ha de atravesar, primero, la epidermis e hipodermis (donde se encuentra presente) y una capa cortical parenquimática de 5 a 10 células de grosor, con numerosos espacios intercelulares llenos de aire. Seguidamente, pasa a la endodermis con la banda de Caspari y, una vez en su interior, se mueve a través de una capa de periciclo, de varias células de grosor, antes de alcanzar el tejido vascular (véase también Capítulo 7).

Teóricamente, existen tres vías anatómicamente diferentes a través de las cuales podría moverse el agua. En primer lugar, la ruta externa al citoplasma vivo, es decir, el continuo de paredes celulares externo a la membrana celular; esta vía se denomina **apoplasto**. El apoplasto de la raíz representa, aproximadamente, un 10 % del volumen de la misma y equivale al **espacio libre**. En segundo lugar, existe la posibilidad de que el agua atraviese la pared celular y el plasmalema, para entrar luego en el citoplasma. Posteriormente, se movería a lo largo del continuo citoplasmático a través de los **plasmodesmos** que conectan el citoplasma con las células adyacentes. Esta ruta, que representa la porción viva de la célula, se denomina vía del **simplasto**. Final-

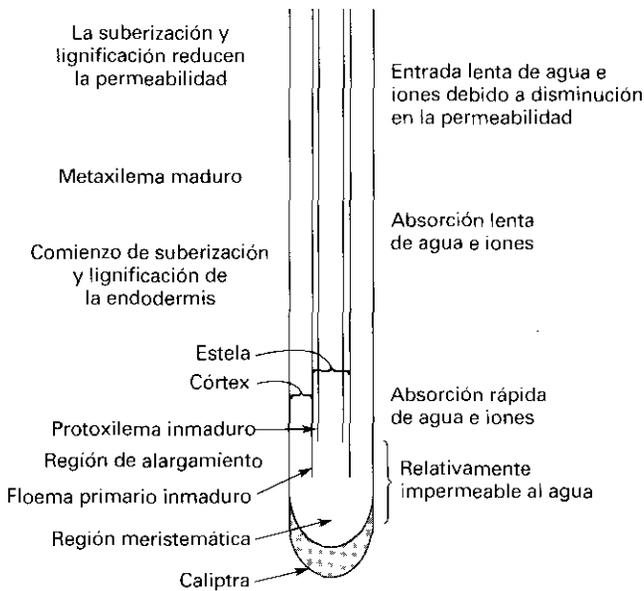


Figura 4-2. Localización de tejidos primarios en una raíz en crecimiento y absorción relativa a diferentes distancias del ápice. Las distancias del ápice a las que se presentan las diferentes fases de maduración dependen de la especie y tasa de crecimiento de la raíz (según Kramer, 1993). (Adaptado de Kramer y Boyer, 1995.)

mente, existe la posibilidad de que el agua atravesase tanto el plasmalema como el tonoplasto, de tal manera, que la **vacuola** pasaría a ser una parte integral de la vía de transporte. La velocidad relativa del flujo a través de cada una de las posibles vías variará inversamente con el nivel de resistencia encontrado.

Tanto mediante ensayos experimentales, como con predicciones basadas en modelos matemáticos, se ha intentado demostrar la ruta del apoplasto o del simplasto-vacuola. Debido a que el agua fluye en la planta desde regiones con mayor a otras con menor potencial hídrico, existirá un considerable movimiento de agua entre cada uno de estos compartimentos hasta que los valores de potencial hídrico, en las diferentes partes del sistema, alcancen el equilibrio.

Si bien existen opiniones diversas con respecto al movimiento del agua a través del córtex, hay acuerdo sobre el hecho de que el movimiento del agua a través de la endodermis ha de ser a través de la ruta simplástica, ya que la **banda de Caspari**, impregnada de lignina y suberina, impide el movimiento del agua a través del apoplasto (Fig. 4-1). Además, en las células endodérmicas más viejas, la superficie de las paredes internas está recubierta por laminillas de suberina que pueden presentar también un engrosamiento generalizado. Existen poros en estas paredes engrosadas, a través de los cuales pasan los plasmodesmos para conectar el citoplasma endodérmico con el citoplasma del periciclo. El movimiento del agua a través de la vía simplástica en la endodermis contribuye significativamente a la resistencia de la raíz; la muerte de las raíces conduce a una reducción en la resistencia al movimiento de agua. Una vez

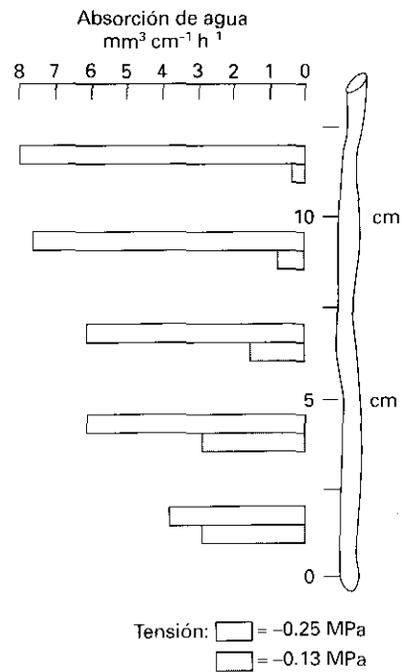


Figura 4-3. Absorción relativa de agua a lo largo de diferentes zonas de raíz de *Vicia faba* en función de la intensidad transpiratoria. La tensión xilemática medida a baja intensidad transpiratoria fue -0.13 MPa , y -0.25 MPa a alta intensidad transpiratoria. Cuando la transpiración es baja, la mayor absorción de agua se presenta cerca del ápice de la raíz. Cuando es alta, el aumento de tensión desvía la zona de absorción hacia regiones más basales (adaptado de Brouwer, 1965).

que el agua ha atravesado la barrera endodérmica y el cilindro central, las resistencias encontradas serán comparables a las del córtex; el agua continuará desplazándose a través del cilindro central hasta que, finalmente, penetre en los vasos y traqueidas xilemáticos para moverse hacia la parte aérea.

2.3. Cuando la transpiración es muy baja, la absorción de agua a consecuencia de una absorción activa de iones en la raíz origina la presión de raíz

Si el tallo de una planta herbácea bien desarrollada se corta a ras del suelo, es frecuente que aparezca líquido xilemático en la superficie de corte. La exudación de dicho líquido, que puede persistir durante varias horas, indica la presencia de una presión positiva en el xilema. La magnitud de esta presión se puede medir adaptando un manómetro a la superficie de corte. A esta presión se le denomina **presión radical**, ya que las fuerzas que originan la exudación se originan en la raíz.

Igualmente, cuando una planta se desarrolla en condiciones de muy baja transpiración, con el sistema radical en un medio bien aireado, húmedo y caluroso, frecuentemente aparecerán gotitas de líquido en los ápices y márgenes de las hojas. Estas gotitas, a las que se le denomina gotas de **gutación**, salen a través de los hida-

todos. La fuerza responsable de la gutación surge en las raíces y se debe a la presión radical.

Se ha propuesto que la presión radical se desarrolla como consecuencia de una disminución en el valor del Ψ_s de la savia del xilema radical. Ello se debe al transporte activo de iones inorgánicos y materiales orgánicos hacia los vasos y traqueidas xilemáticas a partir del parénquima xilemático circundante (véase Capítulo 7). Por tanto, el agua se moverá a través de la raíz en respuesta al gradiente de potencial hídrico desarrollado. En otras palabras, la raíz se comporta como un osmómetro, al favorecer la entrada de agua en los vasos xilemáticos y originar una presión hidrostática en el interior del cilindro central.

Se ha intentado atribuir una función importante a la presión radical. Una presión de 0.1 MPa podría hacer subir al agua casi 10 m y, por eso, se propuso la presión radical como mecanismo para explicar la ascensión del agua en la planta; no obstante, hay datos contrarios. En primer lugar, no se ha demostrado la existencia de presión radical en todas las especies. En segundo lugar, se presenta con una periodicidad circadiana, máxima durante la noche y mínima durante el día; además, suele ser estacional, alta durante la primavera y mínima o no detectable en el verano cuando la pérdida transpiratoria es mayor. Finalmente, se puede demostrar que en períodos de transpiración activa, las columnas de agua xilemática están sometidas a tensión y nunca presentan una presión positiva. Las raíces sometidas a frío, anaerobiosis o venenos metabólicos no presentan presión radical, probablemente porque en tales condiciones cesa el transporte de solutos al xilema. No obstante, si se corta el sistema radical, la transpiración no se afectará hasta pasado un tiempo considerable y podrá incluso, aumentar.

Se ha sugerido, por otra parte, que en el caso de que se haya presentado cavitación debido a una transpiración rápida, sequía, congelación o cualquier otra anomalía, la presión radical podría volver a funcionar y, por tanto, restablecería la continuidad de las columnas de agua en el xilema. Sin embargo, visto en su conjunto, es muy probable que la presión radical sea una consecuencia fortuita de la acumulación de iones en el xilema, sin ningún papel esencial en el equilibrio hídrico total de la planta.

3. FLUJO HÍDRICO A TRAVÉS DEL XILEMA

La supervivencia de las plantas terrestres depende de que una cantidad suficiente de agua sea absorbida por el sistema radical y ascienda a través del tallo y ramas, para reemplazar la pérdida por transpiración en las hojas. Además, el sistema a través del cual se mueve el agua ha de permitir una tasa de transporte relativamente rápida. La difusión del agua de una célula a otra, tal como se describió anteriormente (véase Fig. 2-8), es un proceso demasiado lento como para suministrar agua suficiente a la parte superior de la planta; en realidad, la

existencia de la flora terrestre dependió de la evolución de un sistema vascular conductor de agua.

3.1. El transporte de agua en el xilema depende del gradiente de potencial hídrico y de las características anatómicas de los vasos y traqueidas

La sugerencia de que el **xilema** era el tejido a través del cual el agua ascendía en el tallo se hizo por primera vez hace más de 250 años. En angiospermas, el agua se mueve primordialmente a través de **vasos**, elementos que durante la maduración pierden su citoplasma, desarrollan paredes perforadas y se fusionan en hileras para formar tubos largos. Estos vasos pueden tener muchos metros de longitud y oscilan, dependiendo de la especie, entre 20 y 700 μm de diámetro. En gimnospermas, el elemento conductor es la **traqueida**. Las traqueidas son más cortas (< 5 mm) y estrechas (< 30 μm) que los vasos; poseen paredes terminales adelgazadas, que se superponen con las células contiguas, y punteaduras reforzadas, tanto en las paredes laterales como terminales, a través de las cuales fluye el agua. Las células de vasos y traqueidas pierden el citoplasma durante su maduración y poseen paredes celulares muy lignificadas y relativamente rígidas. Existen conexiones frecuentes entre las hileras adyacentes de células a través de punteaduras en las paredes laterales. Los vasos y las traqueidas se extienden hacia las raíces y hojas, donde se ramifican repetidamente.

Debido a que los vasos y traqueidas han perdido su citoplasma, la resistencia al flujo de agua en el xilema es baja. Si bien es conveniente considerar el xilema como un sistema de conductos, a través del cual se mueve el agua, debido a la presencia de numerosas paredes transversales perforadas, se trata más bien de tubos interrumpidos a intervalos frecuentes. Como se explicará posteriormente, estas paredes trasversales parecen ser, en determinadas circunstancias, esenciales para el funcionamiento continuado del sistema de transporte.

3.2. El transporte de agua en el xilema se produce por flujo masivo

El flujo masivo a través de los vasos xilemáticos (véase Capítulo 2, apartado 6.2), se puede analizar utilizando la ecuación de Hagen-Poiseuille, que demostró que cuando un fluido está sometido a presión en un capilar, el **flujo total por conducto** o **caudal**, q_v ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), es función de la viscosidad del líquido, η ($\text{Pa} \cdot \text{s}$), del gradiente de presión hidrostática, ΔP (Pa), del radio del capilar, r (m), y de la longitud del mismo, l (m):

$$q_v = \frac{\pi r^4}{8 \eta l} \Delta P \quad [4-1]$$

Desde otro punto de vista se puede indicar que el caudal es inversamente proporcional a la resistencia del capilar al flujo (R):

$$R = \frac{\Delta P}{q_v} \quad [4-2]$$

La ecuación 3-1 se aplica al movimiento del agua en los vasos xilemáticos porque es provocado por la diferencia de tensión entre el suelo y las hojas. El punto importante a destacar es, por tanto, que **el flujo es directamente proporcional a la cuarta potencia del radio**. Las consecuencias de esta relación se pueden vislumbrar comparando las tasas de flujo para una traqueida de 40 μm de diámetro ($r = 20 \mu\text{m}$) y un vaso de 200 μm de diámetro ($r = 100 \mu\text{m}$). Aunque el diámetro relativo del vaso sea sólo 5 veces superior al de la traqueida, la velocidad relativa del flujo será 625 (es decir, 5^4) veces la de la traqueida. La elevada velocidad del flujo en los vasos mayores se presenta debido a que la velocidad del flujo de agua no es uniforme en toda la sección del conducto. La velocidad del flujo de las moléculas situadas en la proximidad de la pared del conducto se reduce por fricción, debido a fuerzas de adhesión entre el agua y la pared del conducto. A medida que aumenta el diámetro del conducto, la proporción de moléculas en la proximidad de la pared y, por tanto, sujetas a fuerzas de fricción disminuirá. Dicho de otra manera, las moléculas que se mueven más rápidamente en el centro del conducto constituyen la mayor proporción del conjunto, aumentando así la velocidad total del flujo.

Se ha encontrado coincidencia con la ley de Hagen-Poiseuille en el caso de la vid, que posee vasos xilemáticos grandes y abiertos. Especies como el roble, que poseen poros en forma de anillo, dan también valores próximos a los teóricos, mientras que especies con poros difusos, tales como el haya, dan valores considerablemente inferiores a los previstos.

Se ha desarrollado una serie de **métodos de cuantificación del flujo xilemático**. La forma más directa es medir la cantidad total de agua que pasa a través del tallo, entre el sistema radical y la parte superior de la planta. Las medidas en plantas intactas fueron realizadas por primera vez por Huber y Schmidt (1932), quienes diseñaron el «método del pulso calorífico», que mide la velocidad del flujo de agua en el xilema. Para calcular la cantidad total de agua, ha de conocerse el área conductora real, lo cual generalmente es imposible, puesto que no se conoce qué vasos participan en el transporte. Para superar esta limitación, se puede utilizar la técnica del flujo en masa de equilibrio estable, basada en la capacidad calorífica específica del agua, existiendo dos métodos principales de medida: el de calentamiento continuo y el de equilibrio calorífico. Las velocidades máximas del flujo observadas en tallos de diferentes árboles oscilan desde 0.3-0.8 mm s^{-1} en coníferas y 0.2 - 1.7 mm s^{-1} en especies de duramen con poro difuso (*Populus*, *Acer*) hasta valores de 1.1-12.1

mm s^{-1} en las especies de duramen con poros en anillos (*Fraxinus*, *Ulmus*). En especies herbáceas, la corriente de agua xilemática puede llegar a alcanzar velocidades de hasta 28 mm s^{-1} (100 m h^{-1}). Estos valores son inferiores a los esperados como consecuencia, en parte, de la resistencia al flujo en las membranas de las punteaduras.

3.3. La ascensión del agua en la planta se puede explicar mediante la teoría de la tensión-cohesión

Para ser aceptable, cualquier teoría sobre la ascensión del agua en la planta ha de explicar cómo llega a las partes superiores de los árboles más altos. Especies de *Sequoia* de California, de *Pseudotsuga menziesii* del noroeste del Pacífico o de *Eucalyptus* en Australia pueden alcanzar alturas superiores a los 100 m. Cuando se añade a su altura la profundidad de penetración de las raíces en el suelo, resulta claro que, en casos extremos, el agua ha de subir aproximadamente 120 m.

Si bien en los últimos 100 años se han propuesto muchos mecanismos para explicar la ascensión de la savia, actualmente se acepta la **teoría de la tensión-cohesión de agua**. Cuando el agua se halla confinada en tubos con diámetro estrecho y paredes humedecibles (tales como los vasos y traqueidas xilemáticas), al aplicar un tirón desde la parte superior, la tensión se transmitirá a través de la columna de agua sin que se pierda el contacto con la pared del tubo (fuerzas de adhesión). En otras palabras, en el interior de tales tubos, las columnas de agua se comportan como si todas las moléculas estuviesen conectadas, y una tensión aplicada a cualquier parte de la columna se transmite a través de la misma. Si se aplica una tensión (presión negativa) a un extremo de tal columna, el agua se moverá hacia la fuente de la tensión.

Los vasos y traqueidas encierran columnas de agua continuas, en forma de hilos frecuentemente entrelazados, que se extienden desde los nervios foliares hasta el xilema de las raíces más pequeñas. **La transpiración crea un gradiente de potencial hídrico** a través del mesófilo foliar, que provoca que el agua desaparezca en los extremos de los nervios foliares. La pérdida de agua a ese nivel crea una tensión en las columnas del xilema, cuya magnitud depende de la intensidad transpiratoria. El fluido xilemático es una solución muy diluida de sales y su potencial osmótico no es inferior a -0.1 ó -0.2 MPa; de esta manera, el potencial hídrico en el xilema reflejará, esencialmente, la tensión existente. Por tanto, la reducción en el potencial hídrico a nivel de la superficie transpirante foliar será transmitida a través del xilema hasta las raíces, donde provocará que el agua fluya desde el suelo hacia el interior (véase apartado 2.2), variando la velocidad de absorción con el nivel de tensión desarrollado. En tales condiciones, se creará un **flujo en masa continuo** desde el suelo, vía raíces, tallos y hojas, hasta la atmósfera exterior (Fig. 4-1).

En condiciones ideales, una columna de agua podría soportar, sin romperse, una tensión de -100 a -200 MPa. En el xilema, tales condiciones ideales no existen pero, para tubos similares en diámetro y composición a los vasos y traqueidas, se han aplicado tensiones de hasta -35 MPa antes de que se presente rotura en la columna. La columna será tanto menos estable cuanto mayor sea su diámetro y cuando la tensión se hace excesiva, se presentará **cavitación** con formación de burbujas de aire (véase apartado 3.4). Se ha calculado que para que suba el agua en árboles bajo condiciones de máxima transpiración, se necesita una tensión comprendida entre -0.015 y -0.02 MPa por metro de altura. Este valor representa la tensión necesaria para contrarrestar el efecto hidrostático de la gravedad, así como para superar la resistencia al flujo en el interior de los estrechos conductos xilemáticos. Por tanto, en los árboles más altos (< 120 m), una tensión de -2.4 MPa (-0.02×120) sería suficiente para subir el agua desde el suelo a la copa. En especies herbáceas, son frecuentes valores de potencial hídrico de -0.5 a -1.0 MPa, y en árboles de tamaño moderado, valores de -2.0 a -3.0 MPa en condiciones de elevada transpiración. En algunas especies desérticas, se han medido valores de potencial hídrico foliar de -10 MPa e inferiores. A medida que aumenta la tensión xilemática, los tejidos superficiales pierden agua y el diámetro del tallo disminuye. Por la noche, cuando los estomas se cierran y la pérdida transpiratoria es baja, a medida que van desapareciendo las tensiones, el tallo vuelve a su diámetro original. Queda claro, por tanto, que las fuerzas necesarias para el transporte de agua son compatibles con la arquitectura del sistema vascular, y las hojas pueden continuar funcionando a tensiones superiores a las que se necesitan para satisfacer las demandas transpiratorias de, incluso, las especies forestales más altas.

Debido a que todo el agua de una planta está conectada, las fuerzas cohesivas en el xilema son operativas, tanto lateral como verticalmente. Por tanto, si algunos de los elementos xilemáticos se llegasen a bloquear mediante burbujas de aire (véase cavitación y embolia), (apartado 3.4), o si la continuidad vertical de las columnas de agua se interrumpiese mediante un corte profundo, el agua se movería lateralmente alrededor del obstáculo y continuaría a través de los elementos xilemáticos no lesionados.

3.4. Las columnas de agua en el xilema se hacen muy inestables a medida que aumenta la tensión, pudiéndose originar pequeñas burbujas de aire (cavitación) que se fusionan y originan burbujas mayores que provocan obstrucción (embolia)

A pesar de la fuerza de cohesión, el agua del xilema se puede romper (**cavitar**) bajo las tensiones extremas que

se presentan en la naturaleza. Una vez iniciada la formación de burbujas, éstas se extienden rápidamente formando una **embolia** en el interior del vaso o traqueida, que se detiene en las membranas de las punteaduras. El xilema, sin embargo, minimiza los efectos de la embolia; por una parte, las punteaduras actúan como válvulas complicadas que se cierran cuando la presión aumenta en uno de los vasos y, por otra parte, el agua puede moverse lateralmente a través de las punteaduras, evitando el conducto bloqueado (Fig. 4-4). A menos que la lesión sea repentina y muy extensa, no se afectará la cantidad total de agua transportada. En muchas especies herbáceas, la interconexión entre los elementos individuales del tejido vascular puede ser tan extensa que la oclusión de una parte del mismo no tendrá, prácticamente, efecto sobre el movimiento total del agua. Sin embargo, la entrada de aire puede actuar como un estímulo para la formación de tilosas, bloqueándose de esta forma el interior de los vasos xilemáticos. Esto provoca la pérdida irreversible de la función xilemática en el leño más viejo.

En árboles viejos, una porción considerable del xilema puede no ser funcional debido a embolias o depósito de materiales que interrumpen la continuidad de la columna de agua. Se ha demostrado que, en algunas especies de árboles canadienses, hasta un 40 % del volumen del tronco puede estar ocupado por gases pero, afortunadamente, hay un gran **exceso de xilema** en relación con la cantidad de agua que se transporta. En especies de árboles con poros en forma de anillos, casi todo el transporte de agua se halla confinado al anillo anual más externo (el más joven) del xilema secundario, mientras que en especies de coníferas de poro difuso, varios de los anillos anuales más externos pueden participar en el transporte de agua.

Hasta mediados de los años setenta se suponía que la cavitación era relativamente rara y que no afectaba seriamente al flujo de agua en el xilema. No obstante, las ideas empezaron a cambiar cuando se aplicó a plantas enteras un método de detección de fenómenos de cavitación. Este **método de detección acústica** depende del hecho de que una liberación brusca de la presión durante la cavitación hace que vibren las paredes celulares, produciendo un «chasquido» audible que se puede detectar con un micrófono y un equipo de amplificación apropiado. El uso de detectores ultrasónicos sensibles en la región de 0.1-1.0 MHz mejora el método de detección, ya que la falta de ruido ambiental en esa gama de frecuencia facilita su utilización en campo. Para que esta técnica posea valor como indicadora de disfunción xilemática, es necesario demostrar que los fenómenos que se detectan se presentan en los elementos xilemáticos más importantes, en lugar de en fibras o traqueidas pequeñas. Esto no se ha demostrado aún suficientemente y existen datos de que muchos fenómenos acústicos se originan, frecuentemente, en elementos no conductores. Debido a las dificultades que existen con la detección acústica como indicador de la embolia xilemática,

es más seguro utilizar la pérdida de **conductividad hidráulica** como una medida básica de embolismo.

3.5. La cavitación y las embolias son frecuentes en condiciones de estrés hídrico, congelación e infección por algunos patógenos

Parece ser que los factores responsables de la cavitación son fundamentalmente:

- El déficit hídrico** asociado a tasas elevadas de transpiración y altas tensiones xilemáticas, especialmente en hojas y ramas pequeñas. Aparentemente, diminutas burbujas de aire se filtran a través de las finas membranas de las punteaduras que separan un conducto embolizado del contiguo. Las burbujas actúan como origen o núcleos de una ulterior cavitación y cuanto más grandes sean los poros, más probable es la formación de burbujas. El tamaño de los poros se relaciona con el diámetro de los vasos o traqueidas, de tal manera que, aunque el flujo de agua es más fácil y rápido a través de conductos anchos, existe, sin embargo, mayor riesgo de cavitación. El desarrollo de déficit hídricos durante el día es la causa principal de embolia durante la época de crecimiento de la planta.
- La congelación** del xilema en el invierno conduce, cuando más adelante se presenta la descongelación, a la formación de numerosas burbujas de aire, con lo que se extiende la embolia.
- Existe también un tercer factor, posiblemente de cierta importancia. Se ha observado que la embolia inducida por el patógeno es la causa más importante de la disfunción provocada en el xilema por el hongo causante de la grafiosis (*Ceratocystis ulmi*), que ha devastado la mayoría de los olmos en Europa y Norteamérica. Esto podría ser también cierto en el caso de otros patógenos que ocasionan marchitamiento rápido. El motivo de que los **patógenos** provoquen embolia no está aún claro, pero una sugerencia interesante es que al liberar en la savia del xilema compuestos tales como el ácido oxálico, disminuye la tensión superficial. Esto facilitaría la aparición de núcleos de aire a nivel de las membranas de las punteaduras.

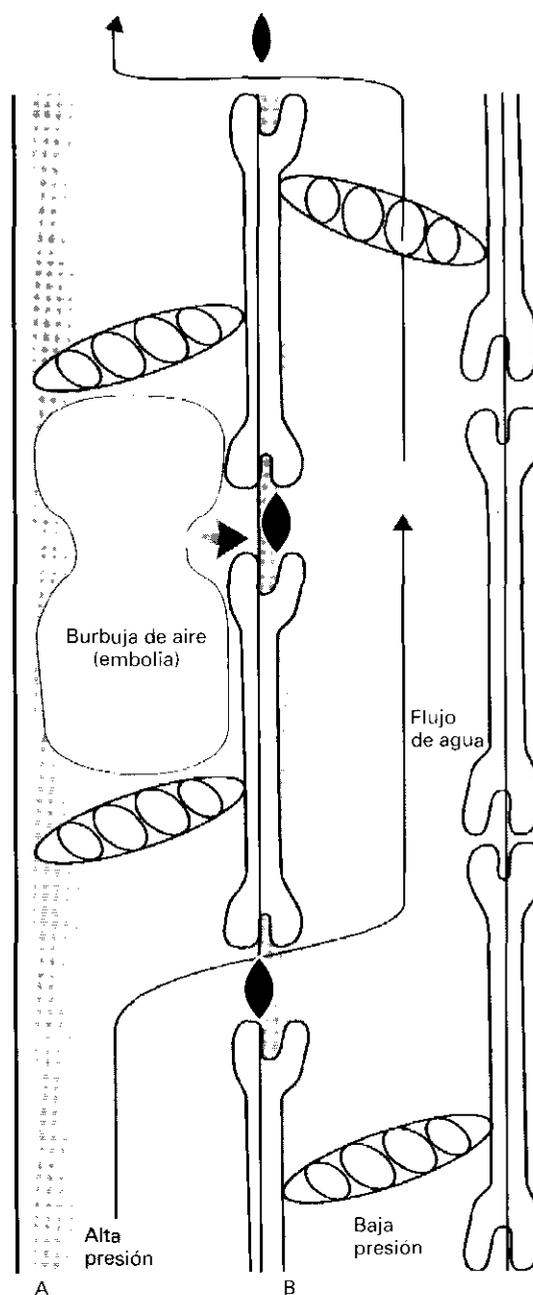


Figura 4-4. Embolismo: burbujas de aire que se originan en el xilema y se presentan en los elementos vasculares o traqueidas. (A) La diferencia de presión que se origina a partir de una embolia causa el sellado del toro de las punteaduras circundantes. (B) La tensión superficial impide que la burbuja atraviese las perforaciones. El agua continúa fluyendo rodeando el elemento bloqueado.

3.6. Las embolias se pueden eliminar por presión positiva en el xilema debida a la presión de raíz

El aire en una embolia vuelve de nuevo a la solución cuando la presión en el xilema sube hasta alcanzar la presión atmosférica o ligeramente por debajo. Con fre-

cuencia, esto ocurre por la noche en las plantas herbáceas, debido al fenómeno denominado **presión de raíz o radical** (véase apartado 2.3). Durante la noche los poros estomáticos se cierran y, en gran medida, la transpiración se detiene pero, en las raíces, continúa la absorción activa de iones y el flujo osmótico de agua hacia el interior. Los iones acumulados difunden hacia la

savia xilemática diluida y el agua sigue fluyendo hacia dentro, aumentando gradualmente la presión hidrostática hasta que se hace positiva.

Por lo general, las presiones radicales son pequeñas (0.1-0.2 MPa), pero en plantas herbáceas bastan para inducir el relleno de los conductos embolizados. En árboles no se desarrollan presiones radicales positivas durante la estación de crecimiento y, por eso, es vital que no se presente embolia a gran escala. Esto, aparentemente, se consigue mediante cierre de estomas y reducción de la tasa transpiratoria, pero a costa de reducir el suministro de CO_2 para la fotosíntesis. No obstante, en las pequeñas ramas periféricas, donde se experimentan las presiones xilemáticas más negativas, es corriente la embolia masiva que, a veces, origina su muerte.

La recuperación de la embolia en invierno provocada por la congelación se debe, al menos en parte, al crecimiento de nuevas células xilemáticas en primavera. No obstante, en algunas plantas leñosas, especialmente abedul y vid, se desarrollan grandes presiones radicales en primavera, que fuerzan el aire fuera del xilema embolizado. Esta «subida de la savia» es tan pronunciada que se pueden observar gotas de fluido durante varios días («llo-ro») sobre los extremos cortados de las ramas podadas, produciéndose espuma a medida que se expulsa el aire.

La susceptibilidad a la cavitación, la tolerancia a la embolia y la capacidad de recuperación han sido, indudablemente, los factores más importantes que han influido en el tipo y distribución de las plantas terrestres, especialmente, con su tolerancia a la sequía y congelación. La importancia del embolismo no se había puesto de manifiesto hasta hace poco, pero, indudablemente, va a constituir un área clave de investigación en el futuro.

4. MOVIMIENTO DEL AGUA EN LA HOJA

A nivel de los nudos del tallo se originan ramificaciones del sistema vascular, que pasan a través del peciolo hasta el limbo foliar. Dentro del limbo, las ramificaciones son extensas y, a menudo, se anastomosan terminando como elementos xilemáticos aislados con sus extremos abiertos, en tal número que ninguna célula de la hoja se encuentra a más de dos o tres células de distancia de los nervios. Es precisamente a través de esta intrincada y extensa red de elementos xilemáticos como el agua y los nutrientes minerales se mueven en la hoja.

Las paredes celulares están compuestas de celulosa y otras macromoléculas (véase Capítulo 1). Debido a sus propiedades y a su organización estructural, estas moléculas, muy hidrófilas, confieren a las paredes celulares un potencial matricial muy negativo. Las moléculas de agua transpiradas por la hoja se liberan previamente en la atmósfera foliar, mediante evaporación a nivel de los espacios microcapilares en el interior de las paredes celulares. La reducción del contenido hídrico de estas paredes por debajo del nivel de saturación disminuye su potencial hídrico; por tanto, el agua fluye hacia estas

paredes celulares a partir de las células adyacentes ($\Psi = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_m$; en la pared celular $\Psi_p = 0$ y $\Psi_s = > -0.1$ MPa; por consiguiente, el valor de Ψ vendrá dado por el valor de Ψ_m). Se establece así un **gradiente de potencial hídrico** a través del mesófilo, de manera que las células que bordean los espacios intercelulares poseen un potencial más bajo que las más alejadas. El agua se moverá a lo largo de este gradiente hasta que, finalmente, el agua perdida por transpiración sea reemplazada por agua procedente de las superficies de agua libre en los terminales de los nervios. La pérdida de agua en los elementos xilemáticos origina una tensión en las columnas de agua del xilema que se puede transmitir hasta las raíces (Figs. 4-1 y 4-5).

5. BALANCE HÍDRICO

El uso de términos tales como **balance hídrico** y **economía del agua** destaca que las relaciones hídricas en las plantas se pueden considerar bajo el prisma de un presupuesto en el cual el balance o estado hídrico (Capítulo 2) viene controlado por las intensidades relativas de absorción y pérdida de agua.

El balance hídrico se puede calcular a partir de las determinaciones cuantitativas de la absorción de agua y de la transpiración. No obstante, las medidas necesarias son aún inexactas y difíciles de obtener, especialmente en condiciones de campo. Por tanto, es frecuente hacer una **estimación indirecta** del balance hídrico a través de su efecto en el contenido hídrico (mejor, contenido hídrico relativo) o potencial hídrico de la planta. Un balance negativo siempre se manifestará por una disminución de la turgencia y el potencial hídrico de los tejidos. El estado hídrico de las plantas puede ser muy variable en una escala temporal que vaya de minutos a meses. De hecho, en muchas especies arbóreas es frecuente que se presenten grandes variaciones estacionales en el contenido de los troncos.

Según el hábitat y las características funcionales de la planta, es posible distinguir dos tipos diferentes de balance hídrico: plantas hidroestables y plantas hidrolábiles. Las **plantas hidroestables** son aquellas que mantienen un contenido hídrico favorable, variando muy poco su balance hídrico durante el día. Pertenecen a este grupo especies acuáticas, suculentas, plantas de sombra (esciófitas o esciófilas), algunas gramíneas y árboles de regiones húmedas. Sus estomas responden con gran sensibilidad a la falta de agua, y los sistemas radicales son, en general, extensos y eficientes. Las fluctuaciones diarias y estacionales en el potencial osmótico y en el potencial hídrico son reducidas.

Las **plantas hidrolábiles** toleran la pérdida de grandes cantidades de agua con el consiguiente aumento en la concentración del jugo celular. Muchas especies herbáceas de hábitats soleados (heliófitas o heliófilas), gramíneas esteparias, así como muchas leñosas, especialmente especies colonizadoras, son hidrolábiles y todas

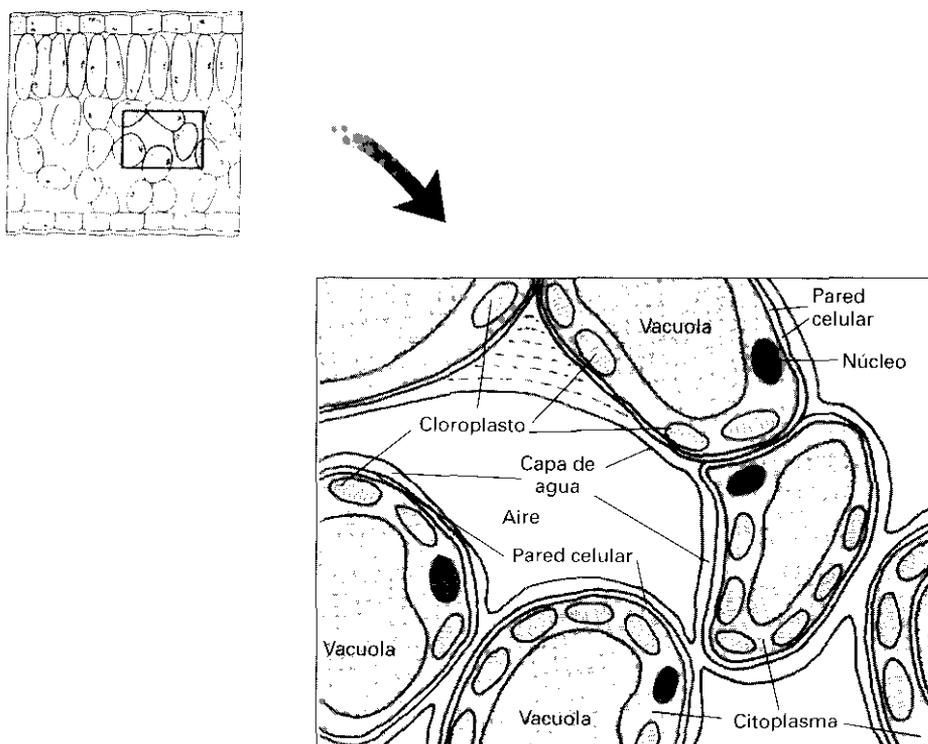


Figura 4-5. Tensión (presión negativa) en la columna de agua. La evaporación en el interior de la hoja origina que el agua se retraiga en el interior de los espacios existentes entre las células del mesófilo. A medida que el agua se retrae, la tensión superficial resultante tira del agua existente en las células adyacentes. Dado que la columna de agua es continua, la tensión es transmitida a través de la misma hacia las raíces y el agua del suelo.

las plantas poiquilohídricas (véase apartado 6.2.2) lo son en grado extremo. Tales plantas pueden tolerar grandes fluctuaciones en el potencial hídrico así como la marchitez temporal. La recuperación de estas situaciones adversas es rápida, gracias a su elevada relación raíz/parte aérea y a la eficacia de los sistemas de transporte de agua.

5.1. En plantas con buena disponibilidad de agua en el suelo, conforme aumenta la transpiración durante el día, el potencial hídrico puede disminuir debido al retraso en la absorción

Diariamente, los estomas de plantas bien regadas se abren poco después del amanecer y el aumento de la demanda evaporativa crea los gradientes de concentración de vapor de agua necesarios para que tenga lugar la transpiración (véase Capítulo 3).

Ordinariamente, a medida que aumenta la transpiración, la pérdida de agua excede la absorción (Fig. 4-6). Ello es debido a que existe una resistencia considerable al flujo de agua desde el suelo al xilema radical y, por otra parte, a que hay un volumen apreciable de agua fácilmente disponible en las células parenquimáticas turgentes de la hoja y del tallo que abastecen la demanda transpiratoria.

A medida que se retira agua de las células del mesófilo durante la transpiración, disminuye el Ψ foliar. En días muy despejados, el potencial hídrico foliar muestra una variación temporal similar al de la radiación solar. No obstante, el equilibrio entre la pérdida transpiratoria de agua y su restauración es extraordinariamente dinámico, y pequeños cambios en las condiciones ambientales pueden provocar grandes variaciones en el Ψ foliar en sólo unos minutos. Esto es especialmente manifiesto en días parcialmente nublados, con plantas que se desarrollan en suelos muy húmedos. Al pasar del sol radiante a la sombra, la temperatura de la hoja disminuye rápidamente debido al enfriamiento convectivo y transpiratorio, reduciéndose, por tanto, el gradiente de concentración de vapor de agua entre la hoja y el aire (ecuación 3-2). La recuperación al anochecer del potencial hídrico foliar en plantas bien regadas sigue la reducción en la radiación solar, pero el Ψ foliar puede presentar un comportamiento ligeramente diferente al de la mañana debido a los mayores déficit de presión de vapor, característicos del anochecer.

Por lo general, la resistencia al flujo de agua es menor entre las células parenquimáticas y las superficies evaporantes que a nivel de la absorción en las raíces. Por tanto, la causa del retraso en la absorción, en condiciones de buena disponibilidad de agua, es la resistencia elevada en las membranas de las células radicales. En el caso de los árboles, una consecuencia del retraso

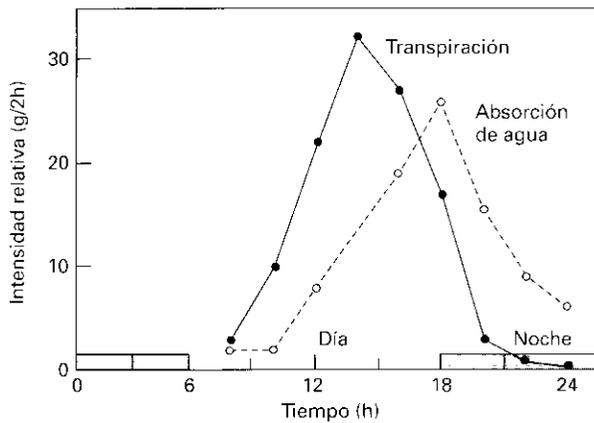


Figura 4-6. Relación entre absorción de agua y transpiración en el fresno (datos de Kramer, 1937). (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

entre absorción y transpiración es que, durante el día, cuando las tasas transpiratorias son elevadas, el agua tiende a salir de las células situadas en las proximidades de la vía principal hacia el xilema funcional. Esto provoca una reducción en el volumen de las células «donantes», y los troncos se pueden encoger durante el día e hinchar durante la noche a medida que las células se rehidratan.

Bajo ciertas condiciones ambientales, el retraso en la absorción se hace tan acentuado que las plantas se marchitan, incluso teniendo agua en el suelo. Es el caso, por ejemplo, de la **temperatura baja del suelo**, su efecto más importante es el aumento de la resistencia hidráulica de las membranas celulares en las raíces. La existencia de frío en la raíz, combinada con temperaturas foliares elevadas, vientos fuertes y aire seco (factores que estimulan la transpiración) suelen matar a la planta por desecación. El peligro es grande en ambientes alpinos, si bien las plantas procedentes de ambientes cálidos y tropicales son muy susceptibles a esta forma de lesión.

Una **escasa aireación del suelo**, especialmente cuando se combina con condiciones que favorecen la transpiración, también puede provocar lesión por desecación. La falta de oxígeno conlleva respiración anaeróbica en las raíces y reduce el suministro de ATP. Los productos finales de este proceso, así como la presencia de otros iones tóxicos en el ambiente reductor que rodea la raíz, tienden a lesionar las células radicales y aumentan su resistencia hidráulica. Además, la limitación de ATP restringe la capacidad de las raíces para absorber activamente iones y mantener el bajo potencial hídrico que es necesario para incorporar agua del suelo. Por tanto, una de las consecuencias de los suelos inundados es la desecación. En las plantas adaptadas a la inundación, el oxígeno puede difundir desde las partes aéreas a las raíces, a través de espacios aéreos gigantes interconectados (aerénquima), de tal manera que las raíces permanecen oxigenadas incluso en suelos totalmente anaerobios.

La estructura de la raíz, la presencia de una endodermis con paredes celulares impermeables, así como cualquier factor que afecte tanto al movimiento del agua a través de las membranas celulares radicales como a la capacidad de acumulación de iones son, todos ellos, factores que afectan al grado de retraso en la absorción. Ello, a su vez, condiciona el gradiente de potencial hídrico, necesario para mover el agua a través de la planta a una velocidad suficiente para satisfacer las pérdidas transpiratorias.

5.2. En condiciones de sequía, disminuye considerablemente el potencial hídrico de la planta y puede presentarse ajuste osmótico

A medida que un suelo se seca y su potencial hídrico va tomando valores cada vez más negativos, las plantas han de disminuir su potencial hídrico con el fin de mantener el gradiente de potencial necesario para la absorción de agua. Teóricamente, esto puede ocurrir de dos maneras: disminuyendo el potencial osmótico (por acumulación de solutos), o disminuyendo la turgencia (mediante simple deshidratación). En los suelos sometidos a sequía, el mecanismo más importante es la disminución del potencial osmótico, bien mediante una estimulación de la acumulación de iones inorgánicos, o bien mediante un aumento en los niveles de solutos orgánicos. Tal **ajuste osmótico** u **osmorregulación** puede impedir la pérdida de turgencia de la raíz.

El potencial hídrico de la planta experimenta una oscilación más o menos típica, con valores más elevados al amanecer y al anochecer y menores al mediodía, cuando es máximo el desequilibrio entre transpiración y absorción. La amplitud de esta tendencia aumenta con el grado de sequía en el suelo. Existe por tanto, durante el día, un **déficit hídrico** provocado por transpiración, resistencia elevada en las raíces y lesión en el xilema por embolia y cavitación. Por la noche, cuando cesa la transpiración, los déficit hídricos diurnos se eliminan gradualmente y, con el tiempo, el potencial hídrico de la planta alcanza un cierto equilibrio con el potencial hídrico del suelo (Fig. 4-7).

Cuando las altas tasas de transpiración acentúan el gradiente de potencial hídrico en la planta, disminuye el potencial hídrico de la raíz y, finalmente, la turgencia. En esta situación se puede presentar encogimiento de la raíz, lo cual provoca no sólo una reducción en el crecimiento de la misma sino, también, la pérdida de contacto con las partículas de suelo. En estas condiciones, la absorción se hace cada vez más difícil debido a un aumento en la **resistencia hidráulica del suelo**.

Cuando el potencial hídrico del suelo desciende por debajo de un nivel crítico, cesa la absorción y la planta muere. El efecto en las plantas de estos ciclos diarios de potenciales hídricos bajos depende no sólo del grado de recuperación del xilema y de la cavitación, sino, tam-

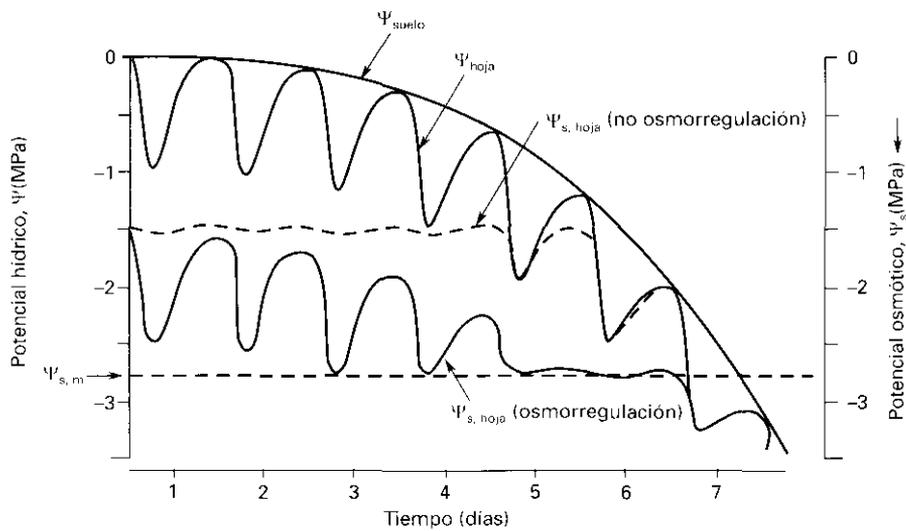


Figura 4-7. Cambios previstos en el potencial hídrico de la hoja y el suelo, así como en el potencial osmótico de una hoja ($\Psi_{s, hoja}$) con (—) y sin (---) osmorregulación. La turgencia foliar es la diferencia entre Ψ_{hoja} y $\Psi_{s, hoja}$. El parámetro $\Psi_{s, m}$ es el potencial osmótico al máximo nivel posible de acumulación de solutos (concentraciones más elevadas provocarían lesión celular) (según Morgan, 1984). (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

bién, de si se presenta o no osmorregulación en las hojas. Si ésta no tiene lugar, inevitablemente la caída del potencial hídrico foliar provocará una disminución de la turgencia, que desencadenará el cierre estomático y la reducción de la expansión celular. Dicho comportamiento se ilustra mediante la línea central discontinua en la Figura 4-7, siendo la turgencia foliar la distancia entre esta línea y la del potencial hídrico foliar. La línea continua inferior muestra lo que sucede cuando hay osmorregulación: la turgencia foliar se mantiene constante hasta el día 4 ó 5 de sequía edáfica y la marchitez no se presenta hasta el día 7.

En condiciones de campo, el déficit de presión de vapor de la atmósfera puede llegar a desempeñar un papel más importante que el contenido hídrico del suelo en la determinación del estado hídrico de la planta. Asimismo, otro factor relevante es la extensión del sistema radical, al condicionar la capacidad de absorción de agua por parte de la planta.

6. DÉFICIT HÍDRICOS Y CRECIMIENTO VEGETAL

El déficit hídrico es el factor más importante que causa la reducción en el crecimiento de la planta (véase también Capítulo 30). A menudo, en días calurosos y soleados, se presentan déficit hídricos transitorios al medio día debido a que, temporalmente, la pérdida de agua excede la absorción. Por el contrario, los déficit hídricos permanentes a largo plazo son provocados por una disminución en la disponibilidad de agua en el suelo (véase apartado 5). Los déficit hídricos afectan prácticamente a todos los aspectos del desarrollo de la planta.

6.1. Los déficit hídricos tienen efectos químicos e hidráulicos y afectan a la mayoría de los procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta

a) Efectos químicos e hidráulicos de los déficit hídricos

La pérdida de agua en un tejido vegetal tiene los siguientes efectos que pueden influir en el metabolismo de la planta:

- Reducción del potencial hídrico o la actividad del agua celular.
- Disminución de la presión turgente.
- Concentración de moléculas, a medida que disminuye el volumen celular con la reducción de la turgencia.
- Alteración de relaciones espaciales en el plasma- lema, tonoplasto y membranas de orgánulos, debido a los cambios de volumen.
- Cambio en la estructura o configuración de las macromoléculas como consecuencia de la eliminación del agua de hidratación o modificación de la estructura de esa agua.

No obstante, resulta difícil entender cómo los posibles efectos de estrés suaves sobre la actividad hídrica, estructura macromolecular o concentración de moléculas en el citoplasma, pueden ser los sensores primarios del estrés. El sensor, en teoría, respondería a la presión de turgencia o tamaño celular. Al menos en células en crecimiento, los pequeños cambios de turgencia pueden reducir la expansión celular, con el consiguiente aumento de materiales de pared no utilizados u otras

substancias que afecten, a su vez, al metabolismo. Se ha demostrado también que la turgencia puede afectar directamente al transporte de iones a través de la participación de sensores que responden a la dilatación de las membranas.

Así y todo, la mayoría de los efectos de los déficit hídricos son, probablemente, secundarios y consecuencia de la actuación de respuestas reguladoras de la planta. Se tiene constancia de que los reguladores de crecimiento participan en la integración de las diferentes respuestas (véase Capítulo 18). Aunque los déficit hídricos afectan a los niveles de giberelinas y auxinas, no se ha demostrado que estos reguladores tengan un papel importante en la respuesta al estrés. Igualmente, la producción de etileno es estimulada por muchos estreses; esta estimulación se ha implicado en una serie de respuestas, como son abscisión de hojas y frutos, epinastia, cierre estomático y disminución de la asimilación (véase Capítulo 22). La reducción en el suministro de citoquininas a consecuencia de la sequía se ha relacionado con respuestas tales como senescencia foliar y cierre estomático (véase Capítulo 21). Sin embargo, es el ácido abscísico (ABA) el que desempeña, a veces en conjunción con iones Ca^{2+} , el papel más importante en la integración de las respuestas de la planta, tanto al estrés hídrico, como a un amplio espectro de otros estreses ambientales, como la salinidad y temperaturas elevadas. De hecho, la participación del ABA en el cierre estomático en respuesta a la sequía ya se ha indicado en el apartado 2.2.2 del Capítulo 3. Por otra parte, las concentraciones de ABA aumentan rápidamente en plantas estresadas (esta subida tiende a ser una función de Ψ_p más que del potencial hídrico total, Ψ); por otra parte, existe una correspondencia estrecha entre las respectivas respuestas a los déficit hídricos y al ABA suministrado exógenamente. Estas observaciones, cuando se combinan con la información obtenida a partir de mutantes deficientes en ABA, proporcionan una prueba convincente de que el ABA participa en la adaptación a los déficit hídricos y otros estrés (véanse Capítulos 22 y 30).

b) *Efectos de los déficit hídricos en procesos fisiológicos y metabólicos*

El efecto más importante de, incluso, un **estrés hídrico suave** es la reducción del crecimiento, siendo especialmente sensible la expansión celular. Se sabe que la presión de turgencia de las células en crecimiento proporciona la fuerza motriz para la expansión celular, pero la tasa real de extensión es controlada por la variación en el potencial hídrico (Ψ) y la extensibilidad (\oslash) (ecuación 2-22). Es probable que, en aquellos casos en que se afecta el crecimiento de la parte aérea sin que simultáneamente se observen cambios en su estado hídrico, la modulación de esa alteración pueda incluir alguna(s) señal(es) desde la raíz a la parte aérea. Durante estrés

suaves puede continuar la síntesis de materiales de la pared celular, de tal modo que el retraso en el crecimiento durante un estrés corto, se puede superar tras la recuperación. La división celular, aunque resulta afectada por el estrés hídrico, normalmente es menos sensible que la expansión celular. Además de una inhibición del crecimiento, los déficit hídricos modifican el desarrollo y la morfología vegetal. Así, por ejemplo, la diferente sensibilidad a la sequía de las raíces y las partes aéreas conduce a grandes aumentos en la **relación raíz/parte aérea**. Otros efectos sobre el desarrollo vegetativo incluyen la reducción del ahijamiento en gramíneas y la terminación precoz del crecimiento en extensión de especies perennes, con la formación de yemas en reposo. Los déficit hídricos también provocan la abscisión de hojas y frutos, especialmente tras la desaparición del estrés. Asimismo, no sólo disminuye el tamaño de las hojas como consecuencia de una disminución de la expansión y división celulares, sino que también, al menos en el trigo, se reduce la proporción de células epidérmicas que constituyen los estomas y aumenta el número de tricomas.

Los déficit hídricos también afectan al desarrollo reproductor, necesitándose, en algunas especies, un período de sequía para estimular la iniciación floral o provocar la emergencia de yemas florales ya diferenciadas (véase Capítulo 25). En condiciones de sequía se adelanta la floración en anuales y se retrasa en perennes. Así, por ejemplo, en el trigo, déficit hídricos moderados adelantan la floración hasta en una semana, aunque con disminución en el número de espiguillas, la fertilidad del polen y la formación de granos.

El efecto de los déficit hídricos en el comportamiento y heterogeneidad de la conductancia estomática ya se ha considerado anteriormente (Capítulo 3). La disminución en la tasa transpiratoria se acompaña siempre de una disminución en la absorción de CO_2 y, por tanto, de la fotosíntesis. Los déficit hídricos también afectan a la fotosíntesis a través de sus consecuencias en los procesos enzimáticos, transporte electrónico y contenido en clorofila (véase Capítulo 30).

La regulación de la transpiración también es importante desde el punto de vista del balance energético de la hoja, en el cual desempeñan un papel crucial los movimientos foliares (véase Capítulo 24). Asimismo, la transpiración se reduce como consecuencia de la inhibición del crecimiento de la parte aérea (véase apartado anterior). Por el contrario, suele aumentar la capacidad absorbente de las raíces por unidad de superficie, al resultar el crecimiento de la raíz menos afectado por el estrés hídrico.

Prácticamente todos los aspectos del metabolismo y la estructura fina celular se ven afectados por los déficit hídricos (Cuadro 4-1). Entre los cambios más característicos hay que citar: incremento de las reacciones degradativas en relación con las sintéticas, disminución de la síntesis de proteínas, aumento en la concentración de aminoácidos libres, especialmente prolina (que pue-

Cuadro 4-1. Sensibilidad a los déficit hídricos de procesos o parámetros vegetales (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993)

Proceso o parámetro afectado	Sensibilidad al estrés			Observaciones
	Muy sensible	Relativamente insensible		
	Ψ del tejido que afecta al proceso			
	0 MPa	-1.0 MPa	-2.0 MPa	
Crecimiento celular (-)	-----			Tejido en crecimiento rápido
Síntesis de pared (-)	-----			Tejido en crecimiento rápido
Síntesis de proteínas (-)	-----			Hojas ahiladas
Formación de protoclorofila (-)	-----			
Nivel de nitrato reductasa (-)	-----			
Acumulación de ABA (+)	-----			
Nivel de citoquininas (-)	-----			
Abertura estomática (-)	-----	-----		Depende de la especie
Asimilación de CO ₂ (-)	-----	-----		Depende de la especie
Respiración (-)	-----			
Acumulación de prolina (+)	-----			
Acumulación de azúcares (+)		-----		

* La longitud de las líneas horizontales representa el margen de niveles de estrés en el cual un proceso empieza a afectarse. Las líneas discontinuas significan deducciones basadas en datos más imprecisos. Los signos (+) o (-) indican aumento o disminución en el parámetro o proceso.

de llegar a un 1 % de la materia seca foliar en algunas especies), glicina betaína, di y poliaminas y azúcares, lo cual comporta cambios importantes en las correspondientes actividades enzimáticas. Muchos de estos cambios se pueden considerar como adaptativos pero, frecuentemente, es difícil distinguir entre cambios que son consecuencia de lesión celular o tisular de los que representan auténtica **aclimatación** (véase Capítulo 30). Los tejidos sometidos a estrés hídrico presentan una disminución en los grupos -SH, y un aumento en la actividad peroxidasa y en la formación de peróxido de hidrógeno. Se ha comprobado también que disminuye el potencial reductor, lo que sugiere que los tejidos sometidos a estrés hídrico poseen un mayor estado de oxidación. Ello provocaría deshidrogenación de las proteínas y, por tanto, formación de puentes disulfuro a partir de grupos -SH. De esta manera, las proteínas adquirirían un estado más oxidado y, con ello perderían su actividad. Este proceso de deshidrogenación, a diferencia de una mera deshidratación, haría posible que las proteínas fuesen inactivadas o activadas, dependiendo del estado metabólico de los tejidos. Existen evidencias de que un factor importante en la lesión mediante desecación es la lesión química debida a **radicales libres** (especialmente, radicales de oxígeno). El radical superóxido (O₂⁻) así como otros radicales de oxígeno se pueden producir mediante una serie de reacciones en las células, como la autooxidación de una serie de compuestos reducidos y la reacción de «Mehler» en los cloroplastos en los que el O₂, en lugar del CO₂, termina siendo el último accep-

tor para el transporte electrónico (tal como puede ocurrir cuando la asimilación es bloqueada por el estrés hídrico). Una vez formado, el O₂⁻ experimenta una reducción para formar el radical hidroxilo (OH), muy lesivo, que puede originar peroxidación de lípidos y peróxido de hidrógeno (véanse Capítulos 10 y 30).

Por otra parte, la sequía puede inducir la transcripción de RNA mensajeros que codifican un gran número de proteínas, las cuales no son sintetizadas en condiciones de óptima disponibilidad de agua. En los casos estudiados, muchas de estas proteínas (*shock proteins*) son también inducidas por el ABA (véase Capítulo 22). En este sentido, parece haber dos importantes cuestiones no dilucidadas del todo. ¿Todas las proteínas del estrés hídrico son inducidas por acumulación de ABA en respuesta a la sequía? ¿La activación de **genes inducibles por el ABA** depende de una activación previa de los genes por la pérdida de turgencia?

6.2. En situaciones de salinidad, sequía o congelación, en que resulta difícil conseguir agua, las plantas presentan características especiales que les permiten sobrevivir

Siempre que el potencial hídrico del suelo desciende considerablemente, se hace más difícil absorber agua y las plantas se exponen al peligro de desecación. El problema se presenta con los suelos salinos, los suelos con-

gelados y, naturalmente, los suelos secos de las zonas áridas. En todas estas situaciones las plantas adquieren características especiales que les permiten sobrevivir. Consideremos, en primer lugar, los aspectos relacionados con la escasez de agua en el suelo.

6.2.1. *Aridez y sequía no significan lo mismo*

Una **región árida** es aquella en la que las precipitaciones son escasas o nulas y la humedad atmosférica es muy baja. Sin embargo, una región puede tener un volumen total de precipitación anual que en otra sería suficiente para sostener un tapiz vegetal continuo y, no obstante, ser árida; en el segundo caso, el agua precipitada, aunque escasa, es aprovechada íntegramente, al menos, durante el período vegetativo; en el primer caso, intervienen factores ajenos a la precipitación que limitan considerablemente el aprovechamiento del agua. Entre estos factores destaca como más importante la temperatura, que condiciona directamente la intensidad de la evaporación. Las temperaturas bajas atenúan la aridez y pueden hacerla desaparecer desde el punto de vista biológico; por el contrario, las temperaturas elevadas, al intensificar la evaporación, pueden causar aridez aún en el caso de un mayor volumen de precipitación. En consecuencia, se deduce que la noción de **aridez** es relativa y su determinación hay que hacerla combinando los datos de precipitación con los de temperatura.

Desde el punto de vista tanto meteorológico como ambiental, podemos definir la **sequía** como la falta o insuficiencia de precipitación durante un período largo, que provoca un desequilibrio hidrológico considerable y, por tanto, restricción en el suministro de agua. Se presenta cuando la evaporación y la transpiración exceden la precipitación durante un tiempo considerable, y constituye el azar físico más grave que afecta principalmente a los cultivos, dado que la vegetación natural se halla más adaptada a esos hábitat. Existen cuatro tipos básicos de sequía:

- a) **Sequía permanente.** Caracteriza a los climas más secos. La escasa vegetación está adaptada a la aridez y es imposible una agricultura de alto rendimiento sin riego continuo.
- b) **Sequía estacional.** Se presenta en aquellos climas que tienen estaciones anuales lluviosas y secas bien definidas. En estas condiciones, conviene ajustar la siembra de manera que los cultivos se desarrollen durante la estación lluviosa.
- c) **Sequía impredecible.** Se refiere a un fallo anormal en la precipitación; se puede presentar prácticamente en cualquier lugar, pero es más característica de climas húmedos y subhúmedos. Ordinariamente, es breve e irregular y sólo afecta a un área reducida.
- d) **Sequía no aparente.** Cuando por temperaturas altas y vientos fuertes se inducen tasas elevadas

de evaporación y transpiración, incluso las lluvias frecuentes pueden no suministrar agua suficiente como para restablecer la cantidad perdida, lo que afecta también al rendimiento.

6.2.2. *Existen dos tipos de mecanismos para tolerar la sequía: evitación y tolerancia a los déficit hídricos en la planta*

Las especies difieren entre sí en el grado y período de tolerancia a la sequía; generalmente, estas características guardan relación inversa con la producción de biomasa. Los diferentes mecanismos de respuesta de la planta que permiten aumentar la tolerancia a la sequía, tales como el comportamiento estomático, los cambios morfológicos en la hoja, la osmorregulación y las alteraciones en la relación raíz/parte aérea ocasionan, al mismo tiempo, reducción en su capacidad de producción. En un contexto agronómico, un cultivar más resistente a la sequía es aquel que presenta una mayor producción bajo estas condiciones que otro menos tolerante. También se busca un cierto grado de estabilidad en la producción de un año a otro como criterio de tolerancia a la sequía. Por el contrario, en ecosistemas naturales, una especie tolerante a la sequía es aquella que tiene la capacidad de sobrevivir y reproducirse en un ambiente relativamente seco. En este caso, la tolerancia a la sequía no se basa, necesariamente, en una productividad elevada. Por tanto, los mecanismos que favorecen la tolerancia a la sequía en típicos monocultivos pueden ser diferentes de los que se han seleccionado en ecosistemas naturales.

Las plantas que pueden vivir en ambientes secos se denominan **xerófitas** y la adaptación de una especie vegetal a estos climas se conoce como **xerofilia**. Las xerófitas se presentan sólo en situaciones de aridez, porque su capacidad competitiva en lugares secos es mayor que la de otras especies.

Existen grandes diferencias en la capacidad de las plantas para tolerar la sequía. Algunas de estas diferencias son consecuencia de adaptaciones en la planta entera, tales como sistemas radicales dispersos y profundos; otras adaptaciones tienen lugar a nivel de órgano, tales como hojas muy cutinizadas y buen control estomático de la transpiración, mientras que otras, como el ajuste osmótico y la tolerancia a la desecación se producen a nivel celular.

Las plantas de las regiones áridas se clasifican, en función de las características de los diferentes nichos ecológicos que ocupan, de la siguiente forma: las que escapan, las que evitan y las que toleran la sequía. Sin embargo, a la vista de la dificultad frecuente para catalogar una determinada especie vegetal en uno de los tres grupos, quizás uno de los enfoques más útiles sea centrarse en los mecanismos que contribuyen a la tolerancia a la sequía, reconociendo que una planta puede poseer varios. Estos mecanismos se pueden clasificar en dos tipos importantes: 1) **evitación del estrés**; es de-

cir, aquellos mecanismos que minimizan la presencia de déficit hídricos lesivos, y 2) **tolerancia al estrés**; es decir, aquellas adaptaciones fisiológicas que permiten que las plantas continúen funcionando, a pesar de la presencia de déficit hídricos en las mismas (véase Capítulo 30).

a) Evitación de los déficit hídricos en la planta

1. Escape a la sequía

Las plantas que poseen este mecanismo, como regla general, no son resistentes a la sequía. La supervivencia en los períodos secos sólo requiere la producción, debidamente programada, de semillas u órganos especialmente protegidos de la desecación. En esta categoría se incluyen las plantas vasculares anuales de vida corta (**terófitas**) que germinan después de lluvias muy intensas y que rápidamente completan su ciclo de desarrollo, pasan la estación seca en forma de semillas y no sufren lesiones por desecación. Una adaptación, aunque menos extrema, se encuentra en muchas plantas de cultivo, en las que los cultivares más tolerantes a la sequía son frecuentemente los que primero florecen y maduran, evitándose así lo peor de la estación seca. Muchas de estas especies anuales adelantan la floración si se las somete a un déficit hídrico de forma prematura.

Otro grupo de plantas que poseen mecanismos para escapar a la sequía son algunas **geófitas** que poseen órganos subterráneos repletos de agua (rizomas, tubérculos, bulbos) y que pueden sobrevivir durante períodos de sequía al estar protegidos de una pérdida excesiva de agua. Cuando empieza la estación lluviosa brotan inmediatamente, utilizando los hidratos de carbono almacenados, floreciendo y fructificando en poco tiempo.

2. Conservación del agua

La forma más corriente de regular el equilibrio hídrico y mantener la turgencia es reducir la pérdida de agua o almacenarla. Entre los mecanismos más frecuentes hemos de considerar:

Cierre estomático rápido y completo. Capacidad para cerrar los estomas rápida y completamente antes de que las células se lesionen por desecación.

Cutícula gruesa y muy impermeable. Posesión de una cutícula gruesa y muy impermeable, recubierta frecuentemente por capas cerasas o resinosas. En algunas xerófitas, la resistencia cuticular al vapor de agua (r_c) puede llegar a ser de 120 s cm^{-1} ; esto quiere decir que una vez cerrados los estomas, la planta pierde muy poca agua.

Pérdida de hojas. Un buen ejemplo es el de la especie *Follquieria splendens* que vive en el desierto de Sonora; esta planta produce hojas después de las lluvias, pero las pierde cuando se limita el suministro de agua,

quedando los nervios centrales y peciolos como espigas; puede producir varios lotes de hojas al año y durante los períodos desprovistos de hojas, existen células verdes en el tallo que mantienen una tasa fotosintética baja.

Reducción de la transpiración. A partir de la ecuación de la transpiración (ecuación 3-2), y suponiendo que los estomas estén abiertos (con lo cual se puede ignorar la resistencia cuticular), hay dos posibilidades para reducir la transpiración: bien disminuir el gradiente de concentración o presión de vapor de agua, o bien aumentar considerablemente la resistencia de la capa límite (r_a).

La reducción del gradiente de concentración o presión de vapor se consigue, fundamentalmente, mediante modificaciones que disminuyen el gradiente térmico entre las hojas y el aire. Las hojas pequeñas disipan el calor más fácilmente que las grandes, mediante corrientes de convección. Las hojas dispuestas paralelamente a los rayos solares, al igual que aquellas de color verde claro o brillante, absorben menos radiación. Otro mecanismo que reduce eficazmente el gradiente de presión de vapor es el desprendimiento de aceites volátiles, produciendo el olor aromático típico de muchas especies mediterráneas. Los aceites aumentan la densidad media del gas en la capa límite, y esto disminuye la tasa a la cual se difunde el vapor de agua a su través, de la misma manera que si hubiese aumentado la humedad del aire.

Una modificación estructural muy corriente en xerófitas, que aumenta la resistencia de la capa límite por encima de los poros estomáticos, es la disposición de los estomas en el fondo de criptas (p. ej., *Nerium oleander*), lo cual dificulta considerablemente el intercambio de gases y, por tanto, de vapor de agua. Asimismo, muchas xerófitas poseen estomas confinados a una sola superficie de la hoja y cuando desciende la turgencia foliar, las hojas se enrollan encerrando los estomas en una cámara húmeda y protegida.

Almacenamiento de agua. En algunas plantas, el almacenamiento de agua combinado con una tasa transpiratoria baja permiten la supervivencia durante muchos meses sin lluvia.

El almacenamiento de agua es muy importante en suculentas desérticas que pueden sobrevivir durante varios meses o, incluso, un año o dos sin agua adicional, siendo su característica más manifiesta la presencia en hojas o tallos de tejido almacenador de agua muy vacuolizado. En dichas suculentas, la pérdida de agua mediante transpiración es despreciable, debido a su cutícula gruesa y al cierre estomático durante el día. Las plantas de este tipo también suelen tener sistemas radicales superficiales y ampliamente extendidos, que absorben el agua cuando la superficie del suelo se moja ocasionalmente con lluvias. En algunas especies, el agua se almacena en órganos subterráneos, como en las raíces enormes de *Welwitschia* y *Pachypodium hispidum* del desierto sudafricano. En el caso de *Adansonia*

digitata, el agua se almacena en cantidades considerables en sus enormes troncos (varios metros de diámetro).

Las plantas CAM, con su ciclo estomático invertido y cutículas gruesas, son especialmente eficaces porque limitan la pérdida de agua en condiciones de estrés (véase Capítulo 12). A medida que el agua disponible en el suelo se reduce, los estomas permanecen abiertos durante períodos cada vez más cortos, llegando a un momento en que se cierran por completo. En esta situación, las suculentas sobreviven reciclando el CO_2 respiratorio, y sus cutículas gruesas evitan, prácticamente, toda pérdida de agua. Así, por ejemplo, en el caso de una especie de *Echinocactus* se ha encontrado que, al cabo de seis años sin agua, la pérdida de peso fue menor de un 30%.

3. Mantenimiento de la absorción de agua

Muchas plantas que tienen éxito en hábitat secos dependen del desarrollo de un sistema radical profundo y extenso que puede obtener agua de un volumen muy grande de suelo o de una capa freática profunda. En el caso de algunas especies (*Acacia*), las raíces pueden penetrar hasta 30 m antes de ramificarse en un suelo húmedo. Frecuentemente, estas **freatófitas** no poseen adaptaciones especiales que reduzcan la pérdida de agua en las partes aéreas pero, por lo general, la raíz que atraviesa el suelo muy seco suele estar cubierta de capas suberosas impermeables que restringen la pérdida de agua.

Algunas bromeliáceas epífitas, especialmente especies de *Tillandsia*, consiguen agua a partir del rocío o el vapor de agua del aire. Estas especies se desarrollan fundamentalmente en desiertos costeros en los que hay muy poca precipitación, pero sí nieblas y rocíos frecuentes, y poseen en ambas superficies foliares pelos especiales que absorben el agua.

b) Tolerancia a los déficit hídricos en la planta

Existen varias maneras mediante las cuales las plantas mantienen la actividad fisiológica a medida que disminuye el contenido o el potencial hídrico:

1. Mantenimiento de la turgencia

Ajuste osmótico. Cuando disminuye el potencial osmótico de los tejidos en respuesta al desarrollo de déficit hídricos internos, es importante separar el componente resultante de una concentración pasiva de solutos, debida a deshidratación del tejido, del originado por una acumulación activa de los mismos. Es a este último caso de osmorregulación al que se le denomina **ajuste osmótico**, para diferenciarlo de un mecanismo similar al que se da en presencia de salinidad.

El ajuste osmótico posibilita así el mantenimiento, en condiciones de sequía, de la turgencia y de los procesos

dependientes de la misma, tales como expansión y crecimiento celulares, abertura estomática, fotosíntesis, etc. Por otra parte, retrasa el enrollamiento foliar y mantiene el crecimiento de la raíz. También se ha demostrado que, en condiciones limitantes de agua, el rendimiento es superior en aquellas variedades que ajustan osmóticamente; los elevados rendimientos se asociaron con mayor desarrollo de la raíz y mejor extracción del agua. Ordinariamente, el ajuste osmótico se presenta en plantas sometidas a un estrés lento. Los solutos que participan varían pero, por lo general, además de iones inorgánicos (especialmente K^+ y Cl^-) y solutos orgánicos cargados eléctricamente que se acumulan en la vacuola, se sintetizan y acumulan en el citoplasma moléculas orgánicas sin carga específica, que no parece que afecten a las funciones de las proteínas. Estas moléculas reciben el nombre de **solutos compatibles** (también denominados citosolutos u osmolitos); entre las angiospermas, los más frecuentes son el amino—o, estrictamente, imino—ácido **prolina** y compuestos de amonio cuaternario como la **betaina**. Así, por ejemplo, en *Hordeum vulgare*, la prolina se acumula en el citoplasma en proporción al grado de sequía en el suelo y, en condiciones de sequía extrema, puede aparecer incluso en las vacuolas. Se ha observado que en condiciones de sequía también se acumulan otras sustancias, como azúcares reductores, sacarosa y pinitol.

Módulo de elasticidad elevado. El desarrollo adicional de tejidos estructurales en muchas plantas xeromórficas origina células inextensibles con un **módulo de elasticidad** (ϵ) elevado (véase Capítulo 2). Esta característica permite a las células tolerar altas concentraciones osmóticas, con la capacidad consiguiente de mantener la turgencia hasta valores muy bajos de Ψ .

2. Tolerancia a la desecación

La tolerancia a la desecación se refiere a la capacidad del protoplasma para soportar una gran pérdida de agua, siendo esta característica adaptativa y típica de cada especie. Los déficit hídricos provocan pérdida progresiva de la turgencia protoplásmica y aumento en la concentración de solutos. El resultado final de estos dos efectos es la alteración en la función celular y la aparición de lesiones en las estructuras protoplásmicas (membranas en particular). Las plantas varían extraordinariamente en relación al grado de deshidratación que pueden tolerar. En el caso de **plantas poiquihídricas** (algas, líquenes, musgos, algunos helechos, semillas y ciertas plantas superiores; estas últimas únicamente durante su etapa vegetativa), el protoplasma puede soportar la deshidratación casi completa, deshidratándose y rehidratándose de forma simultánea, sin sufrir lesión. La mayoría de las regiones áridas tiene una gran abundancia en líquenes que, en algunos casos, representan las únicas plantas capaces de vivir en áreas en las que,

aunque nunca llueve, puede existir una humedad atmosférica elevada y abundante rocío, capaces de activar su metabolismo.

Existe un número reducido de plantas vasculares en las que los tejidos vegetativos muestran una capacidad notable para tolerar la desecación. Estas plantas que «resucitan» no poseen mecanismos especiales que impidan la pérdida de agua o aumenten su absorción; su adaptación principal a la sequía es la tolerancia a la desecación, y poseen una bioquímica celular especializada que lo permite. En algunas especies, las enzimas, las membranas celulares y los pigmentos fotosintéticos se mantienen indemnes en el estado desecado. En otras, se pierden algunos pigmentos y enzimas e incluso las membranas pueden desorganizarse, pero rápidamente son reparadas o resintetizadas tras la hidratación.

Hay que decir, no obstante, que la mayoría de las plantas terrestres son **homeohídricas**. Si bien durante alguna etapa de su ciclo vital (semilla, rizomas o tallos sin hojas) pueden soportar potenciales hídricos muy bajos, durante la mayor parte del desarrollo, su protoplasma no puede tolerar potenciales hídricos bajos sin sufrir lesiones. Las semillas de las plantas homeohídricas, al final de su desarrollo, se desecan hasta un contenido hídrico de un 10% o menos. Hace años se descubrió que la desecación se acompaña de un aumento en el nivel de ABA, el mismo regulador que se acumula en las hojas cuando disminuye la turgencia (véase apartado 6.1), esto provoca cambios esenciales para una desecación «segura», es decir, reversible. El cambio más importante parece ser la activación de un gen responsable de la síntesis de una «proteína de deshidratación» específica, cuya característica principal es que no tiene regiones hidrófobas. Los mutantes del maíz que no sintetizan esta proteína poseen semillas que no desecan, sino que germinan en la mazorca, un fenómeno denominado «viviparismo» que se presenta naturalmente en muchas plantas alpinas y de la tundra. Se sabe que esta proteína se sintetiza también en raíces y hojas de plántulas sometidas a una deshidratación lenta.

Como ya se ha mencionado en este apartado, existe una serie de solutos especialmente eficaces a la hora de proteger las proteínas citoplásmicas y las membranas celulares de la desecación. Los déficit hídricos, al igual que otros estreses ambientales, tienden a desviar el potencial redox celular a un estado más oxidado y a aumentar las concentraciones de **radicales libres**, cambios ambos, lesivos (véase Capítulo 30). No obstante, las plantas poseen una serie de **mecanismos antioxidantes** que las protegen contra la producción de radicales de oxígeno, como son: *a*) reductores solubles en agua, tales como los compuestos que contienen tiol (p. ej., glutatión) y el ascorbato, y *b*) vitaminas solubles en grasas, tales como α -tocoferol y β -caroteno; y *c*) antioxidantes enzimáticos tales como la catalasa y superóxido-dismutasa. Aunque hay datos que sugieren que las diferencias en tolerancia a la sequía pueden radicar en una expresión diferencial de estas enzimas, se requiere

más investigación antes de formular unas conclusiones claras.

6.2.3. *La eficiencia en el uso del agua y la tolerancia a la sequía no suelen estar relacionadas*

Cuando el suministro de agua es limitado, resulta importante considerar la **eficiencia en el uso del agua**, WUE (*Water Use Efficiency*), en términos de materia seca producida por unidad de agua utilizada en la evapotranspiración (véase Capítulo 3). Frecuentemente, WUE y tolerancia a la sequía se toman como sinónimos, si bien, en la mayoría de los casos, no tienen relación entre sí. La WUE se refiere a un parámetro de producción, y un objetivo importante de la investigación en esta área consiste en alcanzar una elevada WUE manteniendo, al mismo tiempo, una elevada productividad. Por el contrario, al analizar la resistencia a la sequía, el énfasis se pone, como hemos visto anteriormente, en la supervivencia durante un período de bajo suministro de agua. De hecho, la capacidad para sobrevivir a intensos déficit hídricos suele estar negativamente relacionada con la productividad.

Actualmente, hay gran interés en la posibilidad de aumentar la tolerancia a la sequía y la eficiencia en el uso del agua mediante mejora vegetal y manejo más adecuado de los cultivos. Un objetivo deseable, aunque difícil de conseguir, sería que se pudiesen obtener combinaciones de características que aumentasen la tolerancia a la deshidratación y la eficiencia en el uso del agua, sin pérdidas en el rendimiento.

6.2.4. *Las halófitas toleran la salinidad porque alcanzan potenciales hídricos muy bajos mediante osmorregulación*

En la mayoría de los suelos, el potencial osmótico no es lo suficientemente bajo como para inhibir la absorción de agua por las raíces, desencadenando un déficit hídrico importante en la planta. No obstante, existen situaciones en las que la concentración de sales en el suelo llega a ser tan elevada que impide o disminuye la absorción de agua, provocando una condición denominada **sequía osmótica**. Este efecto de los solutos disueltos es similar al de un déficit hídrico edáfico. Algunas plantas que se desarrollan en suelos salinos se pueden ajustar osmóticamente y, de esa manera, impiden la pérdida de turgencia.

No obstante, a esta sequía osmótica hay que añadir el efecto de iones específicos, cuando se acumulan en las células concentraciones lesivas de Na^+ , Cl^- o SO_4^{2-} . En condiciones no salinas, el citosol contiene 100-200 mM de K^+ y 1 mM de Na^+ , un ambiente iónico en el cual pueden funcionar óptimamente muchas enzimas. Una relación anormalmente elevada de Na^+ a K^+ y al-

tas concentraciones de sales totales, inactivan las enzimas e inhiben la síntesis de proteínas.

La fotosíntesis es inhibida cuando concentraciones elevadas de Na^+ y Cl^- se acumulan en los cloroplastos. Puesto que el transporte electrónico fotosintético parece ser poco sensible a las sales, es posible que se vean más afectados el metabolismo del carbono o la fotofosforilación. Enzimas extraídas de especies tolerantes a la salinidad (**halófitas**) son tan sensibles a la presencia del NaCl como las enzimas de especies sensibles (**glicófitas**). Por tanto, la resistencia de las halófitas a las sales no es consecuencia de un metabolismo resistente a la salinidad.

Las plantas evitan la lesión por sales mediante exclusión de iones en las hojas o mediante su compartimentación en las vacuolas. En el caso de plantas sensibles, la resistencia a niveles moderados de salinidad en el suelo depende de la capacidad de las raíces para impedir la absorción de iones potencialmente dañinos (véase Capítulo 7). Los iones Na^+ pueden entrar en las raíces pasivamente (siguiendo un gradiente decreciente de potencial electroquímico) y, por tanto, las células de las raíces han de utilizar energía para un transporte activo que devuelva el Na^+ a la solución externa. Por el contrario, la membrana plasmática de la raíz es muy poco permeable al Cl^- . Algunas halófitas pertenecientes a los géneros *Tamarix* y *Atriplex* no excluyen los iones a través de la raíz, sino que, por el contrario, poseen glándulas salinas en las superficies de las hojas. Los iones son transportados a estas glándulas, en las que las sales cristalizan y dejan de ser lesivas.

Cuando las sales son excluidas de las hojas, las plantas utilizan sustancias orgánicas para disminuir el potencial osmótico del citoplasma y la vacuola y, así, conseguir disminuir el potencial hídrico foliar. Entre estos componentes orgánicos que no interfieren en el metabolismo celular a concentraciones elevadas se encuentran la glicina betaína, la prolina, el sorbitol, la sacarosa, etc. La cantidad de carbono utilizada para la síntesis de estos solutos orgánicos puede ser elevada. En la vegetación natural esta desviación del carbono no afecta a la supervivencia, pero en cultivos puede reducir la producción.

Muchas halófitas absorben iones y los acumulan en las hojas. No obstante, estos iones son secuestrados en las vacuolas de las células foliares, con lo que contribuyen al potencial osmótico celular sin lesionar las enzimas cloroplásticas y citosólicas sensibles a la salinidad. En estas hojas, se mantiene el equilibrio hídrico entre el citoplasma y la vacuola acumulándose en el citoplasma compuestos orgánicos como prolina o sacarosa. Debido a que el volumen del citoplasma en una célula adulta vacuolada es pequeño comparado con el volumen de la vacuola, la cantidad de carbono necesaria para la síntesis de compuestos orgánicos es mucho menor en estas plantas que en las que excluyen sales.

La exposición a NaCl o ABA induce la síntesis de proteínas. Especialmente importante parece ser una

proteína de bajo peso molecular denominada **osmotina**, asociada a un aumento en la tolerancia al NaCl . En cultivo de tejidos ha sido posible aclimatar células de plantas de naranjo y tabaco para tolerar concentraciones elevadas de sales. Durante esta aclimatación se han detectado, mediante electroforesis en gel, varias proteínas sintetizadas *de novo*. Si se tratan las células con concentraciones bajas de ABA, antes de exponerlas a concentraciones elevadas de sales, aumenta extraordinariamente su capacidad de aclimatación. Además, el ABA estimula la síntesis de una o más proteínas que, aparentemente, son las mismas que se inducen durante la aclimatación al NaCl . De esta manera, parece posible que el ABA pueda desempeñar algún papel en la aclimatación. En plantas intactas, las elevadas concentraciones de sales aumentan los niveles de ABA en las hojas. Esta respuesta a la salinidad es similar al aumento en la producción de ABA por las raíces y su transporte a la parte aérea, ya descrito anteriormente en relación con el déficit hídrico edáfico (véase también Capítulo 22).

6.2.5. *Las plantas expuestas a temperaturas muy bajas experimentan sequía por congelación*

Es frecuente observar que, después de un período de exposición a temperaturas muy bajas, las hojas pertenecientes a especies vivaces de alta montaña se marchitan irremisiblemente. Esto ocurre así porque experimentan **sequía por congelación**, situación que se presenta cuando el suelo congelado, o xilema congelado y bloqueado, impide que el agua alcance las hojas. Incluso con los estomas cerrados, las hojas pueden perder suficiente cantidad de agua a través de la cutícula como para disminuir la turgencia. Por tanto, en regiones frías, las especies vivaces suelen poseer características xerofíticas como cutículas gruesas y posibilidad de cierre estomático completo, combinadas con capacidad para tolerar la desecación parcial.

Por otra parte, el paso del agua desde las células vivas hacia los espacios intercelulares, una especie de deshidratación controlada, suele ser esencial para sobrevivir a la congelación, al impedir la formación de cristales de hielo en el interior de las células. En los espacios intercelulares se pueden formar grandes cristales de hielo, retornando el agua a las células cuando aquéllos se funden. De esta manera, la capacidad para tolerar la congelación se acompaña de cambios en la bioquímica celular que se desarrollan lentamente durante el otoño, en un proceso que se describe como **aclimatación al frío** (véase Capítulo 30).

Al igual que en los casos de tolerancia a la salinidad y a la sequía, es importante destacar el papel que desempeñan los solutos compatibles que aparecen en muchas plantas durante la aclimatación al frío y que, en este caso, reciben el nombre de **crioprotectores**.

La aclimatación al frío puede ser inhibida por factores tales como la elevada fertilización nitrogenada o la poda, que estimulan el crecimiento de la planta. Las plantas varían en su grado de aclimatación y no todas pueden lograr resistencia a la congelación. Ello es de importancia considerable en agricultura. Así, por ejemplo, los cereales de invierno, que producen hasta un 40 % más que las variedades de primavera, no se pueden sembrar en muchas regiones más frías debido a su limitada tolerancia al frío. Si se pudiese aumentar su tolerancia, el impacto sería enorme en la producción mundial de alimentos.

6.2.6. En condiciones naturales, las plantas se encuentran sometidas a estrés múltiples

La mayor parte de la investigación sobre el efecto de los factores ambientales en las plantas se ha centrado, hasta ahora, en las respuestas y adaptaciones a factores aislados del ambiente pero, en condiciones naturales, las plantas se encuentran sometidas a estreses múltiples (véanse Capítulos 13 y 30). Hay que tener en cuenta que los efectos de los factores ambientales en interacción no suelen ser aditivos. Así, por ejemplo, en la especie mediterránea *Nerium oleander*, la lesión por luz intensa o **fotoinhibición** aumenta extraordinariamente cuando se acompaña de déficit hídricos.

Si bien la característica más importante de una región árida es que la precipitación es escasa o nula y la humedad atmosférica es muy baja, hay otros factores para los cuales también se requiere la adaptación, por ejemplo, elevadas temperaturas, altas intensidades luminosas, reducida disponibilidad de nutrientes, etc.

Por otra parte, condiciones ambientales, como sequía, salinidad, inundación, altas temperaturas, alta demanda de evaporación en la atmósfera y frío, pueden conducir o asociarse a pérdida de turgencia en el tejido vegetal. Parece, por tanto, probable que las respuestas a estos estreses ambientales puedan ser generales y comunes a las observadas en el caso de estrés hídrico (véase Capítulo 30). De hecho, las investigaciones sobre proteínas de choque (*shock proteins*) revelan la existencia de proteínas comunes, independientemente de la especie vegetal o del tipo de estrés.

RESUMEN

La absorción de agua por las raíces depende de la naturaleza y las propiedades hidráulicas del sistema radical, así como de las propiedades y el estado hídrico del suelo y, en general, de las condiciones ambientales. La absorción de agua en plantas con transpiración baja puede

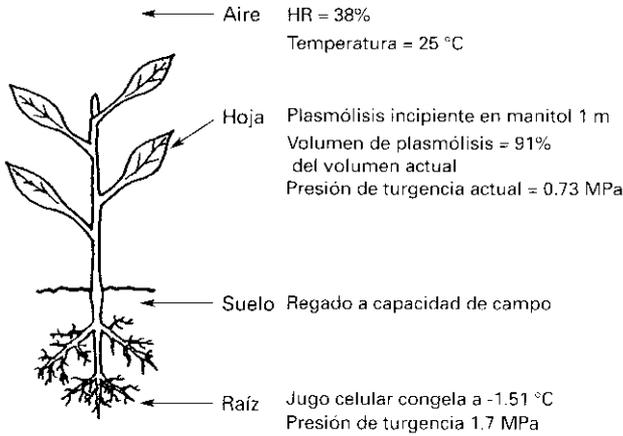
ser de origen osmótico, pero en plantas con transpiración intensa es, en gran medida, un fenómeno pasivo. La absorción de agua debida a fuerzas osmóticas es responsable de la presión de raíz.

El transporte de agua en la planta está regido por los gradientes de potencial hídrico y por las características anatómicas del xilema que controlan las propiedades hidráulicas. La capacidad del flujo en capilares semejantes a conductos xilemáticos aumenta a razón de la cuarta potencia del radio. Por tanto, elementos xilemáticos poseen un caudal muy alto. Las tensiones elevadas, la congelación del agua en el xilema o la acción de ciertos patógenos pueden inducir ruptura de las columnas de agua y embolias en los conductos xilemáticos. Se considera que la formación de embolias bajo tensión está relacionada con el tamaño de los poros en las puntaduras. La susceptibilidad a la cavitación y la tolerancia al embolismo son factores que han influido en el tipo y la distribución de las plantas terrestres en relación con la tolerancia a la sequía y la congelación.

A medida que aumenta la transpiración, la pérdida de agua excede su absorción, lo que origina una disminución del potencial hídrico. La causa de dicho retraso en la absorción es la resistencia elevada a nivel de las membranas de las células radicales. Cuando la radiación solar es variable, el potencial hídrico foliar fluctúa durante el día, incluso con buena disponibilidad de agua. En condiciones de sequía, disminuye considerablemente el potencial hídrico, si bien su variación diaria se puede reducir a medida que se anula la transpiración como consecuencia del cierre estomático. Según su hábitat y características funcionales, existen plantas hidroestables, que varían muy poco su balance hídrico durante el día, y plantas hidrolábiles que toleran grandes variaciones en el potencial hídrico. El déficit hídrico es el factor más importante causante de la reducción en el crecimiento; se puede producir en diferentes situaciones: sequía, bajas temperaturas edáficas, salinidad y escasa aireación del suelo, en combinación con factores que estimulan la transpiración. Las especies difieren entre sí en el grado, los mecanismos y el período de tolerancia a la sequía. En muchos casos se acumulan solutos (ajuste osmótico) y aparecen proteínas específicas que son inducidas rápidamente bajo los efectos del estrés. En general, los mecanismos que permiten mayor tolerancia a la sequía ocasionan reducción en la capacidad de producción. La relación entre las características hídricas de la planta y los fenómenos metabólicos, la naturaleza de los sensores primarios, los cambios en la expresión génica que caracterizan la adaptación de las plantas a los diferentes estrés ambientales relacionados con pérdida de turgencia, así como los efectos de la interacción entre factores ambientales múltiples son aspectos de creciente atención en la investigación.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Con los datos disponibles calcular el potencial hídrico, expresado en MPa, en las siguientes zonas del SPAC: suelo, raíz, hoja y atmósfera.



Considérese m no sustituible por M
 $R = 8.31 \text{ J } ^\circ\text{K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

2. Sugiera explicaciones para las afirmaciones siguientes:
- Las plantas en maceta expuestas al sol se pueden marchitar si se riegan al mediodía con agua muy fría.
 - Las plantas de jardín o en maceta que se desarrollan de forma natural en hábitat sombríos con frecuencia se marchitan a pleno sol, incluso si el suelo está húmedo.
 - Muchas plantas de jardín son más susceptibles a la sequía y se desarrollan con más dificultad en lugares con viento que en zonas protegidas.

3. Explique cómo es posible que el agua se mueva hasta la parte superior de un árbol de 100 m de alto pero, en cambio, una bomba mecánica no puede succionar agua hasta una altura superior a 10.3 m. ¿Qué es lo que impide que se rompa la columna de agua en un árbol? ¿En qué condiciones se puede romper la columna de agua y, si se rompe, cómo se restablece?
4. ¿Cuál se puede considerar como mejor mecanismo para tolerar el estrés hídrico: un aumento o una disminución del módulo de elasticidad. ¿?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Azcón-Bieto, J., Talón, M. (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.
- Brouwer, R.: «Water Movement across the Root». *Symp Soc Exp Biol*, 19: 131-149, 1965.
- Hopkins, W. G. (ed.): *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1995.
- Kozlowski, T. T. y Pallardy, S. G. (eds.): *Physiology of Woody Plants*. Academic Press, Nueva York, 1997.
- Kramer, P. J., y Boyer, J. S. (eds.): *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, Nueva York, 1995.
- Kramer, P. J.: «The relation between rate of transpiration and rate of absorption of water in plants». *Am J Bot*, 24: 10-15, 1937.
- Larcher, W.: *Physiological Plant Ecology*. (3.ª ed.). Springer-Verlag, Berlín, 1995.
- Milburn, J. A.: *Water Flow in Plants*. Longman, Nueva York, 1979.
- Morgan, J. M.: «Osmoregulation». *Ann Rev Plant Physiol*, 35: 299-319, 1984.
- Ridge, I.: *Plant Physiology*. Hodder and Stoughton, Londres, 1991.

TRANSPORTE EN EL FLOEMA

Amparo García Luis y José Luis Guardiola

1. El floema como sistema conductor. 2. Estructura del floema. 3. Sustancias transportadas en el floema. 4. El movimiento de fotoasimilados. Fuentes y sumideros. 5. Mecanismo de transporte. 6. Longevidad e inactivación de los tubos cribosos.

1. EL FLOEMA COMO SISTEMA CONDUCTOR

La necesidad de un sistema de transporte a larga distancia para el movimiento de las sustancias orgánicas es consecuencia de la especialización funcional. En los organismos fotosintéticos más primitivos, unicelulares o talófitos, todas las células realizan la fijación fotosintética del carbono por lo que los lugares de síntesis y de utilización están muy próximos y el transporte no representa un problema. En las plantas vasculares, por el contrario, los **fotoasimilados** producidos en las hojas (véase Capítulo 11) se transportan a otros órganos (frutos, raíces y zonas de almacenamiento) a distancias que oscilan entre unos centímetros y varias decenas de metros. Ni los procesos de difusión, ni el transporte célula a célula permiten mover con eficacia las sustancias a distancias tan considerables. En la cuantía en que este transporte tiene lugar, solamente es posible si los solutos recorren aquellas distancias arrastrados por el agua en el lumen de conductos especializados, al igual que los elementos minerales absorbidos por las raíces se transportan en sentido acrópeto en los vasos del xilema arrastrados por la corriente transpiratoria, o la glucosa se distribuye en los organismos animales en el plasma de la sangre.

1.1. Los experimentos de anillado permitieron establecer que los fotoasimilados se transportan en el floema

Los estudios sobre el transporte de los fotoasimilados se remontan a los experimentos de anillado realizados por M. Malpighi a mediados del siglo XVII. En el tronco y las ramas de las plantas leñosas es factible separar

la corteza del leño en la zona del cámbium vascular, y este autor comprobó que la eliminación de un anillo de corteza alrededor de la base del tallo no tiene un efecto inmediato en el transporte ascendente de agua en el xilema, por lo que la planta no se marchita, al mismo tiempo que provoca un hinchamiento característico de la corteza en la región inmediatamente por encima del anillado (Fig. 5-1).

En 1928, Mason y Maskell demostraron que este tratamiento interrumpe el transporte basípeto de azúcares (fundamentalmente sacarosa) que tiene lugar en la capa más interna de la corteza, constituida por el floema secundario, lo que provoca la acumulación de carbohidratos por encima de la región anillada y su agotamiento por debajo de ella. Como Hartig había demostrado que los elementos cribosos forman un conducto celular continuo que, cuando se corta, secreta un fluido con un contenido en azúcares de hasta el 33%, y éstos son numerosos en el floema, se supuso que el transporte tiene lugar en su lumen.

Estas observaciones permitieron establecer la función del floema en el transporte de los azúcares y otras sustancias orgánicas y minerales, y determinar algunas de las características del transporte, como son:

- la existencia de un conducto constituido por células vivas;
- la elevada concentración de azúcares en la solución de transporte;
- la presión positiva, superior a la atmosférica, a la que se encuentra ese contenido; y
- el sentido basípeto del transporte, opuesto a la corriente transpiratoria, en la base del tallo,

extremos que han sido confirmados posteriormente utilizando técnicas más precisas.

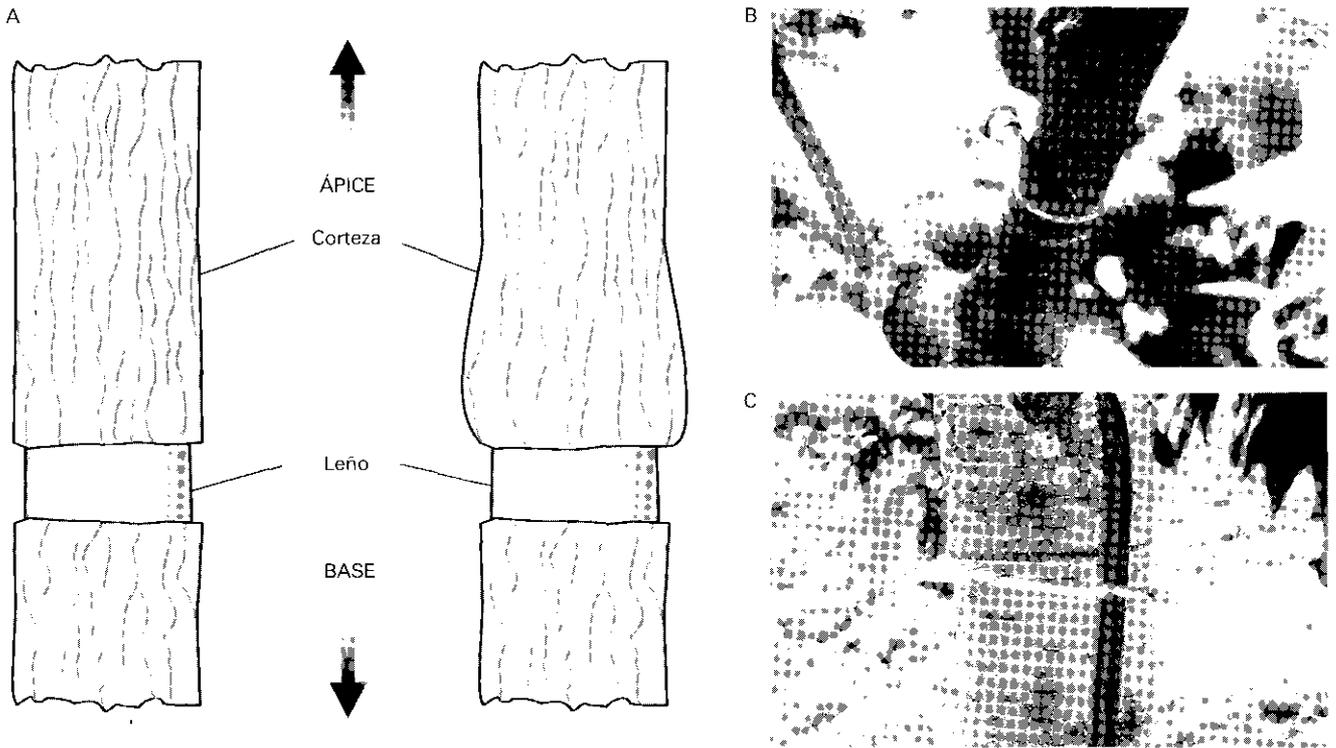


Figura 5-1. A) Diagrama de los experimentos de Malpighi. La separación de un anillo de corteza en el tallo o la base de una rama de una planta leñosa (izquierda) interrumpe el transporte basípeto de nutrientes y hormonas provocando la proliferación de los tejidos inmediatamente por encima del corte (derecha). B) En la práctica agrícola, esta operación, denominada **anillado**, se realiza con cuchillas, como la mostrada en la fotografía, que con un corte circular eliminan un anillo de corteza de la anchura deseada. La acumulación de carbohidratos en la porción distal de la rama respecto al corte aumenta el cuajado y el crecimiento del fruto. Si la anchura del anillo no es excesiva, el callo cicatricial que se forma a partir de la parte superior permite la regeneración de los tejidos eliminados restableciendo las conexiones vasculares. C) Aspecto de una rama de melocotonero mostrando el leño intacto en la región recién anillada. Inmediatamente sobre el anillo se aprecia la cicatriz del anillado realizado el año anterior.

1.2. Las técnicas autorradiográficas demuestran que el transporte se realiza en los elementos cribosos

La función de los **tubos cribosos** en el transporte de fotoasimilados es una conclusión lógica de los experimentos descritos, pero no queda demostrada de un modo fehaciente y, durante algún tiempo, fue cuestionada por consideraciones anatómicas y ultraestructurales. Su diámetro, que normalmente no supera los $10\ \mu\text{m}$, es considerablemente menor que el de los elementos traqueales o los vasos sanguíneos de los animales, lo que, unido a la presencia de citoplasma, aumenta considerablemente la resistencia al movimiento de los fluidos en su lumen y reduce su capacidad de transporte. Además, en las primeras observaciones ultraestructurales, las placas cribosas se mostraban obturadas por calosa y diversos componentes citoplasmáticos, lo que resulta incompatible con la función propuesta.

La demostración de que el transporte tiene lugar en el lumen fue posible con la disponibilidad de marcadores radiactivos a partir de la década de los cuarenta, mediante el uso de técnicas autorradiográficas. Después de la exposición de una hoja durante un tiempo corto a una

atmósfera con $^{14}\text{CO}_2$, los fotoasimilados marcados que se transportan en el peciolo o el tallo se inmovilizan mediante una congelación rápida (p. ej., sumergiendo el tejido en nitrógeno líquido) y se visualizan incubando secciones ultrafinas del tejido con una capa de emulsión fotográfica (Fig. 5-2). Si el tiempo transcurrido desde la presentación del $^{14}\text{CO}_2$ hasta la fijación es suficientemente corto, la radiactividad se localiza exclusivamente en los elementos cribosos (y en sus células de compañía), demostrando así su función como canal de transporte de los fotoasimilados. Cuando el tiempo de transporte se prolonga, la radiactividad se encuentra también en las células del parénquima en la vecindad de los elementos cribosos. Además de su función en el transporte longitudinal a larga distancia, los elementos cribosos proporcionan fotoasimilados y otras sustancias a los tejidos que los rodean, lo que permite el mantenimiento de sus funciones vitales.

Por último, el sellado de las placas cribosas con calosa que se apreciaba en las primeras observaciones ultraestructurales, se considera un artefacto provocado por la manipulación de las muestras. Los elementos cribosos son estructuras muy lábiles y extremadamente sensibles a cualquier manipulación, que provoca rápi-

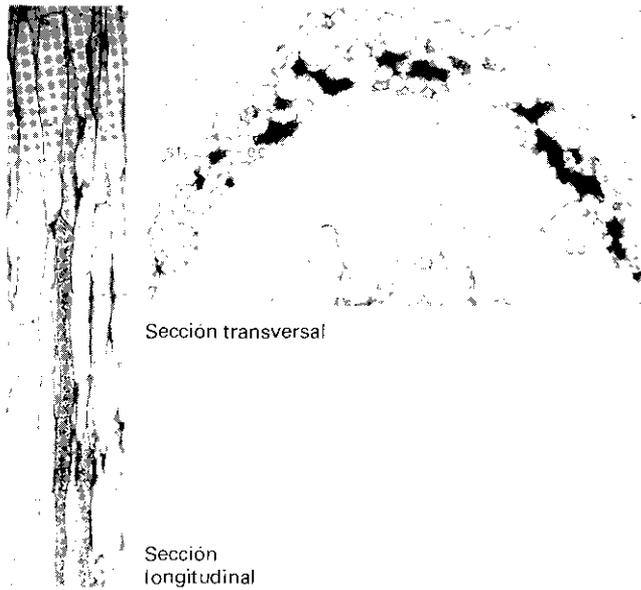


Figura 5-2. Demostración microautorradiográfica del transporte en el lumen de los tubos cribosos del tallo de *Vicia faba*. Tras la exposición de una hoja a una atmósfera con $^{14}\text{CO}_2$ durante 35 minutos, los fotoasimilados radiactivos (puntos negros) se localizan únicamente en el lumen de los tubos cribosos. Reproducido de Eschrich, W. y Fritz, F. (1972). (En *Microautoradiography and Electron Probe Analysis. Their Application to Plant Physiology*. Luttge, U. (ed.), Springer Verlag.)

dos cambios degenerativos y pérdida de su funcionalidad. Esta labilidad hace muy difícil las investigaciones sobre su funcionamiento y la caracterización de su ultraestructura. No obstante, la mejora de las técnicas de microscopía electrónica ha permitido establecer que, en condiciones naturales, los poros de las placas cribosas están normalmente abiertos.

2. ESTRUCTURA DEL FLOEMA

La presencia de elementos cribosos es la característica distintiva del floema. Junto a éstos se encuentran, en proporción variable, células parenquimáticas, fibras y, en algunas especies, laticíferos. Solamente los elementos cribosos están implicados directamente en el transporte. No obstante, algunas células parenquimáticas están estrechamente relacionadas con los elementos cribosos, interviniendo en la regulación de su metabolismo y en la carga de los fotoasimilados.

En el floema de las angiospermas, el canal de transporte es el **tubo criboso**, serie longitudinal de elementos cribosos unidos por sus paredes terminales, profundamente perforadas formando las **placas cribosas** (Fig. 5-3). Cada una de las células del tubo criboso recibe el nombre de **elemento de los tubos**. En el floema primario, el tubo criboso se forma a partir de los elementos del procambium, y su diferenciación procede en sentido acrópeto de modo gradual hasta la inmediata vecindad

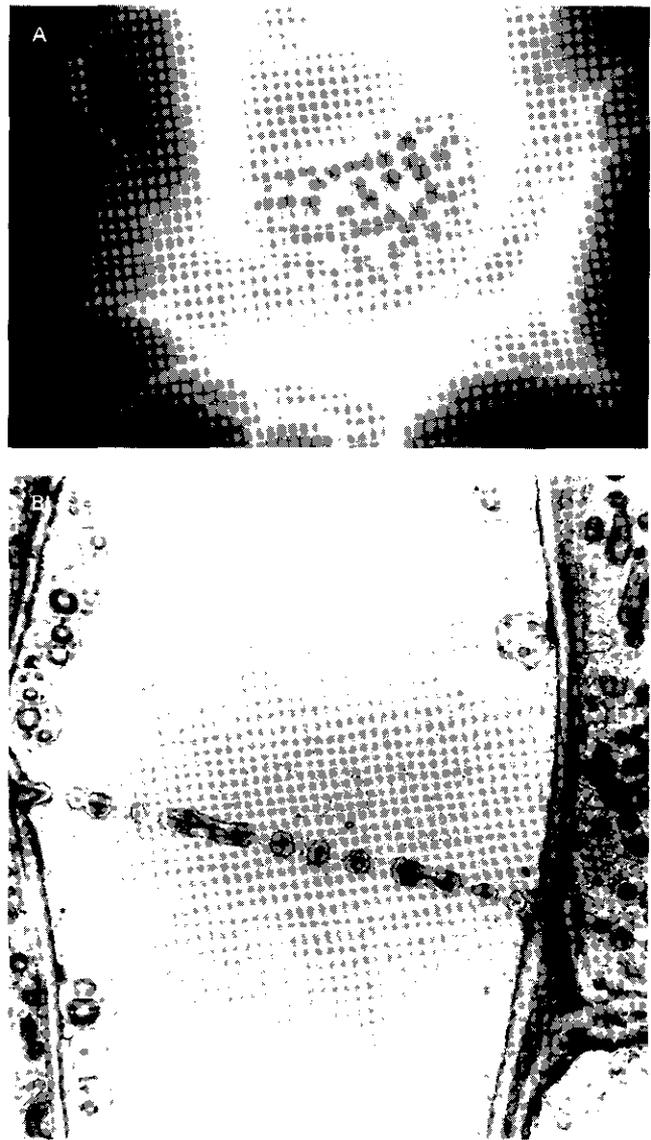


Figura 5-3. Placa cribosa en la pared de separación de dos elementos cribosos. A) Vista frontal de una placa cribosa de *Cucumis melo* al microscopio óptico. B) Sección transversal de una placa cribosa de *Cucurbita maxima* observada con microscopio electrónico. En la preparación, fijada por inmersión en nitrógeno líquido, se observan los poros rodeados por un depósito de calosa pero abiertos y libres de proteína floemática, que se encuentra en el lumen celular en forma dispersa. Se observan plastos con almidón en los elementos de los tubos. Reproducido de Anderson, R. y Cronshaw, J., *J Ultrastr Res*, 29:50-59, 1970.

de los meristemos apicales. En el floema secundario, los tubos cribosos se originan por la diferenciación simultánea de una serie longitudinal de derivadas fusiformes del cámbium, que se extienden del ápice del tallo y las hojas hasta el extremo de la raíz. Característicamente, los elementos de los tubos tienen entre 100 y 500 μm de longitud y 5 a 20 μm de espesor.

En las gimnospermas y las pteridófitas, los elementos cribosos, notablemente alargados, no están ordena-

dos en filas. Estos elementos, que reciben el nombre de **células cribosas**, están interconectados por **áreas cribosas** en las paredes laterales adyacentes (Fig. 5-4).

En el sistema axial de la planta (tallos, raíces, pecíolos y pedúnculos), los tubos cribosos se ordenan paralelamente respecto al eje de los órganos. En el floema secundario del tallo de las angiospermas, los tubos cribosos representan entre el 20 y el 80% de la sección transversal del tejido. En los órganos laterales (hojas y frutos), los tubos cribosos forman con frecuencia un retículo intensamente anastomosado. En las hojas, los tejidos vasculares se asocian a otros tipos celulares, formando las venas, y frecuentemente están rodeados por una o varias filas de células muy compactas que constituyen la **vaina del haz**. La distancia intervenal tiene un valor medio de 130 μm , lo que facilita el transporte desde las células del mesófilo a los elementos cribosos.

2.1. La estructura de los elementos cribosos está adaptada para el transporte

Observados con el microscopio electrónico, los elementos cribosos parecen casi desprovistos de contenido, en marcado contraste con la estructura rica en orgánulos de las células parenquimáticas vecinas. Esta estructura, aparentemente muy simple, es el resultado de un proceso de diferenciación a partir de las derivadas

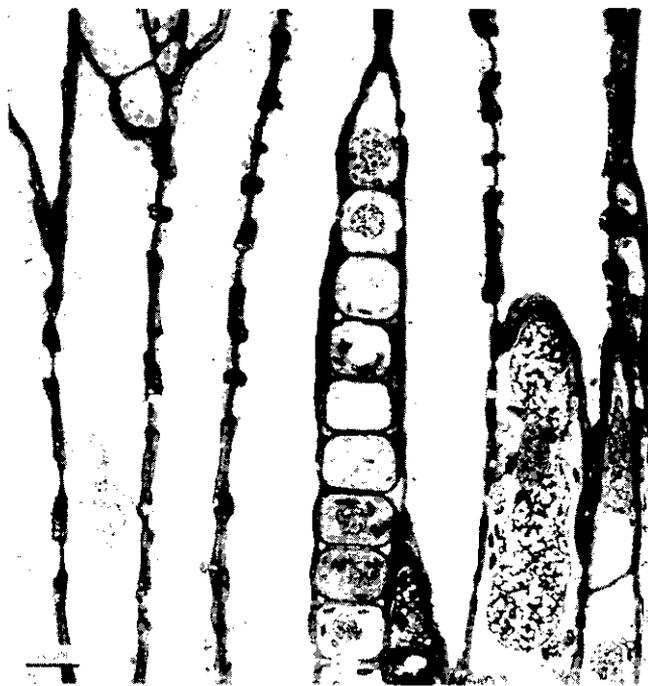


Figura 5-4. Áreas cribosas en las paredes laterales de las células cribosas del floema inmaduro de la raíz de *Picea abies*. Algunas de ellas todavía presentan el núcleo y pequeñas vacuolas. Reproducido de *Sieve Elements. Comparative Structure, Induction and Development*, Behnke, H. D. y Sjolund, R. E. (eds.), Springer-Verlag, 1990, por cortesía del Dr. Schulz.

del cambium que resulta en su adaptación para el flujo de una solución en sentido longitudinal.

La diferenciación de esta estructura tiene lugar en una secuencia bien definida. Las derivadas del cambium tienen un núcleo prominente, abundantes mitocondrias, plastos, ribosomas y dictiosomas, un retículo endoplásmico bien desarrollado y una vacuola claramente distinguible rodeada por el tonoplasto. El primer signo de diferenciación es la presencia de plasmodesmos muy destacados en las regiones en que se formarán áreas cribosas. Los poros se forman por el ensanchamiento gradual de las punteaduras, que se rellenan transitoriamente con **calosa** (β 1-3 glucano), mientras la pared se engruesa considerablemente por el depósito de capas ricas en celulosa con propiedades refractivas características (**capa nacarada**). El tonoplasto se degrada, por lo que desaparece la vacuola. Finalmente se abren los poros por la disolución de la calosa, degenera el núcleo y desaparecen los dictiosomas y los ribosomas.

Los elementos cribosos maduros carecen, por tanto, de muchas de las estructuras celulares, habiendo perdido la información genética y la capacidad de síntesis de proteínas. De pared a menudo engrosada, pero nunca lignificada, tienen plasmalema y conservan mitocondrias modificadas, plastos y algo de retículo endoplásmico liso, que se sitúa siempre en posición parietal. En la mayor parte de las angiospermas se encuentran presentes distintas formas filamentosas o globulares de una proteína denominada **proteína P**; esta proteína no se encuentra en gimnospermas ni en ciertas monocotiledóneas (Fig. 5-5).

Característica distintiva de los elementos cribosos maduros, y de la que deriva su nombre, es la presencia de áreas cribosas, regiones con numerosos poros de gran diámetro (Fig. 5-3). Son particularmente prominentes en las paredes transversales de los elementos de los tubos cribosos (**placas cribosas**) en que los poros, de un diámetro entre 0.1 y 5 μm , ocupan cerca del 50% de la superficie de la pared. Aunque en algunas preparaciones estos poros están obturados por calosa hoy se considera que están normalmente despejados, como se indicó anteriormente, permitiendo la continuidad citoplásmica entre los elementos cribosos contiguos.

2.2. Células parenquimáticas especializadas se asocian a los elementos cribosos

Los elementos de los tubos normalmente se asocian a células parenquimáticas especializadas denominadas **células de compañía**, que se originan mediante una división longitudinal desigual de las iniciales del cambium, previa a la diferenciación del elemento del tubo. Estas células, de citoplasma muy denso, numerosas mitocondrias y con todos los orgánulos y estructuras subcelulares (Fig. 5-5), están unidas al elemento del tubo correspondiente por numerosas conexiones plasmodés-

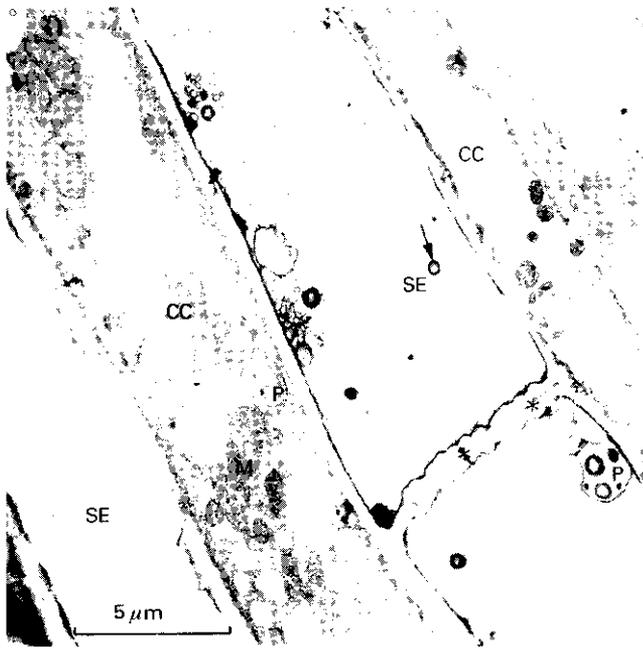


Figura 5-5. Micrografía electrónica de la sección longitudinal de elementos de los tubos (SE) y células de compañía (CC) de *Acer pseudoplatanus*. Los poros de la placa cribosa están obturados por calosa, mientras que la proteína floemática está dispersa en el lumen de los elementos cribosos. En éstos y en las células de compañía, de citoplasma más denso, se observan plastos (P), mitocondrias (M) y membranas de retículo endoplásmico liso. Reproducido de Wooding, F. B. P. en *Phloem*, Oxford University Press, 1971.

micas, ensanchadas por el lado del elemento criboso y con varias ramificaciones por el lado de la célula de compañía (Fig. 5-6). Estos plasmodesmos permiten el intercambio rápido y eficaz de sustancias entre las dos células.

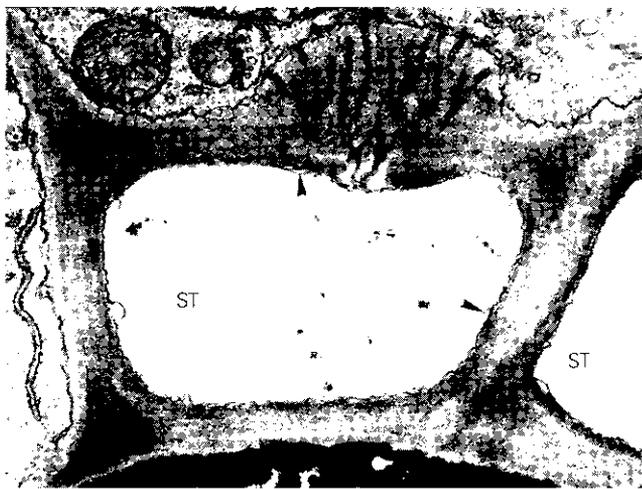


Figura 5-6. Plasmodesmo ramificado entre un tubo criboso (ST) y su célula de compañía. Reproducido de Russin, W. A. y Evert, R. F., *Amer J Botany* 72:1232-1247, 1985.

La interdependencia entre ambos tipos de células se refleja en su muerte simultánea, mientras las células parenquimáticas vecinas sobreviven, por lo que es frecuente considerarlas como un **complejo tubo criboso-célula de compañía**. Las células de compañía desempeñan funciones metabólicas, como la síntesis de proteínas, que no puede realizar el elemento criboso. Además, es probable que sus numerosas mitocondrias proporcionen ATP a los elementos cribosos. En las venas menores de las hojas, las células de compañía tienen un diámetro mayor que los tubos cribosos, y se cree que están implicadas en la carga de fotoasimilados; en el tallo, por el contrario, las células de compañía son mucho menores que los elementos del tubo.

En gimnospermas, estas funciones las desempeñan las **células albuminosas**. A diferencia de las células de compañía, no proceden de la misma célula madre que los elementos cribosos.

2.3. En las venas menores de las hojas hay diversos tipos de células de compañía

En las venas menores de las hojas, se distinguen varios tipos de células de compañía que difieren en su ultraestructura y en la frecuencia de conexiones plasmodésmicas con las células vecinas, excepción hecha del tubo criboso con el que siempre están profusamente conectadas.

Las **células de compañía ordinarias** son de paredes lisas, tienen varias vacuolas de pequeño tamaño y cloroplastos con membranas tilacoidales (Fig. 5-7).

Las **células de transferencia** son un tipo especializado de células de compañía que se caracteriza por la presencia de numerosas invaginaciones en la pared celular, especialmente en las zonas que no están en contacto con el elemento criboso (Fig. 5-8). Estas invaginaciones aumentan considerablemente la superficie de la membrana plasmática y, de este modo, la capacidad de tales células para acumular sustancias desde el apoplasto. Por lo demás, sus características citológicas son similares a las de las células de compañía ordinarias.

Estos dos tipos de células de compañía presentan muy pocas conexiones plasmodémicas con las células parenquimáticas vecinas, por lo que el complejo tubo criboso-célula de compañía no posee conexión simplástica con las restantes células del mesófilo.

Las **células intermediarias**, de mayor tamaño que las células de compañía ordinarias, presentan numerosas conexiones plasmodémicas con las células vecinas, en particular con las de la vaina del haz, de tal modo que se establece una continuidad simplástica entre las células del mesófilo y los elementos conductores. Otras características de estas células son sus paredes lisas, la presencia de numerosos laberintos de retículo endoplásmico y la ausencia de cloroplastos y de granos de almidón.

La configuración de las venas menores en una espe-

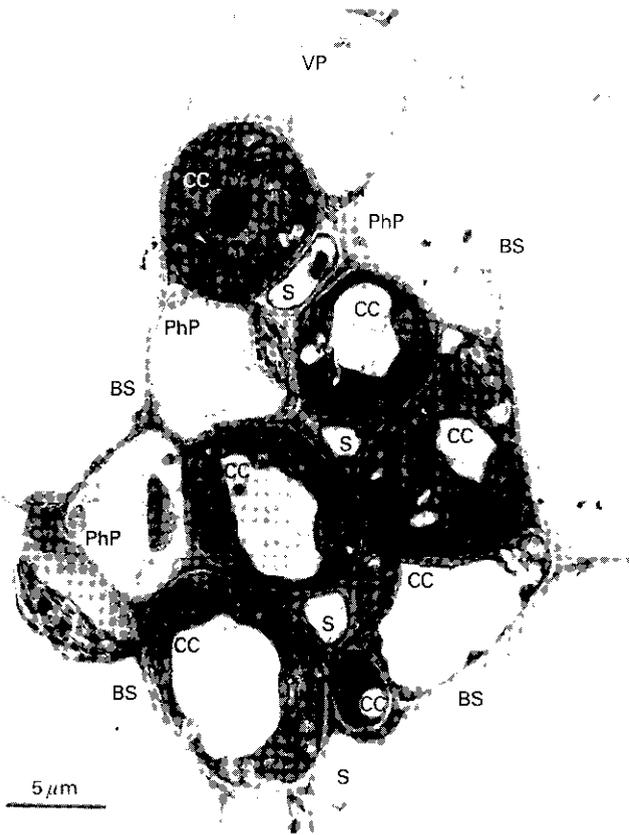


Figura 5-7. Micrografía de la sección transversal de una vena menor de la hoja de *Beta vulgaris*. Las células de compañía (CC), de mayor tamaño que los elementos cribosos (S), tienen un citoplasma denso en el que se observan cloroplastos y paredes de espesor uniforme. Se observan en la preparación células del parénquima floemático (PhP) y del parénquima vascular (VP). La vena está rodeada por las células de la vaina (BS). Reproducido de Evert, R. F. y Mierwa, R. J., 1986. (En Cronshaw, J., Lucas, W. J. y Giaquinta, R. T. (eds.), *Phloem Transport*. Alan R. Liss, New York.)

cie guarda relación con su clasificación taxonómica; además, esta característica está asociada con el modo de incorporación de los azúcares de transporte al tubo criboso. Las células intermediarias se encuentran en especies de familias poco evolucionadas (*Cucurbitaceae*, *Hydrangeaceae* y *Lamiaceae*, entre otras). En éstas, los azúcares se incorporan al tubo criboso por el simplasto (véase más adelante) y los azúcares de la familia de la rafinosa representan entre el 20 y el 80% del total transportado. En las especies en que el complejo tubo criboso-célula de compañía no posee conexiones simplásticas, la sacarosa, que es la forma casi exclusiva del transporte de azúcares en estas especies, se incorpora a aquél desde el apoplasto. Se ha descrito la presencia de células de transferencia en familias originarias de zonas templadas y áridas en que predominan las plantas herbáceas, entre ellas algunas con numerosas especies cultivadas (*Fabaceae*, *Asteraceae*, *Balsaminaceae*, *Boraginaceae* y *Geraniaceae*, entre otras). El aislamiento simplástico del complejo tubo criboso-célula de com-



Figura 5-8. Micrografía electrónica de una sección transversal del floema de la hoja de remolacha azucarera. Las células de compañía (CC), de mayor tamaño que los elementos de los tubos (SE), tienen numerosas invaginaciones en las paredes. Reproducido de Wooding, F. B. P. en *Phloem*, Oxford University Press, 1971.

pañía y la formación de células de transferencia se han producido evolutivamente en esta secuencia.

La relación entre la configuración de las venas menores y la taxonomía no es estricta, y en la familia *Scrophulariaceae* se encuentran especies con los tres tipos de configuración descritos. Además, en una misma planta pueden encontrarse al mismo tiempo células de transferencia y células intermediarias.

3. SUSTANCIAS TRANSPORTADAS EN EL FLOEMA

La naturaleza de las sustancias que se transportan en el floema se ha dilucidado analizando su contenido. Como las sustancias son arrastradas en el lumen del tubo criboso por un flujo de agua, toda sustancia en solución será transportada. Para determinar su composición, es necesario disponer de un volumen suficiente de fluido de floema no contaminado.

3.1. El fluido del floema se obtiene cortando los tubos cribosos

Como el contenido de los tubos cribosos se encuentra sometido a una presión positiva, se libera cuando aquéllos se cortan. De este modo, es posible obtener un volumen apreciable de fluido del floema en *Fraxinus sp.*, *Ricinus sp.*, diversas cucurbitáceas y muchas palmas, en que tal exudación se mantiene durante algunas horas o aun días (Fig. 5-9). En otros casos, el volumen de fluido obtenido es muy pequeño debido al sellado rápido de los tubos cortados por calosa. Este sellado puede evitarse aplicando un agente quelante (p. ej., EDTA) en la superficie de corte, ya que la síntesis de calosa precisa iones calcio. De este modo, aumenta considerablemente el volumen de exudado obtenido.

El principal inconveniente de este procedimiento de obtención es que el fluido recolectado está contaminado por el contenido de otras células que resultan también afectadas por el corte. Además, el corte del tubo criboso causa la extravasación rápida de su contenido y, como consecuencia, una disminución abrupta de la presión de turgencia, lo que provoca la entrada de agua desde las células vecinas y la dilución de su contenido.

3.2. Los áfidos permiten obtener fluido de floema sin contaminar

Es posible obtener fluido del floema sin contaminar por el contenido de las células vecinas con la colaboración involuntaria de los áfidos. Estos insectos insertan su estilete (piezas bucales) directamente en el interior de un elemento criboso, y se alimentan del fluido del floema que circula pasivamente por su tubo digestivo. Si se corta el estilete evitando que el áfido se mueva, el ex-

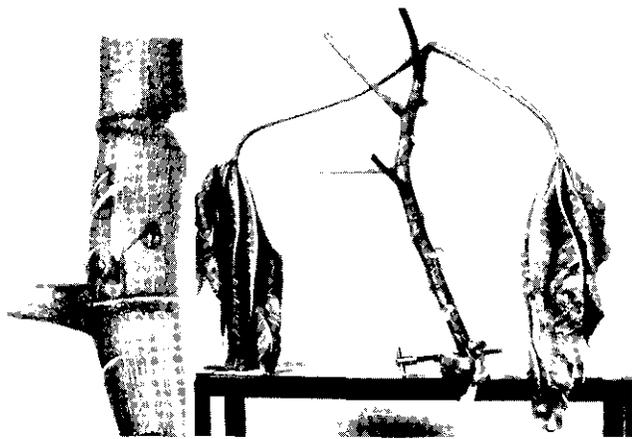


Figura 5-9. Exudación de fluido de floema en el tallo de *Ricinus communis* provocada por una incisión en la corteza. Esta exudación se produce aun cuando el tallo presenta un déficit hídrico acusado (fotografía de la derecha), lo que prueba la capacidad de los elementos cribosos para mantener la turgencia en estas condiciones. Reproducido de Milburn, J. A., *Planta*, 117:303-319, 1974.

tremo del estilete continúa exudando durante varios días, obteniéndose así fluido sin contaminar de un único elemento criboso (Fig. 5-10). La inserción del estilete no desencadena el mecanismo de sellado de los tubos cribosos. El volumen de fluido que se obtiene de este modo es de hasta 5 μL por hora, cantidad muy pequeña desde el punto de vista analítico pero considerable desde el punto de vista celular. Representa aproximadamente 50.000 veces el volumen de un elemento criboso, lo que significa que éste se rellena ¡diez veces por segundo! Este valor demuestra la eficacia de los elementos cribosos para el transporte de un fluido en sentido longitudinal.

3.3. Composición del fluido del floema

La composición del fluido del floema es muy variable, dependiendo de la especie, edad y estado fisiológico del tejido que se analiza. Presenta, sin embargo, una serie de características comunes en todos los casos, como son: un pH próximo a 8, superior al pH del citosol de las células del parénquima y mucho mayor que el pH del fluido de xilema, que oscila entre 5 y 6; un elevado contenido en materia seca, normalmente entre el 10 y el 25%; un bajo peso molecular de las sustancias disueltas, que determina un potencial osmótico muy negativo de la solución, entre -1 y -3 MPa; y una viscosidad elevada, hasta dos veces superior a la del agua.

Los azúcares son el componente mayoritario del fluido del floema, ya que representan normalmente entre el 80 y el 90% de la materia seca total. En cantidades menores se encuentran proteínas, aminoácidos y amidas, ácido málico y diversos aniones y cationes inorgánicos. También se encuentran fosfatos de nucleótidos, fundamentalmente ADP y ATP y, en concentraciones muy bajas, diversas hormonas vegetales, incluyendo auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico. (Cuadro 5-1). El marcado isotópico ha permitido demostrar que la mayor parte de estas sustancias se transporta realmente en el lumen de los tubos cribosos, pero en algunos casos son componentes que se movilizan como consecuencia del corte del tubo criboso. Se cree que las proteínas del exudado, que incluyen varias enzimas y, mayoritariamente, proteína P, no se mueven en el tubo criboso intacto.

3.3.1. Los azúcares del floema no tienen carácter reductor

Sacarosa es normalmente el azúcar más abundante, en ocasiones el único, del fluido del floema. Se encuentran, asimismo, cantidades variables de azúcares de la serie de rafinosa (rafinosa, estaquiosa y verbascosa; Fig. 5-11). Desde el punto de vista estructural y biosintético, estos azúcares derivan de la sacarosa por la adición de moléculas de galactosa, y son particularmente

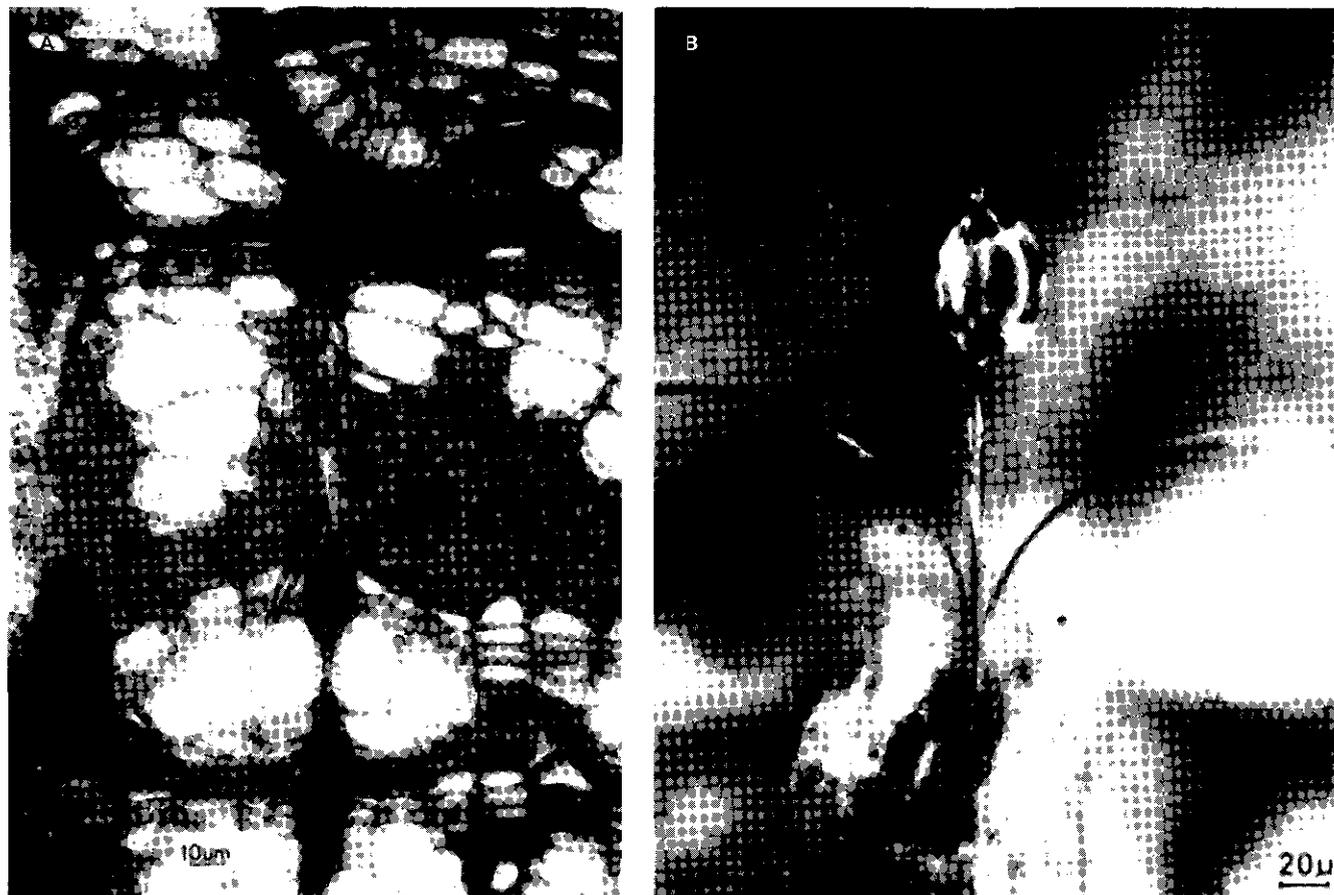


Figura 5-10. Extremo del canal maxilar de un áfido en el lumen de un tubo criboso (A) y exudación en el extremo de un estilete cortado (B). Reproducido de Zimmermann, M. H. y Milburn, J. A. en «Transport in Plants. I. Phloem Transport» «Encyclopedia of Plant Physiology», New Series, Vol.1. Springer-Verlag, Berlin, 1975 y Kollmann, R. y Dörr, I. *Zeitschrift Pflanzenphysiologie*, 55:131-141, 1966.

abundantes en las plantas con células intermediarias en las venas de las hojas; en las cucurbitáceas, la estaquiosa es el azúcar mayoritario en el floema. En algunas familias se transportan, junto a sacarosa, alditoles como manitol (en la familia *Oleaceae*), sorbitol (especies leñosas de la familia *Rosaceae*) o dulcitol (*Celastraceae*).

Una característica de estos compuestos es su carácter no reductor, ya que los carbonos anoméricos (grupos aldehído y cetona) están combinados formando un enlace glucosídico. No se encuentran azúcares reductores, y se considera que las pequeñas cantidades de fructosa y glucosa detectadas a veces en el fluido del floema proceden de la contaminación de la muestra o de la hidrólisis de la sacarosa durante la extracción. No se conoce la razón por la que estos azúcares no se incorporan a los tubos cribosos.

3.3.2. El potasio es el elemento mineral más abundante

En todos los casos se encuentran cantidades variables, pero significativas, de cationes y aniones inorgánicos. El contenido en cationes es siempre más elevado, y la

solución se equilibra eléctricamente por la contribución de aniones orgánicos, particularmente malato. El catión más abundante es invariablemente potasio; su concentración oscila entre 50 y 100 mM, por lo que contribuye significativamente al potencial osmótico del fluido. En concentraciones menores se encuentran magnesio y sodio. Fosfato y cloruro son los aniones más abundantes.

La concentración de algunos iones, como calcio y hierro, es siempre muy baja. El ion nitrato, que es la forma en que se transporta el nitrógeno en el xilema de muchas plantas, no se incorpora al floema.

3.3.3. El nitrógeno se transporta en forma de aminoácidos

En el fluido del floema se encuentra gran número de aminoácidos. Los más abundantes son glutamato o aspartato, bien en forma libre o como amidas (glutamina y asparagina). Ésta es también la forma en que se transporta el nitrógeno en el xilema de muchas especies.

El contenido en aminoácidos del fluido del floema varía ampliamente con la especie y el estado de desarrollo. Normalmente, su concentración oscila entre el

Cuadro 5-1. Composición química y características del exudado de floema de *Ricinus communis* y de *Yucca flaccida*. Tomado de Hall, S. M. y Baker, D. A., *Planta*, 106:131-140, 1972; y de Van Die, J. y Tammes, P. M. L. En: Zimmermann, M. H., y Milburn, A. J. (eds.), «Transport in Plants. I. Phloem Transport». «Encyclopedia of Plant Physiology», New Series, Vol. 1. Springer-Verlag. Berlin, pp. 196-222, 1975

	<i>Ricinus communis</i>	<i>Yucca flaccida</i>
Materia seca total (%)	10-12.5	17.1-19.1
Sacarosa (%)	8.0-10.6	15.0-18.0
Azúcares reductores (glucosa + fructosa) (%)	Ausentes	0.4-0.8
Hexosas-fosfato	—	Trazas
Aminoácidos y amidas (molar)	0.037	0.05-0.08
Ureídos		Trazas
Proteína total (%)	0.15-0.22	0.05-0.08
Ácidos orgánicos (mEq · L ⁻¹)	30-47	ca. 7.0
Fosfato (mEq · L ⁻¹)	7.4-11.4	
Sulfato (mEq · L ⁻¹)	0.5-1.0	
Cloruro (mEq · L ⁻¹)	10-19	
Nitrato (mEq · L ⁻¹)	Ausente	
Bicarbonato (mEq · L ⁻¹)	1.7	
Potasio (mEq · L ⁻¹)	60-122	
Sodio (mEq · L ⁻¹)	2-12	
Calcio (mEq · L ⁻¹)	1.0-4.6	
Magnesio (mEq · L ⁻¹)	9-10	
Amonio (mEq · L ⁻¹)	1.6	
Auxinas (milimolar)	0.6×10^{-4}	
Giberelinas (milimolar)	0.67×10^{-5}	
Citoquininas (milimolar)	0.52×10^{-4}	
ATP (milimolar)	0.40-0.60	
pH	8.0-8.2	8.0-8.2
Conductividad	1.32 mS · m ⁻¹ (a 18 °C)	
Potencial osmótico	-1.42 a -1.52 MPa	
Viscosidad	$1.34 \times 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ (a 20 °C)	

0.2 y el 0.5 %, pero durante la senescencia de las hojas puede aumentar hasta el 5 %.

3.3.4. En el fluido del floema se encuentran sustancias no producidas por las plantas

Algunas moléculas orgánicas de síntesis se incorporan al tubo criboso y se distribuyen de este modo por la planta. Entre ellas se encuentran sustancias con efecto herbicida o plaguicida que, por el hecho de transportarse en el floema, reciben el nombre de sistémicos.

También se han detectado partículas virales. El floema es, en muchos casos, la vía de expansión de los virus en la planta.

4. EL MOVIMIENTO DE FOTOASIMILADOS. FUENTES Y SUMIDEROS

El transporte en el floema tiene lugar desde las fuentes a los sumideros.

Las **fuentes** son órganos en que los azúcares se incorporan al tubo criboso. Ello implica la síntesis de formas de transporte, comúnmente **sacarosa**, y la disponibili-

dad de carbohidratos en cantidad superior a la necesaria para cubrir las necesidades metabólicas. Éstos pueden proceder directamente de la fotosíntesis (p. ej., en las hojas adultas) o de la movilización de reservas acumuladas anteriormente.

Los **sumideros** son órganos «importadores» de carbohidratos, en los que se produce la salida de azúcares del tubo criboso. Estos azúcares pueden ser utilizados en el metabolismo y el crecimiento (sumideros consuntivos) o almacenarse como reservas (sumideros de almacenamiento). En algunos sumideros, las reservas tienen la misma estructura química que el azúcar de transporte. Ejemplos característicos son muchos frutos, los entrenudos de la caña de azúcar y la raíz napiforme de remolacha, que acumulan grandes cantidades de sacarosa. En otros casos, las sustancias acumuladas son diferentes a la forma de transporte, y pueden ser de menor peso molecular (glucosa es el azúcar más abundante del fruto de la vid) o de peso molecular más elevado (almidón es la forma de almacenamiento en los tubérculos de patata y en los cotiledones y el endospermo de muchas semillas).

El hecho de que, en algunos casos, el transporte tenga lugar hacia órganos con una concentración de sacarosa superior a la de los órganos fuente (las hojas) demuestra que, más que la concentración, es la capacidad de acumular o tomar azúcares de los tubos cribosos el

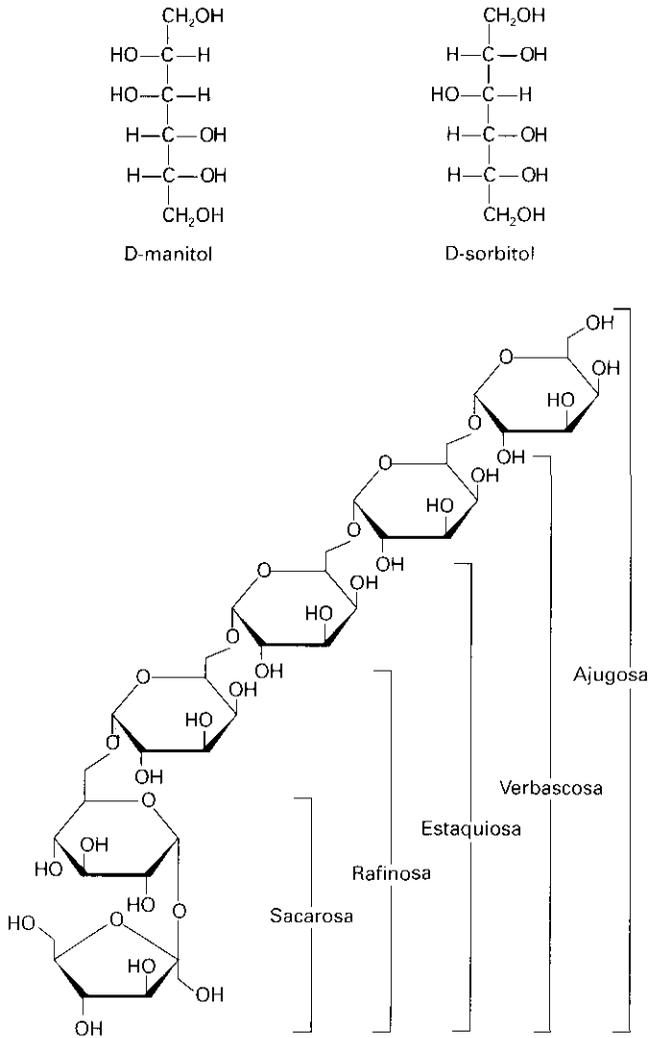


Figura 5-11. Estructura química de los azúcares y algunos hexitales (manitol y sorbitol) transportados en el floema. Característica común de estas sustancias es su carácter no reductor.

factor que determina que un órgano se comporte como fuente o como sumidero.

4.1. La posición de fuentes y sumideros varía durante la ontogenia

Durante las etapas iniciales de su formación, todos los órganos actúan como sumideros, y su desarrollo depende de los carbohidratos que reciben del resto de la planta. Posteriormente, algunos órganos presentan un cambio en su conducta y se comportan como fuentes, convirtiéndose en exportadores netos de carbohidratos. Otros órganos, por el contrario, no pasan nunca a fuente. Son los llamados sumideros irreversibles. Los frutos son un ejemplo característico de este comportamiento. A pesar del elevado contenido en sacarosa de muchos de ellos, ésta no puede ser recuperada por la planta madre en ninguna circunstancia.

La transición de sumidero a fuente ha sido bien estudiada en las hojas. En las hojas simples de las dicotiledóneas, se inicia cuando la hoja no ha completado aún su expansión. Inicialmente, las regiones marginales de la hoja, de más edad, comienzan a exportar azúcares, mientras que las zonas basales, más jóvenes, actúan todavía como sumideros. En estos momentos, estas regiones reciben azúcares tanto desde las zonas marginales como, por el pecíolo, del resto de la planta. Cuando la hoja alcanza una superficie de aproximadamente la mitad de la definitiva, se completa la transición y se convierte en exportadora neta. Esta transición implica cambios bioquímicos y estructurales. Aumenta la actividad de las enzimas que sintetizan sacarosa y disminuye la de las enzimas degradativas. Por tanto, se produce un aumento de la concentración de ese azúcar. Al mismo tiempo, se produce un cambio en el comportamiento del floema, que acumula sacarosa en vez de liberarla, lo que coincide en muchos casos con el aislamiento simplástico de los tubos cribosos. Un proceso similar ocurre en la raíz napiforme de muchas plantas bienales. Durante el primer año, de crecimiento vegetativo, estas plantas acumulan carbohidratos de reserva en la raíz. Durante el segundo año, en que tiene lugar la floración y fructificación, los carbohidratos de la raíz se movilizan hacia el tallo.

Estos cambios en el comportamiento se traducen en cambios en el sentido del transporte. En el tallo de las plantas bienales, es basípeto (del tallo hacia la raíz) durante el primer año y acrópeto (de la raíz hacia el tallo) durante el segundo. En el pecíolo de las hojas se observa un cambio similar en el sentido del transporte ligado al desarrollo, inicialmente hacia la lámina y posteriormente hacia el tallo. No existe, por tanto, una polaridad en el transporte del floema.

4.2. Las relaciones entre fuentes y sumideros dependen de la distancia y las conexiones vasculares

El movimiento de los fotoasimilados en la planta está determinado por la situación de las fuentes y los sumideros. En general, los sumideros son alimentados desde las fuentes más próximas; así, los ápices caulares y las hojas en desarrollo reciben la mayor parte de los metabolitos desde las hojas situadas en la región apical del vástago, mientras que las raíces los reciben desde las hojas más basales. Las hojas situadas en las regiones centrales del tallo exportan tanto hacia el ápice del mismo como hacia las raíces (Fig. 5-12). Esto determina que el movimiento neto de los azúcares sea acrópeto en las regiones apicales y basípeto en las regiones basales. Los flujos de transporte cambian durante la ontogenia de la planta al hacerle la posición de las fuentes y los sumideros, y pueden ser manipulados experimentalmente. De este modo, la ablación de las hojas de la región apical del tallo aumenta el transpor-

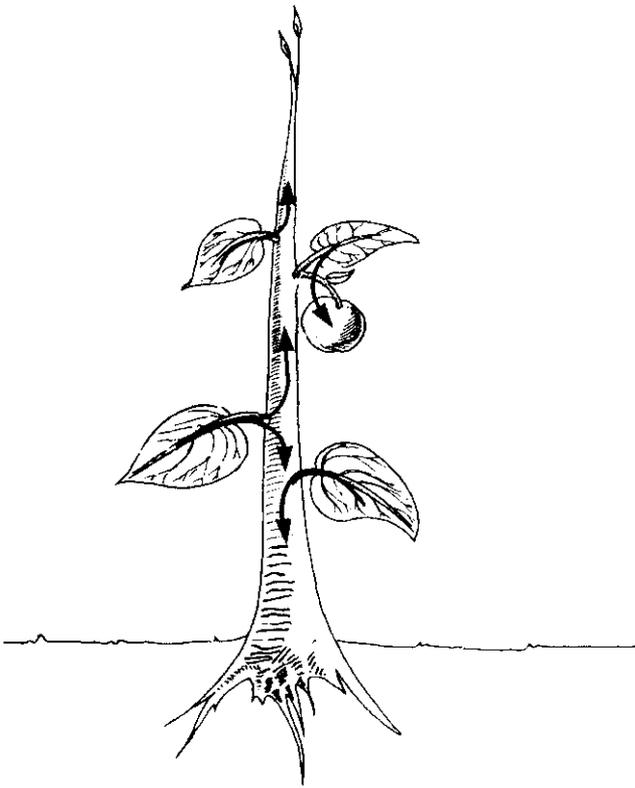


Figura 5-12. Direcciones predominantes del transporte de los fotoasimilados en la planta. Durante el desarrollo vegetativo, el transporte tiene lugar hacia los ápices del tallo y la raíz. Durante la fructificación, los frutos acumulan la mayor parte de los azúcares exportados desde las hojas próximas.

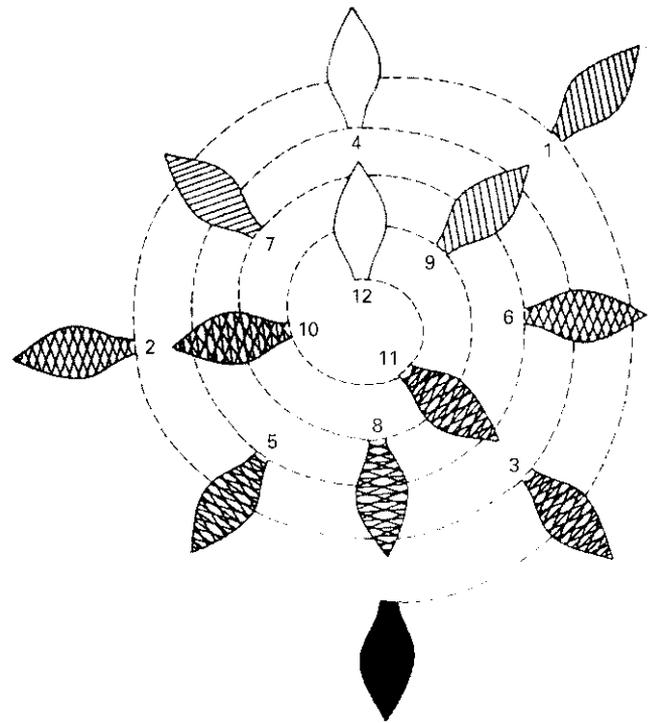


Figura 5-13. Distribución de la radiactividad en las hojas en desarrollo del ápice del tallo de tabaco después de la presentación de una hoja adulta (de color negro en la figura) con $^{14}\text{CO}_2$. El grado de sombreado indica la cantidad relativa de ^{14}C acumulado. Las hojas, numeradas según el orden en que se formaron, se han dibujado sobre la espiral genética; obsérvese la filotaxis 3/8. Reproducido de Shiroga *et al.*, *Can J Botany* 39:855-864, 1961.

te hacia el ápice desde las hojas situadas en posición más basal.

El movimiento de los fotoasimilados es facilitado por la existencia de conexiones vasculares directas entre los órganos. Como en el tallo los tubos cribosos están próximos a la superficie y orientados longitudinalmente respecto al eje del mismo, las relaciones nutricionales son más intensas entre los órganos situados en el mismo ortóstico que entre órganos más próximos pero situados en ortósticos distintos. Un ejemplo de la importancia de este factor en el transporte se presenta en la Figura 5-13. Cuando se presenta una hoja adulta próxima al ápice del tallo con $^{14}\text{CO}_2$, los azúcares marcados se acumulan en los primordios foliares del mismo ortóstico y de ortósticos vecinos, pero apenas en los primordios formados en la parte opuesta del tallo.

4.3. No hay una relación específica entre fuentes y sumideros

Los elementos conductores del floema forman una red muy compleja que interconecta los distintos órganos de la planta. Junto a los flujos principales de transporte

descritos coexisten otros, normalmente de menor importancia cuantitativa, pero que, en determinadas circunstancias, pueden convertirse en la ruta preponderante del transporte. No existe una relación específica entre fuentes y sumideros, y un sumidero puede ser suministrado simultánea o alternativamente desde varias fuentes.

El movimiento tangencial de los solutos en el tallo es posible por la existencia de interconexiones, denominadas **anastomosis**, que son particularmente abundantes en los nudos. Estas interconexiones permiten la transferencia lateral de sustancias entre haces conductores y tubos cribosos, lo que facilita el movimiento de un lado a otro de la planta. Normalmente, el transporte por las anastomosis es de pequeña cuantía, pero aumenta considerablemente cuando el transporte en sentido longitudinal es bloqueado por alguna circunstancia (p. ej., una lesión). Ello es esencial para la supervivencia de las monocotiledóneas perennes (palmas), que no presentan crecimiento secundario y en las que el sistema conductor permanece funcional durante varias decenas de años, pues permite paliar el bloqueo del transporte en una región del tallo.

Un hecho repetidamente observado y confirmado mediante la utilización de marcadores es que parte de

los fotoasimilados producidos en las hojas de la región apical del tallo se transporta a la raíz, al mismo tiempo que desde las hojas más basales se exportan fotoasimilados hacia el ápice del tallo. En la región central del tallo se produce, por tanto, el movimiento simultáneo de sustancias en sentido opuesto (Fig. 5-14). Este **transporte bidireccional** ha sido muy estudiado en relación con el mecanismo de movimiento de las sustancias en los tubos cribosos, aceptándose actualmente que tiene lugar por haces conductores o tubos cribosos diferentes, pero que en un tubo criboso todas las sustancias se mueven en el mismo sentido.

4.4. Los sumideros compiten por los fotoasimilados disponibles

La fotosíntesis impone un límite al desarrollo de la planta, y los sumideros compiten por una disponibilidad limitada, aunque no fija, de fotoasimilados. Una reducción en el número de sumideros aumenta el transporte de sustancias hacia los restantes, y es la base de prácticas hortícolas como el **aclareo** (la eliminación de parte de los frutos en desarrollo aumenta la velocidad de crecimiento y el tamaño final de los restantes) o el **despuntado** (al eliminar el ápice de los brotes, se reduce el consumo de metabolitos en el desarrollo vegetativo, lo que favorece los procesos reproductivos como

el cuajado del fruto y la formación de semillas). Por el contrario, la eliminación de las flores y de los frutos en desarrollo aumenta la cantidad de metabolitos disponible para el desarrollo vegetativo de la planta y, de este modo, su velocidad de crecimiento y el porte de la planta.

La distribución de la materia seca (fotoasimilados fundamentalmente) entre los distintos sumideros se denomina **partición**, parámetro de considerable importancia en la determinación de la productividad de las especies cultivadas. La mayor productividad de los cultivos más modernos se debe a un aumento en la proporción de fotoasimilados acumulados en las partes aprovechables, normalmente los frutos y semillas, más que a un aumento en la fotosíntesis total de la planta, y este efecto es resultado de procesos de selección y mejora desarrollados mediante procedimientos empíricos. La comprensión de la regulación de la partición facilitaría, sin duda, el desarrollo de variedades productivas.

La partición de metabolitos entre los distintos órganos depende, además de los factores de posición y distancia a las fuentes mencionadas anteriormente, de su **fuerza como sumidero**, que es la capacidad para atraer y acumular (o utilizar) metabolitos. No se conoce con precisión la naturaleza de los factores que determinan la fuerza de los sumideros, si bien hay pruebas de la implicación de factores anatómicos y metabólicos. Así, el

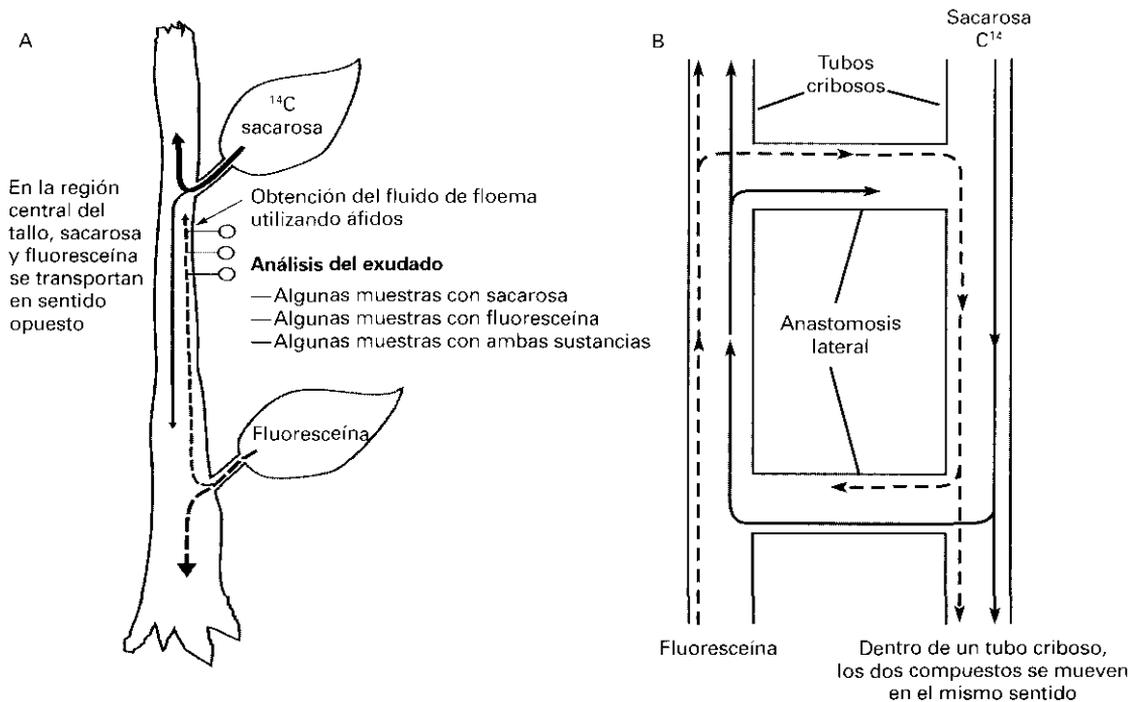


Figura 5-14. A) Dispositivo experimental para demostrar el transporte bidireccional en el floema. B) Explicación para la presencia simultánea de ambas sustancias en el exudado de un elemento criboso, compatible con el transporte unidireccional de todas las sustancias en el mismo.

tamaño final del fruto en el manzano está directamente relacionado con el número de células del fruto, factor éste que se determina durante las fases iniciales de su ontogenia. Por otro lado, mutantes de maíz que no sintetizan almidón en el endospermo tienen granos de menor tamaño que las líneas normales.

La fuerza como sumidero de los órganos varía con el tiempo y es modificada, en ocasiones drásticamente, por la presencia de sumideros alternativos en la planta. Este efecto a veces es debido a un fenómeno de competencia por los metabolitos disponibles, pero también hay mecanismos de regulación de naturaleza hormonal que permiten que un sumidero influya y controle otros sumideros. De este modo se explica la detención del crecimiento de la raíz en algunas especies, como tomate y pepino, cuando se inicia la fructificación.

Los sumideros también influyen en las fuentes, y un aumento en la demanda de fotoasimilados aumenta la fotosíntesis en las hojas y la movilización de las reservas, mientras que la eliminación de los sumideros tiene el efecto contrario. El control de las fuentes por los sumideros implica distintas señales, como cambios en la turgencia, en los niveles de carbohidratos y de hormonas.

La partición de los fotoasimilados en la planta es un proceso regulado de modo complejo por la interacción entre sumideros, de éstos con las fuentes y, probablemente, por la vía de transporte.

5. MECANISMO DE TRANSPORTE

El movimiento de fotoasimilados en la planta comprende tres procesos:

- a) En las fuentes, los azúcares se transportan del lugar de síntesis a las venas menores donde se incorporan a los tubos cribosos, proceso que se denomina **carga del floema**. El transporte de los azúcares hasta el haz conductor es un proceso a corta distancia que, en las hojas, rara vez implica un recorrido superior a tres o cuatro veces el diámetro de las células (varias décimas de milímetro). En algunos órganos, este desplazamiento lateral puede ser de unos pocos centímetros.
- b) Los azúcares y las sustancias incorporadas al tubo criboso son exportados en su lumen hacia los sumideros. Es un transporte a larga distancia, de hasta varios metros en ocasiones.
- c) En los sumideros se produce la **descarga del floema**, proceso inverso al de carga, y las sustancias liberadas se incorporan a las células.

Estos procesos están relacionados mecánicamente, pues la carga y la descarga de los tubos cribosos producen la fuerza para el movimiento del agua a larga distancia que tiene lugar en su lumen.

5.1. La carga de los tubos cribosos puede tener lugar desde el apoplasto o por vía simplástica

El movimiento de la sacarosa en las hojas, desde las células del mesófilo hasta el parénquima floemático, tiene lugar por los plasmodesmos a favor de un gradiente de concentración. El paso de este punto al interior del tubo criboso precisa acoplamiento de energía, ya que la concentración de los azúcares es mucho mayor en el tubo criboso que en las células del mesófilo. Esta incorporación puede tener lugar por los plasmodesmos, siguiendo la denominada **ruta simplástica** o, como alternativa, es posible que la sacarosa sea liberada al apoplasto (paredes celulares), desde donde es incorporada al complejo tubo criboso-célula de compañía (**ruta apoplástica**). Como se señaló en el apartado 2.3, la ruta de incorporación está relacionada con la estructura de las células de compañía, el aislamiento simplástico del complejo tubo criboso-célula de compañía y la naturaleza de los azúcares transportados.

5.1.1. La carga apoplástica implica dos procesos de transporte a través de membranas

En la carga del floema por la ruta apoplástica, la molécula de sacarosa ha de atravesar el plasmalema en dos ocasiones: al ser liberada al apoplasto y, de nuevo, al incorporarse al complejo tubo criboso-célula de compañía (Fig. 5-15).

No se conoce con precisión el lugar ni el modo de liberación de la sacarosa al apoplasto. Por consideraciones anatómicas, es probable que tenga lugar en la inmediata vecindad de los tubos cribosos, desde las células de la vaina o del parénquima floemático, mediante un proceso de difusión facilitada estimulado por la presencia de K^+ en concentraciones relativamente bajas. Desde el apoplasto, la sacarosa se incorpora al complejo tubo criboso-célula de compañía mediante un cotransporte con protones. En este proceso, el movimiento de protones a favor de su gradiente de potencial químico proporciona la energía para el movimiento de sacarosa contra su gradiente de concentración (al ser una molécula sin carga, el gradiente de potencial químico viene dado por el gradiente de concentración).

Diversas observaciones experimentales prueban que éste es el mecanismo probable de carga en especies como *Vicia faba*, *Beta vulgaris* y *Zea mays*, en las que el complejo tubo criboso-célula de compañía no posee conexiones simplásticas y transporta sacarosa. En estas especies:

- a) Se encuentra sacarosa en el apoplasto de las hojas.
- b) Cuando se añade sacarosa marcada al apoplasto de las hojas, este azúcar se incorpora a los tubos

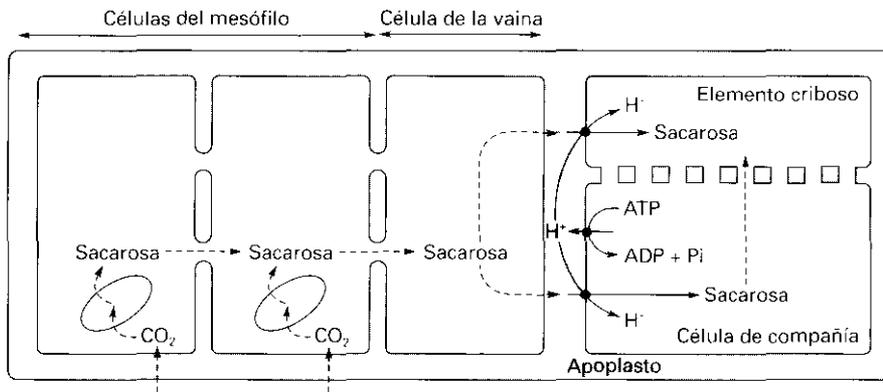


Figura 5-15. Modelo del mecanismo de carga apoplástica del floema. La sacarosa se difunde (línea de trazos) por el simplasto desde el mesófilo hasta las células de la vaina, donde se libera al apoplasto. De allí, es incorporada al elemento criboso y la célula de compañía en contra de su gradiente de concentración mediante un cotransporte con protones. El gradiente de protones necesario es producido por una bomba de protones (ATP-asa de membrana).

cribosos y se exporta desde las hojas de modo similar a la sacarosa endógena.

- c) La aplicación de ácido paracloromercuribenzenosulfónico (PCMBs), reactivo «no permeante» (y que, por tanto, no se incorpora al citoplasma) que bloquea el transporte de sacarosa a través de las membranas, inhibe el transporte desde las hojas tanto de la sacarosa endógena como de la aplicada exógenamente (Fig. 5-16).

Este comportamiento es compatible con la existencia de una etapa apoplástica en la carga del floema.

5.1.2. En plantas con células intermediarias la carga es probablemente simplástica

En especies con células intermediarias como *Coleus blumei*, *Ipomea tricolor* y *Cucurbita pepo*, la incorporación de los fotoasimilados en las venas menores y la exportación desde las hojas es insensible a la aplicación del inhibidor PCMBs (véase Fig. 5-16), lo que indica que los azúcares producidos en la fotosíntesis no se incorporan al tubo criboso desde el apoplasto. Como en estas especies las células intermediarias presentan numerosas conexiones citoplasmáticas con las células de la vaina, se supone que esta incorporación tendría lugar por los plasmodesmos en el simplasto.

No se conoce con certeza cómo se produce la incorporación de los azúcares en los tubos cribosos de estas plantas. En ellos se encuentra, junto a sacarosa, una elevada proporción de azúcares de la serie de rafinosa. Se cree que la compartimentación de la síntesis de estas sustancias podría aportar energía para la carga de los azúcares en los tubos cribosos con una concentración mayor que la que presentan en las células del mesófilo. De acuerdo con el esquema de la Figura 5-17, la sacarosa, sintetizada en el mesófilo, se desplazaría por los plasmodesmos a favor de gradiente hasta las células intermediarias. En éstas, se utilizaría en la síntesis de rafi-

nosa, estaquiosa y otros azúcares, de mayor peso molecular, que pasarían por los plasmodesmos al tubo criboso pero no podrían retornar al mesófilo, lo que requeriría que el límite de exclusión de los plasmodesmos entre las células de la vaina y las células intermediarias fuera inferior al valor normal (el límite de exclusión de los plasmodesmos es normalmente del orden de 1000

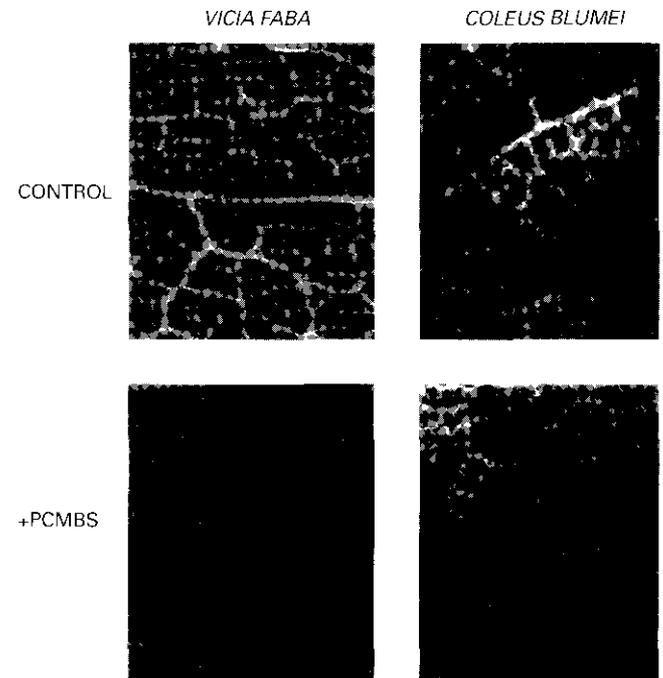


Figura 5-16. Efecto de la infiltración con PCMBs en la acumulación de fotoasimilados en las venas menores de *Vicia faba* y de *Coleus blumei*. Autorradiografías realizadas a los 10 min (*Vicia*) y 20 min (*Coleus*) desde la presentación con $^{14}\text{CO}_2$. La acumulación en las venas menores, que provoca las regiones blancas en la autorradiografía, es inhibida por PCMBs en *Vicia* (carga apoplástica) pero no en *Coleus* (carga simplástica). Reproducido de Bourquin, S. *et al.*, *Plant Physiol*, 92:97-102, 1990 y Turgeon, R. y Gowan, E., *Plant Physiol*, 94:1244-1249, 1990.

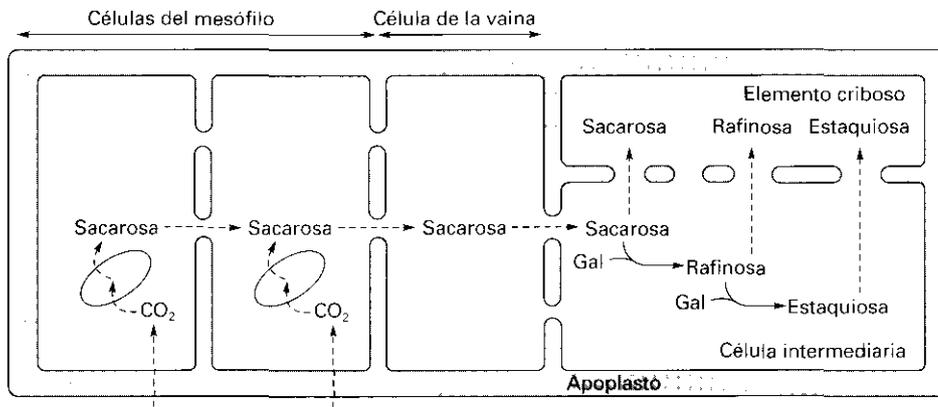


Figura 5-17. Modelo del mecanismo de carga simplástica del floema. La sacarosa se mueve por difusión (línea de trazos) hasta la célula intermediaria, donde se utiliza en la síntesis de rafinosa, estaquiosa, etc., manteniéndose de este modo el gradiente de concentración necesario para su movimiento. Los azúcares sintetizados (y también sacarosa) pasan al elemento criboso, pero no difunden hacia la vaina porque el canal de estos plasmodesmos es demasiado estrecho.

Da: el peso molecular de rafinosa y estaquiosa es, respectivamente, 504 y 666 Da).

Según este esquema, que en varios aspectos no ha sido confirmado experimentalmente, la síntesis de oligosacáridos mantendría el gradiente de difusión necesario para el transporte de sacarosa y otros precursores. El mecanismo de trampa molecular descrito provocaría la acumulación de azúcares y generaría la turgencia necesaria para el transporte en el tubo criboso.

5.2. No hay un mecanismo de descarga único

Los fotoasimilados transportados en los tubos cribosos se descargan en los sumideros, donde se incorporan en las células. Los sumideros son de naturaleza muy variada, pues incluyen órganos vegetativos en crecimiento (ápices del tallo y raíz; hojas en desarrollo), órganos de almacenamiento y reproductivos (frutos y semillas). Esta variabilidad funcional se acompaña de diferencias marcadas en la estructura de los tejidos en los puntos de descarga y en el grado de conexión plasmodésmica con las células de transporte.

Del mismo modo que en el proceso de carga, estas diferencias estructurales determinan la existencia de distintos mecanismos de descarga (Fig. 5-18).

5.2.1. La descarga en los órganos vegetativos es simplástica

En los órganos vegetativos en crecimiento, el floema primario, en diferenciación continua, presenta numerosas conexiones plasmodésmicas con las células indiferenciadas del procambium y las del parénquima vecinas. La descarga de los fotoasimilados es predominantemente simplástica, moviéndose la sacarosa a favor de un gradiente de concentración mantenido merced a

su utilización en la respiración y la síntesis de componentes estructurales de las células en crecimiento.

Este tipo de descarga se da en el ápice del tallo y la raíz y en la mayor parte de las hojas en desarrollo.

5.2.2. En algunos órganos de reserva la descarga es apoplástica

En el parénquima de reserva del tallo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y la raíz de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), la sacarosa se libera al apoplasto desde el complejo tubo criboso-célula de compañera. En la raíz de remolacha, esta sacarosa se acumula en las células del parénquima, manteniéndose así el gradiente de concentración necesario para su descarga continuada. En el tallo de la caña de azúcar, la sacarosa liberada al apoplasto es hidrolizada por una invertasa de pared, lo que mantiene el gradiente necesario para su descarga. La glucosa y la fructosa se incorporan a las células del parénquima, donde se utilizan en la síntesis de sacarosa. Esta sacarosa, igual que en la raíz de remolacha, se almacena en las vacuolas de estas células.

5.2.3. En las semillas en desarrollo la descarga es simplástica, seguida por una etapa apoplástica

La descarga de los tubos cribosos en los frutos y en las cubiertas seminales tiene lugar en el simplasto. En algunos frutos, los azúcares liberados pueden transportarse por el simplasto varias filas de células, a una distancia de hasta varios centímetros, hasta su acumulación en las vacuolas de tejidos especializados.

La mayor parte de los azúcares descargados en las cubiertas seminales se utiliza en el desarrollo del embrión. Éste no tiene conexiones plasmodésmicas con los tejidos maternos, por lo que los azúcares, después de

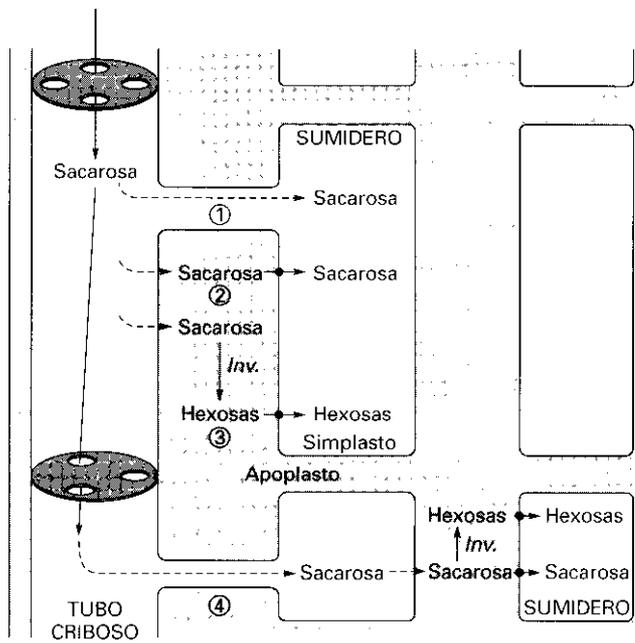


Figura 5-18. Tipos de descarga en los sumideros: 1, descarga simplástica; 2, descarga apoplástica; 3, descarga apoplástica con hidrólisis por la invertasa de pared (Inv.); 4, descarga simplástica seguida por liberación al apoplasto.

un transporte simplástico en las cubiertas, son liberados al apoplasto en la cavidad seminal de donde son tomados por las células del embrión o del endospermo. La eliminación quirúrgica del embrión permite recuperar las sustancias liberadas y estudiar el proceso de liberación.

Aunque en un sentido estricto no se estudia la descarga de los tubos cribosos, esta técnica, denominada de la **cubierta seminal vacía** (*empty ovule technique*), ha permitido determinar con precisión las características del transporte a los embriones en desarrollo. De este modo, se ha probado que, en soja y en haba, la sacarosa se libera al apoplasto mediante un proceso mediado por un transportador y dependiente de energía metabólica. En el maíz, por el contrario, se liberan hexosas por un proceso pasivo. En ambos casos, la incorporación a las células del embrión es un proceso activo.

5.3. El movimiento en los tubos cribosos es un flujo másico provocado por un gradiente de presión

Los solutos se mueven a lo largo del tubo criboso como consecuencia de un flujo másico provocado por diferencias de presión hidrostática (turgencia) entre los extremos del tubo en las fuentes y los sumideros. Los aspectos más salientes del mecanismo de transporte se presentan en la Figura 5-19.

La elevada concentración osmótica en el interior de los tubos cribosos, debida a la acumulación de azúcares, provoca la entrada de agua y, como consecuencia, se produce una reacción elástica de las paredes que

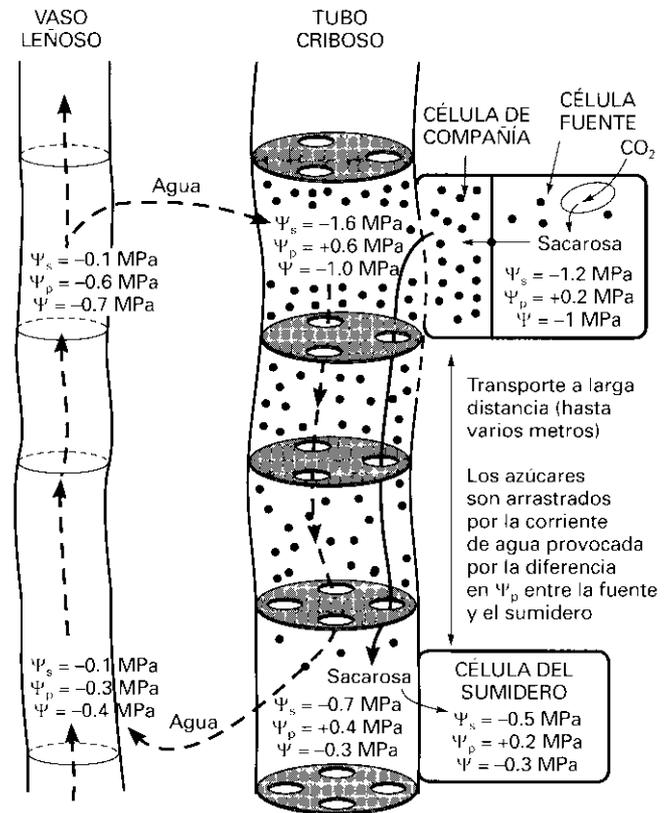


Figura 5-19. Diagrama esquemático de transporte en los tubos cribosos. La acumulación de azúcares (sacarosa) en las fuentes provoca la acumulación de agua por un proceso osmótico y el aumento de la presión de turgencia. La presión disminuye en los sumideros debido a la salida de los azúcares, que se acompaña de la salida de agua. La diferencia de presión provoca el movimiento del agua de la fuente al sumidero, y los azúcares son arrastrados pasivamente por el agua. El agua transportada en los tubos cribosos se recicla en el xilema. Los intercambios entre floema y xilema están regulados por las diferencias en potencial hídrico; en las fuentes, el potencial hídrico es mayor en los vasos leñosos que en los tubos cribosos, mientras que en los sumideros ocurre lo contrario.

ejerce una presión sobre el contenido del tubo criboso. Esta presión es mayor en las fuentes que en los sumideros debido a la mayor concentración de solutos en aquellas, y la diferencia de presión así generada provoca el movimiento del agua y el arrastre de solutos. De este modo, el agua se incorpora a los tubos cribosos en las fuentes y sale de ellos en los sumideros, y el movimiento del agua se mantiene en tanto lo hace la diferencia de presiones que, a su vez, depende de la diferencia de concentración. Ésta es mantenida por la incorporación continuada de solutos en las fuentes y su descarga en los sumideros. La interrupción de la carga o la descarga conduce, en un lapso de tiempo breve, a que se igualen las concentraciones y a la detención del transporte.

El movimiento de los solutos en el tubo criboso es, por tanto, un proceso pasivo que no requiere el aporte directo de energía metabólica. El transporte es «energizado» por la incorporación de azúcares en el tubo criboso.

so; un mismo mecanismo de acumulación proporciona la energía para la incorporación de azúcares contragradiente, y genera la presión que provoca su movimiento longitudinal por un flujo másico.

El agua transportada recircula en el xilema. En las fuentes, el potencial hídrico (véase Capítulo 2) en los tubos cribosos es muy bajo debido a la elevada concentración osmótica, lo que le permite tomar agua del xilema. La salida de solutos en los sumideros aumenta el potencial hídrico en los tubos cribosos, lo que permite ceder agua al xilema. En todo caso, la elevada concentración osmótica en el tubo criboso mantiene en todos los puntos del recorrido una presión hidrostática positiva, que se mantiene incluso cuando la planta tiene un déficit hídrico muy acusado y las hojas están marchitas (Fig. 5-9).

Este mecanismo de transporte, propuesto inicialmente por Munch en 1930, ha sido cuestionado frecuentemente por diversas razones (aún en textos recientes se cita como **hipótesis de Munch**), pero tanto las observaciones experimentales como los análisis teóricos son congruentes con este mecanismo de transporte que hoy es generalmente aceptado. Los cálculos teóricos, a partir de los valores del potencial hídrico y del potencial osmótico, así como las medidas experimentales directas utilizando micromanómetros conectados al estilete de los áfidos, indican que el gradiente de presión en el interior de los tubos cribosos oscila entre 0.02 y 2.0 MPa · m⁻¹. Estos gradientes son suficientes para el movimiento de la solución a una velocidad de entre 25 y 300 cm · h⁻¹, valor encontrado en la mayor parte de las determinaciones experimentales (Cuadro 5-2). Para ello es necesario que los poros de las placas cribosas estén abiertos, como confirman las preparaciones cuando la fijación se realiza adecuadamente (Fig. 5-3). De acuerdo con el modelo, no es posible el movimiento bidireccional en el lumen de un tubo criboso; su existencia, por otro lado, no ha sido probada en ningún caso de modo inequívoco. Todos los solutos se mueven a la misma velocidad en el sentido marcado por el gradiente de concentraciones, determinado fundamentalmente por los azúcares.

6. LONGEVIDAD E INACTIVACIÓN DE LOS TUBOS CRIBOSOS

6.1. La longevidad de los tubos cribosos oscila de unos pocos días a varios años

En la mayor parte de las plantas, la vida de los tubos cribosos es muy corta; los elementos del protofloema son funcionales unos días o unas pocas semanas, mientras que los del metafloema y el floema secundario lo son durante unos pocos meses. La detención del transporte en el tubo criboso se acompaña de la incorporación de calosa, la desaparición del plasmalema y del contenido citoplásmico, y finalmente, las paredes celulares son aplastadas como consecuencia de las presio-

Cuadro 5-2. Velocidades determinadas experimentalmente para el transporte de solutos en el floema. (Extractado de datos recopilados por Crafts y Crisp, 1971)

Especie	Velocidad (cm · h ⁻¹)
<i>Salix</i> sp.	1.5-100
<i>Glycine max.</i>	17-7200*
<i>Cucurbita pepo</i>	30-88
<i>Gossypium hirsutum</i>	35-40
<i>Heracleum mantegazzianum</i>	35-70
<i>Triticum aestivum</i> (hoja)	39-57
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	48-60
<i>Beta vulgaris</i>	50-135
<i>Phaseolus vulgaris</i>	60-80
<i>Saccharum officinarum</i>	60-360
<i>Triticum aestivum</i> (tallo)	87-190
<i>Cucurbita</i> sp.	88-300

* La cifra de 7200 cm · h⁻¹ no corresponde probablemente a transporte en el floema.

nes ejercidas por el crecimiento. En las plantas perennes, el transporte se mantiene por la diferenciación continua de nuevos tubos cribosos debido a la actividad del cambium. Esta renovación continua de los elementos conductores impide, por otro lado, la reducción progresiva de la capacidad del sistema de transporte que se produciría si aquélla no tuviera lugar, ya que estas células son incapaces de repararse y cualquier agresión a las mismas determina su muerte y la inactivación funcional de la región del tubo criboso afectada.

En algunas especies, no obstante, los tubos cribosos permanecen funcionales durante varios años. Ejemplos de longevidad prolongada se encuentran en el floema secundario de algunas gimnospermas y dicotiledóneas, como *Vitis* y *Tilia*. En *Vitis*, al cesar el transporte en el otoño, las placas cribosas se cubren de calosa, que se moviliza al principio de la primavera al reanudarse el transporte.

Notable al respecto es el caso de algunas palmas, en que los tubos cribosos permanecen funcionales durante decenas de años. Debido a la ausencia de actividad del cambium no hay sustitución de los elementos conductores en estas plantas, y cualquier agresión resulta en una inactivación irreversible de los elementos afectados. Esta situación es compensada por el elevado número de elementos conductores y su distribución por toda la sección del tallo. Estos elementos están profundamente interconectados, por lo que en caso de una lesión local, el transporte se deriva hacia los elementos más próximos, bordeando la región lesionada.

6.2. La inactivación de los tubos cribosos reduce las pérdidas cuando hay una lesión

El contenido de los tubos cribosos se encuentra sometido a presión, por lo que cualquier lesión provoca extra-

vasación. Si ésta fuera prolongada, representaría una pérdida insoportable para la planta, pero con la excepción de algunos casos notables, cesa normalmente al cabo de unos pocos minutos. Aun en muchas especies de dicotiledóneas, la exudación es inapreciable, por lo que no es posible obtener fluido del floema por este procedimiento.

La detención de la exudación se debe a la existencia de un mecanismo muy eficaz de **taponamiento** de las placas cribosas, que dificulta gradualmente y al final imposibilita el transporte a través de las más próximas a la lesión. Dos factores contribuyen al taponamiento de los poros. Inicialmente, la **proteína floemática** se moviliza como consecuencia del flujo asociado a la liberación instantánea de la presión en la lesión, desplazándose hacia la misma y acumulándose en el lumen y alrededor de los poros. Ello es seguido, en ocasiones de inmediato, por el **depósito de calosa**, que contribuye al sellado definitivo y permanente de las placas cribosas.

Como la acumulación de proteína floemática en los poros depende del aumento brusco de flujo provocado por la liberación de presión, resulta comprensible que este mecanismo de taponamiento no sea desencadenado por los áfidos, ya que éstos apenas alteran el flujo en el tubo criboso. Tampoco se deposita en este caso calosa, lo que permite obtener exudado de los estiletes durante varios días. Estas observaciones parecen indicar que el depósito de calosa es desencadenado por la liberación de la presión.

RESUMEN

El floema es un sistema conductor continuo, fuertemente interconectado, constituido por células vivas, que se extiende por todos los órganos de la planta y hasta unas pocas células de distancia del extremo del ápice del tallo y de la raíz. En el floema de las angiospermas, el canal de transporte es el **tubo criboso**, serie longitudinal de células (elementos de los tubos) con las paredes terminales modificadas en forma de placas cribosas, con perforaciones de un diámetro considerablemente mayor que los plasmodesmos. En las gimnospermas, los elementos conductores son las **células cribosas**. A diferencia de los tubos cribosos, no están alineadas en filas longitudinales, y están interconectadas mediante áreas cribosas ubicadas normalmente en las paredes laterales.

El transporte tiene lugar de las zonas productoras de carbohidratos (fuentes) a las zonas de acumulación (sumideros). La incorporación en la fuente implica el transporte lateral (desde los cloroplastos de la hojas) hasta el haz vascular, y su ingreso en las células o tubos cribosos mediante un proceso activo y selectivo. La acumulación de solutos en el interior del tubo criboso provoca el descenso del potencial hídrico y la entrada pasiva de agua, que dilata las paredes generándose así una presión que impulsa la solución. El contenido del

tubo criboso se mueve a lo largo del mismo por un proceso de flujo másico (movimiento de la solución) a favor de un gradiente de presión generado por diferencias de concentración. La descarga de los solutos en los sumideros mantiene este gradiente de concentración y determina la dirección del transporte en la planta.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. ¿Qué características determinan que un órgano se comporte como fuente o como sumidero?
2. El fluido de floema se mueve en el lumen de los tubos cribosos impulsado por la presión generada en las fuentes, de modo similar a como lo hace el agua en las tuberías de nuestras casas. Para que suba hasta las viviendas, es necesario aplicar energía mediante el uso de bombas que generan la presión necesaria. ¿Cómo se aplica la energía en el caso del transporte en el floema? (considere por separado la situación en los procesos de carga apoplástica y simplástica).
3. En el caso de que se produzca una reducción transitoria en el contenido en azúcares de un órgano que actúa como fuente (p. ej., al sombrear una hoja adulta), ¿se convierte en sumidero?
4. Un órgano que exporta carbohidratos y, por tanto, se comporta como fuente, ¿exporta también otras sustancias (p. ej., elementos minerales)?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Baker, D. A., Milburn, J. A. (eds.): *Transport of Photoassimilates*. Longman, Essex, 1989.
2. Behnke, H. D., Sjolund, R. E. (eds.): *Sieve Elements. Comparative Structure, Induction and Development*. Springer Verlag, Berlín, 1990.
3. Crafts, A. S., y Crisp, C. E.: *Phloem Transport in Plants*. W. H. Freeman, San Francisco, California, 1971.
4. Giaquinta, R. T.: «Phloem loading of sucrose». *Ann Rev Plant Physiol*, 34:347-387, 1983.
5. Guardiola, J. L., y García Luis, A.: *Fisiología Vegetal I: Nutrición y Transporte*, pp. 295-350. Editorial Síntesis, Madrid, 1990.
6. Guardiola, J. L., y García Luis, A.: «Transporte de azúcares y otros asimilados». En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.), pp. 149-171. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.
7. Hall J. L., Baker, D. A., Oparika, K. L.: «Transport of photoassimilates». *J Exp Botany* (special issue), 47:1119-1333, 1996.
8. Patrick, J. W.: «Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport». *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48:191-222, 1997.
9. Taiz, L., y Zeiger, E.: *Plant Physiology* (2nd ed.), pp. 251-285. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Mass., 1998.
10. Van-Bel A. J. E.: «Strategies of phloem loading». *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44:253-281, 1993.
11. Zamski, E., y Schaffer, A. A.: *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops. Source-sink Relationships*. Marcel Dekker, Nueva York, 1996.

INTRODUCCIÓN A LA NUTRICIÓN MINERAL DE LAS PLANTAS. LOS ELEMENTOS MINERALES

Ildefonso Bonilla

1. Introducción. 2. Soluciones nutritivas. 3. Elementos esenciales. 4. Elementos beneficiosos. 5. Otros elementos.

1. INTRODUCCIÓN

Las necesidades nutricionales de las plantas se estudian de forma separada en dos grandes grupos: nutrientes orgánicos e inorgánicos. Los primeros representan entre el 90 y 95 % del peso seco de las plantas y están constituidos por los elementos carbono, oxígeno e hidrógeno obtenidos a partir del CO₂ de la atmósfera (véase Capítulo 11) y del agua del suelo (véase Capítulo 4). El restante 5-10 %, constituye la denominada fracción mineral y es el objetivo preferente de estudio de este capítulo y de los dos siguientes, en los que destacaremos, en primer lugar, el papel de estos elementos minerales en el metabolismo de las plantas y la razón de su esencialidad (Capítulo 6); su absorción, asimilación y transporte (Capítulo 7); y, por último, su relación con la producción agrícola, incluyendo los síntomas y el diagnóstico de las alteraciones nutricionales (Capítulo 8). Evidentemente, el interés práctico por la nutrición mineral de las plantas está íntimamente relacionado con este último tema y, desde mediados del siglo pasado, ha dirigido los estudios sobre el mismo, sentando las bases de la nutrición mineral de las plantas.

El efecto benéfico que produce sobre el crecimiento de las plantas la adición al suelo de elementos minerales, como cenizas de plantas o cal, así como el efecto tóxico que productos como la sal ejercen sobre los mismos cultivos son aspectos conocidos en la agricultura desde hace más de 2000 años. Sin embargo, hasta hace 150 años, todavía era materia de controversia científica definir si los elementos minerales cumplían una función de nutriente en el crecimiento de las plantas. A finales del siglo XVIII, De Saussure (1767-1845), que estudió tanto la fotosíntesis como la absorción de nutrientes, introdujo nuevas técnicas y métodos muy cuidadosos que le convirtieron en uno de los pioneros en el análisis

elemental de plantas e introductor de la idea de que algunos, pero no necesariamente todos los elementos, pueden ser indispensables. Surge así el concepto de **elemento esencial** para el crecimiento de las plantas.

En la misma época, S. Sprengel (1787-1859) en Alemania y J. B. Boussingault en Francia enunciaron, el primero, que un suelo puede ser improductivo desde el punto de vista agrícola por ausencia exclusiva de un elemento esencial, convirtiéndose así en el precursor de la ley del mínimo; el segundo, por su parte, estudió la relación entre los efectos de fertilizar los suelos, la absorción de nutrientes y el rendimiento de los cultivos. Boussingault fue, además, el descubridor de que las legumbres tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, hecho posteriormente avalado por la identificación de las bacterias fijadoras en los nódulos de las raíces de estas plantas (véanse Capítulos 8 y 16). Es sólo a partir de la mitad del siglo XIX que comienza a configurarse una visión armónica de los problemas nutricionales de las plantas. Surgen figuras como Justus von Liebig (1803-1873), que enuncia nuevamente la ley del mínimo de manera que muchos le atribuyen esta ley, y J. Sachs, famoso botánico alemán que, en 1880, demostró por primera vez que las plantas podían crecer y desarrollarse en soluciones nutritivas totalmente carentes de suelo, lo que determinaría toda una forma de investigación, aún hoy vigente, en el estudio de los requerimientos de nutrientes: los cultivos hidropónicos. Sin embargo, el establecimiento de la nutrición mineral de las plantas como disciplina científica es principalmente el resultado del trabajo de recopilación y armonización de von Liebig, que reunió toda la información existente en su época de forma estructurada, siendo clave también su contribución a la eliminación definitiva de la teoría aristotélica del humus (1848). Este hecho condujo a un rápido aumento en el uso de fertilizantes

minerales. Al final del siglo XIX, especialmente en Europa, grandes cantidades de potasa, superfosfato y, posteriormente, nitrógeno inorgánico fueron usadas en agricultura y en horticultura para mejorar el crecimiento y la productividad de los cultivos.

Las conclusiones de Liebig fueron que los elementos minerales tales como N, P, K, Ca, Mg, Si, Na y Fe eran totalmente esenciales para el crecimiento de las plantas; sin embargo, se llegaba a dicha conclusión más por la observación y especulación que por la precisión de los experimentos realizados. El hecho de que la «teoría de los elementos minerales» estuviese basada en estos defectuosos cimientos fue una de las razones para el gran número de estudios acometidos a finales del siglo diecinueve. A partir de estas y otras extensas investigaciones sobre composición mineral de diferentes especies de plantas crecidas en diferentes suelos, se llegó a la conclusión, a principios del siglo XX, de que **ni la presencia ni la concentración de un elemento mineral son criterios de esencialidad**. Las plantas tienen una capacidad limitada para la absorción selectiva de aquellos minerales que no son necesarios para su crecimiento y que pueden llegar a ser tóxicos. En consecuencia, la composición mineral de los diferentes suelos en que crecen las plantas no sirve para establecer si un elemento mineral es esencial o no. Una vez reconocido esto, se realizaron experimentos en agua y arena con omisión de determinados elementos minerales. Mediante técnicas sencillas fueron posibles una caracterización más precisa de la esencialidad de los elementos minerales y una mejor comprensión de su papel en el metabolismo de las plantas.

El avance en estas investigaciones estuvo y está, estrechamente relacionado con el desarrollo de la química analítica, particularmente con la purificación de los reactivos químicos y de los métodos de medida. Esta relación se refleja fielmente en la cronología con que se descubrió la esencialidad de los distintos micronutrientes a lo largo de la primera mitad del siglo XX, en comparación con el estudio aislado del Fe en el siglo anterior.

El término **elemento mineral esencial** (que también denominaremos en este capítulo **nutriente mineral**, aunque más estrictamente un nutriente es la forma química del elemento mineral esencial en que es disponible para la planta u organismo vegetal) fue propuesto por Arnon y Stout (1934). Estos investigadores defienden que para que un elemento pueda ser considerado esencial debe cumplir estos tres criterios:

1. Una planta será incapaz de completar su ciclo vital en ausencia del elemento mineral considerado.
2. La función que realice dicho elemento no podrá ser desempeñada por otro mineral de reemplazo o de sustitución.
3. El elemento deberá estar directamente implicado en el metabolismo —por ejemplo, como componente de una molécula esencial de la planta—, o deberá ser requerido en una fase metabólica precisa, tal como una reacción enzimática.

De acuerdo con esta estricta definición, aquellos elementos minerales que compensen los efectos tóxicos de otros elementos o aquéllos que, simplemente, reemplacen a nutrientes minerales en algunas de sus funciones específicas menores, tales como el mantenimiento de la presión osmótica, no son esenciales, pero pueden ser descritos como **elementos beneficiosos** (véase apartado 4).

Todavía resulta difícil generalizar qué elementos son esenciales para el crecimiento normal de las plantas. Esto es particularmente obvio cuando comparamos las necesidades de plantas superiores y el conjunto de otros organismos fotosintéticos, como las algas, o no fotosintéticos, como los hongos. Para las plantas superiores está bien definida la necesidad de 17 elementos minerales, aunque la esencialidad del níquel se restringe a un número limitado de plantas. También el sodio y el silicio, muy abundantes en la biosfera, se comportan como esenciales para algunas especies de plantas (Cuadro 6-1).

Dadas las continuas mejoras en las técnicas analíticas y en la purificación de compuestos químicos, esta lista podría muy bien extenderse en un futuro e incluir elementos minerales hoy no reconocidos como esenciales, pero que podrían serlo en muy bajas concentraciones en las plantas, como es el caso de los **micronutrientes**. La mayoría de estos micronutrientes corresponde a constituyentes enzimáticos y, en consecuencia, sólo son necesarios en muy pequeñas cantidades. En contraste, los denominados **macronutrientes** son elementos constituyentes de biomoléculas estructurales, tales como proteínas, lípidos o carbohidratos, o actúan como osmolitos. Estas diferencias en su función quedan reflejadas en las distintas concentraciones medias que estos nutrientes presentan en el análisis de mineralización de un determinado vegetal (Cuadro 6-2) para conseguir su crecimiento adecuado (véase Capítulo 8). Tales valores pueden variar considerablemente dependiendo de la especie, la edad de la planta y la concentración mineral de otros elementos (Cuadro 8-2).

2. SOLUCIONES NUTRITIVAS

Establecida la posibilidad de utilizar **soluciones nutritivas** sencillas a mediados del siglo XIX, J. Sachs diseñó una solución acuosa muy simple, constituida por 6 sales inorgánicas (Cuadro 6-3), que permitiría a las plantas crecer y madurar en ausencia de suelo. Variaciones sobre este sistema han dado lugar a los **cultivos hidropónicos**, herramienta principal a la hora de establecer la esencialidad de los nutrientes. Por otra parte, la gran pureza que en estos momentos puede conseguirse en la síntesis de sales inorgánicas, con una bajísima concentración de impurezas, hace que el control sobre la composición de soluciones de dichas sales sea muy preciso. Hace un siglo, estas impurezas bastaban para cubrir las necesidades de microelementos y dificultaba enormemente el estudio de la nutrición mineral. Las soluciones

Cuadro 6-1. Elementos esenciales y beneficiosos para plantas, algas y hongos

Clasificación	Elementos	Plantas superiores	Algas y hongos
Macroelementos esenciales o macronutrientes	C, O, H, N, P, S, K, Mg, Ca	+	+ Excepto Ca para los hongos
Microelementos esenciales o micronutrientes	Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl, Ni	+	+ Excepto B para los hongos y las algas, con la excepción de las diatomeas
Elementos beneficiosos	Na, Si, Co, I, V, ...	±	±

Adaptado de Marschner (1995).

de Hoagland y Arnon (1950) y de Hewitt (1966) marcaron un hito en la investigación de este campo (Cuadro 6-4).

Actualmente, lo más habitual es hacer crecer las plantas sobre un sustrato normalmente inerte, del tipo arena de cuarzo, vermiculita o perlita, que no aporta nutrientes a la planta y que sirve como soporte físico de la misma. En los cultivos de hidroponía pura no existe ese sustrato; la planta se suele sujetar sobre una superficie plástica agujereada y las raíces, que exhiben un desarrollo muy superior a la situación anterior, se hallan inmersas en la solución nutritiva. En este caso es necesario un dispositivo de aireación, del tipo bomba de pecera, para evitar la anoxia.

Cada vez resultan más utilizadas distintas variaciones de la denominada *nutrient film technique*, técnica de lámina nutritiva, en la cual las raíces están continuamente bañadas por una fina película de solución nutritiva recirculante, que discurre por el fondo de unos canales

plásticos y donde no existen problemas de anoxia, porque el oxígeno disuelto se repone cada vez que se bombea la solución a la cabecera del dispositivo (Fig. 6-1).

La utilización de los cultivos hidropónicos con fines de explotación agrícola y sus modificaciones, como la fertilización en riego por goteo o la fertirrigación en cultivos hortícolas y plantas ornamentales principalmente, serán objeto de estudio en el Capítulo 8.

3. ELEMENTOS ESENCIALES

3.1. Los elementos presentes en mayor cantidad en las plantas se denominan macroelementos o macronutrientes

Tradicionalmente: los elementos esenciales se dividen en dos categorías: 1) los macronutrientes y, 2) los micronutrientes, elementos traza u oligoelementos. Esta

Cuadro 6-2. Elementos esenciales en la mayoría de las plantas, formas de absorción y concentraciones que se consideran adecuadas. Las formas preferentes de absorción se resaltan en negra

Elemento	Símbolo químico	Formas de absorción	Peso atómico	Concentración en peso seco			N.º relativo átomos respecto al Mo
				$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ppm)	%	
Molibdeno	Mo	MoO_4^-	95.95	0.001	0.1	—	1
Níquel	Ni	Ni^{2+}	58.70	~0.001	~0.1	—	1
Cobre	Cu	Cu^+ , Cu^{2+}	63.54	0.10	6	—	100
Cinc	Zn	Zn^{2+}	65.38	0.30	20	—	300
Manganeso	Mn	Mn^{2+}	54.94	1.0	50	—	1000
Hierro	Fe	Fe^{3+} , Fe^{2+}	55.85	2.0	100	—	2000
Boro	B	H_3BO_3	10.82	2.0	20	—	2000
Cloro	Cl	Cl^-	35.46	3.0	100	—	3000
Azufre	S	SO_4^-	32.07	30	—	0.1	30 000
Fósforo	P	H_2PO_4^- , HPO_4^-	30.98	60	—	0.2	60 000
Magnesio	Mg	Mg^{2+}	24.32	80	—	0.2	80 000
Calcio	Ca	Ca^{2+}	40.08	125	—	0.5	125 000
Potasio	K	K^+	39.10	250	—	1.0	250 000
Nitrógeno	N	NO_3^- , NH_4^+	14.01	1000	—	1.5	1 000 000
Oxígeno	O	O_2 , H_2O	16.00	30 000	—	45	30 000 000
Carbono	C	CO_2	12.01	40 000	—	45	40 000 000
Hidrógeno	H	H_2O	1.01	60 000	—	6	60 000 000

Basado en Epstein (1972), Salisbury y Ross (1992) y Marschner (1995).

Cuadro 6-3. Composición de la solución nutritiva de Sachs (1860)

Sales	Fórmula	(mM) concentración aproximada
Nitrato potásico	K NO ₃	9.9
Fosfato cálcico	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.6
Sulfato magnésico	Mg SO ₄ · 7H ₂ O	2.0
Sulfato cálcico	Ca SO ₄	3.7
Cloruro sódico	Na Cl	4.3
Sulfato ferroso	Fe SO ₄	Trazas

distinción no tiene implicación cualitativa ya que todos ellos son igualmente esenciales, sino que refleja, exclusivamente, las concentraciones relativas encontradas en los tejidos o que son requeridas en las soluciones nutritivas. Los seis elementos que estudiaremos a continuación (N, P, K, S, Ca, y Mg) constituyen, junto con H, C y O, la totalidad de macroelementos. En gran parte, pero no de forma exclusiva, están implicados en la estructura de las moléculas, y su nombre hace referencia a que se necesitan en grandes cantidades; su presencia en los tejidos está siempre por encima del 0.1% (30 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco) (Cuadro 6-2). Al contrario de lo que sucede con los micronutrientes, están perfectamente definidos desde mediados del siglo XIX.

Nitrógeno

Después del agua, el nitrógeno es el nutriente más importante en el desarrollo de la planta dada su abundancia en las principales biomoléculas de la materia viva; si a esto añadimos que los suelos suelen ser más deficientes en nitrógeno que en cualquier otro elemento, no resulta extraño que sea, junto con el P y el K, el elemento clave en la nutrición mineral. Las formas iónicas pre-

ferentes de absorción de nitrógeno por la raíz son el nitrato (NO₃⁻) y el amonio (NH₄⁺) (véanse Capítulos 7 y 15). Existe también la posibilidad de conseguir N₂ atmosférico fijado simbióticamente por leguminosas y algunas otras familias de plantas gracias a microorganismos de géneros como *Rhizobium* y *Frankia* (véase Capítulo 16) y también por la absorción de amoniaco (gas) que se introduce en la planta a través de estomas; ambos terminan convirtiéndose en amonio. La asimilación tanto de nitrato como de amonio se estudia ampliamente en el Capítulo 15. No resulta fácil fijar el estado nutricional de las plantas en lo que se refiere al nitrógeno, dado que la presencia del ion nitrato se ve regulada por aspectos como la desnitrificación hasta formas gaseosas de N, la inmovilización microbiana y la lixiviación, mientras que el ion amonio se ve afectado por su volatilización en forma de amoniaco, su absorción por el coloide arcilloso-húmico del suelo y la nitrificación.

La mayor parte del N del suelo se encuentra en la fracción de nitrógeno orgánico, no asimilable por las plantas. De ahí la importancia de los procesos de mineralización del N en el suelo habitualmente controlados por microorganismos, por lo que es muy difícil dictaminar el potencial nutritivo de N en el suelo, aún más si consideramos los procesos mencionados de desnitrifi-

Cuadro 6-4. Composición de la solución de Hoagland y Arnon (1950) modificada ligeramente

Sales	Fórmula	Concentración (mM)	Elementos	Concentración (mg · L ⁻¹)
Nitrato cálcico	Ca (NO ₃) ₂	2.5	Ca	103
Fosfato potásico	KH ₂ PO ₄	0.5	N	105
Nitrato potásico	K NO ₃	2.5	K	118
Sulfato magnésico	Mg SO ₄	1.0	S	33
Sulfato de cinc	Zn SO ₄	0.00039	Mg	25
Sulfato manganoso	Mn SO ₄	0.0046	P	15
Sulfato cúprico	Cu SO ₄	0.00016	Fe	10
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.0234	B	0.25
Ácido molibídico	Mo O ₄ H ₂	0.000051	Mn	0.25
Sequestrene (Fe)	Fe	0.179	Zn	0.025
			Cu	0.01
			Mo	0.0052
			Cl	0.50

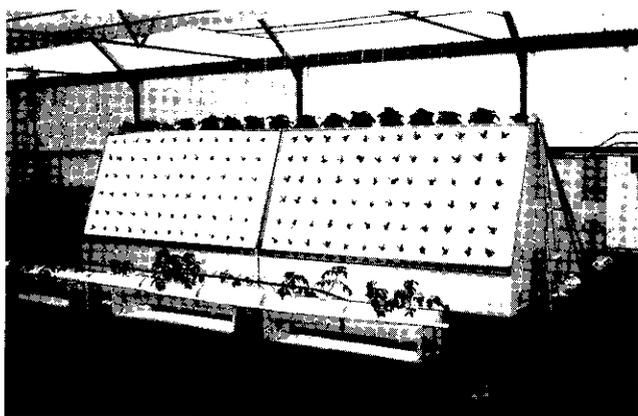


Figura 6-1. Vista general de los invernaderos de Solar Oasis en Tucson (Arizona). En primer término, cultivos crecidos con la técnica de *nutrient film*. En segundo término, cultivos crecidos en solución nutritiva sin soporte inerte (fotografía de Bonilla, 1986).

cación y lixiviación. Esta última determina el enorme impacto ambiental que los nitratos de origen agrícola ejercen en la contaminación de los acuíferos subterráneos.

En la planta, el N se distribuye en tres grupos: más del 50 % se halla en compuestos de elevado peso molecular (proteínas y ácidos nucleicos); el resto, en forma de N orgánico soluble (aminoácidos, amidas, aminoras...) y N inorgánico (principalmente iones nitrato y amonio). Su contenido en el total del peso seco de la planta oscila entre el 1.5 y el 5 %.

Los **síntomas de deficiencia** (véase Capítulo 8) de N son los característicos de un elemento muy móvil: clorosis en las hojas adultas que, con frecuencia, caen de la planta antes de ser necróticas (Fig. 6-2). Algunas plantas, como tomate y ciertas variedades de maíz, muestran una coloración purpúrea causada por la acumulación de pigmentos antocianos.



Figura 6-2. Impacto de la deficiencia de nitrógeno en el cultivo de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*). El N junto con el K y el B son los principales factores nutricionales limitantes del cultivo.

Un exceso de nitrógeno se manifiesta por un exceso de follaje con un rendimiento pobre en frutos, como sucede en cultivos tan diferentes como los de cítricos y patatas. En general, existe un desarrollo radicular mínimo frente a un desarrollo foliar grande, con la consiguiente elevación en la proporción parte aérea-raíz, justo lo inverso de lo que sucede en condiciones de deficiencia (Fig. 6-2). También, en algunos cultivos, el exceso de nitrógeno determina un retardo en la floración y formación de semillas.

Fósforo

El fósforo es disponible para la planta como ion fosfato y se absorbe preferentemente como $H_2PO_4^-$ en suelos con un pH inferior a 7 y como anión divalente HPO_4^{2-} en suelos básicos, con pH por encima de 7. En contraste con el nitrógeno, el fósforo no se encuentra en forma reducida en las plantas, sino que permanece como fosfato ya sea en forma libre o como un compuesto orgánico, principalmente como éster fosfórico con grupos hidroxilos, o formando enlaces anhídridos ricos en energía, como es el caso del ATP o del ADP. Desempeña, por tanto, un papel clave en la fotosíntesis, la respiración y en todo el metabolismo energético.

Asimismo, el fósforo tiene un papel estructural importante en muchas moléculas y estructuras celulares, como en el caso de los enlaces diéster presentes en los ácidos nucleicos y en los fosfolípidos, los cuales son fundamentales en las estructuras membranosas (véase Capítulo 1). Con todo, una parte importante del fosfato en la planta se encuentra en forma iónica libre: el 75 % en las vacuolas y el 25 % restante, en la matriz y los orgánulos citoplasmáticos, en equilibrio con los ciclos metabólicos.

El fosfato se redistribuye fácilmente en la mayoría de las plantas de un órgano a otro, acumulándose en las hojas jóvenes y en las flores y semillas en desarrollo: en consecuencia, los síntomas de deficiencia se presentan primero en las hojas adultas. Las plantas deficientes presentan enanismo y, en contraste con las deficientes en N, un color verde intenso, tomando un color parduzco a medida que mueren. La madurez se ve retardada en comparación con la de las plantas control aunque en muchas especies, es la relación del P con el N la que regula la maduración: el exceso de nitrógeno la retarda y la abundancia de fósforo la acelera (Fig. 6-3).

El fósforo en exceso determina, al contrario que en el caso del nitrógeno, un gran desarrollo de las raíces en relación con la parte aérea, lo que determina una baja proporción parte aérea-raíz.

Un factor muy importante que facilita la absorción de fósforo en condiciones naturales es la presencia de micorrizas, que son asociaciones simbióticas entre hongos del suelo y las raíces de las plantas (véanse Capítulos 7 y 8 para más detalles).

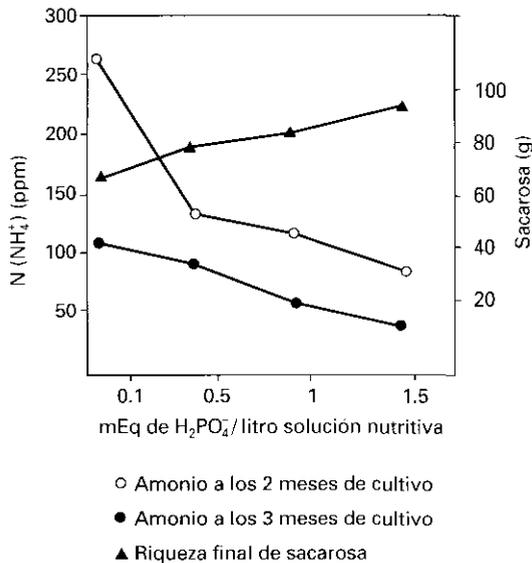


Figura 6-3. La interrelación P y N, observada en varios cultivos, queda aquí reflejada por los niveles de N expresado como NH_4^+ en savia. Existe una acumulación de NH_4^+ en el estado deficiente de P que retrasa la maduración y la riqueza en sacarosa (Bonilla y col., 1980, *Anal. Edaf. Agrobiol.*, XXXIX, 217-237).

Potasio

Junto con el P y el N, constituye el contenido principal de los fertilizantes de máxima comercialización debido a la importancia de estos tres elementos (Fig. 6-4). Su comportamiento, a pesar de su naturaleza catiónica, es muy similar al que presentan el fósforo y el nitrógeno, redistribuyéndose con suma facilidad de los órganos maduros a los juveniles dada su solubilidad y baja afinidad por los ligandos orgánicos, de los que fácilmente se intercambia. Es el catión más abundante en la vacuola y el citoplasma, donde puede alcanzar concentraciones de 100 mM y entre 2000-5000 ppm en el xilema, p. ej., en remolacha azucarera. Desempeña, por tanto, un papel clave en la osmorregulación que tiene lugar en los procesos de apertura y cierre estomáticos (Fig. 6-5, véase Capítulo 3), así como en las nastias y tactismos (véase Capítulo 24).

Por otra parte, el K es activador de más de 50 sistemas enzimáticos, entre los que destacan oxidorreductasas, deshidrogenasas, transferasas, sintetisas y quinasas. Aunque puede ser sustituido en algunos casos, pues sólo es necesario para el cambio conformacional de la apoenzima, dadas las altas concentraciones necesarias, a veces resulta difícil considerar un sustituto *in vivo*.

La deficiencia de K en los cultivos se traduce en una mayor susceptibilidad al ataque de patógenos en la raíz y a una debilidad de los tallos que hace a las plantas especialmente sensibles a la acción del viento, las lluvias, etc., principalmente en el caso de monocotiledóneas. En dicotiledóneas, los primeros síntomas de clorosis aparecen también en hojas adultas que poste-



Figura 6-4. Deficiencia de K en el cultivo de remolacha azucarera. Como puede observarse, el K constituye junto con el N y el P el principal nutriente de los cultivos; por esta razón, estos tres macroelementos están siempre presentes en los fertilizantes.

riormente se hacen necróticas; se retrasa el crecimiento y se producen pérdida de turgencia y marchitamiento, mucho más acusados cuando hay déficit hídrico.

En condiciones de exceso de K se incrementa su consumo, salvo en semillas, y ese consumo de lujo puede interferir en la absorción y disponibilidad fisiológica de Ca y Mg.

Azufre

El azufre se absorbe en forma de anión sulfato (SO_4^{2-}) y, así, se transporta por el xilema. También puede ser absorbido por los estomas de las hojas bajo la forma de dióxido de azufre (SO_2), contaminante atmosférico resultante de la combustión del carbón, la madera y el petróleo. El SO_2 reacciona con el agua en el interior de las células formando bisulfito (HSO_3^-), que desplaza el magnesio de la clorofila y disminuye, en consecuencia, la fotosíntesis. El S como sulfato forma parte de sulfolípidos y heteropolisacáridos y, en forma reducida (reducción que tiene lugar mayoritariamente en los cloroplastos (véase Capítulo 15)), se encuentra en aminoácidos como la cisteína y la metionina. Igualmente, se integra en diversas coenzimas como la tiamina, la biotina y la coenzima A, compuesto clave en la activación de ácidos orgánicos y, por tanto, en los procesos de síntesis y degradación de ácidos grasos y en la respiración celular. Los grupos -SH son clave en multitud de reacciones enzimáticas determinando según su forma, oxidada o reducida, la actividad de las mismas. Finalmente, en los últimos años, una proteínas de bajo peso molecular pero con un elevado número de aminoácidos azufrados (cisteína principalmente), las **fitoquelatinas**, han cobrado un gran interés por formar complejos con metales pesados (Cd, Cu, Pb, ...) constituyéndose en uno de los principales mecanismos de de-

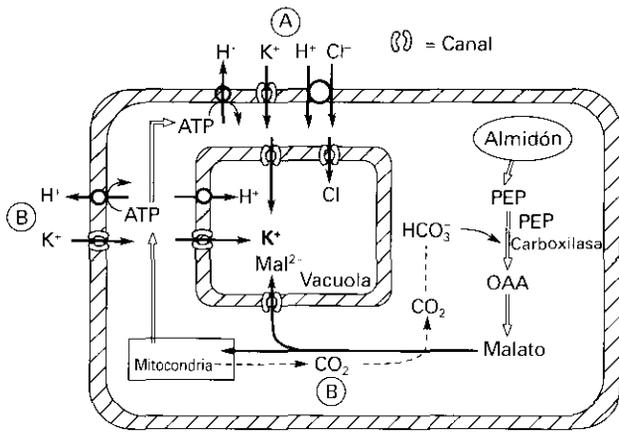


Figura 6-5. El mecanismo de apertura y cierre de los estomas está asociado con una variación de la concentración de K^+ en la vacuola de las células de guarda. Durante la apertura del estoma se han observado incrementos de hasta 0.5 M en la concentración de K^+ . En la figura se reflejan dos modalidades según sea el anión que compensa la carga catiónica del K^+ . A) implica bombas de protones y transporte de K^+ y Cl^- . B) implica transporte de K^+ y malato. PEP: fosfoenolpiruvato; OAA: oxalacetato.

fensa de las plantas frente a estos agentes, tóxicos en su mayoría.

Las deficiencias en azufre son poco habituales dado que la presencia de sulfatos en el suelo resulta suficiente. En caso de producirse, en la planta aparece una clorosis en las hojas muy generalizada, que incluye los haces vasculares. La redistribución desde los tejidos maduros es, en muchas especies, peor que la observada para el fósforo y el potasio, por lo que los síntomas de deficiencia suelen apreciarse en primer lugar en las hojas más jóvenes. Las plantas presentan un menor crecimiento, se hacen rígidas y quebradizas y, a nivel celular, son los cloroplastos los orgánulos más afectados.

El margen de normalidad en contenido de azufre para muchos cultivos se encuentra en un quinceavo del peso total del nitrógeno.

Calcio

El calcio se absorbe como ion divalente, Ca^{2+} ; es abundante en la mayoría de los suelos y rara vez se comporta como un factor limitante, salvo en suelos ácidos con lluvias abundantes donde resulta necesario el aporte de sales cálcicas, principalmente carbonatos, que elevan el pH. Es mucho más móvil en el apoplasto que en el simplasto, por lo que aquellos órganos que reciben el agua principalmente por esta vía pueden presentar problemas en el suministro del catión. En los cultivos hidropónicos, la deficiencia en Ca se caracteriza por un pobre desarrollo radicular. Los síntomas de deficiencia son siempre más evidentes en tejidos jóvenes y zonas meristemáticas de raíces, tallos y hojas. Existen dos razones principales que explican este hecho: por un lado, la

división celular se ve afectada por la deficiencia de calcio y en los tejidos mencionados el índice mitótico es alto; por otro, la lámina media que se forma entre dos células hijas, uno de cuyos principales componentes es el pectato cálcico, puede verse alterada.

Existe un hecho muy curioso respecto al calcio y es que su concentración intracelular es muy baja, del orden de 1 μ molar (μ M), aunque se absorbe en grandes cantidades y su presencia en la planta es similar a la que puede tener el fósforo, el azufre o el magnesio, lo que puede significar hasta el 1 % de materia seca. La mayor parte de Ca se localiza extracelularmente en la pared celular, en los pectatos de la lámina media como hemos indicado y en las membranas (véase Capítulo 1). En el interior de la célula, el calcio se encuentra en las vacuolas donde, dado el pH ácido de las mismas, puede precipitar como sales de oxalato, fosfato, carbonato, sulfato, etc., según las especies. Sin embargo, en el citosol, su concentración sigue siendo muy baja, pues si bien activa algunas enzimas, muchas otras son inhibidas frente a concentraciones de Ca por encima de 1 μ M (Fig. 6-6) (véase también Capítulo 7). Además, las corrientes citoplasmáticas también se ven inhibidas con concentraciones por encima de ese valor, así como la formación de sales de calcio insolubles con ATP y otros fosfatos orgánicos.

El calcio se requiere también para la integridad y funcionalidad de las membranas y, recientemente, se ha visto implicado como segundo mensajero en el funcionamiento de algunas hormonas y en respuestas medioambientales. Como segundo mensajero, está implicado en la fosforilación de algunas proteínas, de manera que el Ca puede desempeñar un importante papel en la actividad y regulación de algunas enzimas (véase Capítulo 18). Su unión reversible a una pequeña proteína citosólica, la **calmodulina**, le permite ejercer una importante función como modulador enzimático y desempeñar un papel fundamental en el mundo de las señales celulares y en el desarrollo vegetal, como ya se ha demostrado en la célula animal.

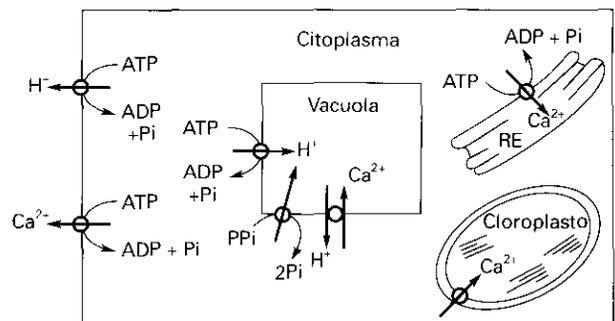


Figura 6-6. Regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} , que se acumula principalmente en la vacuola en forma de oxalato, carbonato, etc., pero también en el retículo endoplasmático (RE) y en el cloroplasto. Concentraciones de Ca^{2+} en el citosol superiores a 1 μ M pueden inhibir la acción de muchas enzimas.

Magnesio

El magnesio no es casi nunca factor limitante para las plantas, salvo en suelos muy ácidos o arenosos. Se absorbe como ion divalente, Mg^{2+} , y se comporta como un elemento muy móvil tanto en la planta como en la célula. Las hojas adultas son las primeras en expresar situaciones de deficiencia, al emigrar el Mg a las hojas más jóvenes. Aquí, la clorosis es muy típica porque se dispone de forma intervenal: por alguna razón, las células del mesófilo próximas a los vasos retienen la clorofila más tiempo. Aproximadamente, el 20% del Mg total de las hojas se encuentra en los cloroplastos, aunque sólo entre el 10% y el 20% se presenta en las moléculas de clorofila (Fig. 6-7). El resto se encuentra localizado en forma iónica soluble en el espacio intratilacoidal y al iluminarse el cloroplasto, pasa al estroma donde activa enzimas tan importantes como la rubisco, la fosfoenol-piruvato carboxilasa y la glutamato sintasa. La asignación fotosintética del carbono y el nitrógeno depende, en gran medida, de la concentración de Mg^{2+} en el cloroplasto. También interviene en el metabolismo energético de la planta al formar complejos con el ATP, ya que las ATPasas utilizan como sustrato los complejos Mg-ATP. Incluso, la propia fosforilación del ATP a partir del ADP necesita Mg^{2+} .

Esa propiedad de establecer uniones tanto iónicas como, especialmente, covalentes —caso de la clorofila— lleva al magnesio a estar presente en procesos claves, como la unión y estabilización de las subunidades del ribosoma y, por tanto, en la biosíntesis de proteínas, e incluso en la transcripción del mensaje genético por la activación de la RNA polimerasa. Por esta razón, un aumento en la proporción de nitrógeno soluble no proteico puede ser un parámetro de diagnóstico químico de la deficiencia de magnesio.

3.2. Los elementos también esenciales pero presentes en cantidades mínimas, se denominan microelementos o micronutrientes

Los ocho elementos esenciales restantes (Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl y Ni) se agrupan bajo la denominación de micronutrientes, elementos traza u oligoelementos. Resultan tan esenciales como cualquier macroelemento y, en consecuencia, deben cumplir los mismos requisitos que satisfacen los macroelementos. Su nombre hace referencia a la baja concentración con la que se encuentran en los tejidos, inferior al 0.1% (menos de $3 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco) (Cuadro 6-2).

A diferencia de lo sucedido con los macroelementos, los micronutrientes no han sido conocidos en su totalidad, con la excepción del Fe, hasta bien entrado el siglo XX. Esto es así porque, dadas las bajas concentraciones requeridas para alcanzar la normalidad, las impurezas de las sales utilizadas habitualmente en la constitución

de las soluciones nutritivas pueden cubrir cumplidamente las necesidades de las plantas y demás organismos fotosintéticos. El desarrollo de las técnicas analíticas ha incrementado, por un lado, la sensibilidad para la detección de elementos en varios órdenes de magnitud y, por otro, la pureza con la que actualmente pueden conseguirse las sales empleadas en las soluciones nutritivas; todo ello puede depararnos sorpresas en el futuro. El último micronutriente aceptado como tal ha sido el Ni en 1987.

Hierro

Entre todos los micronutrientes, el hierro es el requerido en mayor cantidad; de hecho, para algunas plantas se le llega a considerar macronutriente. El hierro puede ser absorbido como Fe^{3+} (Fe III) y más fácilmente, dada su mayor solubilidad, como Fe^{2+} o ion ferroso (Fe II) (véanse Capítulo 7, apartado 8, y Capítulo 8).

Su deficiencia en suelos calizos es muy habitual porque la solubilidad del Fe es muy baja a pH básico. De hecho, fue una de las primeras esencialidades en establecerse por lo frecuente de sus deficiencias y la especificidad de sus síntomas. Las plantas deficientes en Fe se caracterizan por una clorosis intervenal en las hojas jóvenes seguida, en ocasiones, por clorosis en las venas, confiriendo un aspecto amarillento a la totalidad de la hoja. En casos extremos, la hoja puede llegar a ponerse casi blanca, como sucede a veces en los cítricos.

El hierro se acumula en las hojas más antiguas y es relativamente inmóvil en el floema por la formación de óxidos o fosfatos férricos, aunque el tema no está suficientemente claro. Una forma estable y abundante de hierro es la que se acumula en los cloroplastos; cerca del 80% del hierro de las hojas se localiza en estos orgánulos como fitoferritina. La deficiencia de Fe modifica la estructura de los cloroplastos dando lugar a la llamada **clorosis férrica**, uno de los signos más característicos de aquella. Cultivos como los cítricos son especialmente sensibles a esta deficiencia dado el pH básico en el que son habituales y sólo la formación de **quelatos** (complejos orgánicos con hierro, véase Capítulo 8) es capaz de solucionar el problema de la absorción del hierro en estas circunstancias.

La importancia del Fe en la planta, al igual que en los animales, radica en dos importantes funciones:

- Forma parte de los grupos catalíticos de muchas enzimas redox del tipo **hemoproteínas**, como son: citocromos (tanto mitocondriales como cloroplásticos), catalasas, peroxidasas, etc., que presentan un grupo hierro-porfirina como núcleo prostético, el grupo hemo (Fig. 6-7).
- El Fe se encuentra unido a grupos tiólicos de la cisteína en otras proteínas, hierro-azufre, las **sulfofero proteínas**. Estas proteínas son clave en la fotosíntesis, como es el caso de la ferredoxina, la ni-

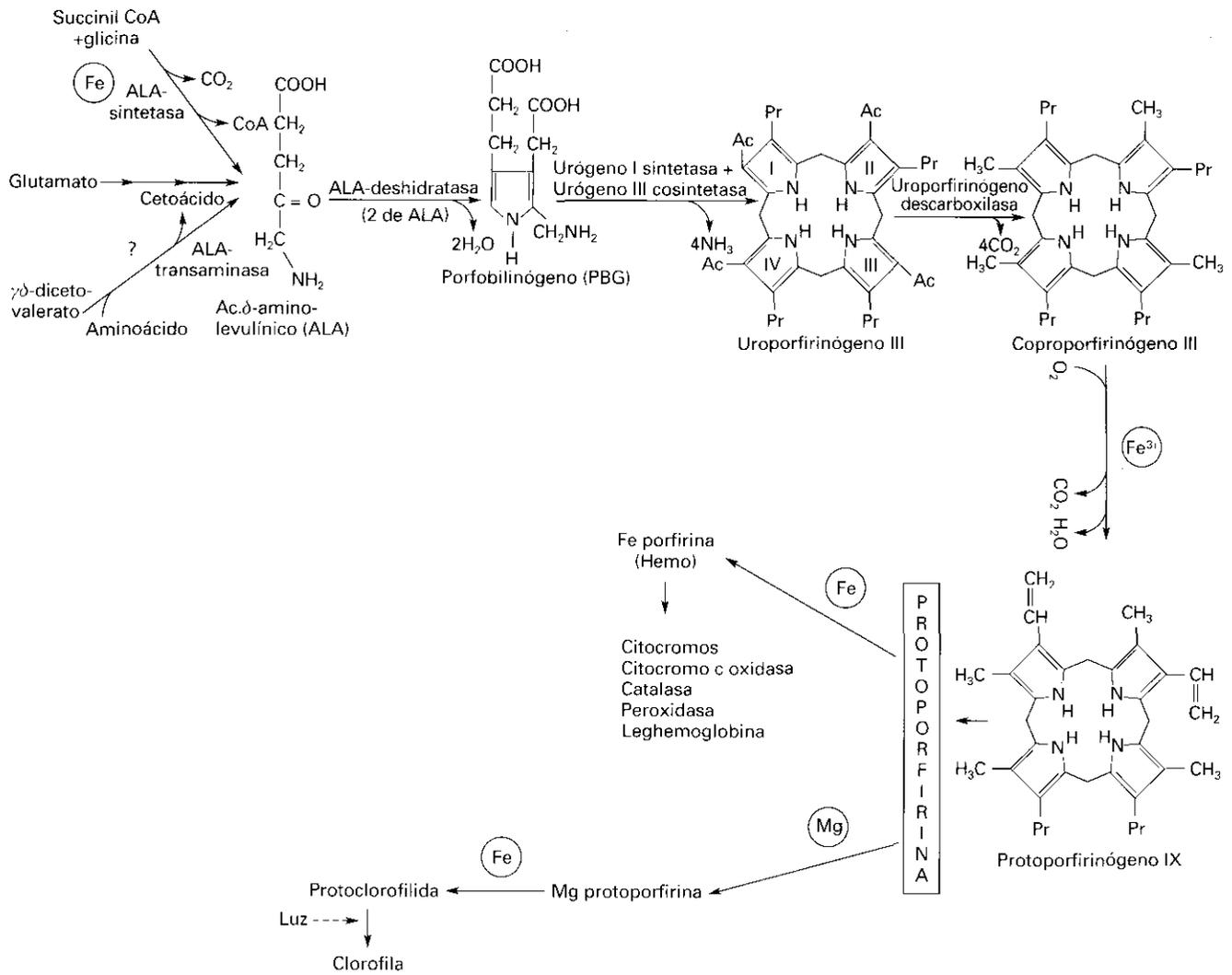


Figura 6-7. Tanto el Fe como el Mg desempeñan un papel clave en la síntesis de la molécula de clorofila. A partir de la protoporfirina encontramos Fe como constituyente del grupo hemo en los sistemas redox, pero no de la clorofila.

trito reductasa y la sulfito reductasa; en la fijación de nitrógeno —caso de la nitrogenasa— y en la respiración. Los estados redox Fe^{3+}/Fe^{2+} explican su presencia en estos sistemas enzimáticos, tanto de un tipo como de otro, al actuar como transportador de electrones en los mismos (Fig. 6-8).

Existe, además, otra razón para la esencialidad del Fe que resulta exclusiva del mundo vegetal, y es su papel en la biosíntesis de la molécula de clorofila, ya que regula la actividad del sistema enzimático encargado de la formación del ácido δ -aminolevulínico (ALA), precursor de las porfirinas, y el paso de protoporfirina-Mg a protoclorofilida (Fig. 6-7).

Manganeso

El manganeso existe en varios estados de oxidación, configurando distintos óxidos en el suelo que resultan insolubles y siendo absorbido, principalmente, como

cación divalente (Mn^{2+}) después de la reducción de estos óxidos en la superficie de las raíces.

El síntoma más significativo de la deficiencia en manganeso es la clorosis intervenal asociada con el desarrollo de pequeñas manchas necróticas. Esta deficiencia puede constituir un factor limitante en suelos ácidos con pH por debajo de 6 y con un alto contenido orgánico.

Con el microscopio electrónico se observa que la deficiencia en manganeso produce, específicamente, una desorganización de las membranas del tilacoide, y también de las membranas del núcleo y de las mitocondrias, aunque de forma no tan acusada en estos dos últimos casos.

Aunque el Mn activa numerosas enzimas, sólo ha podido demostrarse su presencia en dos. La primera es el complejo manganeso-proteína que transporta los electrones desde el agua al fotosistema II, el cual requiere no menos de cuatro átomos de Mn por centro de reacción (véanse Capítulos 9 y 10). Así, por ejemplo, en los heterocistos, células especializadas en la fijación del nitrógeno en las cianobacterias filamentosas, no existe fo-

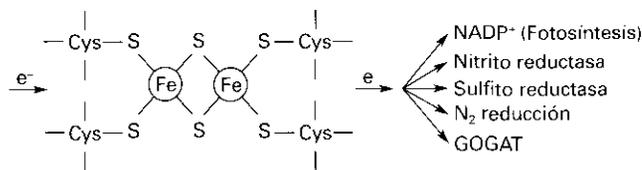


Figura 6-8. La otra forma de presencia del Fe es como constituyente de proteínas sin grupo hemo en donde el Fe está unido a restos de cisteína, caso de numerosas enzimas (proteínas sulfoférricas).

tosistema II ni, en consecuencia, manganeso. En segundo lugar, el manganeso se encuentra formando parte de la Mn-SOD (Mn superóxido dismutasa), una de las isoenzimas de la SOD presente en las mitocondrias y los peroxisomas y, de forma más irregular, en los cloroplastos. Así, por ejemplo, existe en el tabaco pero no se encuentra en el guisante. Junto con otras formas que contienen Fe, Cu o Zn, constituye un conjunto de enzimas implicadas en la defensa de la planta contra la presencia de radicales superóxido O_2^- formados en diversas reacciones enzimáticas (véase Capítulo 30).

El Mn está igualmente implicado como activador de muchas enzimas respiratorias del ciclo de Krebs (descarboxilasas y deshidrogenasas), aunque puede ser reemplazado en ellas —como es el caso de la isocitrato deshidrogenasa— por otros cationes divalentes, principalmente el Mg^{2+} . Asimismo, está implicado en la actividad de la arginasa, enzima clave del ciclo de la urea que escinde la arginina en urea y ornitina, y en la enzima málica dependiente de NAD en plantas C_4 (véase Capítulo 12).

Con todo, las deficiencias de Mn pueden suplirse con Mg^{2+} , y el problema estriba en no superar determinados límites que producirían efectos competitivos con el Fe.

Cobre

Rara vez presentan las plantas deficiencias de Cu debido, principalmente, a la escasa necesidad del mismo y a que está disponible en la mayoría de los suelos. En consecuencia, sólo a través de experimentos con soluciones nutritivas y en condiciones controladas, podemos conocer los resultados de los estados deficientes.

El Cu es absorbido como catión divalente (Cu^{2+}) en suelos aireados o como ion cuproso (Cu^+) en suelos pobres en oxígeno o con alto contenido en agua, como los suelos inundados de los manglares. La forma divalente forma quelatos fácilmente con varios componentes del suelo e igual sucede en soluciones nutritivas, lo que se debe vigilar para evitar estados de toxicidad.

La esencialidad del Cu se explica por su presencia en diversas proteínas y enzimas implicadas en procesos de oxidación/reducción. Dos sistemas clave en este sentido son la **plastocianina**, una proteína cloroplástica involucrada en el transporte electrónico de la fotosíntesis entre el fotosistema II y el fotosistema I (véanse Capítu-

los 9 y 10), y la **enzima citocromo c oxidasa**, una enzima respiratoria que cataliza la transferencia de electrones hasta el oxígeno en las crestas mitocondriales (véase Capítulo 14). Por otra parte, el Cu es componente del complejo enzimático fenolasa, que oxida fenoles, y se relaciona con la biosíntesis de lignina, ya que forma algunos de sus precursores. En este sentido, entre los primeros signos de la deficiencia de Cu están la reducción en la lignificación y una acumulación de fenoles, al igual que sucede en la deficiencia de B.

Cinc

El Zn es absorbido como catión divalente, Zn^{2+} , probablemente, la mayoría de las veces, en forma de quelato. Su disponibilidad es mayor a pH bajo (ácido).

La deficiencia de Zn produce clorosis intervenales fáciles de observar en el maíz, la judía, el sorgo y árboles frutales, lo que se ha relacionado con un papel estabilizador del Zn sobre la molécula de clorofila. Las alteraciones más típicas son la disminución en el crecimiento de las hojas y el acortamiento en la longitud de los entrenudos, especialmente en especies leñosas. Esta reducción del tallo se ha relacionado con la producción de ácido indolacético (AIA), una de las auxinas más habituales (véase Capítulo 19). Hay una clara relación entre los niveles de Zn y la concentración de auxinas que, incluso, llega a disminuir antes de que se manifieste la deficiencia de cinc en la planta. Existen pruebas de su papel en la síntesis del triptófano, aminoácido precursor de la hormona. Por otra parte, el Zn es necesario para la actividad de, al menos, ochenta sistemas enzimáticos (normalmente formando parte de su estructura, aunque no sufre cambios en su estado de oxidación), por ejemplo, la NADH-deshidrogenasa (véase Capítulo 14), la alcohol-deshidrogenasa, que cataliza el paso de acetaldehído a etanol en la fermentación alcohólica, y las cinco anhidrasas carbónicas, descritas hasta el momento, que aceleran la hidratación reversible del dióxido de carbono a bicarbonato en la fotosíntesis (Fig. 6-9) (véanse también Capítulos 7 y 12). Junto con el Cu, constituye algunos tipos de superóxido dismutasas (SOD), presentes en distintos orgánulos y en el citoplasma de la célula vegetal e implicadas en la defensa contra los radicales superóxidos (véase Capítulo 30).

Por último, cabe destacar su participación en la estabilidad del ribosoma y su presencia en la RNA polimerasa, lo que le convierte en un regulador de la expresión génica.

Molibdeno

El molibdeno existe en el suelo principalmente como sales de molibdato (MoO_4^{2-}) o ($HMoO_4^-$), y como MoS_2 molibdenita, uno de los principales minerales que lo contiene. Es el único microelemento que aumenta su solubilidad con el pH. En la primera forma, el

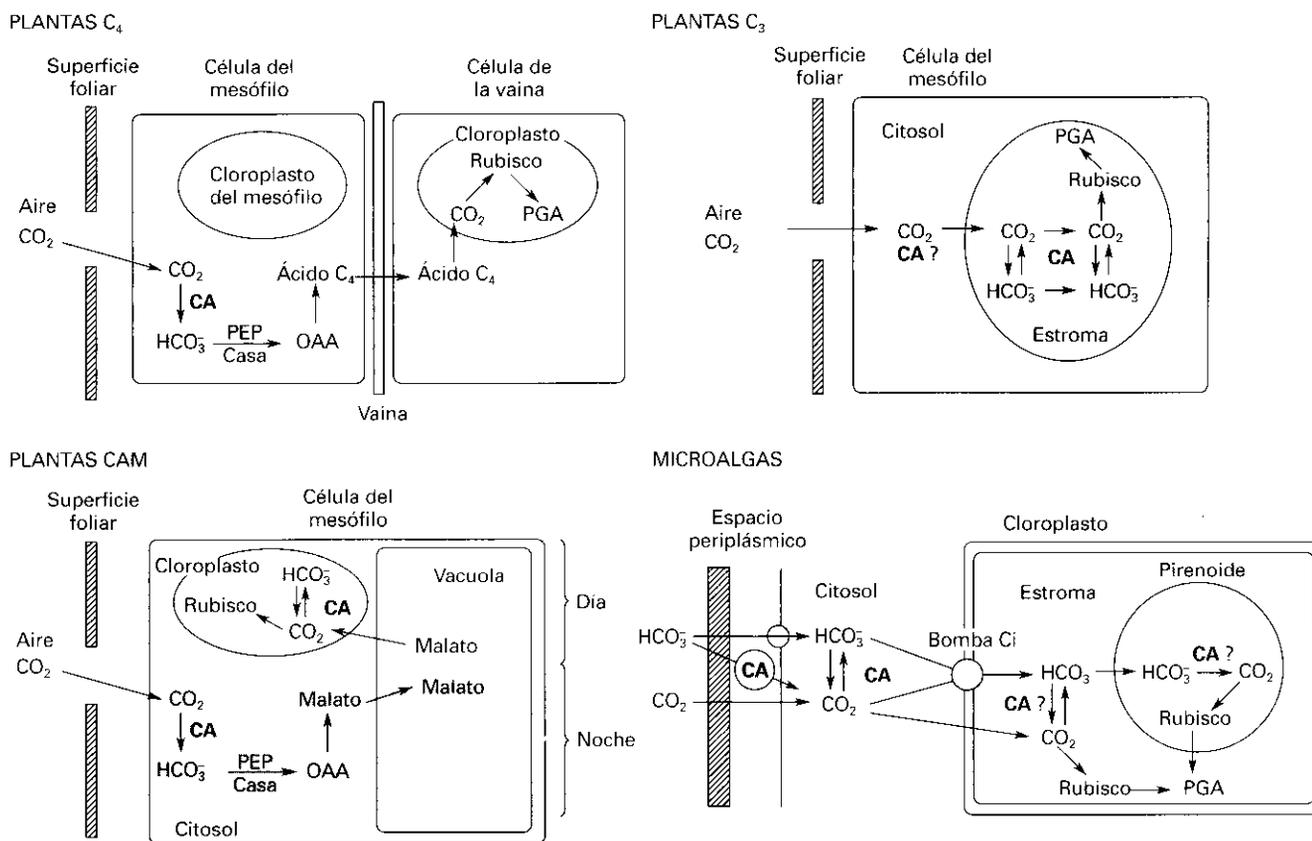


Figura 6-9. Papel de la anhidrasa carbónica (CA) en plantas C₄, C₃, CAM y microalgas. Todas las formas de CA conocidas presentan Zn como componente estructural. Basado en Badger y Price, 1994, *Plant Mol Biol*, 45: 369-392.

molibdeno presenta valencia 6⁺, mientras que en las sales de sulfuro se presenta como Mo⁴⁺. Su función en las plantas deriva principalmente de su participación en reacciones de tipo redox como constituyente de sistemas enzimáticos esenciales para las plantas superiores, algas y cianobacterias.

Debido a los mínimos requerimientos de Mo, se sabe muy poco de las formas en que se absorbe y transforma en la célula vegetal. A pesar de esos bajísimos requerimientos y de que resulta extraño encontrar situaciones de deficiencia, salvo en zonas del Este y Sur de Estados Unidos y Australia en cultivos como la coliflor y el brócoli, su esencialidad es indudable. Forma parte de una enzima clave en la asimilación del nitrato como es la **nitrato reductasa**, responsable de la reducción de nitratos a nitritos (véase Capítulo 15). Asimismo, forma parte de la enzima **nitrogenasa**, fundamental en la fijación biológica del nitrógeno y presente en todos los microorganismos capaces de realizar este proceso de fijación, tanto en forma libre como en simbiosis (véase Capítulo 16). También está implicado en la degradación de bases púricas como la adenina y guanina, como constituyente de la enzima xantín deshidrogenasa oxidasa, responsable del catabolismo de aquéllas. Por último, parece estar implicado en la formación del ABA al ser parte estructural de la enzima que genera el ácido abscísico (véase Capítulo 22).

Boro

A pesar de haber sido definido como esencial hace más de 75 años, el boro es probablemente el microelemento peor comprendido respecto a su papel fisiológico y bioquímico en las plantas. Presenta, con la posible excepción del carbono, la química más interesante y diversa de los elementos, lo que unido a que sólo parece ser esencial en plantas vasculares, diatomeas y cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno, pero no en bacterias en general, algas verdes, hongos y animales, hace que no resulte extraño el interés que, todavía hoy, despierta su estudio.

Dado que el 95 % del boro se encuentra en las paredes celulares, se piensa en un papel básicamente estructural para el microelemento. El hecho de que las monocotiledóneas presenten menos requerimientos de B y, al mismo tiempo, una fracción de pectinas inferior a la existente en dicotiledóneas hace presuponer que el B esté unido preferentemente a esta importante fracción de la pared. La capacidad de establecer enlaces éster entre el boro y los grupos cis-dioles explicaría la necesidad del microelemento en la estabilidad de la pared.

Al no formar parte estructural de ningún sistema enzimático o coenzimático, ya que no posee cambio de valencia, se pensó que el B podría estar implicado de

forma directa en el funcionamiento de los mismos. Sin embargo, se ha demostrado que la deficiencia de B libera de inhibición a la 6-P-gluconato deshidrogenasa al disminuir la concentración de complejos formados entre B y 6-P-gluconato, todo lo cual determina una preponderancia de la vía de las pentosas sobre la glucólisis en el metabolismo de la glucosa, con la consiguiente acumulación de compuestos fenólicos, que son extremadamente tóxicos tanto en la raíz como en los tallos, incluso a concentraciones de $1 \mu\text{M}$, lo que explicaría por sí solo el estrés que sufre la planta en condiciones de deficiencia de boro. Además, ésta se acompaña de un incremento en los niveles de auxinas (AIA), por una inhibición de la indolacético oxidasa producida por la acumulación de fenoles, ácido cafeico y clorogénico principalmente.

Por otra parte, el boro se ha visto relacionado con los principales procesos de la fisiología vegetal: división y crecimiento celular, germinación, regulación hormonal,

etcétera. Así, las plantas con deficiencia en boro presentan una amplia gama de síntomas dependiendo de la edad y el tipo de planta. Uno de los primeros signos de la deficiencia de B es, por ejemplo, la inhibición en el crecimiento y desarrollo de las raíces, tanto primarias como secundarias. La división celular en los tallos y en las hojas jóvenes cesa, y esto se sigue de necrosis y muerte de los meristemos, lo que se relaciona con su posible papel en la síntesis de uracilo precursor del ARN. Si a esto añadimos que estimula el alargamiento del tubo polínico y la germinación, podemos comprender por qué los síntomas de deficiencia en boro resultan tan espectaculares; es el caso del llamado «mal de corazón» de la remolacha azucarera, donde se produce una raíz prácticamente hueca que impide la acumulación de sacarosa (Fig. 6-10). Actualmente, existen datos sobre una relación B/Ca que debe desempeñar un importante papel no sólo a nivel estructural, sino también a nivel de transducción de señales.



Figura 6-10. A) Cultivo de judía (*Phaseolus vulgaris*): la forma deficiente en B presenta menor desarrollo radicular y menor porte. Crecidas en condiciones de fijación de N_2 atmosférico e inoculadas con *Rhizobium*, también puede observarse un menor número de nódulos en la planta deficiente. B) El cultivo de vid (*Vitis vinifera*) se ve claramente afectado por la deficiencia de B, tanto en la floración como en la maduración del fruto y la producción de azúcar. C) El cultivo de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) es uno de los más sensibles a la deficiencia de B, presentando el llamado «mal de corazón», con raíces prácticamente huecas que arruinan la producción. Las plantas están crecidas con solución nutritiva en tiestos tipo Riviera.

Cloro

El ion cloruro es ubicuo en la naturaleza y altamente soluble. Aunque es esencial para las plantas en su categoría de micronutriente, su presencia, relacionada con más de 130 compuestos orgánicos descritos en las mismas, alcanza habitualmente concentraciones de macronutriente. Casi todas las plantas absorben entre 10 y 100 veces más Cl^- del que necesitan. Por otra parte, su solubilidad es alta y en forma de anión se transporta vía tanto xilema como floema. Esta alta movilidad le confiere dos funciones principales:

- 1) Mantenimiento del gradiente de pH existente entre el citosol y la vacuola por activación de la Mg, Mn ATPasa del tonoplasto (Fig. 6-11).
- 2) Como soluto osmóticamente activo de gran importancia. Así, está implicado en el mecanismo de apertura/cierre de estomas junto con el potasio (Fig. 6-5) y en diversos movimientos o nastias (véanse Capítulos 3 y 24).

Sin embargo, el papel principal que presenta el Cl^- es su implicación en la fotólisis del agua con emisión de oxígeno en el fotosistema II, demostrado muy tempranamente por Warburg en 1944, aunque el mecanismo preciso es todavía desconocido (véanse Capítulos 9 y 10). En cualquier caso, su presencia es imprescindible para la estabilidad del cloroplasto, probablemente como protector de la oxidación de los componentes lipoproteicos de las membranas tilacoides.

Las deficiencias de cloro son raras en la naturaleza dada su disponibilidad y elevada solubilidad en los suelos; normalmente, sólo pueden ser observadas en estudios realizados, muy cuidadosamente, con soluciones nutritivas. En deficiencia de Cl^- , el desarrollo de las raíces se ve muy reducido en su longitud, aunque se engrosan en las zonas apicales. Las hojas presentan un desarrollo reducido, con manchones cloróticos y necróticos llegando a presentar, a menudo, un color bronceado generalizado.

Níquel

El níquel ha sido añadido recientemente a la lista de elementos esenciales para las plantas. Es un elemento metálico (Ni) abundante en la naturaleza y siempre pre-

sente en los tejidos vegetales, aunque con valores muy bajos de 0.05 a $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso seco. Una de las principales dificultades para establecer su papel esencial son los bajos requerimientos que se han estimado en, aproximadamente, $200 \mu\text{g}$ para el ciclo vital completo de una planta, cantidad que puede encontrarse contenida, en muchos casos, en la semilla. Ante necesidades tan bajas, no resulta extraño que aunque no haya sido añadido de manera expresa a los medios de cultivo, las propias impurezas de las otras sales hayan cubierto las necesidades de las plantas estudiadas.

Los datos provienen de estudios realizados en cereales y legumbres, principalmente aquellas que desarrollan nódulos determinados como la judía y la soja (véase Capítulo 16). En estas leguminosas, la forma de transporte del NH_4^+ fijado en los nódulos de la raíz son los ureidos, ácido alantoico y citrulina, principalmente, los cuales se transportan vía xilema hasta las hojas y, también, vía floema pasan de las hojas más viejas a las más jóvenes y a las semillas en desarrollo. El metabolismo de dichos ureidos implica la formación de urea y ésta sólo puede hidrolizarse en presencia de **ureasa**, enzima que contiene Ni. Si el metal no se encuentra presente, la concentración de urea aumenta y se comporta como un compuesto tóxico que produce necrosis en las puntas de las hojas. Dado que la degradación de las bases púricas (adenina, guanina) ocurre vía ureidos en las plantas, parece probable que todas las plantas, y no sólo las leguminosas, presenten y, en consecuencia, necesiten Ni para su funcionamiento. En este sentido, los experimentos realizados en cebada, aunque obligan a llegar a la tercera generación para que se obtengan semillas incapaces de germinar y con importantes anomalías estructurales, demuestran para el Ni el primer criterio de la esencialidad de un nutriente.

También, en algunas microalgas verde-azules (cianobacterias), como *Oscillatoria*, concentraciones de $0.05 \mu\text{M}$ de Ni resultan óptimas para el crecimiento con independencia de la fuente de nitrógeno presente en el medio. Asimismo, diversas bacterias presentan una clara dependencia de la presencia de Ni, siendo la mejor conocida la que presenta *Rhizobium*, especie en la que el Ni forma parte de la enzima hidrogenasa, responsable de la recuperación del hidrógeno implicado en el proceso de fijación de nitrógeno (Capítulo 16).

4. ELEMENTOS BENEFICIOSOS

Además de los 17 elementos esenciales descritos, algunas plantas presentan requerimientos adicionales. Dado que estos elementos suplementarios no son necesarios para la generalidad de las plantas, no se pueden considerar elementos esenciales y se definen como **elementos beneficiosos**. Otra posibilidad es que el elemento en cuestión sea capaz de suplir, al menos parcialmente, la falta de otro elemento esencial, o aumentar la tolerancia en los excesos de absorción de algún otro u otros ele-

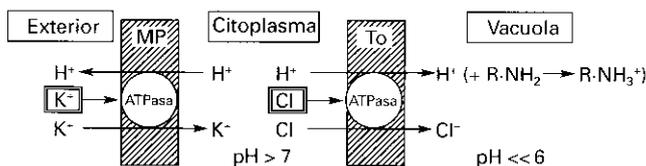


Figura 6-11. Relación existente entre la presencia de KCl y la actividad ATPasa en células de la raíz. En la membrana plasmática (MP), la ATPasa se ve activada por la presencia de K^+ y en el tonoplasto (To) por Cl^- .

mentos, como sería el caso del Si frente a concentraciones elevadas de Mn o Fe, habituales en suelos ácidos donde el silicio reduce los síntomas de toxicidad de estos elementos.

Sodio

Se encuentra como catión monovalente, Na^+ , y algunas plantas lo contienen en concentraciones más propias de un macronutriente, p. ej., las halófitas. Sin embargo, esto se debe a un mecanismo adaptativo de control osmótico, aunque en general se tiende a absorber selectivamente más potasio que sodio. Existen pruebas de su esencialidad a niveles de micronutriente en *Atriplex* y algunas otras plantas pertenecientes al grupo de la C_4 , donde parece que interviene en el acoplamiento del transporte de metabolitos, ácido pirúvico, entre el mesófilo y la vaina. Algo similar ocurre en las plantas CAM, pero no resulta esencial para plantas con fotosíntesis tipo C_3 . En cianobacterias (microalgas verde-azules) existe un requerimiento específico de Na^+ , implicado en procesos clave como la fotosíntesis, el transporte de HCO_3^- y CO_2 , la absorción y asimilación de nitratos y fosfatos y la fijación de nitrógeno en especies filamentosas con heterocistos.

Silicio

El silicio es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre. No resulta, pues, extraño que muchas plantas lo absorban en grandes cantidades. El Si puede significar entre el 1 y el 2 % de la materia seca del maíz e, incluso, porcentajes superiores en pastos y hasta el 16 % en las cenizas de *Equisetum arvense*. Resulta muy difícil realizar experimentos de deficiencia de Si dada su ubicuidad, incluso en el laboratorio por el material de boro-silicato que se utiliza habitualmente. Numerosos trabajos demuestran su esencialidad en gramíneas, donde en forma de óxido hidratado ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) se acumula en la pared aumentando su impermeabilidad y la resistencia al ataque de hongos, no sólo por constituir una barrera física, sino por configurar compuestos silico-orgánicos que son muy estables frente a las enzimas de los patógenos (véanse Capítulo 8 y Fig. 8-8). Ese aumento de la resistencia mecánica de los tejidos en cereales disminuye el denominado encamado de los mismos. Asimismo, las algas diatomeas necesitan Si para configurar sus cubiertas, convirtiéndose en esencial el Si para este grupo, al igual que sucede con el boro, también con valor de excepción.

Cobalto

Aunque el Co resulta esencial en animales por su presencia en el núcleo de corrina de la cianocobalamina,

vitamina B_{12} , no parece esencial en vegetales, salvo para leguminosas en condiciones de fijación de nitrógeno en simbiosis, si bien es el microorganismo el verdadero receptor de ese elemento. En el alga *Euglena* también resulta esencial; su deficiencia determina un descenso en la síntesis de RNA y DNA, por alteraciones en la síntesis de timina y ribósidos. Si en un principio se pensó que podría ser esencial en formas fijadoras de nitrógeno, concretamente en cianobacterias, hoy se sabe que se requiere como otros bioelementos, pero no resulta esencial.

Aluminio

Se encuentra a muy bajas concentraciones en forma soluble aunque es un elemento muy abundante en la corteza terrestre. A pH inferior a 5 se solubiliza y puede afectar de forma muy negativa a un gran número de plantas. Es una de las principales consecuencias de las denominadas lluvias ácidas en muchas zonas de Europa Central. Sin embargo, en pequeñas dosis puede ser altamente beneficioso porque, al igual que sucede en el caso del Si, reduce la toxicidad producida por el exceso de Ca, Mg o P.

Selenio

Aunque el selenio es generalmente tóxico para la mayoría de las plantas, existe un grupo de ellas, las denominadas plantas seleníferas, cuyo género más representativo es el *Astragalus*, que lo acumulan. Con varios cientos de especies, la diferencia entre ellas a la hora de acumular Se es muy grande. Existen especies, como *A. racemosus*, capaces de acumular Se por encima del 0.5 % del peso seco, lo que las convierte en peligrosas para el ganado, que puede envenenarse de forma mortal con ellas. Sin embargo, no está definitivamente establecido que el Se resulte esencial en estas plantas. El Se desplaza al azufre y configura seleno-aminoácidos del tipo de selenometionina y selenocisteína. El primero de éstos, en su forma reticulada, es el principal depósito de Se en las plantas acumuladoras. En bacterias se ha observado la presencia de seleno-proteínas que contienen estos aminoácidos, que resultan esenciales al igual que en animales, estando implicados en procesos de óxido-reducción.

Titanio

El titanio no cumple ninguno de los tres criterios establecidos por Arnon (1939) sobre la esencialidad de los elementos; sin embargo, se ha podido comprobar cómo, por ejemplo, en pimiento (*Capsicum annum L.*) bajo la forma de Ti (IV) incrementa la absorción de nutrientes

y, en consecuencia, la producción de biomasa. Tiene también un efecto activador de pigmentos fotosintéticos, con una acumulación de Fe^{2+} (hierro activo) hasta cinco veces superior a la presentada en los orgánulos de las plantas sin tratar.

5. OTROS ELEMENTOS

Existen pruebas suficientes que demuestran la esencialidad del iodo (I) y el vanadio (V) en algas marinas y hongos, y en algas de agua dulce, respectivamente; sin embargo, en plantas superiores, estos datos son más vagos. En los últimos años se ha prestado un interés especial a las tierras raras cerio (Ce), y lantano (La), principalmente. La mezcla de ambos elementos en dosis de micronutrientes se utiliza con aparente éxito en China como fertilizante foliar en diversos cultivos.

RESUMEN

En este capítulo, se pasa revista al conjunto de elementos o nutrientes que se consideran esenciales para las plantas. Esta parte central de la Fisiología Vegetal se denomina nutrición mineral de las plantas y es una de las que más contribuye a la comprensión del funcionamiento de éstas. Sin embargo, es una de las partes más complejas dado que su estudio implica no solamente a fisiólogos vegetales sino también a bioquímicos, químicos inorgánicos, especialistas del suelo, microbiólogos y ecólogos. Hemos visto en primer lugar, las razones que definen a un elemento como esencial, haciendo una reseña especial de las soluciones nutritivas como herramienta habitual de trabajo a la hora de definir tales elementos. Se explican las causas por las cuales se ha establecido una división entre macroelementos y microelementos en función, no cualitativa, sino cuantitativa, de las necesidades específicas de las plantas. Asimismo, se resumen las razones de orden fisiológico, bioquímico o molecular que hacen esenciales a dichos bioelementos. Por último, se distinguen las diferencias con los denominados elementos beneficiosos y se hace un estudio detallado de los mismos, al igual que de un pequeño grupo de otros elementos implicados en la mejora de la producción vegetal.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. ¿Cuándo se considera que un elemento es esencial para las plantas?
2. ¿Cuál es la diferencia entre elemento esencial y beneficioso?

3. Enuncie los 17 elementos esenciales para las plantas superiores e indique, al menos, una razón de su esencialidad para 2 macroelementos y 3 microelementos.
4. Las deficiencias de Fe, Mg y N producen, todas ellas, clorosis; sin embargo, existen diferencias muy marcadas entre la que está producida por Fe y la que se produce por Mg y N. Defina estas diferentes tipologías de clorosis y explique sus posibles causas.
5. En estos momentos existen 17 elementos definidos como esenciales para el crecimiento de las plantas ¿cree posible que algún otro elemento pueda añadirse a esta lista en el futuro? Razone la respuesta.
6. ¿Puede la cantidad de algún oligoelemento existente en el suelo provocar situaciones de toxicidad en la planta? Razone la respuesta.
7. ¿Qué microelemento es necesario para configurar la estructura funcional de la nitrato reductasa y de la nitrógenasa?
8. Explique el posible papel del Ca como segundo mensajero en la célula vegetal.
9. Cite tres elementos beneficiosos dando, al menos, una razón de por qué lo son.
10. ¿Cuál es la razón por la que deben airearse las soluciones nutritivas empleadas en el crecimiento de plantas mantenidas sin soporte mecánico?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B., Sánchez Tamés, R.: «Nutrición mineral». En: *Fisiología Vegetal*, 6.^a ed. pp. 150-167. Ediciones Pirámide, S. A. Madrid, 1992.
2. Clarkson, D. T.: «Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants». *Ann Rev Plant Physiol*, 36: 77-115, 1985.
3. Epstein, E.: *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1972.
4. Gil, F.: «Nutrición mineral». En: *Elementos de Fisiología Vegetal*, 1.^a ed. pp. 249-283. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, Barcelona, México, 1995.
5. Guardiola, J. L., García Luis, A.: «Absorción, transporte y metabolismo de los elementos minerales». En: *Fisiología Vegetal I: Nutrición y Transporte*, 1.^a ed. pp. 201-294. Editorial Síntesis. S. A. Madrid, 1990.
6. Hopkins, W. G.: «Plants and inorganic nutrients». En: *Introduction to Plant Physiology*. pp. 66-80. John Wiley & Sons, INC. Nueva York, 1995.
7. Marschner, H.: *Mineral Nutrition in Higher Plants*, 2.^a ed. American Press. Londres, 1995.
8. Mengel, K., Kirkby, E. A.: *Principles of Plant Nutrition*, 4.^a ed. International Potash Institute, Suiza, 1987.
9. Salisbury, F. B., Ross, C. W.: «Mineral nutrition». En: *Plant Physiology*, 4.^a ed. pp. 96-113. Wadsworth International. California, 1992.
10. Taiz, L., Zeiger, E.: «Mineral nutrition». En: *Plant Physiology*. pp. 100-119. The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC. California, 1991.

ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE NUTRIENTES MINERALES

José Antonio Fernández y José María Maldonado

1. Introducción. 2. Criterio termodinámico para distinguir entre transporte activo y pasivo. 3. Cinéticas del transporte activo y pasivo. 4. Energética de las membranas vegetales. 5. Papel de las bombas primarias en la generación del potencial de membrana. 6. Transporte secundario de iones. 7. Homeostasis del potencial de membrana y del pH y calcio libre del citoplasma. 8. Sistemas redox del plasmalema. 9. Flujo de iones en la raíz.

1. INTRODUCCIÓN

A excepción del carbono, las plantas terrestres toman los componentes esenciales de su biomasa del suelo. Así, macronutrientes y micronutrientes son incorporados desde la solución salina del suelo hasta el interior de las células, donde son almacenados, metabolizados o transportados a otras células, tejidos u órganos.

Una característica que comparten todas las células vivas es su capacidad de mantener en su interior iones y moléculas notablemente fuera del equilibrio. En gran medida, esa propiedad se debe a las características estructurales y funcionales de la membrana plasmática, **plasmalema** en las células vegetales (véase Capítulo 1). El plasmalema es algo más que una doble capa lipídica compuesta por distintos tipos de fosfolípidos y esteroides; contiene distintos tipos de proteínas, algunas de ellas con una marcada actividad enzimática, a través de las cuales existe un continuo tráfico de iones que permite a las células incorporar y acumular nutrientes, excluir iones o sustancias tóxicas, o intervenir en distintas respuestas a estímulos hormonales o medioambientales.

No todos los iones se transportan a través del plasmalema de la misma forma o a través del mismo tipo de proteína. Algunos son transportados y acumulados en condiciones cercanas al equilibrio, otros se transportan y se acumulan muy por encima o muy por debajo del mismo. En el primer caso se habla de **transporte pasivo** o **difusivo**; en el segundo, de **transporte activo**.

2. CRITERIO TERMODINÁMICO PARA DISTINGUIR ENTRE TRANSPORTE ACTIVO Y PASIVO

Un ion se mueve de forma pasiva si lo hace a favor de la fuerza física que actúa sobre él, denominada **fuerza ion**

motriz. Un ion es transportado de forma activa si su movimiento se realiza en contra de dicha fuerza, para lo cual las células vivas emplean energía metabólica. Saber calcular la fuerza ion motriz es imprescindible para distinguir ambos tipos de transporte. Como se verá más adelante, la fuerza ion motriz es la diferencia entre el **potencial de membrana** de las células y el **potencial de Nernst** para el ion problema.

2.1. La ecuación de Nernst expresa asimetrías de concentración de iones en términos de voltaje

Los iones tienden a moverse cuando hay una fuerza que los empuja. La energía asociada a un ion (j) depende, aparte de sus características intrínsecas, de su concentración (C_j) y de las condiciones eléctricas donde se encuentre (ψ). La suma de esos tres componentes se denomina potencial electroquímico ($\tilde{\mu}_j$) y cuantifica la capacidad de trabajo que un ion posee:

$$\tilde{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + zF\psi$$

donde μ_j^* es el potencial químico en condiciones estándar, R es la constante de la ecuación general de los gases ($8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta (K), z es la carga del ion, F es la constante de Faraday ($96.5 \text{ J mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}$) y ψ es el campo eléctrico donde el ion se encuentra.

Si se tienen dos compartimentos «e» e «i» y el ion está en equilibrio termodinámico, los potenciales electroquímicos en ambos compartimentos son iguales (Fig. 7-1):

$$\tilde{\mu}_j^i = \tilde{\mu}_j^e$$

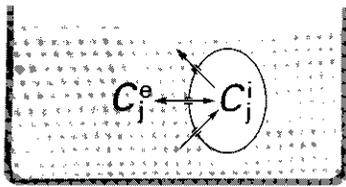


Figura 7-1. Esquema de dos compartimentos, uno exterior «e» y otro interior «i», separados por una membrana semipermeable, a través de la cual el ion «j» puede fluir hasta alcanzar el equilibrio termodinámico.

por tanto, puede escribirse que:

$$\mu_j^* + RT \ln C_j^i + zF\psi^i = \mu_j^* + RT \ln C_j^e + zF\psi^e$$

Agrupando los términos eléctricos a la izquierda y los de concentración a la derecha, la expresión anterior puede simplificarse:

$$zF(\psi^i - \psi^e) = RT (\ln C_j^e - \ln C_j^i)$$

y por tanto,

$$E_j^N = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_j^e}{C_j^i}$$

Esta ecuación es de las más citadas en la literatura biológica y se denomina **ecuación de Nernst**. La diferencia $\psi^i - \psi^e$ es el potencial de membrana con el cual el ion «j» estaría en equilibrio; se denomina **potencial de Nernst** y se abrevia E_j^N . Al objeto de facilitar los cálculos, es frecuente encontrar la ecuación escrita con logaritmos decimales:

$$E_j^N = \frac{RT}{zF} 2.303 \log_{10} \frac{C_j^e}{C_j^i}$$

Así, para un ion catión monovalente ($z = +1$), y a una temperatura de 20 °C, RT/zF vale 25.2 mV y, multiplicado por 2.303, vale 58 mV.

Esta ecuación puede leerse de izquierda a derecha o de derecha a izquierda. En el primer caso, si se tiene un potencial de referencia, puede calcularse la asimetría de un ion cuando está en equilibrio en ambos compartimentos. En el segundo caso esta ecuación permite, a partir de una asimetría de concentración, calcular un potencial con el cual el ion «j» estará en equilibrio termodinámico. Nótese que una variación de diez veces en la asimetría de un ion monovalente significa una variación de 58 mV en el potencial de Nernst. Es ilustrativo pensar que una asimetría 1/100 para un catión monovalente, como el K^+ , estaría en equilibrio con un potencial de -116 mV. En cambio, una asimetría similar se mantiene para un catión bivalente, como el Ca^{2+} , con sólo -58 mV. Para un anión monovalente como el

Cl^- , un potencial de -116 mV mantendría una asimetría 100/1. Es evidente que un compartimento cargado negativamente (interior con respecto al exterior) tiende a acumular iones positivos y a excluir negativos.

2.2. La fuerza ion motriz es la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de Nernst

En los sistemas vivos, la mayoría de los iones no está en equilibrio. La magnitud de la desigualdad puede calcularse a partir de la diferencia entre el potencial electroquímico de un ion en los dos compartimentos involucrados. El **gradiente de potencial electroquímico** sería la diferencia entre ambos compartimentos:

$$\Delta \tilde{\mu}_j = [\mu_j^* + RT \ln C_j^i + zF\psi^i] - [\mu_j^* + RT \ln C_j^e + zF\psi^e]$$

Agrupando los términos eléctricos y de concentración, se tiene:

$$\Delta \tilde{\mu}_j = [zF(\psi^i - \psi^e)] - \left[RT \ln \frac{C_j^e}{C_j^i} \right]$$

La ecuación de Nernst permite expresar un cociente de concentraciones como un potencial eléctrico, y viceversa. Así, $RT \ln C_j^e/C_j^i$ en esta última ecuación puede sustituirse por su valor expresado en términos eléctricos: $E_j^N \cdot zF$, es decir:

$$\Delta \tilde{\mu}_j = [zF(\psi^i - \psi^e)] - [E_j^N zF]$$

donde $\psi^i - \psi^e$ es la diferencia de potencial eléctrico que existe entre ambos compartimentos o **potencial de membrana** (E_m) y puede medirse independientemente. Finalmente, la expresión quedaría como:

$$\Delta \tilde{\mu}_j/F = z(E_m - E_j^N)$$

El gradiente de potencial electroquímico para un ion, o fuerza ion motriz, expresado en mV ($\Delta \tilde{\mu}_j/F$), es la diferencia entre el potencial de membrana (E_m) y el potencial de Nernst (E_j^N) para el ion, multiplicado por la carga. Véase que cuando el potencial de Nernst para un ion y el potencial de membrana son iguales, el gradiente de potencial electroquímico es cero y el ion está en equilibrio. Para un catión monovalente, si E_m es más negativo que E_j^N , la fuerza ion motriz es negativa y el ion tiende a entrar en el compartimento «i». Por el contrario, si E_j^N es más negativo que E_m , la fuerza ion motriz adquiere valor positivo, el ion se acumula en «i» por encima de su valor de equilibrio y la fuerza física que lo empuja se dirige hacia fuera (Fig. 7-2).

El transporte pasivo o difusivo de un ion se produce a favor del gradiente de potencial electroquímico o fuerza ion motriz. El transporte pasivo implica, así mismo,

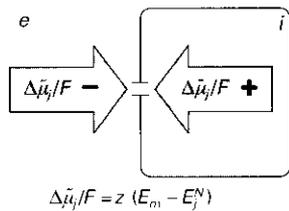


Figura 7-2. El gradiente de potencial electroquímico para el ion «j» o fuerza ion motriz es la diferencia entre el potencial de membrana (E_m) y el potencial de Nernst (E_j^N), multiplicada por la carga del ion (z). Cuando esta variable adquiere un valor positivo, el ion está sometido a una fuerza física que tiende a sacarlo del compartimento «i». Cuando tiene valor negativo, el ion se ve empujado a entrar en «i».

que el ion tiende a acumularse en las células en una concentración próxima al equilibrio para un potencial de membrana determinado. La razón para ello es que el transporte pasivo tiende a igualar el potencial de Nernst del ion que se mueve (E_j^N) al potencial de membrana (E_m). Una variación en la concentración externa o interna determina una nueva reorganización de las concentraciones a ambos lados de la membrana hasta alcanzar, de nuevo, el equilibrio.

En una situación real, por ejemplo, una célula de la raíz, la concentración de un determinado ion en el suelo cambia continuamente debido a dilución, adsorción, transporte y movilización. Dentro de la célula, al mismo tiempo, la concentración también cambia debido principalmente al transporte (dentro o fuera de la célula) o al metabolismo. En una célula viva, el equilibrio para un ion es una situación dinámica en la que el ion fluye continuamente a través del plasmalema.

Es importante tener en cuenta, no obstante, que hay muy pocos iones que se comporten de esa forma. Un ejemplo podría ser el del K^+ , cuando hay cantidad suficiente en el suelo. En todas las plantas y para casi todos los iones, el potencial de membrana siempre es más negativo que el potencial de Nernst, lo que los sitúa fuera del equilibrio.

En el caso del transporte activo, el ion se mueve en sentido opuesto al de la fuerza física que actúa sobre él, es decir, en contra del gradiente de potencial electroquímico o fuerza ion motriz. La existencia de este tipo de transporte es esencial para las células vegetales, ya que un correcto funcionamiento de las principales rutas metabólicas requiere concentraciones internas de muchos iones muy por encima o por debajo de la concentración interna de equilibrio.

3. CINÉTICAS DEL TRANSPORTE ACTIVO Y PASIVO

A finales de la década de los cincuenta, uno de los pioneros del estudio del transporte de iones en plantas, En-

manuel Epstein, observó que, en raíces de cebada, el K^+ se transportaba de dos formas distintas en función de la concentración externa. Cuando la concentración externa de KCl era inferior a 0.2-0.5 mM, incrementos en la concentración externa de K^+ generaban un incremento muy rápido de la tasa de incorporación que, no obstante, se saturaba a medida que la concentración externa de K^+ crecía. La velocidad de incorporación se incrementaba de nuevo sólo si se añadían concentraciones de K^+ bastante más altas, y seguía creciendo hasta una concentración de KCl de 50 mM. Este tipo de **cinética** de incorporación se denominó **bifásica** (Fig. 7-3).

Basándose en el estudio cinético de la incorporación de K^+ , Epstein propuso la existencia de dos mecanismos de transporte. El primero, que denominó de tipo 1, sería capaz de extraer K^+ del suelo a concentraciones muy bajas y sería saturable. El segundo, que funcionaría a concentraciones de K^+ altas, se denominó de tipo 2 (Fig. 7-3). Este último, con el margen habitual de concentraciones en el suelo, presentaría una cinética prácticamente lineal y se saturaría sólo a concentraciones muy altas de K^+ . Una de las contribuciones más importantes de Epstein fue aplicar el modelo de análisis de la cinética enzimática al transporte iónico. Así observó que la cinética descrita para el mecanismo 1 se ajustaba a una curva de Michaelis-Menten:

$$v = V_{\max} S / (K_M + S)$$

donde v y V_{\max} serían la velocidad de incorporación y la máxima velocidad de incorporación del ion, respectivamente; K_M sería la concentración iónica en el medio externo que produce una velocidad de incorporación igual a la mitad de la máxima y S sería la concentración del ion en el medio externo. La evidente analogía con los sistemas enzimáticos sugería que el transporte iónico de tipo 1 podría estar mediado por proteínas de membrana que tendrían una relación de especificidad por los iones similar a la que existe entre un enzima y el sustrato. En lugar de catalizar su transformación en producto, las proteínas de transporte catalizarían el tránsito de los iones de un lado al otro de las membranas. Este tipo de

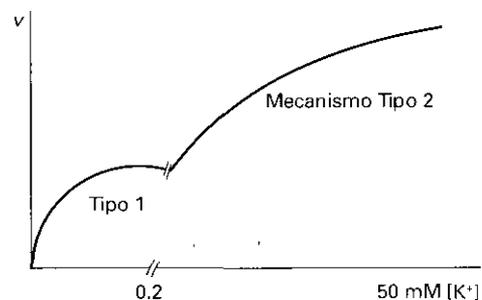


Figura 7-3. Cinética bifásica de incorporación de K^+ en raíces de cebada. Para este tipo de plantas el cambio de cinética tiene lugar entre 0.2 y 0.5 mM.

proteínas recibió el nombre de **transportadores** (*carriers*) o **permeasas** y su actividad se asoció a un transporte activo.

El mecanismo de tipo 2, mucho menos específico y mucho más dependiente de la concentración externa, se asoció a un transporte pasivo (difusivo). No obstante, algunos autores de la época, usando métodos más finos, fueron capaces de resolver en más de una cinética el componente lineal y llamaron a la cinética, en su conjunto, **multifásica**, que parecía sugerir un esquema más complejo.

Gracias a los estudios de Epstein, por primera vez se habló de afinidad en referencia a los sistemas de transporte, variable de extraordinaria importancia para explicar correctamente el uso de los recursos minerales del suelo, la competencia y la productividad de las especies vegetales.

4. ENERGÉTICA DE LAS MEMBRANAS VEGETALES

El transporte de iones, ya sea pasivo o activo, requiere energía, física en el primer caso y metabólica en el segundo. En una célula, la fuente de energía es el metabolismo, que produce energía química y poder reductor. La energía metabólica se transforma en energía útil para el transporte de iones en las membranas a través de la actividad de las **bombas primarias**. Estas bombas son proteínas de membrana que mueven iones (masa y carga) en contra de su gradiente de potencial electroquímico, utilizando energía metabólica y generando gradientes tanto de concentración como eléctricos. El transporte de iones que tiene lugar a través de las bombas primarias se denomina **transporte primario**. Debido a la capacidad de las bombas primarias para generar diferencias de potencial eléctrico al tiempo que catalizan la hidrólisis del ATP, las bombas primarias reciben el nombre de **electroenzimas**.

La bomba primaria de las células animales es la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ que impulsa la salida de 3 iones Na^+ y la entrada de 2 iones K^+ consumiendo ATP. La energía contenida en el enlace rico en energía del ATP se acumula en la membrana generando al mismo tiempo un gradiente de concentración de iones Na^+ y K^+ y cargando la membrana negativamente en su interior. La entrada de K^+ compensa parcialmente el déficit de carga positiva del citoplasma producido por la salida de Na^+ , y eso hace que la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa de las células animales sea poco electrogénica (Fig. 7-4). La energía acumulada asociada al Na^+ puede expresarse, por tanto, como el gradiente de potencial electroquímico para el Na^+ o fuerza Na^+ motriz en la que el componente asociado a la asimetría de concentración de Na^+ es más importante que el componente eléctrico.

4.1. La bomba primaria que «energetiza» al plasmalema es una ATPasa de protones

Las células vegetales no tienen bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+$. La bomba primaria del plasmalema es una bomba de protones que los saca del citoplasma y los vierte al exterior consumiendo ATP (**ATP fosfohidrolasa de protones** o **$\text{H}^+\text{-ATPasa}$**) (Fig. 7-4). La energía metabólica, en el caso de las membranas vegetales, se acumula en forma de asimetría en la concentración de H^+ y como diferencia de potencial eléctrico entre el citoplasma y el exterior, es decir, como gradiente de potencial electroquímico de protones o fuerza H^+ motriz:

$$\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}/F = E_m - E_{\text{H}^+}^{\text{N}}$$

En el caso de las células vegetales, el componente eléctrico es mucho más importante que la asimetría de concentración por dos razones. En primer lugar, en el funcionamiento de la $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ no existe un flujo asociado de otro ion que compense, ni siquiera parcialmente como en células animales, el déficit de carga positiva del citoplasma. Esto hace que el potencial de membrana de las células vegetales sea muy negativo, entre -160 y -250 mV según la especie. En segundo lugar, la asimetría de protones que genera la bomba se disipa parcialmente debido a la capacidad amortiguadora del medio externo, por un lado, y a los mecanismos de homeostasis del pH del citoplasma, por otro (Fig. 7-5).

En la literatura bioquímica, las $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ del plasmalema se denominan de **tipo P** porque forman una unión covalente con el fosfato, proveniente del ATP, durante cada ciclo de bombeo de H^+ al exterior. Debido a la particular unión con el P_i durante la catálisis, las $\text{H}^+\text{-ATPasas}$ del plasmalema son sensibles a la presencia de ortovanadato, ya que este ion bloquearía el lugar de unión para el fosfato. En vesículas aisladas del plasmalema, la presencia de concentraciones de este ion del orden micromolar (μM) inhibe la actividad de la bom-

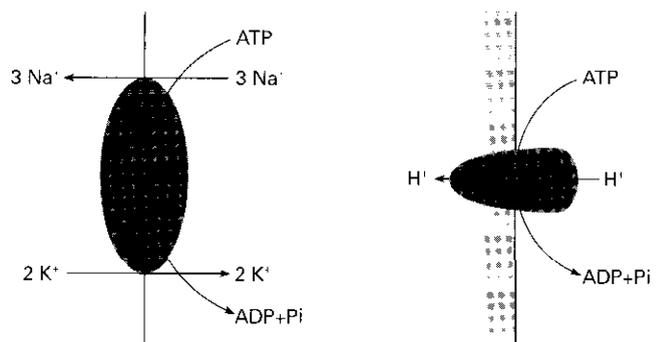


Figura 7-4. Bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de células animales y bomba de H^+ ($\text{H}^+\text{-ATPasa}$) en células vegetales. En las células animales la salida de carga positiva asociada al Na^+ se compensa parcialmente por la entrada de K^+ . En células vegetales, el bombeo de H^+ no está acoplado al flujo de ningún otro ion.

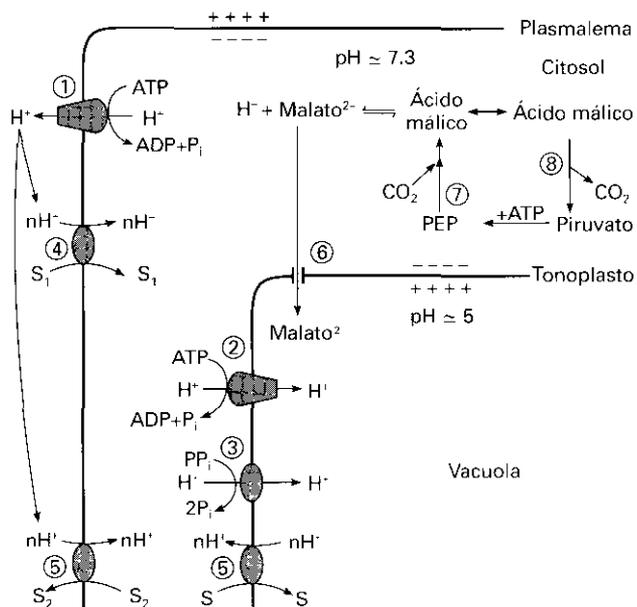


Figura 7-5. Flujo de protones y regulación del pH citoplasmático de una célula vegetal. 1) H⁺-ATPasa de tipo P, bomba primaria que transforma energía metabólica (ATP) en fuerza protón motriz ($\Delta\mu_{H^+}/F$) en el plasmalema. 2) H⁺-ATPasa, tipo V, del tonoplasto. 3) Pirofosfatasa. 4) Sistema de cotransporte (simporte). 5) Sistema de transporte invertido o antiporte. 6) Canal aniónico permeable al malato. 7) Fosfoenolpiruvato carboxilasa. 8) Enzima málica.

ba, si bien *in vivo* la inhibición es mucho más pequeña debido probablemente a la escasa permeabilidad de las membranas a este ion. Por esta razón, cuando se pretende una inhibición de la bomba se usan inhibidores de la respiración, cianuro o azida por ejemplo, que cortan el suministro de ATP a la bomba, incluso en células fotosintéticas iluminadas. Es importante destacar que la actividad de la H⁺-ATPasa y, en consecuencia, el E_m de las células vegetales, sean fotosintéticas o no, se mantiene en oscuridad; por tanto, igual que en las células animales, el ATP que usan proviene mayoritariamente del metabolismo respiratorio (véase Capítulo 14).

Además de la H⁺-ATPasa, las plantas poseen en el plasmalema un segundo tipo de bomba primaria. Se trata de una **Ca²⁺-H⁺ ATPasa**, que saca Ca²⁺ del citoplasma al tiempo que incorpora H⁺ en un proceso igualmente dependiente de ATP. Esta bomba es también del tipo P ya que el bombeo de Ca²⁺ requiere la formación de un intermediario fosfatado durante la catálisis. La contribución de esta bomba a la acumulación de energía en el plasmalema es muy pequeña ya que, además de ser menos electrogénica que la H⁺-ATPasa, es mucho menos activa que ésta. Su función es evacuar Ca²⁺ del citoplasma, para mantener su concentración en torno a 0.1 μM en este compartimento celular.

Algunos hongos, cuando se adaptan a un medio alcalino y con Na⁺, expresan una bomba primaria en la que el flujo de salida de Na⁺ está acoplado a la entrada de H⁺ con consumo de ATP. El funcionamiento de esta

bomba de sodio es simultáneo al funcionamiento de la H⁺-ATPasa de la membrana citoplasmática y la bomba es electroneutra, es decir, no contribuye al E_m . Su función está relacionada con la disminución de la concentración interna de Na⁺, que entra de forma pasiva a través de los canales de K⁺.

Por último, el alga verde marina *Acetabularia*, en lugar de una bomba de protones, tiene como sistema para «energetizar» al plasmalema una Cl⁻-ATPasa que emplea ATP en el transporte electrogénico de Cl⁻. Aunque esta bomba ha sido bien caracterizada desde el punto de vista funcional, aún permanece oscuro el sistema de reciclado del Cl⁻. Algunos autores sugieren que la salida de Cl⁻ del citoplasma se produce coincidiendo con despolarizaciones periódicas que, espontáneamente, ocurren en esta especie y parecen coincidir con disminuciones en la turgencia. Otros sostienen que el Cl⁻ es acumulado en vesículas intracelulares y liberado al medio por exocitosis.

4.2. Las bombas primarias del tonoplasto son una ATPasa de protones y una pirofosfatasa

El **tonoplasto** es la membrana que delimita la vacuola. Aunque se sabe desde hace mucho que la vacuola es el compartimento donde las células vegetales almacenan agua y solutos (véanse Capítulos 1 y 2), hace relativamente poco tiempo que se conocen los mecanismos, asociados al tonoplasto, responsables de dicha función.

La fuerza que impulsa la acumulación de agua y la génesis de turgencia en las células vegetales es osmótica (véase Capítulo 2). A su vez, el origen del potencial osmótico es la acumulación de iones, principalmente K⁺, en la vacuola. La energía que se emplea en el tonoplasto para mover iones está asociada a la actividad de bombas primarias. En el tonoplasto existen dos tipos de bomba primaria, ambos bombean protones hacia el interior de la vacuola; por esta razón, el lumen vacuolar es típicamente ácido y positivo. Medidas directas del pH de la vacuola con microelectrodos indican que se encuentra alrededor de 5, aunque hay organismos vegetales que pueden llegar a tener un pH de 1, como es el caso del alga parda marina *Desmarestia*, que acumula gran cantidad de SO₄²⁻ en forma de ácido sulfúrico. El potencial de membrana que soporta el tonoplasto es mucho menor que el soportado por el plasmalema y oscila, según especies, entre 5 y 20 mV (dentro de la vacuola positivo).

De las dos bombas de protones del tonoplasto, una tiene actividad ATPasa y la otra, pirofosfatasa. La **H⁺-ATPasa** de la vacuola difiere de la (P) H⁺-ATPasa del plasmalema en su estructura, mecanismo de reacción y relación con los inhibidores. Se denomina de **tipo V** y se parece mucho a otras bombas de protones presentes en las endomembranas de las células eucariotas. Mientras que las H⁺-ATPasa de tipo P, presentes en el plas-

malema, son un polipéptido simple de unos 100 kDa, las ATPasa del tipo V se componen de un complejo que atraviesa la membrana proporcionando un poro para los protones y una fracción externa, fácilmente separable de la primera, donde reside la capacidad de hidrolizar ATP. Se parecen a las ATPasa que existen en tilacoides y en la membrana interna de la mitocondria y, por eso, se cree que tienen un origen común.

La **pirofosfatasa** de la vacuola (H^+ -PP₃asa) también cataliza el transporte de H^+ al interior de la vacuola, pero usa pirofosfato (PP₃) como fuente de energía. Esta enzima, exclusiva de las plantas, se compone de un polipéptido simple de unos 80 kDa y su actividad requiere la presencia indispensable de Mg^{2+} , K^+ y H^+ . El papel fisiológico de la H^+ -PP₃asa está aún por determinar. ¿Por qué existen dos bombas primarias en una membrana con (aparentemente) la misma función? Algunos autores sugieren que sirve para acumular la energía asociada al PP₃ como fuerza motriz en el tonoplasto, lo que ayudaría a estabilizar los niveles citoplasmáticos de PP₃ en equilibrio con la actividad de otras enzimas relacionadas. Otros piensan que la H^+ -PP₃asa de la vacuola transportaría K^+ además de H^+ al lumen vacuolar con lo que su función sería diferente.

5. PAPEL DE LAS BOMBAS PRIMARIAS EN LA GENERACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA

En todas las células vivas, el potencial de membrana es siempre negativo en el citoplasma con respecto al medio externo. La adición de inhibidores de la actividad de la H^+ -ATPasa o de la respiración produce, en células vegetales, una despolarización parcial del plasmalema (Fig. 7-6). Al potencial residual que queda cuando la bomba primaria está inhibida se denomina **potencial de difusión** (E_D) y es reflejo de la asimetría de todos los iones entre el citoplasma y el exterior de las células. Los iones que más contribuyen al E_D son tres: K^+ , Na^+ y Cl^- aunque en la mayoría de las plantas la contribución del K^+ es la más importante debido a la mayor permeabilidad de las membranas vegetales al K^+ con respecto a cualquier otro ion. El potencial de difusión puede calcularse a partir de la asimetría de estos tres iones mediante la **ecuación de Goldman**:

$$E_D = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+} C_{K^+}^o + P_{Na^+} C_{Na^+}^o + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^i}{P_{K^+} C_{K^+}^i + P_{Na^+} C_{Na^+}^i + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^o}$$

donde P_{K^+} , P_{Na^+} y P_{Cl^-} son las permeabilidades de la membrana para el K^+ , Na^+ y Cl^- , respectivamente.

El origen del potencial de difusión es la asimetría de los iones que impone la actividad de la H^+ -ATPasa en el plasmalema. El déficit de carga positiva en el interior de las células tiende a ser compensado por flujos pasi-

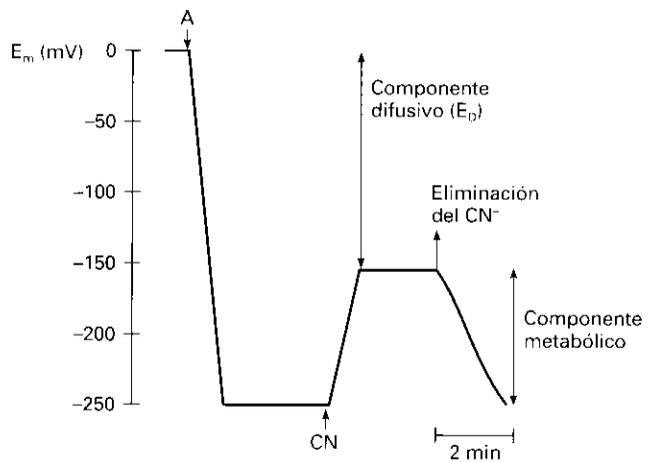


Figura 7-6. Registro continuo del potencial de membrana (E_m) de una célula vegetal medido con un microelectrodo que se introduce en A. La adición de 0.1 mM de NaCN determina una despolarización del plasmalema de unos 90 mV como consecuencia de la inhibición de la respiración. El efecto es reversible, ya que, tras lavar el cianuro, el E_m vuelve a su valor de reposo. Este experimento permite observar los dos componentes del E_m en células vegetales, uno dependiente directamente del metabolismo y otro difusivo que depende de la asimetría de iones positivos y negativos dentro y fuera de la célula, potencial de difusión (E_D) que puede calcularse mediante la ecuación de Goldman.

vos de iones que tenderán a estar en equilibrio. El ion cuya permeabilidad es mayor presentará una mayor velocidad de difusión a través de la membrana y, por tanto, es el que responderá más rápidamente a variaciones en la fuerza ion motriz. En una hipotética membrana semipermeable para el K^+ , Na^+ y Cl^- , donde la permeabilidad relativa sea 1, 0.1 y 0.01, la actividad de una H^+ -ATPasa que genere un potencial de membrana de -100 mV permitiría, en el equilibrio, acumular 100 veces la concentración externa de K^+ y Na^+ y excluir 100 veces la concentración interna de Cl^- .

El potencial de membrana se mide de dos formas: mediante cationes lipofílicos o directamente mediante microelectrodos. En el primer caso se trata de añadir al medio de ensayo, que contiene las células cuyo potencial se quiere medir, una sustancia a la que las membranas sean permeables y que, además, esté cargada positivamente. Tal ion se distribuirá a ambos lados de la membrana hasta alcanzar el equilibrio. Conociendo la cantidad que ha quedado fuera de la célula y la que se ha incorporado, se aplica la ecuación de Nernst para calcular el potencial de membrana. Uno de los cationes lipofílicos más usados es el TPP⁺ (tetrafenilfosfonio), cuya concentración se mide por potenciometría o marcándolo con un isótopo radiactivo. Esta técnica se emplea en células procariontas o en orgánulos procedentes de células eucariotas. La principal limitación de este método para calcular el E_m de células eucariotas reside en que, una vez incorporado al citoplasma, el catión lipofílico tiende a acumularse, a su vez, en los distintos orgánulos según el E_m de cada uno de ellos. La ecuación

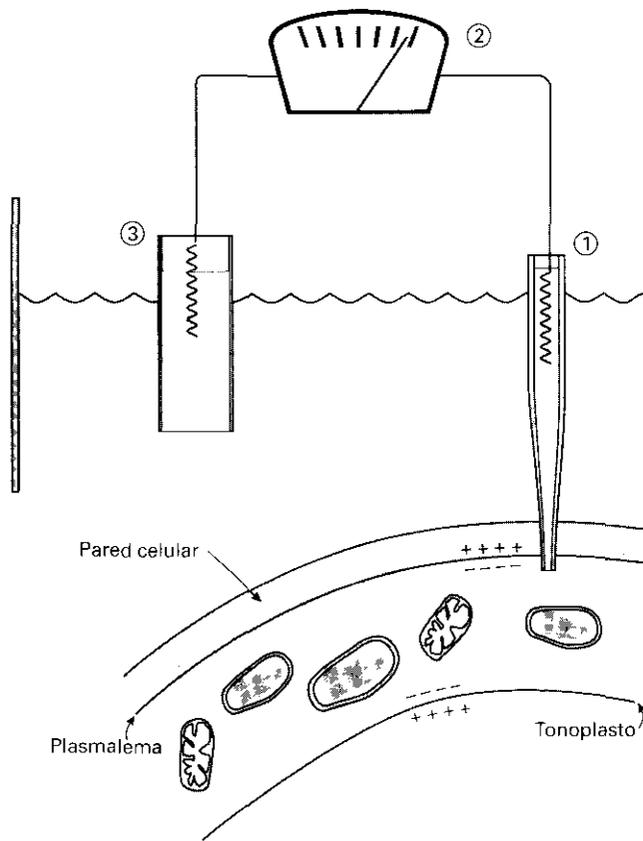


Figura 7-7. Medida del potencial de membrana en células vegetales mediante microelectrodos. Tanto éstos (1) como el electrodo de referencia (3) se llenan de KCl 0.5 M y se conectan a un voltímetro de alta impedancia (2). El microelectrodo ha de atravesar la pared celular y alojarse en el plasmalema en contacto con el citoplasma sin tocar el tonoplasto.

ción de Nernst no puede aplicarse en este caso y han de usarse sistemas más complejos y menos fiables para calcular el E_m .

El segundo método consiste en la medida directa del E_m mediante **microelectrodos** (Fig. 7-7). Éstos se fabrican calentando un capilar de vidrio y estirándolo hasta que el diámetro de la punta alcanza entre 0.2 y 0.6 μm . El interior se llena de una solución 0.5 M de KCl. Fuera de la célula, e inmerso en el medio de ensayo, se sitúa un electrodo de referencia, lleno con la misma solución solidificada con agar al 3%. El microelectrodo y el electrodo de referencia se conectan a un voltímetro de alta impedancia que medirá directamente el potencial de membrana. A principios de siglo, los microelectrodos se hacían a mano y se insertaban dentro de células vegetales gigantes; por eso, *Chara* y *Nitella* son tan populares en experimentos de electrofisiología. Hoy día los microelectrodos se fabrican con aparatos especialmente diseñados, que permiten estandarizar, tanto la forma, como el diámetro de la punta. Además, el uso de micromanipuladores acoplados a microscopios permite la medida de potenciales de membrana en un número creciente de especies y tipos celulares.

Un problema clásico que surge cuando se mide el E_m

de células vegetales es la localización de los microelectrodos. En plantas, la vacuola ocupa muchas veces más del 90% del volumen del citoplasma, lo que hacía pensar a muchos autores que lo que medían era la diferencia de potencial entre la vacuola y el exterior, y no entre el citoplasma y el medio externo. Al final de la década de los ochenta, el uso frecuente de microelectrodos de pH demostró que, en casi todos los casos, los microelectrodos se situaban en el citoplasma, ya que éste era ligeramente alcalino, en torno a un pH de 7.3 frente al pH ácido, en torno a 5, que se mide en la vacuola.

6. TRANSPORTE SECUNDARIO DE IONES

El transporte secundario consume la energía acumulada en las membranas por las bombas primarias. El consumo de energía debido a la actividad del transporte secundario se refleja en la despolarización de la membrana. A diferencia del transporte primario, que genera una diferencia de potencial eléctrico y es, por tanto, electrogénico, el transporte secundario disipa la diferencia de potencial acumulada en la membrana y es, por tanto, **electroforético**. El transporte secundario de iones se establece a través de dos tipos de proteínas de membrana: **canales iónicos**, en el caso del transporte pasivo, y **transportadores (carriers)**, en el caso del transporte activo.

6.1. El flujo pasivo de iones tiene lugar a través de canales

Los **canales** son proteínas que funcionan como poros selectivos en la membrana. Su distribución es prácticamente universal en las membranas de todas las células y orgánulos celulares. En plantas se han descrito hasta la fecha distintos tipos de canales para K^+ , para Ca^{2+} y para Cl^- . Recientemente se han descubierto canales para el agua, denominados **acuaporinas**, especialmente abundantes en membranas sometidas a un flujo grande de agua. Los canales iónicos no sólo aparecen en el plasmalema, sino que también están presentes en el tonoplasto, retículo endoplásmico, mitocondria, membrana interna del cloroplasto y membrana tilacoidal. Un canal de K^+ típico estaría constituido por cuatro subunidades de entre 65 y 100 kDa que formarían el poro y que contendrían un filtro de selectividad y sensores a distintos tipos de estímulos.

A finales de los años setenta, dos investigadores alemanes, Neher y Sakmann, usaron una técnica nueva para el estudio de los flujos iónicos en las membranas. Se trataba de, en vez de insertar electrodos muy finos dentro de las células, adherir un electrodo de punta roma a la superficie de éstas. La técnica se denominó **patch-clamp** y su aplicación a células vegetales requiere disgregar las células del tejido y eliminar la pared

celular mediante un tratamiento con diversas enzimas celulolíticas. Se obtiene entonces una célula vegetal sin pared que se denomina **protoplasto**.

La adhesión firme del electrodo a la superficie del protoplasto se llama **sellado** y se detecta por la alta resistencia que presenta al paso de la corriente eléctrica, que se sitúa alrededor de 10^9 ohmios ($G\Omega$). Mediante esta técnica es posible medir la corriente asociada al flujo de iones a través de la pequeña superficie que queda sellada por el electrodo y que se debe a la actividad de unos pocos canales. También es posible, haciendo un agujero en la membrana del protoplasto, registrar el paso de la corriente a través de todo el plasmalema (Fig. 7-8).

Los experimentos de *patch-clamp* revelan que los canales están abriéndose y cerrándose continuamente a una velocidad altísima (Fig. 7-9). A esta propiedad de abrirse y cerrarse se denomina *gating* y la probabilidad de apertura refleja la actividad del canal. El flujo de iones a través de los canales es, pues, un proceso discontinuo. La cantidad de iones que fluyen a través de un canal cuando está abierto, está determinada por su conductancia y por la magnitud de la fuerza ion motriz. La

representación gráfica de la intensidad de corriente que atraviesa los canales en función del voltaje que se aplica da lugar a las denominadas curvas I-V (intensidad-voltaje), cuya pendiente es una medida de la conductancia del canal (Fig. 7-9). Asumiendo que el flujo de iones a través de la doble capa lipídica de las membranas es prácticamente nulo, la permeabilidad de una membrana para un determinado ion es un valor integrado del número de canales, su conductancia y su actividad (*gating*).

Tanto en el plasmalema como en el tonoplasto, los canales más abundantes son los de K^+ . A diferencia de los canales de K^+ de células animales, los de las plantas son permeables a un gran número de cationes monovalentes. Por ejemplo, en *Nitella*, en orden decreciente, los canales de K^+ son permeables a Rb^+ , NH_4^+ , Na^+ , Li^+ y Cs^+ .

La actividad de los canales es sensible a una serie de estímulos ambientales o fisiológicos. En el plasmalema existen canales aniónicos que responden a la turgencia y a la hiperpolarización, de forma que cuando la membrana sobrepasa un determinado valor negativo de E_m o la turgencia es demasiado alta, los canales aniónicos se abren, dejan escapar una cierta cantidad de Cl^- que despolariza la membrana, se libera K^+ y, como consecuencia, se elimina agua. La concentración de Ca^{2+} en el citoplasma es determinante para la regulación de los canales tanto del plasmalema como del tonoplasto. Un incremento en la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma de las células oclusivas, como respuesta a oscuridad o al ABA, induce el cierre de canales de entrada de K^+ y la apertura de canales de salida de K^+ y de canales aniónicos, lo que determina la pérdida de turgencia de las células oclusivas y, en consecuencia, el cierre del estoma (véase Capítulo 3). El máximo de Ca^{2+} que induce el cierre de los estomas puede estar ocasionado por la activación de proteínas G, inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) o ABA, ya que inducen la entrada de Ca^{2+} en el citoplasma y, en el caso del IP_3 , la liberación de Ca^{2+} de la vacuola (véanse Capítulos 18 y 22).

6.2. El transporte activo secundario tiene lugar a través de transportadores

Además de las bombas primarias y de los canales iónicos, los transportadores (*carriers*) son el tercer gran grupo de proteínas de membrana que intervienen en el tráfico de iones en la célula. Su función es incorporar o liberar iones o moléculas en contra del gradiente de potencial electroquímico; por lo tanto, transportan los iones de forma activa, empleando para ello la energía acumulada en la membrana por la actividad de las bombas primarias. En el caso de las plantas, esta energía se acumula como fuerza protón motriz ($\Delta\mu_{H^+}/F$) y son, por tanto, protones los iones que impulsan el transporte activo secundario en la célula vegetal.

Según sea el sentido del flujo del **ion motriz** con respecto al ion que se transporta, se distinguen dos modos funcionales de transportador: cotransporte o simpor-

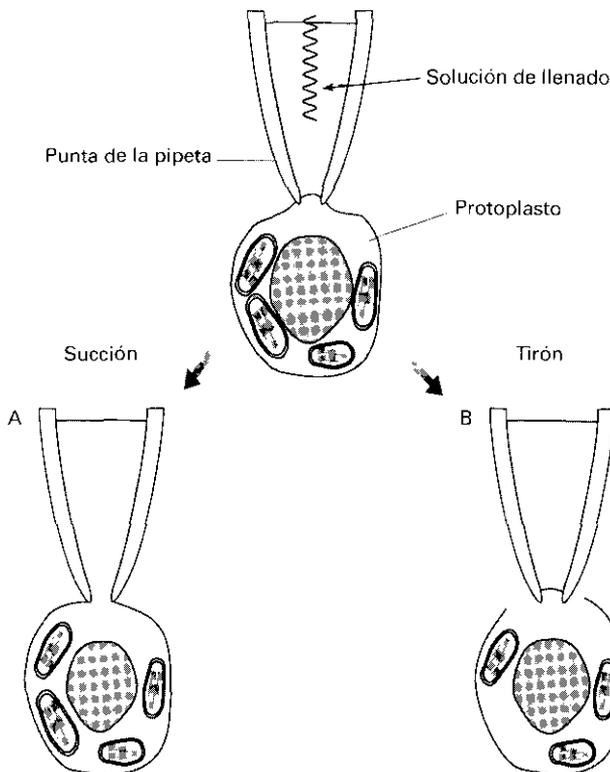


Figura 7-8. Esquema de la configuración de la pipeta y del protoplasto en un experimento de *patch-clamp*. La pipeta debe quedar firmemente adherida al exterior de la célula (sellado) tras lo cual, succionando o tirando, se puede acceder al interior de la célula (A) o retirar una pequeña porción del plasmalema (B). En el primer caso se registra la actividad de los sistemas de transporte de toda la célula y, en el segundo, la actividad de los que se encuentran incluidos en el pequeño trozo que se retira.

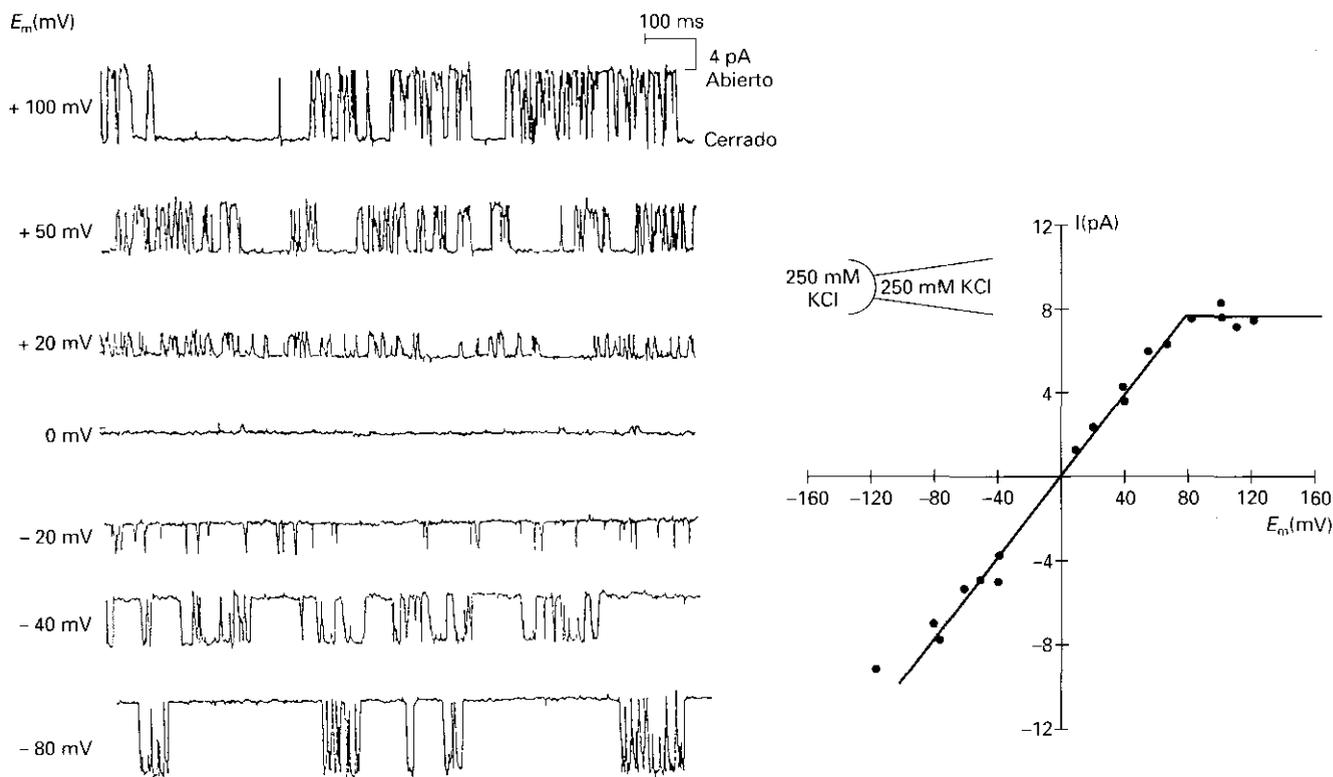


Figura 7-9. Registro continuo de la intensidad de corriente asociada al flujo de K^+ a través de un pequeño trozo de plasmalema durante un experimento de *patch-clamp*. La intensidad de corriente que atraviesa los canales es proporcional a la diferencia de potencial eléctrico que se aplica a ambos lados de la membrana. En este caso, se trata de un canal reversible. La representación gráfica de la intensidad de corriente que atraviesa los canales, en función del voltaje aplicado, da lugar a las curvas I-V, cuya pendiente es un estimador de la conductancia del canal.

te y transporte invertido o antiporte. En el primer caso, la entrada a la célula del ion motriz impulsa la entrada de un ion o molécula en contra del gradiente de potencial electroquímico. En el segundo caso, la entrada en la célula del ion motriz impulsa la salida de la célula de un ion o una molécula en contra del gradiente de potencial electroquímico. Desde el punto de vista energético, es imprescindible que la energía asociada al ion motriz sea mayor que la energía necesaria para mover el ion que se transporta. El balance energético entre ambos iones determinará, a su vez, la estequiometría entre ambos. Veamos un ejemplo:

El NO_3^- en plantas es incorporado a las células en cotransporte con protones (véase Capítulo 15). Si la célula tiene un potencial de membrana de -200 mV, un pH citoplasmático de 7.3 y una concentración citoplasmática de NO_3^- de 1 mM y la situamos en un medio que contiene 0.1 mM de NO_3^- a pH 7.3, se necesitarán dos protones para que la incorporación de una molécula de NO_3^- sea termodinámicamente posible. En esas condiciones, la fuerza asociada al ion motriz, $\Delta \bar{\mu}_{H^+}/F$, es igual a $nz(E_m - E_{H^+}^N)$, siendo «n» el número de H^+ implicados en el transporte. Si el pH dentro y fuera de la célula es el mismo, $E_{H^+}^N$ vale cero y $\bar{\mu}_{H^+}/F$ es igual al

potencial de membrana: -200 mV. En cambio, el potencial del Nernst para el NO_3^- es $+58$ mV, con lo que la fuerza ion motriz que actúa sobre este ion será $+258$ mV. Un solo protón será, en estas condiciones, incapaz de impulsar el transporte de NO_3^- . Sin embargo, dos protones duplicarían la fuerza protón motriz, siendo ya más que suficiente para que el NO_3^- se incorpore.

Los principales nutrientes que necesitan las plantas se incorporan en cotransporte con protones. Así parecen incorporarse, según el mecanismo de alta afinidad (o mecanismo 1 según la terminología de Epstein), NO_3^- , NH_4^+ , $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-} , Cl^- , K^+ y algunas moléculas más grandes como acetato, glucosa o algunos aminoácidos. De esta forma se transporta la sacarosa al interior de las células del floema, siendo este mecanismo esencial para la **carga** del mismo.

Debido al sentido en el que se orienta la fuerza protón motriz, los sistemas de transporte invertido o antiporte son especialmente abundantes en el tonoplasto. En esa membrana, el flujo de salida de H^+ está acoplado al flujo de entrada de K^+ y Na^+ . No obstante, el proceso de exclusión de Na^+ del citoplasma parece estar también asociado a la existencia de un antiporte H^+Na^+ en el plasmalema.

6.3. La fuerza Na^+ motriz puede ser una fuente alternativa de energía para el transporte secundario

Aunque el ion motriz universal en plantas es el H^+ , se ha descubierto recientemente que el Na^+ actúa como ion motriz en determinado tipo de organismos vegetales. En cianobacterias el NO_3^- se incorpora impulsado por el gradiente electroquímico para el Na^+ . *Chara* y *Nitella* presentan mecanismos de transporte de K^+ , de alta afinidad, en cotransporte con Na^+ . En *Nitella*, urea y lisina se transportan de la misma forma. En el trigo se ha aislado un gen, denominado HKT1, que codifica una proteína que incorpora K^+ en cotransporte con Na^+ .

La importancia fisiológica de estos sistemas de transporte está aun por determinar, pero parecen aprovechar el gradiente de potencial electroquímico favorable a la entrada de Na^+ para impulsar la incorporación de determinados nutrientes. En algas y hongos, estos sistemas se expresan cuando el medio es alcalino y rico en Na^+ y parecen conferir a las plantas una cierta resistencia a la salinidad, no se sabe bien si por sí mismos o porque su funcionamiento depende de la existencia en el plasmalema de un sistema de bombeo de Na^+ al exterior impulsado, a su vez, por protones.

6.4. Algunas plantas acuáticas incorporan el carbono inorgánico para la fotosíntesis a través de transportadores

La fuente de carbono inorgánico para la fotosíntesis de las plantas terrestres es el CO_2 , pero las plantas acuáticas están expuestas a otras formas de carbono inorgánico en función del pH donde viven. A medida que el pH del medio aumenta, el CO_2 disuelto en agua se hidrata y forma HCO_3^- . A un pH poco mayor de 8, prácticamente el 100% del carbono inorgánico disponible para la fotosíntesis es HCO_3^- . Para tener acceso a esta fuente de carbono, algunas plantas dulceacuólicas alcalófilas y plantas marinas desarrollan estrategias diversas. Algunas segregan al espacio periplásmico la enzima **anhidrasa carbónica** (CA), que cataliza la interconversión de CO_2 en HCO_3^- ; el bicarbonato es deshidratado externamente y el CO_2 difunde a través del plasmalema al citoplasma. Este parece ser el caso del alga parda marina *Phyllariopsis* o de la angiosperma dulceacuólica *Potamogeton* (Fig. 7-10). En Characeas el HCO_3^- se incorpora al citoplasma en cotransporte con H^+ , el HCO_3^- es deshidratado internamente en una reacción catalizada por la CA interna y los OH^- que se generan se liberan al exterior, a favor del gradiente de potencial electroquímico, a través de canales aniónicos. Los mecanismos de incorporación de HCO_3^- y de liberación de OH^- están separados espacialmente, lo que da lugar a regiones ácidas y regiones alcalinas. En *Monoraphidium* el sistema de transporte de HCO_3^- parece estar estimulado por luz azul. Por último, el alga marina *Ulva*, cuando se

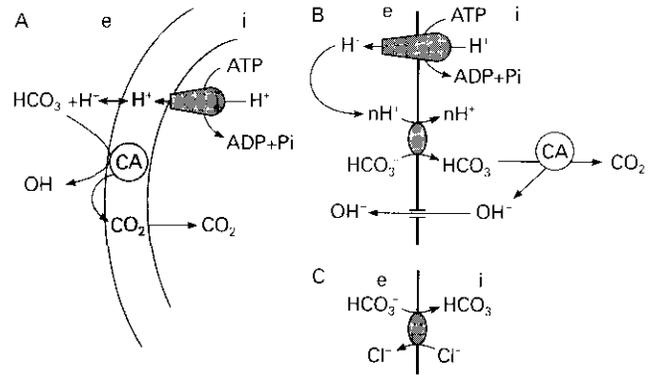


Figura 7-10. Modelos de incorporación de carbono en plantas acuáticas. Deshidratación externa de HCO_3^- y difusión de CO_2 a través del plasmalema en *Potamogeton* y *Phyllariopsis* (A). Cotransporte $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$ en las bandas ácidas de *Chara* (B) y antiporte $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ de *Ulva* (C).

aclimata a un pH de 9, desarrolla un sistema de incorporación directa de HCO_3^- que consiste en un antiporte, donde la entrada de HCO_3^- está impulsada por la salida de Cl^- del citoplasma (Fig. 7-10).

7. HOMEOSTASIS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA Y DEL pH Y CALCIO LIBRE DEL CITOPLASMA

Los desajustes en el balance de cargas asociadas al flujo de iones se compensan con variaciones en la actividad de las bombas primarias y en la actividad de los canales de K^+ y Cl^- (canales aniónicos). Cuando la membrana se despolariza, debido al transporte masivo de un ion, se incrementa la actividad de la H^+ -ATPasa del plasmalema, ya que bombea protones en contra de una menor fuerza protón motriz. Al mismo tiempo, se abren canales de salida de K^+ , lo que permite una rápida repolarización de la membrana. En cambio, cuando la membrana se hiperpolariza, el funcionamiento de la H^+ -ATPasa del plasmalema se ralentiza (bombea protones en contra de una mayor fuerza protón motriz) y se abren canales aniónicos, lo que permite una salida de iones negativos, principalmente Cl^- , que despolariza parcialmente la membrana.

El pH del citoplasma de las células vegetales es muy constante y no parece diferir mucho entre especies. Las bombas primarias situadas tanto en el plasmalema como en el tonoplasto evacúan protones del citoplasma de forma continua (véase Fig. 7-5). Una buena parte de los protones que se liberan al apoplasto o al lumen vacuolar vuelve al citoplasma a través de los sistemas de transporte activo secundario del plasmalema y tonoplasto. El déficit citoplasmático de H^+ originado por la dilución en el apoplasto, o por la diversa estequiometría de los transportadores, es compensado con la síntesis de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como, por ejemplo, el ácido málico. Así, una alcalinización del

citoplasma estimularía la carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) para formar oxalacetato que sería reducido a málico. La disociación del ácido málico generaría protones y malato, que entraría a la vacuola de forma pasiva. A su vez, una bajada de pH inhibiría la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa y activaría la de la enzima málica, que catalizaría la descarboxilación del ácido málico.

El Ca^{2+} actúa como mensajero secundario en un gran número de respuestas de las células vegetales a estímulos ambientales y fisiológicos, mediados o no por hormonas. Para que un máximo en la concentración del Ca^{2+} libre en el citoplasma genere una respuesta, la concentración basal en reposo debe ser baja y constante. En las células vegetales se han descrito tres sistemas de transporte activo de Ca^{2+} que mantienen dicha concentración en torno a $0.1 \mu\text{M}$. Se trata de la bomba de Ca^{2+} del plasmalema, descrita en el apartado 4.1, un antiporte Ca^{2+} - H^+ localizado en el tonoplasto y una ATPasa que cataliza la acumulación de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico (RE) con consumo ATP. Estos tres sistemas evacúan Ca^{2+} del citoplasma y lo acumulan en las vacuolas o el RE o lo sacan al exterior (Fig. 7-11). Distintos estímulos como oscuridad o ABA en células oclusivas (véase Capítulo 3) o auxinas en coleóptilos de

avena (véase Capítulo 19), inducen directa o indirectamente, vía IP_3 por ejemplo, una abertura de los canales de Ca^{2+} situados en el plasmalema, las vacuolas y el RE, lo que permite un rápido flujo pasivo de Ca^{2+} que ocasiona un aumento de varios órdenes de magnitud en la concentración de Ca^{2+} del citoplasma.

8. SISTEMAS REDOX DEL PLASMALEMA

Además de energía química en forma de ATP, el plasmalema acumula energía procedente del poder reductor acumulado en el citoplasma. En el plasmalema de las células vegetales existen proteínas con actividad deshidrogenasa capaces de oxidar NAD(P)H . Los electrones provenientes de la oxidación del NAD(P)H endógeno son transportados a la parte externa del plasmalema a través de una serie de proteínas que tienen como grupos prostéticos FAD y citocromo *b*. El funcionamiento de esta minicadena de transporte de electrones del plasmalema da lugar a una salida de protones al exterior, ya sea a través de un mecanismo acoplado a alguno de sus componentes o indirectamente por activación de la H^+ -ATPasa. El aceptor final de electrones puede ser O_2 , como en el caso de las deshidrogenasas solubles, o cualquier otro agente oxidado, porque la transferencia de electrones en la parte externa del plasmalema es muy inespecífica. Este mecanismo es una bomba redox, que puede catalogarse como un mecanismo primario de transporte, ya que acumula en la membrana poder reductor proveniente de la actividad metabólica, como diferencia de potencial eléctrico y, posiblemente, como asimetría de la concentración de protones. La actividad reductora del plasmalema se relaciona con la capacidad de movilizar determinados iones que son insolubles cuando están oxidados, como el hierro o el manganeso (véase Capítulo 6). En plantas sometidas a déficit de hierro se observa un incremento en la capacidad reductora del plasmalema de las células de la epidermis radicular, al tiempo que se liberan al exterior determinadas moléculas que secuestran el hierro y lo concentran cerca de la zona de absorción de la raíz.

9. FLUJO DE IONES EN LA RAÍZ

Los iones alcanzan la zona de absorción de la raíz por difusión a través de la solución salina del suelo, son arrastrados por el movimiento del agua hacia la raíz o entran en contacto con las zonas de absorción a medida que la raíz crece. Los nutrientes minerales se distribuyen por toda la planta a través del xilema, impulsados por la corriente ascendente de agua que genera el flujo de transpiración (véase Capítulo 3). Así, de la misma forma que el agua debe transportarse radialmente en la raíz para alcanzar el xilema, los iones siguen un camino similar. Al igual que el agua, el transporte radial de

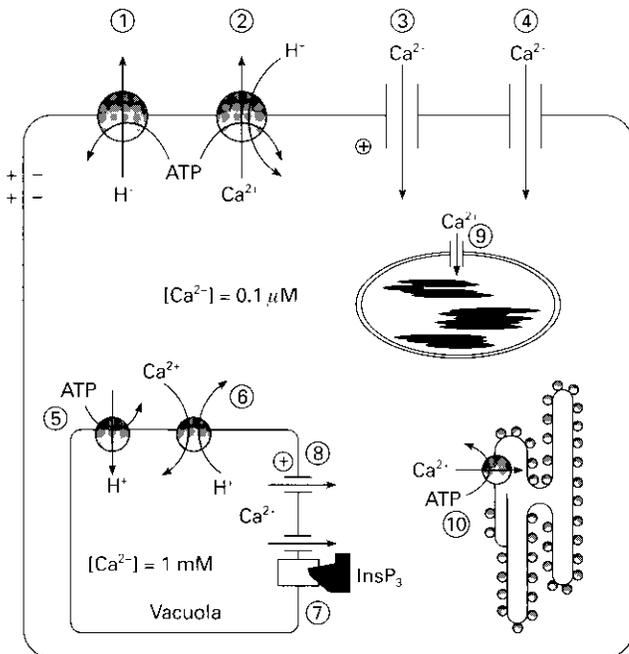


Figura 7-11. Tráfico de Ca^{2+} en una célula vegetal. 1) H^+ -ATPasa que «energetiza» el plasmalema e impone un gradiente de potencial electroquímico para H^+ y un potencial de membrana (E_m) negativo en el citoplasma con respecto al exterior. 2) Ca^{2+} -ATPasa del plasmalema. 3) y 4) Distintos tipos de canales de Ca^{2+} . 5) H^+ -ATPasa de la vacuola. 6) Antiporte Ca^{2+} - H^+ del tonoplasto. 7) y 8) Canales de Ca^{2+} del tonoplasto; el signo + y el InsP_3 significan que los canales se activan por voltaje y por inositol 1-4-5 trifosfato. 9) Canal de Ca^{2+} en el cloroplasto. 10) Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico.

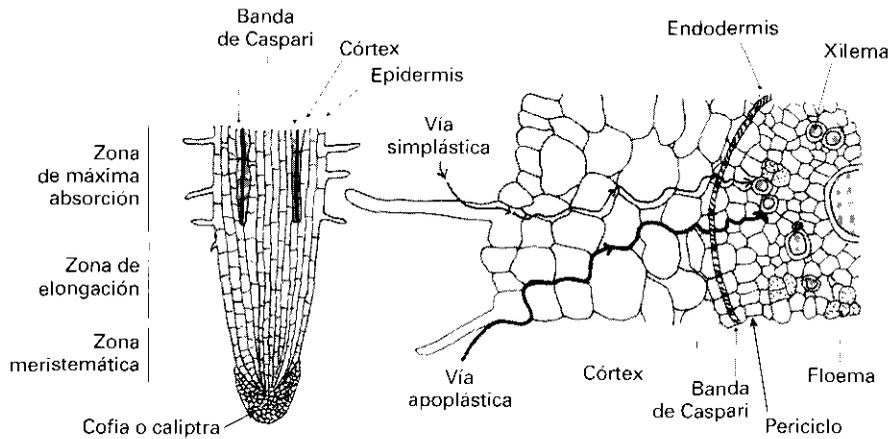


Figura 7-12. Esquema de las vías simplástica y apoplástica para la incorporación de nutrientes a través de la raíz. En la primera, los iones son incorporados a través de los pelos radicales u otras células de la epidermis y transportados célula a célula hasta los elementos conductores del xilema. La vía apoplástica contempla la posibilidad de un transporte extracelular de los iones hasta la endodermis, donde la existencia de una banda impermeable en el apoplasto, la banda de Caspari, obliga al paso a través del plasmalema. Una vez en el periciclo, los iones pueden seguir la vía extracelular hasta los elementos conductores del xilema.

iones por la raíz tiene lugar a través del apoplasto y del simplasto (véase Capítulo 4).

Las células vegetales están separadas por la pared celular, que forma una matriz porosa continua denominada **espacio libre aparente, espacio periplásmico o apoplasto**. Agua, iones y moléculas de pequeño tamaño pueden difundir libremente a través del apoplasto, de forma que, en teoría, un ion puede viajar radialmente en la raíz por esta vía (Fig. 7-12). A lo largo de este recorrido, los iones pueden ser absorbidos por las células tanto de la epidermis como del córtex. La existencia de la **banda de Caspari** en las células de la endodermis supone una barrera infranqueable en el camino hacia el xilema: tanto agua como nutrientes deben obligatoriamente atravesar el plasmalema de las células que componen la endodermis. La permeabilidad, selectividad y afinidad de los canales y transportadores localizados en el plasmalema de las células de la endodermis determinan, en última instancia, qué solutos y a qué velocidad se incorporan o se liberan.

Otra vía posible para la entrada de iones es la **simplástica** (Fig. 7-12). En este caso, los iones son primero incorporados a las células de la epidermis o, incluso, del córtex y luego son transportados, célula a célula, a través del córtex, la endodermis y el periciclo hasta el xilema. El transporte de una célula a otra incluiría el paso a través del plasmalema, la pared celular, la lámina media que comparten ambas células o, de forma alternativa, los iones pueden transportarse de una célula a otra a través de los **plasmodesmos**, que son conexiones tubulares (de 20 a 60 nm de diámetro) entre células, que atraviesan la pared celular y la lámina media y que ponen en contacto los citoplasmas de dos células adyacentes en la mayoría de las plantas. Dentro de los plas-

modosmos hay otro tubo que parece estar ocluido, denominado **desmotúbulo**, formado por membranas del retículo endoplásmico, que se extendería así de una célula a otra. La densidad de plasmodesmos es muy alta, unos 15 por μm^2 y, cuantitativamente, parecen ser la vía principal para el transporte transcelular de agua e iones.

La existencia de **micorrizas** (véase Capítulo 8) confiere a las plantas cierta ventaja para la absorción y el transporte de iones. En primer lugar, los sistemas de transporte del hongo tienen, con frecuencia, una mayor afinidad para determinados iones. En tal caso, una planta con micorrizas puede extraer del suelo algunos nutrientes a concentraciones más bajas de lo que sería capaz una raíz sin ellas. Tal es el caso del fósforo. En segundo lugar, las micorrizas representan una considerable extensión de la zona de absorción, que no quedaría ya reducida a la porción subapical, con pelos radiculares, de la raíz. Por último, la distribución intrarradical de las hifas del hongo, especialmente en el caso de las endomicorrizas, proporciona una vía rápida de transporte de agua e iones hasta el xilema como alternativa a la simplástica y la apoplástica.

Una vez que los iones alcanzan la proximidad del xilema deben ser vertidos a los elementos conductores de éste, es decir, vasos y traqueidas. El vertido se realiza desde las células del periciclo o desde las células vivas del xilema. El mecanismo de secreción de iones desde estas células es aún materia de debate. Algunos autores piensan que los iones se vierten a la relativamente diluida solución del xilema de forma pasiva, impulsados por un gradiente de potencial electroquímico favorable. Este parece ser el caso del K^+ , Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} y NO_3^- . Otros autores sugieren que la secreción de iones al xilema incluye algún tipo de transporte activo.

Cuadro 7-1. Clasificación energética y funcional de los sistemas de transporte en plantas

Tipo	Características	Cinética	Energía que se usa	Ejemplos
Canales	Pasivo (difusivo) Secundario Electroforético	Lineal (Saturable sólo a altas concentraciones)	Física Fuerza ion motriz $\Delta \tilde{\mu}_j/F$	Canales de K^+ , Cl^- y Ca^{2+} en plasmalema y endomembranas
Transportadores (<i>carriers</i>) • Cotransporte (simporte) • Antiporte	Activo Secundario Electroforético	Saturable Michaelis-Menten	Indirectamente energía metabólica Fuerza H^+ o Na^+ motriz $\Delta \tilde{\mu}_H/F$ o $\Delta \tilde{\mu}_{Na}/F$	Sistemas de incorporación de NO_3^- , NH_4^+ , $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-} , HCO_3^- , Cl^- , K^+ , aminoácidos, glucosa y acetato. Sistemas de exclusión de Na^+
Bombas iónicas	Activo Primario Electrogénico	Saturable Michaelis-Menten	Energía metabólica ATP o NAD(P)H en bombas redox	H^+ -ATPasa de plasmalema y tonoplasto Ca^{2+} -ATPasa Na^+ - H^+ -ATPasa de hongos H^+ -PPi asa del tonoplasto Cl^- -ATPasa de <i>Acetabularia</i> Bombas redox

ya que los inhibidores de la respiración parecen inhibir también dicha secreción.

RESUMEN (Cuadro 7-1)

El transporte de iones en las células vegetales puede ser pasivo o activo. En el primer caso, los iones fluyen a favor de la fuerza física que actúa sobre ellos y atraviesan las membranas a través de poros selectivos denominados **canales**, siendo la cinética del transporte prácticamente lineal. El transporte activo requiere la aplicación de energía metabólica. Dicha energía se acumula en las membranas vegetales en forma de fuerza protón motriz debido a la actividad de **bombas iónicas** que sacan H^+ del citoplasma hacia el exterior o lo vierten a la vacuola consumiendo ATP o pirofosfato. De forma secundaria, la energía acumulada en las membranas se utiliza para el movimiento de iones en contra de gradiente mediante **cotransporte** o **antiporte**. Los sistemas de transporte activo tienen cinética de tipo Michaelis-Menten (véase Cuadro 7-1, que resume los sistemas de transporte en plantas). De esta forma, se incorporan, a través de las células de la raíz, los principales nutrientes que necesitan las plantas para mantener su biomasa y crecer.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. La tabla presenta la concentración en el citoplasma (C_j^i) de una serie de iones en equilibrio con su concentración externa (C_j^e), expresada en mM, en células de raíz de guisante. El potencial de Nernst (E_j^N) y la fuerza ion motriz ($\Delta \tilde{\mu}_j/F$) se expresan en mV. $C_j^i(t)$ es la concentración

citoplasmática teórica que predice la ecuación de Nernst, asumiendo que el potencial de Nernst es igual al potencial de membrana (E_m): $C_j^i(t) = \frac{C_j^e}{e^{(E_m - E_j^N)/RT}}$. El experimento se realizó a 25 °C y el E_m , medido separadamente, es -110 mV (dentro negativo). Considérese $R = 8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ y $F = 96.5 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mV}^{-1}$. Los datos proceden de Higinbotham *et al. Plant Physiol.* 42:37-46, 1957. Durante la redacción del capítulo, un desafortunado error extravió parte de los resultados de la tabla. ¿Podría completarla?

Ion	C_j^e	C_j^i	E_j^N	$\Delta \tilde{\mu}_j/F$	$C_j^i(t)$	Fuerza ion motriz
K^+	1	75	-111	~ 0	73	Equilibrio
Na^+	1	8	-53	-58	73	Hacia dentro
Mg^{2+}	0.25	3				
Ca^{2+}	1	2				
NO_3^-	2	28	+68	+117	0.03	Hacia fuera
Cl^-	1	7				
$H_2PO_4^-$	1	21				
SO_4^{2-}	0.25	0.25				

- Usando los valores de la tabla anterior proponga un modelo de transporte para el Na^+ y para el NO_3^- .
- Identifique el ion (o iones) motriz(ces) en el plasmalema y tonoplasto de las células vegetales.
- Explique las diferencias funcionales entre transportadores, canales y bombas iónicas. Ponga un ejemplo de cada tipo.
- Origen y componentes del potencial de membrana (E_m) en las células vegetales.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Hedrich, R., Schroeder, J.: «The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plant cells». *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 40:539-569, 1989.
2. Maathuis, F. J. M., y Sanders, D.: «Plant membrane transport». *Curr Opin Cell Biol*, 4:661-669, 1992.
3. Møller, I.: «Membranas celulares y transporte». En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcón-Bieto J y Talón M. (eds.), pp. 25-47. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.
4. Neher, E., Sakmann, B.: «La técnica del pinzamiento de membrana». *Investigación y Ciencia*, 188:14-22, 1992.
5. Serrano, R., Villalba, J. M.: «Bomba de protones de la membrana vegetal». *Investigación y Ciencia*, 196:62-69, 1993.

NUTRICIÓN MINERAL Y PRODUCCIÓN VEGETAL

Agustín Gárate e Ildfonso Bonilla

1. Introducción. 2. Diagnóstico de nutrición. 3. Suministro de nutrientes en la producción agrícola. 4. Interacción planta-microorganismo. 5. Problemas de nutrición en condiciones de estrés. 6. Genética y nutrición. 7. Nutrición mineral y su relación con enfermedades y plagas.

1. INTRODUCCIÓN

La comprensión de cómo las plantas adquieren y asimilan los nutrientes minerales para su crecimiento y desarrollo es parte central de la Fisiología Vegetal, como hemos visto en los Capítulos 6 y 7. Por añadidura, la mejor comprensión de la nutrición mineral de las plantas ha sido la base de la gran expansión de la agricultura moderna, que sólo podrá mejorar a través de un conocimiento más profundo de los procesos implicados. Dada la naturaleza tan compleja de la nutrición mineral de las plantas, los estudios en este campo no sólo implican a fisiólogos vegetales, sino también a bioquímicos, químicos, edafólogos, microbiólogos y ecólogos. En consecuencia, aspectos aparentemente tan dispares como fertilizantes, micorrizas, quelatos, salinidad o fijación del N₂ atmosférico, deberán tratarse de forma armónica, para conseguir una mayor y mejor producción de los cultivos con el menor impacto negativo posible sobre el medio ambiente.

1.1. Contenido de nutrientes minerales y crecimiento vegetal

El crecimiento de las plantas depende de varios factores, que van desde la regulación génica hasta los factores edafoclimáticos. Para una especie vegetal y en un ambiente determinado, los factores de crecimiento más importantes son la luz, el agua, el CO₂ y los nutrientes minerales. Al aumentar cualquiera de estos factores, se produce un incremento de la producción vegetal, siendo menor la respuesta conforme se sigue aumentando la cantidad de factor aplicado.

Mitscherlich (1920) intentó dar forma matemática a la denominada ley del mínimo, enunciada por Liebig en

1840, y a la ley de los tres puntos de Sachs, en las que se explica cómo cualquier factor limitante ambiental del crecimiento tendrá una respuesta mínima, óptima o máxima sobre la planta. Mitscherlich estableció una relación matemática entre el nutriente aplicado y el rendimiento de la cosecha para indicar que, en la zona de deficiencia, el efecto positivo del aporte de un nutriente es tanto mayor cuanto más grave es la deficiencia del nutriente de partida. El modelo general de relaciones entre el crecimiento o producción de una planta y el contenido de nutrientes minerales se recoge en la Figura 8-1.

Las curvas de respuesta de la producción al aporte de nutrientes presentan distintas pendientes: los oligoelementos presentan la curva de mayor pendiente, mientras que el nitrógeno muestra la de menor (Fig. 8-2). Este comportamiento refleja la diferente demanda de las plantas de cada nutriente en particular. No obstante, las curvas reales de respuesta del crecimiento al aporte de nutrientes no presentan una pendiente constante ni son siempre asintóticas, debido a la existencia de interacciones con otros factores de crecimiento. Todos estos planteamientos son igualmente válidos en el ámbito agrícola, en el que la nutrición mineral tiene una influencia definitiva en la cosecha. La producción de biomasa total, peso total de la planta (**índice biológico**), está directamente relacionada con el contenido de nutrientes, si bien en agricultura la cosecha se determina por la producción de materia seca de determinados órganos o tejidos (**índice de cosecha**), por ejemplo, de tubérculos o granos. Si consideramos la planta de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), el rendimiento agrícola (índice de cosecha) será mayor cuanto mayor sea el peso de la raíz y su concentración de sacarosa. La consecución de un índice biológico elevado podría afectar negativamente a dicho rendimiento, ya que, por ejemplo, un gran desarrollo foliar puede restar peso y riqueza en sacarosa a la raíz.

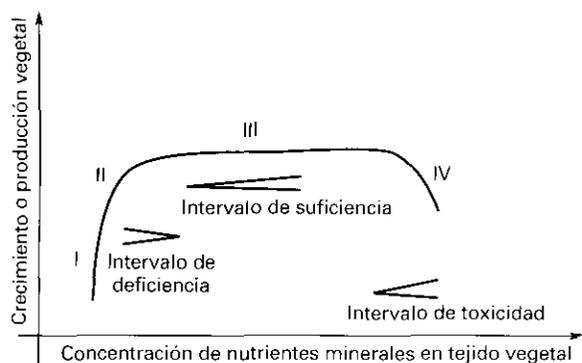


Figura 8-1. Relación entre el crecimiento vegetal y el contenido de nutrientes minerales en la planta. **I**, Parte ascendente de la curva en la que hay un crecimiento marcado frente a pequeñas aportaciones del nutriente. **II**, Los incrementos en el crecimiento y en el contenido del nutriente están estrechamente relacionados. El intervalo I-II es el de la deficiencia. **III**, Zona en la que el crecimiento no está limitado por el nutriente y en la que el contenido del mismo se incrementa notablemente. Es la zona de suficiencia del nutriente. **IV**, Parte final en la que el contenido excesivo de nutriente produce toxicidad y reducción del crecimiento. (Adaptado de Marschner, 1995.)

1.2. Factores que afectan al contenido mineral de las plantas

El contenido de nutrientes esenciales en los tejidos vegetales viene determinado por varios factores, entre los que podemos destacar: a) la dotación genética de la planta; b) la disponibilidad de nutrientes en el suelo o medio de cultivo, y c) el momento fenológico o edad de la planta y el órgano o tejido vegetal que se considere.

Dotación genética de la planta. Los contenidos minerales varían entre las especies vegetales, incluso cuando se hacen las comparaciones usando los mismos órganos y de la misma edad fisiológica. Estas variaciones se basan fundamentalmente en diferencias en el metabolismo y en la constitución de la planta, por ejemplo, las diferencias en la demanda genotípica de B y Ca de la pared celular. El contenido de boro en materia seca de hojas recientemente maduras, crecidas en las mismas condiciones, es de $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ en trigo y $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ en arroz, pero llegan a $25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ en soja y hasta $34 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ en girasol. En el Cuadro 8-2, que se explica más adelante, se pueden apreciar las diferencias en el contenido de nutrientes de distintas especies vegetales.

En un epígrafe posterior se tratan aspectos genéticos de las plantas que tienen que ver con la adaptación de distintas variedades de una misma especie al estrés nutricional.

Disponibilidad de nutrientes en el suelo. El suelo es el soporte natural de las plantas del que las raíces toman el agua y los nutrientes minerales. El desarrollo óptimo de un cultivo está genéticamente controlado, al igual que su capacidad de captar nutrientes del medio externo. Este potencial de desarrollo viene limitado funda-

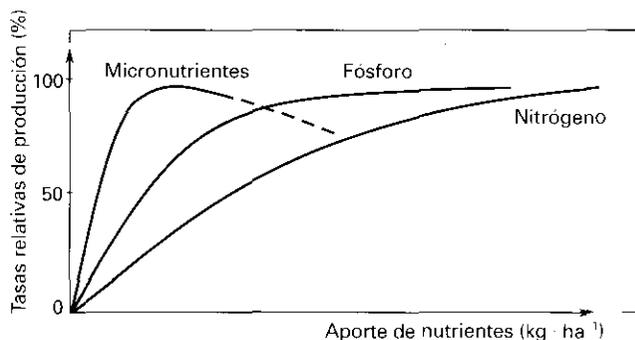


Figura 8-2. Curvas de producción vegetal en función de la concentración de distintos nutrientes en la planta. (Adaptado de Marschner, 1995.)

mentalmente por la disponibilidad de nutrientes del medio y, también, por otros factores de estrés que se comentan más adelante en este capítulo.

El conocimiento de la cantidad total de un nutriente en el suelo resulta irrelevante en la mayoría de los casos. Para el hierro, por ejemplo, tenemos cantidades totales de Fe elevadas en casi todos los suelos, ya que es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre y, sin embargo, la concentración de Fe^{3+} libre en la disolución del suelo, salvo contadas ocasiones, es inferior a 10^{-9} M. Igual sucede con otros elementos y, en consecuencia, la planta sólo puede captar del suelo una parte de la cantidad total de nutrientes presentes, que se denomina **forma disponible o asimilable**.

Momento fenológico y órgano de la planta. La edad fisiológica de la planta y la parte de la planta son, después del aporte de nutrientes, los factores más importantes que afectan al contenido de nutrientes minerales en el tejido vegetal. Normalmente hay un descenso del contenido mineral en peso seco de la planta según ésta va envejeciendo, con excepción del Ca y, a veces, el B y el Fe. Esta tendencia a la baja está provocada principalmente por el aumento relativo del porcentaje de peso seco del material estructural, pared celular y lignina, y de los compuestos de reserva, como el almidón. Por ejemplo, en cebada cultivada en campo con un suministro adecuado de potasio, el contenido de K en la parte aérea pasa desde el 5-6 % en la planta joven hasta cerca del 1 % en la maduración. En este caso, la disminución se debe exclusivamente a un efecto de dilución, ya que la concentración de K en el extracto acuoso de tejido (jugo vacuolar) permanece constante a lo largo del ciclo, con un valor aproximado de $100 \mu\text{M}$. El reparto de fotoasimilados o fotosintetizados es fundamental para el índice de cosecha y está relacionado con la distribución **fuentesumidero** (*source-sink*). Se llama «fuente» a los tejidos fotosintéticos, hojas y tallos, en los que se producen hidratos de carbono, los fotoasimilados, y «sumidero», a los órganos reproductores, los de reserva y los ápices de crecimiento, que son consumidores netos de fotoasimilados (véase Capítulo 5). En los culti-

vos en los que se cosechan frutos, semillas o tubérculos, los efectos del aporte de nutrientes en el índice de cosecha son, a menudo, reflejo de las limitaciones del sumidero, ocasionadas por un aporte deficiente o excesivo durante un período crítico del desarrollo, como el inicio de la floración, la polinización o el inicio de la tuberización.

Los órganos reproductores y de reserva presentan unos contenidos minerales estables en comparación con los órganos vegetativos, que reflejan mejor las fluctuaciones en el aporte externo de nutrientes. En este sentido, la hoja es el órgano que mejor representa el estado de nutrición de la planta, de ahí que sea el más utilizado en el análisis vegetal.

2. DIAGNÓSTICO DE NUTRICIÓN

El diagnóstico del estado nutritivo de las plantas se realiza, principalmente, con fines agrícolas y, también, para investigar problemas de nutrición mineral. Puede dividirse en dos etapas: la primera es la de obtención de datos, fundamentalmente por análisis químico de material vegetal (**análisis foliar**), que puede complementarse con el **análisis del suelo**. La segunda etapa es la de interpretación de resultados, en la que se comparan los datos del análisis con unos valores de referencia. Esta comparación se puede hacer según distintos criterios, que dan lugar a los diferentes métodos de diagnóstico.

2.1. Análisis del suelo

El análisis del suelo permite evaluar su potencial nutricional, es decir, su capacidad para suministrar nutrientes a la planta durante un ciclo de cultivo. La determinación de la composición y propiedades del suelo, como pH, textura (composición centesimal de las partículas sólidas del suelo en función de su diámetro), EC (conductividad eléctrica) y materia orgánica, nos proporciona una información básica para conocer el potencial agrícola de un suelo, ya que tales propiedades marcan las condiciones en las que tendrán lugar los procesos fisicoquímicos relacionados con la disponibilidad de nutrientes.

Los nutrientes minerales que toman las raíces de las plantas se encuentran en disolución y en equilibrio con los nutrientes de la fase coloidal del suelo, compuesta, sobre todo, por las arcillas y las sustancias húmicas. Cuando la concentración de un ion en la disolución del suelo disminuye debido a la absorción radicular, este ion es repuesto desde los coloides edáficos. Por tanto, tenemos un proceso dinámico regulado por factores diversos, que dificulta el diagnóstico del potencial nutricional de los suelos, si tenemos en cuenta, además, la gran variedad de suelos existente.

El análisis del suelo debe suministrar información de los nutrientes disponibles o asimilables por la planta, no

sólo de los que puede haber en un momento dado, sino también del ritmo de incorporación de los nutrientes a la disolución del suelo. Los métodos de extracción de nutrientes asimilables del suelo normalmente consisten en la agitación del mismo con sustancias químicas extractoras, como ácidos o agentes quelantes. En la disolución que obtenemos después de la extracción, se determinan los distintos nutrientes.

2.2. Análisis foliar

El empleo del análisis químico del material vegetal con el fin de realizar un diagnóstico de nutrición, se basa en la asunción de que existe una relación entre el crecimiento de las plantas y el contenido de los nutrientes en la materia vegetal seca o fresca.

En general, el estado nutricional de una planta se refleja mejor por el contenido de los elementos de las hojas que por el de otros órganos (véase apartado 1.2). No obstante, distintos factores, como el tipo de elemento, la edad y la especie vegetal, pueden hacer recomendable un muestreo de otro órgano o parte de la planta.

El empleo de hojas jóvenes es sólo aconsejable para nutrientes que presentan un grado reducido de movilidad desde las hojas adultas hacia zonas de nuevo desarrollo. La situación es otra para los elementos K, N y Mg, puesto que sus contenidos permanecen estables en hojas jóvenes expandidas. Para estos nutrientes móviles, las hojas adultas son las que mejor indican el estado nutricional de la planta. Si se sospecha que pueden existir problemas de toxicidad, las hojas adultas son las más recomendables para el análisis foliar.

El análisis mineral de la hoja o de un tejido vegetal se realiza en tres etapas:

1. **La toma de muestra vegetal** es clave para la validez de todo el **diagnóstico de nutrición**. Es necesario establecer un procedimiento normalizado de muestreo que asegure un material vegetal comparable y que considere los factores que afectan al contenido de nutrientes de órganos y tejidos. La normalización del muestreo debe realizarse por cultivos, dada las diferencias existentes, por ejemplo, entre un frutal y una hortaliza.
2. **La preparación de la muestra**, previa al análisis químico, contempla los siguientes pasos: a) el transporte al laboratorio, generalmente en envases plásticos; b) el lavado de la muestra con agua destilada, sobre todo si se trata de muestras de planta desarrolladas en condiciones de campo, manchadas con polvo o rociados foliares; y c) el secado y molido si, como sucede normalmente, el análisis se hace a partir de material seco.
3. **El análisis foliar**, propiamente dicho, consiste en una mineralización de la materia orgánica vegetal por vía seca o por vía húmeda. En la vía seca, la muestra de hoja se reduce a cenizas en

un horno-mufla y, posteriormente, éstas sufren una digestión ácida, para finalmente realizar el análisis de nutrientes en el extracto resultante. En la vía húmeda, el tejido vegetal se trata con una mezcla de ácidos, sulfúrico, nítrico y clorhídrico, fundamentalmente, para acabar con la medida analítica de los nutrientes. Los nutrientes metálicos se determinan por espectrometría de absorción atómica (Fe, Cu, Mn, Zn y Mo), de emisión por llama (K, Na, Ca y Mg), o de plasma inducido (todos ellos), mientras que los no metálicos (N, P y B) se analizan por colorimetría. Actualmente existen otros métodos capaces de medir conjuntamente aniones y cationes, entre los que podemos destacar la cromatografía líquida (HPLC) y la electroforesis capilar. Existe un procedimiento normalizado recogido en los Métodos Oficiales de Análisis (1993).

2.3. Métodos de diagnóstico

Los métodos de diagnóstico pueden ser cualitativos, por observación de los síntomas visibles de alteraciones nutricionales, o cuantitativos, basados en los resultados del análisis químico del material vegetal, por comparación con normas o valores de referencia.

2.3.1. *Síntomas visibles de alteraciones nutricionales*

Las alteraciones nutricionales que reducen ligeramente el crecimiento y la producción no presentan síntomas visibles claros. Normalmente, los síntomas se hacen patentes cuando la deficiencia nutricional es aguda y el ritmo de crecimiento y la producción disminuyen significativamente. Además, muchas especies vegetales naturales, sobre todo las adaptadas a lugares pobres en nutrientes, ajustan su crecimiento al nutriente limitante, con lo que no se desarrollan síntomas visibles.

Con objeto de diferenciar los síntomas de alteraciones nutricionales de otros síntomas, es importante considerar que los causados por alteraciones nutricionales tienen siempre un patrón de distribución simétrico: las hojas de una planta en posiciones iguales o similares, de la misma edad fisiológica, presentarán una distribución de síntomas casi idéntica.

El diagnóstico del estado nutricional de una planta basado en los síntomas visibles requiere una aproximación sistemática, como se resume en el Cuadro 8-1. Los síntomas aparecen, preferentemente, en hojas jóvenes o viejas, en función de la capacidad del nutriente para movilizarse por el floema.

La **clorosis** (amarilleamiento de las hojas) y la **ne-crosis** (manchas de color variable, normalmente de marrón a negro), así como el patrón de distribución de am-

bas son criterios importantes en el diagnóstico nutricional. Como norma general, los síntomas visibles de la deficiencia de un nutriente son más específicos que los de su toxicidad.

El diagnóstico puede ser especialmente complicado en cultivos agrícolas y en condiciones de campo, cuando se encuentra más de un nutriente en un nivel deficiente, o cuando se producen simultáneamente la deficiencia de un nutriente y la toxicidad de otro. También se complica el diagnóstico basado en los síntomas visibles con la presencia de plagas y enfermedades, o por otros daños provocados, por ejemplo, por el uso de rociados foliares.

2.3.2. *Diagnóstico foliar. Nivel crítico e intervalo de suficiencia*

La comparación de los resultados del análisis foliar con la norma o referencia se viene haciendo de distintas maneras. Algunas implican una mera comparación entre concentraciones de un solo elemento y su norma, pero otras usan relaciones entre dos elementos o, incluso, son multicomponentes. En el primer caso, se encuentran los métodos tradicionales de Nivel Crítico (NC) y de Intervalo de Suficiencia (IS), y en el segundo, el método DRIS.

El **Nivel Crítico (NC)** es el más extendido y se basa en la comparación de la concentración de un nutriente, obtenida por análisis foliar, con un valor de referencia que se denomina nivel crítico, y que normalmente supone el 90 % del máximo de cosecha en peso seco. El problema es que los valores de referencia no son universales y, en consecuencia, no pueden aplicarse directamente a los mismos cultivos de distintas zonas geográficas. Los métodos tradicionales presentan serias limitaciones ya que las concentraciones de los nutrientes sufren fluctuaciones con distintos factores, como los más arriba mencionados. Parece más lógico y realista utilizar un intervalo de valores de referencia, en lugar de un valor aislado.

El **Intervalo de Suficiencia (IS)**, tiene la misma base que el método del nivel crítico, solo que aquí la comparación de nuestro dato analítico se hace frente a un intervalo de concentraciones del nutriente que no implican reducción en la producción.

En el Cuadro 8-2 se muestran intervalos de concentración de nutrientes adecuados o suficientes (IS), para distintas especies vegetales. Los intervalos de macronutrientes son de órdenes de magnitud similares en las distintas especies. El calcio es una excepción, pues presenta un contenido sustancialmente menor en monocotiledóneas. En todas las especies, el intervalo es relativamente estrecho para el N, ya que los contenidos de lujo de N tienen efectos desfavorables en el crecimiento y la composición de la planta. En hoja de manzano, por ejemplo, un contenido de N mayor del 2.4 % afecta a menudo negativamente tanto al color como al almace-

Cuadro 8-1. Síntomas visibles de alteraciones nutricionales

Parte de la planta	Síntoma predominante	Deficiencia nutricional
Hojas adultas	Clorosis	N (S) Mg (Mn)
	Necrosis	K Mg (Mn)
Hojas jóvenes y ápices	Clorosis	Fe (S) Zn (Mn)
	Necrosis (o clorosis)	Ca, B, Cu
	Deformaciones	Mo (Zn, B)

Hojas adultas	Necrosis	Toxicidad nutricional Mn (B) B. salinidad
	Clorosis, necrosis	Toxicidad inespecífica

Adaptado de Marschner, 1995.

naje de los frutos. Los contenidos de micronutrientes en los intervalos de adecuación varían por un factor de 2, o mayor. El Mn es el nutriente que muestra el intervalo más amplio.

2.3.3. Relación entre nutrientes. Método DRIS (Diagnosis and Recommendation Integrated System)

Existen numerosas interacciones específicas e inespecíficas entre los nutrientes minerales de las plantas que afectan a las concentraciones de nutrientes y a la producción vegetal. Así, con contenidos bajos de P en maíz, un aumento de N en la hoja bandera del 2.1 al 2.9 % tiene poco efecto en la producción y, sin embargo, con altos contenidos en P, la producción crece cuando el porcentaje de N en la hoja bandera pasa del 3.0 %.

Las interacciones entre dos nutrientes son importantes cuando los contenidos de ambos se encuentran cercanos al intervalo de deficiencia. El aumento del aporte de uno de los nutrientes estimula el crecimiento, lo que podría provocar o inducir la deficiencia del otro por un efecto de dilución. En principio, estas interacciones inespecíficas son válidas para cualquiera de los nutrientes minerales de las plantas. Por tanto, las relaciones óptimas entre nutrientes son frecuentemente tan importantes como los contenidos absolutos. Por ejemplo, una relación N/S próxima a 17 se considera adecuada para la nutrición azufrada de trigo y soja. Sin embargo, las

relaciones óptimas consideradas de forma aislada son insuficientes, porque pueden conseguirse cuando ambos nutrientes se encuentren en intervalos deficientes, o bien, en los de toxicidad.

Dada la importancia de la relación de nutrientes en el análisis de la planta con fines de diagnóstico, se ha introducido un nuevo concepto **Sistema integrado de diagnóstico y recomendación (DRIS)**. El sistema se basa en la recogida del mayor número posible de datos respecto a los contenidos de nutrientes minerales en la planta (hasta ahora, macronutrientes), y el uso de esos datos para el cálculo de relaciones óptimas entre nutrientes (índices nutritivos o relaciones normalizadas), por ejemplo, las relaciones N/P, N/K, etc. Los índices de nutrientes calculados por DRIS son menos sensibles a los cambios que se producen durante la maduración de la hoja y la ontogénesis, pero dependen en cierto grado de la localización. Por ejemplo, el índice N/P para hoja bandera de maíz tiene un valor medio de 10.13, pero es de 8.91 en Sudáfrica y de 11.13 en el sudoeste de Estados Unidos.

Las relaciones normalizadas o índices nutritivos son valores medios obtenidos a partir de varios miles de experimentos de campo. Actualmente, el uso de modelos informatizados facilita la obtención y manejo de estos índices. Para determinados cultivos y en ciertas condiciones (lugares de alta producción, sistemas de cultivo a gran escala), una elevada inversión económica en aspectos analíticos puede resultar rentable, ya que el DRIS permite una interpretación más fina de los resul-

Cuadro 8-2. Intervalos de suficiencia de la concentración de nutrientes en tejidos vegetales de distintos tipos de planta

Especie (órgano)	Contenidos (% en peso seco)					Contenidos (mg · kg ⁻¹ peso seco)				
	N	P	K	Ca	Mg	Mn	Zn	Cu	B	Mo
Trigo (toda la parte aérea)	3.0-4.5	0.3-0.5	2.9-3.8	0.4-1.0	0.15-0.3	30-100	20-70	5-10	5-10	0.1-0.3
Maíz (hoja madura) ^a	2.7-3.5	0.4-0.7	2.5-3.5	0.7-1.0	0.20-0.5	30-300	20-150	5-25	8-25	0.5-1.0
Remolacha (hoja madura)	4.0-6.0	0.35-0.6	3.5-6.0 ^b	0.7-2.0	0.30-0.70	40-100	20-80	7-15	40-100	0.25-1.0
Algodón (hoja madura)	3.6-4.7	0.3-0.5	1.7-3.5	0.6-1.5	0.35-0.8	35-100	25-80	8-20	20-80	0.6-2.0
Tomate (hoja madura)	4.0-5.5	0.4-0.65	3.0-6.0	3.0-4.0	0.35-0.8	40-100	30-80	6-12	40-80	0.3-1.0
Alfalfa (parte aérea superior)	3.5-5.0	0.3-0.6	2.5-3.8	1.0-2.5	0.3-0.8	30-100	25-70	6-15	35-80	0.5-2.0
Manzano (hoja madura)	2.2-2.8	0.18-0.30	1.1-1.5	1.3-2.2	0.20-0.35	35-100	20-50	5-12	30-50	0.1-0.3
Naranja (hoja madura)	2.4-3.5	0.15-0.3	1.2-2.0	3.0-7.0	0.25-0.7	25-125	25-60	6-15	30-70	0.2-0.5
Abeto (acículas de 1-2 años)	1.35-1.7	0.13-0.25	0.5-1.2	0.35-0.8	0.1-0.25	50-500	15-60	4-10	15-50	0.04-0.2

(a) De Jones *et al.* 1991.

(b) Contenido de Na por debajo de 1.5%.

Adaptado de Marschner, H., 1995.

tados y, por tanto, una adecuada recomendación de abonado, como se ha podido comprobar para remolacha azucarera, maíz y frutales. Sin embargo, con otras condiciones ambientales, los resultados obtenidos con el DRIS han sido menos favorables y, sin duda, no es el método más recomendable en sistemas de producción con una diversidad amplia de cultivos anuales, o para sistemas de producción reducida y de cultivo a pequeña escala.

2.4. Otros métodos de análisis y de diagnóstico de nutrición

El contenido total de un nutriente en hoja es lo que con mayor frecuencia se determina en el análisis vegetal, si bien existen otros métodos de estudio para conocer el estado nutricional de las plantas, como son: a) la fracción de nutrientes, b) el análisis de savia y c) los métodos histológicos y bioquímicos.

Fracción de nutrientes. La determinación de sólo una parte o fracción del contenido total de un nutriente en hoja, por ejemplo, la que es soluble en agua o en un ácido diluido o en un agente quelante, en ocasiones, refleja mejor el estado nutricional de la planta. En el análisis de planta como base para una recomendación de abonado, esta afirmación es aplicable para el nitrato, que es la forma principal del N de reserva en muchas especies vegetales. Las limitaciones más importantes que puede tener este método tienen que ver con las es-

pecies que reducen el nitrato preferentemente en las raíces, como algunos miembros de las rosáceas, o cuando el N amoniacal se añade y se absorbe antes de ser nitrificado en el suelo. Esta situación podría darse en suelos con alto contenido en N orgánico y con altas tasas de mineralización durante los períodos en los que el cultivo tiene una elevada demanda de nitrógeno. La determinación de una fracción definida de nutriente puede ofrecer no sólo una mejor caracterización de las reservas almacenadas en planta (p. ej., N-nitrato o S-sulfato), sino también la disponibilidad fisiológica del nutriente en el tejido. Por ejemplo, la extracción de Fe(II) de hojas con ácidos diluidos o agentes quelantes, para caracterizar la denominada «fracción activa» de Fe, puede mejorar la relación entre el contenido de Fe y el de clorofilas en hojas de plantas cultivadas en campo.

Análisis de savia. De los métodos propuestos para la extracción de savia, destacaremos dos: la savia de presión y el exudado de xilema. En el primer método, los tejidos conductores, tallos y pecíolos, se someten a presión en un medio éter etílico y, posteriormente, por decantación del medio acuoso, se obtiene lo que se denomina «savia». Más bien se trata de un jugo de tejidos conductores, en el que además del fluido de xilema tendremos contenidos celulares, sobre todo vacuolares, de las muestras prensadas.

La savia de xilema se obtiene por decapitación de la planta a unos 2 ó 3 cm por encima del comienzo de la raíz y la subsiguiente recolección del exudado que fluye

del corte. Aquí, el líquido que extraemos es más diluido que en la savia de presión.

La hoja, por análisis foliar, proporciona información sobre lo que ha ocurrido hasta el momento del muestreo, pero difícilmente reflejará alteraciones ocasionales que pueden afectar a los sumideros. En cambio, la savia informa de lo que está ocurriendo en la planta en el momento preciso de la toma de muestra. Se ha utilizado en el estudio de antagonismos nitrato-cloruro, calcio-potasio, en el análisis de N-nitrato como indicador de fertilización nitrogenada en cultivo de remolacha, etc. En cultivos leñosos, el nivel de N orgánico en savia corresponde a N proteico y de aminoácidos que, junto a los azúcares tanto reductores como totales, nos informa de las reservas del cultivo. El análisis de savia permite, por tanto, un diagnóstico precoz de nutrición y, eventualmente, la introducción de medidas de corrección en el abonado o en el riego, con el fin de mejorar la producción en el mismo ciclo de cultivo.

Métodos histoquímicos y bioquímicos. Las alteraciones nutricionales están generalmente relacionadas con cambios típicos en la estructura fina de la célula, de sus orgánulos y del tejido. Los estudios con microscopio óptico de las modificaciones en la anatomía y morfología de la hoja pueden ser útiles para el diagnóstico de las deficiencias de Ca, Cu, B y Mo.

Los métodos enzimáticos relacionados con enzimas marcadoras ofrecen otra aproximación para conocer el estado nutricional de las plantas. Estos métodos se basan en el hecho de que la actividad de ciertas enzimas es menor o mayor (dependiendo del nutriente) en tejidos normales que en los deficientes. Ejemplos se han dado para el Cu y la ascorbato oxidasa, el Zn y la aldolasa o la anhidrasa carbónica y para el Mo y la nitrato reductasa. Se realizan bien por determinación de la actividad actual de la enzima en el tejido después de la extracción, bien por determinación de la actividad inducible de la enzima después de que el tejido se haya incubado con el nutriente en cuestión, como con la actividad peroxidasa con el Fe o la nitrato reductasa con Mo. Para determinar el estado nutricional de Mn, se puede utilizar la actividad superóxido dismutasa (SOD-Mn) en hojas como marcador bioquímico.

También pueden emplearse métodos bioquímicos para determinar el estado nutricional de macronutrientes. La acumulación de putrescina (véase Capítulo 22) en plantas deficientes en K se ha utilizado como indicador bioquímico de los requerimientos de K de la alfalfa. La actividad inducible de nitrato reductasa puede ser utilizada como indicador del estado nutricional de N.

En principio, el potencial de los métodos bioquímicos, biofísicos y enzimáticos está en la resolución de algún caso particular de alteración nutricional y sirve más como complemento que como alternativa al análisis foliar, dado el problema de la calibración de estos métodos.

3. SUMINISTRO DE NUTRIENTES EN LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

Las previsiones medias de las Naciones Unidas (ONU) estiman que la población mundial alcanzará los 6100 millones de habitantes en el año 2000. El crecimiento demográfico con el incremento del nivel de vida harán que la demanda de alimentos y otros productos agrícolas aumente a un ritmo anual del 3.1 %. Durante los últimos años, la producción de alimentos creció a razón de una tasa anual media del 3.2 % en los países en vías de desarrollo y del 2 % en los países desarrollados. La FAO (Organización de Agricultura y Alimentos de la ONU) indica que un tercio de ese incremento se debió a una expansión de la superficie cultivada y dos tercios, al aumento específico del rendimiento de los cultivos. Evidentemente, para mantener e, incluso, incrementar estos resultados se necesita, además de mejorar las prácticas agrícolas, un mayor empleo de fertilizantes que sea, a su vez, respetuoso con el medio ambiente y no implique una contaminación del mismo.

El otro gran factor limitante es el agua. Actualmente, aunque sólo el 15 % del total de la tierra arable del mundo es de regadío, ésta produce el 36 % del rendimiento total de las cosechas. Una utilización adecuada de los fertilizantes implica que los cultivos tengan un suministro suficiente de agua. Por tanto, existe una relación estrecha entre ambos aportes. La agricultura representa aproximadamente el 75 % de todo el consumo de agua. En consecuencia, el riego puede ser muy caro y su control, complejo. Problemas como el de la salinidad, la erosión, la excesiva utilización de agua freática y su contaminación o las inundaciones causadas en muchos casos por una deforestación desmesurada, son aspectos que condicionan la utilización del agua para riego en agricultura.

En síntesis, el crecimiento y el rendimiento de los cultivos están regulados, aparte de por las condiciones ambientales y las nuevas variedades de planta, por la disponibilidad de agua y nutrientes. Así, por ejemplo, en el cultivo de cereales, básicos en la alimentación, hemos pasado de 1.2 ton/ha/año de mediados del siglo XX a 2.5 ton/ha/año en la actualidad.

La aplicación de macro y micronutrientes ha contribuido de forma sustancial al enorme incremento de la producción de alimentos que ha tenido lugar en los últimos cien años. Sin embargo, en los países desarrollados, el uso excesivo de fertilizantes ha generado graves problemas de contaminación de nutrientes. En estos lugares, se ha hecho prioritario mantener el equilibrio de nutrientes en el suelo y nutrientes en el cultivo, de forma que se minimicen las pérdidas al medio ambiente y, también, obtener cultivares de alta eficiencia para suelos con altos niveles de nutrientes. En cambio, en los países en vías de desarrollo, el principal factor limitante de la producción agrícola es la baja fertilidad de los suelos. Aquí, el objetivo de alcanzar una mayor producción está relacionado con impulsar los métodos de diag-

nóstico de las deficiencias y toxicidades de suelos no fertilizados, con la incorporación de una cantidad mínima de fertilizantes y a un coste bajo, y con el desarrollo de cultivares con alta eficiencia de nutrientes para suelos deficientes, o cultivares tolerantes frente a toxicidades naturales. La preocupación de los países desarrollados por la contaminación impide, en ocasiones, contemplar la necesidad urgente de fertilizantes y de estudios de fertilidad que tienen los países en vías de desarrollo para producir más alimentos por hectárea, como alternativa a la obtención de nueva tierra cultivable, por ejemplo, por tala y quemado de áreas forestales.

3.1. Nuevas técnicas de producción agrícola. Fertirrigación

La fertirrigación es una técnica de cultivo que ofrece la posibilidad de realizar una fertilización día a día, en función del proceso fotosintético y exactamente a la medida de un cultivo, de un sustrato y de un agua de riego definidos y para unas condiciones ambientales determinadas. La técnica permite una dosificación adecuada de fertilizantes y fitosanitarios en un sistema de riego localizado, que ofrece numerosas ventajas frente al riego tradicional en cuanto a la cantidad y a la calidad de agua que utiliza.

En España se estima que existen unas 300 000 ha de superficie fertirrigada, un 6 % de la superficie total de regadío, de las que más de 50 000 ha lo son de invernadero, correspondiendo a Almería prácticamente la mitad de esta superficie, el mejor exponente de esta nueva técnica de riego y fertilización. En estos momentos, somos el segundo país del mundo después de Estados Unidos que, con 900 000 ha, ocupa el primer lugar. Normalmente, la fertirrigación se utiliza en cultivos intensivos, de elevado coste y rendimiento, en instalaciones bajo cubierta plástica, aunque también puede hacerse en campo abierto. Los componentes fundamentales de un sistema de cultivo con fertirrigación son: el sustrato de cultivo (orgánico o inorgánico), la disolución fertilizante, el sistema de riego (bomba de agua, filtros, inyectores, electroválvulas, goteros, ...) y la planta (Figura 8-3).

Se utilizan sustratos artificiales distintos del suelo debido a: 1) la necesidad de transportar plantas; 2) la existencia de factores limitantes para la continuidad de los cultivos intensivos en un suelo natural, como agotamiento, salinización y enfermedades; y 3) la posibilidad de un mayor control del ambiente radicular, en aspectos relacionados con el suministro de agua y nutrientes. Los sustratos más utilizados son turbas, arena, lana de roca o *rock-wool*, perlita y otros materiales alternativos, como corteza de pino, fibra de coco, escorias de fundición, etc.

El cabezal de riego en un sistema de fertirrigación consta de distintos módulos para la mezcla y dosificación de los fertilizantes con el agua de riego, con ayuda

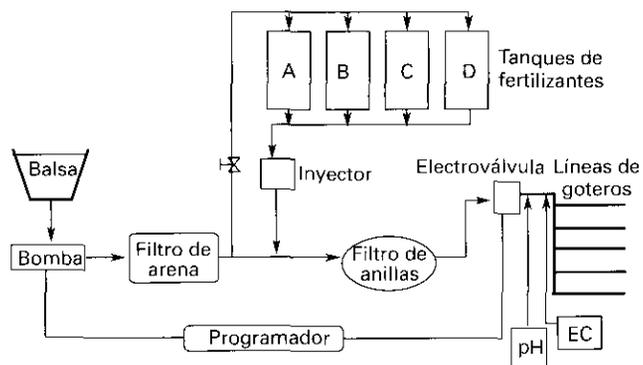


Figura 8-3. Esquema de un sistema de fertirrigación. Tanques A, B y C para las disoluciones de nutrientes, que son entre 100 y 1000 veces superiores a las requeridas por los cultivos. Suele existir un cuarto tanque con ácido nítrico o ácido fosfórico, con la misión de desobturar goteros y controlar el pH de la disolución nutritiva. El inyector permite la mezcla de los fertilizantes con el agua de riego, dando lugar a la disolución nutritiva que se desea. Las electroválvulas regulan y distribuyen el flujo de disolución hacia los goteros. Se sitúan medidores de control del pH y conductividad eléctrica (EC).

de un programa de tiempos y diluciones, como se observa en la Figura 8-3. Los distintos tipos de disolución fertilizante que se utilizan en fertirrigación tienen como modelo las disoluciones nutritivas que se emplean en hidroponía (como la que se menciona en el Cuadro 6-4). Actualmente, se comercializan nuevos fertilizantes para ser utilizados específicamente en fertirrigación que deben ser solubles. Lógicamente, en el diseño de las disoluciones se tienen en cuenta los contenidos salinos del agua de riego, las interacciones con el sustrato y las necesidades del cultivo.

La fertirrigación permite un mejor aprovechamiento de los fertilizantes, dada la precisión en la incorporación de los mismos cerca de las raíces, disminuyendo las pérdidas por lixiviación y volatilización. Se puede conseguir una adecuación continua del abonado a las necesidades del cultivo. Algo parecido sucede con el gasto de agua, ya que se necesitan menores cantidades para mantener húmeda la raíz, lo que implica una reducción en las pérdidas por percolación y por evaporación, así como una distribución controlada del agua en la zona radicular. También existe la posibilidad de adicionar a los cultivos, a través del agua de riego, otros productos como fitosanitarios, bioestimulantes, etc. Podemos resumir que, con esta técnica de cultivo, conseguimos una disminución de la contaminación difusa del suelo y las aguas freáticas y un incremento en el rendimiento de los cultivos.

Los inconvenientes principales de la fertirrigación son el elevado coste de la instalación y el mantenimiento del sistema, además de una cualificación técnica del agricultor para el buen uso del mismo. Además, se producen distintos residuos, como las disoluciones de fertilizantes desechadas, los plásticos y los sustratos de cultivo, que tienen una vida comercial corta.

3.2. Macro y micronutrientes. Quelatos

Los fertilizantes que se emplean en fertirrigación han de ser solubles en agua o, directamente, líquidos. La industria ha desarrollado una serie de productos para ser utilizados en los sistemas de riego, de mayor calidad y variedad respecto a los fertilizantes tradicionales.

Los fertilizantes sólidos de macronutrientes, además de ser perfectamente solubles, han de cumplir dos objetivos: a) ser compatibles entre sí, sin que originen reacciones cruzadas que den lugar a precipitaciones indeseadas. Normalmente, se preparan dos disoluciones concentradas, separando las sales cálcicas de las de fosfato y sulfato y, b) la concentración salina que proporcionan al mezclarse con el agua de riego no debe superar los valores críticos de salinidad de cada cultivo.

En fertirrigación, más que en ningún otro sistema de cultivo, se hace necesaria la aplicación de micronutrientes, ya que las raíces de las plantas, confinadas en el bulbo de goteo, sólo van a poder explorar una pequeña parte del sustrato, cuyo contenido en micronutrientes puede ser insuficiente para el buen desarrollo del cultivo. Además, los fertilizantes de macronutrientes que se emplean en fertirrigación son más puros que los tradicionales y contienen menos micronutrientes como impurezas. Es decir, los micronutrientes se aportan en menor cantidad y, sin embargo, se requieren en mayor medida, dado que el sistema asegura el suministro de elementos mayores. En consecuencia, es más probable que los oligoelementos se constituyan como factores limitantes de la producción. Las sales solubles de micronutrientes, sobre todo las de hierro, tienden a precipitar como hidróxido de Fe, pudiendo interferir con otros nutrientes como el fósforo, con lo que no estarán disponibles para la planta y provocar, además, la obturación de los goteros.

Un quelato es un tipo de complejo en el que un ion metálico (Fe, Cu, Zn, Mn, etc.) se une por varios puntos a una molécula orgánica (agente quelante), de manera que el ion quelado cambia sus propiedades y normalmente, aumenta su estabilidad en disolución. Los quelatos más utilizados son derivados poliaminocarboxílicos, siendo el EDTA (ácido etilén-diamino-carboxílico) el agente quelante más conocido, si bien hay otros que forman quelatos con Fe más estables, como el EDDHA (ácido etilén-diamino-di-ortohidroxi-fenilacético) (Fig. 8-4). En la actualidad, se recomienda el uso exclusivo de quelatos solubles o en disolución para la aplicación de los nutrientes metálicos. En el vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales de 1996, aparecen 153 productos férricos con distintos agentes quelantes o complejos orgánicos y ninguna sal inorgánica de Fe. Para el resto de los metales, también existe una mayoría de fertilizantes a base de complejos y quelatos y sólo unos pocos productos inorgánicos. Incluso los nutrientes B y Mo se comercializan como complejos con diferentes materiales orgánicos.

La aplicación de Fe como quelato férrico es la mejor

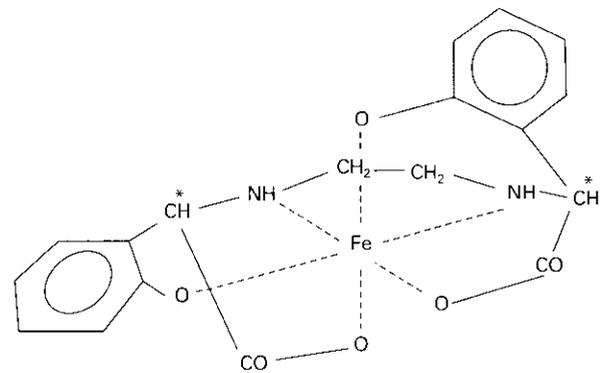


Figura 8-4. Fórmula desarrollada de la molécula del quelato Fe-EDDHA (EDDHA = ácido etilén-diamino-di-ortohidroxi-fenilacético).

forma de corregir la clorosis férrica, si bien puede resultar algo cara. En nuestro país se está utilizando con éxito en cultivos sensibles a la clorosis y de alto valor añadido, o en invernaderos con tecnología de fertirrigación.

4. INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO

Existe una región del suelo definida como **rizosfera** donde se ponen de manifiesto numerosas interacciones entre las raíces de la planta y los microorganismos del suelo, especialmente bacterias y hongos. Estas interacciones raíz-microorganismos resultan, a veces, tremendamente complejas e implican en muchos casos la invasión de la raíz por dichos microorganismos, o bien permanecen libres en el suelo. En cualquier caso, las interacciones pueden producir un beneficio a la planta o bien lesiones o enfermedades. Durante años, estos sistemas han atraído la atención de los microbiólogos; pero, con la excepción de los organismos fijadores de nitrógeno, no es hasta estos últimos años que ha surgido un interés similar en los fisiólogos vegetales. En este sentido, el estudio de las **micorrizas** ha demostrado su importante papel en la nutrición mineral de numerosas familias de plantas, tanto de interés agrícola como, principalmente, en silvicultura.

El objetivo actual de alcanzar y mantener una **agricultura sostenible** se basa especialmente en el mejor conocimiento de estos dos aspectos de la interacción planta-microorganismos que son la fijación biológica del nitrógeno en simbiosis y las micorrizas, comentados a continuación.

4.1. Fijación biológica del nitrógeno

Como ya se dijo en el Capítulo 6, las plantas toman preferentemente el nitrógeno como NO_3^- y también, aunque de forma secundaria, como NH_4^+ (véase también Capítulo 15). Sin embargo, gracias a las asociacio-

nes simbióticas de determinados organismos, algunas plantas, principalmente leguminosas, son capaces de reducir el N_2 atmosférico y asimilarlo. Aunque este aspecto se trata de forma exhaustiva en el Capítulo 16, en este apartado se describe la proyección agrícola de la fijación de N_2 .

El nitrógeno junto con el déficit hídrico son los factores limitantes más importantes de la producción agrícola. En consecuencia, el nitrógeno inorgánico se ha convertido en el principal fertilizante utilizado con resultados verdaderamente espectaculares. Así, por ejemplo, con sólo un aumento del 10% en la superficie cultivada, en 25 años se duplicó la producción de cereales en el mundo, al pasar de un aporte nitrogenado de 8 kg/ha/año empleados al finalizar la Segunda Guerra Mundial a 125 kg/ha/año utilizados en la década de los setenta. Actualmente, se vienen utilizando un promedio de 150 kg/ha/año en los países del primer mundo.

Frente a los métodos industriales, principalmente el método de Haber-Bosch, para la obtención de fertilizantes nitrogenados, que resultan muy caros desde el punto de vista energético y, potencialmente, contaminantes tanto de las aguas como del suelo, la fijación biológica del nitrógeno se presenta como una alternativa económicamente rentable y ecológicamente limpia. La fijación total de nitrógeno en la biosfera se eleva a 275 millones de toneladas anuales; de ellas, 175 millones se fijan biológicamente, existe una fijación industrial de 70 millones y una fijación espontánea del orden de unos 30 millones. Así, la fijación biológica supone algo más del 60%, de la cual la mitad corresponde a la simbiosis del sistema *Rhizobium*-leguminosas. Desde hace más de veinte siglos, las leguminosas se vienen utilizando empíricamente en la cuenca del Mediterráneo y en otros lugares para restaurar la fertilidad de los suelos mediante la **rotación de los cultivos**. Una mirada a la producción mundial de leguminosas indica que, frente a la producción anual de 200 millones de toneladas, serían necesarias, al finalizar el siglo, 500 millones de toneladas para alimentar a la población mundial. Sin embargo, la producción de leguminosas en los últimos años sólo ha crecido en un 20% debido, entre otras causas, a su complicada nutrición nitrogenada.

Los principales **sistemas simbióticos** son los siguientes:

- a) *Simbiosis Rhizobium-leguminosas*. Es la más estudiada y, en consecuencia, la mejor conocida, aunque presenta todavía toda una serie de problemas de orden ecofisiológico, bioquímico y molecular que aún se desconocen, y que podrían mejorar claramente la producción. Actualmente, el aislamiento de mutantes más eficaces de *Rhizobium* y los adelantos en genética molecular están arrojando mayor luz a la comprensión del proceso y una mayor rentabilidad en la producción de leguminosas (Fig. 8-5 A). Podemos esta-

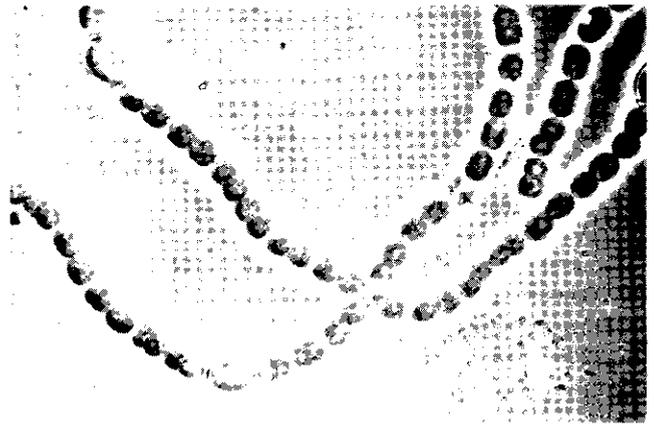
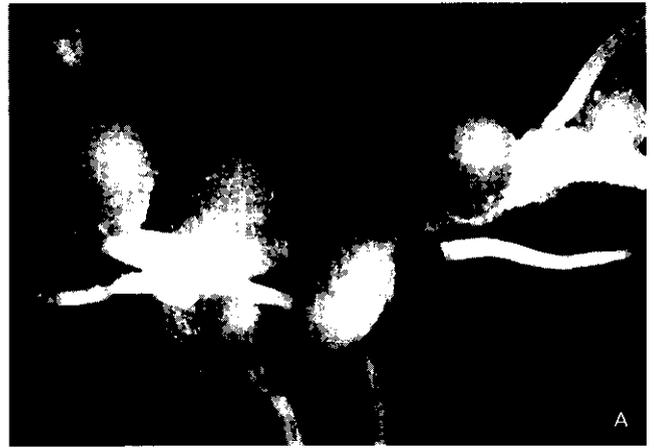


Figura 8-5. A) Detalle de los nódulos resultantes de la simbiosis entre la planta de guisante (*Pisum sativum*) y *Rhizobium leguminosarum*. (Fotografía de L. Bolaños, 1992.) B) *Anabaena*, cianobacteria filamentososa con heterocistos, células especializadas donde se realiza la fijación biológica del nitrógeno. Microscopía de fluorescencia, $\times 1000$. (Fotografía de I. Bonilla, 1986.)

blecer un promedio del nitrógeno fijado por esta modalidad de entre 50-250 kg/ha/año.

- b) *Simbiosis Frankia-no leguminosas*. *Frankia* es una bacteria filamentososa que establece simbiosis con plantas no leguminosas todas ellas leñosas, por lo que tiene una gran importancia en las áreas forestales y en la regeneración de suelos pobres. La biología de *Frankia* es mucho peor conocida que la de *Rhizobium* ya que, contrariamente a lo sucedido con la anterior, no fue aislada y cultivada *in vitro* hasta 1968 por el grupo de J. Torrey de la Universidad de Harvard. La simbiosis que establece con las plantas del género *Casuarina* es la mejor conocida de este tipo. Son plantas originales de Australia y Sureste asiático, árboles de crecimiento rápido que pueden servir de cortavientos en las regiones de predeseierto, para la protección de los cultivos contra la arena. También sirven para fijar suelos erosionados y dunas. Con unas 70 especies, actualmente están aclimatadas a todas las regiones tro-

picales y subtropicales. Existe también simbiosis de *Frankia* con otras plantas, siempre leñosas, de diversos órdenes como *Rosales*, *Fagales* y *Myricales*, etc. Podemos establecer un promedio de nitrógeno fijado por esta modalidad de entre 30-230 kg/ha/año.

- c) *Simbiosis cianobacterias-Azolla*. Ya 2000 años a. de C., en los arrozales chinos y vietnamitas, se utilizaba el helecho acuático *Azolla* que establece una simbiosis con cianobacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente del género *Anabaena* (Fig. 8-5B). Tanto en simbiosis como en forma libre, estas cianobacterias aportan a los arrozales unos 30 kgN/ha/año; sin embargo, estudios actuales indican que la inoculación previa en los arrozales incrementa un 14 % el rendimiento de grano, lo que equivale a 450 kg de grano/ha/año. Podemos establecer un promedio de nitrógeno fijado por esta modalidad de simbiosis de entre 10-200 kg/ha/año.

4.2. Micorrizas

Muy probablemente, de todas las interacciones entre plantas y microorganismos, la de mayor proyección nutricional sea la que se presenta entre las raíces y los hongos del suelo, en una forma de mutualismo que conocemos como micorriza. A diferencia de lo que sucede con la fijación biológica de dinitrógeno, donde sólo unas pocas familias, principalmente leguminosas, presentan la asociación simbiótica, se han observado micorrizas en más del 80 % de las especies estudiadas, incluyendo prácticamente todas las plantas de interés agrícola y forestal.

Originalmente descubiertas en el siglo XIX por el botánico alemán Frank, éste observó que la inoculación con micorrizas estimulaba la germinación y el crecimiento de las plántulas. Aunque no fueron aceptados en un principio, los estudios actuales han venido a confirmar estos resultados con árboles, tanto en Estados Unidos como en Australia y en la antigua URSS, donde se han obtenido aumentos en el crecimiento de un 30 a un 150 % en semillas inoculadas frente a controles sin inocular. Similares resultados se han conseguido en plantas como el maíz. Sabemos que el papel benéfico de las micorrizas se debe a que aumenta considerablemente la zona en que la raíz es capaz de absorber nutrientes minerales, al establecerse una interacción de las hifas con los pelos radiculares de la planta (Fig. 8-6). Existen dos formas de micorrizas: ectomicorrizas y endomicorrizas.

Las **ectomicorrizas** están restringidas a muy pocas familias (sólo el 3 % de las fanerógamas); son propias de zonas templadas y aparecen mayormente en árboles y arbustos, como pinos (Fig. 8-6 C) y hayas (Fagáceas). Suelen ser cortas y muy ramificadas y las hifas del hongo penetran sólo en el espacio libre radicular (hasta la banda de Caspari), pero no en el interior de las células,

formando una red intercelular en el apoplasto que se denomina **red de Hartig** (Fig. 8-6 A).

Las **endomicorrizas** se encuentran en especies de casi todas las familias de angiospermas y en la mayoría de las gimnospermas, excepto las pináceas. Son, sin duda, las más abundantes, encontrándose en todos los climas y continentes a excepción de la Antártida. Presentan tres tipos, de los cuales el más numeroso es el de las micorrizas vesículo-arbusculares (VA). A diferencia de las ectomicorrizas, los hongos de las micorrizas VA, miembros de la familia *Endogonaceae*, parecen penetrar de manera directa en el citosol de las células corticales, donde configuran esas formas arbusculares y vesicales que dan nombre a este tipo de micorrizas. Las hifas se ven rodeadas de una membrana plasmática invaginada de las células corticales (Fig. 8-6 B).

Tanto en unas como en otras micorrizas, la planta suministra azúcares para mantener el metabolismo del hongo y éste, por su parte, mejora la capacidad de la raíz para absorber iones de difusión lenta o iones que la planta requiere en cantidades elevadas, como fosfato, amonio, nitrato y potasio (véase Capítulo 7). Muchas comunidades de árboles no crecerían sin la ayuda de las micorrizas, como sucede en numerosos suelos poco fértiles o en árboles crecidos en terrenos que no son los suyos originarios, como es el caso de árboles europeos introducidos en América, que no crecen hasta que no son inoculados con los hongos tomados de sus suelos originarios. Como puede verse, se trata de una relación simbiótica y mutualista, con un claro beneficio mutuo, donde el hongo recibe nutrientes orgánicos de la planta, y ésta ve mejorada su capacidad de absorción de agua y sales minerales.

Zonas muy degeneradas ambientalmente, como márgenes de carreteras, o contaminadas por rellenos industriales, mineros, sanitarios, etc., son regeneradas más fácilmente gracias a la introducción de **plantas micorrizadas**. Las micorrizas así como la fijación biológica de dinitrógeno se han configurado como dos de las estrategias científicamente aceptadas para una agricultura sostenible.

5. PROBLEMAS DE PRODUCCIÓN EN CONDICIONES DE ESTRÉS

La incapacidad de desplazamiento es una característica diferencial de las plantas que condiciona de forma absoluta su relación con el medio ambiente, y hace que su desarrollo dependa de la capacidad adaptativa que presentan frente a condiciones externas variables, como la luz, la temperatura o la disponibilidad de agua y sales minerales (véase Capítulo 13). En consecuencia, las variaciones ambientales producen situaciones diversas de estrés a las cuales se enfrentan las plantas con mayor o menor éxito según se lo permita la flexibilidad adaptativa de su genoma.

Como se verá con más detalle en el Capítulo 30, en-

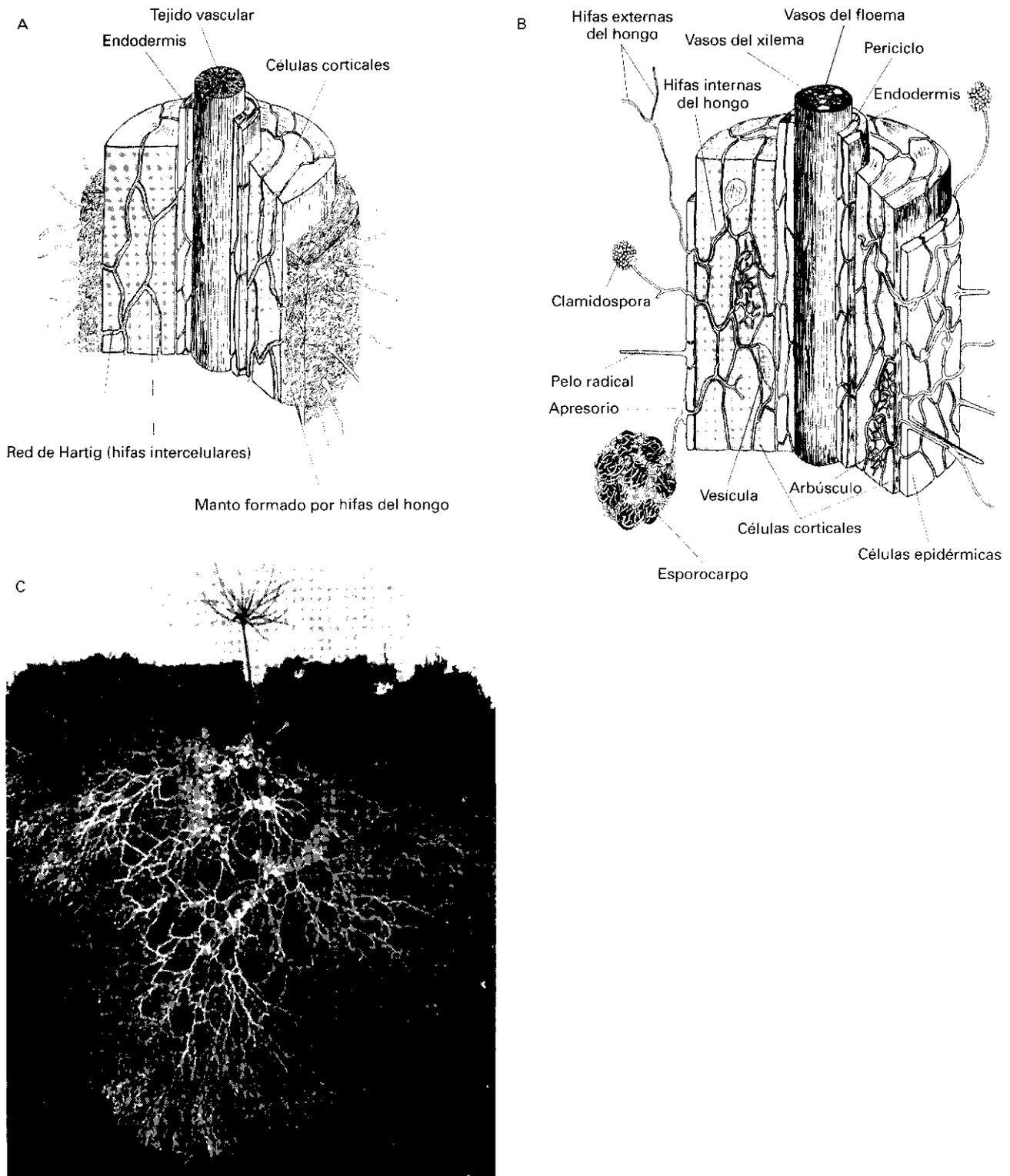


Figura 8-6. A) Las **ectomicorrizas** se caracterizan por el manto de hifas que el hongo produce cubriendo la raíz. El hongo se desarrolla intercelularmente configurando la llamada **red de Hartig**. Sólo un 3% de las plantas superiores forma estas micorrizas, principalmente árboles: pinos, hayas, robles, ... B) Las **endomycorrizas** no forman como las anteriores un manto externo de hifas, sino que se desarrollan en el interior de la raíz, inter e intracelularmente, dando lugar a los elementos morfológicos típicos de la infección: vesículas y arbuscúlos. Representan la mayor parte de las micorrizas, ya que el 96% de las plantas existentes en la naturaleza las poseen. (A y B adaptados de C. Azcón de Aguilar y J. M. Barea, *Biología Vegetal*, Libros de Investigación y Ciencia, 1988.) C) Corte lateral de una plántula de 4 cm de tamaño, de *Pinus contorta*, mostrando un desarrollo espectacular de sus raíces colonizadas por micorrizas. (Adaptado de Brock, *Microbiología*.)

tre las causas más frecuentes de estrés en las plantas destacan: el estrés hídrico, también tratado en el Capítulo 4; las bajas temperaturas; la salinidad y la acidez de los suelos, este último aspecto en estrecha relación con los metales pesados. Nosotros estudiaremos en este apartado, dada su importancia, la relación existente entre las condiciones de salinidad y acidez y basicidad de los suelos con la producción agrícola.

5.1. Salinidad

La salinidad es, quizás, el problema de contaminación más antiguo de los suelos agrícolas. Las sales presentes en el agua de riego se acumulan a un ritmo más o menos acelerado y determinan la degradación y la pérdida del valor agrícola de los suelos. Este problema es más acuciante en zonas áridas y semiáridas, donde las precipitaciones son insuficientes para lavar las sales solubles aportadas al suelo. La historia de las grandes civilizaciones es, en gran medida, la historia de la agricultura de irrigación, y ésta no puede perdurar ilimitadamente sin un control adecuado del equilibrio entre la salinidad de las aguas de riego, la salinidad nativa del suelo y la capacidad de drenaje del mismo, para permitir que el exceso de sales sea lixiviado de la zona radicular de los cultivos.

La salinidad de un suelo viene determinada por la conductividad eléctrica (EC) de su fase acuosa. Un suelo agrícola debe presentar un valor de EC inferior a 2 miliSiemens (mS), lo que representa un porcentaje menor del 10% de la salinidad del agua del mar, valor suficiente para que sólo las plantas tolerantes a la salinidad puedan desarrollarse en estas condiciones. La utilización de nuevas variedades y, sobre todo, de nuevas tecnologías de riego está permitiendo mejorar estos niveles de tolerancia.

Un problema todavía más grave que el exceso de sales es la carga de sodio (sodicidad), con efectos directos sobre la estructura del suelo, especialmente cuando éste es arcilloso, lo que provoca un descenso de la permeabilidad y, con ello, un menor desarrollo radicular, con los consiguientes problemas en la absorción de nutrientes, principalmente K, Ca y P.

Por tanto, el efecto negativo de la salinidad en los cultivos se debe a dos tipos de estrés: (1) el estrés hídrico, al reducirse la absorción de agua por el efecto osmótico; y (2) la toxicidad iónica relacionada con la excesiva absorción de sodio, que desencadena un desequilibrio iónico en la planta (Fig. 8-7). En el primer caso (1), existe una respuesta de la planta en el sentido de incrementar la producción intracelular de sustancias solubles, como betaína, prolina, sacarosa, manitol, glicerol, etc., que disminuyen el potencial hídrico intracelular y facilitan la entrada del agua; de lo contrario, no sólo no entraría agua del medio exterior, sino que ésta tendería a salir de las células radiculares, secándose la planta. Hortalizas, legumbres y frutales son cultivos especialmente sensibles a la salinidad. En el segundo caso

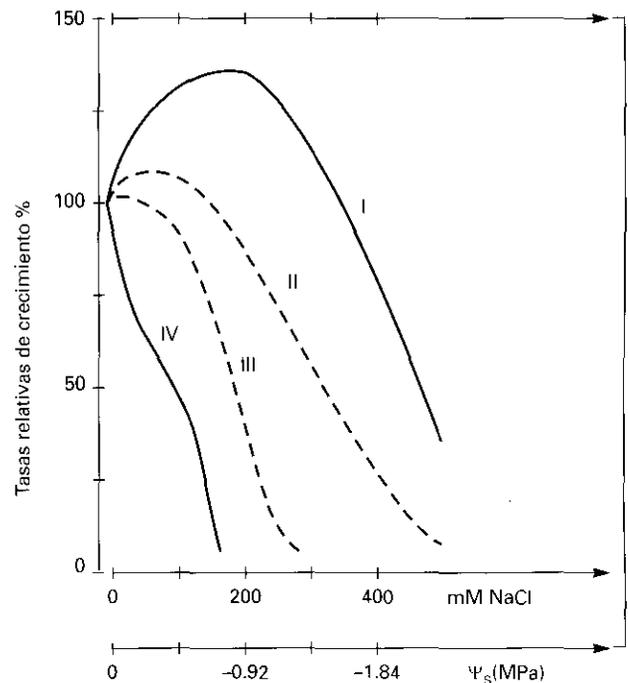


Figura 8-7. Respuesta del crecimiento de distintas especies de planta frente a un incremento en la salinidad y en el potencial osmótico. I, Halófitas. II, Cultivos halófilos relacionados con I, como la remolacha azucarera. III, Cultivos tolerantes a la salinidad, como la cebada. IV, Especies sensibles, como el guisante. (Adaptado de Marschner, 1995.)

(2), el Na puede desplazar el Ca de las membranas celulares, modificando la absorción de nutrientes como el K. Sin embargo, se ha observado que si existe un aporte suplementario de Ca, el proceso de captación de K funciona bien, en detrimento del Na que compite con el K por medio de un mecanismo de baja afinidad. Así, pues, la fertilización con Ca mejora la producción agrícola al incrementar la absorción de K y reducir el eflujo de nitrato y fosfato e, incluso, del propio K. Recientemente se ha propuesto que el efecto positivo del Ca se debe a su capacidad para reactivar las **acuaporinas**, proteínas que forman canales de agua en las membranas y que permiten el paso libre de agua en respuesta a cambios de la presión osmótica e hidrostática. Estas acuaporinas se ven rápidamente inactivadas ante la presencia de NaCl y aunque todavía se sabe muy poco sobre la regulación de las mismas, se ha observado que su apertura depende de fosforilación que, en último término, viene regulada por la concentración de Ca intracelular.

Las estrategias más habituales que han seguido las plantas halófilas (*halófitas*) para adaptarse al crecimiento en zonas salinas pueden resumirse en las siguientes:

- Disminución de la absorción de Na^+ , mediante desarrollo de transportadores muy específicos para K^+ .
- Presencia de bombas de extrusión de Na^+ en la membrana plasmática de las células del córtex.

El sodio será bombeado activamente fuera de la célula mientras que su entrada será pasiva; es el caso de *Agropyrum junceiforme*.

- c) Excreción de NaCl por glándulas secretoras (hidatodos) en las hojas, como sucede en los géneros *Atriplex*, *Tamaris*, *Spartina*, etc.
- d) Acumulación de exceso de sodio en las vacuolas.
- e) Sustitución parcial del K^+ por el Na^+ en las funciones específicas del K^+ en el citoplasma.

Frecuentemente, las plantas silvestres adaptadas a la salinidad poseen una o varias de estas estrategias para poder desarrollarse en situaciones de estrés salino. Actualmente, se conocen genes resistentes a la salinidad en levaduras, como los genes TRK1, que codifican un transportador altamente selectivo de K^+ frente a Na^+ , y genes ENA, que codifican una bomba de extrusión de Na^+ . Se intenta conseguir plantas transgénicas que incorporen algunos de estos genes de levaduras que las conviertan en plantas altamente resistentes a la salinidad.

5.2. Acidez y basicidad

La mayoría de las plantas crece en suelos que tienen un pH variable entre 4 y 8. En los extremos de este intervalo se producen situaciones de estrés a las que se han adaptado diversas especies. Los mecanismos de competencia han marcado, seguramente, la presencia de dos tipos de plantas: **basófilas**, aquellas que viven en suelos con valores de pH entre 8 y 9; y **acidófilas**, las que viven en suelos con un pH inferior a 4.

El hecho de que exista una estrecha relación entre el pH básico y la presencia de Ca, y viceversa, hace que se haya hablado indistintamente de plantas calcícolas o basófilas por un lado y calcífugas o acidófilas por el otro. Esto no siempre es correcto pues pueden existir suelos con un pH elevado, como los suelos de serpentina, con bajos contenidos en Ca. Si consideramos específicamente la presencia de calcio, en las **plantas calcífugas**, típicas de suelos pobres en Ca, la concentración intracelular de Ca sería baja. Sin embargo, las **plantas calcícolas** tolerarían altas concentraciones de Ca en el suelo y, por tanto, muy probablemente tendrían también altos requerimientos del mismo que mantendrían en disolución en el ámbito intracelular (vacuola y RE) gracias a la formación de malato cálcico. Asimismo, el Ca desempeña un papel aún no bien comprendido en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa que favorece el desarrollo de los nódulos radiculares. Es probable que las características del suelo, como la textura del mismo, tengan una influencia más marcada sobre el crecimiento de las plantas que la propia concentración de H^+ *per se*, aunque el pH incide de forma importante en la solubilidad de numerosos elementos, que estarán o no disponibles para la planta según el pH del suelo. Así, los metales como el Fe y el Cu son menos solubles en suelos alcalinos que en suelos áci-

dos, lo que impide, por ejemplo, el desarrollo de plantas calcífugas en suelos calcáreos, al no poder utilizar el Fe que en esos suelos se encuentra escasamente disponible, provocándose severas clorosis que no manifiestan las plantas calcícolas. En la misma línea, el anión ortofosfato diácido ($H_2PO_4^-$) se absorbe con mayor facilidad a valores de pH entre 5.5 y 6.5, mientras que en suelos básicos se encuentra mayoritariamente como HPO_4^{2-} , que se absorbe peor.

Por otra parte, la disponibilidad de elementos nocivos para la planta, como el aluminio y los metales pesados, aumenta conforme disminuye el pH del suelo. En el caso de Al, el incremento de las lluvias ácidas en Europa Central ha determinado serios problemas de toxicidad por Al, al alterarse la absorción de fósforo y calcio por las plantas. Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos por los que las plantas toleran los efectos de estos metales pesados, existen pruebas de cómo resisten su presencia. Así, algunas plantas acumulan el metal en la pared celular, evitando de esta forma su presencia en el interior celular. En otros casos, los metales pesados son absorbidos en cantidades muy pequeñas aunque su concentración externa sea muy grande. De forma complementaria pueden existir sistemas activos de extrusión de metales. Muy a menudo se encuentra una compartimentación, siendo las vacuolas su principal lugar de acumulación. En combinación con alguno de los citados, existe toda una serie de mecanismos de formación de quelatos que tiene en las fitoquelatinas su principal exponente. Las **fitoquelatinas** son pequeños péptidos ricos en cisteína: entre 2 y 8 restos de cisteína situados en posición central respecto a un ácido glutámico y una glicocola en los extremos amino y carboxi terminales, respectivamente. Los grupos-SH de las cisteínas constituyen los puentes por los que se unen a los distintos metales. Las fitoquelatinas se inducen en presencia de metales pesados, y su papel es similar al de las metalotioninas de los animales.

Las plantas que presentan algunos de los rasgos que implican tolerancia a los metales pesados tienden a ser excluidas de los suelos normales por las no tolerantes, dado que éstas son más vigorosas y presentan una mayor tasa de crecimiento. Sin embargo, las especies o variedades tolerantes son muy útiles al poder crecer en suelos ácidos y/o afectados por la presencia de metales pesados.

6. GENÉTICA Y NUTRICIÓN

La condición de tolerancia a un determinado estrés nutricional como la salinidad, alcalinidad, niveles tóxicos o deficientes, etc., unida a los requerimientos específicos de elementos esenciales, se encuentra bajo control genético, siendo éste uno de los campos de investigación en fisiología vegetal que más necesita la aportación de las nuevas tecnologías.

Podemos trazar una división entre plantas ineficientes y plantas eficientes. El estudio de las plantas inefi-

cientes se basa principalmente en trabajos con mutantes obtenidos en laboratorio. Así, tenemos mutantes de soja ineficientes respecto del Fe, mutantes de maíz ineficientes para el Mg y tomates respecto al B. Mutantes de estas plantas —por ejemplo, de la soja— injertadas sobre raíz normal, no manifestaron los síntomas de clorosis que produce la ausencia de Fe, al ser la raíz la que regula la eficiencia en la absorción y utilización del Fe. Por otra parte, las plantas eficientes pueden encontrarse de forma natural en hábitat pobres en nutrientes, o con cantidades tóxicas de metales pesados, salinos, alcalinos, etc., es decir, en unas condiciones que podrían determinar la muerte de otras especies e, incluso, de otras variedades de la misma especie. Esto quiere decir que se ha producido un mecanismo adaptativo, regulado por la selección natural. En plantas cultivadas de valor agrícola, se han obtenido variedades resistentes por selección dirigida.

Los mecanismos propuestos para explicar las variaciones genéticas que justifican el comportamiento, tanto de las formas eficientes como de las ineficientes, frente a un estrés nutricional se pueden agrupar en tres grandes categorías:

- a) Modificación de la absorción radicular, por cambios en la morfología de la raíz o del mecanismo de absorción y transporte de iones. Así, por ejemplo, en las plantas resistentes al arsenato, el mecanismo de tolerancia va ligado a una supresión del sistema de absorción de fosfato de alta afinidad, el cual le vale al arsenato para ser transportado dentro de la célula. La hipótesis más aceptada es que existe un gen supresor de la síntesis del transportador en las especies tolerantes, pero es inexistente en las no tolerantes.
- b) Alteración del movimiento de los nutrientes a través de las raíces, de su liberación al xilema, y también, de la distribución de los nutrientes en la parte aérea. Así, en casos de deficiencia, una capacidad elevada de redistribución desde las hojas y partes senescentes hacia las zonas de crecimiento de especies eficientes sería muy importante para la supervivencia frente a otras ineficientes, de baja capacidad distributiva. De igual forma, la capacidad de movilizar reservas de Ca, P, etc., desde la vacuola hacia el citoplasma, determinaría la eficiencia de unas plantas frente a otras en situaciones de deficiencias nutricionales.
- c) Cambios en la utilización de nutrientes en el metabolismo y en el crecimiento. Existen diferencias entre especies que, sometidas a estados de deficiencia, son capaces de realizar un metabolismo normal frente a baja concentración de nutrientes. Así sucede, por ejemplo, entre distintas variedades de tomate, que pueden ofrecer cosechas normales con concentraciones muy bajas de K.

Otra posible adaptación es la capacidad de sustituir un elemento por otro. Los casos mejor conocidos son la

sustitución de Na por K en algas halófilas, así como las plantas del género *Astragalus*, capaces de reemplazar el azufre por selenio en los denominados selenoaminoácidos.

Estas potencialidades genéticas se han aprovechado para obtener plantas de interés agrícola capaces de desarrollarse en zonas tanto deficientes como tóxicas en nutrientes o metales pesados. Actualmente, frente a las técnicas clásicas de selección tradicional, se están utilizando técnicas de cultivos *in vitro* y de ingeniería genética que nos permitirán en un futuro muy próximo regenerar suelos contaminados o con altos niveles de estrés, gracias a la utilización de plantas transgénicas capaces de desarrollarse en esas condiciones limitantes para plantas normales.

7. NUTRICIÓN MINERAL Y SU RELACIÓN CON ENFERMEDADES Y PLAGAS

La nutrición mineral puede aumentar o disminuir la resistencia o la tolerancia de las plantas a las plagas y enfermedades. Mientras que la **resistencia** se relaciona con la habilidad del huésped para limitar la penetración, el desarrollo y la reproducción del patógeno invasor o para limitar la alimentación de las plagas, la **tolerancia** se caracteriza por la habilidad de la planta huésped para mantener su crecimiento a pesar de la infección o el ataque de una plaga. Aunque la resistencia y la tolerancia están controladas genéticamente, tienen una influencia considerable los factores ambientales. La nutrición mineral puede considerarse un factor ambiental que puede manipularse con relativa facilidad.

Una nutrición mineral equilibrada asegura un crecimiento óptimo de la planta y, al mismo tiempo, permite una resistencia óptima de la misma, aunque pueda haber algunas excepciones. Con respecto a la tolerancia, hay una norma general por la que las plantas que sufren una deficiencia nutricional presentan una menor tolerancia a plagas y enfermedades. La tolerancia puede aumentarse por el aporte del nutriente deficitario, ya que una planta que crece de forma más vigorosa tiene mayor capacidad de compensar la pérdida de fotosintetizados, o la disminución de superficie foliar producida por una infección.

7.1. Enfermedades fúngicas, bacterianas y víricas

Las enfermedades de las plantas pueden ser causadas por hongos, bacterias y virus, siendo las más importantes las fúngicas. La germinación de esporas de hongos en la superficie de hoja o raíz se estimula por la presencia de exudados. La velocidad de flujo y la composición de los exudados dependen de la concentración celular. Por ejemplo, la concentración de aminoácidos y azúcares es grande en hojas con deficiencia de potasio. Tam-

bién se acumulan aminoácidos cuando el aporte de N es excesivo. La salida de fotoasimilados al apoplasto depende de la permeabilidad de la membrana plasmática, y puede aumentar en condiciones de deficiencia de Ca y B, que aumentan la permeabilidad de la membrana, y con la deficiencia de K, que desacopla la síntesis de polímeros.

La mayoría de los parásitos sólo tiene acceso a las células epidérmicas, que poseen un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides (véase Capítulo 17), que se caracterizan por sus propiedades fungistáticas. El metabolismo de compuestos fenólicos está relacionado, entre otros, con el Cu y el B. La invasión del apoplasto por hongos, y también por bacterias, tiene que ver con la emisión de enzimas pectolíticas que disuelven la lámina media de la pared celular (Fig. 8-8). La actividad de estas enzimas está fuertemente inhibida por el catión Ca^{2+} . No obstante, las enzimas pécticas u otras toxinas fúngicas también pueden aumentar la permeabilidad de la membrana, y provocar así la salida de K^+ o de H^+ que, a su vez, pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad como necrosis localizadas.

Otro mecanismo de defensa, como parte de la respuesta a la infección, es la producción de radicales superóxido, que contribuirán a la respuesta de hipersensibilidad, a la lignificación de la pared celular o a la muerte del patógeno. Dado el papel de Cu, Zn, Mn y Fe en la generación y destrucción de los radicales superóxido, estos nutrientes, como constituyentes de las superóxido dismutasas (SOD), estarán relacionados con la resistencia de la planta en los supuestos planteados.

La lignificación y la acumulación y depósito de sílice en las células epidérmicas pueden formar una barrera física frente a la penetración de las hifas (Fig. 8-8). Estos procesos, relacionados con la nutrición mineral, procuran la principal resistencia estructural de las plantas frente a las plagas y enfermedades, sobre todo en las gramíneas y en la endodermis de la raíz.

El N y el K afectan a la resistencia de los cultivos a las enfermedades y tienen mucha importancia como fertilizantes. Así como el K, al aumentar su nivel en hoja, aumenta la resistencia de la planta frente a parásitos tanto facultativos (*Fusarium*) como obligatorios (*Puccinia*), el N presenta respuestas diferentes: en parásitos facultativos, el incremento de N aumenta la resistencia, mientras que en obligatorios el mayor aporte de N disminuye la resistencia (Cuadro 8-3). La planta deficiente en N es la más resistente a los parásitos obligatorios, ya que éstos se nutren de los asimilados de células vivas, mientras que los facultativos, que son semisaprófitos, prefieren tejidos senescentes. Por tanto, todo lo que apoya la actividad metabólica de la célula huésped y retrasa la senescencia de la planta aumenta la resistencia o tolerancia a los parásitos facultativos.

Los cultivos con deficiencia de K son muy sensibles a los ataques fúngicos. La aplicación de fertilizantes potásicos a estos cultivos disminuye drásticamente la incidencia de ambos tipos de parásito, obligatorio y fa-

cultivo. En plantas deficientes en K, la síntesis de compuestos de alto peso molecular (proteínas, almidón y celulosa) se desacopla, con lo que se acumulan compuestos de bajo peso molecular que favorecen la invasión y el crecimiento de los hongos. Una aplicación de K por encima del nivel óptimo no produce una mayor resistencia de la planta frente a las enfermedades y puede, por el contrario, crear competencia con el calcio o el magnesio y provocar alteraciones fisiológicas que conduzcan a una mayor susceptibilidad de la planta.

El contenido de Ca en los tejidos afecta a la incidencia de parásitos en dos formas: a) el Ca es esencial para la estabilidad de las biomembranas; cuando la concentración de Ca es baja, se favorece la salida de compuestos de bajo peso molecular, como azúcares, al apoplasto y b) se necesitan poligalacturonatos de calcio para estabilizar la lámina media de la pared celular (Fig. 8-8). Muchos hongos y bacterias invaden los tejidos mediante la producción de enzimas pectolíticas tipo poligalacturonasas, que disuelven la lámina media. El Ca inhibe drásticamente la actividad de estas enzimas. Los tejidos vegetales bajos en Ca, respecto de los normales en Ca, son más susceptibles a las enfermedades parasitarias también durante el almacenado. Esto es muy importante para los frutos carnosos frente a las distintas podredumbres. Un remedio eficaz es dar a los frutos un tratamiento de calcio antes del almacenado.

Hay numerosas referencias de los efectos de los micronutrientes sobre las enfermedades parasitarias de las plantas. De los mecanismos de defensa propuestos, el del metabolismo de fenoles y la síntesis de lignina es el mejor conocido en relación, al menos, con el B, el Mn y el Cu. El cobre ha sido y es utilizado ampliamente como fungicida, en unas dosis 100 veces superiores a las que requiere la planta como nutriente.

7.2. Plagas

Las plagas son animales (insectos, arácnidos, nematodos, etc.) que, al contrario que las bacterias y los hongos, tienen sistemas digestivo y excretor, y su dieta es menos específica. Factores como el color de las hojas pueden ser importantes para el reconocimiento u orientación de la plaga. Los mecanismos de resistencia de las plantas son: a) físicos, como el color, propiedades de superficie, o pelos; b) mecánicos, como la fibra o la sílice y, c) químicos o bioquímicos, como el contenido de estimulantes, toxinas o repelentes.

En general, las plantas jóvenes o de crecimiento rápido tienen mayor probabilidad de ser atacadas por las plagas que las plantas viejas o de crecimiento lento. Por tanto, se encuentran buenas correlaciones entre la aplicación de N y el ataque de plagas. Sin embargo, los cultivos suficientes en K sufren menos ataques que los deficientes en K. El contenido en aminoácidos es más importante que el de azúcares frente a los insectos chupadores. Un incremento del contenido de aminoácidos

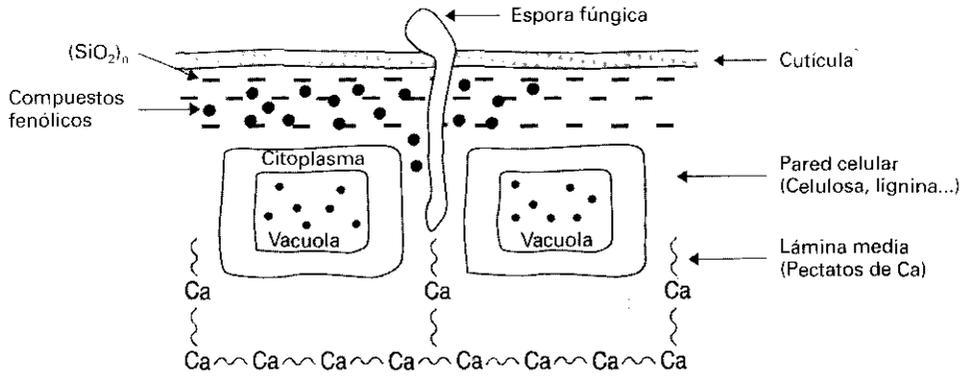


Figura 8-8. Esquema de la penetración de una hifa fúngica desde la superficie foliar hacia las células epidérmicas (apoplasto) y algunos de los factores que afectan al crecimiento del hongo y que están relacionados con la nutrición mineral. (Adaptado de Marschner, 1995.)

es típico de un aporte alto de N o de una anomalía en la síntesis de proteínas, como la debida a ciertas deficiencias de K, S o Zn. Cualquier alteración nutricional que disminuya la presencia de K o produzca directamente el incremento de aminoácidos, disminuirá la resistencia del cultivo a las plagas. Las relaciones planta-plaga son complejas y las observaciones de un caso no se pueden extrapolar para otras plantas y otros ecosistemas. Así, se ha descrito que aportes elevados de N no aumentaban la susceptibilidad de pinos al ataque de insectos herbívoros, posiblemente debido a que el aporte de N no sólo aumentaba el N de la planta, sino que también aumentaba el contenido de diterpenoides, que actúan como aleloquímicos (compuestos del metabolismo secundario que interactúan con otros organismos) (véase Capítulo 17). Las células epidérmicas que contienen depósitos de sílice actúan como una barrera mecánica frente a insectos mordedores y chupadores. Los rocíos foliares con compuestos de silicio reducen la incidencia de los ataques, por ejemplo, de áfidos.

Cabe recordar que los insectos actúan como vectores de virosis, lo que supone una amenaza añadida a la de

una plaga de insectos chupadores. En muchas ocasiones, el estado nutricional de la planta va a influir indirectamente en la enfermedad vírica a través de los vectores, que son hongos o insectos, sobre todo áfidos, responsables del 60% de las virosis.

7.3. Aplicación de fertilizantes y su relación con plagas y enfermedades

La adición de fertilizantes en condiciones de campo afecta a las plagas y enfermedades directamente, a través del estado nutritivo de la planta, e indirectamente, por producir alteraciones, por ejemplo, en la recepción de la luz y en la humedad del cultivo. Además, la época de aplicación (calendario de fertilización) y el tipo de compuesto empleado son factores importantes, fundamentalmente para el N. En la mayoría de los casos, el abonado nitrogenado se añade en dos fracciones, en otoño y en primavera. Así, el nitrógeno aplicado a cereales en zonas de clima templado al comienzo del ciclo de cultivo, normalmente en otoño (abonado de semen-

Cuadro 8-3. Efectos de la concentración de nitrógeno y potasio sobre el grado de patogenicidad de parásitos en diversos cultivos

Patógeno/Enfermedades	Nivel de N		Nivel de K	
	Bajo	Alto	Bajo	Alto
Parásitos obligatorios				
<i>Puccinia</i> ssp./roya	+	+++	++++	+
<i>Erysiphe graminis</i> /mildeu	+	+++	++++	+
Parásitos facultativos				
<i>Alternaria</i> ssp./moteado de hoja	+++	+	++++	+
<i>Fusarium oxysporum</i> /podredumbre y marchitamiento	+++	+	++++	+
<i>Xanthomonas</i> ssp./moteado y marchitamiento	+++	+	++++	+

Diferente intensidad (+ → ++++).
Adaptado de Marschner, 1995.

tera), favorece el ahijado y el desarrollo del aparato vegetativo, lo que a su vez favorece la incidencia de enfermedades, sobre todo de ataques fúngicos. En estos supuestos se requiere el uso de productos químicos para el control de plagas y enfermedades para proteger el cultivo y obtener una cosecha rentable. La aplicación del abonado nitrogenado en primavera (abonado de cobertura), cuando la planta está formada, permite una mejor utilización del fertilizante y disminuye la aparición de enfermedades, con lo que la necesidad de productos plaguicidas disminuye respecto al abonado de sementera en otoño. La aplicación de plaguicidas recupera las cosechas de los cultivos fertilizados con nitrógeno.

Por otra parte, la forma del N aplicado al suelo puede tener implicaciones en los patógenos de la parte aérea de la planta. Así, la solubilidad de la sílice depende de varios factores, y aumenta conforme disminuye el pH del suelo. En consecuencia, el contenido de sílice de la planta no sólo depende de la fertilización sílicea, sino también de la forma de fertilizante nitrogenado añadido. El sulfato de amonio acidifica el suelo, mientras que el nitrato cálcico lo alcaliniza. Por tanto, la aplicación de fertilizantes minerales puede sustituir, o al menos reducir, la demanda de plaguicidas.

RESUMEN

El presente capítulo estudia la relación existente entre los contenidos en la planta de los diferentes elementos esenciales descritos en el Capítulo 6 y la producción vegetal. Establecer la concentración de nutrientes adecuada para conseguir cosechas excelentes en calidad y cantidad es un apartado clave e imprescindible para poder realizar un diagnóstico que refleje el estado nutricional de un cultivo y formular la recomendación de abonado correspondiente. La elección del tejido o material adecuado así como las condiciones de la toma de muestra y la representatividad de ésta son tratadas de forma exhaustiva, dada la importancia del tema. De igual forma, la existencia prioritaria de monocultivos en la agricultura moderna obliga a contemplar aspectos como fertilizantes, quelatos y enfermedades y plagas más habituales en los cultivos.

Por otra parte, el impacto ambiental negativo que se está produciendo por el uso abusivo de productos químicos en la agricultura obliga a presentar nuevas técnicas de producción más respetuosas con el medio ambiente, como son la fertirrigación, muy adecuada para la producción de hortalizas y de plantas ornamentales. Asimismo, estudiamos las bases científicas para una agricultura sostenible, donde destacamos la fijación biológica del nitrógeno y las micorrizas.

Por último, estudiamos también la producción en condiciones de estrés (salinidad y metales pesados), estrechamente relacionada con el uso agrícola e industrial, así como la incidencia que la dotación génica tiene sobre todos estos agentes.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Señale los principales factores que afectan al contenido mineral de un tejido vegetal.
2. ¿En función de qué factor se presentan los síntomas visibles de deficiencia en hojas de distinta edad?
3. Defina nivel crítico e intervalo de suficiencia de un nutriente. ¿Qué elemento presenta el intervalo de suficiencia más amplio?
4. Indique las características del análisis de savia y los inconvenientes de las medidas enzimáticas para una recomendación de abonado.
5. Defina quelato, señalando sus principales propiedades.
6. ¿Qué formas se conocen de simbiosis en la fijación biológica del nitrógeno? ¿Qué diferencias esenciales presentan?
7. Defina micorrizas y explique los dos tipos de micorrizas más habituales.
8. ¿Qué dos tipos de estrés produce la salinidad?
9. ¿Qué relación existe entre la toxicidad de los metales pesados y el pH de los suelos?
10. Defina plantas resistentes y tolerantes a las enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Alloway, B. J.: *Heavy Metals in Soils*. 2.^a ed. Blackie Academic & Professional, Londres, 1995.
2. Cadahia, C.: *Fertirrigación. Cultivos Hortícolas y Ornamentales*, 1.^a ed. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. Barcelona. Méjico, 1998.
3. Francois, L. E., Maas, E. V.: «Crop response to salt stress». En: *Handbook of Plant and Crop Stress*, pp. 149-182. M. Pessarakli (ed.), M. Dekker Inc. NY. 1994.
4. Hubber, D. M.: «The role of nutrition in the take-all disease of wheat and other small grains». En: *Soilborne Plant Pathogens: Management of Diseases with Macro and Microelements*. AW Engelhard (ed.). APS Press. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, 1989.
5. Jones, J. B. Jr, Wolf, B., Mills, H. A.: *Plant Analysis Handbook. Methods of Plant Analysis and Interpretation*. Micro-Macro Publishing Athens, GA, USA. 1991.
6. Loneragan, J. F.: «Plant nutrition in the 20th and perspectives for the 21st century». *Plant and Soil*. 196: 163-174, 1997.
7. Marschner, H.: *Mineral Nutrition in Higher Plants*. 2.^a ed. American Press. Londres, 1995.
8. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: *Métodos Oficiales de Análisis. Suelos, Aguas, Fertilizantes y Planta*. Ed. MAPA. Madrid, 1993.
9. Thompson, J. P.: «What is the potential for management of mycorrhizas in agriculture?» En: *Management of Mycorrhiza in Agriculture, Horticulture and Forestry*. pp. 191-200. A. D. Robson, L. K. Abbott and N. Malajczuk (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 1993.
10. Varios autores: *Biología Vegetal*. 1.^a ed. Libros de Investigación y Ciencia. Prensa Científica, S. A. Barcelona, 1988.

LA LUZ Y EL APARATO FOTOSINTÉTICO

Javier De Las Rivas

1. Luz y fotosíntesis. 2. Energía luminosa y pigmentos. 3. Estructuración del aparato fotosintético vegetal. 4. Elementos del aparato fotosintético en los tilacoides. 5. Genética y origen del aparato fotosintético vegetal.

1. LUZ Y FOTOSÍNTESIS

1.1. La luz solar es la fuente principal de energía para la biosfera

La luz es la fuente primaria de energía para la vida sobre la Tierra. La biosfera en la que vivimos es un sistema cerrado y en equilibrio dinámico constante. Ser sistema cerrado significa termodinámicamente que no intercambia materia con el exterior, pero sí recibe energía. Esta energía «extraterrestre» es esencial para la dinámica tanto geológica como biológica de este planeta, que alberga algo tan genuino como es la vida. El Sol es el astro del que recibimos prácticamente la totalidad de esa energía «extraterrestre». La radiación solar que llega a la Tierra abarca una amplia franja del espectro radiativo electromagnético y, dentro de ella, una parte significativa (aproximadamente un 40%) es la radiación luminosa, normalmente llamada luz.

Se puede comprobar la fuerza de la luz solar comparando su intensidad con la intensidad de una luz artificial. Por ejemplo, un día de sol proporciona al aire libre unos 2000 μmol de fotones de luz por metro cuadrado por segundo ($2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), en potencia unos $1000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. Por contraste, una lámpara con una bombilla de 100 vatios situada a un metro de una mesa de un metro cuadrado nos proporciona unos 20 μmoles de fotones por segundo ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $10 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ de luz). La distancia hasta el Sol son muchos miles de millones de metros, pero su luz es 100 veces más intensa que la de la lámpara.

La Figura 9-1 presenta desglosados los valores de intensidad y la proporción de los distintos componentes de la radiación solar: radiación gamma (γ), ultravioleta (UV), luminosa (VIS) e infrarroja (IR, calor).

El total de energía radiante solar que alcanza nuestro

planeta es enorme. Esta energía es considerada una constante (llamada **constante solar**) y se suele expresar como energía recibida por unidad de tiempo y por unidad de área perpendicular a la radiación. Se puede estimar que la energía total que llega a la superficie de la Tierra en un día (8 horas de radiación en toda su superficie) es equivalente a la energía contenida en 300 000 millones de toneladas de carbón, es decir, unos 100 000 000 millones en un año. El consumo energético mundial anual equivale a unos 10 000 millones de toneladas de carbón, es decir, es inferior en cuatro órdenes de magnitud ($\times 10^4$) a la energía que nos llega del Sol.

1.2. La luz es un conjunto de ondas electromagnéticas que vemos y que comprende longitudes de onda de 400 a 700 nm

El espectro electromagnético está constituido por ondas electromagnéticas de distinta frecuencia, ν (o longitud de onda, $\lambda = 1/\nu$), abarcando desde las ondas de mayor longitud y menor energía, como las ondas de radio y televisión, hasta las ondas de menor longitud y mayor energía, como los rayos gamma (véase Fig. 9-2). La radiación luminosa ocupa una pequeña franja del espectro, que va desde los 400 a los 700 nm, y se sitúa entre las radiaciones ultravioletas (UV) y las infrarrojas (IR), y constituye la llamada **radiación fotosintéticamente activa (PAR)**.

La radiación luminosa también se llama radiación visible (VIS) porque el ojo humano es un órgano sensible foto-detector que nos permite ver esa radiación. La luz blanca está constituida por la conjunción de todas las radiaciones luminosas de distinto color: luz violeta, azul, verde, amarilla, naranja y roja (véase Fig. 9-2). La

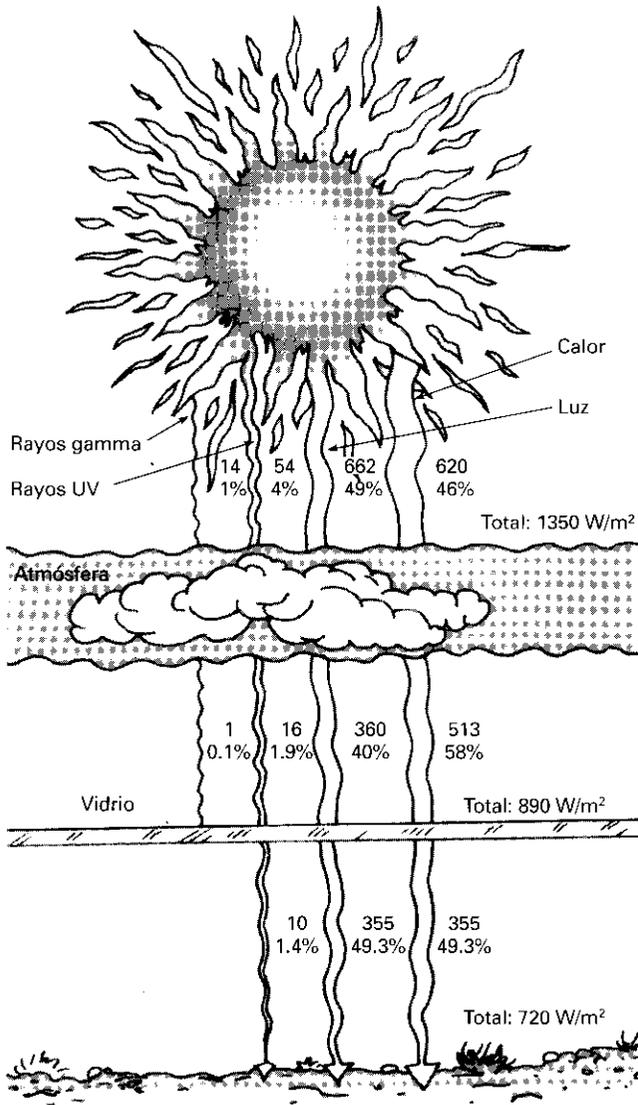


Figura 9-1. Valores de intensidad (en $W \cdot m^{-2}$) y proporción relativa (en %) de los principales componentes de la radiación electromagnética solar que llega a la Tierra: radiación gamma, ultravioleta (UV), luminosa (luz) e infrarroja (calor).

luz blanca se puede descomponer en todo el arco cromático de luces de color por difracción a través de un prisma cristalino. Un compuesto o sustancia con color absorbe la luz del color complementario a la luz del color que muestra, es decir, ese compuesto es del color de la luz no absorbida, que es la que vemos reflejada o transmitida.

1.3. Las plantas son organismos autótrofos fotosintéticos

Mediante un único y complejo proceso fisiológico denominado fotosíntesis, determinados organismos vivos

autótrofos, también llamados fotoergónicos o fotosintéticos, son capaces de absorber y utilizar la energía luminosa. Cualquier fuente de luz visible (por ejemplo, una lámpara incandescente o fluorescente) sirve a los organismos fotosintéticos para hacer fotosíntesis. Por ello, no hay nada específico o misterioso en que el Sol los haga crecer. Simplemente usan su luz; si bien, la luz solar tiene una intensidad y un espectro difíciles de alcanzar o imitar con iluminación artificial.

Entre los organismos fotosintéticos, los vegetales son el grupo principal y más abundante. Por ello, la fotosíntesis es un proceso distintivo del reino vegetal, que determina en buena parte los rasgos característicos de la estructura y la fisiología de las plantas. El tipo de fotosíntesis que realizan los vegetales se caracteriza por la formación de oxígeno (O_2) como subproducto desprendido a la atmósfera. Este tipo de fotosíntesis se denomina **fotosíntesis oxigénica** y no está restringido a las plantas superiores, pues ocurre también en algas y en organismos procariotas como las cianobacterias. Existe también la modalidad de **fotosíntesis anoxigénica**, que realizan ciertas bacterias que viven en condiciones anaerobias.

La similitud de los procesos fotosintéticos fundamentales es bastante grande entre ambas modalidades de fotosíntesis. Por el carácter de este libro, en la exposición de la fotosíntesis nos referiremos exclusivamente a la oxigénica.

Al observar la organización global de los seres vivos en la biosfera, se comprueba que el origen y el desarrollo de los sistemas biológicos se sustentan en la existencia de los mencionados organismos autótrofos fotosintéticos, los únicos que asimilan la energía radiante solar. Por esta capacidad, los vegetales y sus antepasados en la evolución son los que han fundamentado y permitido el desarrollo de otras formas de vida no autótrofas.

Los más antiguos restos de vida encontrados en la Tierra corresponden precisamente a antepasados de cianobacterias, que son organismos procariotas fotosintéticos. Estudios zoológicos y ecológicos muestran que prácticamente toda cadena trófica se sustenta en sistemas vegetales como uno de sus pilares.

Los organismos fotosintéticos transforman en biomasa la energía solar que absorben y asimilan. Anualmente, en la Tierra se almacena, por fotosíntesis, el equivalente energético a 80 000 millones de toneladas de carbón, lo cual corresponde a la asimilación de unas 10^{10} toneladas de carbono de azúcares y otras fuentes de materia orgánica. De la biomasa vegetal, aproximadamente la mitad es sintetizada por el ecosistema terrestre (cultivos agrícolas, bosques, sabanas y matorrales), mientras que la otra mitad es producida en las capas superiores de lagos y océanos por los ecosistemas acuáticos (fitoplancton y macrófitas). La energía acumulada en esta biomasa es luego distribuida, más o menos directamente, al resto de los organismos vivos.

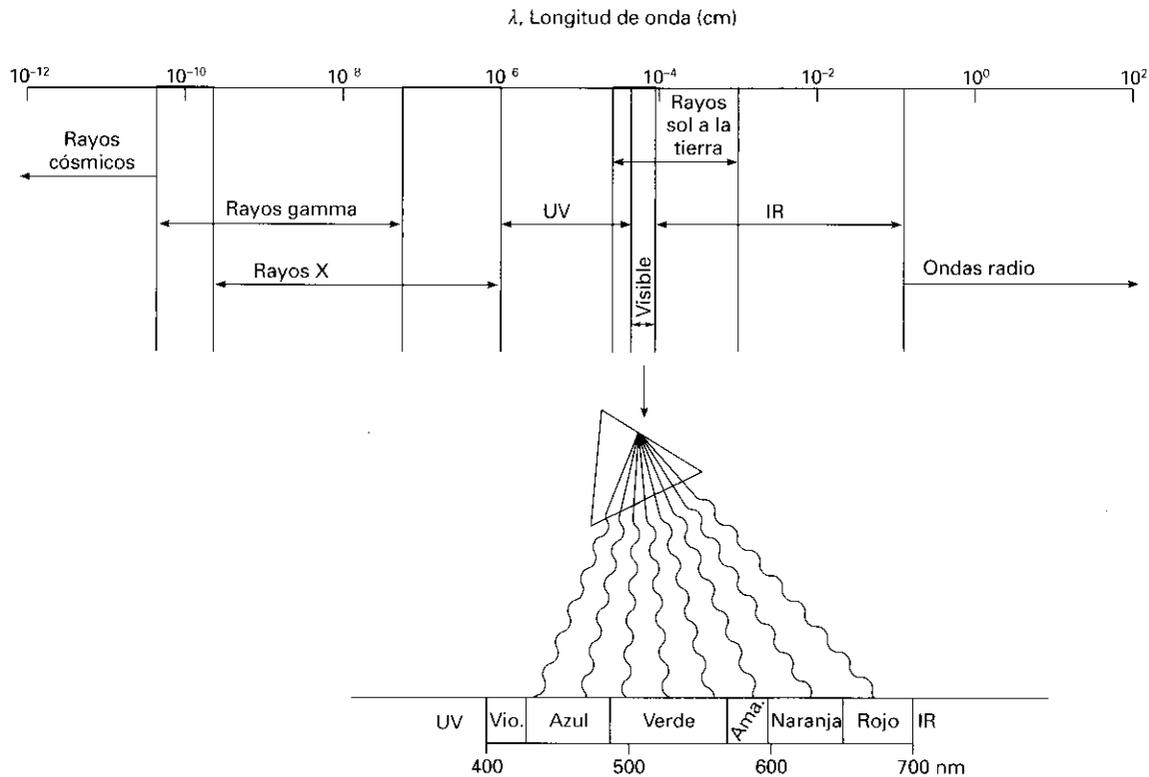


Figura 9-2. Espectro de ondas electromagnéticas indicando la escala de longitud de onda. La radiación luminosa ocupa una pequeña franja del espectro, que va desde los 400 a los 700 nm, y se sitúa entre las radiaciones ultravioleta (UV) e infrarroja (IR).

1.4. La fotosíntesis es un proceso biológico de foto-absorción y foto-asimilación donde se distinguen dos fases

La fotosíntesis es un proceso biológico complejo en el que pueden distinguirse dos fases bien diferenciadas, una primera de absorción y conversión de energía y otra segunda de toma y asimilación de elementos constitutivos de la materia orgánica (C, H, O, N, S, etc.). La energía luminosa es absorbida por biomoléculas fotosensibles y transformada en una forma de energía bioquímica estable. Los elementos constitutivos son tomados de fuentes minerales inorgánicas (agua, H₂O; dióxido de carbono, CO₂; nitratos, NO₃⁻; sulfatos, SO₄⁻, etc.) e incorporados en biomoléculas orgánicas metabolizables (véase Capítulo 6). Ambas fases, la toma de energía y la toma de elementos, están perfectamente coordinadas e interrelacionadas. Clásicamente, estas fases se llamaron fase luminosa y fase oscura; pero esta nomenclatura puede inducir a error, ya que actualmente sabemos que la luz es un factor esencial en toda la fotosíntesis como elemento de regulación y control de ambas fases. Así se puede decir que existe una foto-absorción de energía y una foto-asimilación de los elementos esenciales.

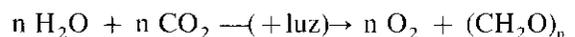
La primera fase es un proceso de conversión de energía luminosa en energía electroquímica. Se inicia con la absorción de la luz por ciertos complejos pigmento-proteína denominados **antenas**, «cosechadores» de luz

(LHC, *Light Harvesting Complexes*), y la posterior canalización de la energía de los fotones hacia los **centros de reacción** de los fotosistemas, donde la energía se transforma en una corriente de electrones entre moléculas óxido-reductoras. Las reacciones de óxido-reducción producen, en último término, dos biomoléculas estables (NADPH y ATP) que se van acumulando. Estas biomoléculas son útiles como fuente de «energía asimiladora», ya que proporcionan **poder de reducción** (el NADPH) y **poder de enlace** (el ATP) necesarios para la siguiente fase.

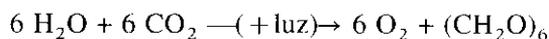
En la segunda fase de la fotosíntesis, se sucede toda una serie de reacciones de asimilación de elementos necesarios para la construcción biomolecular: C, H, O, N, S, etc. El elemento esencial y mayoritario en la materia orgánica es el carbono. El carbono, en la fotosíntesis, es tomado del dióxido de carbono (CO₂) del aire. El proceso de fijación y asimilación fotosintética del carbono se estudia en los Capítulos 11 y 12.

1.5. Las reacciones fotosintéticas pueden expresarse en una ecuación global que incluye los componentes esenciales del proceso

La ecuación global de la fotosíntesis es:



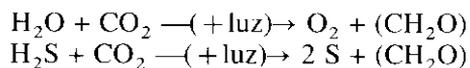
Esta ecuación corresponde a la fotosíntesis que hemos denominado oxigénica, en la que el oxígeno es el producto final, desprendido y liberado a la atmósfera y útil para el proceso biológico de la respiración (véase Capítulo 14). En esta ecuación, $(\text{CH}_2\text{O})_n$ representa un azúcar como producto final fotosintetizado, llamado genéricamente fotosintato o **fotoasimilado**. Azúcares fotosintetizados muy frecuentes son los monosacáridos glucosa y fructosa, el disacárido sacarosa, o el polisacárido almidón. Si consideramos el caso más sencillo de síntesis de un monosacárido, tenemos la ecuación:



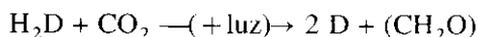
Esta ecuación es endergónica, es decir, necesita un aporte de energía libre ($-\Delta G$) para moverse en el sentido indicado por la flecha. Esta energía es aportada por la luz absorbida fotosintéticamente.

Desde el punto de vista histórico la ecuación fue primeramente descrita por el ginebrino *Theodore de Saussure* que descubrió el papel del H_2O en la fotosíntesis vegetal y completó la reacción en torno a 1804 tomando los datos de varios bioquímicos vanguardistas de su época: el también ginebrino *Jean Senebier* que había indicado que el «aire fijado» —es decir, el CO_2 — se incorporaba a la fotosíntesis; el holandés *Jan Ingen-Housz*, que había descubierto la acción de la luz solar en el proceso; y el inglés *Joseph Priestley*, que ya en 1771 había comprobado la producción de un «nuevo gas» —el oxígeno (O_2)— por las plantas, que eran capaces de «renovar» el «aire viciado» causado por la combustión de una vela y no respirable por un ratón.

Un análisis más profundo del proceso fotosintético no llegó hasta nuestro siglo. En los años treinta, la ecuación básica global se reestudia y se desglosa en dos partes perfectamente diferenciables. Así, en 1931, *Cornelis van Niel* realizó estudios comparativos de fotosíntesis de plantas verdes frente a fotosíntesis de bacterias sulfúreas, y escribió las ecuaciones globales de ambos procesos:



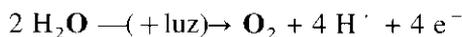
A la vista de estas ecuaciones, consideró que el azufre formado por las bacterias era análogo al oxígeno producido por las plantas, y de modo más general, podía escribir y proponer la ecuación:



Donde H_2D es una molécula reducida dadora de hidrógeno. De este modo, podía formularse la fotosíntesis en las plantas como una reacción en la que el CO_2 fuera reducido por el hidrógeno procedente del agua. La liberación de oxígeno sería, entonces, consecuencia necesaria del proceso de deshidrogenación del agua. Lo

esencial de este aspecto de la fotosíntesis es que la molécula de agua es escindida por la luz.

En 1939, *Robert Hill* descubrió que cloroplastos aislados de hojas son capaces de producir oxígeno al ser iluminados en presencia de un adecuado compuesto químico aceptor artificial de electrones, tal como el ferricianuro. La reacción produce la reducción del ferricianuro a ferrocianuro. Con esta comprobación, Hill formuló la ecuación:



La ecuación de Hill fracciona la fotosíntesis en dos fases al mostrar que la liberación de oxígeno puede realizarse sin reducción del CO_2 . También confirma que todo el oxígeno producido procede del agua y no del CO_2 . La reacción de Hill puso de manifiesto que el hecho primario en la fotosíntesis es la transferencia, activada por la luz, de electrones y protones de una sustancia a otra en contra de un gradiente de potencial redox químico, es decir, en dirección termodinámicamente desfavorable. Electrones más protones equivalen a átomos de hidrógeno ($\text{H} = \text{H}^+ + \text{e}^-$) que es lo que aporta el agua, H_2O .

Finalmente, se puede escribir una reacción global integradora de toda la fotosíntesis vegetal haciendo referencia de modo general a su segunda fase, en la cual se lleva a cabo la asimilación de los distintos elementos a partir de fuentes inorgánicas (CO_2 , NO_3^- , SO_4^{2-}):

$$2 \text{H}_2\text{O} + \text{AO} \xrightarrow{(+ \text{luz})} \text{O}_2 + (\text{AH}_2 + \text{H}_2\text{O})$$

La molécula AO incluye el elemento ($\text{A} = \text{C}, \text{N}, \text{S}$) aceptor final de electrones y protones que es reducido parcialmente, como en el caso del carbono en un azúcar $(\text{CH}_2\text{O})_6$, o totalmente, como en el caso del nitrógeno en NH_4^+ o del azufre en SH_2 . Como se ve, el oxígeno, O, procede también principalmente de las fuentes inorgánicas citadas.

En los Capítulos 9 y 10 se estudia la primera fase del proceso fotosintético. En los Capítulos 11 al 15 se estudia todo lo referente a la segunda fase fotosintética de asimilación de carbono, nitrógeno y azufre que constituye parte esencial del anabolismo fotosintético vegetal (véase también Capítulos 16 y 17).

2. ENERGÍA LUMINOSA Y PIGMENTOS

2.1. La energía luminosa se mide y expresa cuantitativamente en unidades de luz: fotones

En 1900, Max Planck enunció la teoría por la que toda transferencia de energía radiante de un objeto a otro implicaba unidades «discretas» de energía a las que llamó cuantos. Las ondas electromagnéticas son radiaciones y, por tanto, se transmiten de manera cuántica, en unidades discretas. La teoría cuántica de Planck se expresa matemáticamente como $E = h \cdot \nu$, siendo E la energía de

una unidad o partícula cuántica de radiación, ν la frecuencia de la radiación (es decir, el número de ondas transmitido por unidad de tiempo) y h una constante (constante de Planck de valor $h = 6.6262 \times 10^{-34}$ J · s). La frecuencia de una radiación corresponde también a la velocidad de dicha radiación dividida por la longitud de onda, es decir, $\nu = c/\lambda$. La velocidad de todas las radiaciones electromagnéticas, c , es la misma, es decir, es una constante ($c = 2.9979 \times 10^8$ m · s⁻¹). De este modo, la energía de una radiación se puede también expresar como: $E = h \cdot c/\lambda$.

La luz, como el resto de las radiaciones electromagnéticas, está compuesta de paquetes elementales de energía denominados fotones, de modo que un fotón individual interacciona con (es absorbido o emitido por) una molécula, y no se puede dar absorción o emisión de fracciones de fotones. Aunque nos referiremos sólo a moléculas, casi todo lo que digamos será aplicable también a agrupaciones atómicas o moleculares que funcionen como una unidad.

Si se pretende que la energía de un fotón pueda ser utilizada para impulsar una transformación física o química, lo primero que hay que conseguir es hacerlo interactuar con una molécula que lo absorba. Lógicamente, en el momento de ser absorbido, el fotón deja de ser fotón y su energía se suma a la que ya tiene la molécula. Este exceso de energía localizado en la molécula tras la absorción se denomina energía de excitación o, más brevemente, **excitón**.

Cada fotón de luz tiene una energía propia, que corresponde a su longitud de onda específica y que puede ser calculada a partir de la ecuación de Planck, según la expresión antes descrita: $E = h \cdot c/\lambda$. En el Cuadro 9-1 se presenta el cálculo de la energía de la luz de varias longitudes de onda dentro del arco cromático, entre 700 y 400 nm. También, se incluye para ilustración un cálculo de la energía de una radiación más larga, infrarroja (IR), y de otras dos cortas, ultravioletas (UV). La energía de un fotón es muy pequeña y, por ello, a menudo, en vez de expresarse en julios (J), se puede expresar

en electrones voltio (eV), que es una unidad de energía más pequeña, definida como la energía adquirida por un electrón (unidad de carga elemental) cuando se mueve a través de un potencial de 1 voltio: $1 \text{ eV} = 1.6022 \times 10^{-19}$ J. De este modo, un fotón rojo de 700 nm tiene una energía de 1.77 eV.

2.2. El espectro de absorción de una molécula indica el tipo de fotones que absorbe, y el tipo de transiciones energéticas que sufre depende de su estructura electrónica

El resultado de la absorción (A) de un fotón por una molécula supone la transición desde su estado fundamental (S₀) de mínima energía, a uno de sus estados excitados (S₁, S₂, etc), de mayor contenido energético (Fig. 9-3A). Los estados electrónicos S son de tipo **singlete** (S), es decir, constan de dos electrones de espín opuesto. La transición que resulta útil para promover transformaciones químicas, si se trata tanto de fotosíntesis como de un sistema no biológico, es un cambio en la configuración de los electrones de valencia, es decir, los que ocupan los orbitales más externos, ya que esos electrones son los que intervienen en el establecimiento de enlaces químicos. En la transición, el electrón perteneciente al orbital periférico pasa a uno de los orbitales desocupados de mayor energía y el salto energético entre orbitales es idéntico a la cantidad de energía del fotón absorbido (Fig. 9-3A).

El **estado excitado** que resulta de la absorción de un fotón es muy inestable, por lo que la molécula excitada tiene una marcada tendencia a ceder el exceso de energía y volver al estado fundamental. Existen varias rutas o formas de llevar a cabo esta relajación o desexcitación. Una descripción esquemática de tales rutas aparece en la Fig. 9-3A. La vuelta directa al estado fundamental, con la emisión de un fotón idéntico al absorbido, es muy improbable. Lo normal es primero,

Cuadro 9-1. Color, frecuencia, longitud de onda y energía de los fotones de radiación visible, infrarroja y ultravioleta

Color	Frecuencia $\nu \times 10^{-15}(\text{s}^{-1})$	Longitud de onda λ (nm)	Energía	
			(eV · fotón ⁻¹)	(kJ · mol fotones ⁻¹)
Infrarrojo	0.300	1000	1.24	120
Rojo	0.428	700	1.77	171
Naranja	0.484	620	2.00	193
Amarillo	0.517	580	2.14	206
Verde	0.566	530	2.34	226
Azul	0.638	470	2.64	255
Violeta	0.749	400	3.10	299
UV cercano	1.000	300	4.14	399
UV lejano	1.500	200	6.21	599

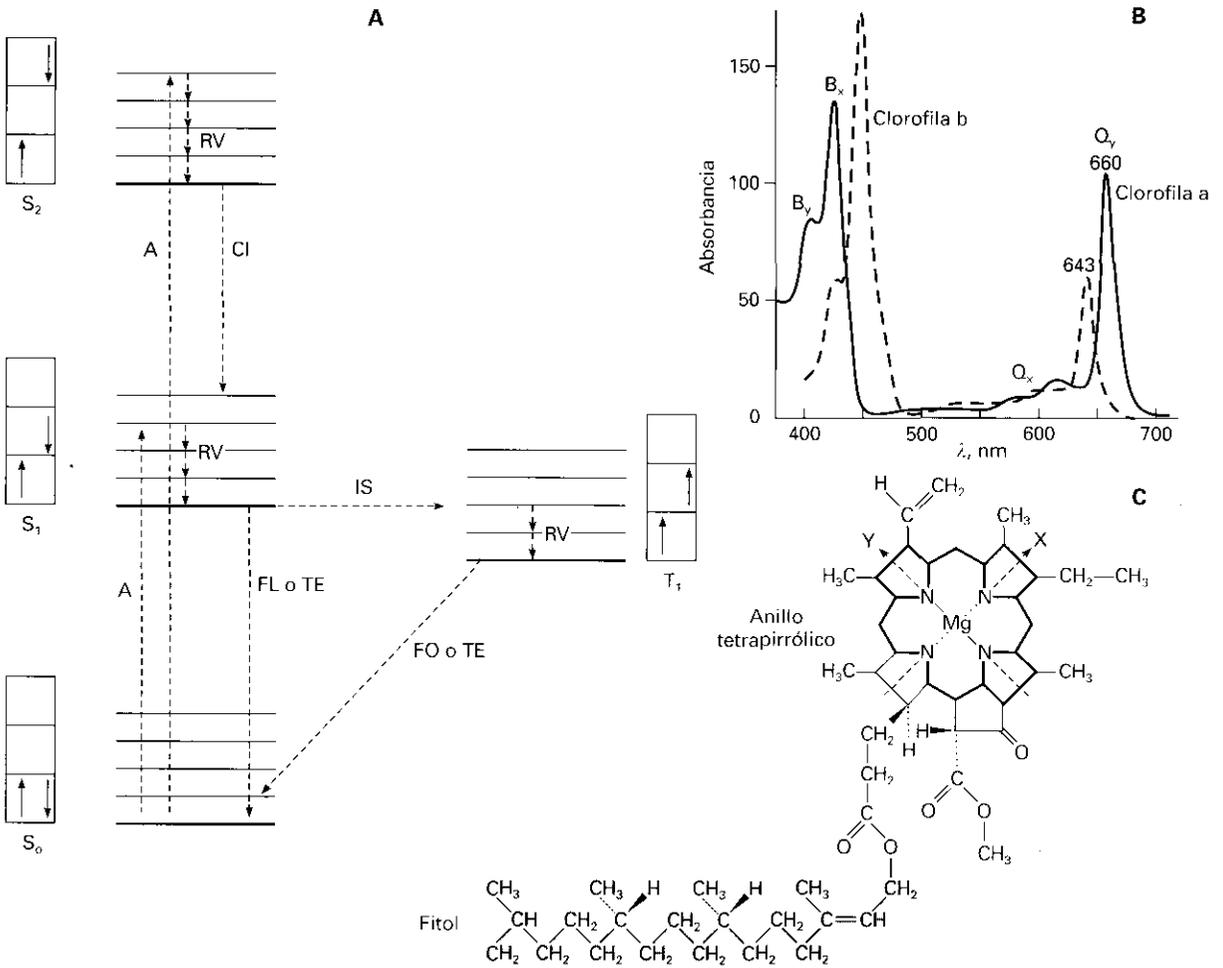


Figura 9-3. A) Representación del estado fundamental, de mínima energía (S_0), de un par de electrones periféricos de una molécula y de dos estados excitados consecutivos (S_1 , S_2), de mayor contenido energético. Todos ellos son formas singlete, frente a la forma triplete (T_1) en la cual los electrones tienen el mismo espín. Las transiciones que suceden (A, RV, CI, FL, IS, FO, TE) son explicadas en el texto. B) Espectro de absorción de las clorofilas a y b indicando la longitud de onda del pico máximo en el rojo (660 y 643 nm). Cada espectro presenta 4 bandas principales citadas en el texto (Q_y , Q_x , B_x , B_y). C) Estructura molecular de la clorofila a indicando en el anillo porfirínico los ejes X e Y que corresponden a las bandas de absorción. Los dobles enlaces conjugados del anillo porfirínico no se muestran en esta figura (véase también Fig. 9-4).

una relajación de la vibración dentro del mismo estado electrónico que supone pérdida de energía en forma de calor (energía no radiante) (**RV**). También se puede dar relajación mediante saltos descendentes cortos entre estados electrónicos próximos, soltando de nuevo energía en forma no radiante, en pequeños paquetes, a grupos atómicos de la misma molécula o de moléculas adyacentes (conversión interna, **CI**). Alguno de los saltos puede ocurrir entre estados suficientemente separados, y la energía cedida puede entonces ser emitida en forma radiante como fotón visible, siempre de menor energía que el que causó la formación del estado excitado (proceso llamado **fluorescencia**, **FL**). Las clorofilas son moléculas que fácilmente pierden su energía de excitación por esta vía, emitiendo luz fluorescente roja de longitud de onda normalmente mayor de 660 nm.

La relajación puede también transcurrir por vías indirectas, como la que supone una inversión del espín del

electrón excitado, originando un estado **triplete** (**T**) que tiene dos electrones con el mismo espín. El triplete presenta normalmente un nivel de energía menor y el paso de configuración singlete (**S**) a triplete (**T**) conlleva el llamado cruce intersistemas (**IS**). La relajación de vuelta desde el triplete al estado basal singlete puede suceder con emisión de nuevo de una energía radiante, es decir, de un fotón visible (este proceso que emite luz se llama **fosforescencia**, **FO**). La vuelta de triplete a singlete también se puede dar de modo no radiante, por simple conversión interna. En general, estas conversiones son poco frecuentes debido a su complejidad, ya que tienen que suceder dos cambios de configuración electrónica.

Finalmente, la relajación, tanto desde la forma singlete excitada (S_1) como desde la forma triplete excitada (T_1), puede darse por la cesión o transferencia de la energía de excitación a otra molécula que esté suficien-

temente cerca. Este modo o vía se llama de **transferencia excitónica (TE)** y es la vía clave para el funcionamiento de las **antenas fotosintéticas** cuyos pigmentos están ordenados y dispuestos próximos, es decir, acoplados excitónicamente de modo que se pueden transmitir unos a otros esos cuantos o paquetes de energía de excitación (llamados **excitones**).

La probabilidad de que un fotón sea o no absorbido, varía dependiendo de la estructura electrónica de la molécula. Es decir, la estructura molecular determina la eficiencia con la que cada especie química absorbe los fotones de distintas energías. La representación gráfica utilizada normalmente para ilustrar la capacidad de absorber luz de una especie química (o de una mezcla) se llama **espectro de absorción**. En él se representa la intensidad de la absorción (como absorbancia, absorción fraccional o porcentaje de transmisión) frente a la energía del fotón (expresada por su frecuencia, ν , en s^{-1} , o por su longitud de onda, λ , en nm). La Figura 9-3B muestra el espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos más comunes, clorofila *a* y *b* (véase apartado 2.3). El contenido energético de los diferentes estados de una molécula está influido por el entorno en que se encuentra (otras moléculas próximas) y, por ello, el espectro de absorción de una determinada especie química en disolución varía según el disolvente. Igualmente, las interacciones entre moléculas idénticas en oligómeros, o entre moléculas distintas en complejos no covalentes pueden modificar sustancialmente el espectro de absorción, como ocurre de hecho con los pigmentos fotosintéticos cuando están insertados en proteínas.

Al ser un reflejo de las diferencias de energía entre los diferentes estados moleculares, los espectros de absorción facilitan información valiosa sobre las propiedades íntimas de las moléculas y sobre su entorno inmediato. Por ello, son de enorme utilidad y tienen numerosas aplicaciones en el estudio de la materia, tanto viva como inanimada.

2.3. Los principales pigmentos fotosintéticos son las clorofilas (verdes) y los carotenoides (amarillo-anaranjados)

En las plantas, la luz destinada a impulsar el proceso fotosintético es absorbida por dos tipos de pigmentos: clorofilas y carotenoides, que son moléculas cromóforas sensibles a la radiación luminosa y genéricamente llamadas pigmentos fotosintéticos.

Estos pigmentos no están libres en el aparato fotosintético, sino que se encuentran engarzados dentro de las proteínas fotosintéticas formando los **complejos pigmento-proteína**. La asociación de estos pigmentos con polipéptidos es de tipo no covalente, por lo que al desnaturalizarse la proteína, se liberan los pigmentos.

El pigmento fotosintético más importante es la **clorofila**, ya que es la biomolécula cromófora que interviene más directamente en el proceso de absorción y

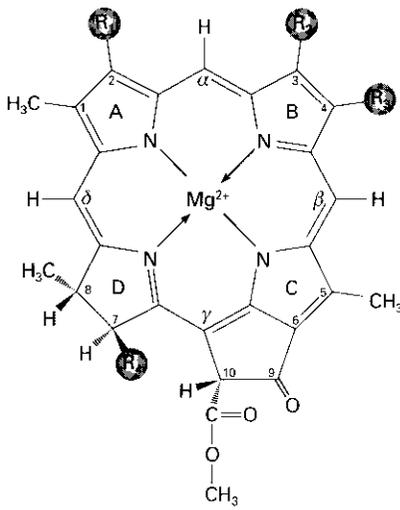
conversión de la energía luminosa. Existen distintos tipos de clorofilas, pero todos se caracterizan por tener un anillo tetrapirrólico cíclico, tipo porfirina (similar al grupo hemo), con un catión metálico de magnesio ligado en el centro del anillo (Mg^{2+}) (Fig. 9-4). También tienen en su estructura una larga cadena hidrófoba de fitol (véase Capítulo 17) que les facilita el anclaje dentro de zonas o estructuras poco polares. Debido a esta estructura molecular, las clorofilas son capaces de absorber la radiación luminosa en la zona del azul y también en la zona del rojo; por ello son de color verde, dando al mundo vegetal su color tan propio y característico.

En vegetales, existen dos tipos de clorofilas diferentes, la clorofila *a* y la clorofila *b* (Fig. 9-4). Habitualmente, todas las clorofilas están asociadas de modo no covalente a los polipéptidos constitutivos de las antenas. La principal función de las clorofilas es la absorción de luz en dichas antenas. En diversos microorganismos fototróficos existen otros tipos de clorofilas, como la clorofila *c* o la bacterioclorofila.

Los **carotenoides** son compuestos de cuarenta átomos de carbono (C_{40}) que tienen una estructura principal lineal con grupos metilo laterales cada 4 carbonos. Biosintéticamente, son derivados de la fusión de ocho unidades de isopreno (molécula de 5 C) (Fig. 9-5) (véase Capítulo 17). Por ello, son lípidos isoprenoides. Los extremos de la molécula de un carotenoide pueden formar anillos o llevar sustituyentes oxigenados. Los carotenoides con algún grupo oxigenado se denominan **xantofilas**, mientras que los hidrocarburos sin oxígeno son los **carotenos**. Los principales carotenoides presentes en todo cloroplasto vegetal son α -caroteno, β -caroteno y 5 xantofilas: luteína, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina y neoxantina. En la Fig. 9-5 se muestran las estructuras de estos compuestos. Junto a estos carotenoides, comunes a todas las plantas superiores, se dan algunos otros tipos en ciertas especies vegetales. Los carotenos son más abundantes, en general, en los centros de reacción de los fotosistemas y las xantofilas son más abundantes en las antenas. La función fotosintética principal de los carotenoides es proteger el aparato fotosensible mediante mecanismos de disipación y extinción de energía. De modo secundario, también tienen la función de ser antenas alternativas, sobre todo en el espectro de luz entre 450 y 500 nm, en el cual las clorofilas absorben poco. Por absorber en esta zona del espectro, que corresponde a la luz azul-verde, los carotenoides de los cloroplastos son de colores amarillos y anaranjados.

2.4. Las clorofilas y los carotenoides son pigmentos que por su estructura molecular absorben muy eficazmente la luz

Tanto clorofilas como carotenoides poseen en su estructura sistemas de dobles enlaces conjugados (es de-



Tipos de clorofilas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Pérdida de hidrógenos en C ₇ y C ₈ dando doble enlace
a	—CH = CH ₂	—CH ₃	—CH ₂ CH ₃	X	No
b	—CH = CH ₂	—CHO	—CH ₂ CH ₃	X	No
c ₁	—CH = CH ₂	—CH ₃	—CH ₂ CH ₃	—CH = CH—COOH	Sí
c ₂	—CH = CH ₂	—CH ₃	—CH = CH ₂	—CH = CH—COOH	Sí
d	—CHO	—CH ₃	—CH ₂ CH ₃	X	No

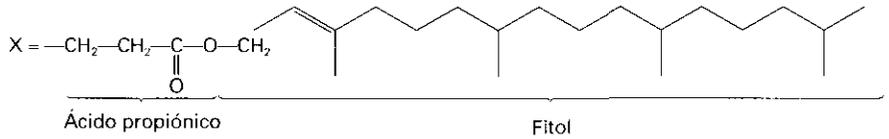


Figura 9-4. Estructura molecular de las clorofilas, indicando: los dobles enlaces conjugados del anillo porfirínico (que incluye cuatro pirroles A, B, C y D); la unión coordinada al átomo de magnesio; y los distintos radicales (R) que cambian en cada tipo de clorofila: a, b, c₁, c₂, d.

cir, dobles enlaces alternados con sencillos) que se extienden por gran parte de la molécula. La presencia de estos sistemas conjugados es lo que confiere a esos pigmentos su capacidad para absorber luz visible (es decir, absorber fotones). Cada doble enlace C=C está constituido por un orbital molecular tipo σ y otro, tipo π . Los numerosos orbitales moleculares del tipo π del sistema conjugado (tantos como átomos de C que participan en este sistema) dan lugar a un gran número de electrones π deslocalizados que tienen niveles energéticos próximos, de forma que cuantos más enlaces conjugados hay, la diferencia de energía entre el orbital ocupado superior (π , enlazante) y el orbital desocupado inferior (π^* , antienlazante) es menor. A partir de siete o más dobles enlaces conjugados, la energía de la radiación visible (fotones) es suficiente para promover la transición de un electrón desde un orbital ocupado π a un orbital desocupado π^* . Según el tipo de fotón (entre rojo y azul) que cada molécula de pigmento absorbe, la energía de estas transiciones π - π^* oscila entre 1.7 y 3.1 eV · fotón⁻¹ (véase Cuadro 9-1). En otras moléculas orgánicas con menos dobles enlaces conjugados, los intervalos de energía entre los distintos estados electrónicos son mayores y se necesitan fotones ultravioletas, más energéticos, para promover transiciones electrónicas π - π^* .

Desde el punto de vista molecular, en clorofilas y carotenoides existen claras diferencias de simetría entre el estado fundamental y algunos o todos los estados excitados que participan en las transiciones visibles. Esto confiere a dichas transiciones un marcado carácter dipolar. Por otra parte, los orbitales π están deslocalizados en una gran área de la molécula, por lo que el efecto del cambio de configuración electrónica se reparte entre muchos átomos, y no ocasiona alteraciones marcadas de la geometría nuclear. Además, las regiones del espacio ocupadas por los orbitales π y π^* coinciden

bastante, lo que también favorece la transición. Todas estas circunstancias contribuyen a que clorofilas y carotenoides sean pigmentos extraordinariamente eficaces para la absorción de luz. En el caso de las clorofilas, su espectro visible de absorción muestra 4 bandas principales más o menos intensas que corresponden a distintas transiciones electrónicas, denominadas Q_y, Q_x, B_x y B_y, por orden de energía creciente (véase Fig. 9-3B). Los coeficientes molares de absorción (ϵ) de las bandas roja (Q_y) y azul (B o banda Soret) de las clorofilas están, junto con los de los carotenoides, entre los más altos observados en pigmentos naturales. El espectro de absorción de los carotenoides exhibe una banda (con tres claros componentes vibratorios) cuya localización varía según la especie química concreta de que se trate, pero que suele estar entre 400 y 550 nm (véase Fig. 9-6). Como puede apreciarse al superponer sus espectros, la presencia simultánea de ambos tipos de pigmentos, clorofilas y carotenoides, en el aparato fotosintético amplía la gama de energía de fotones visibles que pueden ser absorbidos (Fig. 9-6).

3. ESTRUCTURACIÓN DEL APARATO FOTOSINTÉTICO VEGETAL

3.1. Las hojas son el órgano vegetal especializado en realizar la fotosíntesis

La fotosíntesis en plantas superiores tiene lugar en tejidos fotosintéticos que se agrupan en su mayoría en órganos especializados. Estos órganos son las hojas. La luz solar es una radiación que se dispersa en toda la atmósfera terrestre; para aprovecharla al máximo, es necesario exponer la mayor cantidad posible de tejido a los fotones incidentes, de ahí la gran superficie foliar que suelen tener los vegetales. Las hojas son también,

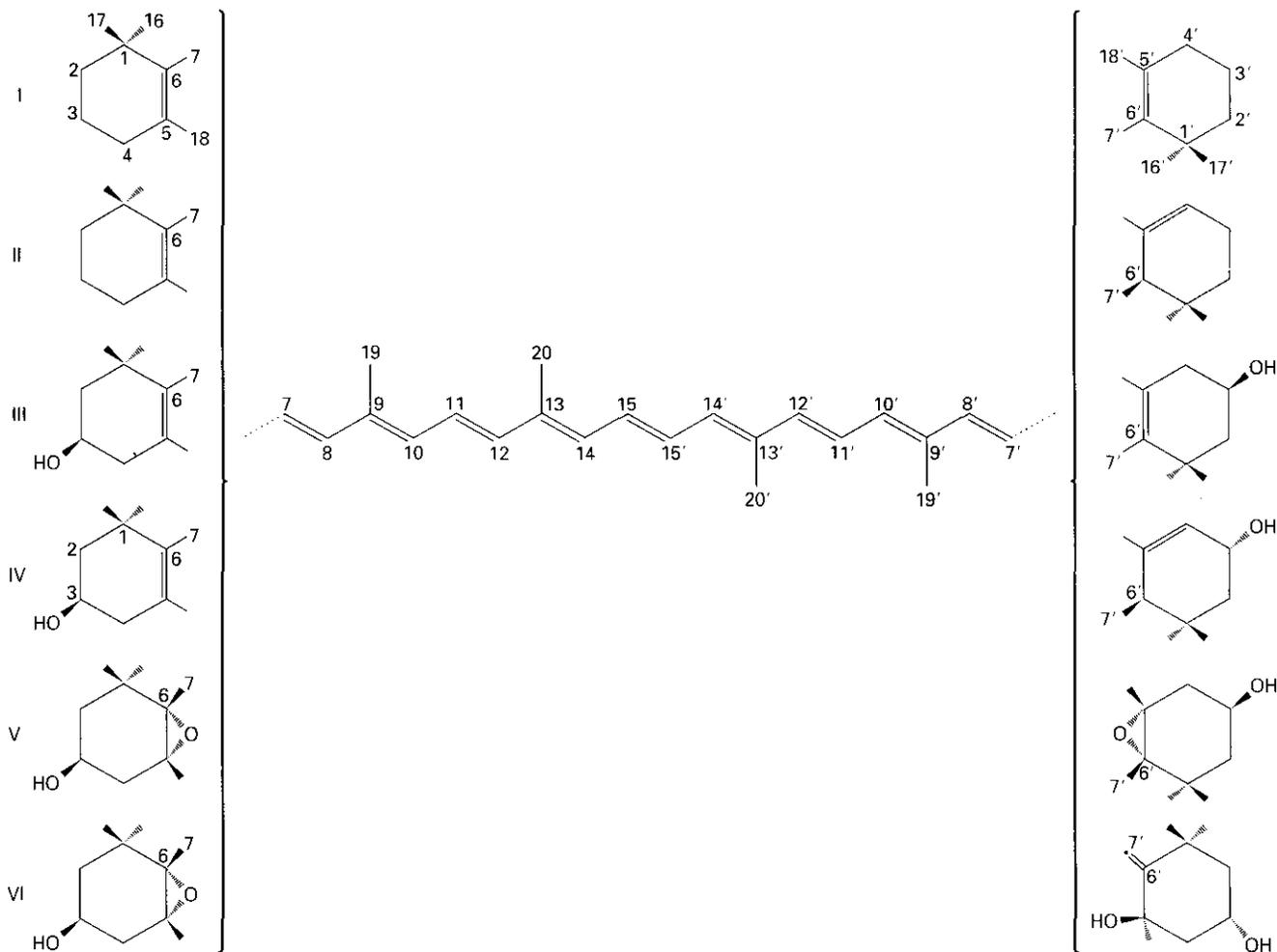


Figura 9-5. Estructura molecular de los carotenoides más comunes en las hojas: I: beta-caroteno; II: alfa-caroteno; III: zeaxantina; IV: luteína; V: violaxantina; VI: neoxantina.

por esta razón, generalmente planas, como pequeños paneles solares que se pueden orientar a los rayos solares para tratar de absorber de modo óptimo toda la luz que necesitan. Además, las plantas habitualmente tienen muchas hojas pequeñas para lograr otras ventajas funcionales: a) distintas hojas pueden tomar distintas orientaciones, adaptándose a la incidencia luminosa que cambia a lo largo del día con el movimiento del sol, y b) la disipación térmica en un elemento sometido a radiación solar es mucho más eficaz si es pequeño y tiene, proporcionalmente, una gran superficie en contacto con el aire.

La Fig. 9-7A muestra una hoja con los compuestos que intervienen en la reacción global fotosintética. Dos son gases (CO_2 y O_2) intercambiados con la atmósfera; el producto final es un sólido hidrosoluble, azúcar $[(\text{CH}_2\text{O})_n]$; y el sustrato primero (agua, H_2O) es un líquido tomado por las raíces, que se puede transformar en gas (vapor de agua) por evapotranspiración según las necesidades hídricas y metabólicas de la planta (véanse Capítulos 3 y 4). En la Figura 9-7B se muestra la penetración de luz incidente en una hoja. La sección de la hoja (unos $160 \mu\text{m}$ desde el haz al envés) se relaciona

con el gradiente de penetración de luz calculado para tres intensidades de luz blanca (radiación PAR) incidente: $200, 700$ y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. El gradiente es dependiente de la estructura tisular de la sección de la hoja. Primero están las células del mesófilo en empalizada, cercanas al haz, alargadas, compactadas y con una gran densidad de cloroplastos. Luego, las células del mesófilo lagunar, cercanas al envés, son irregulares y dejan muchos huecos o espacios llamados cámaras subestomáticas, esenciales para el intercambio gaseoso regulado por los estomas (véase Capítulo 3). A este segundo tipo tisular le llega menos luz y, por ello, tiene menor densidad de orgánulos fotosintéticos.

3.2. Los cloroplastos son orgánulos subcelulares donde se encuentra todo el aparato biomolecular fotosintético

Para estudiar y entender propiamente la fisiología o funcionamiento del aparato fotosintético vegetal, es necesario primero localizar y caracterizar estructuralmen-

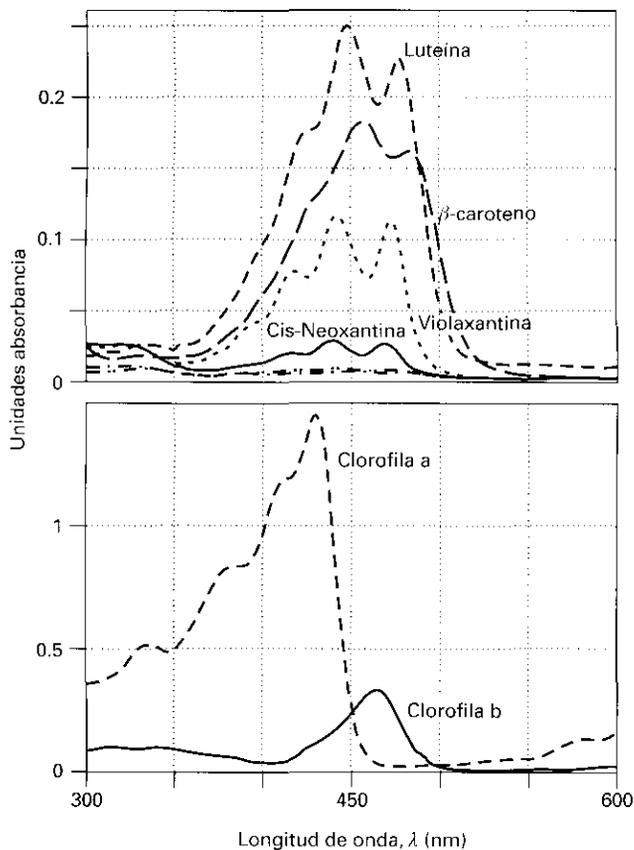


Figura 9-6. Espectros de absorción entre 300 y 600 nm de los pigmentos fotosintéticos más abundantes en un extracto de hojas. La absorción relativa de cada espectro en esta figura corresponde aproximadamente a las cantidades relativas de los pigmentos en las hojas. El carotenoide más abundante es la luteína y la clorofila más abundante, la clorofila a.

te dicho aparato. Ya hemos dicho que, a nivel macroscópico, al observar cualquier vegetal se distinguen las hojas como órgano especializado en fotosíntesis. Las hojas están constituidas esencialmente por tejidos fotosintéticos, es decir, por células que tienen en su interior la maquinaria necesaria para la fotosíntesis. A nivel celular, esta maquinaria se localiza específica y exclusivamente en unos orgánulos subcelulares llamados **cloroplastos**. Estos orgánulos son el elemento común presente en todas las células fotosintéticas eucariotas, desde las plantas superiores hasta las algas pluricelulares y unicelulares. Los cloroplastos son, por tanto, unos plastidios especializados en la función fotosintética en eucariotas.

3.3. Las biomembranas fotosintéticas son las membranas tilacoidales y están organizadas en lamelas apiladas, grana, y en lamelas no apiladas, estromáticas

Los cloroplastos son orgánulos separados del citosol celular por una doble membrana denominada envuelta o envoltura cloroplástica; la membrana externa es bas-

tante permeable (debido a la presencia de la proteína porina) y rodea a la membrana interna la cual tiene permeabilidad más selectiva. Ésta última, a su vez, parece estar en conexión con un complejo sistema membranoso que constituye parte esencial del interior cloroplástico. Las membranas del interior del cloroplasto constituyen los **tilacoides** (del griego, *thylakos*, saco) y forman un sistema intrincado de membranas tilacoidales que se pliegan dando dobles membranas a modo de láminas paralelas, más o menos separadas o apiladas. Los tilacoides plegados formando esas láminas paralelas de dobles membranas se llaman lamelas. Existen dos tipos de lamelas: las **lamelas grana** que constituyen apilamientos de numerosas láminas a modo de discos; y las **lamelas estromáticas** que son láminas simples más extensas que interconectan zonas de lamelas apiladas.

La Fig. 9-8 muestra las distintas estructuras vegetales que contienen el aparato fotosintético desde lo macroscópico a lo microscópico, es decir, desde las hojas hasta los tilacoides, pasando por el tejido foliar y los cloroplastos. En la figura se indican las dimensiones de las estructuras, cada vez más pequeñas. Las membranas tilacoidales son las biomembranas fotosintéticas porque incluyen en su interior todo el aparato biomolecular que lleva a cabo la primera fase de la fotosíntesis (véase apartado 4.1).

3.4. Las membranas tilacoidales son bicapas lipídicas hechas de glicerolípidos especiales

Los tilacoides están constituidos por biomembranas, es decir, bicapas lipídicas. Gran parte de la función fotosintética realizada en los tilacoides es solamente posible precisamente por el hecho de estar basados en membranas. Las membranas biológicas están constituidas por una doble capa de lípidos anfipáticos, es decir, lípidos que tienen una cabeza polar en contacto con el medio acuoso y una cola hidrófoba que se sitúa hacia el interior de la membrana en contacto con la cola de la capa opuesta. Por estas características químicas, las membranas son barreras semipermeables entre espacios acuosos que compartimentan el medio interno celular, o lo separan del exterior (véase Capítulo 1). Los complejos fotosintéticos que realizan la primera fase de la fotosíntesis se insertan transversalmente en las membranas tilacoidales. Con esta inserción, los complejos quedan en contacto con dos espacios acuosos diferentes. Además, las membranas son un fluido bidimensional donde los complejos fotosintéticos pueden moverse o «nadar». Este **movimiento lateral** dentro de la matriz bidimensional de la membrana tilacoidal, permite cambiar y regular la función de las proteínas fotosintéticas en respuesta a distintas situaciones metabólicas ya que, con el movimiento, se pueden producir variaciones en las conexiones entre los distintos elementos.

La composición lipídica es determinante de la fluidez de la membrana y de la movilidad de las proteínas

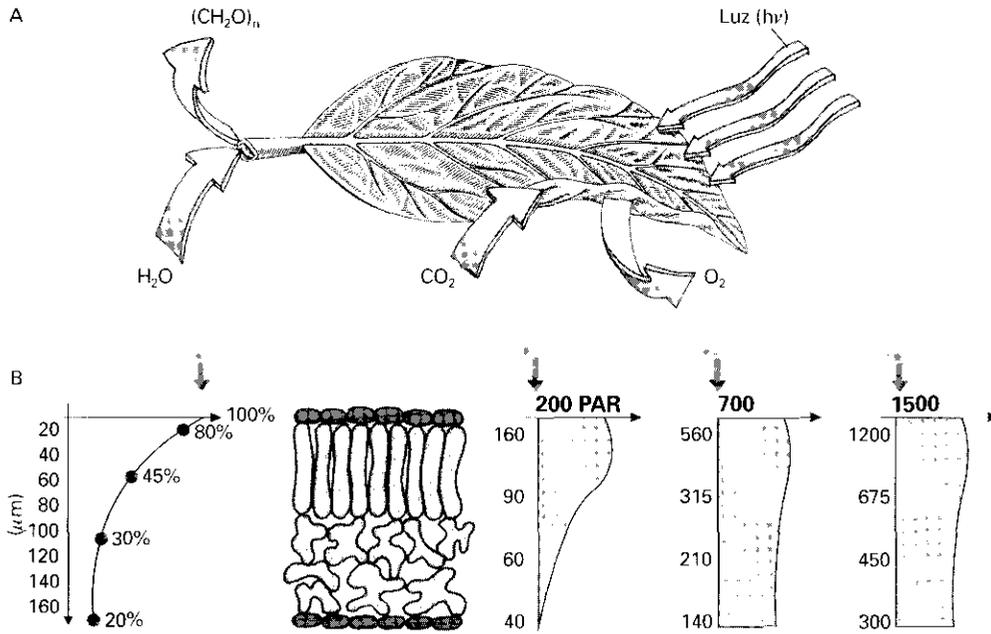


Figura 9-7. A) Dibujo de una hoja con los compuestos que intervienen en la reacción global fotosintética. Dos son gases (CO_2 y O_2) intercambiados con la atmósfera; el producto final, azúcar ($(CH_2O)_n$); y el sustrato primero, (H_2O) tomada por las raíces. B) Penetración de luz incidente en una hoja. La sección de la hoja (160 μm desde el haz al envés) se relaciona con el gradiente de penetración de luz calculado para tres densidades de flujo fotónico fotosintético (PAR): 200, 700 y 1500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. El gradiente es dependiente de la estructura tisular de la sección de la hoja.

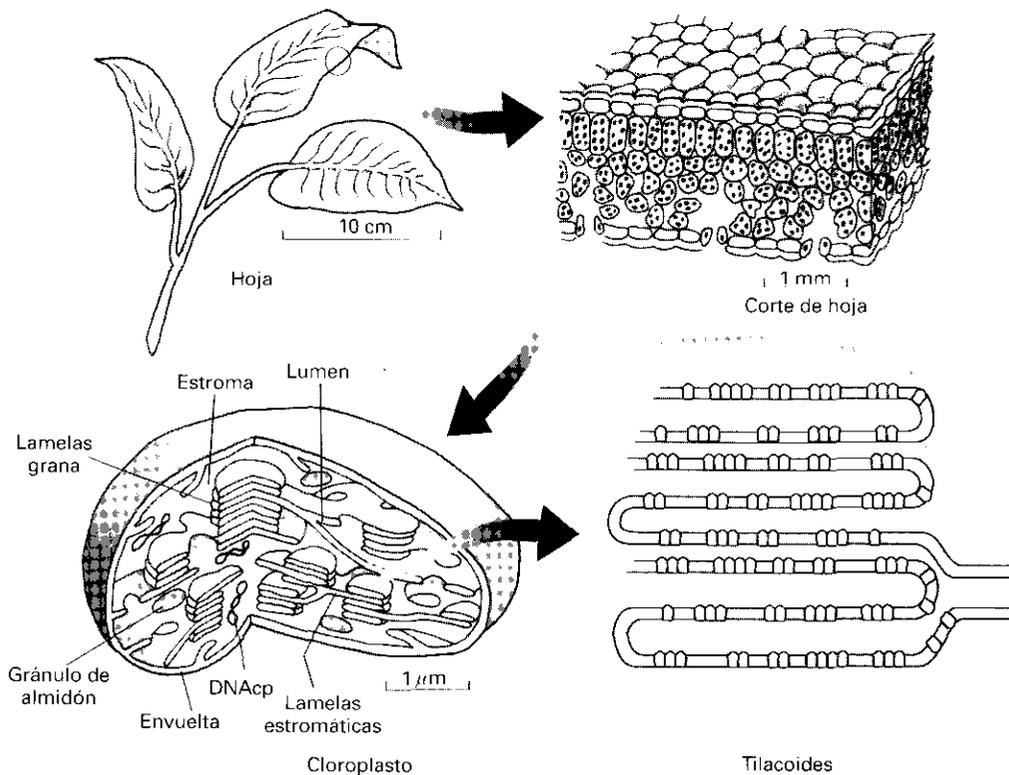


Figura 9-8. Estructuras vegetales que contienen el aparato fotosintético: hojas, tejido foliar (corte de hoja), cloroplasto y tilacoides. Se indican las dimensiones de las estructuras, que son cada vez más pequeñas.

insertadas en ella. Los tilacoides son membranas constituidas por lípidos polares muy específicos: galactolípidos, sulfolípidos y fosfolípidos.

Los principales galactolípidos son monogalactosil diacilglicerol (MGDG) y digalactosil diacilglicerol (DGDG) (Fig. 9-9). Estos galactolípidos constituyen el 80 % de los glicerolípidos de la membrana tilacoidal, siendo MGDG el mayoritario (un 50 %). Un hecho muy peculiar de estos galactolípidos es que tienen un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linolénico (C18:3, Fig. 9-9) que, en algunas especies de plantas, alcanza el 95 % de los ácidos grasos totales del cloroplasto. El alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados da una alta fluidez a la membrana tilacoidal. El sulfolípidos más importante encontrado en tilacoides de plantas es el sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG) que constituye en torno a un 7 % del total de los glicerolípidos que forman la bicapa. Este lípido, a pH fisiológico, está cargado negativamente en su grupo sulfónico. Los fosfolípidos son lípidos muy comunes y abundantes en muchos tipos de biomembranas que, sin embargo, en el caso de los tilacoides, tan sólo representan un 7-10 % del total. El más importante es el fosfatidil glicerol (PG), que tiene también carga negativa. El tipo de ácidos grasos que este lípido presenta en tilacoides es muy distinto a su composición en otras membranas de células eucariotas, un ejemplo, es el ácido transhexadecenoico (C16:1t). La sensibilidad al frío que tienen algunas plantas parece estar relacionada con la presencia de PG con ácidos grasos tipo C16:0 y C16:1t. Por otro lado, el PG parece ser necesario para que LHClI forme trímeros (véase apartado 4.4). Otros fosfolípidos como fosfatidil colina (PC) apenas se encuentran en tilacoides, aunque, en contraste, PC sea el glicerolípidos más abundante (32 %) en la membrana externa de la envuelta cloroplástica.

Junto a estos lípidos que construyen la bicapa, existen en los tilacoides otros lípidos con funciones distintas, como son la pareja plastoquinona/plastoquinol, que son transportadores redox (véase apartado 4.6), o el tocoferol, que es una molécula tipo prenilquinona que tiene función antioxidante (véase Capítulo 30). También son lípidos los pigmentos fotosintéticos clorofilas y carotenoides ya citados.

3.5. Los tilacoides separan dos espacios acuosos en el interior cloroplástico: el estroma y el lumen

Las lamelas grana y estromáticas, al estar hechas por dobles membranas tilacoidales plegadas, dejan un espacio acuoso en su interior denominado **lumen**, que queda separado del espacio acuoso interno general del cloroplasto llamado estroma. El **estroma** es la matriz acuosa principal del cloroplasto, ocupa el mayor volumen y puede ser considerado análogo al citosol de una célula. En el estroma se localiza, en disolución, el aparato bio-

molecular que realiza la segunda fase de la fotosíntesis, incluida la vía principal de fijación del dióxido de carbono por el ciclo de Calvin (véase Capítulo 11). El lumen es un espacio separado diferente, donde la reacción más significativa es la fotólisis del agua que produce oxígeno (véase Capítulo 10).

Los tilacoides son, por tanto, biomembranas que separan dos espacios con claras diferencias en composición y en función. Por otro lado, los tilacoides no son iguales u homogéneos en todo el cloroplasto, sino que son asimétricos, presentando internamente una polaridad transversal y una distribución zonal lateral. En los tilacoides, los lípidos de la bicapa exterior, hacia el estroma, no son iguales a los lípidos que están en la bicapa interior orientados hacia el lumen. También, las proteínas insertadas y que atraviesan de un lado a otro los tilacoides (llamadas proteínas intrínsecas de membrana o transmembrana) presentan una asimetría o polaridad transversal, con dos polos o lados funcionalmente distintos: lado luminal y lado estromático. Por otro lado, en los tilacoides también se distinguen lateralmente zonas que, estructural y funcionalmente, tienen distintas propiedades. Estas zonas corresponden a las ya mencionadas como lamelas grana y lamelas estromáticas (véase Fig. 9-8 y Fig. 9-10). Cuando las lamelas de los tilacoides se apilan formando las lamelas grana, dejan de estar en contacto con el estroma por quedar apiladas o pegadas a la siguiente lamela. El apilamiento es un factor que cambia la topología de los tilacoides. En el Capítulo 10 se indica con más detalle la diferente composición de proteínas de estas dos zonas tilacoidales, grana y estromática.

4. ELEMENTOS DEL APARATO FOTOSINTÉTICO EN LOS TILACOIDES

4.1. Insertados en las membranas tilacoidales se encuentran los 4 complejos proteínicos que llevan a cabo la primera fase fotosintética

La primera fase de la fotosíntesis es una fase de conversión de energía que incluye la formación de una cadena redox de transferencia de electrones y la consecuente generación de un gradiente de concentración de protones. Los tilacoides contienen los complejos proteínicos que llevan a cabo ese manejo de electrones y protones imprescindible para la conversión energética.

Los complejos proteínicos incluidos en los tilacoides son cuatro y, por su complejidad estructural y funcional y gran tamaño molecular, se pueden llamar macro-complejos. Los tres primeros están implicados en la transferencia electrónica a lo largo de la membrana y en la transferencia protónica a través de la membrana (del estroma al lumen). Para realizar estas transferencias, estos complejos contienen engarzadas en su esqueleto proteínico una serie de moléculas, átomos o agrupaciones atómicas que tienen capacidad redox reversible.

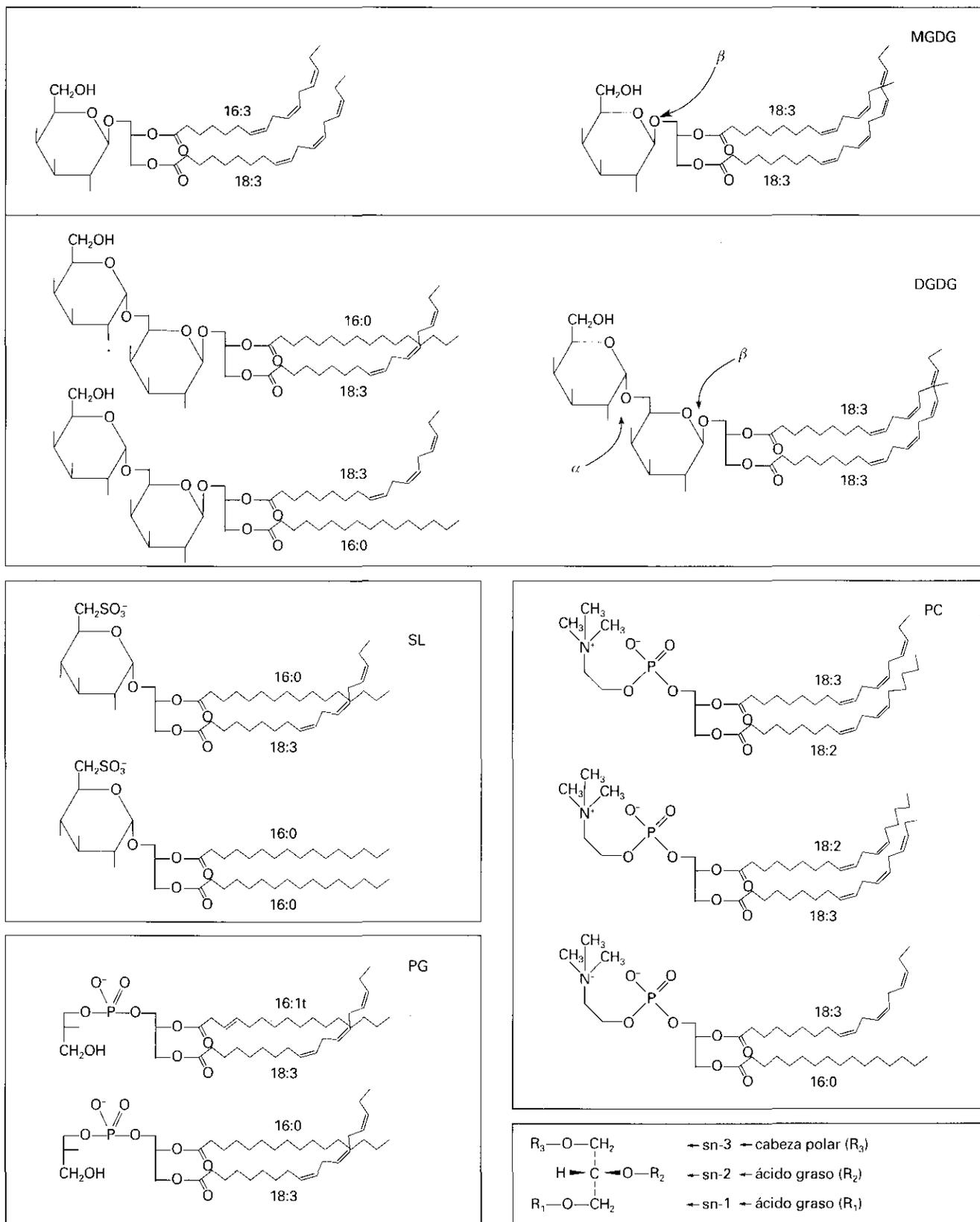


Figura 9-9. Estructura molecular de los principales tipos de glicerolípidos constitutivos de las membranas tilacoidales: galactolípidos: monogalactosil diacilglicerol (MGDG), digalactosil diacilglicerol (DGDG); sulfolípidos y sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG o SL); fosfolípidos: fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidil colina (PC).

Dos de estos complejos son, además, **fotosistemas**, es decir, sistemas capaces de absorber y transformar la energía fotónica en energía electroquímica redox. Se llaman **fotosistema I** y **fotosistema II**. Esta definición amplia de los fotosistemas incluye las antenas extrínsecas respectivas (LHC I y LHC II), aunque estructuralmente conviene considerarlas por separado (véase más adelante). El tercer complejo es un sistema conector entre los dos fotosistemas, llamado **complejo citocromo b₆f**.

Finalmente, existe un cuarto complejo proteínico distinto a los otros porque no interviene en las transferencias citadas, sino que utiliza el gradiente de protones que los otros complejos han formado a través del tilacoide. Los protones, al fluir de vuelta del lumen al estroma a favor de gradiente, proporcionan una energía (fuerza protonmotriz) que el cuarto complejo utiliza para sintetizar ATP, a partir de ADP y Pi. Este complejo es, por ello, una **ATP sintasa** (ATPasa). El ATP es una biomolécula útil para multitud de trabajos metabólicos y celulares, es decir, un combustible bioquímico estable casi universal.

La Figura 9-10 muestra los cuatro complejos insertados en la membrana tilacoidal indicando, de modo esquemático, las transferencias y el flujo de electrones y protones mencionados. Las membranas dibujadas corresponden a una sección que incluye parte de lamela grana y parte de lamela estromática.

Cada complejo fotosintético está codificado por una familia de genes específica denominada: *psa* para el fotosistema I (excepto LHCI); *psb* para el fotosistema II (excepto LHCII); *pet* para el citocromo b₆f; *atp* para la ATPasa; *lhca* para LHCI; *lhcb* para LHCII. La primera letra es mayúscula si el gen está en el núcleo y minúscula si está en el cloroplasto. Cada gen concreto se denomina con una letra mayúscula a continuación del nombre de la familia: *psaA*, *psaB*, etc. Los polipéptidos se denominan según esta nomenclatura quitando el tipo cursiva y con la primera letra en mayúscula: **PsaA**, **PsaB**, etc.

En la última década se ha avanzado mucho en el descubrimiento y la caracterización de cada uno de los componentes de estos complejos fotosintéticos. Para la identificación sistemática ha sido muy útil la secuenciación total del DNA de cloroplastos (DNAcp) y de gran parte del DNA nuclear de células vegetales. A pesar de estos logros, la función de algunos de los polipéptidos es todavía desconocida y también es probable que falten algunos por descubrir, especialmente si tienen peso molecular pequeño, ya que pueden quedar fácilmente enmascarados.

4.2. El fotosistema II, PSII, es un complejo constituido por unos 21 polipéptidos, enzimáticamente llamado agua-plastoquinona óxido-reductasa

El fotosistema II es un macro-complejo que, por su actividad bioquímica, puede ser denominado agua-plasto-

quinona óxido-reductasa, ya que, enzimáticamente, cataliza la oxidación del agua y la reducción de la plastoquinona, ambas foto-inducidas. Este fotosistema se encuentra en todos los organismos verdes autótrofos, tanto plantas superiores como algas verdes y cianobacterias. En él suceden dos procesos de especial significación para el conjunto de la fotosíntesis: 1) La primera **separación de carga**, consecuencia de la transducción de energía luminosa en energía redox, es decir, la transformación del flujo fotónico en flujo electrónico. Con la primera separación de carga se inicia el transporte electrónico fotosintético, y 2) La hidrólisis del agua, que da electrones y protones y también da lugar a oxígeno molecular liberado como producto residual de la reacción.

Ambos procesos son pilares esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la vida sobre el planeta porque, a través de ellos, se hace posible el aprovechamiento de la luz solar como fuente de energía y se posibilita la existencia de una atmósfera rica en oxígeno. El oxígeno es necesario para los procesos oxidativos, esencialmente para la respiración, que es la principal fuente de energía en sistemas heterótrofos (véase Capítulo 14).

Desde el punto de vista estructural, el fotosistema II está constituido por unos 21 polipéptidos (LHCII aparte) (Fig. 9-11). De ellos, 17 son proteínas intrínsecas de membrana. Las 2 proteínas centrales que unen los principales cofactores implicados en las reacciones redox son las proteínas D1 y D2, de tamaño 30-32 kDa. Íntimamente asociado a éstas está un grupo de proteínas de pesos moleculares pequeños, entre 4 y 9 kDa, que no unen clorofilas; son, por ejemplo, la fosfoproteína PsbH que une fosfato y el citocromo b559 que tiene un grupo hemo redox y 2 polipéptidos (PsbE y PsbF). Luego están las proteínas que unen específicamente clorofilas (llamadas clorofilo-proteínas: CP), que constituyen la antena intrínseca del fotosistema II: CP47 y CP43 (el número junto a CP indica el peso molecular aparente). Todas las proteínas citadas forman el «núcleo» (*core*) del centro de reacción del fotosistema, que tiene un tamaño de unos 6-8 nm (Fig. 9-11). Existen otras clorofilo-proteínas más pequeñas (CP29, CP26, CP24 y CP22), implicadas en la interconexión del centro de reacción con su antena extrínseca LHCI (véase apartado 4.4). La disposición y el número de estas CP varían según el estado funcional del fotosistema II y su unión a LHCII; sin embargo, la antena intrínseca y el resto de las proteínas centrales son constantes.

Asociadas al fotosistema II en el lado del lumen hay 3 proteínas extrínsecas de membrana que ayudan a la función de fotólisis del agua y producción de oxígeno. Se llaman proteínas extrínsecas estabilizadores del desprendimiento de oxígeno (en inglés, OEEp). Tienen pesos moleculares de 33, 23 y 16 kDa y, por los genes que las codifican, se llaman: PsbO, PsbP y PsbQ. Finalmente, también se ha identificado en el fotosistema II la proteína PsbR, de peso molecular 10 kDa y que tiene una parte integrada en la membrana y otra extrínseca.

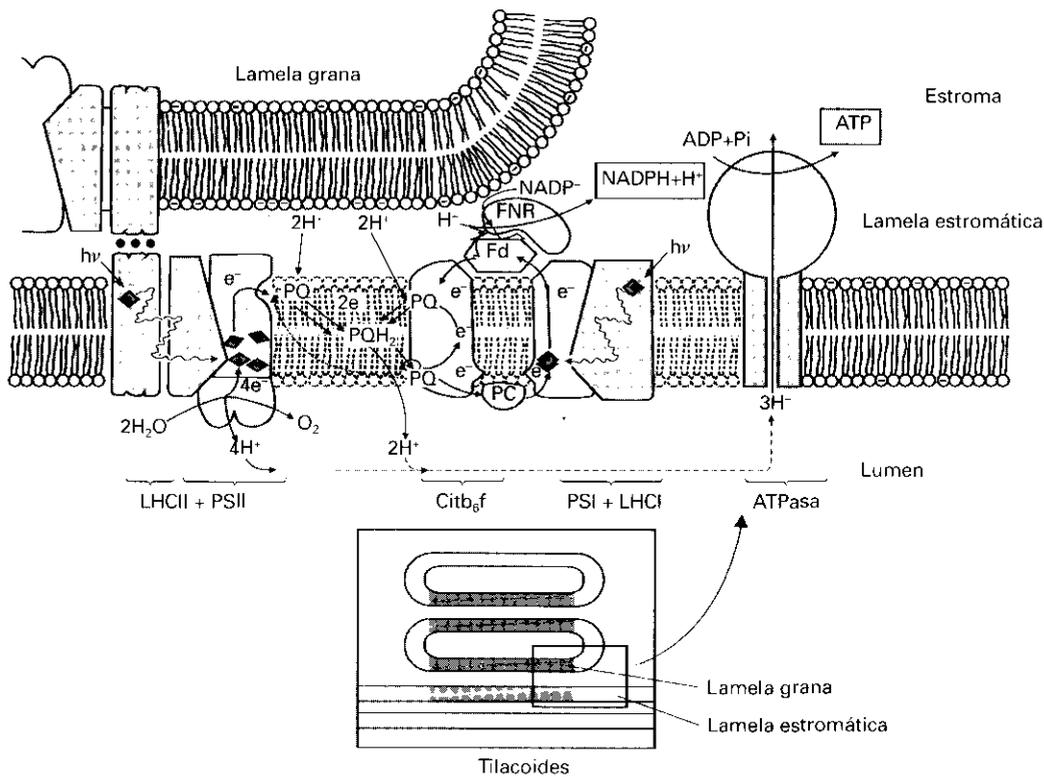
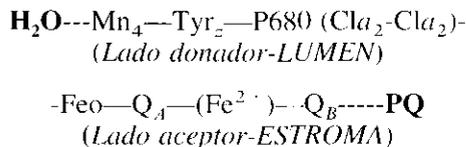


Figura 9-10. Cuatro complejos enzimáticos insertados en la membrana tilacoidal. Se indican de modo esquemático las transferencias y el flujo de electrones y protones explicados en el texto. Las membranas dibujadas corresponden a una sección que incluye parte de lamela grana y parte de lamela estromática.

Los cofactores o grupos prostéticos implicados en la transferencia electrónica desde agua a plastoquinona en el fotosistema II son:



Todos estos elementos son moléculas o agrupaciones atómicas o moleculares, capaces de oxidarse y reducirse reversiblemente. Sus características químicas y modo de funcionamiento en la transferencia electrónica fotosintética se explican en el Capítulo 10.

Estos grupos prostéticos están unidos a las dos proteínas centrales del fotosistema II, D1 y D2 (PsbA y PsbD). Los tipos de enlace en estas uniones son dispares, predominando las uniones no covalentes. Las proteínas D1 y D2 son estructuralmente gemelas y cada una incluye una serie de cofactores que, por ello, están duplicados. Es decir, hay dos tirosinas, cuatro clorofilas, dos feofitinas y dos quinonas: 2Tyr(Z y D)-2Cl-2Cl-2Feo-2Q(A y B). La proteína D1 es la que une la serie de cofactores implicadas en la transferencia electrónica: Tyr_Z-Cl-Cl-Feo-Q_B. Los otros cofactores unidos a D2 (Tyr_D-Cl-Cl-Feo) no intervienen en el flujo electrónico, a excepción de la Q_A y el hierro no hemini-

nico (Fe²⁺), que es único. De este modo, el dímero D1-D2 es un sistema estructuralmente duplicado pero funcionalmente asimétrico porque los electrones fluyen, principalmente por un lado o rama del dímero.

4.3. El fotosistema I, PSI, es un complejo constituido por unos 15 polipéptidos, enzimáticamente llamado plastocianina-ferredoxina óxido-reductasa

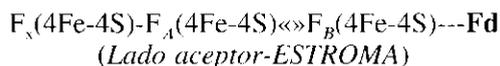
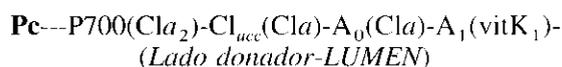
El segundo fotosistema constituyente del aparato fotosintético vegetal es el fotosistema I. Por su función enzimática puede ser denominado plastocianina-ferredoxina óxido-reductasa, ya que interviene en la parte final de la transferencia electrónica fotosintética tomando los electrones de la proteína del lumen plastocianina y cediéndolos a la proteína del estroma ferredoxina.

Estructuralmente, este fotosistema está constituido por dos proteínas centrales grandes, de peso molecular 83 kDa (PsaA) y 82 kDa (PsaB) (Fig. 9-12). Estas proteínas unen los principales cofactores redox implicados en la transferencia electrónica, y unen también un gran número de clorofilas que funcionan como antena intrínseca del fotosistema. En el lado estromático, integrada con PsaA y Psa B, hay otra proteína pequeña, PsaC (8.9 kDa), que liga los dos últimos cofactores redox del fotosistema. Asociada a estas 3 proteínas hay una serie de

polipéptidos transmembrana de tamaño pequeño: PsaI (4.6 kDa), PsaJ (3.3 kDa), PsaK (5.6 kDa) y PsaL (15.4 kDa). También, asociados al dímero central PsaA-PsaB tanto por el lumen como por el estroma, se encuentran otros polipéptidos que posibilitan la interacción (o *docking*) y la transferencia redox de plastocianina y ferredoxina con el fotosistema I. Estos polipéptidos son, en el estroma: PsaD (17.9 kDa), PsaE (9.7 kDa), PsaG (10.8 kDa), PsaH (10.2 kDa); y en el lumen: PsaF (17.3 kDa), PsaO (9.0 kDa). PsaG y PsaO no son totalmente extrínsecos porque tienen un dominio transmembrana. PsaD y PsaF son los que están específicamente implicados en la unión electrostática a plastocianina y a ferredoxina, respectivamente (Fig. 9-12).

La antena o complejo de clorofilo-proteínas colectoras de luz asociado al fotosistema I se llama LHCI. Su estructura se describe en el apartado 4.4.

Los cofactores o grupos prostéticos implicados en la transferencia electrónica desde plastocianina (Pc) a ferredoxina (Fd) dentro del fotosistema I son:



Todos estos grupos prostéticos están unidos a las proteínas centrales del fotosistema I, PsaA y PsaB, y a la pequeña proteína extrínseca PsaC. Las dos proteínas centrales, de modo análogo al fotosistema II, son estructuralmente gemelas y en ellas algunos cofactores están también duplicados. Así, hay dos clorofilas accesorias (Cl_{acc} y Cl_{acc}'), dos A_1 (A_1 y A_1') y dos A_0 (A_0 y A_0'). El flujo electrónico es asimétrico y sólo sucede a través de una de las ramas: $\text{Cl}_{acc} - \text{A}_0 - \text{A}_1$.

4.4. Los complejos antena LHCI y LHCII son sistemas colectores de luz

Asociadas a cada fotosistema existen unas **antenas periféricas o extrínsecas**, llamadas **LHC** (del inglés *Light Harvesting Complexes*: complejos cosechadores de luz) I y II. Estas antenas complementan la función de captación y absorción de luz que también tienen las antenas intrínsecas de cada fotosistema ya citadas.

Las LHC contienen una variedad relativamente alta de polipéptidos que se pueden asociar de manera diversa según el estado funcional. Por ello, hay varios tipos de LHCI y de LHCII que se combinan y ensamblan de modo múltiple. La LHCI está constituida por polipéptidos de cuatro tipos: LhcA1, LhcA2, LhcA3 y LhcA4, de pesos moleculares entre 22 y 25 kDa. La LHCII está constituida por polipéptidos de tres tipos: LhcB1, LhcB2 y LhcB3, de pesos moleculares entre 25 y 28 kDa. Todos estos polipéptidos están codificados por genes nucleares.

Estructuralmente parece ser que cada fotosistema I está rodeado por 8 polipéptidos de LHCI con 2 copias de cada uno de los 4 tipos mencionados. Sin embargo, la posición y las asociaciones precisas de los distintos tipos de LhcA no se conocen, aunque sí se sabe que esta antena está siempre asociada al fotosistema I (Fig. 9-12).

El complejo antena LHCII es más variable en composición y se puede mover por dentro de los tilacoides independientemente del fotosistema II, sufriendo redistribuciones en respuesta a estímulos ambientales. En general, forma trímeros constituidos por los polipéptidos LhcB1 y LhcB2. El polipéptido LhcB3 cumple principalmente el papel de interconexión entre los trímeros móviles de la antena extrínseca y también contribuye a la conexión con la antena intrínseca del fotosistema II, junto con CP29, CP26 y CP24.

Los principales pigmentos fotosintéticos asociados a estos complejos de antena son las clorofilas que se encuentran engarzadas en la matriz polipeptídica de las LHC. También estos polipéptidos unen pigmentos carotenoides. Cada subunidad polipeptídica de LhcB une 6-8 clorofilas *a*, 5-6 clorofilas *b*, 2 luteínas, 1 neoxantina y varias moléculas de fosfolípidos (DGDG y PG) necesarios para la formación de trímeros de LHCII. Recientemente la estructura de una subunidad monomérica de LHCII ha sido determinada con precisión observándose que la cadena polipeptídica tiene tres α -hélices transmembrana que unen en el centro 7 clorofilas *a* y 2 luteínas *y*, más periféricamente, 5 clorofilas *b*. El número exacto de clorofilas *a* y *b* asociadas a cada polipéptido de LHCI se conoce con menos precisión. Sin embargo, tanto para LHCI como para LHCII se han realizado cálculos globales aproximados del número total de pigmentos que unen. Estos cálculos para toda la antena de PSI-LHCI, es decir, tanto antena intrínseca como antena extrínseca, dan los siguientes valores: 180-190 clorofilas *a*; 24 clorofilas *b*; 27 β -carotenos; 12 luteínas; 9 violaxantinas y 0-2 neoxantinas. Igualmente, se ha estimado el número de moléculas de cada pigmento unidas a toda la antena de PSII-LHCII en: 160 clorofilas *a*; 70 clorofilas *b*; 10 β -carotenos; 2-3 luteínas; 3-4 violaxantinas y 7 neoxantinas.

4.5. El complejo citocromo b_6f hace de puente entre los dos fotosistemas y regula su interconexión

Un tercer complejo implicado en la transferencia electrónica fotosintética en los tilacoides es el **complejo citocromo b_6f** . Su principal función es conectar los dos fotosistemas, oxidando el plastoquinol (PQH_2) producido en el fotosistema II y reduciendo la plastocianina (Pc) que se oxidará en el fotosistema I. Este complejo no es exclusivamente fotosintético, ya que es análogo a la ubiquinol-citocromo *c* reductasa de la membrana respiratoria de mitocondrias y bacterias (véase Capítulo

14). De hecho, las bacterias fototróficas purpúreas utilizan esta última proteína tanto para respiración como para fotosíntesis, y lo mismo se ha descrito con el citocromo b_6f en cianobacterias, procariontes que realizan fotosíntesis oxigénica.

La Figura 9-13 muestra esquemáticamente cómo se empaquetan en la membrana tilacoide los cuatro polipéptidos principales que componen el complejo citocromo b_6f y sus cofactores o grupos prostéticos. Estos componentes son: el citocromo f (de peso molecular 31.3 kDa) con un grupo hemo tipo c localizado extrínsecamente en el lumen; el citocromo b_6 (23.7 kDa), con dos grupos hemo tipo b localizados dentro de la membrana; la proteína Rieske (18.8 kDa), que tiene un centro sulfo-ferro $2Fe-2S$ y la subunidad IV (15.2 kDa), que interviene en la unión de las quinonas. Además, se ha descrito la presencia de un quinto polipéptido, la subunidad V, bastante más pequeño (4 kDa), de función todavía no claramente definida. La familia de genes que codifica estas proteínas abarca, en el orden antes citado: *petA*, *petB*, *petC*, *petD* y *petE*. El gen de la proteína Rieske (*petC*) está en el genoma nuclear y el resto, en el DNA cloroplástico.

En la Figura 9-13 se muestran también esquemáticamente las porciones de cada polipéptido que atraviesan la membrana tilacoide y la localización aproximada de los grupos prostéticos: 3 hemos, 1 sulfo-ferro y las zonas de unión de las 2 quinonas (Q_i y Q_o).

4.6. Entre los complejos de la cadena fotosintética hay una serie de conectores redox: plastoquinona, plastocianina, ferredoxina y FNR

Para lograr el flujo global de la cadena fotosintética, desde la oxidación del H_2O hasta la reducción de $NADP^+$, es necesaria la presencia de pequeñas moléculas móviles que interconecten los tres complejos fotosintéticos. Las biomoléculas intermedias encargadas de esta conexión redox son la plastoquinona (PQ) y tres proteínas pequeñas: plastocianina (Pc); ferredoxina (Fd) y ferredoxina- $NADP^+$ reductasa (FNR).

La **plastoquinona** (PQ) es una molécula de carácter anfipático, que tiene una cabeza polar de tipo ceto-benceno, con dos grupos ceto en el anillo bencénico (quinona) capaces de reducirse para dar un difenol con dos grupos hidroxilo (hidroquinona). Esta molécula también tiene unida, como sustituyente del anillo, una cola no polar hidrocarburo $—[CH_2—CH(C(CH_3)_2)—CH_2]_n—H$. Por este carácter anfipático (polar + no polar) la plastoquinona se mezcla y difunde bien en la fase lipídica de la membrana del tilacoide. El número de plastoquinonas por centro de reacción es más de uno, estimándose que existe un acervo (en inglés, *pool*) de plastoquinonas del orden de 10 por fotosistema II, que se va reduciendo y oxidando según el estado funcional del aparato fotosintético. Por su papel interconector, el *pool* de plasto-

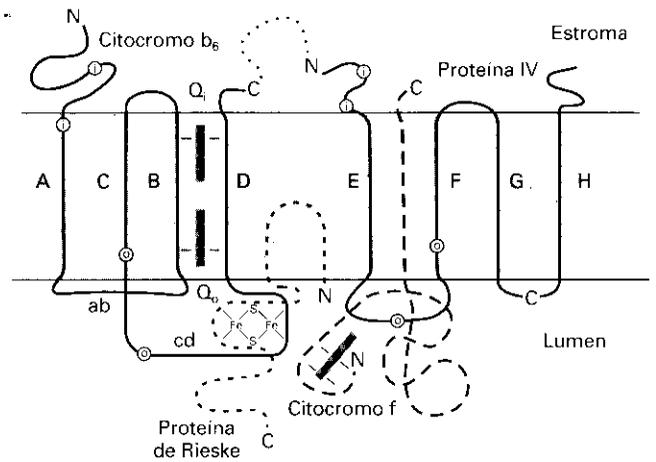


Figura 9-13. Modelo de asociación en la membrana tilacoide de los 4 polipéptidos principales que componen el complejo citocromo b_6f y sus cofactores o grupos prostéticos. Estos componentes son: el citocromo f , con un grupo hemo tipo c localizado extrínsecamente en el lumen; el citocromo b_6 , con dos grupos hemo tipo b localizados dentro de la membrana; la proteína de Rieske, con un centro sulfo-ferro $2Fe-2S$; y la subunidad o proteína IV, que interviene en la unión de las quinonas.

quinonas ejerce un acción reguladora importante en el funcionamiento de la cadena de óxido-reducción fotosintética y es, en muchos casos, un punto de cruce de esta vía con otras vías redox.

La **plastocianina** (Pc) es una proteína óxido-reductasa pequeña, que se asocia de modo extrínseco a la membrana tilacoide en el lado del lumen y hace de puente redox entre el complejo citocromo b_6f y el fotosistema I. Es una proteína soluble en agua, de peso molecular 10 kDa, que funciona como un transportador electrónico móvil tomando un electrón del citocromo f que la reduce y dándole al P700 del fotosistema I que la oxida. El grupo prostético reactivo de la plastocianina es un átomo de cobre (Cu) ligado a 4 residuos aminoácidos (dos histidinas H, una cisteína C y una metionina M), en una geometría casi tetraédrica. Fruto de su unión al cobre, la proteína tiene color azul.

La **ferredoxina** (Fd) es otra proteína óxido-reductasa pequeña, de peso molecular 11 kDa, que contiene un centro sulfo-ferro de bajo potencial tipo $[2Fe-2S]$ y actúa como aceptor de los electrones del fotosistema I en el lado estromático de la membrana tilacoide. El centro sulfo-ferro está constituido por 2 átomos de hierro coordinados, cada uno, con 4 azufres: 2 átomos de azufre inorgánico centrales compartidos y otros 2 azufres dados por radicales cisteína a cada hierro. De este modo, cada átomo de hierro presenta una geometría tetraédrica. La ferredoxina, igual que la plastocianina, es una proteína extrínseca de membrana soluble en agua y, por ello, móvil, capaz de transportar electrones entre dos sistemas redox. La principal función de la ferredoxina dentro de la cadena electrónica fotosintética es interconectar el fotosistema I con la enzima final que reduce el $NADP^+$,

llamada ferredoxina-NADP⁺ óxido-reductasa (FNR). La ferredoxina no tiene como única función reducir la FNR, sino que es una proteína redox multifuncional, involucrada en la reducción de una serie de enzimas solubles presentes en el estroma cloroplástico y, llamadas enzimas dependientes de ferredoxina. Estas enzimas son la citada FNR; la ferredoxina-nitrito óxido-reductasa o, simplemente llamada, nitrito reductasa (implicada en el metabolismo del nitrógeno); la glutamina α -cetoglutarato amino-transferasa o glutamato sintasa (implicada también en el metabolismo del nitrógeno) y la ferredoxina-tiorredoxina óxido-reductasa o tiorredoxina reductasa (implicada en el metabolismo del azufre) (véase Capítulo 15).

La FNR es la última proteína implicada en el flujo fotosintético electrónico lineal al reducir NADP⁺ para dar NADPH. Para esta reducción son necesarios 2 electrones y 1 protón; por ello, la FNR debe interactuar con 2 ferredoxinas reducidas, cada una de las cuales le cede un electrón. El H⁺ es tomado del medio acuoso estromático, produciéndose un aumento del pH que contribuye a incrementar la diferencia de pH trans-tilacoideal (Δ pH). La FNR tiene 35 kDa de peso molecular y tiene como único grupo prostético una molécula de FAD ligada de modo no covalente. En la FNR de cianobacterias se ha distinguido un dominio especial de unos 85 aminoácidos, localizado hacia el extremo amino, implicado en el anclaje de la proteína a la membrana. Este dominio parece no estar presente en la FNR de plantas.

4.7. La ATP sintasa es un complejo enzimático con una parte en el tilacoide y otra en el estroma

La síntesis fotoinducida del ATP sucede tras la cadena redox fotosintética y es catalizada por el complejo enzimático **ATP sintasa** (o, simplemente, ATPasa). Su composición se conoce con bastante detalle por ser un enzima homólogo de la ATP sintasa mitocondrial asociada a la cadena respiratoria (véase Capítulo 14), cuya estructura molecular ha sido recientemente determinada por difracción de rayos X.

El mecanismo que mueve y posibilita la catálisis de la ATPasa es el gradiente de protones transversal originado por el flujo electrónico en el tilacoide (véase Capítulo 10). En la Figura 9-14 se muestra un esquema estructural de la ATP sintasa cloroplástica que consta de dos partes o dominios diferenciados: un dominio extrínseco ubicado en el estroma, llamado CF₁; y otro dominio intrínseco insertado en la membrana tilacoide, llamado CF₀, que hace de conector con el lumen y es por donde entran los protones. El dominio extrínseco está constituido por asociación de 5 tipos de subunidades polipeptídicas distintas: α , β , γ , δ , ϵ . Las subunidades α y β son las más grandes, forman la cabeza del complejo y se asocian en dos trímeros alternados (α - β)₃. A ellas se unen los cofactores ADP y P_i, necesarios para formar

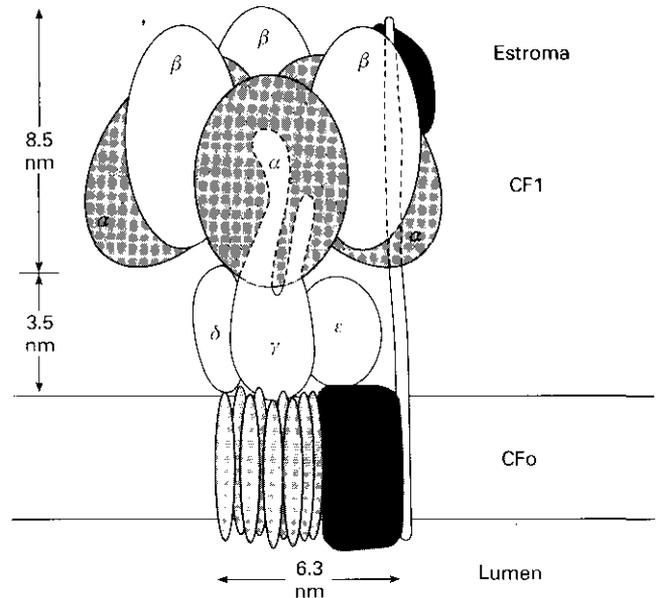


Figura 9-14. Modelo estructural esquemático de la ATP sintasa cloroplástica que consta de dos dominios diferenciados: dominio CF₁, ubicado en el estroma, y dominio CF₀, insertado en la membrana tilacoide que hace de conector con el lumen, por donde entran los protones. El dominio extrínseco está constituido por asociación de 5 tipos de subunidades polipeptídicas distintas: α , β , δ , γ , ϵ . Las subunidades α y β son las más grandes, forman la cabeza del complejo y se asocian en dos trímeros alternados (α - β)₃. Los dos dominios están también unidos por una subunidad larga que está anclada en la membrana y llega también hasta el dominio extrínseco para sujetarlo.

el ATP. Las subunidades γ , δ y ϵ sirven de conexión con el dominio CF₀. Este dominio intrínseco está constituido por 4 tipos de subunidades polipeptídicas: I, II, III y IV; y actúa como un canal que permite el paso o flujo regulado de los protones, moviéndose a modo de rotor por acción de ese flujo. Este giro o rotación es transmitido al dominio estromático para inducir cambios de conformación en la cabeza de la ATP sintasa que posibilitan la catálisis enzimática. La familia de los genes que codifican las 9 subunidades polipeptídicas mencionadas de la ATP sintasa (5 de CF₁ y 4 de CF₀) se llama *atp* y comprende 9 genes: *atpA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H* y *I*. Los genes *atpC*, *atpD* y *atpG* son codificados por el genoma nuclear celular y el resto, por el DNA del cloroplasto.

5. GENÉTICA Y ORIGEN DEL APARATO FOTOSINTÉTICO VEGETAL

5.1. Los complejos proteínicos del tilacoide están codificados por el DNA cloroplástico y por el DNA nuclear de las células vegetales

Los polipéptidos que integran los complejos proteínicos del tilacoide están codificados por dos genomas distin-

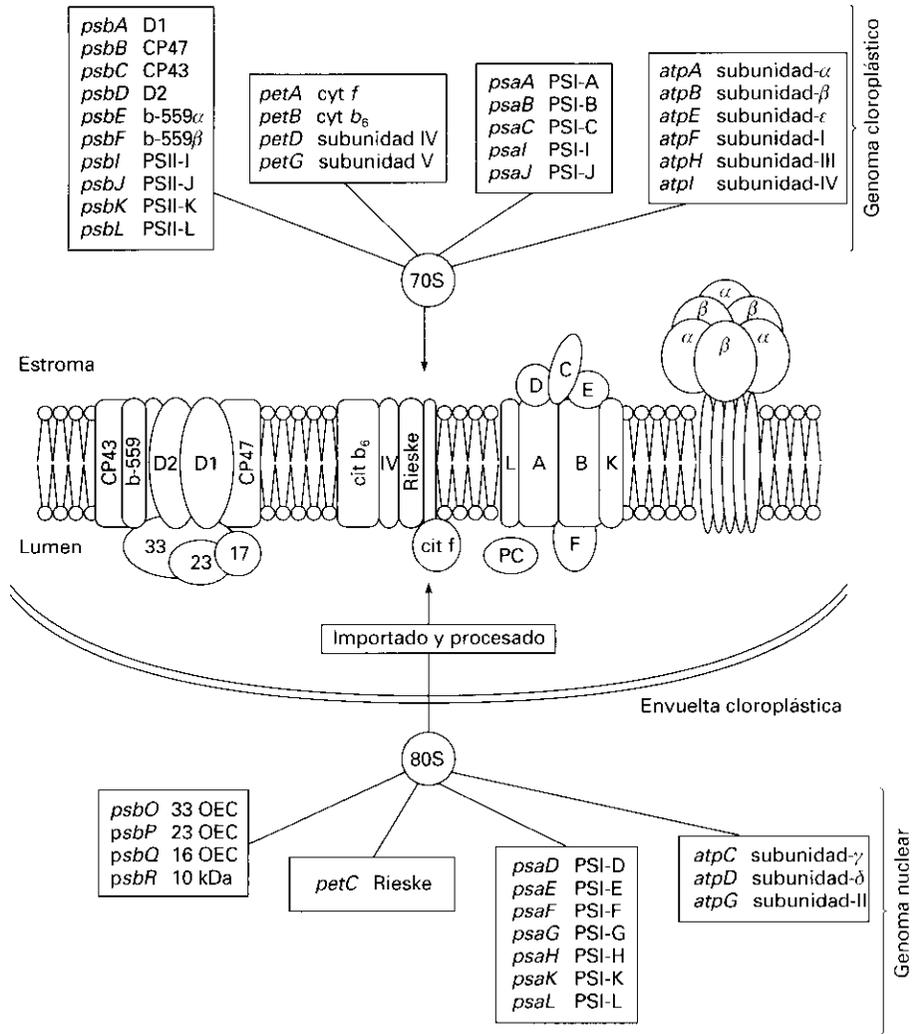


Figura 9-15. Esquema que sitúa los polipéptidos que integran los cuatro complejos fotosintéticos del tilacoide (PSII, Cit *b₆f*, PSI y ATPasa) según estén codificados por el DNA cloroplástico (DNACP), o por el DNA nuclear de cada célula vegetal. La traducción del genoma nuclear sucede en el citosol, mediada por los ribosomas tipo 80S, y la traducción del genoma cloroplástico sucede en el estroma del cloroplasto mediada por los ribosomas 70S.

tos: el DNA presente en el estroma del cloroplasto, llamado DNA cloroplástico (DNACP), y el DNA nuclear de cada célula vegetal. En la Fig. 9-15 se muestra, para cada uno de los cuatro complejos fotosintéticos (PSII, Citocromo *b₆f*, PSI y ATPasa), qué polipéptidos están codificados por el genoma nuclear y cuáles por el genoma cloroplástico.

Los polipéptidos nucleares se traducen en el citosol mediante la acción de los ribosomas celulares, de tamaño 80S. Tras la traducción, estos polipéptidos son importados al cloroplasto y procesados para poder ser ensamblados. El procesado está relacionado con el corte de una secuencia señal de transporte al cloroplasto (de entre 30 y 80 aminoácidos) que estos polipéptidos llevan. Para el caso de los polipéptidos cloroplásticos, la traducción se realiza en el estroma mediante la acción de los ribosomas del cloroplasto, de tamaño 70S. Es significativo que todos los complejos tienen algunos polipéptidos codificados en el núcleo y otros en el clo-

roplasto. El fotosistema I es el único que tiene más polipéptidos codificados por el DNA nuclear que por el DNA cloroplástico. El complejo citocromo *b₆f* tiene tan sólo un gen nuclear. Esta mezcla de genes de dos procedencias para la formación de un determinado complejo multi-polipeptídico hace que la expresión de estos genes deba estar muy bien regulada y coordinada, para evitar retrasos o faltas de algún elemento polipeptídico que pudieran provocar errores en el ensamblaje de los complejos.

El **DNA cloroplástico** (DNACP) es un DNA circular que tiene un tamaño de entre 130 000 y 160 000 pares de bases y que, por estas características, se asemeja a un DNA bacteriano. En la Fig. 9-16 se muestra un mapa del DNACP del arroz (*Oryza sativa*). En este DNACP de doble hebra, unos genes están codificados en la hebra A, leída en sentido contrario a las agujas del reloj (estos genes se indican en la Figura 9-16 fuera del círculo); otros genes están codificados en la hebra B, leída en el

somas tipo 70S dentro de la maquinaria de transcripción de los cloroplastos apoya el pensamiento de un origen procariótico para estos orgánulos, ya que este tipo de ribosomas es semejante al de bacterias y distinto del 80S eucariótico. Otro razonamiento que favorece esta idea sobre el origen, es que los cloroplastos son plastidios con una doble membrana, una de ellas externa la cual es análoga estructural y funcionalmente a una membrana plasmática, aunque presenta una mayor permeabilidad. La presencia de esta membrana externa indica que el orgánulo ha podido en algún momento estar en contacto con un medio extracelular.

En lo que se refiere a la fotosíntesis, llama la atención que todo este proceso fisiológico tan trascendental para la vida y la caracterización de los vegetales se realice completamente dentro de un orgánulo celular, de modo que el resto de la célula, aunque la regula y controla, no realiza fotosíntesis. Es decir, no hay enzimas o elementos fotosintéticos fuera del cloroplasto.

Todos estos argumentos han llevado a postular una hipótesis sobre el origen en la evolución de las células vegetales eucariotas. La hipótesis mantiene que un organismo unicelular fotosintético procariótico arcaico habría sido fagocitado por un ancestro eucariótico unicelular no fotosintético, quedando incluido en su citoplasma. Ambos organismos iniciarían así una relación de simbiosis que, con el tiempo, daría lugar a un solo organismo integrado, con toda una serie de capacidades metabólicas fruto de la combinación de las de ambos predecesores, especialmente la capacidad fotosintética aportada por el organismo autótrofo fotosintético. Este organismo procariótico podría ser del tipo de las cianobacterias. La teoría se denomina **teoría endosimbionte**.

La hipótesis de un origen endosimbionte también se ha utilizado para explicar el origen de las mitocondrias, que son el otro orgánulo implicado en la bioenergética celular, donde tiene lugar la respiración. Los vegetales también tienen mitocondrias en sus células con las que respiran como vía energética alternativa a la fotosíntesis (véase Capítulo 14).

RESUMEN

La radiación solar que llega a la Tierra abarca una amplia franja del espectro radiativo electromagnético, dentro del cual una parte significativa es la **radiación luminosa**. Esta luz es fuente de energía primaria para la biosfera ya que, mediante el proceso fisiológico denominado **fotosíntesis**, determinados organismos vivos autótrofos son capaces de absorber y utilizar parte de esa energía luminosa solar. Entre los organismos fotosintéticos, los vegetales son los principales y la fotosíntesis distingue y define el reino vegetal, determinando la estructura y la fisiología de las plantas. El tipo de fotosíntesis que realizan los vegetales se caracteriza por la formación de oxígeno como subproducto; por ello se le denomina **fotosíntesis oxigénica**. En el proceso de la

fotosíntesis se pueden distinguir dos fases: una primera de absorción y conversión de energía luminosa en energía electroquímica redox, y otra segunda, de asimilación de elementos químicos esenciales para la síntesis biomolecular. La fotosíntesis en plantas superiores tiene lugar en tejidos fotosintéticos localizados mayoritariamente en las hojas, que son órganos especializados en esta función. A nivel celular, la maquinaria fotosintética se localiza en los orgánulos subcelulares llamados **cloroplastos**, separados del citosol por una envoltura de doble membrana. Los cloroplastos contienen también un intrincado sistema de membranas internas, las cuales se denominan **membranas tilacoidales** y se pliegan dando dobles membranas (lamelas) que pueden formar láminas paralelas separadas (lamelas estromáticas) o apiladas en discos (lamelas grana). Las membranas tilacoidales incluyen todo el aparato biomolecular necesario para llevar a cabo la primera fase de la fotosíntesis, es decir, son las membranas fotosintéticas donde se encuentran los 4 complejos proteínicos que funcionan hasta producir NADPH y ATP. Los tres primeros están implicados en la transferencia electrónica y protónica a través de la membrana tilacoide en contra de gradiente: realizan estas transferencias porque son complejos proteínicos transmembrana que contienen engarzada en su esqueleto una serie de moléculas con capacidad redox reversible. Dos de estos complejos son fotosistemas: el **fotosistema I** y el **fotosistema II**. El tercer complejo es un sistema conector entre ambos fotosistemas, llamado complejo **citocromo b_6/f** . El cuarto complejo, la **ATP sintasa**, es distinto, pues no interviene en la transferencias citadas, sino que utiliza el gradiente de protones que los otros complejos han originado, para sintetizar ATP en el lado estromático a partir de ADP y Pi. Los numerosos polipéptidos que integran estos 4 complejos proteínicos fotosintéticos están codificados por dos genomas: el DNA que existe dentro del cloroplasto, llamado DNA cloroplástico (DNAcp), y el DNA nuclear de cada célula vegetal.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. ¿Qué diferencia de intensidad de luz hay sobre una mesa iluminada con una lámpara de 50 vatios y una mesa puesta al aire libre en un día de sol sin nubes?
2. Basados en la ecuación de la fotosíntesis, calcule cuánto oxígeno se desprende a la atmósfera por litro de agua utilizado por una planta en la primera fase de la fotosíntesis.
3. La fotólisis del agua y la reducción del NADP^+ suceden en espacios subcelulares distintos. ¿Cuáles son esos espacios diferenciados y qué implicaciones tiene esta distribución por zonas en la función fotosintética global?
4. ¿Cuáles son las proteínas que unen los principales cofactores del *core* o núcleo central del fotosistema I y del fotosistema II?
5. ¿Cuál es la explicación actual más verosímil sobre el origen de los cloroplastos de vegetales?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Anderson, J. M.: «Cytochrome b_6f complex-dynamic, molecular organization, function and acclimation». *Photosynth Res*, 34:341-357, 1992.
2. Blankenship, R. E.: «Origin and early evolution of photosynthesis». *Photosynth Res*, 33:91-111, 1992.
3. De La Rosa, M. A., et al.: *Fotobioquímica*. Síntesis, Madrid, 1990.
4. De Las Rivas, J.: «La luz como fuente limpia de energía». *Medio Ambiente y Territorio*, 2.º Semestre: 20-24, 1995.
5. Golbeck, J. H.: «Structure and function of photosystem I». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:293-324, 1992.
6. Goodwing, T. W., Mercer, E. I.: «Photosynthesis». En: *Introduction to Plant Biochemistry*, 2.ª ed., 5:92-161, Pergamon Press, Oxford, 1983.
7. Jansson, S.: «The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins». *Biochim Biophys Acta*, 1184:1-19, 1994.
8. Nitschke, W., Rutherford, A. W.: «Photosynthetic reaction centres: variations on a common structural theme?» *Trends Biochem Sci*, 16:241-245, 1991.
9. Ort, D. R., Yocum, C. E.: «Oxygenic photosynthesis: the light reactions». En: *Advances in Photosynthesis*. Vol. 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996.
10. Trissl, H. W., Wilhelm, C.: «Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks?» *Trends Biochem Sci*, 18:415-419, 1993.
11. Webb, M. S., Green, B. R.: «Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids». *Biochim Biophys Acta*, 1060:133-158, 1991.

UTILIZACIÓN DE LA ENERGÍA LUMINOSA EN LA FOTOSÍNTESIS

Javier De Las Rivas

1. Absorción y conversión de la energía luminosa. 2. Cadena de transporte electrónico fotosintético. 3. Dinámica del aparato fotosintético. 4. Fotorregulación y fotoinhibición del aparato fotosintético. 5. Coordinación y proporción en la producción de ATP y NADPH.

1. ABSORCIÓN Y CONVERSIÓN DE LA ENERGÍA LUMINOSA

Este capítulo se centra en explicar cómo funciona el aparato fotosintético de vegetales, cuya morfología y estructura han sido ya presentadas con detalle en el Capítulo 9, así como gran parte de los conceptos y términos usados en este capítulo.

1.1. Globalmente, un fotosistema está constituido por una antena asociada a un centro de reacción

Para que la fotosíntesis funcione, es esencial que una parte del aparato biomolecular fotosintético sea sensible a la luz. Esta fotosensibilidad viene dada por la existencia de sistemas moleculares que son capaces de absorber la luz (energía luminosa), transmitir la energía absorbida y convertirla (o transducirla) en una energía no radiante, estable y acumulable, como es la energía química.

El sistema o unidad básica esencial para el funcionamiento de todo aparato fotosintético es, precisamente, el fotosistema, el cual es capaz de realizar estos pasos de absorción, transmisión y conversión.

Funcionalmente, un **fotosistema** está constituido por un elemento nuclear o central llamado **centro de reacción**, hacia donde se canaliza la **energía de excitación** (*) y en donde esta energía pasa a transformarse en energía química de tipo redox (-/+) mediante una cadena de transportadores de electrones. Asociado a este elemento central, el fotosistema tiene un elemento llamado **antena**, que es colector o cosechador de luz porque es capaz de absorber los fotones que le llegan cuando está sometido a iluminación y, luego, transmite la

energía absorbida en forma de excitones hasta el centro de reacción. En la Fig. 10-1 se muestra un esquema general de la integración de los dos componentes de un fotosistema: antena y centro de reacción.

Los dos fotosistemas de plantas, fotosistema I y fotosistema II, están constituidos por un centro de reacción al que se asocia, respectivamente, un complejo antena: LHCI y LHCII. Tanto las antenas como los centros de reacción tienen pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) como elementos fotosensibles, es decir moléculas que absorben parte de la radiación luminosa. Por otro lado, los centros de reacción incluyen en sus polipéptidos centrales toda una serie de elementos o grupos redox especiales que realizan el transporte electrónico fotosintético originado tras la conversión energética de excitones en electrones (véase Capítulo 9).

Dada la complejidad de los fotosistemas y demás proteínas fotosintéticas, no es de extrañar que no haya todavía acuerdo completo entre los distintos investigadores sobre la identidad exacta de los elementos o grupos redox que participan en cada una de las etapas individuales de transferencia de electrones. Así, es normal que a determinados elementos redox, detectados por algunas propiedades espectrales y fotoquímicas, se les designe con un símbolo arbitrario que dice muy poco de su naturaleza química. De hecho, la diversidad química de estos elementos redox es muy grande. Pueden ser átomos, moléculas, agrupaciones atómicas o moleculares o, incluso, grupos activos de los mismos residuos aminoácidos integrantes de los polipéptidos. Por esta razón, también es difícil decir si son o no cofactores o grupos prostéticos, considerando los fotosistemas como enzimas.

En el apartado 1.2 se describe el funcionamiento de las antenas en la absorción y transmisión de energía, y en el apartado 1.3 se describe la conversión foto-elec-

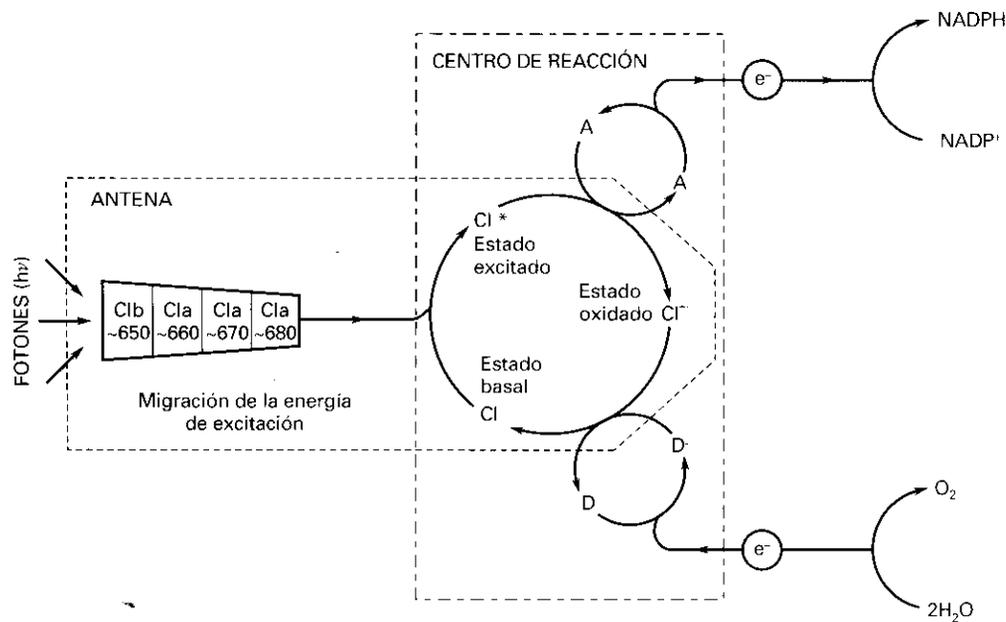


Figura 10-1. Esquema que integra los 2 componentes de un fotosistema: antena y centro de reacción. Las clorofilas (Cl) de la antena se agrupan en conjuntos de longitud de onda creciente (650, 660, 670, 680 nm) y ceden su excitón a las clorofilas centrales del centro de reacción que pasan al estado excitado (Cl^*) y, tras ceder un electrón, al estado oxidado catión (Cl^{+}). Los siguientes elementos redox, aceptores (A) y donadores (D), están asociados en cadena hasta oxidar agua y reducir $NADP^+$.

troquímica realizada en los centros de reacción. En la sección 2 de este capítulo se explica el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico fotosintético, describiendo los elementos redox activos que la componen.

1.2. Las antenas, colectores de luz, absorben fotones y transmiten excitones

El funcionamiento de una antena comienza con la absorción de la luz que le llega. La absorción de luz por un pigmento es la absorción de la energía de los fotones con longitudes de onda capaces de excitar dicha molécula pigmento, es decir, de alterar la energía de los electrones de sus orbitales moleculares más externos. Para una antena, su espectro de absorción global es el resultado de la suma de los espectros de absorción de todos los pigmentos que la constituyen o integran. Como se ha explicado en el Capítulo 9, el resultado de la absorción de un fotón por un pigmento es la transición de la molécula desde el estado electrónico fundamental o basal (S_0) de mínima energía, a uno de los estados excitados predeterminados (S_1 , S_2 , etc.), de mayor contenido energético.

Los diversos procesos que median la relajación del estado excitado de una molécula compiten entre sí, predominando entre ellos los más rápidos. Cualquier utilización con fines metabólicos del excitón o energía extra del estado excitado debe evitar la relajación fútil, lo que sólo es posible si se ofrece una ruta conservadora de energía que sea aún más rápida que los procesos disipa-

dores (véase apartado 2.2 del Capítulo 9). Los factores que determinan la contribución de cada uno de los procesos alternativos de relajación son tanto intrínsecos (dependientes del propio pigmento) como extrínsecos (es decir, dependientes de las interacciones con otras moléculas cercanas). En general, la vida media de un estado excitado singlete de una molécula aislada no suele exceder de una fracción de microsegundo, lo que da idea de las altas constantes de velocidad de las rutas por las que transcurre su relajación ($k \geq 10^{-6} \text{ s}$). Para las clorofilas, la vida media del estado excitado es aún menor, del orden del nanosegundo (10^{-9} s), y más corta todavía es la de los carotenoides. La razón de la rapidez de estos procesos es que no están impedidos por barreras de activación, ya que sólo implican saltos electrónicos entre orbitales de la misma molécula y cambios vibratorios de los enlaces. Cuando varias moléculas de clorofila están acopladas excitónicamente (como ocurre en las antenas), la vida media de sus estados excitados se hace, incluso, mucho más corta y pasa al orden de los picosegundos (puede oscilar entre 1 y $100 \times 10^{-12} \text{ s}$). De este modo, la vía de transferencia excitónica es la más rápida y predominante, por ser la vía más eficaz para que moléculas de clorofila interconectadas se transmitan la energía absorbida de modo ultra-rápido. Por todo ello, este es el mecanismo clave de funcionamiento de una antena, que es como un mosaico de clorofilas engarzadas sobre el cual los excitones se mueven al azar en picosegundos de una clorofila a sus contiguas. La Fig. 10-2A muestra esta idea.

Organizando las clorofilas de modo acoplado, se logra también un importante efecto cooperativo en la ab-

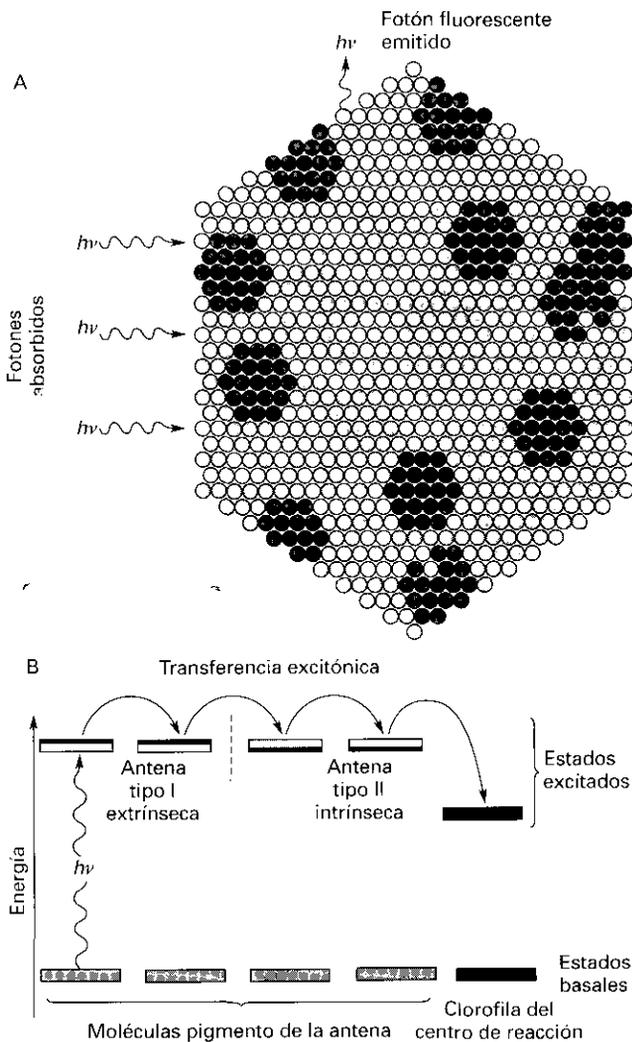


Figura 10-2. A) Representación de la antena como un mosaico de clorofilas que se transmiten la energía de excitación al azar, hasta contactar con la antena intrínseca de cada centro de reacción (en gris oscuro) y las clorofilas centrales P (en negro), que hacen de sumidero por tener un nivel energético de excitación más bajo, como se muestra en B).

sorción de la radiación luminosa incidente. Se ha estimado que, para una irradiación solar de $2000 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (valor en un día claro de sol a mediodía), una molécula de clorofila *a* absorbe aproximadamente unos 10 fotones por segundo. Si los fotosistemas I y II estuviesen constituidos por una sola clorofila, con 10 fotones por segundo no serían capaces de mantener las tasas de asimilación fotosintética que se observan en la realidad en las hojas. El efecto cooperativo logrado con el acoplamiento excitónico de múltiples clorofilas en las antenas permite disponer de unas 200 clorofilas por fotosistema. De este modo, en un segundo se pueden absorber hasta 2000 fotones por centro de reacción.

Dentro de las clorofilas incluidas en las antenas se ha observado también una jerarquización basada en una

modulación del nivel energético de absorción de ciertos grupos de clorofilas (véanse Figs. 10-1 y 10-2). Así, se han detectado en las LHC grupos de clorofilas que tienen un máximo de absorción distinto, con longitudes de onda crecientes: clorofilas *b* de 650nm – clorofilas *a* de 662 nm – clorofilas *a* de 670 nm – clorofilas *a* de 677 nm. Es decir, son grupos de clorofilas con niveles energéticos ligeramente decrecientes, lo cual permite una canalización de la energía de excitación por esa pendiente energética. De hecho, se ha detectado que los grupos de clorofilas de mayor energía tienden a localizarse en la periferia (antena extrínseca), y los de menor energía, más cercanos a los centros de reacción (antena intrínseca). Por otro lado, en el núcleo de cada fotosistema existe un grupo especial de clorofilas que tienen un nivel energético claramente menor que el resto de la antena y que están implicadas en el último paso de la función de la antena, y primero del centro de reacción. Su función se describe a continuación.

1.3. La conversión de excitones en electrones sucede con la primera separación de carga en los centros de reacción

Existe la posibilidad de que la relajación del estado excitado de una molécula conduzca a una nueva configuración electrónica estable (esto es, a un estado fundamental) distinta de la original. Esta nueva configuración supone una transformación química, ya que se modifica la distribución de los electrones de valencia. Si el producto de la reacción fotoquímica contiene más energía interna que el pigmento que absorbió originalmente el fotón, tal producto conserva como energía química de enlace parte de la energía de la luz absorbida. Tal es la base de la conversión o transducción de energía, que sucede en los centros de reacción fotosintéticos.

La Fig. 10-1 muestra que la zona común, donde se realiza la interconexión entre la antena y el centro de reacción de un fotosistema, está constituida por unas clorofilas especiales que constituyen el punto de término de la transferencia de energía de excitación ($\text{Chl} + h\nu = \text{Chl}^*$) y el punto de inicio de la primera separación de carga y transferencia de un electrón ($\text{Chl}^* - \text{e}^- = \text{Chl}^+$). Gracias a estas clorofilas especiales, sucede la conversión de la energía excitónica en energía electroquímica redox.

Estas clorofilas especiales de los fotosistema I y II se llaman P700 y P680, respectivamente. La P viene de pigmento y 700 ó 680, de la longitud de onda (en nm) a la cual estas clorofilas tienen su máximo de absorción en la zona del rojo. Estas clorofilas tienen un nivel energético en su estado excitado (P^*) más bajo que todas las clorofilas de las antenas (véase Fig. 10-2B). Por ello, se diferencian marcadamente de ellas, y actúan como su-

midero o trampa energética, ya que en ellas el excitón queda atrapado de modo irreversible.

En las inmediaciones de estas clorofilas (P) se encuentra otra molécula (A), con un orbital vacante de menor energía que el ocupado por el electrón excitado desapareado de P*, de modo que se puede producir la transferencia de ese electrón entre P y A. En esta transferencia, la clorofila especiales excitadas (P*) actúan como agente altamente reductor donador del electrón y pasan a estado oxidado (P⁺); la molécula que gana un electrón, el aceptor primario, queda en estado reducido (A⁻) (véase Fig. 10-1). Ambas moléculas, P y A, quedan con un electrón desapareado, es decir, como radicales libres: el donador como catión y el aceptor como anión. Tanto en la fotosíntesis oxigénica de plantas como en la anoxigénica de bacterias, las reacciones fotoquímicas primarias son siempre **separaciones de carga eléctrica** de este tipo. Los radicales iónicos producidos en la primera reacción fotoquímica (P⁺A⁻) conservan una fracción importante de la energía del fotón absorbido, pero convertida en una energía química redox que se puede medir por la diferencia de potencial redox (ΔE) existente entre P⁺ y A⁻. Normalmente, P⁺ es altamente positivo (es decir, altamente oxidante) y A⁻ es altamente negativo (es decir, altamente reductor) y, por ello, a continuación mueven una serie de transformaciones electroquímicas redox en cadena, que se suelen llamar secundarias, que son exergónicas espontáneas porque van a favor de potencial redox.

Las clorofilas especiales oxidadas (P⁺) tras ceder el electrón, actúan en un segundo paso como fuertes agentes oxidantes que captan un electrón de un primer donador cercano (D), siendo así re-reducidas y, con ello, recobran su estado basal original (P) en el que podrán ser excitadas de nuevo si reciben otro excitón. Con este segundo paso se llega al estado D⁺ P A⁻, que luego pasará a D₂⁺ D₁ P A₁ A₂⁻ y así sucesivamente. De este modo, toda la serie de elementos donadores y aceptores redox contenidos en los centros de reacción se conecta creando una cadena de transporte electrónico en cada fotosistema. Los componentes de la cadena electrónica fotosintética son explicados en los apartados siguientes. La Fig. 10-1 muestra el donador inicial (agua) y el aceptor final de electrones (NADP⁺) de esta cadena.

Es importante recalcar que la clave de este proceso de conversión energética está en la existencia de esas clorofilas especiales (P), capaces de absorber irreversiblemente un excitón para convertirse en un agente altamente reductor (P*) y, luego, en un agente altamente oxidante (P⁺). Es decir, se mueven de modo cíclico en 3 estados (véase Fig. 10-1). Las clorofilas son las biomoléculas que reúnen las propiedades físico-químicas especiales para esta función, y se encuentran en todos los centros de reacción de organismos fotótrofos conocidos.

Existe diferencia entre el salto energético ($\Delta E'_0$) que cada uno de los sistemas P conocidos es capaz de realizar (Fig. 10-3). La amplitud de este salto está relaciona-

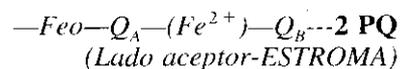
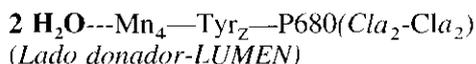
da con los donadores y aceptores secundarios de los cuales cada fotosistema dispone y con la naturaleza molecular específica del núcleo de cada fotosistema. En la Fig. 10-3 se observa que el salto energético más grande de los conocidos corresponde al P680 de fotosistema II, comparados con los saltos realizados por el P700 de fotosistema I, el P840 de bacterias verdes y el P870 de bacterias purpúreas.

Las clorofilas aisladas en disolución no son capaces de realizar esta función fotoquímica. La fugacidad del estado excitado de P hace necesario mantener a los donadores y aceptores a la distancia precisa y con la orientación adecuada para que los orbitales implicados se solapen y el salto electrónico entre ellos esté favorecido. La forma en que esto se consigue es haciendo que los elementos reactantes (A, P, D) formen parte de proteínas, a las que se unen interactuando específicamente con residuos polipeptídicos, con lo cual mantienen una disposición espacial óptima adecuada. Esto significa que las proteínas del aparato fotosintético integrado en la membrana tilacoidal constituyen la sede específica de prácticamente toda la cadena electroquímica fotosintética. Con las clorofilas P asociadas a las proteínas, la separación inicial de cargas tiene lugar en pocos picosegundos ($1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$), un tiempo varios órdenes de magnitud más corto que lo que tardan en ser operativas las rutas alternativas de relajación del estado excitado de P.

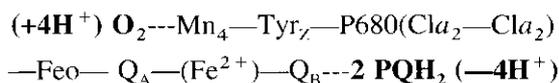
2. CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO FOTOSINTÉTICO

2.1. El fotosistema II contiene los primeros elementos redox implicados en la cadena fotosintética desde agua a plastoquinona

Los elementos redox implicados en la transferencia electrónica desde agua a plastoquinona dentro del fotosistema II son, por orden, los siguientes:



Que tras el proceso global de óxido-reducción, se transforman en O₂ y PQH₂:



Estequiométricamente, se trata de una reacción global de 4 electrones que fluyen de uno en uno. Es decir, es una reacción que se repite en ciclos de 4 veces, iniciándose cada vez con la primera separación de carga

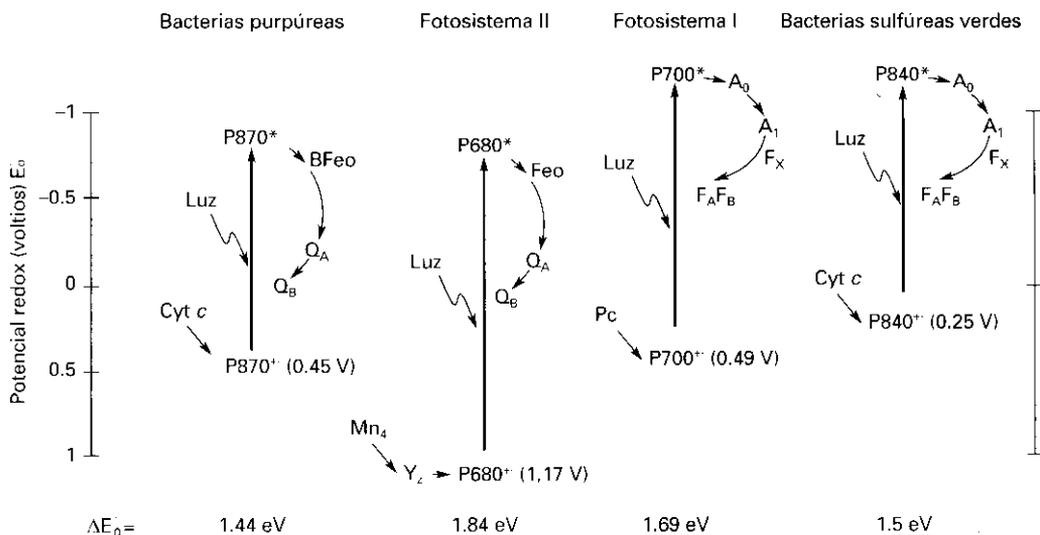
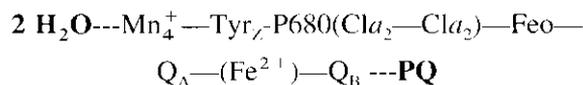
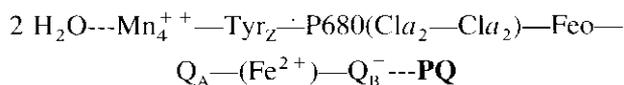


Figura 10-3. Salto energético (ΔE_0) de los principales sistemas P conocidos: P680 de fotosistema II; P700 de fotosistema I; P840 de bacterias verdes sulfúreas; P870 de bacterias púrpuras.

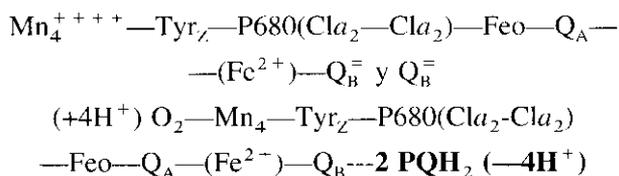
desde P680*. Sobre P680 se realiza la conversión de la energía de excitación (*) en una transferencia electrónica, para dar un primer radical catión ($P680^+$) y el primer anión que es la feofitina (Feo^- , clorofila sin Mg). Este doble radical luego se va transmitiendo a los respectivos elementos redox anejos aceptores (derecha) y donadores (izquierda), hasta Mn_4 y Q_B :



Las dos primeras cargas se acumulan en los extremos, y llega otro fotón que produce una segunda separación de carga consecutiva:



Entonces, la quinona móvil del lado aceptor toma dos protones ($2 H^+$) del estroma y da plastoquinol (PQH_2) que se libera del fotosistema II, y una segunda molécula de plastoquinona oxidada ($PQ \rightleftharpoons Q_B$) entra en su lugar. El fotosistema vuelve a asimilar otros dos fotones que inducen otras dos separaciones de carga iguales a las descritas, que se vuelven a acumular en los extremos. Con 4 cargas acumuladas, el *cluster* de manganeso (Mn_4^{++++}) es capaz de oxidar dos moléculas de agua ($2 H_2O$) liberando una molécula de oxígeno (O_2) y cuatro protones en el lado donador (lumen, $+4 H^+$):

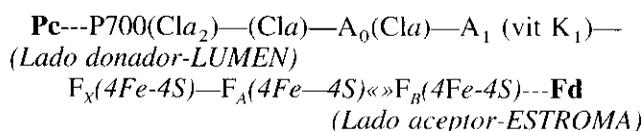


El elemento central, P680, está molecularmente constituido por un conjunto de clorofilas. Los datos más recientes parecen indicar que se trata de, al menos, 4 clorofilas asociadas multiméricamente (dos dímeros), es decir, 4 clorofilas cuyas nubes electrónicas están acopladas y, tras absorber la energía excitónica ($P680^*$), se comportan como un elemento unitario capaz de soltar un electrón y dar lugar a un radical catiónico, $P680^+$, altamente oxidante. El electrón soltado pasa a una feofitina (Feo^-), que es como clorofila pero sin magnesio en el anillo tetrapirrol. El siguiente aceptor es una quinona fija, Q_A , y el último aceptor es otra quinona móvil, Q_B , que cuando se reduce se intercambia por otra del conjunto (*pool*) de plastoquinonas (PQ) libres que nadan en la membrana tilacoidal (unas 10 moléculas por fotosistema II). Entre ambas quinonas, Q_A y Q_B , hay un átomo de hierro no hemínico (Fe^{2+}) que interviene en la canalización del transporte electrónico entre ellas. Quien da el primer electrón a $P680^+$, por el lado donador, es un aminoácido tirosina de la proteína D1, llamada Tyr_Z . La tirosina toma, a su vez, el electrón del *cluster* de manganeso, constituido por 4 átomos de manganeso, Mn_4 . Este conjunto de 4 manganesos coordinados es capaz de oxidarse cuatro veces consecutivas cediendo un electrón cada vez, y acumulando un estado final tetra-oxidado (Mn_4^{++++}) que es el que arranca los electrones del agua, produciéndose la fotólisis del agua.

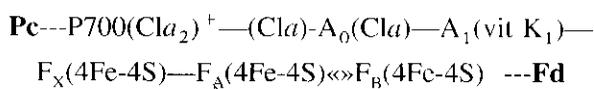
2.2. El fotosistema I contiene los últimos elementos redox de la cadena fotosintética entre plastocianina y ferredoxina

Los elementos redox implicados en la transferencia electrónica desde plastocianina (Pc) a ferredoxina (Fd)

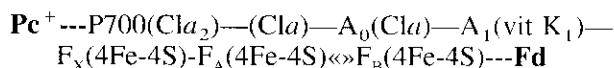
dentro del fotosistema I son, de modo ordenado, los siguientes:



Al igual que en el otro fotosistema, se produce una reacción global de transferencia de un electrón que pasa de un elemento redox al siguiente, iniciándose la separación de carga en el elemento central, P700, cuando a él llega la energía de un fotón-excitón desde las antenas (P700*). El radical catión-anión se va transmitiendo desde P700 a los respectivos elementos anejos, hasta oxidar plastocianina (Pc) y reducir ferredoxina (Fd), que son dos proteínas redox que se encuentran ya fuera del fotosistema I:



La plastocianina se oxida cediendo un electrón a P700 y la ferredoxina se reduce tomando un electrón de F_A , con ello, se concluye el flujo electrónico a lo largo del fotosistema I:



El elemento central, P700, es un dímero de clorofilas a acopladas excitónicamente. Estas clorofilas absorben la energía excitónica (P700*) y se comportan como un elemento unitario capaz de soltar un electrón y dar lugar a un radical catiónico oxidante P700^+ . El electrón soltado pasa a A_0 , que es también una clorofila a . Esta transferencia se realiza, quizás, a través de otra clorofila accesoria intermedia. A_0 cede el electrón a una fitoquinona (vitamina K_1) nombrada A_1 . A continuación, intervienen en la transferencia tres grupos sulfo-férricos, constituidos por 4 átomos de hierro y 4 átomos de azufre (4Fe-4S), denominados: F_X , F_A , F_B (a veces también llamados A_2 , A_3 y A_4). Tras la reducción de F_X , los siguientes cofactores, F_A y F_B , no reciben los electrones consecutivos sino alternativamente, es decir, el flujo electrónico pasa por uno u otro de modo alternado en equilibrio.

2.3. El esquema en Z incluye los dos fotosistemas y el resto de los elementos que completan la cadena fotosintética desde H_2O a NADP^+

Toda la serie de elementos que se oxidan y se reducen alternativamente, presentes tanto en los dos fotosiste-

mas como en el complejo intermedio citocromo b_6f , y los elementos unitarios intermediarios entre ellos (plastoquinona, plastocianina, ferredoxina y FNR) constituyen la cadena de transporte electrónico fotosintético.

El primer donador de electrones de esta cadena es el H_2O que se oxida en el lumen, y el último aceptor es el NADP^+ que se reduce en el estroma cercano al tilacoide. De este modo, esta cadena da lugar a un flujo electrónico lineal desde H_2O a NADP^+ , hasta transformarlas en O_2 y NADPH . Estequiométricamente la reacción se puede escribir como:



Esta reacción global supone un flujo de paso o de intercambio de 4 electrones ($4 e^-$) entre los dos reactivos que está acoplado a un intercambio transversal lumen-estroma de 8 protones (8H^+) en total (véanse apartados 2.4 y 5).

Cada uno de los elementos óxido-reductores de la cadena fotosintética tiene un determinado potencial redox (E'_0), de modo que si se representan todos ellos en una gráfica, se obtiene el llamado **esquema en Z** (Fig. 10-4), en que la cadena queda representada como una Z invertida, correspondiendo los dos palos a los dos saltos energéticos que suceden en el elemento P del núcleo de cada fotosistema. Estos dos elementos, P680 y P700, son los que reciben los excitones y realizan las primeras separaciones de carga que mueven la cadena fotosintética. Ya se ha comentado que las formas P^* son altamente reductoras y las formas P^+ son altamente oxidantes. De hecho, P680^* tiene un potencial redox en torno a -0.67 V y P680^+ , un potencial en torno a $+1.17 \text{ V}$; de modo análogo, P700^* tiene un potencial redox en torno a -1.20 V y P700^+ , un potencial en torno a $+0.49 \text{ V}$. Con la absorción de la energía de un excitón, cada uno de los dos fotosistemas hace de bomba que impulsa el flujo electrónico al originar un salto contra gradiente de potencial redox (salto de valores positivos de E'_0 a valores más negativos). Estos saltos dan diferencias de potencial de valor: $\Delta E'_0 = 1.84 \text{ V}$ en el fotosistema II y $\Delta E'_0 = 1.69 \text{ V}$ en el fotosistema I. El resto de las transferencias redox se produce a continuación a favor de gradiente de potencial (de valores más negativos a más positivos) y, por ello, suceden de modo espontáneo (son reacciones exergónicas). La Fig. 10-4 muestra el esquema en Z con los saltos energéticos mencionados y el resto de los elementos redox incluidos en la cadena fotosintética.

El flujo principal es lineal desde H_2O hasta NADP^+ ; pero, en ciertas circunstancias, el flujo electrónico puede seguir las llamadas vías cíclicas. En estas vías cíclicas los electrones no llegan hasta NADP^+ , sino que fluyen de modo cíclico en torno a un fotosistema mediante una re-conexión hacia atrás, desde elementos redox de potencial negativo que han recibido los electrones de

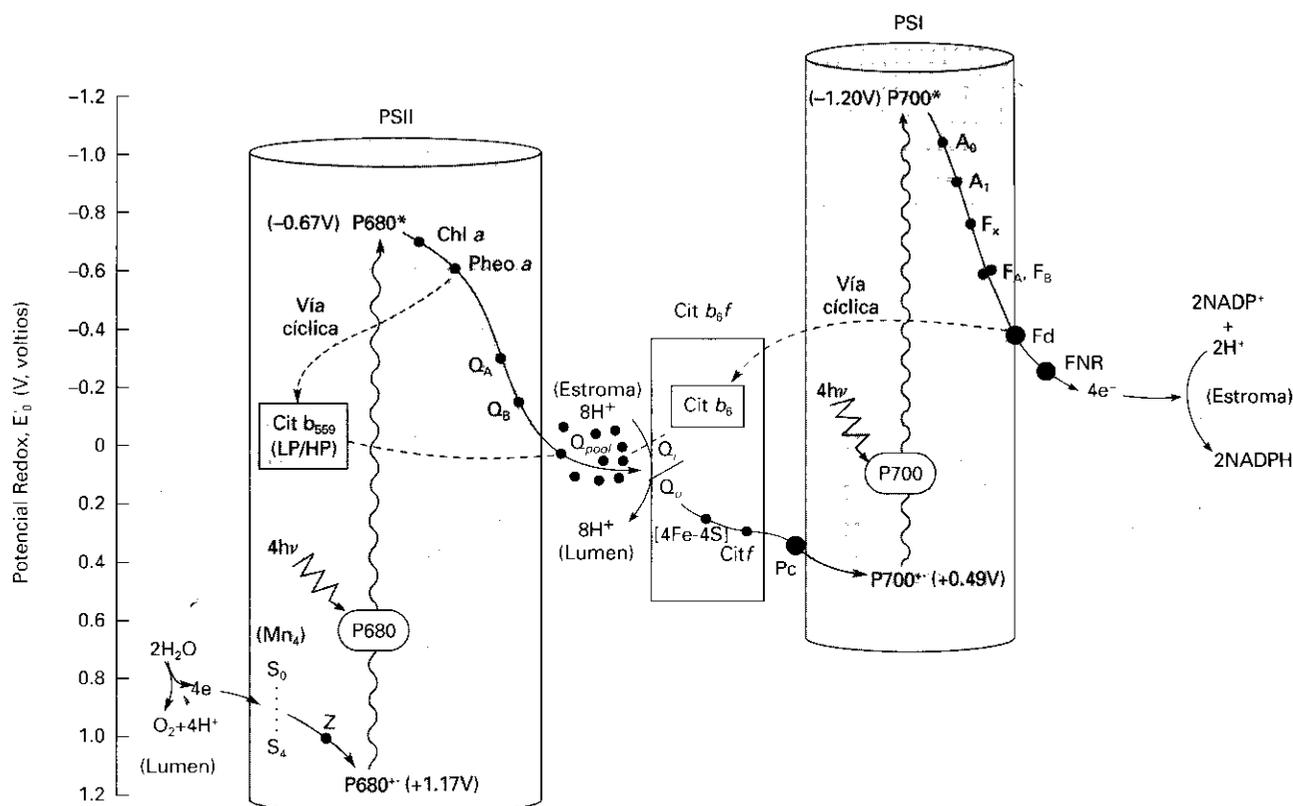


Figura 10-4. Esquema en Z detallado, situando en serie cada uno de los elementos óxido reductores de la cadena fotosintética en la escala de potencial redox (ΔE_0).

P* hacia elementos redox de potencial más positivo que son donadores de P^+ . Este tipo de flujo electrónico cíclico fue descrito por primera vez hace más de treinta años por D. I. Arnon para el caso del fotosistema I, y la función principal que se le atribuye es la de ser una vía de obtención de ATP sin necesidad de obtener a la vez poder reductor (NADPH). En este flujo cíclico, junto al fotosistema I interviene el complejo citocromo b_6f y, a través de él, se da una translocación de protones del estroma al lumen cuya acumulación es la fuerza que va a permitir la síntesis de ATP acoplada a la cadena fotosintética (véase apartado 2.5).

A pesar de haber sido descrito hace tiempo, todavía no se conoce el mecanismo molecular preciso de la vía electrónica fotosintética cíclica en torno al fotosistema I. Cabe destacar la importancia de la intervención de un citocromo (principalmente el citocromo b_6) y de quinonas (el *pool* de plastoquinonas) en el proceso y la relación directa que estos elementos tienen con la translocación de protones. En este sentido, más recientemente se ha postulado la posibilidad de que en torno al fotosistema II exista otro flujo electrónico cíclico en el cual intervenirían también un citocromo (citocromo b_{559}) y el *pool* de plastoquinonas (véase Fig. 10-4). La posible existencia de esta segunda vía cíclica y su función pare-

cen estar relacionadas con el proceso fisiológico de la fotoinhibición descrito en el apartado 4.

2.4. La fotólisis del H_2O produce oxígeno molecular, O_2 , y los electrones y protones que se transmiten hasta $NADP^+$ para dar NADPH

Un punto especialmente importante y significativo de la cadena redox fotosintética es la primera reacción, en la cual se produce la oxidación del agua, también llamada **photólisis del agua**. En esta reacción, los vegetales originan como subproducto oxígeno molecular (O_2), gas que difunde fuera del cloroplasto y de la célula y es soltado a la atmósfera a través de los estomas. El aporte de oxígeno a la atmósfera por la acción de los organismos fotosintéticos oxigénicos es un hecho trascendental para la dinámica y el equilibrio de la biosfera tal y como hoy la conocemos. Todos los organismos heterótrofos somos dependientes de ese oxígeno para nuestros procesos vitales, ya que nuestra bioenergética celular se basa en la respiración que necesita oxígeno como sustrato esencial.

La oxidación del agua (H_2O) requiere la extracción

de cuatro electrones para la formación de una molécula de oxígeno (O_2), pero el fotosistema II proporciona las cargas positivas una por una, separando una carga eléctrica por fotón absorbido. Para comprender el mecanismo de esta reacción, es necesario relacionar la producción de oxígeno con el consumo de los electrones. En 1969, Pierre Joliot y cols. demostraron que si se dejan cloroplastos en la oscuridad durante algunos minutos «flases» y después se iluminan mediante destellos o flases intensos y breves (10 microsegundos o menos), de manera que todos los centros de reacción del fotosistema II queden excitados una sola vez, se constata que la producción de oxígeno es casi nula después de los dos primeros destellos, alcanza un máximo después del tercero y, a continuación, presenta un comportamiento oscilante de período 4 durante la iluminación con los destellos siguientes —es decir, el máximo se alcanza cada cuatro destellos—. La interpretación sencilla de estos resultados fue que el ciclo de oxidación del agua incluía cinco estados S (nombrados de S_0 a S_4), correspondientes a cinco formas transitorias cada vez más oxidadas del fotosistema II (Fig. 10-5). El retorno del estado S_4 , el más oxidado (el menos rico en electrones), al estado S_0 iría acompañado de la producción de oxígeno. Por el tipo de señal que emitían estos estados, se identificó que el elemento químico principal que intervenía era manganeso (Mn). En efecto, luego se demostró que el fotosistema II activo tiene 4 átomos de manganeso unidos a su estructura proteica, constituyen-

do lo que se denomina *cluster* o centro de manganeso. Si los manganesos se extraen mediante tratamientos químicos (pH superior a 9, adición de aminas o de agentes reductores), desaparece la capacidad del fotosistema II para oxidar el agua. El manganeso es un metal susceptible de presentar numerosos estados de oxidación, es decir, que puede ceder de 2 a 7 electrones a otros compuestos. Varios de estos estados son altamente oxidantes (propicios a captar electrones), lo que hace del manganeso un elemento ideal para efectuar la oxidación del agua. La configuración química de los átomos de manganeso en los diferentes estados S corresponde a distintos valores de oxidación de dichos átomos. La identificación precisa de cuál es el grado de oxidación de cada átomo en cada estado S es difícil y está todavía pendiente.

Se ha observado que los estados S dependen no sólo de la oxidación del manganeso, sino también de la presencia de iones calcio y cloruro. Así, se ha establecido que la ausencia de estos iones inhibe la transición de S_3 a S_4 y a S_0 . Actualmente, prosiguen las investigaciones sobre las funciones complementarias de los iones calcio y cloruro. La principal hipótesis atribuye a estos iones el papel de pantalla: protegerían el centro de manganeso, muy reactivo, del acceso demasiado precoz (es decir, antes de que se acumulen cuatro cargas positivas) de moléculas de agua. Un acceso anticipado del agua podría provocar la formación de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada, H_2O_2), tóxico para la célula, y de manganeso Mn (II) inestable, que afectaría al fotosistema II. Por otra parte, el calcio y el cloruro podrían tener efectos de «compensación de carga» durante el ciclo de los estados S.

Respecto a la cuestión de ¿cómo es posible que la oxidación de dos moléculas de agua provoque la liberación de una molécula de oxígeno y de cuatro protones? Los análisis fisicoquímicos más actuales demuestran que es el manganeso el que es oxidado etapa a etapa, y no el agua. Estas observaciones permiten suponer que la oxidación del agua se hace químicamente en una sola etapa, en una reacción concertada de cuatro electrones. Lamentablemente, esta reacción de liberación del oxígeno es muy difícil de analizar, ya que tiene lugar con una extraordinaria rapidez: cuando el fotosistema II se encuentra en el estado S_3 y recibe un destello, la liberación se efectúa en unos milisegundos, por lo que todavía no ha podido descubrirse ningún intermediario de esta reacción. Por otro lado, si la oxidación del agua se efectúa en una sola etapa, los cuatro protones resultantes deberían ser liberados de una sola vez, simultáneamente con la molécula de oxígeno. Pero no es así. La liberación de protones puede seguirse si se mide con precisión la acidificación del medio durante una excitación del fotosistema II por un tren de destellos o flases. Estas mediciones indican que los protones son liberados progresivamente (Fig. 10-5). Incluso se ha demostrado que el número de protones liberados por centro de fotosistema II no es exactamente un número entero. Por

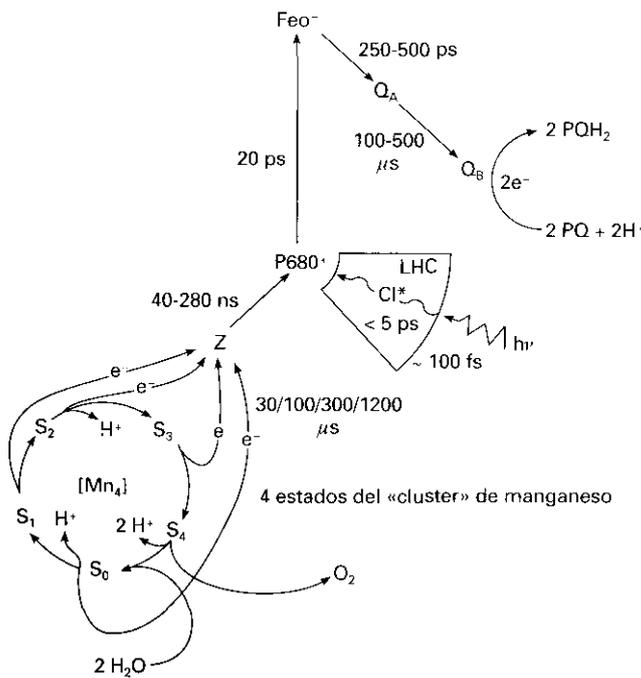


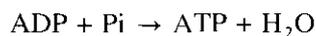
Figura 10-5. Esquema de los elementos redox que transportan electrones dentro del fotosistema II desde el agua a la plastoquinona, incluyendo los cinco estados (de S_0 a S_4) del *cluster* o centro de manganeso (Mn_4) que oxida el agua. Junto a las flechas se indican los tiempos o intervalos de tiempo en los que sucede cada transferencia.

este motivo, la mayoría de los investigadores piensa que los protones liberados no provienen directamente de la disociación del agua, sino de grupos ácido-básicos susceptibles de intercambiar protones y pertenecientes a ciertos aminoácidos próximos al *cluster* de manganeso. Por tanto, los protones liberados por oxidación del agua pasan al medio, pero a través de un proceso complejo en el que intervienen muchos aminoácidos. A pesar de los progresos recientes, el estado de nuestros conocimientos sobre la reacción de fotólisis del agua en la fotosíntesis puede parecer decepcionante; sin embargo, no debe olvidarse que el problema es de una complejidad extrema.

Finalmente, cabe señalar que, como se observa en la Fig. 10-5, en la adecuada coordinación de todas estas reacciones fotoelectroquímicas son muy importantes las velocidades propias de cada paso. Así, se ve cómo las reacciones más rápidas son las primeras que suceden, de modo que el orden en la sucesión de acontecimientos está regido por el tiempo (con valores crecientes de picosegundos-nanosegundos-microsegundos-milisegundos, ps-ns- μ s-ms). De este modo, tras la absorción fotónica (en femtosegundos) y transmisión excitónica en la antena (en picosegundos), el proceso de transferencia electrónica empieza con la formación del primer radical doble (catión/anión, $P680^+ / Feo^-$) que sucede en torno a unos 20 ps, continúa con la cesión a la primera quinona, en 250-500 ps, y con la captación desde la tirosina Z, en 40-280 ns. La cesión electrónica desde el *cluster* de manganeso es la más lenta, empezando hacia los 30 μ s y finalizando en torno a 1200 μ s. Es decir, el último paso que libera el oxígeno tarda más de un milisegundo. En el lado aceptor, cuatro electrones formarán dos moléculas de plastoquinona reducida ($2 PQH_2$) y su tiempo de formación ($2 \times 500 \mu$ s) coincide aproximadamente con el tiempo de producción de O_2 , de modo que todo el proceso queda coordinado. Este tipo de coordinación de tiempos también se da en el funcionamiento del fotosistema I.

2.5. La ATP sintasa es un motor biomolecular movido por el gradiente de protones originado por el flujo electrónico fotosintético

Estrechamente acoplada al flujo fotosintético de electrones se encuentra la síntesis de adenosín-trifosfato (ATP) a partir de adenosín-difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi):



Esta fosforilación, al estar promovida por la luz, se denomina **fotofosforilación** o fosforilación fotosintética. Es catalizada por el último macro-complejo enzimático anclado en la membrana tilacoide que es la ATP sintasa, que no interviene en el flujo electrónico sino

que utiliza la energía acumulada por la cadena redox fotosintética en forma de fuerza o energía protón-motriz.

El mecanismo íntimo de la fotofosforilación ha podido ser comprendido gracias a la teoría quimiosmótica formulada en el año 1961 por el bioquímico inglés Mitchell —galardonado con el premio Nobel de Química en 1978— que dice: la energía de óxido-reducción que se libera cuando los electrones caen de nivel no se utiliza directamente en la síntesis de ATP, sino que se almacena, como etapa intermedia, en la energía ácido-base que se crea al establecerse una diferencia de concentración de protones (o potencial electroquímico protónico) entre uno y otro lado de las membranas biológicas.

A lo largo de la cadena de transporte electrónico fotosintética existen determinados puntos —los llamados sitios de acoplamiento— en los que el flujo de electrones se acopla con el movimiento de protones a través de la membrana tilacoide. Aunque la localización exacta de los sitios de acoplamiento no se conoce, es muy probable que uno de los principales se sitúe a nivel de la plastoquinona, ya que es un transportador móvil que, en el lado estromático de la membrana, acepta electrones procedentes del fotosistema II y adquiere carga protónica, para después ceder los electrones al citocromo b_6/f y descargarse de protones en el lumen. En esta translocación de protones mediada por quinonas, el complejo citocromo b_6/f desempeña un papel esencial, ya que tiene dos centros oxidorreductores de quinona, uno a cada lado de la membrana. Además, el citocromo b_6/f está situado en la cadena fotosintética entre los dos fotosistemas. Por otro lado, físicamente asociado al fotosistema II, hay otro citocromo transmembrana, el citocromo $b559$, que podría también estar implicado en translocación de protones. Además de los sitios de acoplamiento, la propia fotooxidación del agua en el lumen tilacoide y la reducción de los piridín-nucleótidos ($NADP^+$) en el estroma cloroplástico son reacciones que conllevan liberación y captación de protones como producto y sustrato, respectivamente. Estas reacciones contribuyen, asimismo, a la creación del potencial electroquímico de protones a través de la membrana del tilacoide.

De acuerdo con la hipótesis de Mitchell, el transporte unidireccional de protones a través de las membranas tilacoidales tiene lugar desde el estroma al lumen del tilacoide y, como se ha mencionado, lo llevan a cabo transportadores redox incluidos en los complejos fotosintéticos (PSII, Cit b_6/f y PSI) que, de manera transversal-vectorial, se reducen y toman protones del estroma y, luego, se oxidan y sueltan protones en el lumen. En una segunda etapa, el potencial o gradiente de protones así creado —el pH del lumen en cloroplastos iluminados es unas 3 ó 4 unidades más ácido que el pH del estroma— es utilizado en sentido contrario como fuerza protón-motriz y suministra la energía necesaria para la síntesis de ATP, catalizada por la ATP sintasa. La estructura molecular de esta enzima fue expuesta en el Capítulo 9. Funcionalmente, el dominio de la ATP sin-

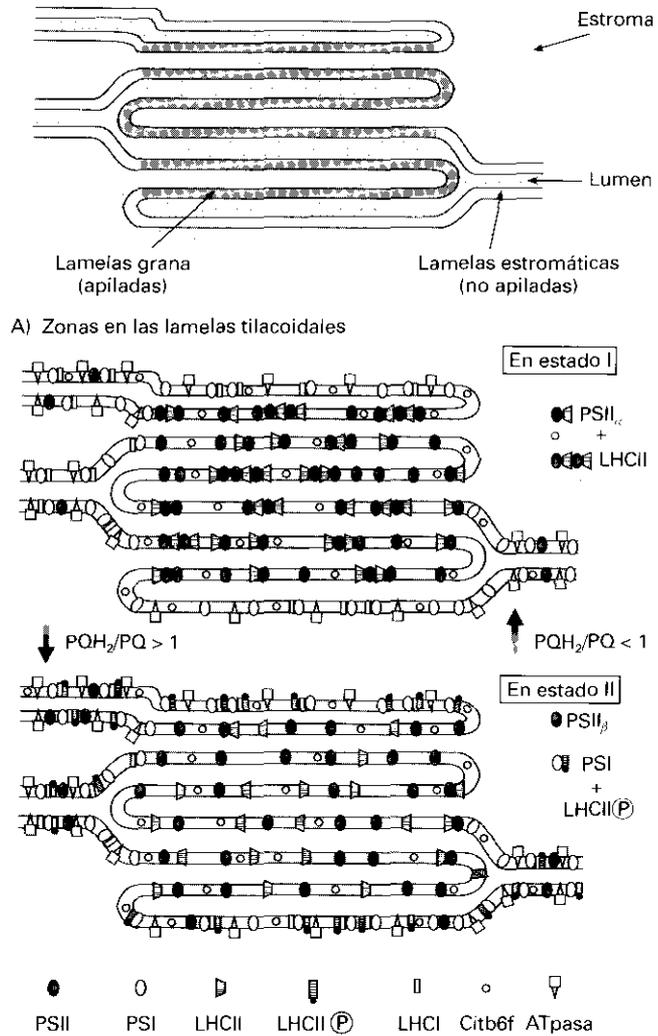
tasa insertado en la membrana tilacoidal, CF_0 , hace de conector lumen-estroma y es por donde vuelven los protones del lumen al estroma a favor de gradiente. Es decir, CF_0 actúa como un canal que permite el paso o flujo regulado de los protones, y utiliza la energía de ese flujo para moverse a modo de rotor. Este movimiento de giro o rotación originado en el CF_0 de la ATPasa al pasar 3 H^+ se transmite a su dominio extrínseco situado en el estroma, CF_1 , induciendo cambios de conformación en la cabeza de la ATPasa que posibilitan la catálisis enzimática de unión de ADP y P_i para formar una molécula de ATP.

3. DINÁMICA DEL APARATO FOTOSINTÉTICO

3.1. La distribución de proteínas en la membrana tilacoidal es dinámica y varía según el estado fotosintético: estado I y estado II

La distribución de proteínas en la membrana tilacoidal no es uniforme. Mientras el complejo citocromo b_6/f aparece distribuido más o menos uniformemente por toda la membrana, cada fotosistema se concentra en una zona distinta. El fotosistema II es más abundante en los tilacoides apilados, o lamelas grana, mientras que el fotosistema I abunda más en los tilacoides sin apilar o lamelas estromáticas. En el Capítulo 9 (apartado 3.5), se ha comentado esta distribución lateral por zonas en los tilacoides. La Figura 10-6 muestra los dos tipos de lamelas y la distribución diferente de los fotosistemas en cada zona.

Añadida a la distribución por zonas, existe una posibilidad de movimiento y redistribución de los fotosistemas que hace que los tilacoides no sean un sistema estático, sino un sistema dinámico regulado por la cantidad y calidad de la luz que les llega. Cuando la energía que llega al fotosistema II excede la que recibe el fotosistema I, la plastoquinona se acumula en forma reducida ya que el fotosistema I, por medio de la plastocianina y del citocromo b_6/f , no puede oxidarla a suficiente velocidad. El exceso de plastoquinona reducida (plastoquinol) activa una enzima quinasa que fosforila LHCII y modifica su estructura, por lo que disminuye su afinidad por el núcleo del fotosistema II, del que se disocia. La misma fosforilación induce la asociación de LHCII al fotosistema I. A este cambio en los tilacoides se le llama cambio de estado I a estado II y en él el principal elemento móvil es el LHCII (Fig. 10-6B). La antena asociada al fotosistema I incrementa la frecuencia con la que recibe excitones y, por consiguiente, causa un aumento de su velocidad de funcionamiento respecto al fotosistema II (que se ve frenado); con ello, el plastoquinol se oxida más rápidamente y la plastoquinona se reduce más lentamente. Suben así los niveles de plasto-



B) Distribución de los complejos en las lamelas

Figura 10-6. Estructura de los tilacoides, indicando en a) los tipos de lamelas: lamelas grana apiladas y lamelas estromáticas no apiladas. La distribución de los fotosistemas en las lamelas es distinta según el estado funcional, como se indica en b). En estado I, las lamelas grana acumulan los fotosistemas II tipo α , asociados a la antena LHCII formando monómeros y también dímeros. En estado II, las lamelas grana presentan fotosistemas II tipo β que no están asociados a la antena LHCII. En este segundo estado, la antena LHCII aparece en parte fosforilada y asociada al fotosistema I. El paso del estado I al II está asociado con la proporción de plastoquinona reducida/oxidada (PQH_2/PQ) y sucede cuando es mayor que uno.

quinona, que induce la desfosforilación de LHCII y la reversión del proceso que acabamos de describir. Por tanto, el par redox plastoquinona / plastoquinol (PQ/PQH_2) parece actuar como un sensor que detecta los posibles desajustes entre las actividades de los dos fotosistemas y dispara este mecanismo corrector que redistribuye la energía.

Hay datos que indican que los dominios estromáticos de la LHCII desfosforilada tienen afinidad por sí mismos, de tal manera, que la asociación de dos antenas (LHCII-LHCII) por sus regiones expuestas al estroma, entre LHCII de tilacoides distintos, provocaría la unión tilacoide-tilacoide para formar los apilamientos o grana. También se ha observado que cuando el tejido fotosintético se somete durante varios minutos a iluminación con luz azul, alternada con períodos similares de iluminación roja (para excitar preferentemente las antenas del fotosistema II con luz azul o del fotosistema I con luz roja), se inducen cambios alternados en la abundancia de tilacoides apilados y no apilados. Estos hechos ponen en relación cambios morfológicos en los tilacoides con situaciones de exceso de energía sobre uno u otro fotosistema.

3.2. El estado funcional de los fotosistemas provoca también una distinción entre formas α y formas β

Los fotosistemas I y II, como complejos enzimáticos, pueden estar en forma activa funcional o en forma inactiva no funcional. De hecho, en los tilacoides se han diferenciado dos tipos de fotosistema II (PSII) que se han encontrado distribuidos de manera distinta: la forma principal y mayoritaria, denominada PSII $_{\alpha}$, que se encuentra en las lamelas grana y otra forma mucho menos abundante que se encuentra en las lamelas estromáticas, denominada PSII $_{\beta}$ (Fig. 10-6B). Esta segunda forma, PSII $_{\beta}$, parece no ser fotoquímicamente activa y está relacionada con el proceso de recambio de algunas de las proteínas del fotosistema. Este recambio de proteínas sucede cuando alguna de ellas deja de funcionar adecuadamente por sufrir una alteración química. Esto es especialmente frecuente para el caso de las proteínas que realizan el mayor esfuerzo de conversión energética dentro de los fotosistemas. En el fotosistema II esta proteína es la D1, la cual contiene como grupos prostéticos las moléculas redox implicadas en los primeros pasos de la transferencia electrónica fotosintética (véase Capítulo 9, apartado 4.2). La proteína D1 es la que tiene una mayor tasa de recambio de todas las proteínas del cloroplasto. Este hecho está relacionado con el proceso fisiológico de la **fotoinhibición**, que se explica en la siguiente sección de este capítulo. Toda la síntesis de proteínas tilacoidales nuevas está asociada a las lamelas estromáticas, ya que el recambio se realiza en esta zona de los tilacoides. Los ribosomas presentes en el estroma cloroplástico que leen los RNA mensajeros se acercan a las lamelas estromáticas para facilitar la inserción en los tilacoides de las proteínas de membrana nuevas, que van luego a ensamblarse en los complejos fotosintéticos. Las formas β de PSII y, también, de PSI (PSII $_{\beta}$, PSI $_{\beta}$) corresponderían a estos complejos que están en las lamelas estromáticas en proceso de ensamblaje o densamblaje. En la Figura 10-7 se ilustra cómo se pro-

duce este proceso en sus distintas etapas para el caso del fotosistema II, que es el más significativo. Una vez montados los fotosistemas, pasan a la forma α activa. El PSII $_{\alpha}$ se mueve hasta los grana y el PSI $_{\alpha}$ se queda en las lamelas estromáticas. Hay datos que indican que cuando el fotosistema II pasa a los grana, además de conectarse a su antena LHCII, se asocia en dímeros (Fig. 10-6b).

4. FOTORREGULACIÓN Y FOTOINHIBICIÓN DEL APARATO FOTOSINTÉTICO

4.1. La tasa global fotosintética de un vegetal es una medida de su capacidad para crecer

Las dos fases de la fotosíntesis en plantas, la primera de transducción de energía y la segunda de asimilación de elementos constitutivos, están íntimamente entrelazadas y coordinadas, como partes de un proceso global de nutrición autotrófica. Para analizarlas cuantitativamente, se pueden considerar dos variables generales como expresión de la función de cada «fase»:

- El rendimiento cuántico fotoelectroquímico Φ .
- La tasa de asimilación metabólica P_m .

La primera variable (Φ) es expresión de la velocidad de los reacciones fotoquímicas y, a veces, se denomina eficacia fotosintética, terminología menos específica. La segunda (P_m) es expresión de la velocidad de las reacciones de asimilación. La tasa global fotosintética de un vegetal, que se relaciona con su tasa de crecimiento, vendría dada por la combinación de ambas variables (Φ y P_m), de modo que el frenado o disminución de cualquiera de ellas se manifiesta en una «inhibición fotosintética».

El luz es el principal factor limitante de la primera variable, y los nutrientes inorgánicos, incluidos el CO₂ y el agua, son los principales factores limitantes de la segunda. Es claro que el defecto de uno de estos elementos (luz o nutrientes) es perjudicial para las plantas, pero cada vez se van perfilando más ejemplos en los que también el exceso de uno de ellos disminuye la actividad vegetal (véase también Capítulo 13).

4.2. El aparato fotosintético está regulado en primer lugar por la luz, que puede ser factor tanto limitante como estresante

En este capítulo estamos estudiando la primera fase de la fotosíntesis (la segunda fase se aborda en los capítu-

DAÑO Y REPARACIÓN DEL FOTOSISTEMA II EN LOS TILACOIDES

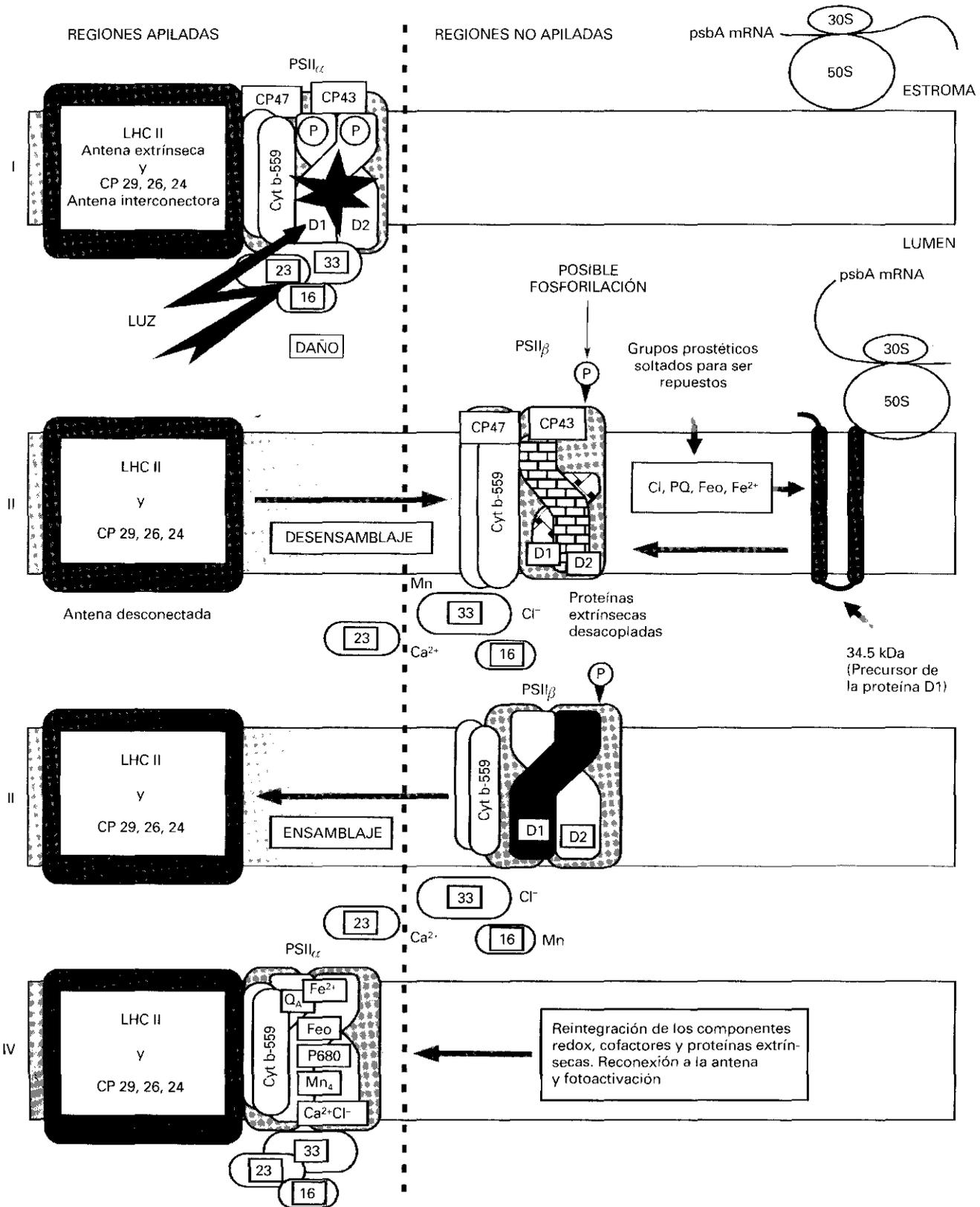


Figura 10-7. Modelo del proceso de fotolesión del fotosistema II y sustitución de la proteína D1. Tras el daño fotoquímico, el fotosistema II se desconecta de la antena LHCII y pasa a desensamblarse a la lamela estromática, donde una nueva D1 recién sintetizada sustituye a la inactivada. El fotosistema II reparado, todavía no activo, regresa a la lamela grana y se reconecta con la LHCII para reiniciar su actividad fotoelectroquímica.

los siguientes). Una pregunta importante que tenemos que tratar de contestar para entender bien el funcionamiento de esta fase es: ¿Cómo regulan las plantas el uso de su primera fuente, la luz? Y es que las plantas no pueden moverse para huir de la luz cuando llega en exceso o para buscarla cuando falta en una zona sombreada (véanse Capítulos 13 y 30).

La energía luminosa del sol que llega y es absorbida por una planta sólo puede seguir dos caminos o vías posibles: 1) ser transformada eficazmente en otra forma de energía acumulable (energía química) mediante el proceso de conversión fotoelectroquímica de la fotosíntesis; o 2) ser disipada por conversión a otras formas de energía radiante no acumulable (como radiación de luz fluorescente o radiación de calor).

Estas dos vías están en continuo equilibrio y en relación inversa: cuando aumenta la primera (transformación eficaz) disminuye la segunda (disipación), y viceversa. La tasa global fotosintética de una planta sana y con suficientes nutrientes inorgánicos aumenta linealmente desde la oscuridad con la cantidad de luz (o densidad de flujo fotónico, PPF) hasta llegar a un nivel de saturación, en el cual la energía sobrante no puede ser utilizada. El nivel de saturación depende de las características propias de cada especie o variedad y del estado fisiológico y condiciones nutricionales específicas para cada planta. La luz en exceso tiene que ser disipada porque, si no, puede «quemar» la planta. De hecho, en esto consiste propiamente el fenómeno fisiológico denominado **fotoinhibición**, en el cual el daño provocado por la excesiva luz hace disminuir la tasa fotosintética de las plantas.

4.3. El fotosistema II es el centro fotorregulador donde sucede el proceso de fotoinhibición a nivel molecular

Como centros de reacción, los fotosistemas pueden ser comparados con un «reactor» de una central nuclear que está sometido a una tensión energética muy grande. El reactor tiene que tener multitud de sistemas de seguridad que lo apaguen o lo cierren en caso de emergencia, para evitar que la energía se canalice hacia lugares no previstos.

Algo así sucede en plantas con el fotosistema II, que es un reactor natural fotosintético muy bien protegido y, también, el que tiene más probabilidades de ser dañado. De todos los fotosistemas conocidos (véase Fig. 10-3), el fotosistema II es el que tiene que realizar un mayor trabajo energético (medido en $\Delta E'_0$, aproximadamente 2 voltios por cuanto de luz absorbido), ya que tiene que ser capaz de oxidar el agua (a un potencial redox de aproximadamente -1.2 V) y reducir una feofitina (a un potencial redox de aproximadamente $+0.7$ V). Todo el resto de fotosistemas conocidos, incluyendo el fotosistema I de plantas, ejerce un trabajo energé-

tico menor de 1.7 V ($\Delta E'_0$). Por ello, se puede decir que el fotosistema II es el punto flaco del aparato fotosintético, como el filamento de una bombilla que es lo primero que se puede romper.

Por estas propiedades, el fotosistema II es el centro fotosensible regulador más importante de la actividad fotosintética, siendo su fotosensibilidad el medio de control que tienen las plantas para «encender» o «apagar» el proceso de transformación de energía luminosa en energía electroquímica. Cuando la intensidad de luz sobrepasa la capacidad de absorción y transformación de la planta, toda una serie de mecanismos de desacoplamiento y desactivación se suceden en torno al fotosistema II, con objeto de maximizar la disipación de energía y minimizar el daño global sobre el aparato fotosintético y, así, proteger la planta.

Además, para mantener la función a pesar del daño, la planta tiene toda una maquinaria de reparación que arregla continuamente el daño sufrido. De hecho, el fotosistema II resulta dañado con relativa frecuencia, concretamente en su polipéptido central D1. La ruptura del polipéptido D1 es una manera de proteger todo el complejo, a modo de un fusible que evita que todo el sistema se «queme» y sólo necesite un recambio puntual. De este modo, las plantas han minimizado el daño, centrándolo en un solo polipéptido de los más de veinte que contiene el fotosistema II. La proteína D1 forma parte del centro de reacción del fotosistema II y en su estructura molecular se insertan como grupos prostéticos: clorofila, feofitina, caroteno y quinona, las moléculas implicadas en los primeros pasos del transporte electrónico. El recambio molecular de D1 se está produciendo continuamente, incluso cuando las plantas reciben intensidades de luz normales, no fotoinhibitorias. Por ello, esta proteína tiene una tasa de recambio varios órdenes de magnitud superior a las del resto de las proteínas de la membrana tilacoidal. El proceso de daño y sustitución de D1 se ilustra en la Figura 10-7. Se puede decir por estos hechos, y considerando la extensión y volumen del reino vegetal, que la proteína D1 es la más sintetizada en todo el planeta. Quizás, este es el precio que las plantas tienen que pagar por ser capaces de utilizar el agua como fuente de protones y electrones, al tiempo que generan «residualmente» una molécula tan peligrosa como es el oxígeno (O_2).

Cuando los mecanismos de desacoplamiento o de reparación fallan o no son suficientes para aguantar la intensidad de energía luminosa que llega a una planta, ésta sufre el citado proceso de fotoinhibición real que disminuye su eficacia fotosintética y su capacidad asimiladora. Estos procesos fotoinhibitorios pueden disminuir drásticamente la producción vegetal y, a menudo, están inducidos por combinación de un exceso de luz con distintos tipos de estrés nutricional, como estrés por falta de agua (hídrico), estrés por falta de algún nutriente esencial (nitrato, hierro, etc), estrés por exceso de sales en el suelo (salino), etc. (véase Capítulo 30).

4.4. Los mecanismos de desacoplamiento permiten la disipación de energía en exceso y protegen contra la fotoinhibición

Todos los procesos de disipación activa de energía son procesos llamados de protección fotodinámica del aparato fotosintético, y funcionan cuando éste no puede asimilar convenientemente la energía que le llega. Hemos visto que se pueden distinguir dos pasos para la asimilación de energía fotosintética: 1) la absorción y transferencia de fotones en las antenas; 2) la conversión fotoeléctrica y transferencia redox de electrones en los centros de reacción de los fotosistemas.

En correspondencia con estos dos pasos existen dos mecanismos de desacoplamiento que permiten disipación de energía: 1) mecanismos de desacoplamiento de la transferencia de fotones en las antenas; 2) mecanismos de desacoplamiento de la transferencia de electrones en los centros de reacción.

4.5. El aumento de la emisión de fluorescencia es un modo de disipar energía en las antenas

Son mecanismos de desacoplamiento de la transferencia de fotones en las antenas (primer tipo de desacoplamiento citado) los procesos de extinción de estados excitados de clorofilas por cambios de estado de las antenas. En este sentido, la migración de antenas, que se da con los cambios o transiciones entre estado I y estado II ya descritos, sirve para modular la energía que llega a cada fotosistema. También, la agregación de antenas, que se da mediada por variaciones en el ciclo de las xantofilas y en el gradiente de pH del tilacoide, es un mecanismo para aumentar la extinción de los clorofilas excitadas.

Las clorofilas son pigmentos que tienen la propiedad de poder extinguir su estado excitado emitiendo energía en forma de una luz de mayor longitud de onda que la que absorben. Esta emisión se llama **fluorescencia** (véase apartado 2.2 del Capítulo 9). Normalmente, las clorofilas engarzadas en los complejos fotosintéticos apenas emiten fluorescencia, porque están dispuestas para transmitir rápidamente la energía de su estado excitado hasta los centros de reacción, convertirla allí en energía electroquímica y realizar así la fotosíntesis. Sin embargo, se ha comprobado que las plantas pueden aumentar la emisión de fluorescencia de sus clorofilas modificando el estado o la estructura de las antenas, y éste es un modo eficaz de disipar energía cuando hay luz en exceso.

La modificación del estado o la morfología molecular de las antenas se asocia a dos fenómenos bioquímicos en el tilacoide: 1) la concentración de gran número de protones en el lumen que genera un fuerte gradiente de pH; y 2) la transformación de la xantofila violaxanti-

na en zeaxantina por des-epoxidación (por el llamado **ciclo de las xantofilas**) (véase Capítulo 30). Se ha demostrado que ambos procesos son fotoinducidos y afectan drásticamente y directamente al estado de agregación y la conformación de LHClI y, por ello, a su capacidad de emitir fluorescencia. Cuando en el lumen el pH es bajo (5-6) y la proporción de zeaxantina/violaxantina asociada a la antena es alta, la LHClI emite más fluorescencia y con ello aumenta la disipación de energía radiante y baja el rendimiento fotosintético.

4.6. Los flujos cíclicos de electrones en torno a los centros de reacción son también válvulas de escape en situaciones fotoinhibitorias

Mecanismos de desacoplamiento energético del segundo tipo son los procesos de interrupción del transporte electrónico lineal normal (desde H_2O hasta $NADP^+$) entre los fotosistemas I y II. Un tipo de interrupción conocido son los flujos cíclicos, que provocan que en un cierto paso redox el electrón vuelva a ser tomado por un elemento de la cadena por el cual ya había pasado. Estos flujos disipan parte de la energía porque suponen un aumento importante de la entropía de la reacción fotosintética global. También, los procesos de extinción de radicales libres iónicos, es decir, procesos que facilitan la desionización, inducen la interrupción del transporte electrónico.

El flujo cíclico de electrones en torno al fotosistema I es bien conocido, y consiste en que los electrones son devueltos desde la ferredoxina hacia elementos anteriores de la cadena fotosintética, en un ciclo mediado por el *pool* de plastoquinonas y por su complejo de óxido-reducción intermediario (el complejo citocromo b_6/f) (véase Fig. 10-4). Este flujo cíclico no produce NADPH, sino que utiliza parte de la energía redox acumulada después del fotosistema I en bombear protones a través de la membrana fotosintética y, a la vez, disipa el resto de la energía en forma de calor (por el aumento de entropía en el proceso cíclico). Este movimiento de protones aumenta el gradiente de pH utilizado luego por la ATP sintasa para obtener ATP, lo que da lugar a la llamada fotofosforilación cíclica que, energéticamente, es menos eficiente que la lineal, ya que una parte importante de la energía es disipada en forma de calor.

Hasta mediados de los años ochenta no se habían encontrado datos experimentales que avalasen seriamente la posibilidad de la existencia de algún tipo de flujo cíclico de electrones en torno al fotosistema II. Sin embargo, los más recientes estudios moleculares sobre fotoinhibición indicaban una interrupción frecuente del transporte electrónico lineal normal en el fotosistema II. Se podía, por ello, pensar con nuevos argumentos en la existencia de algún mecanismo de disipación alternativo similar al descrito para el fotosistema I.

Recientes investigaciones sobre la función del citocromo b559 lo han implicado en un camino alternativo para los electrones en torno al fotosistema II, planteando la posibilidad de que exista otra vía de disipación de energía quizás parecida a un «segundo flujo cíclico» a través de dicho fotosistema (Fig. 10-8). Este citocromo aparece siempre íntimamente asociado al centro de reacción del fotosistema II. Experimentalmente, se ha caracterizado la existencia de este citocromo en dos formas de distinto potencial redox: una de bajo potencial (LP) que, en oscuridad, está oxidada y otra de alto potencial (HP) que, en oscuridad, tiende a estar reducida. Se ha demostrado también que, en ciertas condiciones se puede dar una foto-reducción y una foto-oxidación alternativas de este citocromo y que existe una clara influencia del pH sobre estos procesos redox. Además, se ha visto que el funcionamiento de este flujo alternativo fotoinducido de electrones hacia el citocromo b559 está íntimamente ligado a la interrupción del flujo electrónico lineal en el fotosistema II, es decir, a procesos de fotoinhibición de su actividad normal. Todos estos descubrimientos han permitido postular un nuevo modelo funcional para el enigmático citocromo b559, que durante casi treinta años ha sido un punto oscuro en la investigación sobre la fotosíntesis. En la Figura 10-8 se presentan dos esquemas que ilustran el modelo funcional del citocromo b559 postulado. Como se ve, el citocromo se sitúa en paralelo al flujo electrónico lineal normal en el fotosistema II. Su funcionamiento estaría así ligado al desacoplamiento de este transporte electrónico lineal en condiciones fotoinhibitorias del lado aceptor o del lado donador del fotosistema II, es decir, al fallo de los aceptores o los donadores secundarios. La vía alternativa de transferencia hasta o desde el citocromo estaría luego conectada y en equilibrio con el *pool* de plastoquinona/plastoquinol presente en los tilacoides, que actuaría como un amortiguador redox de electrones. Como se ve en la Figura 10-8, se trata propiamente de un pseudo-ciclo ya que, según el modelo, no se dan a la vez una oxidación y una reducción consecutiva del citocromo, sino que éstas se dan en dos situaciones distintas existiendo un mecanismo molecular (a modo de «interruptor») que hace que el citocromo pase de un estado a otro. Sin embargo, según ciertos autores, sí puede suceder que la alternancia de oxidación y reducción del citocromo vaya acompañada de un translocación de protones, lo cual daría a todo este proceso una función parecida a la descrita en el flujo cíclico en torno al fotosistema I. Esta es un área abierta de investigación en fotosíntesis.

5. COORDINACIÓN Y PROPORCIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ATP y NADPH

Cuando los fotosistemas PSI y PSII funcionan en serie, por cada molécula de NADP^+ que se reduce a NADPH (con 2 electrones transferidos desde una molécula de

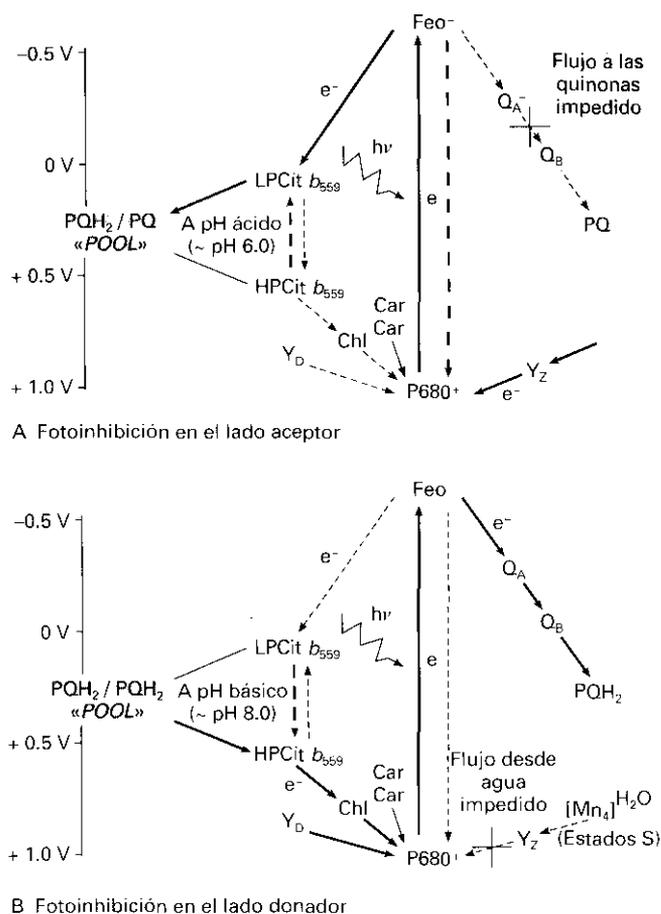


Figura 10-8. Esquema de dos modos alternativos de transferencia electrónica en torno al fotosistema II en caso de alteración por fotoinhibición del transporte electrónico normal. Ambos casos implican la función del citocromo b559 como aceptor, en a), o donador, en b), alternativo de electrones. La forma LP de bajo potencial del citocromo está oxidada a pH ácido y es capaz de tomar un electrón. a) La forma HP del alto potencial del citocromo está reducida a pH básico y es capaz de ceder un electrón. b) El potencial redox de las formas LP y HP del citocromo están justo por encima de PQ y justo por debajo de PQH_2 , respectivamente, de modo que en oscuridad ceden o toman electrones del *pool* de plastoquinona.

H_2O), se produce normalmente la fosforilación de 1.33 moléculas de ADP a ATP. Este número se deduce de los datos del acoplamiento de la fosforilación con la cadena electrónica fotosintética a través del gradiente de protones. En este acoplamiento se estima que a nivel de la ATP sintasa se necesitan 3 H^+ por ATP producido, y que en el transporte electrónico fotosintético lineal se traslocan unos 4 H^+ por cada 2 electrones que pasan por la cadena del de e^- . De este modo, $4/3 = 1.33$ es el rendimiento en ATP por cada 2 electrones que atraviesan la cadena fotosintética de forma lineal. Esta formación de ATP acoplada a la reducción de NADP^+ se denomina **foto-fosforilación no-cíclica**.

Debido a la dinámica del aparato fotosintético (aparato 3) se entiende que los dos fotosistemas, PSI y PSII, no tienen que funcionar siempre exactamente a la mis-

ma velocidad. Las relaciones entre las cantidades de ATP y NADPH que requieren las distintas rutas biosintéticas del cloroplasto no tienen por qué coincidir con 1.33. Por ejemplo, en la ruta de **asimilación del CO₂**, que es la más importante desde el punto de vista cuantitativo y, por tanto, la que en mayor grado determina el consumo global de energía metabólica, la relación ATP/NADPH consumidos es de 1.5 (véase Capítulo 11). Hace falta, por tanto, en este caso una mayor proporción de ATP respecto a lo que puede producir la transferencia lineal de electrones desde el H₂O hasta el NADP⁺ por los dos fotosistemas conectados en serie. Ese ATP adicional puede obtenerse del funcionamiento cíclico de los electrones en torno a un fotosistema, de modo que su producto final reducido vuelve a oxidarse reduciendo a su vez al primer elemento redox de la serie que atraviesa ese fotosistema, cerrando así un ciclo donde el flujo electrónico sólo produce un incremento en el gradiente de protones trans-tilacoide, que sirve para producir ATP en la llamada **fotofosforilación cíclica**. El flujo electrónico cíclico se da fundamentalmente en torno al PSI, lo que exige que una fracción de los excitones que llegan al PSI se dediquen a reoxidar ferredoxina reducida, en vez de plastoquinol (por medio del citocromo *b₆/f* en ambos casos), y que el número total de excitones procesados por el PSI sea superior a los que utiliza el PSII.

El rendimiento energético de un flujo cíclico es menor que el de un flujo lineal, porque ese tipo de flujo es análogo a los ciclos metabólicos llamados **fútiles**, que sirven entre otras cosas para producir calor y disipar energía. Como se ha comentado en el apartado 4, la disipación de energía en exceso es también una función esencial de los flujos cíclicos en torno a los fotosistemas.

Otras situaciones que modifican la proporción ATP/NADPH son aquellas en las que la planta no puede utilizar la energía metabólica producida en la membrana fotosintética, ATP y NADPH, por una falta de nutrientes o de agua que conduce a la carencia de los sustratos metabólicos adecuados. Tal es la situación de la planta sometida a escasez de agua, que restringe el intercambio de gases para frenar la desecación y que, como consecuencia de tal restricción, queda desnutrida de CO₂ al cerrar estomas. Al no fijarse tanto CO₂, se acumulan sin gastarse ATP y NADPH, lo cual lleva al agotamiento de los niveles de NADP⁺ y ADP, sustratos terminales indirectos de los procesos que ocurren en la membrana fotosintética. Con ello, se impide el funcionamiento normal de la transferencia electrónica, lo que, a su vez, interfiere los procesos primarios en los fotosistemas, que se ven frenados o, incluso, bloqueados. En estas circunstancias de estrés se producen, pues, las condiciones metabólicas que favorecen los desajustes entre las etapas fotosintéticas y se hace necesario utilizar activamente toda clase de mecanismos protectores como los que se han descrito en el apartado 4. Entre éstos, tenemos que añadir a los ya mencionados las rutas o ciclos metabólicos fútiles propiamente dichos, di-

ferentes a la cadena fotosintética, en los que se consume NADPH, ATP o ambos sin propósito necesariamente biosintético. Quizás el ejemplo más extendido e importante de una ruta fotosintética fútil es la **fotorrespiración** (véase Capítulo 12). Esta ruta metabólica opera preferentemente cuando bajan los niveles de CO₂ y aumentan los de O₂. En ella se consumen gran número de moléculas de ATP y de NADPH por cada ribulosa bisfosfato que se oxida a CO₂. Por tanto, puede resultar muy eficiente para la regeneración de ADP y de NADP⁺ y para aliviar el bloqueo del sistema de transferencia electrónica e impedir la acumulación de reductores potentes en el extremo de bajo potencial del PSI.

Alternativamente a la fotorrespiración, donde la rubisco actúa como oxigenasa consumiendo O₂ (véase Capítulo 12), existe a nivel del PSI la posibilidad de reducción directa del O₂ a ion superóxido (O₂⁻; véase también Capítulo 30), de manera que el O₂ puede actuar como aceptor final de electrones en la fotosíntesis. La eliminación del ion superóxido mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) utiliza H⁺ y produce agua oxigenada (H₂O₂) (véase apartado 4.8 y Fig. 30-9 del Capítulo 30). El conjunto de estas reacciones, que se conoce clásicamente como **reacción de Mehler**: O₂ + 2e⁻ (de la cadena fotosintética) + 2H⁺ → H₂O₂, es el origen de muchas **especies activadas del oxígeno** (véase apartado 4.8 del Capítulo 30), las cuales muestran una amplia peligrosidad para muchas moléculas y membranas celulares. Por tanto, estas especies derivadas del O₂ necesitan ser eliminadas por una variedad de mecanismos de detoxificación, para evitar procesos de fotoinhibición y foto-oxidación (véase Capítulo 30).

Sin embargo, el transporte lineal de electrones desde el agua hasta el O₂ a través de los fotosistemas genera gradiente protónico (al igual que el transporte desde el agua hasta el NADP⁺), y por tanto se acopla a síntesis de ATP. Este tipo de fotofosforilación se llama **pseudo-cíclica**, porque en apariencia se parece a la fotofosforilación cíclica ya que el balance global de producción de O₂ es cero: la producción de este gas que tiene lugar en la fotólisis del agua se compensa con el consumo de O₂ a nivel del PSI en el contexto de lo que se conoce actualmente como el ciclo agua-agua en los cloroplastos (véase Asada, 1999). La cantidad de ATP que se forma por **fotofosforilación pseudo-cíclica** no es muy grande cuantitativamente, pero puede ser significativa en circunstancias fisiológicas donde la concentración del aceptor NADP⁺ disminuye, tal como se discutió anteriormente en este mismo apartado.

RESUMEN

Para que la fotosíntesis funcione, los pigmentos fotosintéticos deben estar engarzados en sistemas biomoleculares capaces de absorber la energía luminosa, de transmitir la energía absorbida y de convertir esta energía en una energía no radiante, estable y acumulable en un or-

ganismo, como es la energía química. Estos sistemas biomoleculares compuestos por grandes complejos pigmento-proteína se llaman **fotosistemas**, y son las unidades básicas para la realización de fotosíntesis. Funcionalmente están constituidos por: un núcleo o **centro de reacción**, hacia donde se canaliza la energía de excitación y se transforma en energía química redox; y una **antena**, colectora de luz, capaz de absorber los fotones que le llegan y de transmitir la energía absorbida en forma de excitones hasta el centro de reacción. En plantas existen dos fotosistemas: el fotosistema I y el fotosistema II (PSI y PSII) y sus antenas correspondientes son *LHCI* y *LHCII*, respectivamente. El mecanismo clave de funcionamiento de las antenas es el acoplamiento excitónico, de manera que son como un mosaico de clorofilas engarzadas sobre el cual los excitones se mueven al azar en picossegundos. La zona común de interconexión entre la antena y el centro de reacción de un fotosistema está constituida por unas **clorofilas especiales** (P) que son el punto de término de la energía de excitación transmitida (P^*) y el punto de inicio de la primera separación de carga con transferencia de un electrón (P^{+}). En estas clorofilas especiales se produce la conversión de la energía excitónica en energía electroquímica redox; y se llaman *P700* y *P680*, en PSI y PSII, respectivamente. A estas clorofilas se conecta toda una serie de elementos redox que se oxidan y se reducen alternativamente, y que están engarzados en la estructura proteínica de los 3 grandes complejos fotosintéticos (PSI, PSII y Cit b_6/f) y de los intermediarios entre ellos (PQ, P_c, Fd y FNR). Todos estos elementos redox constituyen la cadena de transporte electrónico fotosintético. Si se representan los elementos de la cadena frente al potencial redox, se obtiene el llamado esquema en Z. El primer donador de esta cadena es el H₂O, que se oxida en el lumen tilacoidal, y el último aceptor es el NADP⁺, que se reduce en el estroma. La **fotoólisis del agua**, que origina como subproducto oxígeno molecular (O₂), es mediada por un cluster de manganeso relacionado con el PSII. Estrechamente acoplada al flujo fotosintético de electrones se encuentra la síntesis de ATP catalizada por la **ATP sintasa**. Para esta síntesis, se utiliza la energía acumulada por la cadena redox en forma de energía o **fuerza protón-motriz**. La ubicación de las proteínas fotosintéticas en la membrana tilacoidal no es uniforme, y está sometida a cambios dependientes del estado funcional que, a su vez, es regulado por la cantidad y calidad de la luz que les llega. La distribución de la energía de excitación entre los 2 fotosistemas cambia según el estado de la plastoquinona y de LHCII, dando lugar a dos estados funcionales: estado I y estado II. También, PSI y PSII, como complejos enzimáticos que son, pueden estar en forma activa funcional o en forma inactiva no funcional, lo cual da lugar a dos tipos de fotosistemas: α y β (por ejemplo, PSII _{α} y PSII _{β}). La inactivación está relacionada con un exceso de luz o una incapacidad de absorber toda la luz incidente. La energía en exceso debe

ser disipada porque, si no, puede provocar **fotoinhibición**, en la que el daño provocado por la excesiva luz hace disminuir la tasa fotosintética global. El PSII es el principal centro fotosensible regulador de la actividad fotosintética, siendo su fotosensibilidad el mecanismo de control que tienen las plantas para esa regulación. Cuando la intensidad de luz sobrepasa la capacidad de absorción, una serie de mecanismos de desacoplamiento y desactivación tiene lugar con el objeto de maximizar la disipación de energía y minimizar el daño global sobre el aparato fotosintético y, así, proteger la planta. Estos mecanismos de protección a nivel molecular son el desacoplamiento de la transferencia de fotones en las antenas y el desacoplamiento de la transferencia de electrones en los centros de reacción.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Calcule en eV la energía de un fotón de longitud de onda 430 nm y de otro de longitud de onda 680 nm. ¿A qué zona del espectro visible corresponden estos fotones?
2. ¿Cuál es la energía mínima necesaria que debe ser absorbida en el centro de reacción del fotosistema II para que un electrón circule por los diferentes transportadores, y cuál para el fotosistema I?
3. ¿Cuál es la característica que hace a una molécula fotosensible?
4. ¿Cuál es el elemento más oxidante en el esquema en Z fotosintético y cuál el más reductor según la escala de potencial redox?
5. ¿Qué diferencias estructurales principales se dan en los tilacoides entre los denominados estado I y estado II?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Allen, J. F.: «Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis». *Biochim Biophys Acta*, 1098:275-335, 1992.
2. Aro, E. M. *et al.*: «Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover». *Biochim Biophys Acta*, 1143:113-134, 1993.
3. Asada, K.: «The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:601-639, 1999.
4. Barber, J., Andersson, B.: «Too much of a good thing - Light can be bad for photosynthesis». *Trends Biochem Sci*, 17:61-66, 1992.
5. Barber, J., De Las Rivas, J.: «A functional model for the role of cytochrome b559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition». *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:10942-10946, 1993.
6. Brudvig, G. W. *et al.*: «Mechanism of photosynthetic water oxidation». *Annu Rev Biophys Chem*, 18:25-46, 1989.
7. Cramer, W. A. *et al.*: «The enigmatic cytochrome b-559 of oxygenic photosynthesis». *Physiol Plant*, 88:705-711, 1993.
8. De La Rosa, M. A., *et al.*: «Fotosíntesis: sol, agua, tierra y aire». *Mundo Científico*, 138:744-755, 1993.

9. Ghanotakis, D. F., Yocum, C. F.: «Photosystem II and the oxygen-evolving complex». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41:255-276, 1990.
10. Mathis, P., Rutherford, A. W.: «La producción de oxígeno en las plantas». *Mundo Científico*, 144:240-247, 1994.
11. Melis, A.: «Dynamics of photosynthetic membrane composition and function». *Biochim Biophys Acta* 1058:87-106, 1991.
12. Niyogi, K. K.: «Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:333-359, 1999.
13. Rutherford, A. W.: «Photosystem II, the water splitting enzyme». *Trends Biochem Sci*, 14:227-232, 1989.
14. Van Grondelle, R., *et al.*: «Energy transfer and trapping in photosynthesis». *Biochim Biophys Acta* 1187:1-66, 1994.

FIJACIÓN DEL DIÓXIDO DE CARBONO Y BIOSÍNTESIS DE FOTOASIMILADOS

Hipólito Medrano y Jaime Flexas

1. Introducción. 2. Fotosíntesis en los cloroplastos: el ciclo de Calvin. 3. Regulación de la asimilación del CO₂.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La fijación fotosintética del dióxido de carbono constituye el primer paso para la producción vegetal y la vida en la Tierra

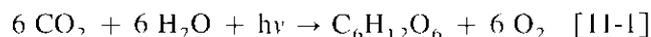
Los organismos autotróficos, entre los que se incluye la inmensa mayoría de vegetales, constituyen la puerta por la que energía y materia se incorporan a la biosfera. Por un lado, estos organismos son capaces de transformar la energía lumínica procedente del sol en energía química utilizable para las reacciones metabólicas (véase Capítulo 10). Por otra parte, el dióxido de carbono asimilado en los órganos fotosintéticos constituye, junto con el hidrógeno procedente del agua y los elementos minerales absorbidos por las raíces, la base estructural del crecimiento de los vegetales y, en consecuencia, de la producción primaria de los ecosistemas y la biosfera.

Por todo ello, la fotosíntesis es un proceso fundamental para la vida en la Tierra, hecho que ha suscitado un enorme interés por su estudio. Entre las múltiples aplicaciones derivadas del conocimiento o la manipulación de la fotosíntesis se incluyen: la mejora de la producción de los cultivos, la comprensión de las diferencias de productividad entre diferentes ecosistemas, o la predicción de los efectos de cambios ambientales sobre la composición y productividad de las comunidades vegetales.

1.2. La combinación de agua y dióxido de carbono genera carbohidratos con la liberación de oxígeno

La fotosíntesis es un proceso complejo, en el que intervienen múltiples reacciones bioquímicas que, en con-

junto, requieren una elevada energía (2879 kJ mol⁻¹). La resultante del conjunto de reacciones puede sintetizarse mediante la siguiente ecuación:



En general, en las plantas terrestres, el CO₂ se incorpora desde la atmósfera a través de los estomas (véase Capítulo 3). En las algas y plantas acuáticas, procede del CO₂ disuelto en el agua circundante. $h\nu$ representa la energía luminosa transformada en ATP y NADPH (véase Capítulo 10) y C₆H₁₂O₆ es la fórmula general para designar a los carbohidratos de seis unidades de carbono sintetizados en este proceso. Según esta ecuación, la producción de un mol de carbohidrato (hexosa) requiere el consumo de seis moles de dióxido de carbono y seis de agua. El proceso lleva asociada la liberación de seis moles de oxígeno al ambiente.

Esta liberación de O₂ se conoce desde antes, incluso, de que Lavoisier (1743-1794) diera nombre al oxígeno. Ya Stephen Hales (1677-1761) había intuido que las plantas «se alimentaban del aire», aunque fue Joseph Priestley (1733-1804) quien demostró que las plantas se alimentaban de aire «flogisticado» (CO₂), el cual «purificaban» (desprendiendo O₂). A estas conclusiones llegó Priestley mediante un sistema experimental consistente en una campana cerrada en la cual introducía una vela encendida, un ratoncito y, a veces, una planta verde. Descubrió que, en presencia de la planta, el ratón podía respirar y la vela permanecía encendida durante más tiempo que en ausencia de la planta (Fig. 11-1). Posteriormente, Jan Ingenhousz (1730-1799) demostró que las partes verdes de las plantas fijan CO₂ en presencia de luz, pero en la oscuridad realizan el proceso opuesto.

A pesar de estos conocimientos precoces, no sería

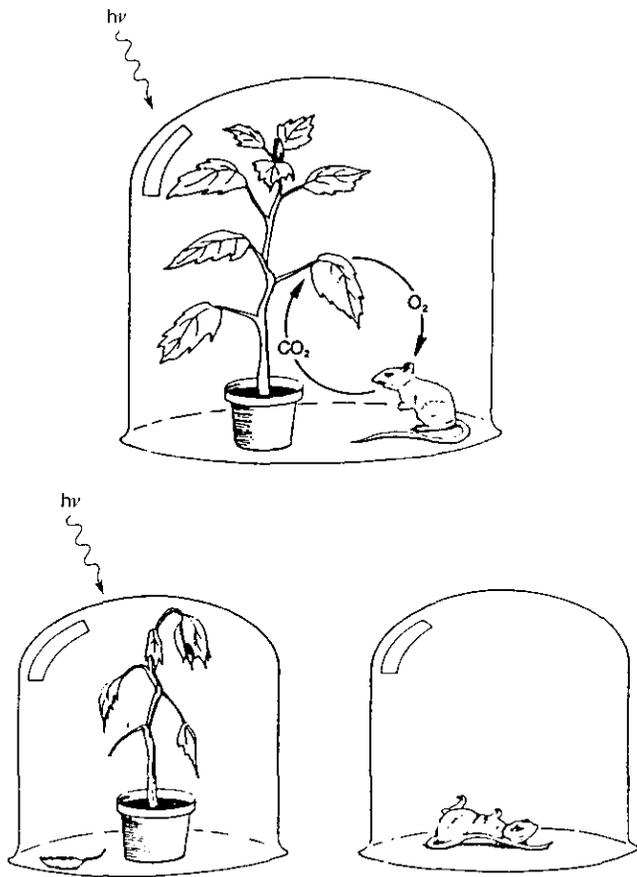


Figura 11-1. Experimento clásico de Priestley mostrando que las plantas iluminadas consumen CO₂ y desprenden oxígeno, al contrario que los animales.

hasta mediados del siglo XX que las nuevas técnicas emergentes permitirían dilucidar la ruta bioquímica de asimilación del CO₂. Aún hoy, quedan todavía muchos aspectos por conocer acerca de este proceso que permite la vida de todos los organismos del planeta.

2. FOTOSÍNTESIS EN LOS CLOROPLASTOS: EL CICLO DE CALVIN

2.1. El ciclo fotosintético de reducción del carbono (CFRC) fue dilucidado en los años cincuenta gracias al uso del ¹⁴C

El isótopo del carbono de peso atómico 14 comenzó a utilizarse como marcador a mediados de este siglo. La ventaja de este isótopo frente al ¹³C es que tiene una vida muy larga (período de semidesintegración de 5730 años), lo cual hace de él una herramienta útil para la datación de materiales antiguos. La ventaja del ¹⁴C frente al ¹³C es que éste es estable mientras que el anterior es radiactivo, cosa que permite detectar su presencia sobre un cromatograma mediante autorradiografía. La utilización del ¹⁴C permite marcar compuestos en los que se puede detectar su presencia inmediatamente

o años más tarde. Utilizando ¹⁴C como marcador de los productos intermediarios de la fotosíntesis, Melvin Calvin, Andrew Benson, James A. Bassham y otros investigadores de la Universidad de California en Berkeley lograron dilucidar la ruta del carbono en la fotosíntesis durante la década de los cincuenta. Este trabajo le valió a Melvin Calvin el Premio Nobel de Química en 1961. Su diseño experimental consistió en suministrar CO₂ marcado con el isótopo radiactivo a un cultivo de algas del género *Chlorella*, las cuales lo utilizaban para la realización de la fotosíntesis, que se interrumpía rápidamente mediante inmersión en etanol hirviente al 80%. A continuación, se sometía un extracto de las algas a cromatografía bidimensional en papel, la cual se revelaba mediante autorradiografía sobre una película de rayos X para ver en qué compuestos se localizaba la radiactividad procedente del ¹⁴C. Si se obtenían los extractos un minuto después de que las algas hubieran fotosintetizado con ¹⁴CO₂, aparecían muchos compuestos radiactivos. Acortando el tiempo transcurrido entre el suministro de ¹⁴CO₂ y la interrupción de la fotosíntesis algunos de estos compuestos no mostraban radiactividad, indicando que se trataba de compuestos que se sintetizaban en pasos tardíos de la ruta del carbono. Cuando el tiempo se acortaba a sólo dos segundos, la mayor parte de la radiactividad se concentraba en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido-3-fosfoglicérico o 3-fosfoglicerato (3-PGA, o simplemente PGA) (Fig. 11-2). Éste debía ser, por tanto, el compuesto resultante de la incorporación del CO₂ en la ruta fotosintética.

Tras buscar infructuosamente el compuesto de dos átomos de carbono que se unía con el CO₂ para originar el 3-PGA, se planteó la hipótesis de que, en realidad, el precursor fuera una molécula de 5 átomos de carbono que se escindiera en dos de tres tras la incorporación del CO₂. Para identificar esta molécula, se esperó a que las algas hubieran fotosintetizado utilizando ¹⁴CO₂, y después se eliminó el suministro de CO₂ para interrumpir su asimilación. En los extractos posteriores se encontró una progresiva disminución en los niveles de 3-PGA marcado. Curiosamente, al mismo tiempo se observaba

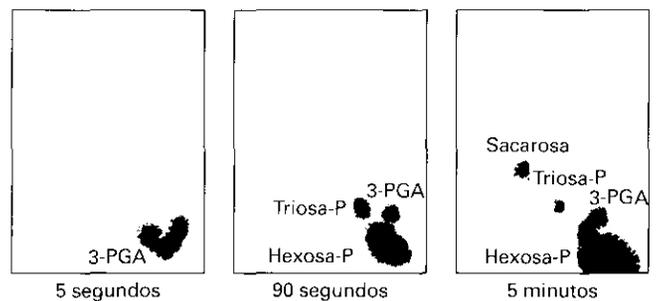


Figura 11-2. Esquemas de los resultados obtenidos al hacer la autorradiografía de los cromatogramas obtenidos con suspensiones de algas iluminadas. Las muestras se obtuvieron 5, 90 y 300 segundos tras añadir ¹⁴CO₂ a las suspensiones de algas. Obsérvense los cambios con el tiempo en la aparición de sustancias marcadas (adaptado de Hess, D. Fisiología Vegetal. Editorial Omega, Barcelona, 1980).

un aumento de la concentración de un azúcar de 5 átomos de carbono fosforilado en cada uno de sus extremos, la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP). Interrumpiendo el suministro de luz en vez del CO_2 , se observaba un incremento inicial de la concentración de 3-PGA junto a una disminución progresiva de la RuBP (Fig. 11-3). Los incrementos de concentración molar del 3-PGA eran el doble que las disminuciones de la concentración molar de la RuBP. Por otro lado, en cuanto la concentración de RuBP se hacía nula la acumulación de 3-PGA disminuía drásticamente. Estas evidencias sugieren que la RuBP actúa como aceptor del CO_2 y precursor del 3-PGA. Se estableció así la ruta metabólica que explicaba las reacciones químicas que conducen a la reducción del CO_2 , las que permiten la formación de los primeros carbohidratos y las que concluyen con la regeneración de la RuBP. Esta ruta, tras una serie de reacciones, generaba la RuBP y demostraba tratarse de un ciclo bioquímico. Este ciclo se conoció con el nombre de sus descubridores Calvin-Benson-Bassham, aunque modernamente se tiende a simplificar como Ciclo Fotosintético de Reducción del Carbono (CFRC) o Ciclo de Calvin.

2.2. El CFRC contiene diversos pasos que consumen energía (ATP) y poder reductor (NADPH) generados mediante la cadena de transporte de electrones

Continuando con sus experimentos, Calvin y cols. y otros grupos consiguieron dilucidar la ruta completa de asimilación del dióxido de carbono, con todos sus intermediarios, así como las enzimas que catalizan las distintas reacciones (Fig. 11-4). En esta ruta se diferencian tres fases.

1. La **fijación inicial del CO_2** , que tiene lugar por **carboxilación** de la RuBP.
2. La **reducción del carbono** fijado a hidratos de carbono, que requiere el aporte de energía y poder reductor generados mediante la cadena de transporte electrónico.
3. La **regeneración de la RuBP**, que requiere también aporte energético.

Cada una de estas tres fases, que se encuentran resumidas en la Figura 10-4, se detallan a continuación en el texto y en las Figuras 11-5, 11-6 y 11-7.

La incorporación del CO_2 a la RuBP se denomina **carboxilación**. Este paso está catalizado por una enzima denominada ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa («RuBisCo»). El nombre de carboxilasa/oxigenasa se debe a que la rubisco cataliza también la oxigenación de la RuBP (véase Capítulo 12). La reacción de carboxilación se desarrolla en cinco pasos, todos los cuales están catalizados por la rubisco (Fig. 11-5).

Como se refleja en la Figura 11-4, estequiométricamente es necesaria la fijación de tres moléculas de CO_2 para que el carbono pueda avanzar hacia la síntesis de hidratos de carbono con la consiguiente regeneración completa de RuBP, ya que el primer intermediario de la síntesis es un compuesto fosfatado de tres átomos de carbono (Fig. 11-4). Se describirá, pues, el CFRC en términos de fijación de tres moléculas de CO_2 . Tras la incorporación de tres moléculas de CO_2 a tres moléculas de RuBP se obtienen seis moléculas de 3-PGA. La mayor parte de la energía consumida en el CFRC se consume durante la reducción del grupo carboxílico del 3-PGA. En primer lugar, cada una de las seis moléculas de 3-PGA es fosforilada con consumo de una molécula de ATP, en una reacción catalizada por la PGA quinasa. Cada una de las seis moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato

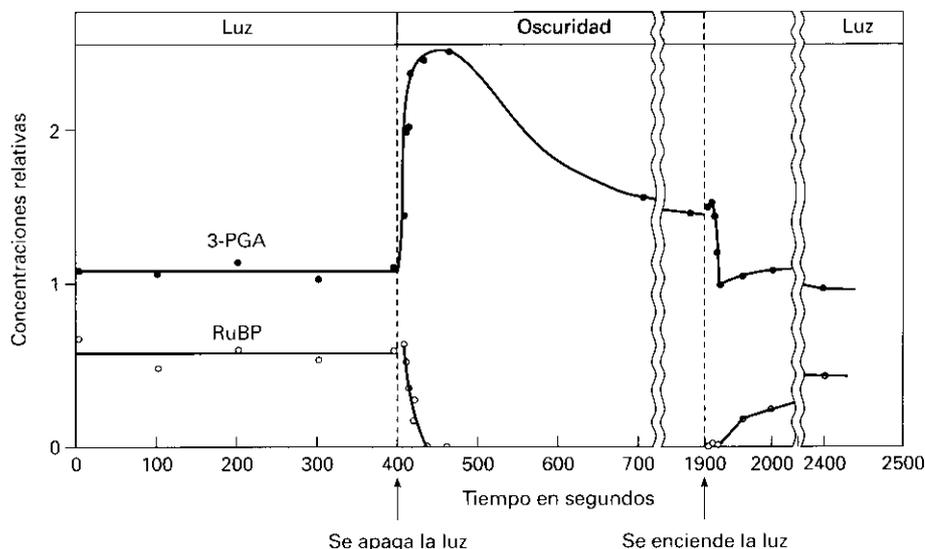


Figura 11-3. Esquema que representa la variación en las concentraciones de 3-PGA y de la RuBP en una suspensión de algas verdes unicelulares al apagar y encender la luz (adaptado de Bassham, J.A. y Calvin, M. *The Path of Carbon in Photosynthesis*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1957).

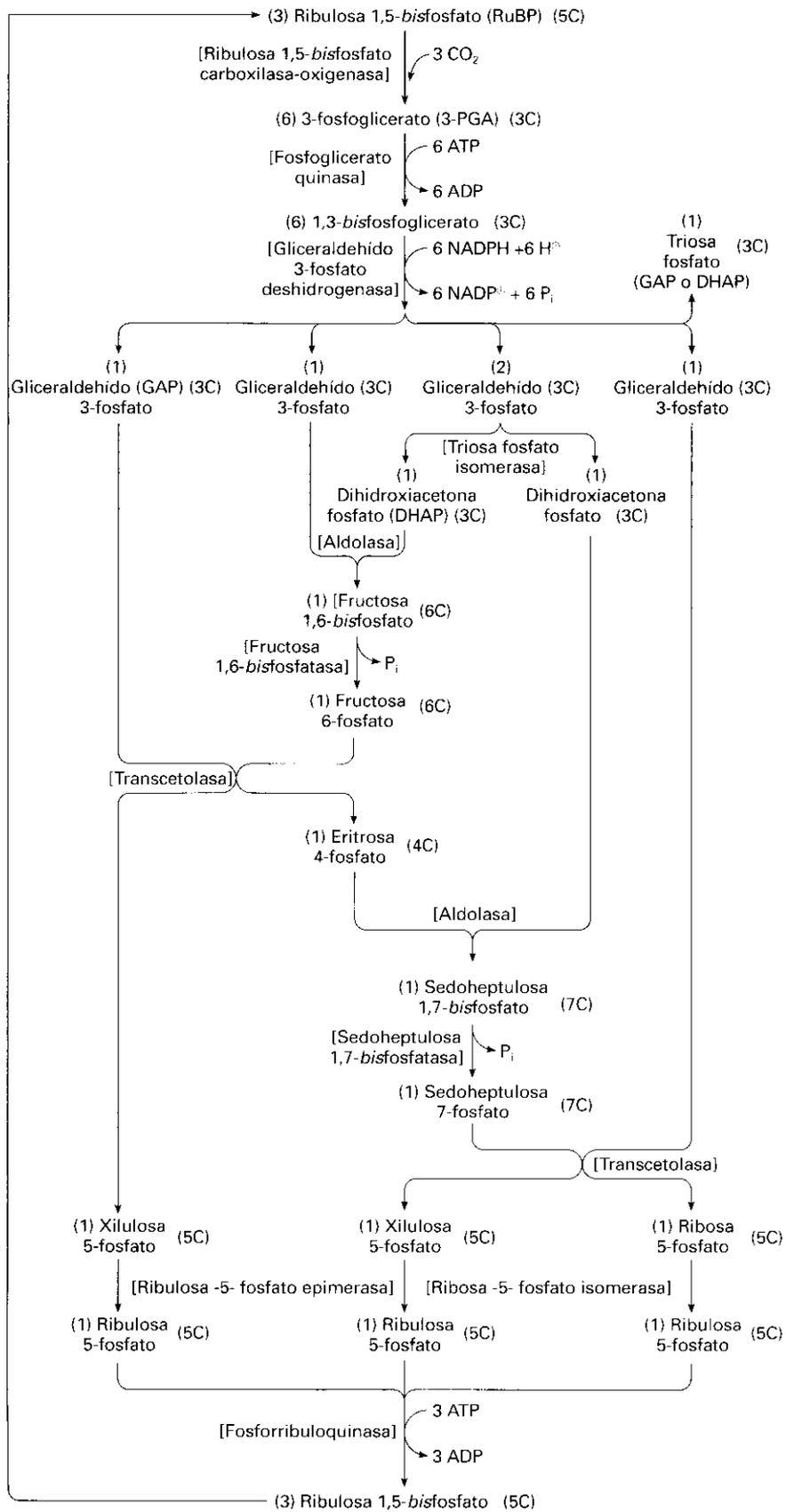


Figura 11-4. Esquema general del ciclo fotosintético de reducción de carbono (CFRC) o ciclo de Calvin. A la derecha de cada compuesto intermediario se muestra entre paréntesis el número de átomos de C de la molécula. El paréntesis a la izquierda o arriba muestra el número de moléculas.

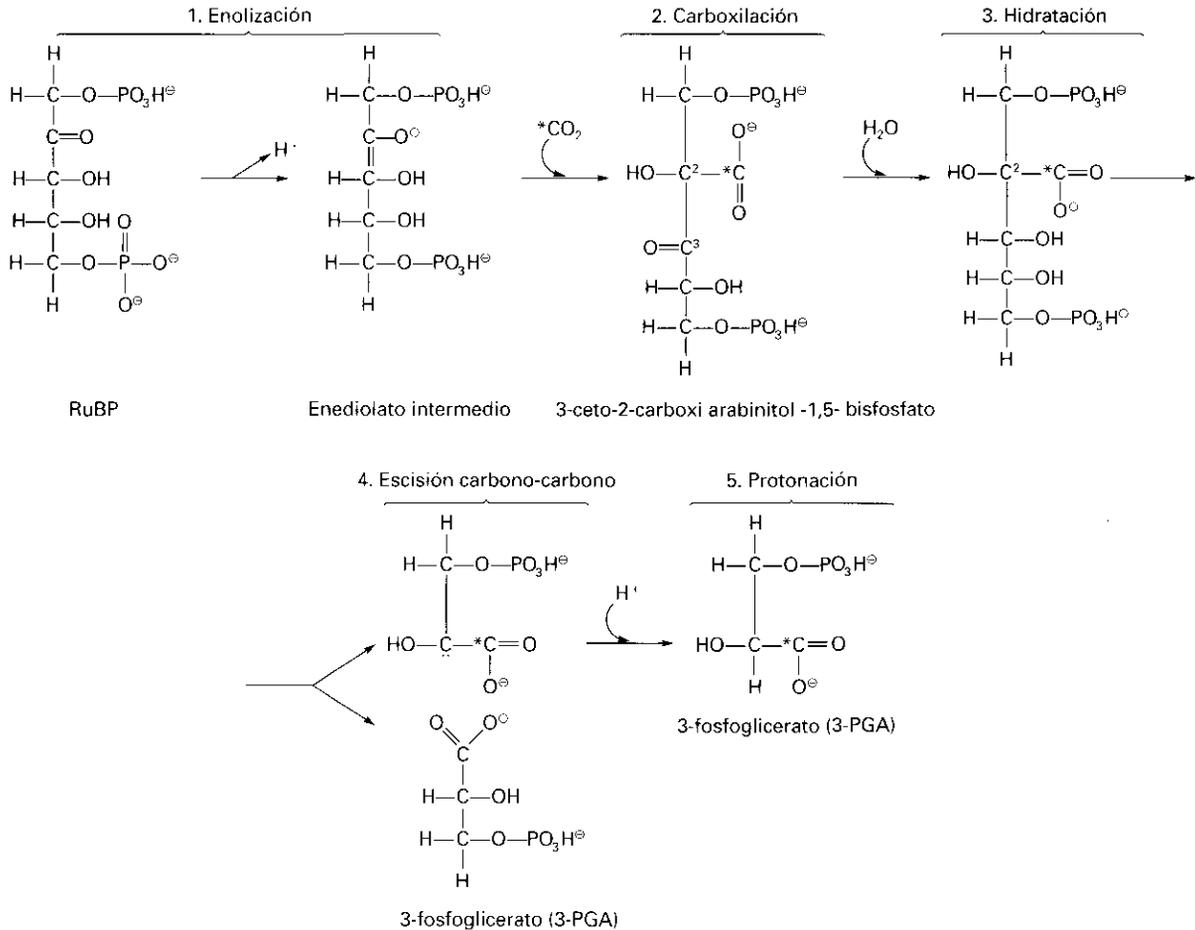


Figura 11-5. Detalle del CFRC. Fase de carboxilación de la RuBP, la cual se lleva a cabo por acción de una sola enzima, la rubisco (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

originadas es, entonces, reducida a gliceraldehído 3-fosfato (GAP) por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, que consume poder reductor en forma de NADPH (Fig. 11-6). De las seis moléculas formadas de GAP, una es derivada a la síntesis neta de carbohidratos, mientras las otras cinco participan en la regeneración de RuBP.

Las reacciones implicadas en la regeneración de RuBP son similares a las de la vía de las pentosas-fosfato, presente tanto en plantas como en animales (véase Capítulo 14). Sólo la última enzima implicada, la fosforribuloquinasa (Fig. 11-4), se encuentra exclusivamente en los cloroplastos. La fase de regeneración consta de una secuencia compleja de interconversiones entre moléculas de azúcar que tienen de tres a siete átomos de carbono. Para que pueda darse la regeneración es necesaria la interconversión de GAP en dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), compuesto similar al GAP salvo por que posee el grupo carbonilo en el interior de la molécula (acetona) en lugar de un extremo (aldehído) (Fig. 11-7). Una molécula de GAP se une con una de DHAP para originar una molécula de fructosa 1,6-bisfosfato (seis carbonos), en una reacción catalizada por la aldosa. La fructosa 1,6-bisfosfato pierde un grupo fosfato para originar fructosa 6-fosfato (Fig. 11-4) en una reac-

ción catalizada por la fructosa 1,6-bisfosfatasa. A continuación, la enzima transcetolasa cataliza una doble reacción. Por un lado, la escisión de la fructosa 6-fosfato en una molécula de eritrosa 4-fosfato (cuatro carbonos) y un complejo glicolaldehído (Fig. 11-7). Por otro, la combinación del complejo glicolaldehído con una molécula de GAP, para originar una molécula de xilulosa 5-fosfato (cinco carbonos) (Fig. 11-7). La xilulosa 5-fosfato es transformada en su epímero ribulosa 5-fosfato con intervención de una epimerasa. Por otra parte, la eritrosa 4-fosfato formada se combina mediante la acción de una aldolasa con una molécula de DHAP para originar una molécula de sedoheptulosa 1,7-bisfosfato (siete carbonos). Ésta se convierte en sedoheptulosa 7-fosfato al perder un grupo fosfato. En un paso catalizado por la transcetolasa, la sedoheptulosa 1,7-bisfosfato reacciona con la molécula de GAP que queda sin utilizar y se originan dos compuestos de cinco átomos de carbono: una molécula de xilulosa 5-fosfato, que se convierte en ribulosa 5-fosfato por acción de la epimerasa, y una molécula de ribosa 5-fosfato que, a su vez, se transforma también en ribulosa 5-fosfato en una reacción catalizada por una isomerasa (Fig. 11-7). De este modo, el conjunto de reacciones expuesto origina, a partir de 5 moléculas de GAP, tres moléculas de ribu-

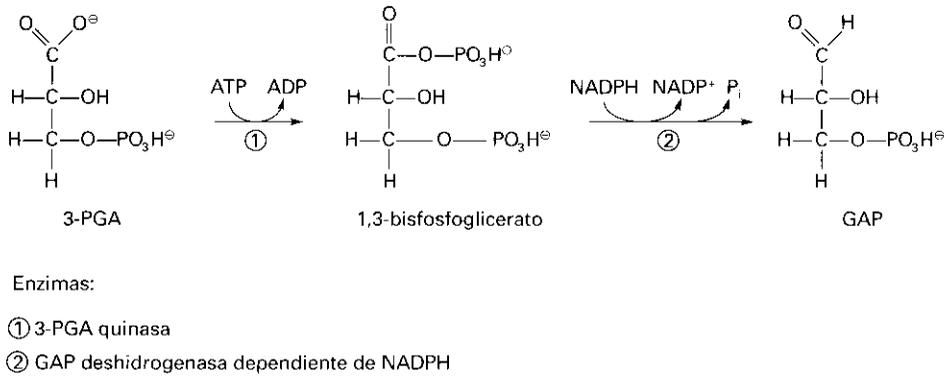
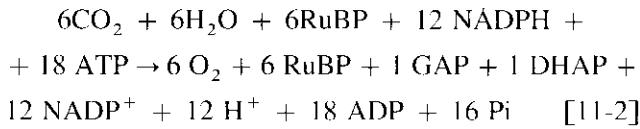


Figura 11-6. Detalle del CFRC. Fase de reducción del 3-fosfoglicerato (3-PGA) a gliceraldehído-3-P (GAP) (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

losa 5-fosfato. Estas tres moléculas son finalmente fosforiladas por la fosforribuloquinasa, con gasto de ATP, para regenerar las tres moléculas de RuBP, que pueden de este modo volver al comienzo del ciclo.

A partir de los ciclos descritos, la ecuación 11-1, que expresaba en síntesis la formación de carbohidratos a partir de CO₂ y H₂O en la fotosíntesis, puede concretarse con mayor detalle en la siguiente expresión:



2.3. La sacarosa y el almidón se sintetizan a partir de los compuestos obtenidos en el CFRC

Las triosas fosfato que se originan en el CFRC (ecuación 11-2) son utilizadas para la síntesis de sacarosa y almidón.

La síntesis de sacarosa y otros productos que son transportados por el floema (Capítulo 5) tiene lugar en el citosol. Ello tiene lugar mediante un mecanismo de intercambio de triosas-fosfato con fosfato inorgánico (Pi) procedente del citosol, a través de un transportador de la membrana interna del cloroplasto denominado **translocador de fosfato** (Fig. 11-8). En el citosol, una molécula de GAP se combina con una molécula de DHAP para originar una molécula de fructosa-1,6-bisfosfato en una reacción reversible (Fig. 11-9). A continuación, la fructosa-1,6-bisfosfato origina fructosa 6-fosfato en una reacción irreversible catalizada por fructosa bisfosfatasa.

Los siguientes pasos de la síntesis, con sus enzimas correspondientes, se resumen en la Figura 11-9. El paso de glucosa 1-fosfato a UDP-glucosa es el único que requiere aporte energético, en forma de UTP.

El exceso de triosa-fosfato que no se utiliza en la síntesis de sacarosa se convierte en almidón, que actúa de sustancia de reserva de carbono de manera similar a la

función del glucógeno en células de animales y hongos. La síntesis y el almacenamiento del almidón tienen lugar en el propio cloroplasto, donde se acumula durante el día para ser movilizado y exportado durante la noche. De esta manera, los cloroplastos pueden proporcionar carbono reducido al resto de la planta tanto de día como de noche. La síntesis de almidón es semejante a la de sacarosa (Fig. 11-9), y sólo difiere en los dos últimos pasos. La transformación de la glucosa 1-fosfato utiliza ATP en vez de UTP, originándose ADP-glucosa. Este paso, catalizado por la ADP glucosa-pirofosforilasa, es el más importante en la regulación de la síntesis de almidón. El último paso de la síntesis de almidón consiste en la unión de moléculas de glucosa para formar un polímero con dos tipos de cadena: la amilosa, una cadena lineal de moléculas de glucosa unidas entre sí por los carbonos 1 y 4; y la amilopectina, que forma cadenas de ramificación lateral mediante uniones entre los carbonos 1 y 6 de la glucosa (Fig. 11-10). El almacenamiento de carbono en forma de almidón permite mantener velocidades altas de fotosíntesis, aun cuando la síntesis de sacarosa sea más lenta.

2.4. El carbono fijado en la fotosíntesis se utiliza también para la síntesis de compuestos no glucídicos en el cloroplasto

Además de los carbohidratos, algunos aminoácidos, ácidos grasos e isoprenoides se sintetizan en el cloroplasto a partir del carbono fijado en la fotosíntesis.

Algunos de los aminoácidos denominados esenciales se sintetizan exclusivamente en los cloroplastos (Leucina, Isoleucina, Valina y Lisina). Asimismo, todos los ácidos grasos que se encuentran en los vegetales son sintetizados en los cloroplastos y otros plastos. Finalmente, otro grupo de sustancias, los isoprenoides, se sintetiza en los cloroplastos (véase Capítulo 17). Este último grupo de sustancias incluye algunas de interés esencial para la fotosíntesis, como los carotenos y xantofilas, y otras cuya función es desconocida, aunque se piensa que deben ser importantes, ya que la síntesis de

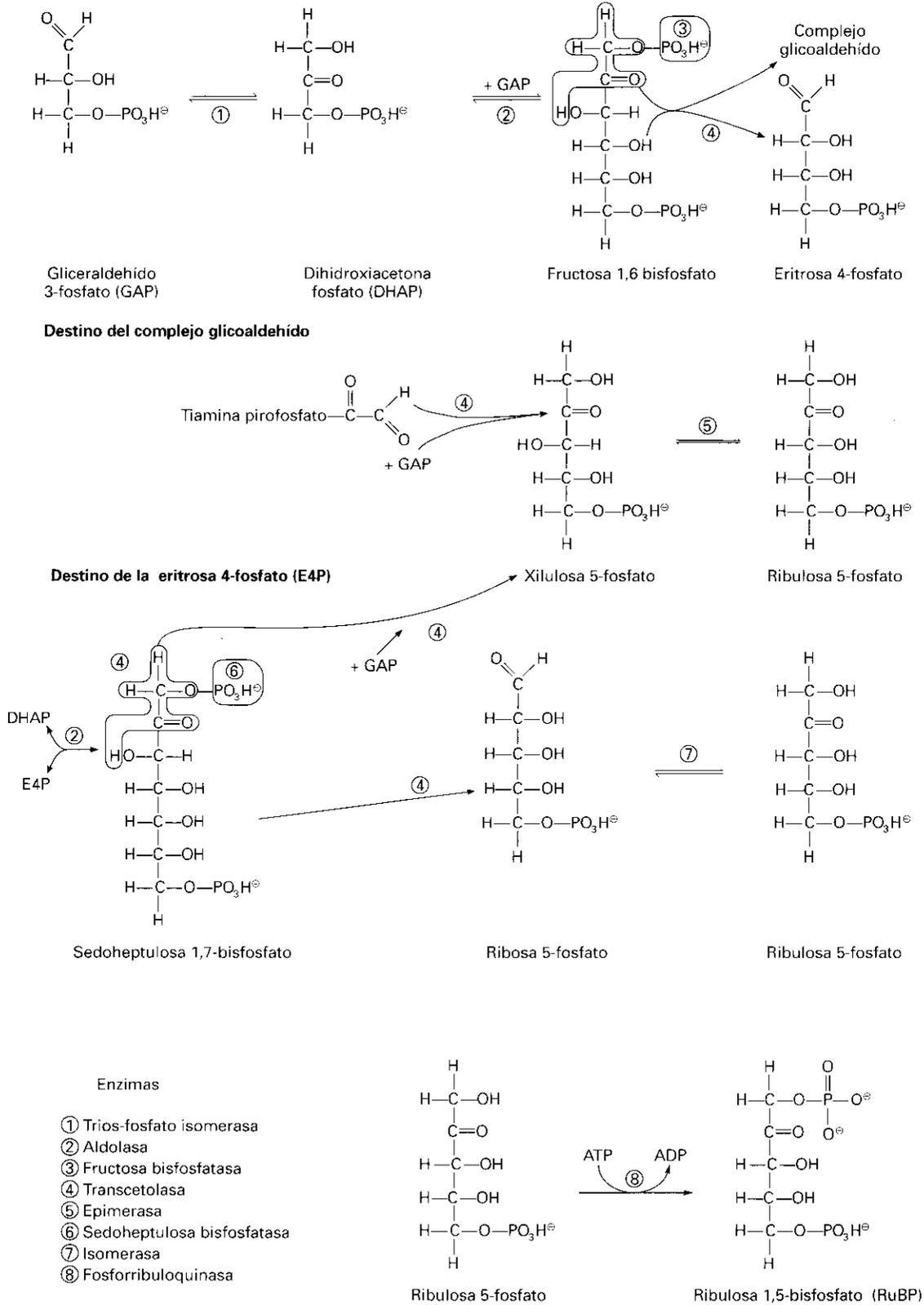


Figura 11-7. Detalle del CFRC. Fase de regeneración de RuBP a partir de GAP (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

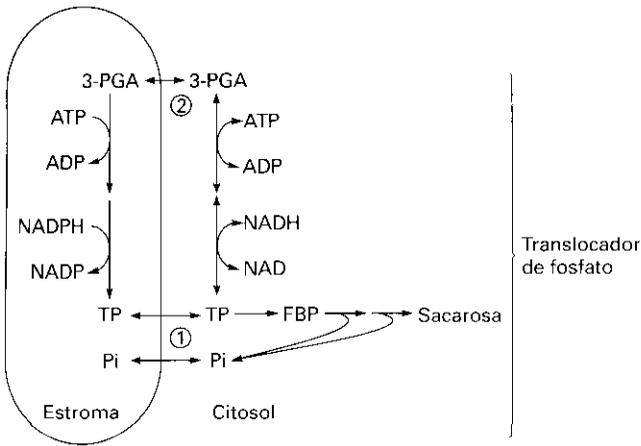


Figura 11-8. Esquema del funcionamiento del translocador de fosfato de los cloroplastos. Durante la fotosíntesis se produce triosa-fosfato (TP) en el interior del cloroplasto. Durante la síntesis de sacarosa en el citosol se origina fosfato libre (Pi). Por tanto, el principal intercambio de fosfatos tiene lugar entre TP del cloroplasto y Pi del citosol (1). Algunas TP pueden ser intercambiadas por 3-PGA del citosol (2) por el mismo transportador. Ello establece un ciclo en el que el 3-PGA es reducido en el estroma a TP, que sale al citosol donde se reoxida a 3-PGA. De esta manera, se puede exportar al citosol poder reductor (NADH) y ATP. Todos los movimientos que se producen a través de este translocador tienen lugar mediante un riguroso intercambio en direcciones opuestas, de forma que la cantidad total de fosfato (libre o ligado) en el interior de los cloroplastos no varía (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

cada unidad a partir de malonil-CoA requiere un gasto de energía y poder reductor igual al necesario para la fijación de una molécula de CO₂ y algunas plantas las acumulan y/o emiten en grandes cantidades. Reciente-

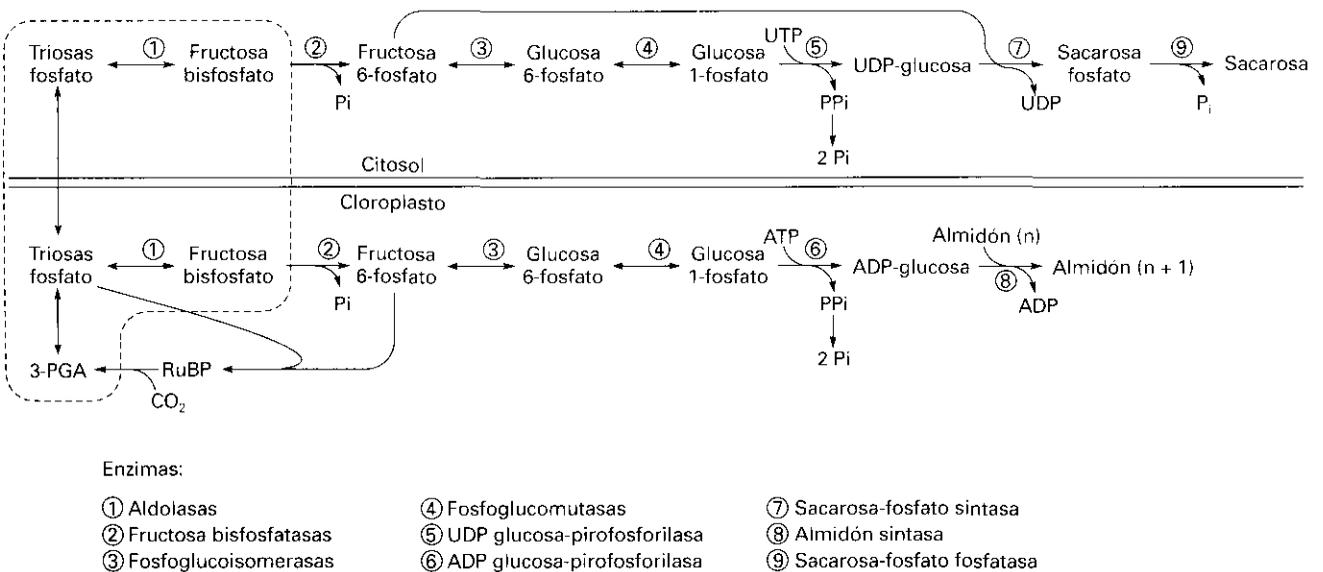
mente se ha podido demostrar que el carbono utilizado para la síntesis de isoprenoides es carbono recién asimilado en la fotosíntesis. Otros isoprenoides cumplen funciones hormonales importantes, como el ácido abscísico, las giberelinas o los esteroides.

3. REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DEL CO₂

3.1. La regulación de la rubisco condiciona la asimilación de CO₂

La rubisco constituye alrededor del 50% de la proteína soluble de las hojas de las plantas y, de hecho, se considera la proteína más abundante en la naturaleza. Se trata de una proteína de peso molecular (PM) 550 000 Da, compuesta por ocho subunidades de PM 55 000 Da y ocho de PM 14 000 Da. Cada subunidad grande (PM 55 000 Da) contiene un centro activo, de modo que existen ocho centros activos por molécula de rubisco. Esta estructura corresponde a eucariotas y algunos procariontes. Sin embargo, en organismos más primitivos existen otras estructuras menos complejas. Así, muchas bacterias poseen una rubisco constituida por sólo 4 subunidades grandes y 4 pequeñas, lo que significa disponer de sólo 4 centros activos. En *Rhodospirillum rubrum* la estructura se simplifica a dos subunidades grandes y dos pequeñas con un total de dos centros activos.

Estas variaciones en cuanto a la complejidad se corresponden en general con variaciones en la eficiencia. Como ya se ha dicho, la rubisco cataliza no sólo la carboxilación de la RuBP, sino también su oxigenación.



Enzimas:

- | | | |
|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| ① Aldolasas | ④ Fosfoglucomutasas | ⑦ Sacarosa-fosfato sintasa |
| ② Fructosa bisfosfatasa | ⑤ UDP glucosa-pirofosforilasa | ⑧ Almidón sintasa |
| ③ Fosfoglucoisomerasas | ⑥ ADP glucosa-pirofosforilasa | ⑨ Sacarosa-fosfato fosfatasa |

Figura 11-9. Esquema de la síntesis de sacarosa y almidón en el citosol y el cloroplasto, respectivamente. Los compuestos que están dentro de la línea de puntos, forman un acervo («pool») común, ya que éstos están conectados por reacciones reversibles (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

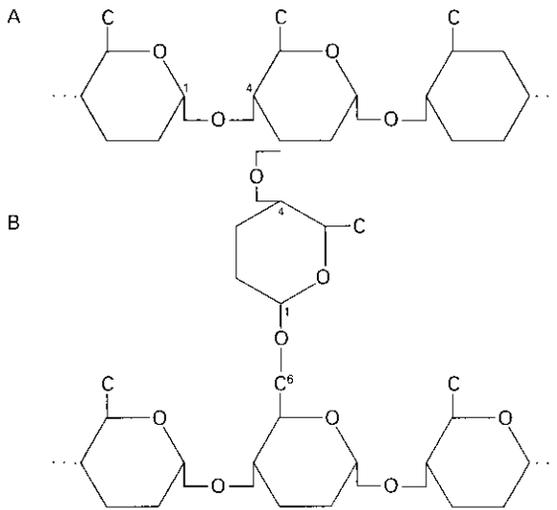


Figura 11-10. El almidón se compone de amilosa y de amilopectina. Las unidades de glucosa están unidas mediante configuración α (α se refiere a la estereoquímica de la forma) entre los carbonos 1 y 4 (1 y 6 en las ramificaciones). a) Enlaces α -1,4 de moléculas de glucosa en la amilosa. b) La amilopectina se ramifica como resultado de enlaces α -1,6 (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

En este sentido, se considera una enzima de baja eficiencia. Sin embargo, las enzimas con 8 sitios activos muestran una afinidad por el CO_2 (factor específico) 90 ó 100 veces superior a la afinidad por el O_2 mientras que en la rubisco de *Rhodospirillum* esta afinidad es solamente 10 veces superior. En general, se considera que las formas de rubisco más elementales y de menor especificidad se corresponden con las formas de vida más arcaicas y, por tanto, formadas en atmósferas extraordinariamente ricas en CO_2 y pobres en O_2 respecto a las actuales.

Siempre que no haya limitaciones en la disponibilidad de luz o energía procedente de la cadena de transporte electrónico (Capítulo 10), la velocidad de captura del CO_2 durante la fotosíntesis para someterse a la acción de la rubisco suele venir determinada por alguno de los siguientes factores:

1. La disponibilidad de CO_2 en los centros activos y la ratio de concentraciones CO_2/O_2 .
2. El aporte de RuBP.
3. La cantidad de rubisco presente.
4. El estado de activación de la rubisco.

En condiciones óptimas, la disponibilidad de CO_2 no resulta un factor limitante para la fotosíntesis y, aunque la ratio CO_2/O_2 es siempre baja (ya que la concentración de O_2 en la atmósfera es del 21 %, mientras que la de CO_2 es de tan solo 0.035-0.036 %) la mayor afinidad de la rubisco por el CO_2 (constante de Michaelis-Menten, $K_M = 12 \mu\text{M}$) frente al O_2 ($K_M = 250 \mu\text{M}$) hace que la concentración de CO_2 sea suficiente para permitir la carboxilación. Sin embargo, en condiciones en las que produce el cierre de los estomas (por ejemplo, en condiciones de sequía, Capítulos 4 y 30) la concentra-

ción de CO_2 en el sitio de la carboxilación puede disminuir considerablemente, y por tanto, disminuye la ratio CO_2/O_2 , de modo que la velocidad de la fotosíntesis se ve limitada por este factor.

Dado que tanto el CO_2 como la RuBP actúan de sustratos de la rubisco, el exceso de uno de los sustratos no puede compensar la deficiencia del otro. O, lo que es lo mismo, para una determinada concentración y grado de activación de la rubisco, la disponibilidad de uno de los dos sustratos resultará limitante de la velocidad fotosintética. Ya se ha visto la limitación en condiciones de baja disponibilidad de CO_2 . Ahora bien, si la velocidad de carboxilación es superior a la velocidad de regeneración de la RuBP, llegará un momento en que la asimilación de CO_2 se verá limitada por la falta de RuBP disponible. Modificando la presión parcial de CO_2 en el aire que envuelve una hoja y eliminando el O_2 para suprimir la oxigenación de la RuBP, puede diferenciarse si el factor que limita la fotosíntesis es la disponibilidad de CO_2 o la disponibilidad de RuBP (Fig. 11-11). A bajas presiones parciales de CO_2 , al ir incrementando la concentración, aumenta linealmente la velocidad de asimilación. Esta situación se conoce como fotosíntesis limitada por rubisco o por disponibilidad de CO_2 . Sin embargo, a partir de una determinada presión parcial de CO_2 , la velocidad de asimilación de CO_2 no aumenta por más que se incremente su concentración. Esta situación indica falta de disponibilidad del otro sustrato de la reacción, la RuBP, y se conoce como fotosíntesis limitada por regeneración de RuBP. En las concentraciones actuales de CO_2 en la atmósfera (alrededor de 0.036 %) el factor limitante suele ser la disponibilidad de CO_2 , aún en condiciones de completa apertura estomática. Sin embargo, en determinadas condiciones de estrés o en microhábitat con elevadas concentraciones de CO_2 , la fotosíntesis podría estar limitada por la regeneración de RuBP (véase también el Capítulo 13).

La cantidad de rubisco presente en los cloroplastos no es un factor limitante en condiciones normales. Sin embargo, en condiciones de estrés que limiten la síntesis proteica, bien por falta de componentes esenciales

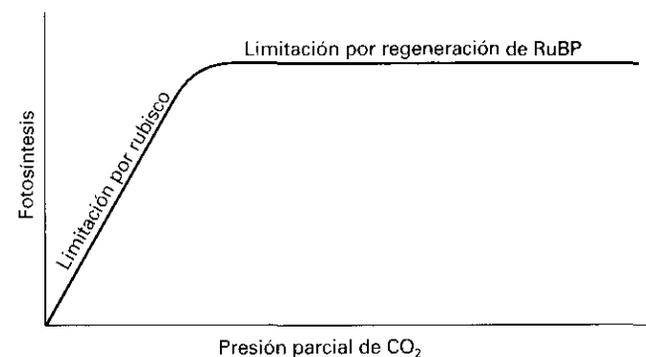


Figura 11-11. Respuesta de la fotosíntesis a la presión parcial de CO_2 en el aire, cuando se elimina el O_2 para impedir la fotorrespiración. (Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993.)

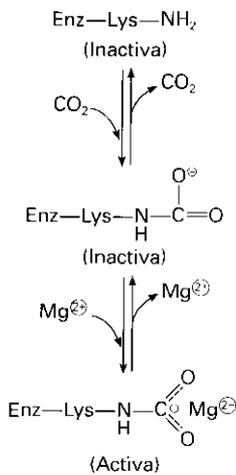


Figura 11-12. Activación de la rubisco con intervención de CO₂ y magnesio.

(p. ej., en condiciones deficitarias de nitrógeno), bien por inhibición de la transcripción o traducción genéticas (p. ej., en condiciones de sequía prolongada), este factor puede limitar fuertemente las tasas de fotosíntesis.

Los mecanismos de activación de la rubisco tras su síntesis son complejos, e incluyen diversos factores. En primer lugar, tras su traducción, la rubisco debe ser modificada para poder catalizar la carboxilación. Esta transformación depende de CO₂ y pérdida de dos protones en una lisina específica de la estructura proteica de la rubisco, lo que origina la formación de un carbamato. Este CO₂ actúa como activador y es distinto del CO₂ sustrato que posteriormente se ligará a la RuBP. A la carga negativa del carbamato debe unirse Mg²⁺ para finalizar la activación de la rubisco (Fig. 11-12). Para que pueda darse esta carbamilación son necesarias elevadas concentraciones de CO₂ y Mg²⁺, así como un pH elevado. Estas condiciones se producen, precisamente, en presencia de luz, ya que la iluminación de los cloroplastos hace que los protones sean translocados al interior del lumen tilacoidal, originando un incremento del pH en el estroma (Capítulo 10). También la concentración de Mg²⁺ aumenta en el estroma. En este sentido, la luz es indispensable para la activación de la rubisco. Parece ser, sin embargo, que estos cambios no son suficientes para obtener los altos niveles de carbamilación que se observan en las hojas. De hecho, esto sería suficiente para que la rubisco estuviera carbamilada en sólo un 30 %, que es el grado de carbamilación que se obtiene con extractos de rubisco en un tubo de ensayo. Se piensa que la rubisco puede estar carbamilada al 100 % en las hojas, lo cual requeriría la actividad de la rubisco activasa, una proteína reguladora cuyo mecanismo aún está por dilucidar. Además, algunas plantas acumulan sustancias inhibitoras de la actividad de la rubisco durante la noche, como el carboxiarabinitol 1-fosfato. La propia RuBP podría actuar como modulador de la activación de la rubisco, además de como sustrato de la

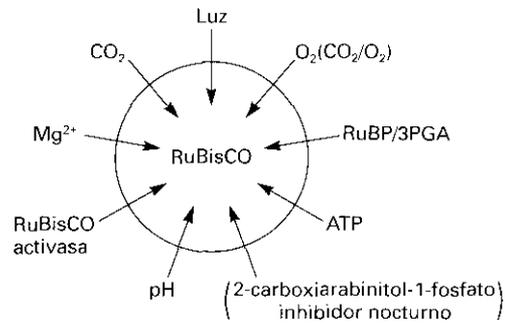


Figura 11-13. Factores que intervienen en la regulación de la actividad de la rubisco.

misma. El funcionamiento de éstas y otras sustancias *in vivo*, sin embargo, está menos documentado. El papel clave de la rubisco en la fotosíntesis se refleja por la diversidad de elementos que intervienen en su regulación, que se resumen en la Figura 11-13.

3.2. Otros factores regulan la actividad del CFRC

Además de los mecanismos reguladores de la rubisco y de la disponibilidad de sustratos (CO₂ y RuBP) para su actividad carboxilasa, la regulación de otras enzimas del CFRC es también esencial para la coordinación del ciclo completo y la tasa fotosintética. Las enzimas que catalizan reacciones irreversibles (como las bisfosfatasa) o las que catalizan reacciones que requieren ATP o NADPH son, generalmente, las que están sometidas a un fuerte control regulador. Se conocen fundamentalmente tres tipos de mecanismos reguladores de enzimas de CFRC:

1. Regulación por reducción de grupos tiol.
2. Activación por variaciones de pH y concentración de magnesio.
3. Modulación por cambios en la concentración de sustrato.

La regulación por reducción de grupos tiol se basa en la existencia de puentes disulfuro entre residuos de cisteína de la estructura de la enzima. El estado oxidado de estos puentes disulfuro determina una cierta configuración de la estructura proteica. La reducción de los mismos puede originar cambios conformacionales en la enzima que originan su activación. Los electrones necesarios para la reducción de la cisteína proceden de la cadena de transporte electrónico, y son cedidos de la ferredoxina a una proteína específica que contiene azufre, la **tiorredoxina**, la cual los transfiere a las enzimas del estroma (Fig. 11-14). De esta manera, puede decirse que estas enzimas son «activadas por luz», y este mecanismo constituye una segunda vía de enlace entre las reacciones de la cadena de transporte electrónico (fase «luminosa» de la fotosíntesis) y el CFRC (fase «oscura»), siendo el primer nexo la producción de ATP y NADPH en la ca-

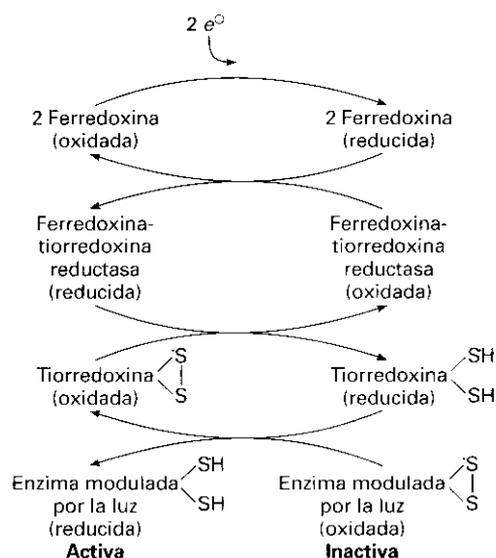


Figura 11-14. Esquema general de activación por la luz mediante reducción de puentes disulfuro de enzimas del CFRC.

dena de transporte electrónico para su consumo en el CFRC. Esta regulación no permite un control variable de la actividad enzimática, sino que actúa como un sistema de activación-desactivación. Las enzimas del CFRC que se regulan por este sistema son la gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa, la fructosa-1,6-bisfosfatasa, la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa y la fosforribulokinasa.

La activación por variaciones de pH y concentración de magnesio se ha explicado ya como mecanismo de activación de la rubisco (apartado 3.1). Otras enzimas del CFRC que comparten este mecanismo de activación son la fructosa-1,6-bisfosfatasa y la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa. Al igual que la activación por reducción de grupos tiol, este mecanismo permite la activación de las enzimas durante el día y su desactivación durante la noche, más que un control variable de su actividad. Este mecanismo constituye también otra vía de acoplamiento entre la cadena de transporte electrónico y el CFRC.

La modulación por cambios en la concentración de sustrato, al contrario que los dos mecanismos anteriores, conduce al control variable de las actividades enzimáticas. En las enzimas del CFRC es rara la regulación por variaciones en la concentración del propio sustrato. De hecho, a excepción del PGA y la RuBP, se observan variaciones muy pequeñas en las concentraciones de los metabolitos que actúan como sustratos de las distintas reacciones del CFRC en las hojas. Sin embargo, se ha observado un control de la actividad enzimática por acción de un sustrato que actúa en un lugar diferente al sitio activo de la enzima (control alostérico). Así, la fructosa-1,6-bisfosfato sensibiliza a la fructosa-1,6-bisfosfatasa a su activación por tiorredoxina. Esto permite que la actividad de la enzima pueda responder a muy pequeñas variaciones en la concentración de su sustra-

to. Un mecanismo de control diferente es el de la fosforribulokinasa, la cual es sensible al PGA, de tal modo que si la concentración de PGA aumenta, la actividad de la fosforribulokinasa disminuye. Este mecanismo ayuda a mantener constante la relación entre la producción de PGA que depende de la actividad de la rubisco, y la reducción de PGA que depende de la velocidad con que se sintetiza NADPH y ATP por mediación de la cadena de transporte electrónico.

3.3. La síntesis y exportación de fotoasimilados está sujeta a diferentes tipos de regulación

El primer paso de la síntesis de sacarosa que está fuertemente regulado es el que cataliza la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Al contrario que la isoenzima del estroma, regulada por grupos tiol (apartado 3.2), la fructosa bisfosfatasa citosólica está regulada por fructosa-2,6-bisfosfato, un isómero del sustrato fructosa-1,6-bisfosfato. Cuando esta sustancia está presente, la actividad de la enzima es baja, y cuando está ausente, la actividad aumenta. La concentración de fructosa-2,6-bisfosfato aumenta cuando la velocidad de la fotosíntesis es baja. De esta manera se logra que a bajas velocidades de fijación de carbono la actividad de la fructosa bisfosfatasa citosólica sea baja, evitándose así un drenaje inútil de carbono desde el cloroplasto. La actividad de esta fructosa bisfosfatasa controla la velocidad a la que el carbono fijado en la fotosíntesis se destina a la formación de sacarosa.

La enzima más importante en la regulación de la síntesis de sacarosa es la sacarosa-fosfato sintasa, que cataliza el paso de UDP-glucosa a sacarosa-fosfato (Fig. 11-9). Esta enzima se regula a través de la fosforilación de aminoácidos específicos, además de por la concentración de metabolitos diferentes de sus propios sustratos. Estos metabolitos son el fosfato inorgánico y la glucosa 6-fosfato. Cuando la velocidad de la fotosíntesis se incrementa, aumenta la síntesis de glucosa 6-fosfato y disminuye la concentración de fosfato inorgánico en el citosol. Ambos factores estimulan la actividad de la sacarosa-fosfato sintasa, de manera que la síntesis de sacarosa equilibra su velocidad con la velocidad de fijación del carbono.

La regulación de la síntesis de almidón es similar a la de la síntesis de sacarosa. Sin embargo, el paso más importante de la regulación es el que implica la conversión de glucosa 1-P a ADP-glucosa. La ADP glucosapirofosforilasa es estimulada por PGA e inhibida por fosfato inorgánico. Al incrementar la asimilación fotosintética, aumenta la concentración de PGA a expensas del fosfato, de modo que se incrementa la actividad de la enzima.

3.4. La tasa de fotosíntesis también está regulada por el uso y transporte de asimilados

La capacidad de la planta para usar los productos de la fotosíntesis es limitada y puede reducir las tasas de asimilación de CO_2 en las hojas. Este efecto fue observado al alargar extremadamente el período de iluminación en plantas en condiciones ideales de cultivo (saturación de luz y CO_2), de manera que tienen lugar elevadas tasas de fotosíntesis, cercanas a la máxima capacidad de la hoja, las cuales disminuyen con el tiempo cuando, por alguna razón, la capacidad de utilización de los fotoasimilados está reducida, esto es, cuando la producción de triosas-fosfato en el cloroplasto excede la capacidad de utilizar sacarosa y almidón.

La síntesis de sacarosa y almidón son procesos dependientes de las concentraciones de CO_2 y O_2 , a través de los efectos de estos gases en la rubisco y, por tanto, en la producción posterior de triosas-fosfato (véanse apartados 2.2, 3.1 y Capítulo 12). Sin embargo, los procesos de la utilización de sacarosa y almidón no dependen de CO_2 y O_2 y la limitación de la fotosíntesis por exceso de triosas-fosfato se detecta porque la tasa de fotosíntesis no aumenta al elevar la concentración de CO_2 o reducir la de O_2 .

La tasa de síntesis de sacarosa y almidón determina la rapidez del ciclo de fosfato inorgánico. La síntesis de sacarosa en el citoplasma libera fosfato inorgánico, que vuelve al cloroplasto (véase apartado 2.3). En muchas plantas, la capacidad de síntesis de almidón es muy inferior a la capacidad fotosintética por lo que en condiciones de elevada iluminación y alta concentración de CO_2 , la tasa de fotosíntesis está fuertemente determinada por la capacidad de síntesis de sacarosa y la consecuente regeneración del fosfato inorgánico necesario dentro del cloroplasto para la síntesis de ATP.

Esta regulación explica también la frecuente observación de tasas de fotosíntesis más elevadas en las hojas cercanas a los frutos (sumideros de fotoasimilados), y el efecto negativo de la escisión de los sumideros (frutos, tubérculos, etc.) sobre las tasas de fotosíntesis (véase Capítulo 5). La manipulación de las plantas para incrementar la utilización de los asimilados puede aumentar la tasa de fotosíntesis de las hojas. En la mejora genética clásica, la selección por tamaño y calidad del fruto ha producido plantas en las que la utilización de asimilados es más intensa (véase Capítulo 5).

Recientemente, se ha conseguido manipular genéticamente la expresión de la enzima sacarosa-fosfato sintasa (SPS), enzima clave en la síntesis de sacarosa (véanse apartados 2.3, 3.3 y Fig. 11-9) consiguiéndose plantas transgénicas de tomate que sobreexpresaban genes de SPS procedentes de maíz. Estas plantas, en condiciones de elevada iluminación y alta concentración de CO_2 mostraron incrementos significativos de sus tasas de fotosíntesis respecto a las plantas nativas. La capaci-

dad de transferir, mediante ingeniería genética, mayor capacidad de utilización de los productos de la fotosíntesis parece una de las vías más prometedoras para incrementar la fotosíntesis y, en consecuencia, la producción de los cultivos, máxime en una atmósfera que incrementa progresivamente su concentración de CO_2 (véase Capítulo 13).

RESUMEN

La asimilación fotosintética del CO_2 es el primer paso en la producción de nueva biomasa y, por tanto, tiene una importancia clave para el mantenimiento de la biosfera. Los primeros productos de la asimilación del CO_2 son triosas-fosfato que, posteriormente, pasan a ser moléculas de azúcares sencillos (glucosa, fructosa) o más complejos (sacarosa y almidón).

El conocimiento de los primeros pasos en la asimilación del CO_2 mediante ^{14}C permitió identificar el primer aceptor para el CO_2 (ribulosa-1,5-bisfosfato, RuBP) y el primer producto de su asimilación 3-(fosfoglicerato). El descubrimiento del ciclo fotosintético de reducción del C (CFRC) permite distinguir 3 fases diferenciadas: fijación del CO_2 o carboxilación, reducción a hidratos de carbono y regeneración de la RuBP. A partir de gliceraldehído 3-P y dihidroxiacetona-P (triosas-fosfato), se inicia la formación de glucosa, fructosa y, posteriormente, almidón y sacarosa.

Existen diferentes mecanismos de regulación de la actividad carboxilasa de la rubisco, que incluyen la activación por luz, presión parcial de CO_2 y otros. Las otras enzimas del CFRC y la formación de los distintos fotoasimilados presentan también interesantes mecanismos de regulación.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Combinando los conocimientos adquiridos en el presente capítulo y en el anterior, calcule cuántos fotones deben ser capturados como mínimo por la planta, para poder sintetizar una molécula de hexosa en condiciones ideales.
2. Como se puede ver en la Figura 11-3, la concentración de RuBP y PGA marcados con ^{14}C en *Chlorella* cambian sus niveles al pasar de luz a oscuridad. Esta figura, ¿es una prueba suficiente de que la RuBP es el aceptor del ^{14}C ? ¿Sugiere esta figura que el PGA se forma a partir de la RuBP?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Azcón-Bieto, J. Talón, M. (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, 1993.
2. Buchanan, B. B.: «Role of light in the regulation of chloroplast enzymes». *Annu Rev Plant Physiol*, 31: 341-374, 1980.

3. Calvin, M., Bassham, J. A.: *The Photosynthesis of Carbon Compounds*. Benjamin, Nueva York, 1962.
4. Foyer, C. H. (ed.): *Fotosíntesis*. Compañía Editorial Continental, S. A., México, 1987.
5. Lawlor, D. W. (ed.): *Photosynthesis. Molecular, Physiological and Environmental Processes*, 2.^a ed. Longman Scientific & Technical, Hong-Kong, 1993.
6. Portis, A. R. J.: «Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43: 415-437, 1992.
7. Rawn, J. D. (ed.): *Bioquímica*. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, 1989.
8. Somerville, C.R., Somerville, S. C.: «La fotosíntesis de las plantas». *Mundo Científico*, 4: 612-623, 1984.
9. Stitt, M.: «Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 41: 153-185, 1990.
10. Woodrow, I. E., Berry, J. A.: «Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants». *Annu Rev Plant Physiol*, 39: 533-594, 1988.

FOTORRESPIRACIÓN Y MECANISMOS DE CONCENTRACIÓN DEL DIÓXIDO DE CARBONO

Hipólito Medrano y Jaime Flexas

1. Introducción. 2. Fotorrespiración. 3. Mecanismo fotosintético C_4 . 4. Metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). 5. Otros mecanismos de concentración de CO_2 . 6. Discriminación isotópica de los diversos mecanismos de fijación fotosintética del carbono. 7. Las diferentes vías de asimilación del carbono en un contexto evolutivo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las plantas presentan un tipo de respiración dependiente de la luz: la fotorrespiración

La asimilación del CO_2 en la fotosíntesis se realiza básicamente conforme a las rutas bioquímicas explicadas en el capítulo anterior. Junto a estas rutas, sin embargo, se han descubierto posteriormente procesos bioquímicos y modificaciones morfológicas que cambian sustancialmente la efectividad del ciclo fotosintético de reducción del carbono (CFRC) y que suponen importantes variaciones que afectan a la eficiencia energética de las plantas. Así, comentaremos en este capítulo los detalles más relevantes de la fotorrespiración, así como de diferentes modificaciones anatómicas y vías metabólicas que consiguen aumentar la concentración del CO_2 en el entorno de la rubisco.

Los primeros descubrimientos en relación con la fotorrespiración se remontan a los trabajos de Warburg hacia 1920 en *Chlorella*, investigando el efecto inhibitorio del oxígeno a elevadas concentraciones sobre la fotosíntesis. Por otra parte, los estudios sobre el metabolismo del glicolato demostraron que su formación se inhibía a altas concentraciones de CO_2 , y que constituía un metabolito importante de la respiración en condiciones de iluminación. Posteriormente, se descubrió que, en el locus activo de la rubisco, la RuBP puede unirse al O_2 en lugar de al CO_2 para producir P-glicolato, el precursor del glicolato. Este descubrimiento permitió integrar los efectos de las altas concentraciones de O_2 sobre la fotosíntesis, la implicación del glicolato y la relación íntima de la fotorrespiración con el CFRC. En conjunto, la fotorrespiración supone una reducción de la eficiencia de la fotosíntesis y, de hecho, durante unos años se

invertieron grandes esfuerzos en seleccionar plantas con muy baja fotorrespiración como vía para incrementar la producción de los cultivos, con muy escaso éxito. La función fisiológica de este proceso no está totalmente clarificada, aunque se están acumulando evidencias sobre su importancia como vía de disipación de la energía (consume poder reductor y ATP acumulados), lo cual puede ayudar a mantener activo el aparato fotosintético en condiciones de alta iluminación y bajo suministro de CO_2 . La importancia de este proceso en los distintos tipos de plantas es desigual y depende, en buena parte, de las condiciones de crecimiento.

1.2. Existen diferentes mecanismos de asimilación del dióxido de carbono

En diferentes familias (unas 17) de plantas superiores y en unas 3000 especies, se ha desarrollado un mecanismo de acumulación del CO_2 alrededor de la rubisco en el mesófilo que aumenta la eficiencia de la fotosíntesis, sobre todo en climas secos y cálidos. En los años cincuenta estudiando la fotosíntesis en la caña de azúcar, se observó que los primeros productos marcados con ^{14}C no eran el 3-PGA ni el GAP (véase Capítulo 11), sino los ácidos málico y aspártico (moléculas de 4 átomos de carbono). Al prolongar la incubación con ^{14}C aparecía marcado el 3-PGA. En los años sesenta, Hatch y Slack acumularon nuevas pruebas y describieron la existencia de esta vía de asimilación del carbono en caña de azúcar y en otras plantas, que se denominaron plantas C_4 , en contraposición con las que presentan el 3-PGA como primer compuesto marcado con ^{14}C , que pasaron a llamarse plantas C_3 . Las modificaciones bioquímicas que presentan estas plantas se asocian a cambios morfológicos que permiten aislar, por una parte,

los nuevos mecanismos de fijación de CO₂ en el mesófilo y, por otra, la definitiva asimilación del CO₂ por la rubisco. El resultado es una tasa de fotosíntesis muy superior a la de las plantas C₃, sobre todo para conductancias estomáticas bajas, y una mayor eficiencia en el uso del agua (véanse Capítulos 3, 4 y 13).

Otra modificación importante del CFRC es la que se encuentra en muchas especies de plantas suculentas, de hojas carnosas. Esta modificación también supone una concentración del CO₂ en el entorno de la rubisco y fue descubierta en plantas de la familia de las crasuláceas, que se denominaron plantas CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*). En estas plantas, en general de zonas áridas, los estomas permanecen cerrados durante el día (con el consiguiente ahorro de agua) y se abren por la noche. Así, el primer producto de la fotosíntesis es también un compuesto de cuatro carbonos, pero la asimilación de CO₂ tiene lugar por la noche, merced al poder reductor que se ha ido acumulando durante el día.

En plantas que viven bajo el agua existen igualmente mecanismos de absorción y concentración del CO₂ en el mesófilo que implican gasto energético. En medios acuáticos, la difusión del CO₂ es 10 000 veces más lenta que en el aire, lo que justifica la ventaja ecológica y evolutiva de desarrollar estos mecanismos de concentración.

En conjunto, el proceso de asimilación del CO₂ presenta variaciones que podemos relacionar con el problema general del abastecimiento de CO₂ en el entorno de la rubisco. En este sentido, la adquisición de mecanismos de concentración de CO₂ en los vegetales supone siempre una reducción de la fotorrespiración, pero también una mejora de la capacidad de adaptación a ambientes áridos y cálidos, con las consiguientes ventajas evolutivas.

2. FOTORRESPIRACIÓN

2.1. En el lugar activo de la rubisco, la RuBP puede reaccionar con O₂ en lugar de con CO₂ y se inicia el proceso de fotorrespiración

La actividad carboxilasa de la rubisco implica la unión de la enzima con la RuBP en los *loci* activos, la forma-

ción de un compuesto intermediario tras la aceptación del CO₂ (sustrato) y la liberación de dos moléculas de 3-PGA. Sin embargo, al igual que el CO₂, el O₂ puede reaccionar con la RuBP para producir fosfoglicolato a partir de los carbonos 1 y 2, y 3-PGA a partir de los carbonos restantes (Fig. 12-1). El O₂ y el CO₂ **compiten** por los *loci* activos de la rubisco, es decir, el O₂ se comporta como inhibidor competitivo del CO₂.

La capacidad de catalizar tanto la carboxilación como la oxigenación de la RuBP es una propiedad de la rubisco actual, incluso, en bacterias autótrofas anaeróbicas. La carboxilación, medida *in vitro* a similares concentraciones de O₂ y CO₂, es unas 80 veces más rápida que la oxigenación. Sin embargo, en una solución acuosa a 25 °C, la ratio CO₂/O₂ es de 0.0416. En consecuencia, en condiciones atmosféricas normales, la rubisco actúa como oxigenasa entre un 25 y un 30 % de las veces. Esta actividad oxigenasa de la rubisco es el comienzo de un proceso llamado fotorrespiración, que tiene lugar en una serie de reacciones llamada ciclo C₂ o ciclo fotorrespiratorio.

El fosfoglicolato formado en el cloroplasto por oxigenación de la RuBP es rápidamente hidrolizado a glicolato por una fosfatasa específica (Fig. 12-2). El metabolismo del glicolato implica la participación de dos orgánulos más, los peroxisomas o microcuerpos y las mitocondrias. Mediante un transportador específico, el glicolato sale del cloroplasto y difunde hacia el peroxisoma. El peroxisoma contiene grandes cantidades de catalasa, enzima que cataliza la conversión peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a H₂O + 1/2 O₂. En el peroxisoma, el glicolato es oxidado a glioxilato generándose H₂O₂ que, mediante las catalasas, se transformará en H₂O. El glioxilato sufre una transaminación en la que el donador es probablemente glutamato y el producto, la glicina. Este aminoácido deja el peroxisoma y entra en la mitocondria donde el complejo glicina descarboxilasa descompone una molécula de glicina liberando amoníaco y CO₂ y dejando libre el otro carbono de la glicina que se une a un transportador especial de carbono (tetrahidrofolato), que dona este carbono a una segunda glicina para formar serina. Tanto la glicina como la serina pueden utilizarse para formar proteínas, pero en su mayor parte, serán metabolizadas para formar 3-PGA. El amonio liberado se vuelve a fijar a través del ciclo de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS/GOGAT)

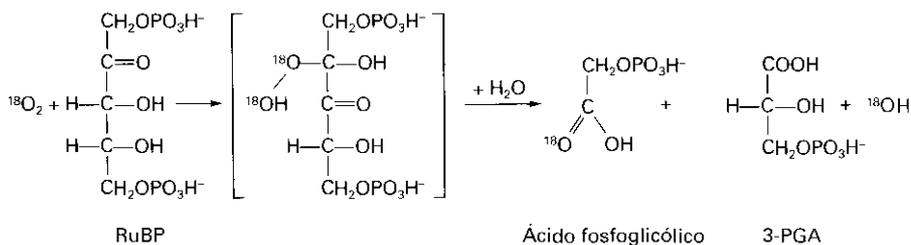


Figura 12-1. Actividad oxigenasa de la rubisco. El oxígeno reacciona con la RuBP formando un compuesto inestable que se escinde en ácido fosfoglicólico y 3-PGA.

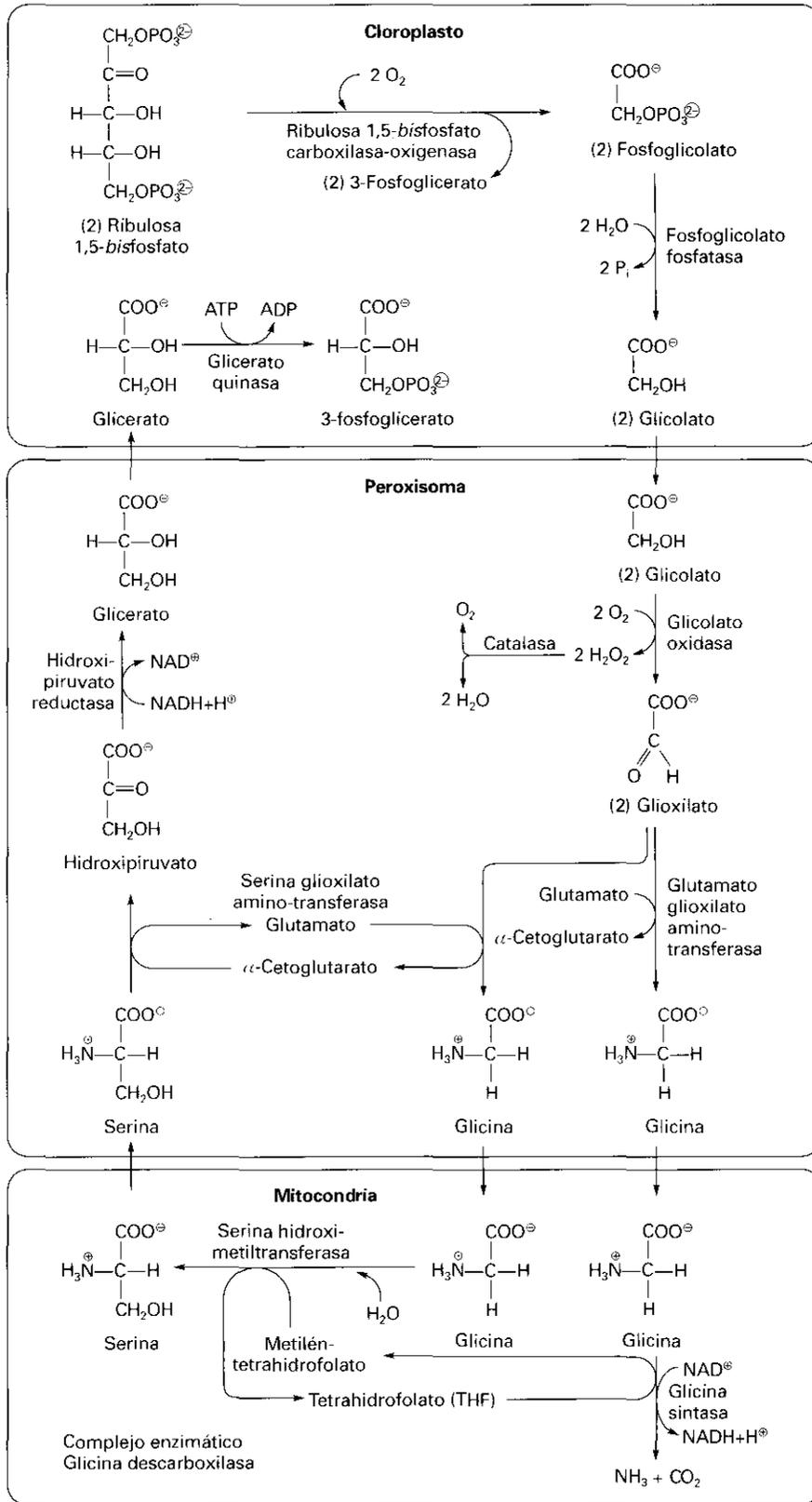


Figura 12-2. Ciclo de la fotorrespiración. Este ciclo implica la participación de tres orgánulos: cloroplasto, peroxisoma y mitocondria.

con un elevado coste energético (véase Capítulo 15). La serina pasa al peroxisoma, donde sufre una primera transaminación para dar hidroxipiruvato y, después, una reducción a glicerato. Este glicerato, finalmente, entra en el cloroplasto, donde es fosforilado a 3-PGA (Fig. 12-2).

En este proceso se ha consumido O_2 (en el primer paso a cargo de rubisco y, después, en el peroxisoma) y se ha liberado CO_2 (en la formación de serina), por lo que reúne características de proceso respiratorio. Sin embargo, al contrario que la respiración mitocondrial, este proceso es dependiente de la luz, se inhibe mediante DCMU (un inhibidor de la fotosíntesis a nivel de la cadena de transporte de electrones) y no es sensible al CN^- . Además, es estimulado por concentraciones crecientes de O_2 , incluso hasta llegar al 100% de O_2 , mientras que la respiración mitocondrial se satura a $10\text{--}20\text{ mL } O_2 \cdot l^{-1}$ (Fig. 12-3). La fotorrespiración es, por tanto, un proceso distinto de la respiración mitocondrial (véase Capítulo 14).

2.2. La competición entre carboxilación y oxigenación de rubisco depende de las propiedades cinéticas de la enzima, la temperatura ambiente y las concentraciones de O_2 y CO_2

Puesto que la fotosíntesis y la fotorrespiración se producen a la vez en la hoja, la tasa de asimilación del CO_2 (fotosíntesis neta) es principalmente un balance entre el CO_2 inicialmente fijado (fotosíntesis bruta) y las pérdidas fotorrespiratorias. Como en ambos procesos están

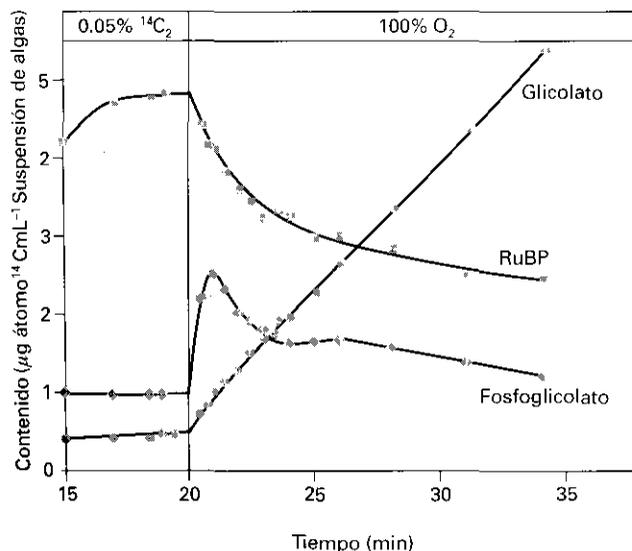


Figura 12-3. Efecto del O_2 en la síntesis del glicolato. El cultivo de algas se mantuvo a la luz expuesto, en primer lugar, a aire con $^{14}CO_2$ al 0.05% para marcar todos los productos intermedios con ^{14}C . Después, se pasó a aire que contenía solamente O_2 puro. La formación de glicolato marcado fue aumentando progresivamente.

implicados los mismos gases, pero con flujos en sentido contrario, es difícil medir por separado fotosíntesis y fotorrespiración. Sin embargo, podemos evaluar teóricamente la importancia de cada proceso y estimar experimentalmente la dependencia respecto a ciertas variables.

En principio, por cada cuatro carbonos que entran en el ciclo se pierde uno como CO_2 en las condiciones atmosféricas actuales, lo que indica que la fotosíntesis bruta debe estar alrededor del 125% de la medida experimentalmente.

El balance entre los dos ciclos está determinado por las propiedades cinéticas de la rubisco y la concentración de sustratos (O_2 y CO_2). Las propiedades cinéticas de la rubisco presentan una variabilidad no muy alta entre los organismos en que se han medido y resultan, por hoy, difíciles de mejorar, a pesar de los importantes esfuerzos que se están llevando a cabo mediante ingeniería genética. Estas propiedades son dependientes de la temperatura: al incrementarse la temperatura, se favorece la actividad oxigenasa y, por otra parte, también disminuye la ratio CO_2/O_2 disueltos en agua porque la solubilidad del CO_2 decrece más que la del O_2 . Por tanto, en conjunto, al aumentar la temperatura, se favorece la fotorrespiración.

2.3. La fotorrespiración disminuye la eficiencia de la fotosíntesis, pero puede proteger las plantas frente a un exceso de luz en condiciones de bajo CO_2 en el mesófilo

Una primera consecuencia de la fotorrespiración es que, además de reducir (junto con la clásica respiración mitocondrial) la fotosíntesis bruta a las tasas de fotosíntesis neta, se produce un gasto energético importante que reduce también la eficiencia del proceso de asimilación del CO_2 .

Si el CFRC supone el gasto de 2 NADPH y 3 ATP por ciclo (521 kJ), el ciclo fotorrespiratorio supone gastar 2.5 NAD(P)H y 2 ATP (600 kJ) por cada RuBP oxigenada (Cuadro 12-1; en este esquema se asume que cada NADH que se genera dentro de la mitocondria en el paso de 2 glicina a serina, se reoxida por la vía citocrómica de la cadena respiratoria con producción de 3 ATP). En atmósfera normal, con una ratio carboxilación/oxigenación de 3:1, tendremos un gasto energético de $3 \times 521\text{ kJ} + 1 \times 600\text{ kJ} = 2163\text{ kJ}$ para fijar, en neto, 2.5 carbonos (fijar tres y perder $1/2$). Por tanto, la energía requerida para fijar un mol de CO_2 pasa de 521 a 867 kJ. En conjunto, la eficiencia termodinámica se reduce de un 90% ($467/521$) a un 54% ($467/867$). Esta pérdida de eficiencia puede observarse cuando medimos un rendimiento cuántico mayor en condiciones no fotorrespiratorias (p. ej., en atmósfera con un 2% de O_2) frente a condiciones de atmósfera normal (véase Capítulo 13).

Cuadro 12-1. Gasto energético asociado a la carboxilación y la oxigenación de la rubisco. En el caso de la oxigenación, se asume que el NADH que se genera dentro de la mitocondria en el paso de 2 glicina a serina, se reoxida completamente por la vía citocrómica de la cadena respiratoria con producción de 3 ATP por cada NADH (véase Capítulo 14). Si, por el contrario, el NADH mitocondrial se exporta al peroxisoma mediante la lanzadera malato/oxalacetato para reducir el hidroxipiruvato, entonces el coste de fijar un O₂ sería 3.5 ATP + 2 NAD(P) H. En la realidad, seguramente coexisten ambos mecanismos de reoxidación del NADH fotorrespiratorio mitocondrial con un coste intermedio de ATP y NAD(P)H

Gasto energético asociado a la carboxilación	
3(RuBP) + 3CO ₂ + 3H ₂ O	6(3-PGA)
6(3-PGA) + 6 ATP + 6NADPH	6(triosa-P) + 6ADP + 6Pi + 6NADP
5(triosa-P)	3RuP + 2Pi
3RuP + 3ATP	3RuBP + 3ADP
3CO ₂ + 3H ₂ O + 9ATP + 6NADPH	Triosa-P + 9ADP + 6NADP + 8Pi
Coste de fijar un CO ₂ = 3ATP + 2NADPH	
Gasto energético asociado a la oxigenación de la rubisco	
10 (RuP) + 10ATP	10 (RuBP) + 10ADP
10 (RuBP) + 10 O ₂	10(P-glicolato) + 10(3-PGA)
10(P-glicolato) + 10 glutamato	10Pi + 10 glicina + 10 α-cetoglutarato
10 glicina + 15ADP + 15 Pi	5 serina + 15ATP + 5 NH ₃ + 5CO ₂
5 serina + 5 α-cetoglutarato	5 hidroxipiruvato + 5 glutamato
5 hidroxipiruvato + 5NADH	5 glicerato + 5NAD
5 glicerato + 5ATP	5(3-PGA) + 5ADP
5NH ₃ + 5ATP + 5 glutamato	5 glutamina + 5ADP + 5 Pi
5 glutamina + 5 α-cetoglutarato + 5NADPH	10 glutamato + 5NADP
15(3-PGA) + 15ATP + 15NADPH	15 triosa-P + 15 ADP + 15 Pi + 15NADP
15 triosa-P	9 RuP + 6 Pi
RuP + O ₂ + 2ATP + 2.5NAD(P)H	0.9 RuP + 0.5 CO ₂ + 2ADP + 2.5NAD(P) + 2.1 Pi
Coste de fijar un O ₂ = 2ATP + 2.5NAD(P)H	

(Adaptado de Taiz, L. y Zeiger, E.: Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Redwood City, California, 1991.)

Cabe preguntarse entonces por qué se mantiene en la planta un proceso aparentemente sin beneficio y que reduce fuertemente la eficiencia de la fotosíntesis —proceso básico para la producción y el crecimiento de la planta— ¿por qué la selección natural no ha eliminado este proceso? El descubrimiento de la actividad oxigenasa de la rubisco (muy posterior al del ciclo del glicólico o la fotorrespiración) animó a estudiar a fondo este punto de partida de todo el gasto fotorrespiratorio y a conocer posibles variantes, efectos ambientales, etc. Con los conocimientos actuales se entiende que la oxigenación resulta «inevitable» para el *locus* activo de la rubisco, quizá por la similitud de las propias moléculas de O₂ y CO₂. Aunque la fotorrespiración resulte «inevitable», lo que sí puede conseguirse es minimizarla aumentando la concentración del CO₂ o reduciendo la presencia de O₂ en la rubisco. En efecto, ciertas especies, de evolución reciente y frecuentemente de zonas cálidas y áridas, han desarrollado mecanismos (C₄, CAM, otros) que consiguen incrementar fuertemente la concentración del CO₂ en el entorno de la rubisco y reducir la incidencia de la fotorrespiración a mínimos.

Por otra parte, en condiciones de elevada iluminación y bajas concentraciones de CO₂ en el mesófilo (p. ej., por un cierre estomático en respuesta a la sequía o la salinidad), la fotorrespiración puede ser una vía para disipar el exceso de ATP y NADPH generado en los tilacoides, previniéndose así los daños que la acumulación de estos compuestos puede causar indirectamente al aparato fotosintético. Su papel sería, por tanto, similar al de los carotenoides en cuanto que ayudan a proteger la integridad del aparato fotosintético en condiciones difíciles de fotoinhibición (véanse Capítulos 10 y 30).

3. MECANISMO FOTOSINTÉTICO C₄

3.1. Existen plantas en las que el primer producto de fijación fotosintética es un compuesto de cuatro átomos de carbono

La concentración efectiva de CO₂ en el mesófilo es baja, puesto que en la atmósfera lo es, y existen diversas

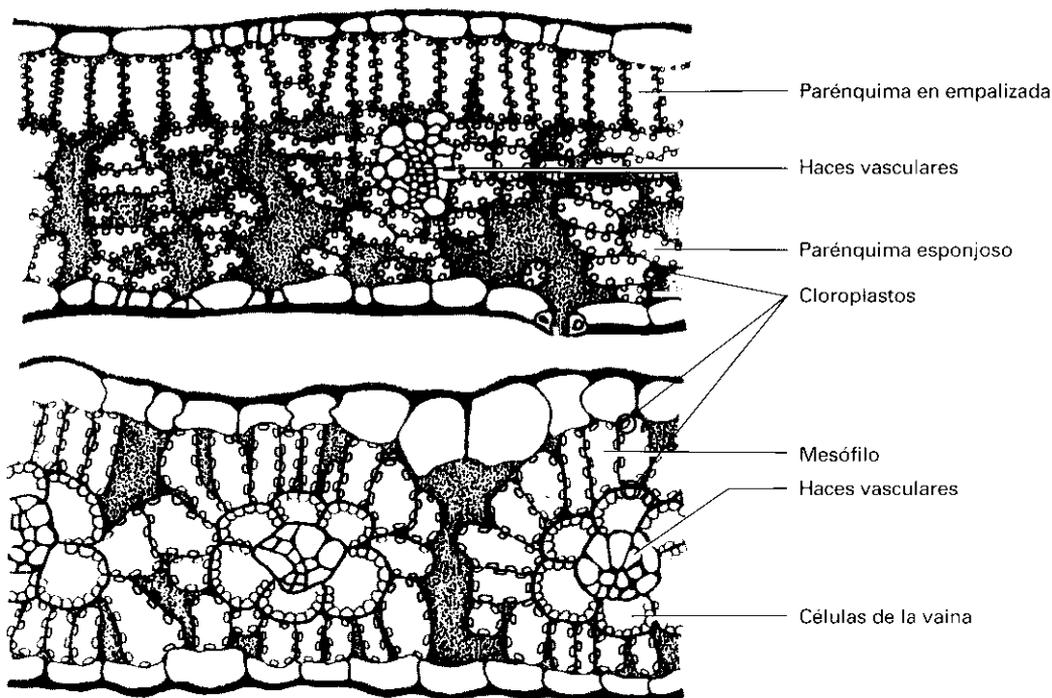


Figura 12-4. Comparación de la anatomía de secciones transversales de hojas de plantas C_3 y C_4 .

barreras, sobre todo la apertura estomática, que limitan el flujo de CO_2 hacia la rubisco. Además mantener abiertos los estomas tiene un coste elevado en pérdidas de agua por transpiración (véanse Capítulos 3 y 4). Algunas plantas que ocupan principalmente zonas cálidas y, en algunos casos, áridas o semiáridas han desarrollado un sistema que les permite fijar el CO_2 rápidamente en forma de ácido málico o aspártico, para liberarlo después en el entorno de la rubisco. Puesto que los primeros productos de la fijación de CO_2 tienen 4 átomos de carbono, a estas plantas se les conoce como plantas C_4 . Entre ellas están cultivos tan importantes como el maíz y la caña de azúcar, y bastantes malas hierbas que crecen en verano.

3.2. El mecanismo C_4 lleva asociadas diferencias anatómicas y bioquímicas respecto a las plantas C_3

Este ciclo se desarrolla en una anatomía particular del mesófilo, la anatomía Kranz (Fig. 12-4) que fue descrita a finales del siglo pasado. En estas plantas, las **células del mesófilo**, en vez de formar el parénquima lagunar y en empalizada, se asocian alrededor de los haces conductores formando una vaina espesa de células clorofílicas grandes con los cloroplastos agrupados en la periferia y con paredes celulares más gruesas profusamente atravesadas por plasmodesmos que comunican las células de la vaina y las del mesófilo. Rodeando los haces vasculares se encuentran células clorofílicas más

pequeñas, las **células de la vaina**. Los cloroplastos de las células de la vaina suelen ser más grandes, tienen poco grana y acumulan almidón. Los de las células del mesófilo son de tamaño más normal, tienen abundante grana y no presentan almidón.

Comparada con la anatomía C_3 , esta disposición genera una mayor proporción de espacio aéreo dentro de la hoja alrededor de las células del mesófilo, así como un contacto directo de las células de la vaina con el floema (en plantas C_3 , por término medio, cada célula tiene entre 9 y 15 células entre ella y el haz más próximo). En conjunto, esta disposición del mesófilo facilita la difusión del CO_2 y, en cierta forma, «canaliza» más estrechamente el flujo del carbono en el espacio y a nivel bioquímico.

El ciclo C_4 comprende, básicamente, cuatro etapas o fases (Fig. 12-5):

1. Asimilación del CO_2 , que implica la carboxilación del fosfoenolpiruvato en las células del mesófilo para formar ácidos C_4 .
2. Transporte de estos ácidos C_4 a las células de la vaina.
3. Descarboxilación de estos ácidos en las células de la vaina y generación del CO_2 , que es fijado por la rubisco y reducido a carbohidratos por vía del CFRC.
4. Regreso a las células del mesófilo del ácido C_3 (piruvato o alanina) formado por descarboxilación de los ácidos C_4 , y regeneración del aceptor del CO_2 (fosfoenolpiruvato).

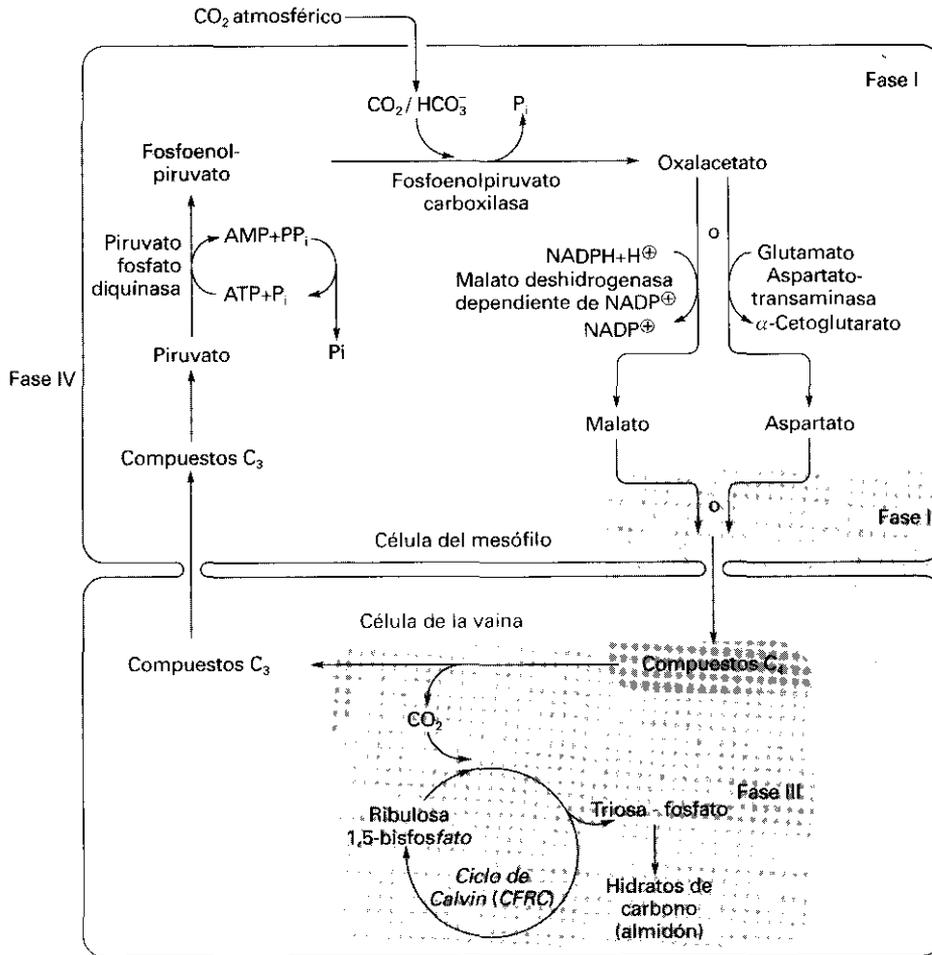


Figura 12-5. Esquema general de la ruta C₄ mostrando las cuatro fases principales.

En conjunto, se produce un transporte de CO₂ hacia las células de la vaina donde se encuentra la mayor parte de la rubisco. La elevada concentración de CO₂ que se puede conseguir en estas células (unas 20 veces superior a la de las células del mesófilo) aumenta la eficiencia de carboxilación de la rubisco (la actividad oxigenasa/fotorrespiración queda prácticamente anulada), con lo que los rendimientos fotosintéticos son claramente superiores a los de plantas C₃.

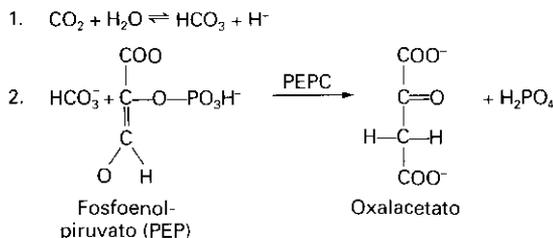


Figura 12-6. Paso inicial en la carboxilación en las plantas C₄: carboxilación del fosfoenolpiruvato a oxalacetato. La reacción 1 está catalizada por la enzima anhidrasa carbónica (CA) y la reacción 2 por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).

3.3. Existen diversos tipos de plantas C₄ y, también, especies intermedias C₃-C₄

En la primera fase del ciclo C₄, en el citosol de las células del mesófilo, el CO₂ pasa a formar bicarbonato, bien espontáneamente o bien de forma acelerada por la anhidrasa carbónica (véase apartado 5.2; también Capítulos 6 y 7). El bicarbonato se combina con el fosfoenolpiruvato (PEP) (gracias a la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa) y da como resultado la formación de oxalacetato (Fig. 12-6), producto muy reactivo que se convierte inmediatamente en malato o en aspartato, mucho más estables (Fig. 12-5).

En las fases siguientes, los ácidos C₄ difunden hacia las células de la vaina donde son descarboxilados, liberándose el CO₂. La descarboxilación pueden llevarla a cabo tres enzimas distintas: la enzima málica dependiente de NADP⁺ (NADP-ME), localizada en el interior de los cloroplastos, la PEP carboxiquinasa (PEPCK), localizada en el citosol, y la enzima málica dependiente de NAD⁺ (NAD-ME), localizada en las mitocondrias. Cada especie C₄ presenta alguna de estas vías, por lo

que se distinguen tres tipos de plantas C_4 de acuerdo con la enzima que descarboxila en la vaina (Cuadro 12-2).

En las plantas tipo NADP-ME (p. ej., maíz) se transfieren a los cloroplastos de las células de la vaina CO_2 y poder reductor (NADPH) mediante el transporte de malato, y la triosa fosfato difunde de la vaina al mesófilo para formar sacarosa. Por tanto, la necesidad de generar poder reductor en la vaina es menor, lo que explica la baja densidad de fotosistema II (PSII), dado que el poder reductor se genera con la colaboración de PSII y PSI. La presencia de PSI asegura el abastecimiento de ATP mediante la fotofosforilación cíclica (véase Capítulo 10). La ausencia o escasez del PSII supone asimismo una generación de O_2 reducida, que también contribuye a limitar la fotorrespiración.

En plantas tipo NAD-ME y PEPCK no hay transferencia de poder reductor a las células de la vaina, y transportan principalmente aspartato en vez de malato. Al generarse poder reductor en los cloroplastos de la vaina, se genera también O_2 que debe difundir al exterior.

El interés despertado por el ciclo C_4 y el reflejo evidente de las ventajas de este ciclo en la capacidad de producción en maíz y caña de azúcar animaron a estudiar su presencia en otras especies y a tratar de cruzar especies C_3 con C_4 , como una vía para introducir las ventajas de las C_4 en algunas C_3 , aunque sin demasiado éxito.

Se han encontrado más de 3000 especies de plantas que poseen características C_4 , pertenecientes a unas 17 familias distintas, todas ellas, de angiospermas. Este síndrome es particularmente abundante en especies de gramíneas tropicales y en dicotiledóneas (quenopodiáceas y amarantáceas, entre otras). En la flora europea se citan unas 117 especies, en su mayor parte gramíneas. En el género *Atriplex* se encuentran especies C_3 (*A. hastata*) y otras C_4 (*A. sabulosa*). Asimismo, *Flaveria cronquistii* es C_3 , mientras que *Flaveria trinervia* es C_4 . Además, hay bastantes géneros (*Flaveria*, *Mollugo*, *Panicum*, entre otros) que presentan especies «interme-

dias», es decir, que reúnen algunas características C_4 pero no todas. Estas especies se consideran intermedios evolutivos.

El hecho de que el síndrome C_4 abarque modificaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas y que sólo se manifieste por completo cuando los tres niveles están presentes plantea interesantes cuestiones de tipo evolutivo. Para esclarecer estas cuestiones, el estudio de los géneros con especies C_3 y C_4 y especies intermedias es de enorme interés. Asimismo, la aplicación de las técnicas de ingeniería genética al estudio de estas modificaciones puede también ayudar a esclarecer el origen y ensamblaje de dicho síndrome.

3.4. La vía C_4 tiene un coste energético que se compensa con una mayor eficiencia en la carboxilación

Comparadas con las plantas C_3 (véase Cuadro 12-1), las C_4 tienen mayores requerimientos energéticos: normalmente 2 moléculas extra de ATP por CO_2 fijado (5 ATP y 2 NADPH), debido a la conversión del piruvato a PEP. En las plantas de tipo NADP-ME, se requieren 2 ATP y 1 NADPH en las células del mesófilo, mientras que en las NAD-ME y PEPCK se requieren sólo 2 ATP. Adicionalmente, las plantas PEPCK usan un ATP en la vaina. Esta energía extra requerida por las C_4 , en principio, debe reducir su rendimiento cuántico, pero queda ampliamente compensada por la mayor eficiencia en la carboxilación al conseguir la anulación de las pérdidas por fotorrespiración que sufren las plantas C_3 .

La eficacia global de las plantas C_4 es superior a la de las C_3 porque, finalmente, requieren menos energía para fijar un CO_2 y presentan mayor eficiencia respecto al nitrógeno utilizado (proteína soluble en hoja) y en el uso del agua. La mayor eficiencia energética se mantiene mientras la energía empleada en bombear CO_2 resulte inferior al gasto fotorrespiratorio de las C_3 . Por tanto, a bajas temperaturas ($< 25^\circ C$) la fotorrespiración es

Cuadro 12-2. Subtipos del ciclo fotosintético C_4

Nombre del subtipo	Ácido C_4 principal en las células de la vaina	Enzima de descarboxilación	Ácido C_3 devuelto a las células del mesófilo	Ejemplos
NADP-ME	Málico	Enzima málica dependiente de NADP (cloroplasto)	Piruvato	Maíz, caña de azúcar, sorgo
NAD-ME	Aspártico	Enzima málica dependiente de NAD (mitocondria)	Alanina	<i>Panicum milliaceum</i>
PEP-CK	Alanina/piruvato	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (citoplasma)	Alanina/piruvato	<i>Panicum máximum</i>

baja y hace que este balance no sea favorable para las C_4 . La mayor **eficiencia en el uso del nitrógeno** se debe a que la rubisco, que supone la mayor parte del nitrógeno en plantas, trabaja en las C_4 más cerca de su tasa máxima de carboxilación y, por tanto, en las plantas C_4 pueden mantenerse mayores tasas de carboxilación que en las C_3 con menor concentración de rubisco. En cuanto a la eficiencia en el uso del agua, al disponer de un mayor gradiente de CO_2 entre la atmósfera y el lugar de carboxilación, para idéntica apertura estomática que las C_3 , conseguirán un flujo mayor de CO_2 y, por tanto, frente el mismo gasto de agua, su capacidad de asimilación de carbono resulta más elevada.

Estas ventajas se hacen más importantes, cuanto más difícil es el abastecimiento de agua para la planta, mayor competencia hay por el nitrógeno y mayores son las temperaturas. La distribución geográfica de las especies con este síndrome muestra que su abundancia es mayor en zonas semi-áridas y de altas temperaturas.

4. METABOLISMO ÁCIDO DE LAS CRASULÁCEAS (CAM)

4.1. Algunas plantas capturan el CO_2 por la noche y lo transforman en carbohidratos durante el día

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, del inglés, *Crassulacean Acid Metabolism*) debe su nombre a que se descubrió por primera vez en plantas de la familia de las crasuláceas, aunque no es en absoluto exclusivo de dicho grupo. El nombre de metabolismo ácido hace referencia a la acumulación de ácidos orgánicos durante la noche por las plantas que poseen este mecanismo de fijación de carbono. En cualquier caso, la fotosíntesis CAM va asociada normalmente con hojas de anatomía suculenta, con grandes vacuolas llenas de agua.

Esta vía metabólica es semejante a la vía C_4 (apartado 3). Sin embargo, en la vía CAM, la separación de los dos carboxilaciones no es espacial, como ocurría en las plantas C_4 , sino temporal. En efecto, en las plantas CAM la carboxilación C_4 , mediada por la PEP carboxilasa, tiene lugar durante la noche en las células del mesófilo. El oxalacetato formado es transformado en malato, forma en que se acumula el carbono durante la noche en estas plantas. Esta transformación conlleva un gasto de poder reductor y es mediada por la enzima malato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ . El malato acumulado se almacena en las vacuolas, que son de gran tamaño en las células de plantas CAM, pudiendo ocupar más del 95 % del volumen celular. La concentración de malato al final de la noche suele ser muy alta (>0.2 M), lo que confiere a estas hojas un cierto sabor ácido al amanecer. Durante el día, el malato se libera de la vacuola y es descarboxilado a piruvato mediante una de las tres enzimas, que cumplen idéntica función en las plantas C_4 (enzima málica dependiente de NAD^+ , en-

zima málica dependiente de $NADP^+$ o PEP carboxiquinasa, según la especie). Esta descarboxilación lleva consigo la liberación de CO_2 . De este modo, al igual que ocurría en las plantas C_4 , las plantas CAM incrementan la concentración de CO_2 en el lugar activo de la rubisco. El piruvato resultante se transforma en almidón (véase Capítulo 11). Durante la noche siguiente, el almidón origina por glucólisis moléculas de fosfoenolpiruvato que constituyen el sustrato de la carboxilación por PEP carboxilasa, cerrándose así el ciclo. El esquema comprensivo de esta vía de fijación del CO_2 se muestra en la Figura 12-7. Como puede verse en la Figura 12-8, existe un cierto antiparalelismo entre la concentración de malato y la de almidón durante el día y la noche en hojas de plantas CAM.

La separación temporal de los procesos fotosintéticos en las plantas CAM hace que la asimilación del carbono tenga lugar durante la noche, cuando la demanda atmosférica de agua es muy baja. De este modo, pueden mantener los estomas abiertos sin apenas pérdida de agua y cerrar los estomas durante el día, cuando la demanda atmosférica es alta. Por tal motivo, la fotosíntesis CAM se asocia con una elevada eficiencia en el uso del agua.

4.2. El ciclo CAM consta de cuatro fases diferenciadas

Analizando con algo más de detalle, el ciclo CAM a lo largo de un día puede dividirse en cuatro fases, denominadas simplemente fases I, II, III y IV. La Figura 12-9 muestra la evolución diaria, con las cuatro fases citadas, de la tasa de fijación de CO_2 , la resistencia estomática (es decir, el grado de cierre de los estomas) y la acumulación de malato.

La fase I es la que tiene lugar durante la noche. En ella, la resistencia estomática es baja y la concentración de ácido málico aumenta en paralelo con la tasa de fijación de CO_2 . Al final de la noche, la concentración de malato alcanza un estado estacionario debido al agotamiento del *pool* de fosfoenolpiruvato. A partir de ese momento, la fijación de CO_2 desciende rápidamente.

La fase II tiene lugar durante las primeras horas tras el amanecer. En esta fase, la resistencia estomática es todavía baja, debido a que la demanda atmosférica de agua sigue siendo suave en esas horas. Durante esta fase se produce un aumento de la tasa de fijación de CO_2 que no se traduce en incremento de la concentración de malato, ya que, en esta fase, la fijación de CO_2 tiene lugar mediante la vía C_3 normal.

La fase III es la fase CAM típica que tiene lugar durante las horas centrales del día, en presencia de elevada iluminación. Durante esta fase, la resistencia estomática aumenta hasta el cierre estomático completo. La incorporación de CO_2 a la planta, por consiguiente, se reduce hasta prácticamente anularse. Se producen la descarboxilación del malato acumulado durante la noche y la utilización por la rubisco del CO_2 liberado.

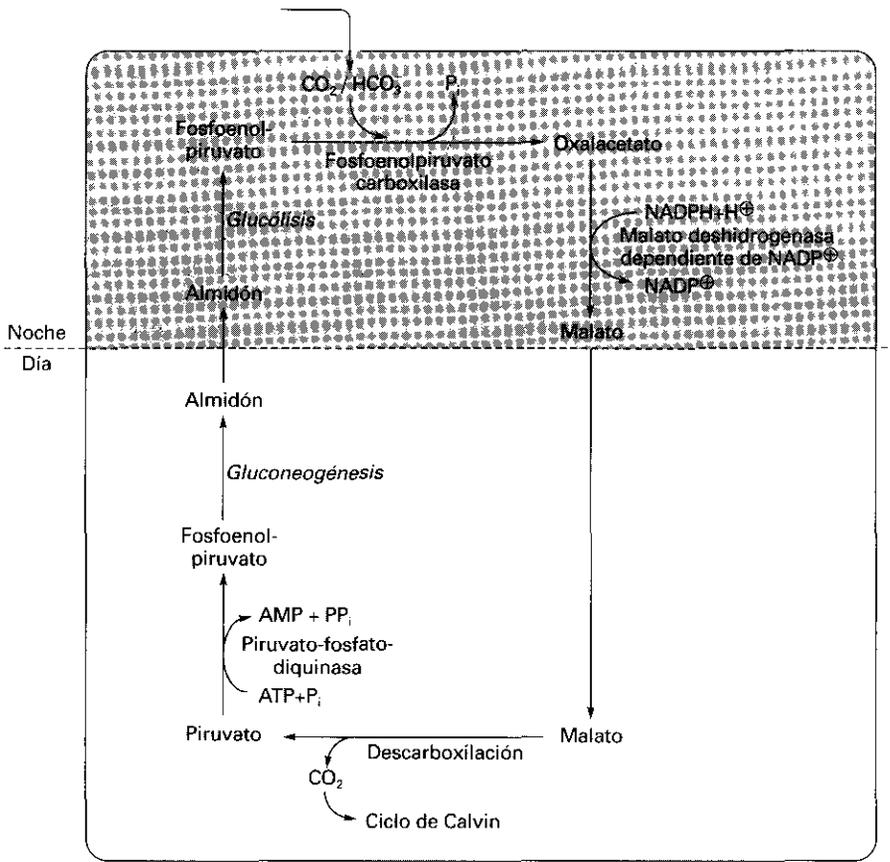


Figura 12-7. Esquema general del ciclo CAM.

La fase IV tiene lugar al atardecer, cuando el *pool* de malato va disminuyendo hasta casi desaparecer. En estas condiciones, la tasa de reducción de CO₂ se hace progresivamente mayor que la tasa de liberación interna por el malato, de manera que la presión parcial de CO₂ en el sitio activo de la rubisco desciende. Ello induce la apertura de los estomas con el consiguiente incremento de la tasa de fijación de CO₂, que tiene lugar

en esta fase mediante la vía normal C₃, al igual que en la fase II.

Estas cuatro fases, en especial la II y la IV, no siempre se observan en las plantas CAM, ya que dependen de las condiciones ambientales. En condiciones de estrés (véase Capítulo 30) suele desaparecer alguna de las fases.

4.3. Existen plantas que funcionan como C₃ CAM según las condiciones ambientales

La separación entre plantas C₃ y CAM no es neta, sino que existe un gradiente de especies con más o menos características de uno u otro tipo de fotosíntesis. Así, existen plantas con metabolismo C₃ estricto, otras con metabolismo intermedio C₃-CAM, otras con metabolismo CAM estricto y otras con un metabolismo que se conoce como CAM «inútil». En este último caso los estomas se mantienen cerrados día y noche, de tal manera que el CO₂ respirado durante la noche se fija internamente en forma de malato y se reasimila durante el día. Obviamente, este método no origina ninguna ganancia neta de carbono, por lo que las plantas no pueden crecer. Sin embargo, la pérdida de carbono y agua en estas condiciones es extraordinariamente baja, por lo que estas plantas pueden vivir durante mucho tiempo incluso sin sistema radicular. Esta característica se ha

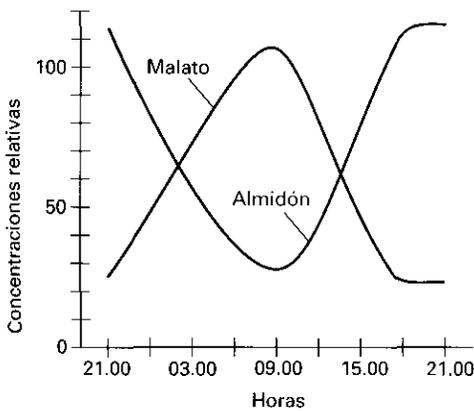


Figura 12-8. Ciclo diario de las concentraciones de malato y almidón en plantas CAM. Obsérvese la variación inversa de ambos productos.

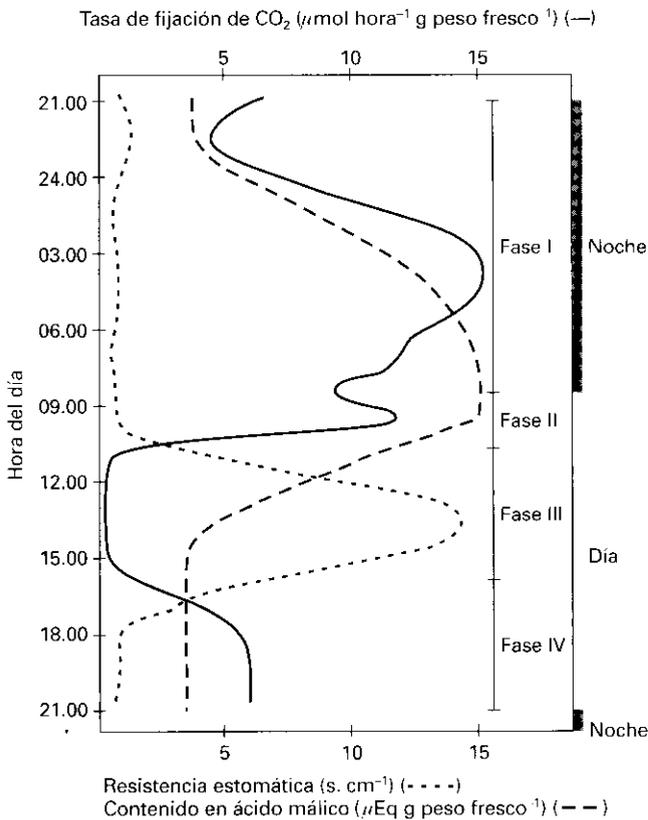


Figura 12-9. Ciclo diario de tasa de asimilación del CO_2 , resistencia estomática y acumulación de malato en una planta CAM típica (adaptado de Osmond, 1978).

utilizado para obtener plantas ornamentales, sin raíces, que pueden vivir sin agua colgadas de un techo o una pared.

En muchas plantas, la presencia del metabolismo CAM es facultativa, e inducible en función de las condiciones ambientales. *Briophyllum*, por ejemplo, se comporta habitualmente como una planta C_3 , sin embargo, en cuanto aparecen días cortos y noches frías, la planta modifica su metabolismo hacia CAM. En la llamada planta del polo (*Mesembryanthemum crystallinum*), frecuente en algunas zonas de nuestro litoral, las condiciones de estrés salino, al igual que las de estrés hídrico, inducen un cambio de metabolismo C_3 a metabolismo CAM.

5. OTROS MECANISMOS DE CONCENTRACIÓN DE CO_2

5.1. Los vegetales acuáticos poseen mecanismos de bombeo de CO_2 al interior celular

Algunos vegetales acuáticos asimilan el CO_2 del medio por simple difusión hasta la rubisco, de modo similar a como lo hacen las plantas terrestres del tipo C_3 . Estos son, sin embargo, la minoría. En el ambiente acuático, la ratio de concentraciones O_2/CO_2 es aún mayor que

en la atmósfera. Más aún, el coeficiente de difusión del CO_2 en agua es cuatro órdenes de magnitud inferior al coeficiente en aire, y decrece además al incrementarse la temperatura. Por otro lado, el equilibrio entre carbonato y bicarbonato se encuentra claramente desplazado hacia este último en la mayoría de ambientes acuáticos (Fig. 12-10), especialmente en aguas con valores de pH de 8 ó más alcalinas, de manera que prácticamente todo el carbono inorgánico se encuentra en forma de HCO_3^- . En estas condiciones, una asimilación del CO_2 por simple difusión como la que se da en plantas terrestres C_3 es, necesariamente, muy poco efectiva.

Por todo ello, los vegetales acuáticos (algas unicelulares, algas pluricelulares, plantas macrófitas acuáticas y fanerógamas marinas) han desarrollado diversos mecanismos para concentrar CO_2 en el entorno de la rubisco. Las características comunes a todos estos mecanismos son que logran mantener una concentración de CO_2 estable en el sitio activo de la rubisco y que esta concentración excede la que es habitual en situación de equilibrio con la atmósfera. De hecho, la mayoría de vegetales acuáticos posee una rubisco con un factor específico (afinidad por el CO_2) más bajo que las plantas terrestres, sin que se vea por ello afectada su capacidad fotosintética normal. Los principales grupos de vegetales acuáticos pueden clasificarse en cinco categorías según sus mecanismos de adquisición de carbono inorgánico:

1. Vegetales que adquieren el CO_2 directamente del medio por difusión. Este es un mecanismo poco común en plantas acuáticas, propio de ambientes especialmente enriquecidos en CO_2 por organotrofia, tales como pequeñas charcas temporales eutróficas.
2. Rizófitas que crecen sobre sedimentos enriquecidos en CO_2 por organotrofia. En este caso, el CO_2 se transporta desde las raíces a los tallos a través de espacios aéreos intercelulares. Este mecanismo es propio de plantas secundariamente acuáticas, como las isoetales (pteridófitas). También se encuentra en isoétidos terrestres que carecen de estomas, como *Stylites andicola*.

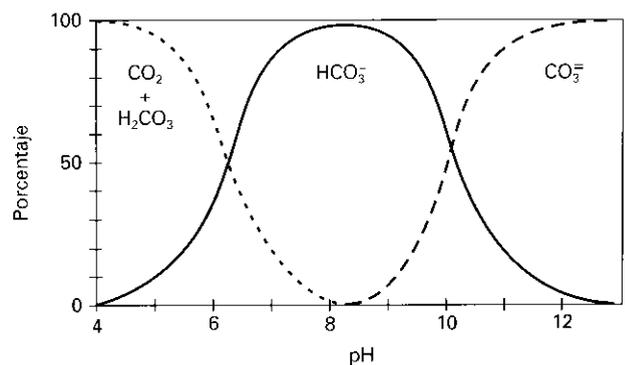


Figura 12-10. Abundancia relativa de varias formas de carbono inorgánico con diferentes valores de pH en el agua. Nótese que a pH habituales (7-8.5) la forma mayoritaria es el HCO_3^- , mientras que el CO_2 es prácticamente inexistente.

3. Plantas y algas que utilizan HCO_3^- para la acumulación del carbono inorgánico. Es el mecanismo más común en la mayor parte de vegetales acuáticos (*Elo-dea canadensis*, *Potamogeton lucens*, *Chlamydomonas*...). En algunos casos, se da una catálisis extracelular de HCO_3^- a CO_2 , el cual es incorporado rápidamente al interior celular, o bien un bombeo directo de HCO_3^- , el cual es posteriormente convertido en CO_2 por la anhidrasa carbónica (véase Fig. 12-11, apartado 5.2). En ambos casos la fijación viene mediada por la rubisco. Los mecanismos exactos de bombeo de HCO_3^- , en especial si se trata de mecanismos electrogénicos o mediados por transportadores de tipo uniporte, antiporte o simporte, activos o pasivos, así como su interferencia con la regulación del pH intracelular son uno de los campos de estudio de la fotosíntesis acuática de mayor actualidad. Parece ser que el mecanismo de transporte no es universal, sino que diversos organismos han adoptado diversos sistemas, siendo el más habitual el cotransporte electrogénico de HCO_3^- y H^+ (véase también Capítulo 7).

4. Plantas con comportamiento CAM o C_4 . Los mecanismos anteriores, aparte del bombeo activo de carbono, pueden considerarse típicamente propios de plantas C_3 . Existen otros vegetales acuáticos, sin embargo, en las que la estrategia consiste en una primera fijación realizada por PEP-carboxilasa o PEP-carboxiquinasa, originándose un compuesto de cuatro carbonos que posteriormente es descarboxilado, y el CO_2 desprendido es fijado por rubisco. En la mayoría de plantas de este tipo, la separación entre la fijación primaria por PEP-carboxilasa o PEP-carboxiquinasa y la secundaria por rubisco es de tipo temporal, por lo que se considera que estas plantas tienen un mecanismo fotosintético de tipo CAM. Tal es el caso de algunos isoétidos acuáticos o de las crasuláceas acuáticas (*Isoetes* sp., ...). Se conocen también algunos casos, todavía discutidos de separación espacial tipo C_4 como la cloroficea marina *Udotea flabellum*, con metabolismo fotosintético similar al de las plantas C_4 pero sin anatomía Kranz. Es el caso también de la planta acuática de agua dulce y de creci-

miento invasivo, *Hydrilla verticillata*, la cual posee un mecanismo de concentración de CO_2 inducible por la baja concentración de carbono inorgánico disuelto. En otros casos, como *Litorella* sp., parecen darse simultáneamente mecanismos C_4 y CAM en la asimilación del CO_2 por las raíces.

5.2. La anhidrasa carbónica convierte el HCO_3^- en CO_2 para su utilización por la rubisco, además de desempeñar otros papeles importantes en la fotosíntesis

Como se ha comentado, uno de los mecanismos más comunes de concentración de CO_2 en vegetales acuáticos es el bombeo de HCO_3^- al interior celular. Dado que el HCO_3^- no puede actuar como sustrato de la rubisco, debe ser convertido a CO_2 para que pueda darse la reducción fotosintética. La enzima encargada de esta transformación es la anhidrasa carbónica, una metaloenzima que contiene cinc (véase Capítulo 6). En la mayor parte de algas, esta enzima se halla asociada a una estructura globosa, el pirenoide, que se encuentra en el interior del cloroplasto. Además de cumplir con esta función, es muy posible que el transportador de HCO_3^- al interior celular (véase apartado anterior) sea también una anhidrasa carbónica, ya que el HCO_3^- debe ser deshidratado para poder atravesar la capa hidrófoba de la membrana celular. La Figura 12-11 muestra el mecanismo básico de concentración de carbono inorgánico en una célula de alga verde, indicándose la localización de diferentes anhidrasas carbónicas en el interior celular.

Además de cumplir importantes funciones en la fotosíntesis de los vegetales acuáticos, la anhidrasa carbónica se halla presente en las plantas terrestres, tanto en C_3 como en C_4 o CAM, por lo que el estudio de la estructura y función de esta enzima es otro de los puntos clave de los estudios actuales sobre fotosíntesis. En las plantas C_4 y CAM su función es imprescindible, ya que cataliza el primer paso de la fijación fotosintética del car-

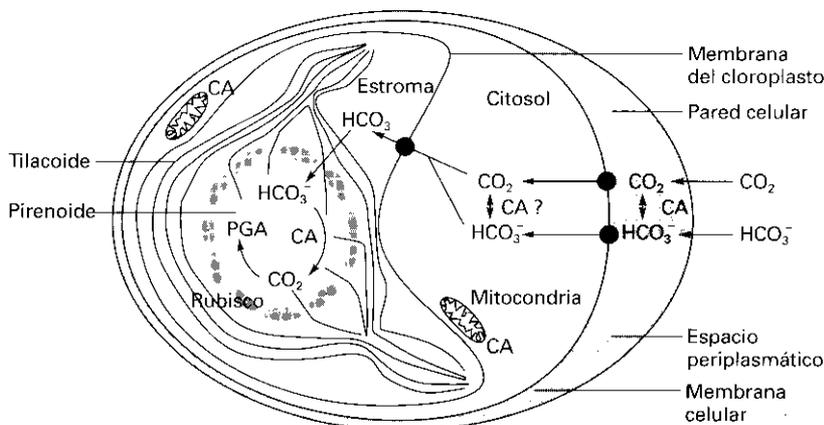


Figura 12-11. Mecanismo básico de concentración del carbono en una célula de alga verde.

bono. En efecto, aunque la primera carboxilación es catalizada por la PEP-carboxilasa, el sustrato de esta enzima es el HCO_3^- , y no el CO_2 , por lo que éste debe ser convertido en HCO_3^- mediante una anhidrasa carbónica. En este caso, la anhidrasa carbónica cataliza la reacción opuesta a la que cataliza en los pirenoides de las algas. También en las plantas C_3 la presencia de anhidrasa carbónica es importante, constituyendo entre el 0.5 y el 2% de la proteína soluble total. Por ello, se pensó en la posibilidad de que existieran mecanismos de concentración de CO_2 en el sitio activo de la rubisco también en plantas C_3 . A la vista de los resultados, sin embargo, esta hipótesis parece poco probable. Parece que la función de la anhidrasa carbónica en plantas C_3 sería producir un equilibrio rápido entre HCO_3^- y CO_2 , de manera que la difusión de CO_2 a través de la célula fuera facilitada.

5.3. Algunos vegetales viven en microhábitat con elevada concentración de CO_2

Se ha dicho (Capítulo 11) que, en las condiciones ambientales actuales, el factor más limitante para la fotosíntesis de las plantas es la concentración de CO_2 en la atmósfera. Sin embargo, existen numerosos microhábitat, generados por el medio o por las propias plantas, en los que la concentración de CO_2 es localmente alta. El efecto de estos microhábitat sobre la fotosíntesis de las especies que viven en ellos ha sido poco estudiado. Así, por ejemplo, las plantas que viven en el sotobosque de un bosque cerrado, cerca del suelo, pueden disponer de una concentración de CO_2 algo más elevada que los árboles de ese mismo bosque. También, existen plantas cuya estructura es pulvínular, es decir, que forman un «cojinete» bajo más o menos cerrado, con el envés de las hojas a escasa distancia del suelo. Cabe pensar que estas hojas dispondrán de elevadas concentraciones de CO_2 , desprendido por la respiración edáfica. Otras plantas que pueden disponer de elevadas concentraciones atmosféricas de CO_2 son las que viven en zonas urbanas, o cerca de entradas de cueva y surgencias en zonas cársticas. Mucho más complejo resulta el caso de los líquenes. El componente alga de los líquenes, al estar en contacto estrecho con el hongo simbiote que respira así como con el sustrato sobre el que vive, puede disponer de una elevada concentración de CO_2 . Sin embargo, parece ser que esta elevada concentración de CO_2 no supone un aumento muy grande en la tasa fotosintética, ya que estas algas poseen una baja eficiencia de carboxilación. Por otra parte, la difusión del CO_2 a los cloroplastos en líquenes varía notablemente según el contenido en agua del talo, habiéndose descrito incluso la necesidad de mecanismos de bombeo similares a los descritos en alga para permitir la fotosíntesis de los líquenes, aun disponiendo éstos de elevadas concentraciones de CO_2 .

6. DISCRIMINACIÓN ISOTÓPICA DE LOS DIVERSOS MECANISMOS DE FIJACIÓN FOTOSINTÉTICA DEL CARBONO

6.1. El contenido en carbono 13 puede utilizarse para discriminar el tipo de fijación metabólica del carbono

En la atmósfera, el 99% del carbono en forma de CO_2 se halla en forma del isótopo «normal» ^{12}C . El 1% restante se halla en forma del isótopo ^{13}C que, al ser más pesado, difunde más lentamente y es utilizado más despacio por algunas enzimas. La rubisco, por ejemplo, utiliza $^{13}\text{CO}_2$ un 3% más despacio que $^{12}\text{CO}_2$. En cualquier caso, si todo el CO_2 que llega hasta la rubisco es fijado fotosintéticamente, no se producirá discriminación isotópica. Para que ésta se dé, la planta debe poder «elegir», es decir, el CO_2 debe poder difundir hacia adentro y hacia afuera. Esto último ocurre en las plantas C_3 , las cuales presentan una importante discriminación isotópica. En las C_4 , en cambio, casi todo el CO_2 que es bombeado desde las células del mesófilo a las de la vaina es, finalmente, fijado por la rubisco, por lo que no hay apenas discriminación isotópica. Este hecho puede ser utilizado para distinguir ambos tipos metabólicos, mediante análisis del contenido en ^{13}C de la materia seca (Fig. 12-12).

Este método no permite distinguir las plantas CAM, debido a que éstas suelen ser predominantemente CAM o predominantemente C_3 (ya se ha dicho que existe un gradiente continuo entre ambos tipos metabólicos). Por ello, el gradiente de discriminación isotópica en las CAM abarca todo el gradiente de las C_3 y las C_4 . En realidad, la distribución de composiciones isotópicas en las CAM es bimodal, con muchas plantas en el rango de las plantas C_3 , y otras muchas en el rango de las C_4 . En el Cuadro 12-3 se muestran algunas caracterís-

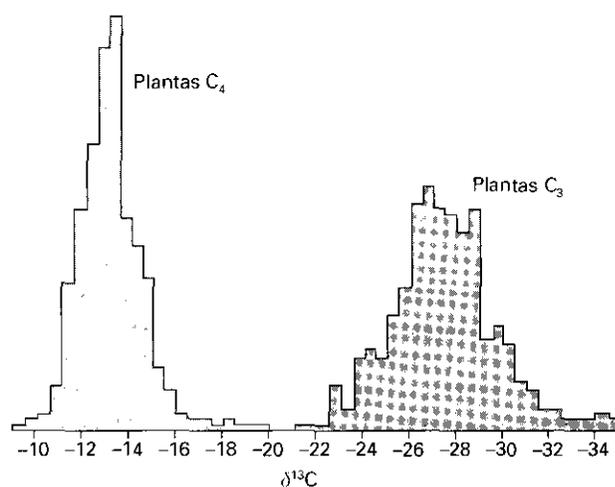


Figura 12-12. Distribución de los valores de discriminación del ^{13}C en diferentes plantas C_3 y C_4 (adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

Cuadro 12-3. Características diferenciales de las tres principales vías fotosintéticas de asimilación de C

Vía	C ₃	C ₄	CAM
Enzima responsable de la carboxilación inicial	Rubisco	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	Ambas: rubisco y PEPC
Anatomía	Normal	Kranz	Suculenta
Tasa de fotosíntesis	Media	Alta	Baja
Inhibición de la fotosíntesis por el oxígeno	Sí	No	Sí durante el día, no durante la noche (caso de la fijación oscura de CO ₂)
Eficiencia en el uso del agua	Baja	Media	Alta
Distribución geográfica	Amplia	Áreas tropicales abiertas y hábitat áridos	Regiones y hábitat áridos

ticas diferenciadoras de plantas C₃, C₄ y CAM, incluyendo la discriminación isotópica de cada tipo metabólico. El método de discriminación isotópica tampoco permite dilucidar la vía fotosintética de vegetales acuáticos, debido a que el HCO₃⁻ contiene sustancialmente más ¹³C que el CO₂. Por otra parte, cualquiera de los mecanismos de concentración de carbono inorgánico utilizados por los vegetales acuáticos (apartado 5.1) hace que la discriminación isotópica se asemeje a la de las plantas C₄.

7. LAS DIFERENTES VÍAS DE ASIMILACIÓN DEL CARBONO EN UN CONTEXTO EVOLUTIVO

7.1. La vía C₄ tiene un origen reciente, tal vez monofilético. La vía CAM es ancestral y polifilética

Todas las plantas C₄ son angiospermas excepto, tal vez, *Udotea flabellum*, una clorofícea. Ello hace pensar en un origen reciente para este tipo metabólico. El registro fósil y el análisis isotópico de paleosuelos sugieren que, en efecto, la aparición de la vía C₄ tuvo lugar durante el Mioceno (hace 10 ó 20 millones de años). El hecho de que el metabolismo C₄ sea exclusivo de angiospermas ha hecho pensar en un origen monofilético. Sin embargo, este tipo de metabolismo se encuentra tanto en algunos grupos de monocotiledóneas (gramíneas y ciperáceas) como en dicotiledóneas (órdenes centrospermas, geraniales, campanuladas y gruinales), lo cual parece apuntar a un origen polifilético. Al cruzar genéticamente especies C₃ con especies C₄, se observa que los caracteres anatómicos (anatomía Kranz) se segregan independientemente de los caracteres fisiológicos. El carácter C₄ se vería favorecido frente al C₃ en condiciones de temperaturas elevadas (véase Capítulo 13).

El carácter CAM, al contrario que el C₄, está presente en los grupos vegetales más primitivos, lo cual sugiere un origen más remoto. Así, está presente en pteridófitas de las clases *Lycopodiatae* y *Filicatae*, incluyendo las isoetales acuáticas y terrestres (*Stylites* es el taxón más antiguo que presenta la vía CAM). También está presente en espermatófitas, especialmente, en las angiospermas (tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas). La única gimnosperma a la que se ha atribuido carácter CAM, actualmente en discusión, es *Welwitschia mirabilis*, una extraña planta del desierto de Namibia. Por otra parte, se conocen unas 20 000 especies CAM, un orden de magnitud más que de especies C₄, lo cual parece confirmar el carácter más antiguo del metabolismo CAM. La gran diversidad de grupos taxonómicos que presentan metabolismo CAM sugiere, indudablemente, un origen polifilético para esta vía metabólica. El hecho de encontrarse un amplio gradiente continuo entre plantas C₃ y CAM, así como la existencia de plantas CAM inducibles por estrés ambiental parecen confirmar que el *pool* de genes que confieren este carácter debe estar presente en la mayoría de especies C₃, variando sólo su expresión. El metabolismo CAM constituiría una adaptación a condiciones de aridez periódica, pero no permanente. De hecho, las plantas CAM resultan más abundantes en desiertos subtropicales, o como epífitas en la zona tropical.

RESUMEN

En condiciones de atmósfera normal (21 % de O₂, 0.036 % CO₂), la rubisco puede catalizar la reacción de la RuBP con una molécula de O₂, en lugar de con un CO₂. En este caso (aproximadamente una de cada cuatro reacciones), se forma un P-glicolato y un 3-PGA y se inicia con ello la ruta del glicólico en la que se consumen ATP y poder reductor, y se desprende parte del

CO₂ anteriormente fijado. Esta ruta supone utilizar O₂ y emitir CO₂ y es dependiente de la luz, por lo que recibe el nombre de fotorrespiración, está presente en todos los vegetales y reduce el rendimiento energético de la asimilación del CO₂, pero puede ser importante para disipar excesos de poder reductor.

Diversos tipos de plantas han desarrollado mecanismos de concentración de CO₂ en el entorno de la rubisco, que implican una primera carboxilación del CO₂ para formar ácidos de 4 carbonos (málico u oxalacético), que posteriormente se descarboxilan cerca de la rubisco. Las plantas C₄, además de este mecanismo, han desarrollado una anatomía peculiar que refuerza la separación espacial de las dos carboxilaciones y la eficacia del mismo. Las plantas CAM fijan el CO₂ de manera similar, pero por la noche (de día los estomas están cerrados), y consiguen así una separación temporal de la carboxilación inicial y la definitiva (en el ciclo de la rubisco) que les permite aumentar la eficiencia en el uso del agua. En vegetales acuáticos, se concentra el CO₂ disuelto, gracias a una diversidad de mecanismos de bombeo de carbono inorgánico.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Teniendo en cuenta: 1) que en las condiciones atmosféricas actuales, aproximadamente, de cada cuatro reacciones de la rubisco, tres son de fijación de CO₂ y una de oxigenación; 2) que cada CO₂ fijado supone invertir la energía de unos 10 fotones (3 ATP y 2 NAD(P)H); 3) que cada ciclo fotorrespiratorio supone la pérdida de 1/2 CO₂; A) Calcule el requerimiento cuántico de un ciclo de fotorrespiración (2 ATP + 2.5 NADPH) y, B) calcule el coste promedio de la asimilación de CO₂ en estas condiciones.

C) ¿En qué proporción se incrementa el requerimiento cuántico teórico en condiciones fotorrespiratorias?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Azcón-Bieto, J., Talón, M. (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 1993.
2. Badger, M. R., Price, G. D.: «The role of carbonic anhydrase in photosynthesis». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 45: 369-392, 1994.
3. Leegod, R. C.: «The regulation of C₄ photosynthesis». *Adv Bot Res*, 26: 251-316, 1997.
4. Ogren, W. L.: «Photorespiration pathways, regulation and modification». *Annu Rev Plant Physiol*, 35: 415-442, 1984.
5. Osmond, C. B.: «Crassulacean Acid Metabolism: a curiosity in context». *Annu Rev Plant Physiol*, 29: 379-414, 1978.
6. Osmond, C. B. *et al.*: «Functional significance of different pathways of CO₂ fixation in photosynthesis». En: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Volume 12B*, Lange O. L. *et al* (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg Nueva York, 1982.
7. Raven, J. A.: «Photosynthesis in aquatic plants». En: *Ecophysiology of Photosynthesis*. Schulze, E. D. y Caldwell, M. M. (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg Nueva York, 1994.
8. Somerville, C. R. Somerville, S. C.: «La fotosíntesis de las plantas». *Mundo Científico*, 4: 612-623, 1984.
9. Winter, K.: «Crassulacean Acid Metabolism». En: *Topics in Photosynthesis. Volume 6. Photosynthetic Mechanisms and the Environment*. Barber J y Baker NR (eds.). Amsterdam Nueva York Oxford, Elsevier Science Publishers BV, 1985.
10. Winter, K., Smith, J. A. C. (eds.): *Crassulacean Acid Metabolism. Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Springer-Verlag, Berlin, 1996.

FOTOSÍNTESIS EN UN AMBIENTE CAMBIANTE

Joaquín Azcón-Bieto, Isabel Fleck, Xavier Aranda y Albert Xambó

1. Introducción. 2. Disponibilidad de CO₂. 3. La luz como factor ambiental más variable que afecta a la fotosíntesis. 4. Temperatura. 5. Otros factores que afectan a la fotosíntesis. 6. Interacción entre los factores que afectan a la fotosíntesis. 7. Fotosíntesis en el contexto del cambio climático.

1. INTRODUCCIÓN

El complejo proceso de la fotosíntesis, descrito en los cuatro capítulos anteriores, debe funcionar de forma integrada y eficiente en un medio ambiente en donde existe una enorme **variabilidad natural** de factores que afectan a la tasa de fotosíntesis, tales como la **luz**, la **temperatura**, la **humedad del aire**, la **disponibilidad hídrica** del suelo y los **nutrientes minerales**. A estos factores ambientales variables puede añadirse también el **dióxido de carbono** (CO₂), el principal sustrato de la fotosíntesis, ya que está teniendo lugar un rápido aumento de su concentración en la atmósfera en los últimos años, debido a las enormes emisiones de este gas relacionadas con actividades humanas.

La tasa de fotosíntesis de una hoja depende de más de 50 reacciones individuales, cada una de las cuales presenta su propia respuesta a cada variable ambiental, y esta tasa global puede variar ampliamente en el curso de un día y, también, entre las diferentes estaciones del año, debido a **cambios naturales** de los regímenes lumínico, térmico, hídrico y nutricional. De la habilidad que las plantas manifiesten para compensar los efectos ambientales cambiantes en la fotosíntesis, depende gran parte de su rendimiento y supervivencia en un medio ambiente determinado, especialmente cuando se dan situaciones de estrés (por ejemplo, déficit hídricos). Asimismo, la tasa de fotosíntesis también puede variar a largo plazo en las próximas décadas a través de complejas respuestas adaptativas a los **niveles cambiantes de CO₂**, que incluyen respuestas tanto directas al propio CO₂ como indirectas a través de cambios de temperatura y régimen hídrico que pueden tener lugar en el futuro, asociados al **cambio climático** que cabe esperar por el aumento en la atmósfera de CO₂ y de otros gases «invernadero».

Cada uno de los factores ambientales citados afecta a

la tasa de fotosíntesis de manera distinta, dependiendo también de la escala de tiempo que se considere, por lo que requieren un tratamiento individualizado en este capítulo, sin descuidar que, en condiciones naturales, pueden darse **interacciones** importantes entre ellos. Así, los factores que se estudiarán son principalmente el CO₂, la luz, la temperatura y los nutrientes, dado que el efecto del déficit hídrico en la fotosíntesis se trata en los Capítulos 3, 4 y 30.

2. DISPONIBILIDAD DE CO₂

2.1. La tasa de fotosíntesis está relacionada con la difusión del CO₂

El CO₂ es un gas que se encuentra de forma natural en la atmósfera en niveles muy bajos (350 partes por millón o ppm, aproximadamente). A pesar de ello, es el sustrato principal de la fotosíntesis, ya que es la fuente de carbono para la síntesis de los distintos compuestos orgánicos de las plantas.

La concentración de CO₂ en el aire alrededor de las hojas influye marcadamente en el crecimiento de las plantas, dado que tienen que incorporar dióxido de carbono en cantidades suficientes. La mayor parte de las plantas depende de la **difusión del CO₂** desde la atmósfera hasta los cloroplastos, donde tendrá lugar la fijación del dióxido de carbono gracias a la actividad carboxilasa de la enzima rubisco (véase Capítulo 11). Estas plantas en las que la absorción de CO₂ depende de la difusión son las denominadas **plantas C₃**. Otras plantas dependen menos de la difusión, ya que tienen mecanismos que les permiten concentrar el CO₂ para la fotosíntesis, aunque con un cierto coste energético. Ejemplo de ellas son las **plantas C₄** y las **plantas CAM** (metabolismo ácido de las crasuláceas) (véase Capítulo 12).

2.2. El CO₂ debe atravesar distintas barreras de la hoja hasta poder ser utilizado por la rubisco

El CO₂ difunde desde el aire hasta el cloroplasto y, para ello, debe pasar por distintas partes de la hoja: 1) la capa límite o *boundary layer*; 2) los estomas; 3) los espacios aéreos del interior de la hoja; y 4) la fase líquida en el interior de la hoja, que incluye la disolución del CO₂. En cada uno de estos espacios de la hoja, disminuye la concentración de CO₂, ya que actúan como resistencias, análogas a las de un circuito eléctrico (Fig. 13-1). Las **resistencias foliares** al paso del CO₂ se pueden agrupar en dos tipos:

1) Resistencia de la fase gaseosa: Incluye las resistencias ofrecidas por la capa límite (r_a), la estomática (r_s) y la de los espacios aéreos del interior de la hoja (r_i). La **capa límite** o **capa estacionaria** es una fina película de aire quieto que rodea la hoja ofreciendo resistencia a la difusión del CO₂, de manera que la concentración de este gas en esta zona es intermedia entre la concentración externa del aire no atrapado por la hoja y la interna de la misma. La magnitud de esta resistencia disminuye con el tamaño de la hoja y con la velocidad del viento (véase Capítulo 3).

Una vez que el CO₂ ha difundido a través de la capa límite, entra por los poros estomáticos. Los **estomas** ofrecen una resistencia variable, según el grado de apertura en que se encuentren (véase Capítulo 3). Una vez superada la resistencia estomática, el último obs-

táculo de la fase gaseosa son los **espacios aéreos del interior de la hoja**, es decir, las cavidades delimitadas por las paredes de las células del mesófilo, incluyendo las cavidades sub-estomáticas (resistencia de los espacios intercelulares, r_i).

Como es difícil determinar la resistencia a la difusión correspondiente a cada uno de los pasos, la fase gaseosa se considera como un único reostato, es decir, como una única resistencia variable, dado que la resistencia estomática tiene un efecto dominante. La determinación de la resistencia gaseosa al CO₂ se hace mediante la medida previa de la resistencia a la difusión del vapor de agua (véase Capítulo 3). Dado que la molécula de CO₂ es más pesada que la del agua, aquélla difunde más lentamente, de manera que la resistencia al paso de CO₂ es aproximadamente 1.6 veces mayor que la resistencia al paso de vapor de agua. En términos de conductancia, que es el parámetro inverso de la resistencia ($g = 1/r$), la conductancia al CO₂ (g_c) es 1.6 veces menor que la conductancia al vapor de agua (g_w):

$$g_c = g_w/1.6 \quad [13-1]$$

El cálculo de la conductancia al CO₂ permite estimar la **concentración de CO₂ intercelular** (C_i), siempre y cuando se haya medido también la concentración externa de CO₂ (C_a) y la tasa de asimilación neta de CO₂ (A):

$$C_i = C_a - A/g_c \quad [13-2]$$

o bien

$$C_i = C_a - 1.6 A/g_w \quad [13-3]$$

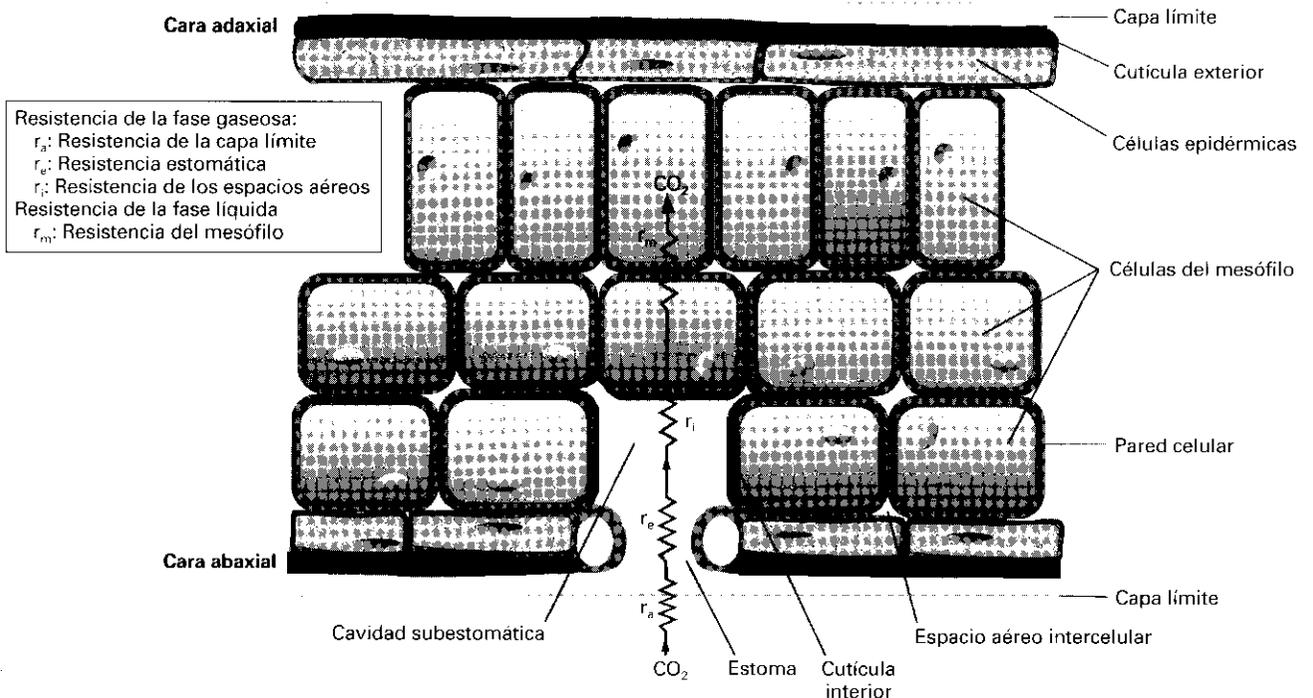


Figura 13-1. Sección transversal de una hoja hipostomática de planta C₃ y analogía eléctrica de las resistencias de difusión al paso de CO₂ desde el aire hasta el interior de las células del mesófilo de la hoja.

donde las unidades son:

$$C_i, C_a = \mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ de aire o ppm (fracción molar de CO}_2)$$

$$A = \mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$g_c, g_w = \text{mol de aire} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$$

II) Resistencia de la fase líquida: Una vez que el CO_2 ha superado la resistencia a la fase gaseosa, tiene que disolverse en la fase líquida que baña las células, atravesar la pared y la membrana celulares, el citosol, la membrana de los cloroplastos y el estroma antes de poder ser utilizado por la rubisco. Todos estos pasos pueden englobarse en uno solo, la llamada **resistencia del mesófilo** (r_m). Las recientes medidas de la conductancia del mesófilo (inversa de la resistencia) han determinado que la fracción molar efectiva de CO_2 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ o ppm) en el interior del estroma se sitúa, generalmente, entre un 50 y un 70% de la existente en el aire que rodea la hojas. Ello lleva a que las plantas C_3 , que básicamente dependen de la difusión de CO_2 , tengan unos niveles de dióxido de carbono alrededor de la rubisco por debajo de su K_m para el CO_2 , lo que implica un alto requerimiento proteico (y, por tanto, de nitrógeno); es decir, las plantas C_3 se ven obligadas a contener elevadas cantidades de rubisco para mantener altas tasas de fotosíntesis.

2.3. La apertura de los estomas durante la absorción de CO_2 comporta un coste de agua para la planta

Para la difusión de CO_2 a través de la fase gaseosa, los estomas deben estar abiertos. Como consecuencia, se exponen las superficies húmedas del interior de la hoja a la atmósfera, lo que provoca una pérdida de agua. Esto supone aproximadamente entre 100 y 1000 moléculas de agua perdidas (típicamente 240) por cada molécula de CO_2 incorporada en la fotosíntesis. Debido a este efecto, en climas desfavorables desde el punto de vista hídrico, la pérdida de agua por mantener los estomas abiertos puede suponer un factor crítico para la planta. Por ello, existen varios mecanismos para reducir estas pérdidas, como el de las plantas C_4 , el cual consiste en concentrar el CO_2 en las células de la vaina, permitiendo que estas plantas trabajen con una menor concentración de CO_2 intercelular que las plantas C_3 y, por tanto, mantener una menor apertura estomática; o bien el mecanismo de las plantas CAM, que consiste en fijar el CO_2 por la noche y mantener los estomas cerrados durante el día, cuando la transpiración podría ser muy elevada (véase Capítulo 12).

2.4. El CO_2 estimula la fotosíntesis a través de su acción como sustrato

A pesar de la existencia de otros factores limitantes el CO_2 es un factor clave que determina la tasa de fotosíntesis, ya que es uno de los principales sustratos de este proceso (véanse Capítulos 11 y 12). Mayoritariamente, si las plantas no presentan limitaciones por otros factores, responden incrementando la fotosíntesis a medida que se incrementa la concentración de CO_2 . Estos incrementos de la fotosíntesis no se dan de forma idéntica en todas las plantas, sino que varían según la fisiología de cada una de ellas, tal como se muestra en la Figura 13-2. En las plantas C_3 , el incremento del C_i se traduce en un incremento complejo de la tasa de fotosíntesis neta (A), ya que no sólo aumenta la asimilación bruta de CO_2 , sino que la fotorrespiración disminuye al incrementar la concentración de CO_2 . En las plantas C_4 , en cambio, la gran acumulación de CO_2 en las células donde se encuentra la rubisco reprime la manifestación de la fotorrespiración y, por tanto, el aumento de C_i da lugar a una rápida respuesta inicial de la fotosíntesis, alcanzándose la saturación a niveles menores de C_i que en el caso de las plantas C_3 (Fig. 13-2). Por lo tanto, la tasa de fotosíntesis de las plantas C_3 es sensible a las variaciones de CO_2 en un margen mayor que en el caso de las C_4 . Esta sensibilidad de la fotosíntesis C_3 al CO_2 puede ser utilizada para mejorar la productividad vegetal en invernaderos comerciales con control de CO_2 , y por supuesto tendrá un impacto en la fotosíntesis de las plantas en una atmósfera futura con elevado CO_2 (véase apartado 7).

La región inicial de la curva A/C_i (Fig. 13-3), donde no se manifiesta saturación de la fotosíntesis, expresa la utilización fotosintética del CO_2 , y la pendiente de la

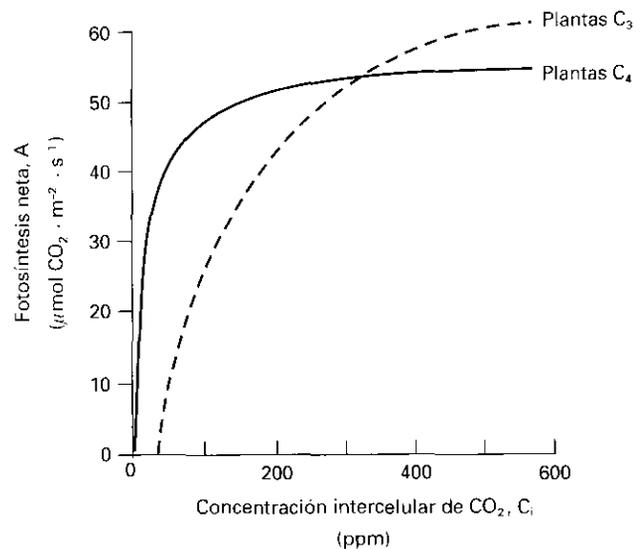


Figura 13-2. Efecto de la concentración intercelular de CO_2 sobre la fotosíntesis o asimilación neta de CO_2 (curva A/C_i) en hojas de plantas C_3 y C_4 .

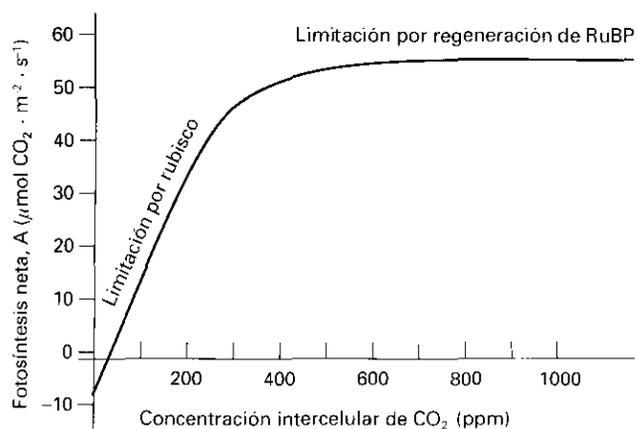


Figura 13-3. Características típicas de la curva A/C_i de una hoja de planta C₃ fotosintetizando con O₂ al 21% y luz intensa.

curva en esta región proporciona una estimación de la eficiencia de los procesos de carboxilación. En el caso de las plantas C₃, esto se corresponde con la eficiencia de la rubisco, que cataliza la reacción del CO₂ con la ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) en cantidades equimolares (véase Capítulo 11). Cuando los niveles de CO₂ son bajos, la RuBP se sintetiza en la fase de regeneración del ciclo de Calvin, más rápidamente de lo que es utilizada por la rubisco y, por tanto, la RuBP se encuentra en exceso. En estas condiciones, la fotosíntesis está **limitada por la actividad carboxilasa de la rubisco**, dado que los niveles del otro sustrato de esta enzima

(CO₂) son bajos. Al aumentar los niveles de este gas, también aumenta la tasa total de fotosíntesis, y la RuBP se utilizará con mayor velocidad. Al llegar el punto en que la rubisco puede usar la RuBP más rápidamente de lo que se sintetiza, la tasa de fotosíntesis ya no aumenta más, lo que corresponde a la zona de saturación de la curva. Así pues, la velocidad de regeneración de RuBP en el ciclo de Calvin impone otro límite a la tasa fotosintética. Dado que, normalmente, la tasa de regeneración de RuBP viene dada por la tasa de producción de ATP y NADPH tras la captación de la luz en los tilacoides, se suele decir de esta segunda parte de la curva A/C_i que la fotosíntesis está limitada por la luz (transporte de electrones y otras reacciones luminosas), en contraposición a la **limitación por rubisco** que se atribuye a la primera parte de la curva. En todo caso, hay que tener en cuenta que la regeneración de la RuBP puede verse también limitada por la velocidad con que el ion fosfato es liberado en la síntesis de sacarosa y almidón a partir de las triosas-fosfato formadas en el ciclo de Calvin, ya que este mismo fosfato es el que se utiliza en el cloroplasto para la fosforilación de ribulosa 5-fosfato a RuBP en el último paso del ciclo de Calvin (véase Capítulo 11). Por tanto, lo más correcto y genérico es hablar de **limitación por regeneración de RuBP** (en lugar de limitación por luz) en la zona de saturación de la curva A/C_i.

En la curva A/C_i puede observarse también que la fotosíntesis neta de la planta C₃ se hace nula a cierta concentración de CO₂ superior a cero (Figs. 13-2 y 13-3). Este fenómeno puede explicarse mejor con la siguiente

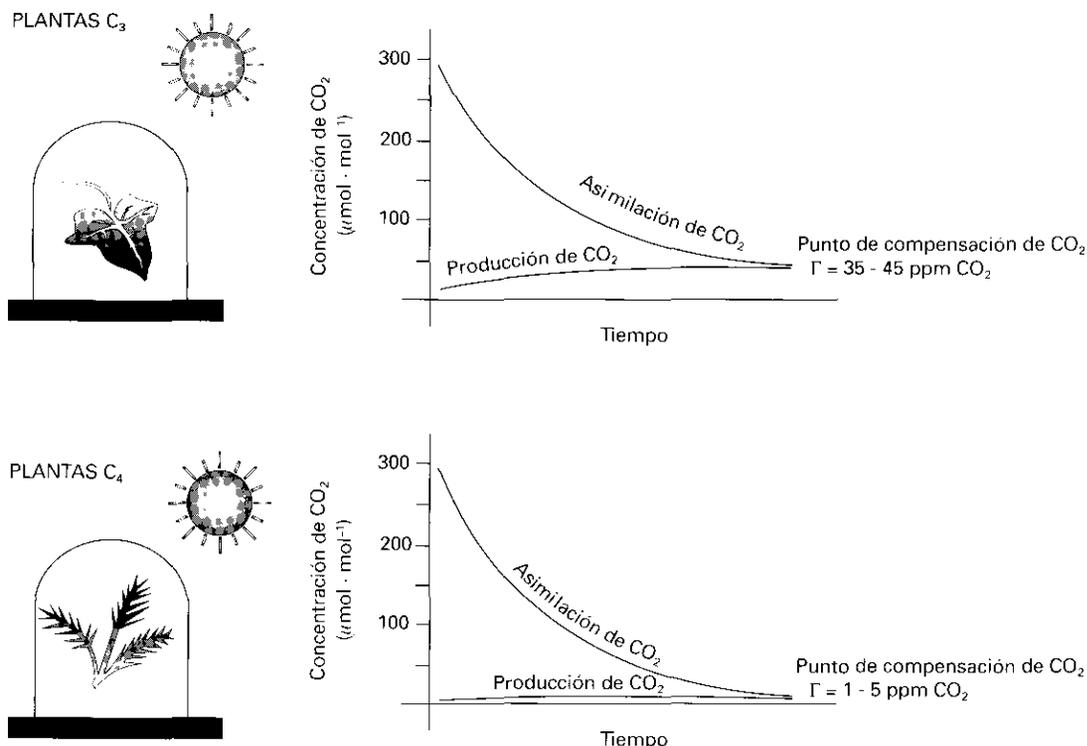


Figura 13-4. Determinación del punto de compensación de CO₂ en un sistema de intercambio de gases cerrado.

experiencia. Si se coloca una planta, expuesta a la luz, en una cámara cerrada, se observa que la concentración de CO₂ contenida en el aire de la cámara se va reduciendo con el tiempo por acción de la fotosíntesis (Fig. 13-4). La concentración de CO₂ en el interior del recinto cerrado va disminuyendo gradualmente, pero nunca alcanza valores nulos porque se establece un equilibrio entre el CO₂ captado por la fotosíntesis y el CO₂ emitido por la respiración y la fotorrespiración. Este equilibrio se conoce como **punto de compensación de CO₂** (Γ), que es aquella concentración de CO₂ donde el balance entre la fijación de CO₂ y la emisión de CO₂ es cero, y en la curva A/C_i corresponde al punto de intersección de la curva con el eje de abscisas (es decir, cuando A=0) (Figs. 13-2 y 13-3). En las plantas C₃, el valor de Γ suele ser de 35 a 45 ppm de CO₂, mientras que las plantas C₄ presentan valores del punto de compensación mucho menores (0-5 ppm de CO₂), debido a la ausencia de fotorrespiración.

3. LA LUZ COMO FACTOR AMBIENTAL MÁS VARIABLE QUE AFECTA A LA FOTOSÍNTESIS

La radiación luminosa, o luz, es el elemento clave de la fotosíntesis, dado que es su fuente primaria de energía; por tanto, la naturaleza de la luz y su papel en el aparato fotosintético se consideran ampliamente en los Capítulos 9 y 10. Por otra parte, la luz también actúa como factor regulador del crecimiento y el desarrollo de los vegetales, y esta función de fotomorfogénesis se introduce en el Capítulo 23. En este capítulo se relaciona la cantidad de luz, como parámetro ambiental de carácter muy variable, con las propiedades fotosintéticas que manifiestan las plantas, tanto en sus adaptaciones a largo plazo como en sus respuestas rápidas en la tasa de fotosíntesis.

3.1. El régimen de irradiancia durante el crecimiento condiciona las características fotosintéticas de las hojas

El ambiente luminoso al que se encuentran expuestas las plantas afecta a su crecimiento y desarrollo y determina su morfología foliar y fisiología, sobreviviendo únicamente las plantas cuya fotosíntesis está adaptada a dichas condiciones de luz. Cabe diferenciar dos tipos de adaptaciones: **plantas de sol** (o heliófilas) y **plantas de sombra** (o esciófilas). Existen, asimismo, adaptaciones dentro de los árboles, encontrándose hojas de sol y de sombra en un mismo árbol que corresponden a emplazamientos soleados o sombreados, respectivamente.

Las hojas crecidas en condiciones de luz débil (hojas de sombra), aunque normalmente pueden tener mayor superficie que las desarrolladas con luz intensa (hojas de sol), son más delgadas debido a que poseen menos

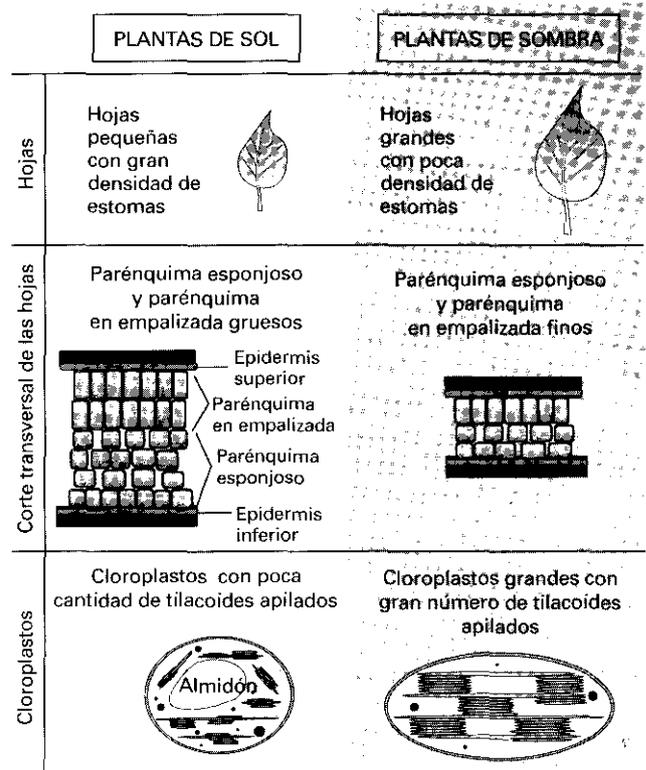


Figura 13-5. Algunas características de las hojas de plantas de sol y de sombra.

capas de células del mesófilo en empalizada, células más cortas y menor peso por unidad de área foliar (Fig. 13-5). La epidermis, el mesófilo esponjoso y los sistemas vasculares están más desarrollados en las hojas de sol. También existen diferencias en el aparato fotosintético: las hojas de sombra poseen más grana por cloroplasto y un mayor número de tilacoides apilados por grana que las de sol.

Asimismo, las plantas de sombra poseen mayor número de pigmentos en las antenas de los fotosistemas (especialmente, clorofila b) con el fin de aprovechar mejor la escasa irradiación incidente. Ello se refleja en un descenso de la relación clorofila a/clorofila b desde valores de 4-5 en hojas de plantas crecidas a pleno sol hasta valores alrededor de 2.5, típicos de hojas de plena sombra. Las hojas más gruesas de plantas de sol poseen un mayor contenido en clorofila total y carotenos por unidad de área, mientras que las de sombra, más finas y con un peso seco relativamente bajo, contienen más clorofilas por unidad de peso fresco o peso seco, en especial clorofila b. La inversión de nitrógeno es también distinta para ambos tipos de hojas: las de sombra invierten más nitrógeno en la producción de pigmentos cloroplásticos para la captación de la escasa radiación incidente, mientras que en las hojas de sol hay una gran inversión en proteína estromática, principalmente rubisco. Este hecho se traduce en una relación clorofila/proteína soluble baja en hojas de sol y elevada en las de sombra. Las plantas de sol poseen, asimismo, una

Cuadro 13-1. Diferencias entre plantas adaptadas a condiciones de sol o de sombra

Rasgos	Sol	Sombra
De la hoja		
Respuesta fotosintética a la luz		
Tasa de saturación a la luz	Alta	Baja
Irradiancia de saturación	Alta	Baja
Irradiancia de compensación	Alta	Baja
Bioquímica		
Contenido de N, rubisco y proteína soluble/masa	Alto	Ligeramente inferior
% clorofila a/clorofila b	Alto	Bajo
% clorofila/proteína soluble	Bajo	Alto
Anatomía y ultraestructura		
Tamaño del cloroplasto	Pequeño	Grande
Tilacoide/grana	Bajo	Alto
Morfología		
Masa de la hoja/área	Alto	Bajo
Grosor de la hoja	Grande	Pequeño
Tamaño de los estomas	Pequeño	Grande
Densidad estomática	Elevada	Baja
% mesófilo en empalizada/mesófilo esponjoso	Alto	Bajo
% área del mesófilo/área foliar	Alto	Bajo
Orientación de la hoja	Erecta	Horizontal
Del dosel		
Índice de área foliar	De alto a bajo	Bajo
Filotaxis	Espiral	Dística
Orientación de las ramas	Erecta	± Horizontal
Asimetría de la base foliar	Casi nunca	Infrecuente
De la planta		
Partición fraccional en hojas	Baja	Alta
Partición fraccional en raíces	Elevada	Baja
Esfuerzo reproductivo	Elevado	Bajo

composición química distinta de las de sombra, con mayor proporción de lípidos, almidón, carbohidratos solubles y cutinas (Cuadro 13-1).

3.2. La respuesta fotosintética a la luz varía según el tipo de planta

Las curvas de respuesta de la tasa de fotosíntesis neta a la luz (o curvas de saturación de luz) proporcionan mucha información sobre el funcionamiento fotosintético de las hojas. En dichas curvas (Fig. 13-6) se utiliza comúnmente como medida de luz la densidad de flujo fotónico incidente, o radiación fotosintéticamente activa (PAR), que corresponde al número de cuanta o fotones en el intervalo de longitudes de onda efectivas para la fotosíntesis (400-700 nm) (véase Capítulo 9). Valores máximos de PAR en un día soleado en latitudes medias son 2000-2300 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. El **punto de compensación de luz** corresponde a la densidad de

flujo fotónico con la cual el intercambio neto de CO_2 de la hoja es cero, debido a que se iguala el consumo fotosintético de CO_2 con su producción en procesos respiratorios. Este punto de compensación dependerá de las especies, las fases de desarrollo de la hoja y las características ambientales. Por ejemplo, el valor del punto de compensación luminoso en plantas de sol es de 20-30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, mientras que en las plantas de sombra, es de 1-10 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Los valores bajos de plantas de sombra son debidos a su baja tasa de respiración, que es compensada con facilidad por una fotosíntesis poco elevada. Las tasas de fijación de CO_2 y de respiración son más elevadas en las hojas de plantas de sol que en las de sombra, expresadas, tanto por unidad de área, como por contenido en clorofila.

Con una determinada densidad de flujo fotónico, la fotosíntesis neta se satura; esto corresponde al **punto de saturación luminoso**. Dicho punto es menor en plantas de sombra (entre 60 y 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) que en plantas de sol. En plantas C_3 de sol, se sitúa entre 400 y

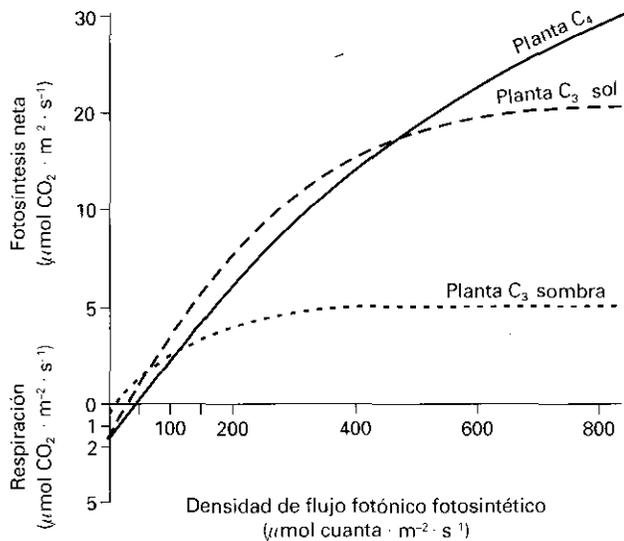


Figura 13-6. Respuesta de la fotosíntesis neta a la luz en hojas de plantas C_3 de sol y de sombra, y de plantas C_4 .

$600 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, correspondiente aproximadamente al 25% de la radiación luminosa solar máxima, mientras que en algunas plantas C_4 no se observa incluso la saturación (Fig. 13-6). Los puntos de saturación luminosos generalmente reflejan las densidades de flujo fotónico a las que estuvo expuesta la hoja durante su desarrollo. Las plantas de sol muestran tasas mayores de asimilación de CO_2 con saturación de luz, considerándose esta tasa como una medida de su **capacidad fotosintética** ($A_{\text{máx}}$). Ésta varía mucho entre especies y entre plantas C_3 y C_4 , habiéndose detectado en estas últimas tasas máximas de hasta $60 \mu\text{mol} \text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, hecho que repercute en su gran productividad. La capacidad fotosintética de una planta depende de todos los factores ambientales que afectan el proceso fotosintético, así como de la ontogenia foliar (véase Capítulo 28).

La pendiente inicial de la curva de saturación de luz viene determinada por las reacciones fotoquímicas fotosintéticas, mientras que la fase propiamente de saturación de la curva depende de las características bioquímicas de la fotosíntesis o reacciones de asimilación del CO_2 . La pendiente inicial puede describirse como el **rendimiento cuántico** (Φ) o eficiencia fotosintética en función de los fotones absorbidos ($\text{mol de CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de fotones) (Figs. 13-6 y 13-7). Las plantas C_3 tienen un Φ de 0.05 en condiciones naturales (corresponde a 1 molécula de CO_2 fijado por 20 fotones absorbidos); si se elimina el proceso de fotorrespiración mediante bajas concentraciones de O_2 (1-2%) o altas concentraciones de CO_2 , el rendimiento cuántico aumenta a 0.07-0.08 (1 CO_2 por 12-14 fotones). Las plantas C_4 poseen un Φ de 0.05 para todas las condiciones de concentración de oxígeno (Fig. 13-7). Dichas plantas, debido a la reacción de la PEP carboxilasa que permite acumular CO_2 en los sitios de carboxilación de la rubisco, presentan una menor dependencia del suministro de CO_2 . El

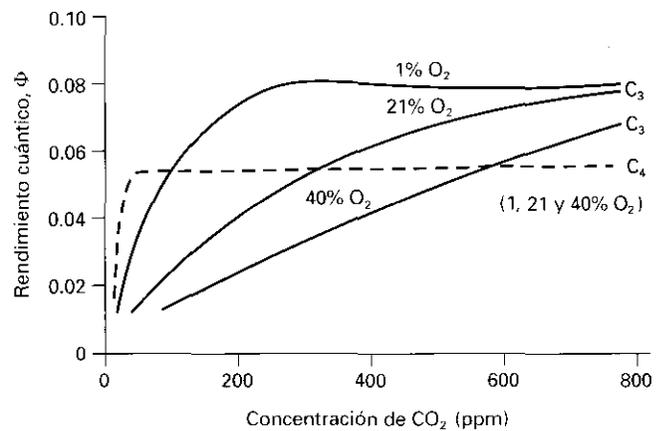


Figura 13-7. Rendimiento cuántico (Φ) o eficiencia fotoquímica de la fotosíntesis de hojas C_3 y C_4 en función de la concentración de CO_2 y O_2 . (Adaptado de Osmond, C.B. et al., eds. *Physiological Processes in Plant Ecology. Towards a Synthesis with Atriplex*. Springer-Verlag, Berlin, 1980).

menor rendimiento cuántico de las plantas C_4 con CO_2 elevado se debe a su mayor requerimiento de ATP en las vías de fijación del CO_2 (véase Capítulo 12); por ello, son relativamente ineficientes en condiciones de luz baja. Por otra parte, el rendimiento cuántico de plantas de sol y de sombra es similar, excepto cuando aparecen procesos de fotoinhibición (véase apartado 3.3), que producen una disminución del rendimiento cuántico, especialmente en plantas de sombra.

3.3. Existen diversos procesos de disipación de energía luminosa en los cloroplastos

La radiación incidente es absorbida en las membranas fotosintéticas de algas verdes y plantas superiores por parte de los complejos proteína-pigmentos de las antenas (*light harvesting complexes* o LHC), asociados a los centros de reacción del fotosistema I (PSI) y el fotosistema II (PSII) (Fig. 13-8)

Al absorber un fotón de luz, las clorofilas de las antenas adquieren el estado de singlete excitado, cuya energía de excitación puede transferirse a los centros de reacción y generar un transporte de electrones que oxida el H_2O y genera energía química en forma de ATP y NADPH para la reducción del CO_2 (véase Capítulo 10). La regulación de la captación de luz y el transporte de electrones es fundamental para que exista un equilibrio entre la producción de energía química y su consumo. En condiciones de baja densidad de flujo fotónico (PAR), es necesario que la planta capture y utilice la luz de la forma más eficiente, mientras que con niveles de PAR más elevados, el exceso de energía de excitación debe ser disipado de forma inocua para evitar deterioro en los centros de reacción (**fotoinhibición**) y en otros constituyentes celulares. Con frecuencia en la naturaleza, la absorción de energía luminosa en las superficies foliares es superior a su capacidad fotosintética, lo que

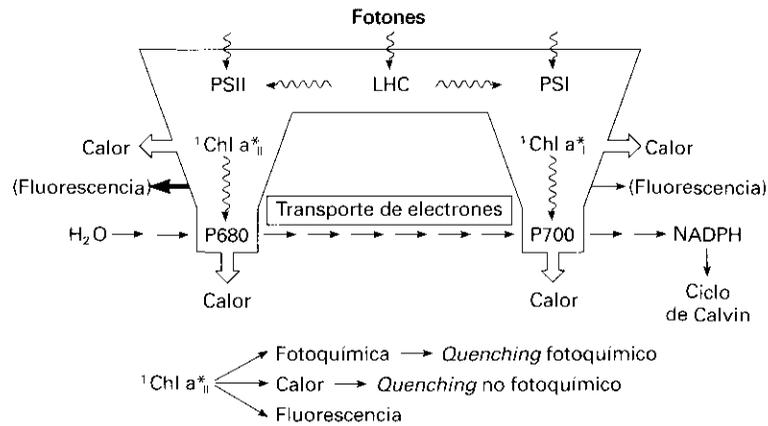


Figura 13-8. Los diferentes procesos de disipación de la energía luminosa en la fotosíntesis (adaptado de Schreiber, U. *et al.*, en *Ecophysiology of Photosynthesis*, E.-D. Schulze y M. M. Caldwell, eds. Springer-Verlag, 1995). LHC: complejo captador de luz de los fotosistemas (PSI y PSII). Véase el texto para otras abreviaturas

origina un estado de exceso de reducción de los transportadores de la cadena de electrones y una acumulación de energía de excitación no disipada en las antenas asociadas a los centros de reacción. Como consecuencia, se favorece la fotoinhibición y, también, la reducción directa del O₂ por la cadena de transporte de electrones (reacción de Mehler) y la posterior formación de especies reactivas de oxígeno (ion superóxido, peróxido de hidrógeno, etc.), que pueden llevar en último término a un deterioro fotooxidativo, especialmente del PSII (véanse Capítulos 10 y 30).

Diversos procesos constituyen formas de disipación de energía de excitación: entre las vías fotoquímicas se incluye fundamentalmente la asimilación de CO₂, que consume mucho ATP y NADPH generados en la fase fotoquímica de la fotosíntesis, aunque otros procesos, como la fotorrespiración, la reducción de nitrato y la asimilación de amonio, también consumen ATP y poder reductor (véanse Capítulos 12 y 15) y contribuyen a la disipación de energía. Asimismo, la reacción de Mehler constituye otra vía fotoquímica de disipación de energía. Los procesos no fotoquímicos incluyen principalmente la disipación térmica (no radiante) de la energía de excitación (Fig. 13-8).

3.4. La medida de la emisión de fluorescencia de las clorofilas es indicativa del funcionamiento fotoquímico de los cloroplastos

En adición a los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos de disipación de la energía radiante, mencionados en el apartado anterior, cierta cantidad de la energía luminosa absorbida por las clorofilas es disipada en forma de fluorescencia (véanse Capítulos 9 y 10). Es decir, la energía de los fotones absorbidos se distribuye entre estos tres procesos disipativos, que compiten entre ellos mismos. La fluorescencia constituye una fracción pe-

queña (3-4 %) de la energía total disipada, pero su medida puede servir para el conocimiento de la eficiencia en la conversión de energía radiante, ya que los cambios en la cantidad de energía utilizada por los otros procesos da lugar a cambios en la fluorescencia debido a la mencionada competencia entre todos ellos (Fig. 13-8). La fluorescencia se origina casi exclusivamente en el PSII, por lo que los cambios de esta radiación reflejan el estado de dicho fotosistema. A partir de mediciones rápidas y no destructivas, la **emisión de fluorescencia** puede ser analizada y evaluada cuantitativamente, informando sobre la tasa de transporte de electrones, el rendimiento cuántico y la existencia de fotoinhibición de la fotosíntesis. Los fluorímetros utilizados para dichas medidas de la fluorescencia son aparatos portátiles o semiportátiles y de bajo consumo, ideales para mediciones *in situ*. Son ampliamente utilizados en estudios ecofisiológicos sobre los factores de estrés que afectan a la fotosíntesis y constituyen una alternativa a los métodos de intercambio de gases (véanse apartado 2 y Capítulo 3).

En una hoja iluminada, los procesos de captación de luz, de canalización de la energía de excitación hasta la clorofila del centro de reacción del PSII (P680), y de la posterior separación de cargas que lleva al electrón desde esta clorofila hasta las quinonas (Q_A, etc.), son mucho más rápidos que los siguientes pasos de la cadena de transporte de electrones (véase Capítulo 10), por lo que se produce una cierta acumulación de quinonas reducidas a la espera de ser oxidadas por el siguiente aceptor de electrones. Como resultado de ello, aquellos centros de reacción del PSII cuyas quinonas estén reducidas no podrán, temporalmente, procesar más energía de excitación procedente de las antenas, con lo que la emisión de fluorescencia aumentará. A estos centros de reacción se les denomina «cerrados» en contraposición con los centros «abiertos», es decir, aquellos cuyas quinonas están total o parcialmente oxidadas y, por tanto, pueden seguir procesando energía, dando lugar a una

menor emisión de fluorescencia. Así, si se ilumina una hoja con un pulso de luz blanca suficientemente alto (saturante), se conseguirá cerrar momentáneamente todos los centros de reacción, lo que combinado con la relativa lentitud del transporte de electrones, dará lugar a un nivel de fluorescencia máximo. A partir de aquí, cuanto más energía es utilizada en reacciones fotoquímicas o en disipación térmica, menos energía queda disponible para emitirse como fluorescencia. Por ello se distinguen dos tipos de *quenching* o atenuación de la fluorescencia: el fotoquímico (q_p) y el no fotoquímico (q_N). En la práctica, la separación y cuantificación de los dos tipos de *quenching* se realiza precisamente mediante la aplicación de un pulso saturante de luz a un material fotosintético previamente adaptado a la oscuridad. El material se ilumina con la llamada luz de medida, que es de muy baja intensidad, por lo que la proporción de centros de reacción cerrados es prácticamente nula y el *quenching* fotoquímico es máximo al no haber ninguna restricción al transporte de electrones. Como consecuencia, el nivel de fluorescencia es mínimo (F_0). Al aplicar el pulso saturante de luz, la fluorescencia aumenta hasta un valor máximo (F_m), dado que todos los centros de reacción se hallan cerrados, y por tanto, el *quenching* fotoquímico queda completamente suprimido; el *quenching* restante en estas condiciones es no fotoquímico. La diferencia entre F_0 y F_m constituye la fluorescencia variable, F_v . Los valores de F_v/F_m para una gran variedad de plantas no estresadas adaptadas a oscuridad es de 0.75-0.85. El parámetro F_v/F_m es una estima del rendimiento cuántico máximo del PSII y su disminución es indicativa de daño por fotoinhibición.

Si bien inicialmente sólo era posible realizar mediciones de fluorescencia en ausencia de luz ambiental, los modernos fluorímetros presentan mejoras técnicas que permiten distinguir la emisión de fluorescencia en presencia de intensa luz ambiental o actínica. Es la llamada fluorescencia modulada. Con el uso de la luz modulada de medida (de muy baja intensidad), de luz saturante ($> 5000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), y de luz actínica, es posible observar los cambios de fluorescencia que sufren las hojas adaptadas a la oscuridad cuando son iluminadas, y también los cambios de hojas previamente iluminadas, tal como se observa en la Figura 13-9. Ello permite calcular el rendimiento cuántico efectivo o eficiencia fotoquímica del PSII expuesto a la luz ambiental que, como muestra la Figura 13-10, disminuye al aumentar la irradiación. La técnica de fluorescencia modulada permite también calcular parámetros relacionados con el *quenching* fotoquímico (q_p) y con el no fotoquímico (expresado como q_N o NPQ), que describen principalmente la disipación térmica en las antenas del PSII. La Figura 13-11 muestra también el aumento de la participación en procesos de disipación de energía térmica (NPQ) al aumentar la irradiación.

Los carotenoides de la membrana tilacoidal y, especialmente, las xantofilas desempeñan un papel decisivo en la disipación térmica del exceso de energía luminosa

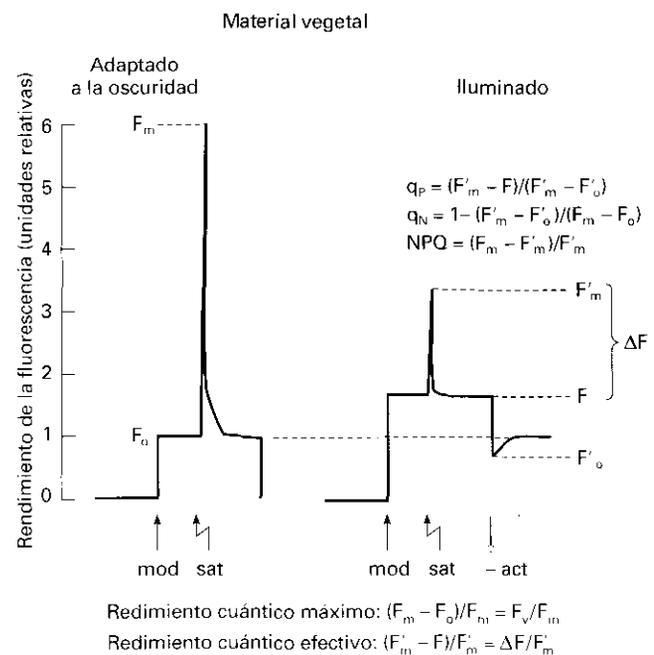


Figura 13-9. Cinéticas de fluorescencia de hojas adaptadas a la oscuridad e iluminadas. Definición de coeficientes de *quenching* y ecuaciones útiles derivadas de los parámetros de fluorescencia. Esta información se obtiene con la metodología del pulso saturante de luz blanca con fluorescencia modulada. El material vegetal utilizado normalmente son hojas. mod: luz modulada de medida, sat: pulso saturante de luz, act: luz actínica. (Adaptado de Schreiber, U. *et al.*, en *Ecophysiology of Photosynthesis*, E.-D. Schulze y M. M. Caldwell, eds. Springer-Verlag, 1995.)

absorbida por las clorofilas. En situaciones de exceso de luz, el incremento de la concentración de protones en el lumen tilacoidal generado por el transporte de electrones, activa enzimas que producen zeaxantina. Se ha observado que existe una clara relación entre el contenido de zeaxantina y el *quenching* no fotoquímico (NPQ) en muchas especies y bajo distintas circunstancias estresantes (Fig. 13-11), lo que ha llevado a proponer que la zeaxantina sea la principal responsable de los procesos de disipación térmica que explique el *quenching* no fotoquímico. Sin embargo, cabe la posibilidad de que su relación sea simplemente consecuencia del hecho de que ambos procesos tienen una dependencia similar del pH del lóculo o lumen (véanse también los Capítulos 10 y 30).

4. TEMPERATURA

4.1. La fotosíntesis puede operar en un amplio margen de temperaturas

Las plantas viven, y fotosintetizan, en una gran variedad de hábitat que presentan grandes diferencias en sus regímenes térmicos. A ello hay que añadir las fluctuaciones diarias y anuales que presenta la temperatura en

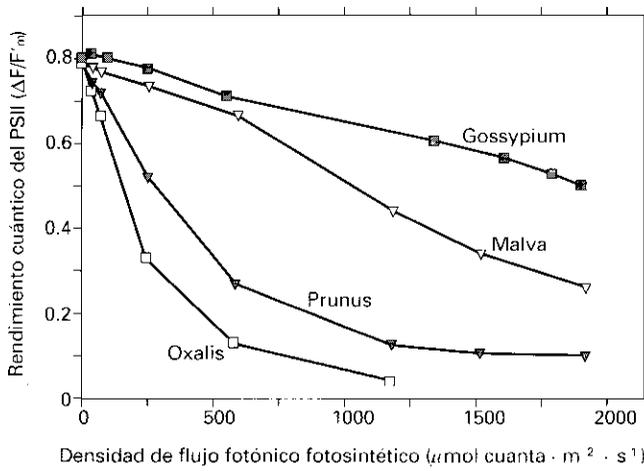


Figura 13-10. Efecto de la luz incidente (400-700 nm) sobre el rendimiento cuántico del PSII ($\Delta F/F_m$) en diferentes especies (adaptado de Björkman, O., Demmig-Adams B. En: *Ecophysiology of Photosynthesis*. E.-D. Schulze y M. M. Caldwell, eds. Springer-Verlag, 1995).

estos hábitat. La temperatura de la planta, como organismo poiquilotérmico que es, está estrechamente relacionada con la temperatura ambiental. Ello significa que la fotosíntesis deberá enfrentarse con ese amplio margen de temperaturas y, así, se encontrará actividad fotosintética próxima a los 0 °C en plantas alpinas, y cerca de 50 °C en algunas especies de desiertos cálidos.

¿Cómo responde la fotosíntesis a la temperatura? En la Figura 13-12, se observan curvas de respuesta en for-

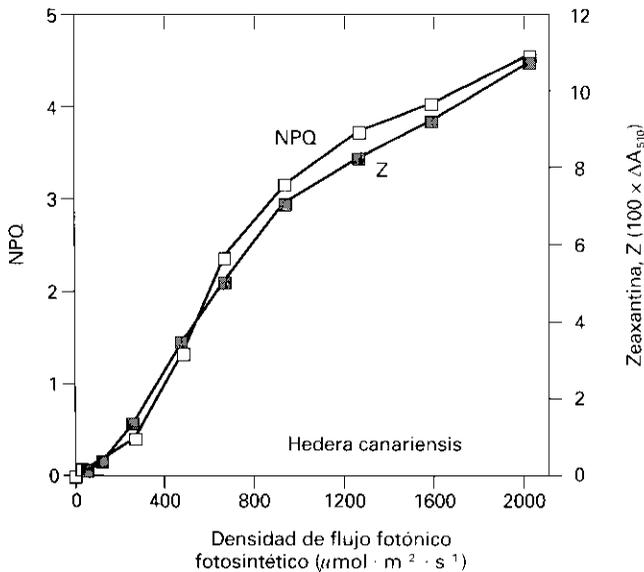


Figura 13-11. Paralelismo de la respuesta a la luz del quenching no fotoquímico (NPO) y del contenido relativo de zeaxantina en hojas de *Hedera canariensis*. La formación de zeaxantina fue monitorizada mediante el incremento de la absorbancia foliar a 510 nm (adaptado de Björkman, O., Demmig-Adams, B., en *Ecophysiology of Photosynthesis*. E.-D. Schulze y M. M. Caldwell, eds. Springer-Verlag, 1995).

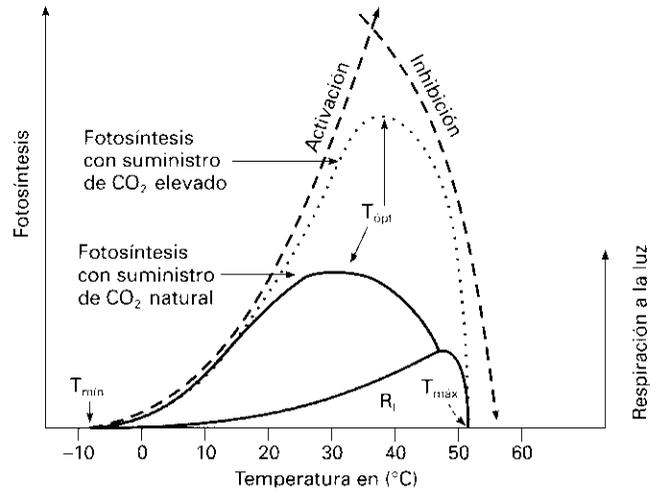


Figura 13-12. Respuestas a la temperatura de la fotosíntesis a niveles de CO_2 ambiental y elevado, en plantas C_3 . T_{opt} : temperatura óptima para la fotosíntesis; T_{min} : límite inferior de temperatura; T_{max} : límite superior; R_l : estimación de la respiración a la luz (principalmente fotorrespiración). (Adaptado de Larcher, W. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, 1995.)

ma de campana, típicas de la mayoría de los procesos biológicos, con tres puntos característicos: una temperatura óptima en que la asimilación neta de CO_2 es máxima, y las temperaturas mínima y máxima con las que se observa fotosíntesis. Se trata de curvas complejas a pesar de su apariencia, ya que resumen varios procesos: fotosíntesis bruta, fotorrespiración y respiración. Cada uno de estos procesos comprende varias reacciones químicas sobre las que la temperatura tiene un efecto positivo, pero que son catalizadas por enzimas que presentan una respuesta a la temperatura típicamente acampanada, con una temperatura óptima diferente para cada enzima.

En la Figura 13-13 se observan dos respuestas reales diferentes de la fotosíntesis. La curva superior corresponde a una planta C_4 , con una marcada respuesta a la temperatura. La curva inferior, muy aplanada, representa una cierta independencia de la temperatura a lo largo de un amplio margen. Es la respuesta típica de la mayoría de las C_3 , en las que la estimulación de la asimilación neta de CO_2 por la temperatura se ve compensada por un aumento de la fotorrespiración (el cual se debe a la mayor pérdida de afinidad de la rubisco por el CO_2 que por el O_2 , y también, a que el aumento de temperatura incrementa la proporción del O_2 disuelto respecto al CO_2 ; véase Capítulo 12) y, también, de la respiración, tal como muestra la Figura 13-12. En ella podemos ver además cómo, por causa de la fotorrespiración, la temperatura óptima de la fotosíntesis neta se halla desplazada respecto a la temperatura óptima de la fotosíntesis bruta (sin fotorrespiración). Cabe resaltar también la respuesta que presenta la misma planta C_3 , medida con un aporte de CO_2 óptimo: el aspecto de esta curva es el mismo que el que presenta una C_4 (Figs. 13-13 y 13-14), dado que en ambos casos se da una

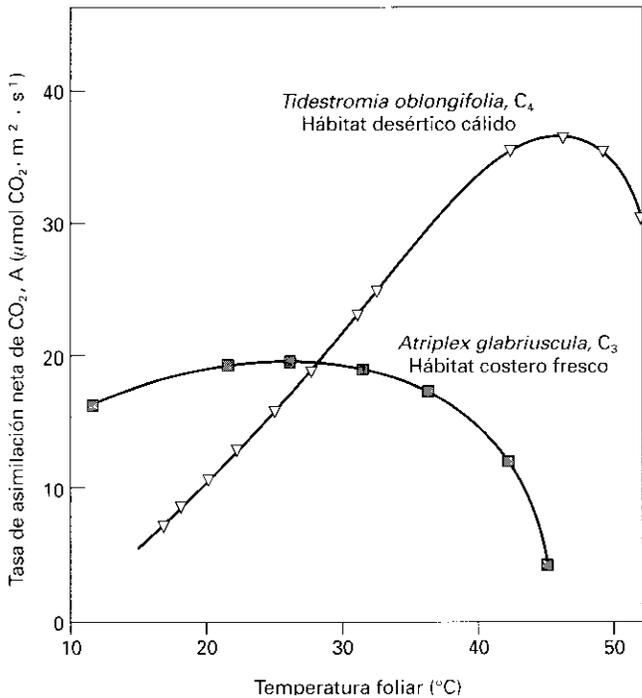


Figura 13-13. Comparación de la respuesta de la fotosíntesis neta a la temperatura en plantas enteras C₃ y C₄ crecidas en diferentes hábitat con temperaturas contrastadas. (Adaptado de Berry, J. A., Björkman, O. *Annu Rev Plant Physiol*, 31: 491-543, 1980.)

concentración elevada de CO₂ en el lugar de carboxilación que elimina la fotorrespiración.

Como consecuencia de todos los factores mencionados, existe una importante variabilidad entre las temperaturas óptima, máxima y mínima en las diferentes especies. Así, cabe destacar que el margen óptimo abarca de 15 a 30 °C para la mayoría de las C₃, pero las plantas de sombra y las especies que florecen al principio de la primavera lo tienen entre 10 y 20 °C; las plantas de sol, entre 25 y 35 °C; algunos arbustos de desierto, hasta por encima de 40 °C, mientras que la mayor parte de las C₄ sigue fotosintetizando bien a temperaturas aun superiores. También es variable la temperatura máxima, que podríamos calificar de punto de compensación de calor: con temperaturas altas, la fotosíntesis se reduce rápidamente y la respiración y la fotorrespiración aumentan con gran velocidad, hasta llegar a un punto en que todo el CO₂ asimilado es liberado de nuevo; más allá de este punto, que oscila entre los 40 y los 60 °C según se trate de plantas leñosas o herbáceas, se observa una emisión neta de CO₂.

En cuanto a la temperatura mínima aceptable para la fotosíntesis, ésta se sitúa por encima del punto de congelación en las plantas tropicales (cuyas membranas tilacoidales pierden su fluidez y funcionalidad), pero descendiendo algunos grados bajo cero en plantas de climas templados, al menos hasta que se forma hielo, lo que suele ocurrir entre -3 y -5 °C (véanse también Capítulos 1 y 30). Antes de llegar a este valor extremo, la disminución de la tasa de fotosíntesis con temperatu-

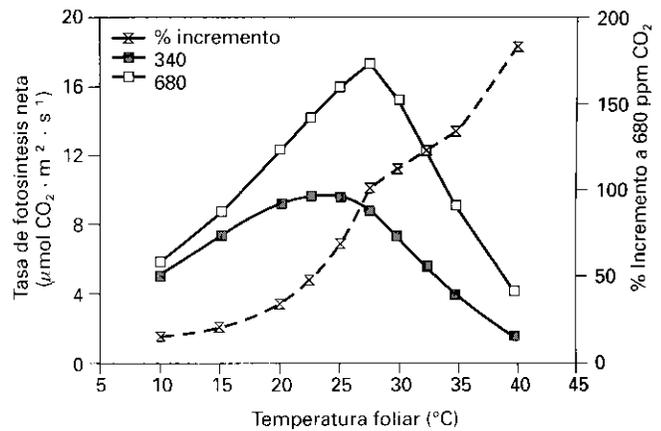


Figura 13-14. Respuesta de la fotosíntesis neta en función de la temperatura con dos niveles de CO₂ (ambiental y elevado), según un modelo matemático de simulación de la fotosíntesis. La luz incidente (400-700 nm) utilizada en la simulación es 1000 µmol cuanta m⁻² · s⁻¹. (Adaptado de Harley, P.C., en *Global Change and Mediterranean-type Ecosystems*. J. M. Moreno y W. C. Oechel, eds. Springer-Verlag, 1995.)

ras bajas parece estar relacionada con una baja disponibilidad de fosfato libre en el cloroplasto ya que, con estas temperaturas, la utilización de triosas fosfato para síntesis de almidón, y el transporte de triosas fosfato al citosol para la síntesis de sacarosa disminuyen mucho, con lo que el fosfato queda atrapado en los compuestos intermedios (véase Capítulo 11). Además de la falta de fosfato libre en el cloroplasto, necesario para la formación de ATP y de todos los productos intermedios del ciclo de Calvin, también se ha sugerido que estos productos intermedios, que se acumularían en estas condiciones, podrían inducir una disminución de los niveles de enzimas que participan en el proceso de fijación del CO₂, mediante la represión de la expresión de los genes que las codifican.

En los ejemplos anteriores se puede ver que hay una relación estrecha entre la respuesta a la temperatura de las plantas y las condiciones ambientales en que se desarrollan. De hecho, las temperaturas óptimas para la fotosíntesis suelen ser similares a las temperaturas diurnas de los ambientes en que crecen. Ello se debe no sólo a un proceso de adaptación genotípica que asegura un ajuste a la temperatura media del hábitat de la especie, sino también a una capacidad de las plantas de aclimatación a la temperatura en la que se encuentran en un determinado momento, de forma que la curva de respuesta a la temperatura se puede modificar en cuestión de días e, incluso, horas como consecuencia de un cambio en el régimen térmico. Los mecanismos implicados en esta aclimatación pueden ser: sustitución de unas isoenzimas por otras con temperaturas óptimas más adecuadas; cambios químicos y estructurales en las membranas, especialmente las tilacoidales; o, en el caso de aclimatación a temperaturas bajo cero, acumulación de azúcares u otros solutos que disminuyan el punto de congelación (véanse también Capítulos 1 y 30). De he-

cho, la capacidad de aclimatarse a una cierta temperatura suele ser la principal característica de la adaptación genotípica; así, plantas de hábitat fríos aclimatan su fotosíntesis mucho más rápidamente y mejor a temperaturas bajas que individuos de la misma especie procedentes de hábitat más cálidos, y viceversa.

5. OTROS FACTORES QUE AFECTAN A LA FOTOSÍNTESIS

Cuando la luz, el CO_2 y la temperatura, así como el O_2 y la humedad relativa del aire, presentan valores óptimos, la tasa de fotosíntesis alcanza su valor máximo. Es la llamada **capacidad fotosintética** (véase también apartado 3.2), que puede variar hasta en dos órdenes de magnitud entre especies y condiciones diferentes. La disponibilidad de nutrientes minerales en el suelo, especialmente nitrógeno y fósforo, puede afectar a la capacidad fotosintética. El nitrógeno forma parte de enzimas y de la clorofila, y existe una fuerte correlación entre el contenido de nitrógeno de las hojas y el contenido en clorofila y, sobre todo, en rubisco: aproximadamente un 50% del nitrógeno de una hoja se encuentra en esta proteína en una planta C_3 . En cuanto al fósforo, forma parte del ATP producido mediante el transporte de electrones en la membrana tilacoidal, así como de todos y cada uno de los productos intermedios del ciclo de Calvin. Una deficiencia en fósforo tiende a reducir la fotosíntesis (Fig. 13-15) al no poder exportarse del cloroplasto las triosas-fosfato, que quedan acumuladas en el interior del mismo (véase Capítulo 11). Esta situación se agrava cuando la concentración de CO_2 es alta, dado que la producción de triosas-fosfato es más elevada cuando se estimula la fotosíntesis.

La capacidad fotosintética es también susceptible a otros factores, como la presencia de organismos parásitos, simbióticos o patógenos (hongos, bacterias, virus), y contaminantes ambientales, tanto en el aire (dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, ozono) como en el suelo (metales pesados como el cadmio, el plomo o el arsénico). Explicaciones más detalladas de todos estos factores, incluyendo los nutrientes minerales, pueden encontrarse en los Capítulos 6, 8, 16 y 30.

6. INTERACCIÓN ENTRE LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA FOTOSÍNTESIS

Todos estos factores que se han presentado separadamente, en realidad pueden darse al mismo tiempo en condiciones naturales, e interactúan para dar lugar a una influencia compleja sobre la fotosíntesis. Así, las temperaturas óptima y máxima de la fotosíntesis aumentan con el CO_2 (Figs. 13-12 y 13-14), la respuesta de la fotosíntesis al CO_2 intercelular varía según la disponibilidad de fósforo (Fig. 13-15), y la respuesta a la luz cambia según el CO_2 (Fig. 13-16) y la humedad del

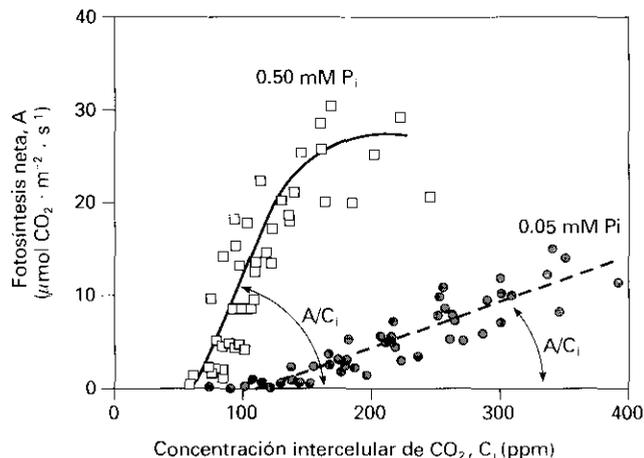


Figura 13-15. Curvas A/C de hojas de soja en condiciones de buen suministro (0.50 mM Pi) y deficiencia (0.05 mM Pi) de fósforo. (Adaptado de Larcher, W. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, 1995.)

aire (Fig. 13-17). En situaciones naturales, siempre hay, al menos, algún factor que no presenta valores óptimos y limita la tasa de fotosíntesis. De hecho, difícilmente se dan condiciones en que todos los factores de los que depende la fotosíntesis presenten, a la vez, valores favorables, de forma que normalmente la tasa de fotosíntesis es muy inferior a la capacidad fotosintética, hasta el punto de que los valores máximos diarios no suelen superar un 80% de esta capacidad máxima.

Como consecuencia de esta situación, los valores obtenidos en situaciones naturales no toman una forma tan definida como en el laboratorio, y las curvas conocidas aparecen más bien como límites de la nube de puntos que forman los resultados (Fig. 13-17 izquierda). Es más, los factores naturales no sólo interactúan, sino que son interdependientes: por ejemplo, una curva de respuesta a la luz medida en condiciones naturales conlleva un sobrecalentamiento de las hojas con los niveles

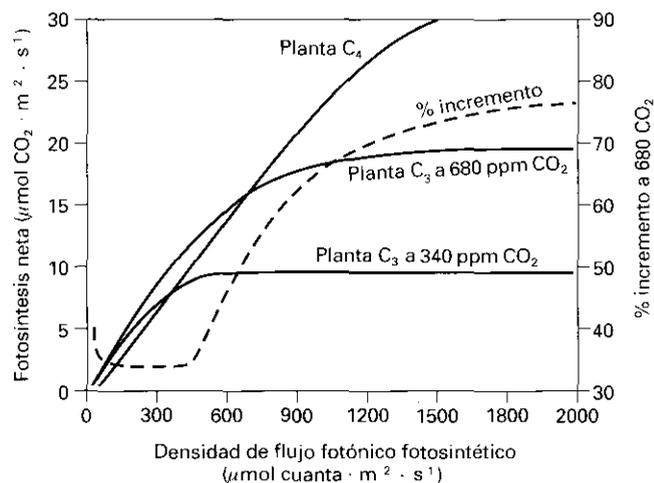


Figura 13-16. Respuestas de la fotosíntesis neta a la luz en plantas C_3 y C_4 , y su interacción con el CO_2 en la planta C_3 .

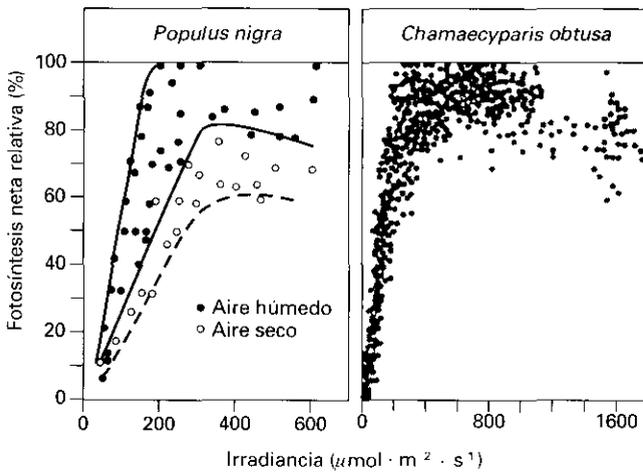


Figura 13-17. Respuesta de la fotosíntesis neta a la luz en diferentes condiciones meteorológicas. Figura de la izquierda: en días nublados con aire húmedo, los valores de la fotosíntesis neta en hojas de *Populus nigra* son superiores a los que se obtienen con la misma irradiancia en días claros con aire seco. Figura de la derecha: el calentamiento de las zonas asimiladoras de *Chamaecyparis obtusa* por la irradiación intensa produce un fuerte gradiente de presión de vapor de agua en relación con el aire exterior, lo que produce un estrés hídrico y una mayor dispersión de las medidas de fotosíntesis a valores altos de irradiancia. (Adaptado de Larcher, W. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, 1995.)

de irradiancia más altos, por lo que, en vez de obtenerse una curva de saturación como en el laboratorio, aparece más bien una curva con un óptimo de luz a partir del cual la fotosíntesis vuelve a decrecer por causa del sobrecalentamiento y el estrés hídrico que éste llega a producir (Fig. 13-17 derecha).

En este sentido, para la interpretación correcta de las observaciones en condiciones naturales, resulta importante determinar qué factor o factores están limitando la fotosíntesis en unas condiciones dadas. Así, el **déficit hídrico** es el mayor factor de limitación, aunque con diferente importancia en C_3 , C_4 y CAM; pero en las latitudes intermedias, el factor de limitación más corriente es la **luz**, debido a la presencia de nubes y al pequeño ángulo con que incide el sol buena parte del año. Las **bajas temperaturas** suelen limitar la fotosíntesis en los otoños e inviernos de los climas templados, mientras que el **excesivo calor**, sólo suele ser importante en zonas áridas y tropicales.

7. FOTOSÍNTESIS EN EL CONTEXTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO

7.1. El aumento de CO_2 atmosférico puede producir una aclimatación de la fotosíntesis

Las actividades humanas como el transporte, la industria, la deforestación, la agricultura, etc., están provo-

cando un aumento de la concentración atmosférica de CO_2 (a razón de casi 2 ppm por año) y de otros gases «invernadero» (metano, etc.). La acumulación de estos gases tiende a calentar la atmósfera, lo que podría conducir, a la larga, a cambios regionales e incluso globales del clima que afectarán a parámetros como la temperatura, las precipitaciones, la humedad del suelo y el nivel del mar. Las previsiones del Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC), basadas en complejos modelos climáticos, indican que la temperatura media de la superficie del planeta y el nivel del mar aumentarán de 1 a 3.5 °C y de 15 a 95 cm, respectivamente, antes del año 2100.

Aún no se conoce bien cómo los cambios de CO_2 , de temperatura y de régimen hídrico afectarán a los ecosistemas terrestres, y las plantas en particular; pero la cuestión es crucial, ya que la vegetación y los bosques pueden asumir un papel fundamental en la mitigación de los efectos del cambio climático, dada su gran capacidad de absorción de CO_2 por fotosíntesis. Se sabe que un aumento de CO_2 produce un incremento inmediato de la tasa de fotosíntesis, especialmente en las plantas C_3 (véanse apartado 2.4 y Figs. 13-2 y 13-3). Sin embargo, cuando las plantas crecen continuamente con CO_2 elevado, tienen lugar cambios bioquímicos que disminuyen la capacidad fotosintética de la hoja, de manera que los grandes incrementos iniciales de la fotosíntesis con alto CO_2 no suelen mantenerse tan elevados cuando pasan semanas o meses. Este fenómeno se conoce como **aclimatación de la fotosíntesis**. En este caso, la pendiente inicial de la curva A/C_i suele ser menor en las plantas crecidas con CO_2 elevado, lo cual es indicativo de que la actividad de la rubisco ha disminuido (véase apartado 2.4). Por tanto, la aclimatación a largo plazo de la fotosíntesis al CO_2 no permite que las plantas puedan expresar al máximo su potencial fotosintético, lo que se ha relacionado con la acumulación de carbohidratos y la reducción de la concentración de enzimas fotosintéticas clave, como la rubisco, que frecuentemente se observan en hojas crecidas con alto CO_2 . En consecuencia, estas hojas presentan una reducción del contenido en N (15-20%) y un aumento de la relación C/N. Esta regulación a la baja (*down-regulation*) de la fotosíntesis aumenta con la duración del período de exposición al CO_2 , y se hace más pronunciada cuando las plantas crecen con niveles limitantes de nutrientes (nitrógeno, fósforo, etc.), o cuando tienen sumideros de carbohidratos de tamaño insuficiente para acoger el exceso de fotoasimilados.

En principio, existen dos razones para justificar esta aclimatación de la fotosíntesis. En primer lugar, la planta puede no ser capaz de usar todos los carbohidratos adicionales que la fotosíntesis a alto CO_2 produce y, por tanto, una reducción de la actividad de las fuentes puede ocurrir (véanse Capítulos 5 y 11). En segundo lugar, la rubisco se requiere en cantidades menores a alto CO_2 para realizar tasas de fotosíntesis similares a las de CO_2 ambiente. El mecanismo molecular de la aclimatación

está relacionado con el incremento de carbohidratos no estructurales, y en particular, de azúcares (hexosas), que afectan de forma poco conocida la transcripción de genes nucleares de proteínas fotosintéticas, como la subunidad pequeña de la rubisco (véase Capítulo 11). Se especula que este mecanismo «sensor» de azúcares también podría desempeñar un papel en la aclimatación de la fotosíntesis a otros factores ambientales, como la luz, el suministro de N y el estrés hídrico.

Debido a la aclimatación, cabría esperar que altas tasas de fotosíntesis a elevado CO_2 sólo podrían ser mantenidas si no existiera limitación alguna por sumideros y nutrientes, aunque esta situación es bastante excepcional en las plantas crecidas en condiciones naturales. Sin embargo, aún puede esperarse un cierto aumento global de la fotosíntesis en una atmósfera futura con alto CO_2 (aunque menos que si no hubiera aclimatación), lo que en conjunto hace que las plantas actúen como **sumideros biológicos** del CO_2 emitido en exceso.

Por tanto, en el contexto del cambio climático, la vegetación no puede ser considerada solamente como un elemento estático o estético de un paisaje, o ser valorada únicamente por su contribución a mantener la biodiversidad, sino que también ha de ser valorada por su contribución clave al mantenimiento de los delicados equilibrios de la atmósfera de nuestro planeta. Estos equilibrios están siendo alterados por las enormes emisiones de dióxido de carbono y de otros gases invernadero resultantes de las actividades humanas, que provocarán con toda seguridad un cambio climático global de consecuencias no del todo previsibles. La conservación de la vegetación, especialmente los bosques, puede ser vital para amortiguar la magnitud de este cambio climático en un mundo futuro con elevado CO_2 .

RESUMEN

En este capítulo, se ha tratado la integración de la fotosíntesis en el medio ambiente siempre cambiante en que tiene lugar. Se ha visto cómo responde al CO_2 , a la luz, a la temperatura y a los nutrientes minerales, y de qué manera las diferentes especies se acomodan a los niveles de estos parámetros que predominan en su ambiente natural. También se ha querido hacer incapié en el hecho de que, en condiciones naturales, todos estos parámetros (y otros, como la humedad y la disponibilidad hídrica) actúan al mismo tiempo sobre la fotosíntesis, interactuando entre sí, de forma que es importante identificar cuál o cuáles de ellos están realmente determinando la tasa fotosintética en cada situación de un medio ambiente cambiante. Finalmente, se ha considerado la posibilidad de una aclimatación a la baja de la fotosíntesis en una atmósfera futura con elevado CO_2 .

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Una hoja presenta una tasa de fotosíntesis neta de 20 μmol de $\text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con el CO_2 ambiental ($C_a = 350 \mu\text{mol}$ de $\text{CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ aire), con una conductancia total al vapor de agua (g_w) de $0.32 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Calcule: a) el CO_2 intercelular (C_i) en las condiciones descritas, y b) la variación del C_i cuando la hoja cierra parcialmente los estomas debido a un ligero estrés hídrico ($g_w = 0.288 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y la tasa de fotosíntesis neta se reduce un 10%.
2. Describa las partes principales de una curva de respuesta de la fotosíntesis neta al CO_2 intercelular (curva A/C_i).
3. Parte de la energía luminosa absorbida por el PSII es reemitida en forma de fluorescencia. ¿Cómo puede utilizarse esta emisión para obtener información sobre las otras vías de disipación de energía?
4. ¿Qué factores afectan a la respuesta de la fotosíntesis neta a la temperatura?
5. ¿De qué manera puede reflejarse en una curva A/C_i de una hoja un cambio en la nutrición nitrogenada de la planta?
6. En condiciones naturales, ¿qué importancia tienen las interacciones entre factores que afectan a la fotosíntesis?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Drake, B. G., González-Meler, M. A., Long, S. P.: «More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO_2 ?» *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 609-639, 1997.
2. Gil, F.: *Elementos de Fisiología Vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 1995.
3. Lambers, H., Chapin, F. S. III., Pons, T. L.: *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, Nueva York, 1998.
4. Larcher, W.: *Physiological Plant Ecology* (3.^a ed). Springer-Verlag, Berlín, 1995.
5. Long, S. P., Humphries, S., Falkowski, P. G.: «Photoinhibition of photosynthesis in nature». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 45: 633-662, 1994.
6. Lüttge, U., Kluge, M., Bauer, G.: *Botánica*. pp. 397-439. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.
7. Moreno, J. M., Oechel, W. C. (eds.): *Global Change and Mediterranean-type Ecosystems*. Ecological Studies 117. Springer-Verlag, Nueva York, 1995.
8. Nobel, P. S.: *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press Inc., San Diego, 1991.
9. Sharkey, T. D.: «Fotosíntesis. Absorción y utilización del dióxido de carbono en un contexto ecológico». En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. J. Azcón-Bieto y M. Talón (eds.). pp. 135-147. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.
10. Schulze, E.-D., Caldwell, M. M. (eds.): *Ecophysiology of Photosynthesis*. Ecological Studies 100. Springer-Verlag, Nueva York, 1995.
11. Wilkinson R. E. (ed.): *Plant-Environment Interactions*. Marcel Dekker Inc. Nueva York, 1994.

FISIOLOGÍA DE LA RESPIRACIÓN DE LAS PLANTAS

Miquel Ribas-Carbó y Miquel Àngel González-Meler

1. Introducción. 2. Vías metabólicas. 3. Regulación de la respiración. 4. Respiración a nivel de planta entera.

1. INTRODUCCIÓN

La respiración vegetal es el conjunto de reacciones mediante las cuales los azúcares sintetizados durante la fotosíntesis son oxidados a CO_2 y H_2O y la energía liberada es transformada mayoritariamente en ATP. Las proteínas y los ácidos grasos también son oxidados, aunque, por lo general, en menor medida que los azúcares. La energía obtenida a través de la respiración, almacenada en forma de ATP, es utilizada para el crecimiento de los órganos vegetales y de la planta, el mantenimiento de las estructuras existentes, el transporte de metabolitos e iones, la regeneración de proteínas y los procesos de reparación. Además de la síntesis de ATP, la respiración genera toda una serie de compuestos de carbono intermedios que son precursores de aminoácidos y otros compuestos de carbono intermedios en la síntesis de ácidos grasos, porfirinas (clorofila, citocromos), pigmentos (carotenoides, flavonoides), pared celular y compuestos aromáticos para la síntesis de lignina (véase Capítulo 17).

El conjunto de reacciones que conforman la respiración comprende la glucólisis, la vía de oxidación de las pentosas fosfato, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la oxidación del poder reductor (NADH) y la fosforilación oxidativa de ADP para la génesis de ATP. En este capítulo se abordan las reacciones que componen la respiración de azúcares, su regulación, su interacción con otras vías de síntesis, la respiración de la planta entera y los efectos causados por los cambios medioambientales sobre la misma.

2. VÍAS METABÓLICAS

Las vías metabólicas de la respiración pueden dividirse en cuatro etapas: en la primera etapa se produce la de-

gradación del almidón y la sacarosa, obtenidos durante la fotosíntesis, para formar fructosa-1,6-bisfosfato. En una segunda etapa, la fructosa-1,6-bisfosfato es oxidada hasta piruvato a través de la vía glucolítica. En una tercera etapa, el piruvato entra en la mitocondria donde es oxidado hasta CO_2 por medio del ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos, produciéndose la mayor parte del NADH. En la cuarta etapa, el NADH es finalmente utilizado por la cadena de transporte electrónico mitocondrial para producir ATP. Asimismo, la vía de las pentosas fosfato complementa la vía glucolítica utilizando la glucosa-6-fosfato como sustrato para dar lugar a fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, ambos intermediarios de la vía glucolítica.

2.1. El almidón es la reserva de carbono más importante como fuente energética

El almidón es el producto de reserva de carbohidratos más importante de toda la planta y se almacena en forma de gránulos insolubles en los plastidios (ya sean cloroplastos o amiloplastos). Su síntesis se lleva a cabo mediante el proceso de la fotosíntesis (véase Capítulo 11) y su estructura química es compleja y ramificada. El **almidón** está formado por unidades amilosa, moléculas de glucosa unidas linealmente mediante enlaces $\alpha(1-4)$ y amilopectina, moléculas de glucosa unidas linealmente mediante enlaces $\alpha(1-4)$ con ramificaciones formadas por enlaces $\alpha(1-6)$ (Fig. 14-1). Esta estructura compleja hace que su degradación deba llevarse a cabo mediante un conjunto de reacciones en las que cooperan diferentes enzimas. Las enzimas principales encargadas de la degradación del almidón son tres: la α -amilasa, la β -amilasa y la almidón fosforilasa, a las que se deben añadir los enzimas desramificantes. En la Figura 14-1 se muestran los puntos de ataque de las diferentes enzimas.

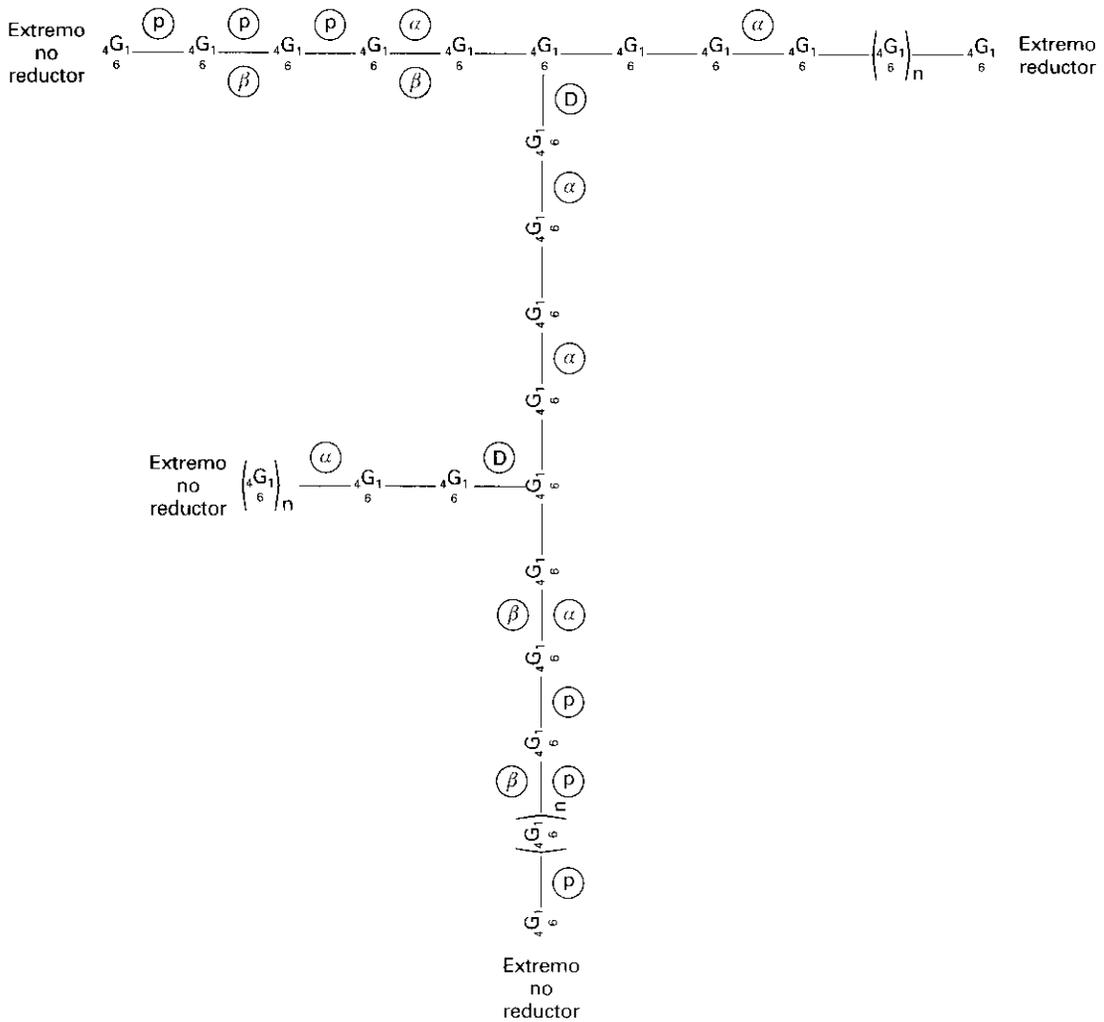
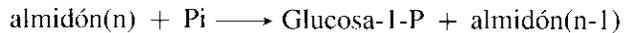


Figura 14-1. Ruptura de los enlaces entre las glucosas (G) que forman la molécula de almidón. Los números indican el carbono de unión a la siguiente molécula de glucosa. El extremo reductor termina con el carbono 1 libre, mientras el extremo no reductor tiene el carbono 4 libre.

P: almidón fosforilasa. α : α -amilasa. β : β -amilasa. D: enzima desramificante.

La α -amilasa es la única enzima que puede atacar los gránulos intactos de almidón para hidrolizar enlaces $\alpha(1-4)$ a discreción, pero no puede degradar los enlaces formadores de ramificaciones $\alpha(1-6)$ ni los enlaces $\alpha(1-4)$ cercanos a éstos. La β -amilasa degrada cadenas de glucosas inicialmente degradadas por la α -amilasa y enlaces $\alpha(1-4)$, pero a partir de los extremos no reductores. Al igual que la α -amilasa, la β -amilasa tampoco puede romper los enlaces ramificantes $\alpha(1-6)$. Las α y β -amilasas producen α y β -maltosa, respectivamente. La maltosa es un disacárido compuesto de dos moléculas de glucosa unidas por un enlace $\alpha(1-4)$, que se hidroliza rápidamente a dos moléculas de glucosa mediante la α -glucosidasa. La almidón fosforilasa también inicia la degradación del almidón por el extremo no reductor, al igual que la β -amilasa. Sin embargo, el producto final de esta reacción produce glucosa-1-fosfato, en lugar de maltosa, mediante la siguiente reacción:



Este tipo de reacción se conoce como degradación fosforilante del almidón, y tiene lugar cuando la concentración de fosfato inorgánico en los plastidios es alta.

Los enlaces ramificantes $\alpha(1-6)$ son específicamente degradados por la dextrinasa límite presente en los plastidios. Una vez rota la ramificación, las amilasas y fosforilasas llevan a cabo la degradación final de la cadena lineal hasta la obtención de glucosa o glucosa-1-fosfato (Fig. 14-1).

2.2. La convergencia de hexosas hacia fructosa-6-fosfato es la primera reacción de la glucólisis

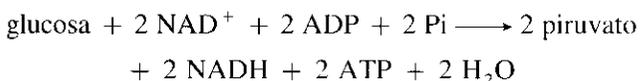
El producto final de la hidrólisis del almidón es la glucosa; sin embargo, la sacarosa es el producto fotosintético.

tico más utilizado para el transporte de carbohidratos a través de la planta (véase Capítulo 5). La **sacarosa** está compuesta por una molécula de glucosa y una de fructosa y las reacciones que dan lugar a su síntesis están explicadas en el Capítulo 11 (véase también Fig. 14-2). Para dar inicio al proceso de la respiración, la sacarosa debe ser inicialmente hidrolizada mediante uno de dos enzimas citosólicos distintos: a) la invertasa (1), o b) la sacarosa sintasa (2) (Fig. 14-2) (véase codificación internacional de las enzimas indicadas con un número entre paréntesis en un anexo al final del capítulo).

Para que las hexosas provenientes del almacenamiento de carbono (almidón y sacarosa) sean metabolizadas por la vía glucolítica, primero deben ser convertidas en fructosa-6-fosfato. La glucosa, que proviene de la hidrólisis del almidón y de la degradación de la sacarosa, se convierte en glucosa-6-fosfato mediante la acción de la hexoquinasa (3) (Fig. 14-2). Esta reacción requiere una molécula de ATP. La glucosa-1-fosfato, que proviene de la degradación fosforilante del almidón, se convierte en glucosa-6-fosfato por la acción de la fosfoglucomutasa (4). En este punto, la glucosa-6-fosfato se transforma en fructosa-6-fosfato mediante la enzima hexosafosfato isomerasa (5). La fructosa obtenida por la degradación de la sacarosa se fosforila por la fructoquinasa (6) para formar fructosa-6-fosfato. De esta manera, se necesita una molécula de ATP por cada hexosa que entra en la vía glucolítica. Esta molécula de ATP se recupera en las siguientes reacciones de la glucólisis. Sin embargo, durante la degradación fosforilante del almidón se produce glucosa-1-fosfato sin gasto de ATP, por lo que su conversión en fructosa-6-fosfato no requiere ATP. Así pues, la degradación fosforilante del almidón ofrece una cierta ventaja energética respecto de la degradación hidrolítica del almidón. Eventualmente, la glucosa-6-fosfato también puede ser convertida en 6-fosfogluconolactona, que es degradada por la vía de las pentosas fosfato como se describe en el apartado 2.4.

2.3. Las reacciones que componen la glucólisis tienen lugar en el citoplasma y sus productos finales son los ácidos pirúvico y málico

Mediante la glucólisis, cada hexosa (monosacárido de seis carbonos) obtenida mediante la degradación de almidón y sacarosa se convierte en dos compuestos de tres carbonos (C_3). La reacción global de la glucólisis es la siguiente:



Sin embargo, la glucólisis de las plantas también puede terminar en compuestos C_4 , como el malato (véase más adelante).

Una relación detallada de todas las reacciones involucradas en la glucólisis se encuentra en la Figura 14-2 con un resumen de las mismas en la Figura 14-3. Estas reacciones (7 a 15) tienen lugar en el citoplasma. El piruvato puede utilizarse posteriormente en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (respiración aeróbica) (apartado 2.5), o en la fermentación anaeróbica (apartado 2.3.1). Tanto el malato como el piruvato son transportados hacia el interior de la mitocondria para formar parte del ciclo de Krebs.

La reacción inicial de la glucólisis parte de la fructosa-6-fosfato que se obtiene de la degradación tanto del almidón como de la sacarosa (apartado 2.2). La fructosa-6-fosfato se convierte en fructosa-1,6-bisfosfato. Esta reacción puede llevarse a cabo por dos enzimas diferentes: la **fosfofructoquinasa** (PFK) (7), que utiliza una molécula de ATP para llevar a cabo tal reacción, de forma irreversible, y la **fosfofructofosfotransferasa** (PFP) (8), que interviene en una reacción reversible en la cual se transfiere fosfato inorgánico entre el pirofosfato (PPi) y la fructosa-1,6-bisfosfato (Fig. 14-2).

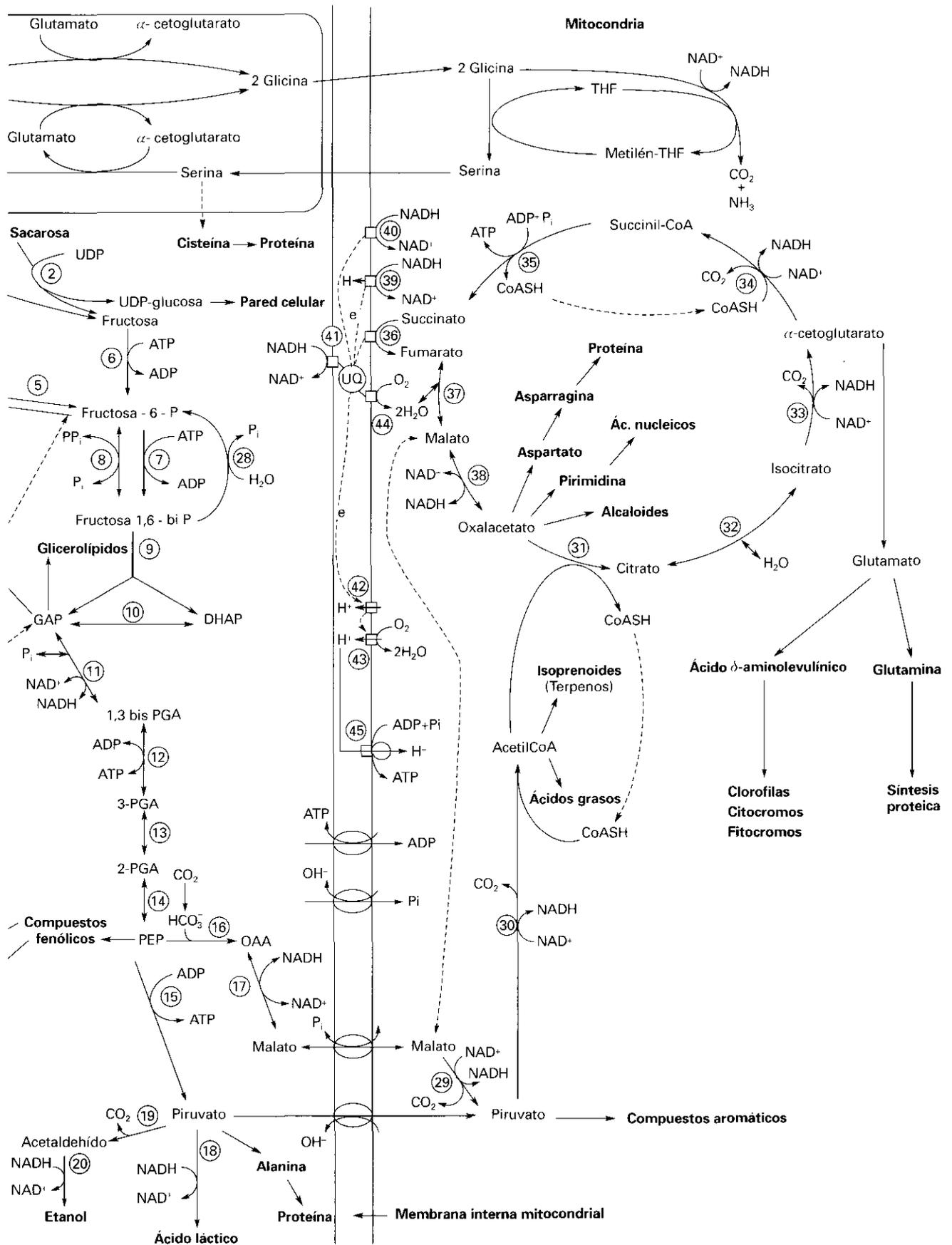
La fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (9) rompe la fructosa-1,6-bisfosfato en dos partes y produce dos triosas fosfato, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3 fosfato (GAP) que pueden interconvertirse mediante la enzima triosa-fosfato isomerasa (10) (Fig. 14-2).

El gliceraldehído-3-fosfato es posteriormente oxidado a glicerato-1,3-bisfosfato mediante una deshidrogenasa (11) con la incorporación de una molécula de fosfato inorgánico. Esta reacción produce la síntesis de una molécula de NADH a partir de una de NAD^+ (Fig. 14-2).

El glicerato-1,3-bisfosfato se convierte en 3-fosfoglicerato (3-PGA) al perder un grupo fosfato para formar una molécula de ATP mediante la reacción reversible de la enzima **3-PGA quinasa** (12) (Fig. 14-2). La fosfoglicerato mutasa (13) transforma el 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato, el cual pasa a fosfoenolpiruvato (PEP) en una reacción reversible catalizada por la enzima enolasa (14). El fosfoenolpiruvato (PEP) pierde el grupo fosfato para pasar a piruvato produciéndose la síntesis de otra molécula de ATP mediante una segunda reacción de **fosforilación a nivel de sustrato**, catalizada por la enzima **piruvato quinasa** (15). Asimismo, el fosfoenolpiruvato (PEP) se puede convertir en oxalacetato por la enzima fosfoenol-piruvato carboxilasa, la cual utiliza bicarbonato como sustrato (16). La malato deshidrogenasa (17) citoplasmática reduce el oxalacetato produciendo **malato**, el cual se puede considerar como producto final de la glucólisis, al igual que el **piruvato**.

2.3.1. El metabolismo del ácido pirúvico viene determinado por la concentración de oxígeno

En condiciones aeróbicas normales, el ácido pirúvico es el sustrato principal del ciclo de Krebs que tiene lugar en la mitocondria. Sin embargo, en condiciones anaeró-



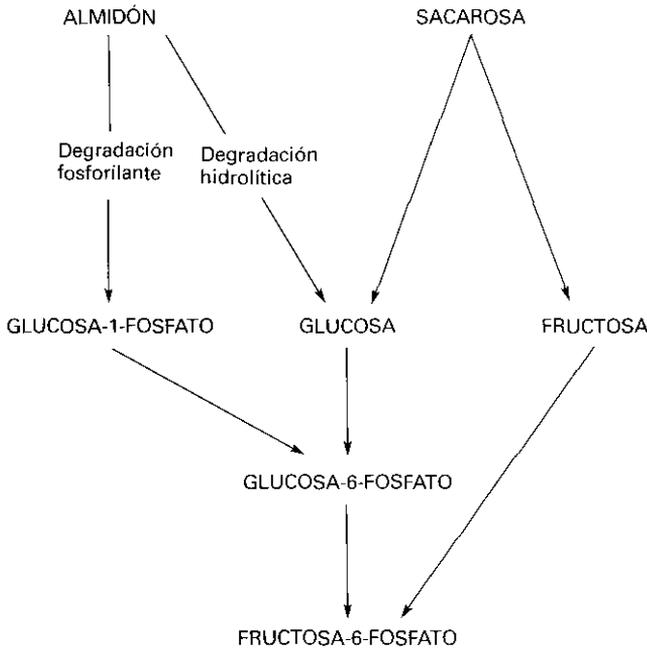


Figura 14-3. Esquema simplificado de las reacciones formadoras de hexosas fosfato que son el sustrato de las vías glucolítica y de las pentosas fosfato. Estas reacciones se encuentran de forma más detallada e integrada en la Figura 14-2.

bicas (falta de oxígeno), el ácido pirúvico se metaboliza a través del proceso de la **fermentación**. La fermentación reduce el ácido pirúvico a ácido láctico por la lactato deshidrogenasa (18) o a etanol mediante las reacciones consecutivas de la piruvato descarboxilasa (19) y la alcohol deshidrogenasa (20), siendo la formación de etanol mayor que la de lactato. En ambos casos, se utiliza una molécula de NADH para llevar a cabo la reducción del ácido pirúvico, con la consiguiente pérdida de eficiencia en la síntesis de ATP. A cambio, se consigue mantener activa la vía glucolítica (véase apartado 4.3.2).

2.3.2. El transporte de los ácidos pirúvico y málico es determinante para la regulación del metabolismo respiratorio

Los ácidos pirúvico y málico deben ser transportados del citosol a la matriz mitocondrial para poder ser utilizados por el ciclo de Krebs (Fig. 14-4). La mitocondria es un orgánulo enmarcado en una doble membrana (Fig. 14-5). La membrana externa es muy permeable. Sin embargo, la membrana interna es altamente impermeable a todo tipo de iones con carga eléctrica debido a su potencial de membrana. Este gradiente protónico existente en la membrana interna mitocondrial se utiliza para el transporte simporte de piruvato y malato ha-

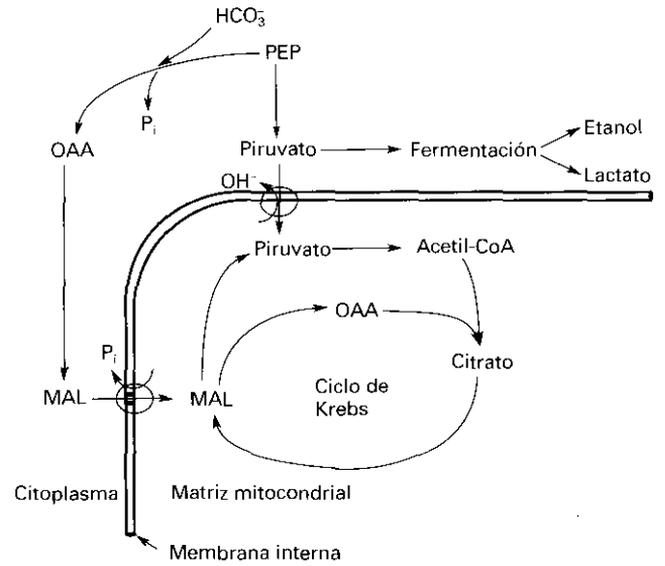


Figura 14-4. Detalle de las vías de entrada de los ácidos pirúvico (piruvato) y málico (MAL) hacia el interior de la mitocondria, así como de los productos fermentativos a partir del piruvato.

cia la matriz mitocondrial, que se intercambian por sendas moléculas de OH^- y de P_i , respectivamente (Fig. 14-4).

2.4. La vía de las pentosas fosfato es la principal productora de NADPH

La vía de las pentosas fosfato (reacciones 21 a 27) está estrechamente relacionada con la vía glucolítica y con la síntesis de ácidos nucleicos, antocianos, ligninas y ácidos grasos entre otros (Fig. 14-2) (véase Capítulo 17). El sustrato inicial es la glucosa-6-fosfato que se deshidrogena a 6-fosfogluconolactona, mediante la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (21), al tiempo que se sintetiza

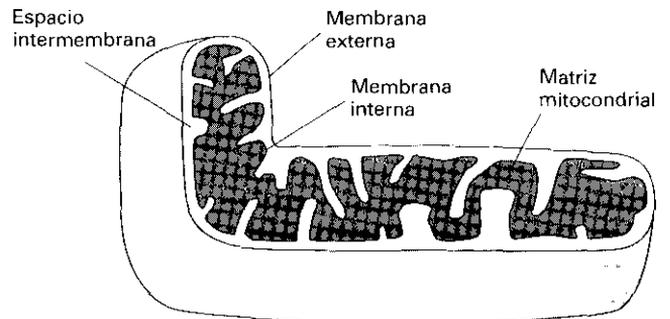


Figura 14-5. Diagrama de un corte longitudinal de la mitocondria vegetal donde se observan la estructura de doble membrana, las crestas y la matriz mitocondrial.

NADPH a partir de NADP^+ . La enzima 6-fosfo-glucano-lactonasa (22) transforma la 6-fosfogluconolactona en 6-fosfogluconato, molécula que es deshidrogenada por la 6-fosfo-gluconato-deshidrogenasa (23), dando lugar a ribulosa-5-fosfato y a una molécula de NADPH. A partir de aquí, existen dos vías paralelas que se entrecruzan. La ribulosa-5-fosfato se puede transformar en xilulosa-5-fosfato por la enzima ribulosa-5-fosfato epimerasa (24), o en ribosa-5-fosfato por la ribulosa-5-fosfato isomerasa (25). La unión de ambas mediante una transcetolasa (26) da lugar a sedoheptulosa-7-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, y estas últimas moléculas se combinan mediante una transaldolasa (27) dando lugar a una molécula de eritrosa-4 fosfato y otra de fructosa-6 fosfato. Finalmente, la eritrosa-4-fosfato puede participar en otra reacción de transcetolación (26) con la xilulosa-5-fosfato, y se produce así una molécula de gliceraldehído-3-fosfato y otra de fructosa-6-fosfato, ambos compuestos intermediarios de la glucólisis (apartado 2.3).

En resumen, la vía de las pentosas fosfato genera NADPH, el cual es un donador de poder reductor para la síntesis de ácidos nucleicos y otros procesos de biosíntesis. Asimismo, esta vía proporciona intermediarios de la vía glucolítica y permite utilizar la glucosa-6-fosfato directamente como fuente de energía.

2.5. El ciclo de Krebs cumple dos funciones elementales: la síntesis de NADH y la formación de precursores de la síntesis de aminoácidos

En la Figura 14-2 se detallan todas las reacciones y enzimas que forman parte del ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs (30 a 38). El ácido málico puede: a) pasar directamente a formar parte del ciclo de Krebs o b) ser oxidado a ácido pirúvico mediante la acción de la **enzima málica mitocondrial** (29) dando lugar a una molécula de piruvato, una de CO_2 y una de NADH. El piruvato, obtenido en la vía glucolítica o a partir del ácido málico, es oxidado por la piruvato deshidrogenasa (30) para dar lugar a una molécula de acetil-CoA, una de CO_2 y una de NADH. La molécula de acetil-CoA se fusiona con una molécula de oxalacetato, proceso mediado por la enzima citrato sintasa (31), produciendo una molécula de ácido cítrico y liberando la coenzima A (CoA, CoASH). A continuación, el citrato pasa a isocitrato por medio de la aconitasa (32). El isocitrato se oxida a ácido α -cetoglutárico por la isocitrato deshidrogenasa (33), liberando una molécula de CO_2 y produciendo una molécula de NADH. El isocitrato vuelve a reducirse por la acción de la α -cetoglutárico deshidrogenasa (34) que le añade una molécula de CoA para formar succinil-CoA, una molécula de CO_2 y producir un NADH. La **succinil-CoA sintasa** (35) cataboliza el paso de succinil-CoA a succinato, sintetizando un ATP a partir de ADP y P_i y liberando la molécula de

CoA (es de destacar que UDP es el sustrato de la succinil-CoA sintasa en animales, y por tanto, se forma UTP). La **succinato deshidrogenasa** (36) oxida el succinato a fumarato. La peculiaridad de esta reacción es que es la única del ciclo de Krebs que se lleva a cabo en la membrana mitocondrial y que, a la vez, forma parte de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Complejo II). En esta reacción se reduce una molécula de ubiquinona (véase apartado 2.6). La fumarasa (37) transforma el fumarato en ácido málico en una reacción reversible. Finalmente, y para cerrar el ciclo, la malato deshidrogenasa (38) convierte el ácido málico en oxalacetato.

En resumen, mediante el ciclo de los ácidos tricarbóxicos se convierte una molécula de ácido pirúvico en 3 moléculas de CO_2 , 4 moléculas de NADH y una molécula de ATP, además de reducirse una molécula de ubiquinona.

2.6. Mediante el transporte electrónico mitocondrial se consigue el gradiente protónico que dará lugar a la síntesis de ATP

La función principal de la cadena de transporte electrónico es convertir el poder reductor, en forma de NADH y succinato, en moléculas de ATP para su posterior utilización en otras reacciones celulares (síntesis, transporte iónico, etc.). Para ello, se utiliza el transporte electrónico a través de las diferentes proteínas insertadas en la membrana interna mitocondrial para translocar protones (H^+) al espacio entre las membranas interna y externa. Este gradiente protónico sirve, posteriormente, para llevar a cabo la síntesis de ATP (Fig. 14-6).

La cadena de transporte electrónico está formada por diversas proteínas redox que en su mayoría forman parte de grandes complejos proteicos insertados en la membrana, por lo que el transporte electrónico entre estos complejos se lleva a cabo mediante dos moléculas más móviles: la ubiquinona y el citocromo c. Las moléculas de NADH son oxidadas por las deshidrogenasas de NADH. Existen diversas NADH deshidrogenasas, pero sólo la correspondiente al Complejo I (39) está acoplada al transporte de protones al exterior de la membrana y, en consecuencia, acoplada a la síntesis de ATP. Existen otras NADH deshidrogenasas adicionales que oxidan el NADH de la matriz mitocondrial (40) o del citosol (41). Tanto el Complejo I (39), como las otras NADH deshidrogenasas (40-41), reducen la molécula de **ubiquinona** (Fig. 14-6).

La succinato deshidrogenasa (36), enzima que a la vez forma parte del ciclo de Krebs (véase apartado 2.5), también reduce la molécula de ubiquinona. Sin embargo, esta reducción no conlleva trasiego de protones a través de la membrana (Fig. 14-6), y, por tanto, no se genera gradiente de H^+ .

Las moléculas de ubiquinona reducida transfieren los

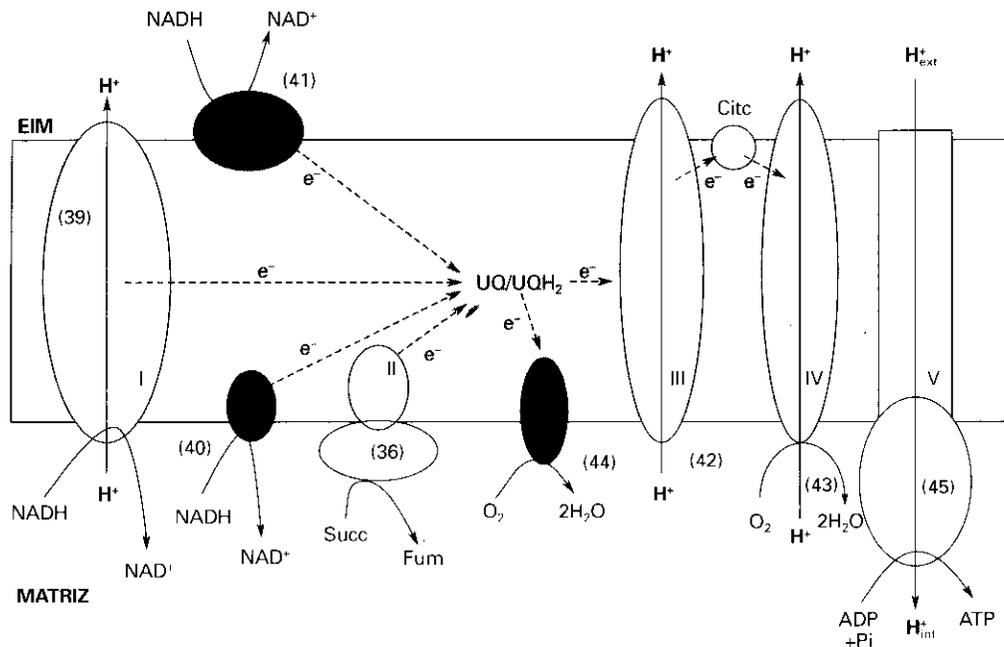


Figura 14-6. Esquema de la cadena de transporte electrónico en la membrana interna mitocondrial. Las líneas discontinuas representan el movimiento de electrones, y las líneas continuas representan el movimiento de protones. Los números de cada enzima corresponden a la lista del anexo al capítulo. La estequiometría del transporte de protones a través de los distintos complejos proteicos no se da.

Abreviaturas: EIM: espacio intermembranoso; UQ: UQH₂; ubiquinona ubiquinol.

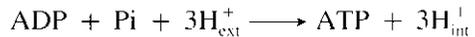
electrones desde las deshidrogenasas a las oxidasas. En plantas existen dos vías terminales de oxidación, la vía citocrómica y la vía alternativa. La vía citocrómica está compuesta por dos complejos proteicos, el complejo **citocromo b/c₁** o complejo III (42) (el cual es análogo al complejo citocromo b₆/f de los tilacoides, Capítulos 9 y 10) y el complejo **citocromo c oxidasa** o complejo IV (43). El complejo III oxida la ubiquinona reducida (o ubiquinol) y reduce el citocromo c, mientras que el complejo IV oxida el citocromo c y reduce el oxígeno para formar agua. Ambos complejos III y IV transportan protones hacia el exterior de la membrana mitocondrial, por lo que la energía asociada a este transporte electrónico es, finalmente, aprovechada para la síntesis de ATP (véase Fig. 14-6).

La **vía alternativa** recibe su nombre por ser alternativa a la **vía citocrómica**, con la que compite por los electrones de la ubiquinona, para reducir el oxígeno a agua (Fig. 14-6). Sin embargo, la **oxidasa alternativa** (44) no transporta protones hacia el exterior de la membrana, por lo que toda la energía asociada a la oxidación de ubiquinol se pierde en forma de calor (véase apartado 2.6.2).

2.6.1. La fosforilación oxidativa aprovecha el gradiente protónico para llevar a cabo la síntesis de ATP

La fuerza creada por los protones (**fuerza protón-motriz**) al volver a la matriz mitocondrial, se utiliza para la síntesis de ATP. La llamada **fosforilación oxidativa** se

basa en la reacción final, que materializa la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi). La síntesis de ATP se lleva a cabo a través de la enzima **ATP sintasa** (45) (la cual es análoga a la de cloroplastos, Capítulos 9 y 10), y cuya reacción global es la siguiente:



Por tanto, se considera que por cada 3H⁺ translocados de la matriz mitocondrial al espacio intermembranoso durante el transporte de electrones se producirá una molécula de ATP a partir de la ATP sintasa, cuando estos protones vuelven otra vez a la matriz mitocondrial (int) por la ATP sintasa.

2.6.2. Las plantas son resistentes al cianuro gracias a la existencia de una oxidasa alternativa

Una de las características diferenciales de la respiración de las plantas en relación con la de animales superiores, es su **resistencia al cianuro**. Esta característica es debida a la presencia de una enzima adicional que reduce el oxígeno a agua utilizando electrones provenientes de la ubiquinona reducida como fuente de poder reductor, ya que coexiste con la citocromo c oxidasa sensible al cianuro (véase apartado 2.6). Durante el transporte de electrones a través de esta vía «alternativa» de respiración no existe transporte de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranoso, perdiéndose toda la energía en forma de calor. La función fisiológica de

esta oxidasa alternativa es todavía desconocida, y es un tema de profundo debate. La única función que hasta el momento se le atribuye, está relacionada con la floración de los espádice de la familia de las aráceas. En este caso muy particular, y en el momento de la floración, el espádice respira la mayor parte de sus reservas a través de la **oxidasa alternativa**, produciéndose un elevado aumento de la temperatura del espádice, que puede llegar a ser hasta 10 °C por encima de la temperatura ambiente. Este aumento de temperatura produce un desprendimiento de compuestos aromáticos volátiles que atraen a los insectos para llevar a cabo la polinización.

Durante muchos años se ha creído que la vía citocrómica estaba termodinámicamente favorecida, mientras que la vía alternativa era sólo activa cuando la vía citocrómica estaba saturada o inhibida. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las dos vías compiten directamente por los electrones procedentes de la ubiquinona reducida. El ácido pirúvico es un fuerte estimulador metabólico de la actividad de la oxidasa alternativa, cuando la enzima está en estado reducido (véase apartado 3.1).

2.7. El conjunto de reacciones de las vías metabólicas respiratorias tiene lugar de forma simultánea con una importante interacción fisiológica

2.7.1. Las vías metabólicas de respiración comparten sustratos y productos

En la Figura 14-2 se puede observar el elevado nivel de interacción existente entre todas las vías metabólicas de la respiración anteriormente detalladas. Es muy importante reconocer este hecho, debido a que la regulación de una vía puede depender directa o indirectamente de la actividad de las demás vías. Diferenciaremos estas relaciones metabólicas entre dos grupos de células, las fotosintéticas y las no fotosintéticas.

En las células fotosintéticas, donde tiene lugar la fijación de CO₂ y la formación de glicolato en el proceso de fotorrespiración (véanse Capítulos 11 y 12), encontramos una estrecha relación entre esta fotorrespiración y la cadena de transporte electrónico mitocondrial. En el paso de glicina a serina tiene lugar la producción de una molécula de NADH. Este NADH puede ser posteriormente oxidado en la cadena de transporte electrónico (CTE) mitocondrial, por lo que la actividad de la CTE mitocondrial afectará a la reacción de síntesis de serina y, en consecuencia, a la fotorrespiración.

En todas las células, ya sean fotosintéticas o no fotosintéticas, existen también muchas interacciones entre las diferentes vías metabólicas de respiración, entre las que destacamos algunas:

- La vía glucolítica y la de las pentosas fosfato tienen varios puntos en común. En un principio, al

degradarse la sacarosa, se forman una glucosa y una fructosa que se convierten en glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, sustratos de la vía de las pentosas fosfato y la glucólisis, respectivamente, y que pueden intercambiarse mediante la enzima hexosafosfato isomerasa (5). Asimismo, los productos de la vía de las pentosas fosfato son el 3-P-gliceraldehído y la fructosa-6-P, ambos intermedios de la vía glucolítica.

- La vía glucolítica y el ciclo de Krebs mantienen una estrecha relación debido a que el producto de la glucólisis (piruvato) es el sustrato inicial del ciclo de Krebs. Un aspecto importante del piruvato es su transporte al interior de la mitocondria y las diferentes reacciones de las cuales el ácido pirúvico es sustrato (Fig. 14-4). Así pues, el piruvato puede entrar en la mitocondria y ser oxidado por la piruvato deshidrogenasa (30) para entrar en el ciclo de Krebs. Asimismo, el proceso de la fermentación puede reducir el piruvato a etanol o ácido láctico, con la correspondiente pérdida de una molécula de NADH (apartado 2.3.1).
- El ciclo de Krebs y la cadena de transporte electrónico (CTE) mitocondrial también guardan una estrecha relación. En primer lugar, el producto principal del ciclo de Krebs (NADH) es uno de los sustratos principales de la CTE mitocondrial y en segundo lugar, una de las enzimas del ciclo de Krebs, la succinato deshidrogenasa (36), se encuentra en la membrana mitocondrial formando simultáneamente parte intrínseca de la cadena de transporte electrónico (Complejo II), poniendo de manifiesto la estrecha relación entre las dos vías metabólicas.

2.7.2. Muchos de los intermediarios de las vías metabólicas respiratorias son sustratos para la biosíntesis de otros compuestos esenciales

Muchos de los productos intermedios de la respiración son sustratos, o fuente de energía de las vías de síntesis de muchos otros productos (Figs. 14-2 y 14-7). Entre los intermediarios de la vía glucolítica, las hexosas proporcionan esqueletos de carbono para la síntesis de productos que se utilizan en la formación de la pared celular (véase Capítulo 1). Las triosas fosfato son la base de los glicerolípidos y de aminoácidos, como serina o cisteína, que se utilizan en la síntesis de las proteínas. El fosfoenolpiruvato (PEP) es el sustrato para la síntesis de compuestos fenólicos, como la tirosina, la fenilalanina o las auxinas (véase Capítulo 17). Finalmente, a partir del ácido pirúvico, se produce el aminoácido alanina. En cuanto a los componentes del ciclo de Krebs, encontramos que a partir del ácido α -cetoglutarico, se sintetiza el ácido glutámico, a partir del cual se forman la clorofila, los citocromos y los fitocromos. A partir del

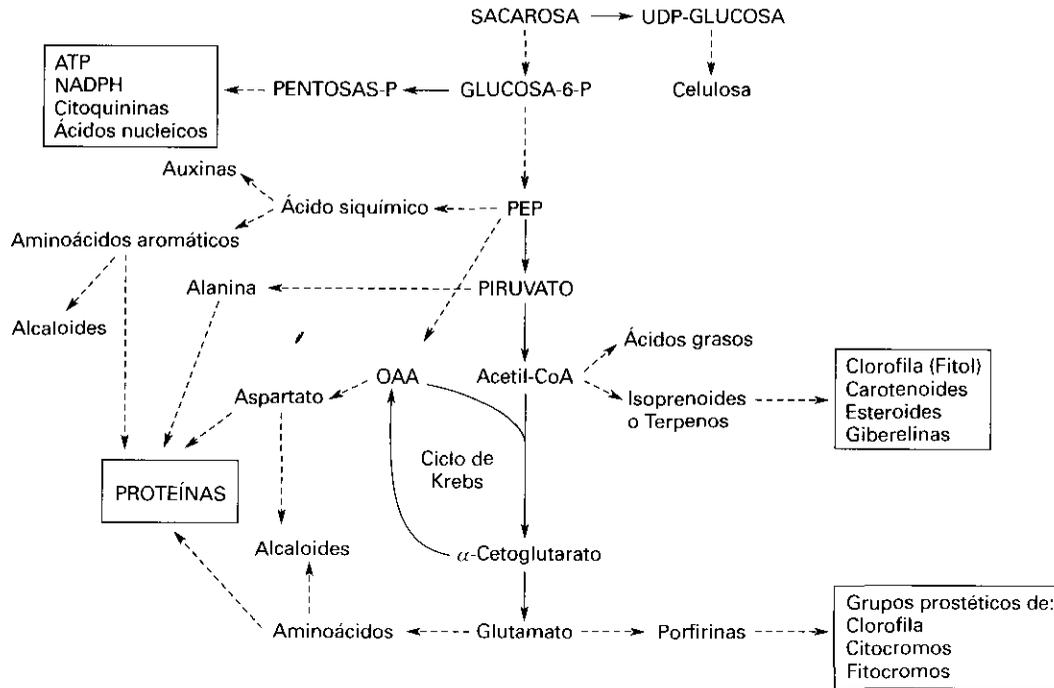


Figura 14-7. Interacción entre los compuestos intermediarios respiratorios y la síntesis de diversos compuestos primarios y secundarios.

ácido oxalacético se forma el ácido aspártico, el cual genera la asparagina y las pirimidinas esenciales para la síntesis de los ácidos nucleicos. Asimismo, el ciclo de las pentosas fosfato forma la ribosa-5-fosfato, esencial para la síntesis de ácidos nucleicos. La eritrosa-4-fosfato se utiliza en la síntesis del ácido siquímico (véase Capítulo 17), mientras que el NADPH generado en el ciclo de las pentosas fosfato es vital para todas las reacciones de biosíntesis que se llevan a cabo en las células.

3. REGULACIÓN DE LA RESPIRACIÓN

3.1. La regulación bioquímica de la respiración dependerá del balance entre las diferentes vías

Por regla general, las enzimas más fuertemente reguladas de una vía metabólica suelen ser las que intervienen al final de la misma, así como en los puntos de interacción con otras vías metabólicas. Además, los sustratos y productos de cada reacción suelen llevar a cabo una regulación de la enzima que los usa o produce, respectivamente.

La primera reacción fuertemente regulada en la vía glucolítica es la del paso de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato y viceversa. El balance global de la actividad de las tres enzimas que lo catalizan (véase Fig. 14-2) determina cuál de las dos vías, la glucólisis (consumo de glucosa) o la gluconeogénesis (síntesis de glucosa), es la predominante. Todos los intermedia-

rios de la vía glucolítica, pero de forma especial el fosfoenolpiruvato (PEP), inhiben la fosfofructoquinasa (PFK) (7) de modo retroactivo. Asimismo, el ATP y NADH también inhiben la actividad de la PFK, mientras que el Pi actúa de activador. La fructosa-2,6-bisfosfato activa la enzima fosfofructofosfotransferasa (PFF) (8) e inhibe la fructosa-1,6-bisfosfatasa (28) (véase Fig. 14-2).

Otro punto fuertemente regulado de la glucólisis es el paso de fosfoenolpiruvato a piruvato mediante la piruvato quinasa (15). Esta reacción es activada por ADP e inhibida por ATP. Además, debe tenerse en cuenta que una acumulación de piruvato disminuye la velocidad de reacción. El piruvato puede utilizarse de diferentes formas, por lo que constituye también un punto de regulación. La disponibilidad del oxígeno desempeña un papel importante en la utilización del piruvato en la fermentación, tal y como se detalla en el apartado 2.3.1. Además, el transporte del piruvato hacia el interior de la mitocondria también es un punto de regulación de la respiración (Fig. 14-4). Hay que tener en cuenta que el paso de la piruvato quinasa puede ser sorteado por la PEP carboxilasa (16), la malato deshidrogenasa (17) y la enzima málica mitocondrial (29), de manera que el PEP se transforma a piruvato finalmente en la mitocondria (véase Figs. 14-2 y 14-4).

La vía de las pentosas fosfato exhibe un punto clave de regulación en su inicio. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (21) es inhibida por NADPH y estimulada por NADP^+ . Así, la actividad de esta vía se ve estimulada en situaciones de síntesis aumentada de compues-

tos derivados de los intermediarios de la propia vía de las pentosas fosfato (apartado 2.4) o de otras vías de síntesis que utilizan NADPH.

El ciclo de Krebs muestra una fuerte regulación en su reacción inicial. La enzima piruvato deshidrogenasa (30) está altamente regulada por mecanismos de fosforilación. La enzima está desactivada en estado fosforilado, mientras que está activada en estado desfosforilado. Una concentración elevada de ATP causa una desactivación de la piruvato deshidrogenasa y, en consecuencia, una disminución de la actividad global del ciclo de Krebs. La mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs lleva asociada la formación de NADH o ATP, por lo que una elevada concentración de NADH o ATP significará una reducción de su actividad por falta de sustrato (NAD^+ o ADP). Otra de las enzimas claves en el ciclo de Krebs es la succinato deshidrogenasa (36), que transfiere el poder reductor a la ubiquinona de la membrana mitocondrial. La actividad de esta reacción se ve disminuida si el estado de reducción de la ubiquinona es elevado, con lo que se produce un entortecimiento del ciclo de Krebs.

La cadena de transporte de electrones tiene diversos puntos de control. Aquellas reacciones que llevan a cabo el trasiego de protones (H^+) hacia el espacio intermembranoso (Complejos I (39), III (42) y IV (43)) se ven afectadas por el gradiente protónico existente entre este espacio y la matriz mitocondrial. Asimismo, el estado de reducción del *pool* de ubiquinona también controla la actividad tanto de las deshidrogenasas como de las oxidasas terminales. Finalmente, la ATP sintasa (45), que está regulada principalmente por la disponibilidad de sus sustratos ADP y Pi, es la que regula de forma activa el gradiente de protones transmembrana y, por ende, determina en parte la actividad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (**control respiratorio**). Sin embargo, se debe tener en cuenta la existencia de deshidrogenasas y oxidasas que no están ligadas al transporte de protones a través de la membrana (véase apartado 2.6), lo que las hace independientes del control metabólico de ADP y Pi.

La oxidasa alternativa está compuesta por dímeros que pueden formar puentes disulfuro. La actividad oxidasa alternativa es mayor cuando los puentes disulfuro están reducidos. Además, los α -cetoácidos, especialmente el piruvato, son activadores de la oxidasa alternativa reducida. La función de estas vías se desconoce, pero dotan a la respiración de una gran **flexibilidad metabólica**.

Es importante tener en cuenta que, en plantas, la síntesis de ATP no es la única función de la respiración y que pueden existir situaciones en las que sea necesario mantener el metabolismo respiratorio activo, para obtener esqueletos de carbono, aun cuando la concentración de ATP sea alta. En estos casos, las vías «alternativas» pueden desempeñar un papel importante en el metabolismo respiratorio.

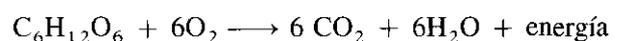
3.2. La regulación fisiológica de la respiración viene determinada por la disponibilidad de sustrato carbonado y de ADP

Es importante remarcar que no todos los tejidos ni todas las células de una planta son fotosintéticos y que dependen del aporte de compuestos de carbono por parte de otras células fotosintéticas que les proporcionen la energía necesaria para subsistir. Esto es posible porque la respiración vegetal proporciona tanto los intermediarios necesarios para la biosíntesis, como la energía necesaria para que esta biosíntesis tenga lugar e implica que la respiración en plantas es regulada por la presión de sustrato carbonado disponible y por la demanda energética de ATP del tejido o la planta. Por un lado, la presión de fotoasimilados «empuja» los compuestos de carbono hacia las vías metabólicas de la respiración, mientras que la demanda energética «tira» de los compuestos de carbono por las vías respiratorias para sintetizar ATP. Por ejemplo, una planta en fase de crecimiento rápido tiene una demanda energética alta y sus tasas respiratorias aumentarán si dispone de suficiente sustrato (se supone que no hay limitación por falta de ADP). Al mismo tiempo, habrá una mayor demanda de fotoasimilados para la producción de ATP y de precursores de carbono para el crecimiento. Si, por el contrario, la demanda energética es baja, la respiración estará reducida y controlada principalmente por la disponibilidad de ADP. Este mecanismo de balance entre «empujar y tirar» se puede resumir en la disponibilidad de sustrato carbonado y de ADP como factores claves de la regulación fisiológica de la respiración vegetal.

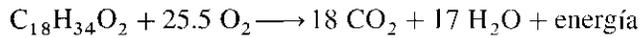
4. RESPIRACIÓN A NIVEL DE PLANTA ENTERA

4.1. El cociente respiratorio es un indicador del tipo de sustrato utilizado

Los flujos metabólicos que convergen en la mitocondria para la síntesis de ATP dan pie a la emisión de dióxido de carbono y el consumo de oxígeno además de producir agua y calor. La producción de CO_2 proviene de la oxidación de compuestos de carbono como generación de electrones que reducen el O_2 para formar H_2O . Tanto la emisión de CO_2 como el consumo de O_2 pueden ser utilizados para medir la tasa de respiración de las plantas. Si se mide simultáneamente el intercambio gaseoso entre CO_2 y O_2 se puede calcular el **cociente respiratorio (RQ)**, que es la relación entre las moléculas de CO_2 emitido y las moléculas de O_2 utilizado. En el caso de la oxidación de la glucosa, el volumen de O_2 consumido es igual al volumen de CO_2 producido, según la siguiente ecuación:



y el valor de RQ ($6 \text{ CO}_2/6 \text{ O}_2$) es 1.0. Por lo general, cuando una planta respira carbohidratos, el valor de RQ es cercano a la unidad. Si, por el contrario, el compuesto oxidado es un ácido graso como, por ejemplo, el ácido oleico:



el RQ para esta reacción es de $18 \text{ CO}_2/25.5 \text{ O}_2 = 0.71$. Si los sustratos respiratorios son ácidos orgánicos, el valor de RQ tendrá un valor mayor que la unidad porque el grado de oxidación de estos compuestos es mayor que el de los azúcares.

Así, el valor RQ es una medida dependiente del contenido de carbono, hidrógeno y oxígeno que tiene el sustrato respiratorio utilizado. La respiración de la mayoría de las semillas tiene un $\text{RQ} < 1$ durante la germinación, lo que indica que se están utilizando las reservas grasas (compuestos poco oxidados) para producir energía. En hojas, el valor medio de RQ es 1.05, sugiriendo que el sustrato respiratorio mayoritario son los azúcares. El RQ también refleja la actividad de otros procesos metabólicos. Por ejemplo, durante la reducción asimilatoria del nitrato se producen simultáneamente ácidos orgánicos y CO_2 (véase Capítulo 15) lo que conlleva un valor de $\text{RQ} > 1$. Como caso extremo se encuentran las raíces que forman asociaciones simbióticas para asimilar el nitrógeno atmosférico y cuya respiración tiene valores de $\text{RQ} \approx 1.5$.

4.2. La tasa respiratoria de las plantas depende del tipo de órgano, del estado metabólico y de la edad de la planta

En términos generales, un tejido vegetal o una planta respira más cuanto mayor es su **demanda energética**. Tejidos, órganos o plantas jóvenes, en pleno crecimiento, experimentan mayores tasas de respiración específica (es decir, expresada por unidad de biomasa) que cuando los mismos tejidos están completamente desarrollados. La alta tasa de respiración específica de tejidos y plantas jóvenes es debida a la alta demanda de esqueletos de carbono para crear las nuevas estructuras vegetales, al reciclaje del poder reductor metabolizado durante su biosíntesis y a la alta demanda energética para sostener la tasa de crecimiento vegetativo. A medida que la planta se desarrolla y envejece, esta demanda se reduce y la tasa de respiración específica también disminuye.

La respiración específica de las semillas en estado de latencia es muy baja (entre 0.003 y 0.01 $\mu\text{moles de CO}_2$ por gramo de peso seco y hora). Durante la imbibición de las semillas, la tasa respiratoria aumenta ligeramente. Durante el crecimiento del embrión, la respiración aumenta enormemente. Para la mayoría de las plantas herbáceas, éste es el estado de desarrollo donde la respiración específica alcanza valores máximos.

Cuadro 14-1. Tasas de respiración específica de distintos tejidos completamente desarrollados en grupos de plantas diferentes. Las tasas de respiración citadas son indicadores de tasas medias mínimas y máximas correspondiente a especies vegetales diferentes, medidas a unos 20°C de temperatura

	Respiración específica <i>μmoles de CO₂ por gramo de peso seco y hora</i>
Semillas (latencia)	0.003-0.01
Hojas	
plantas herbáceas	50-150
arbustos de sotobosque	6-35
árboles	
caducifolios	30-100
coníferas	5-20
Raíces finas	20-350
Frutos	
climatéricos	1.5-4.8
no climatéricos	0.8-3.0
Espádice de las aráceas	1000

En tejidos meristemáticos foliares, la respiración puede llegar a consumir hasta un 10% de su biomasa seca durante el período nocturno. La tasa respiratoria por unidad de biomasa de las hojas que se forman a partir del meristemo, se reduce hasta llegar a un valor constante una vez que la hoja ha llegado a su estado de maduración completa (Fig. 14-8). Durante su desarrollo, la respiración foliar puede disminuir en más de un 60%. En este estadio de máximo desarrollo de la hoja, los procesos respiratorios consumen menos del 1.5%

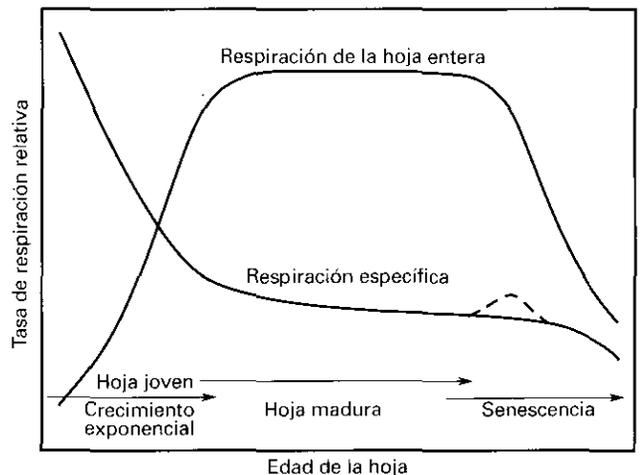


Figura 14-8. Curva de la respiración de una hoja desde su emergencia hasta su senescencia. La respiración específica por unidad de biomasa disminuye durante el desarrollo de la hoja. En algunas hojas se observa un ligero incremento en la respiración al inicio de la senescencia, como el representado por la línea discontinua. Sin embargo, la respiración total de la hoja entera aumenta a medida que la hoja incrementa su biomasa.

de su peso seco durante la noche. Existe gran variabilidad en la tasa de respiración foliar específica entre grupos funcionales de vegetación. Las hojas de especies agrícolas son las que respiran a mayor velocidad, mientras que las hojas de coníferas o plantas que viven en condiciones de luz muy bajas son las que tienen las tasas de respiración más bajas (Cuadro 14-1). Durante la senescencia (véase Capítulo 28), la respiración foliar es variable. Por lo general, la respiración disminuye rápidamente al iniciarse la senescencia. Sin embargo, en algunos casos, se observa un pequeño incremento en la respiración, seguido por una rápida disminución (Fig. 14-8).

La respiración de los tejidos reproductores se ha estudiado poco. Se considera que el ápice o primordio floral puede llegar a respirar casi todo el carbono que recibe de la planta, como en el caso del trigo. Un caso particular de tejidos reproductores es el del espádice de las aráceas durante el período de floración (véase apartado 2.6.2). En estos espádices, la respiración específica (alrededor de 1000 μmol de CO_2 por gramo de peso seco y hora) es unas cien mil veces mayor que en las semillas y entre diez y cien veces mayor que en las hojas. La respiración ha sido más estudiada durante el proceso de llenado de las semillas (véase Capítulo 27). Por ejemplo, la respiración en los granos de los cereales disminuye durante el proceso de llenado, debido a que los carbohidratos son almacenados en los tejidos de reserva y no son utilizados en los procesos metabólicos. En el caso de llenado de semillas de las legumbres, se observa que la respiración está limitada por la disponibilidad de sustrato (hexosas) (apartado 3.2). La respiración llega a valores muy bajos durante el secado de las semillas.

La respiración de frutos jóvenes, durante la fase de crecimiento es alta, aunque disminuye rápidamente antes del proceso de maduración (Fig. 14-9). Ciertos frutos carnosos, como el plátano o la manzana, tienen una respuesta respiratoria durante la maduración conocida como climatérica. Al inicio de la maduración de los **frutos climatéricos**, la respiración aumenta de forma muy rápida, coincidiendo con aumentos en la producción de etileno que estimula la maduración. Las características organolépticas de los frutos climatéricos se desarrollan durante este período de incremento de respiración. En el caso de **frutos no climatéricos**, como es el caso de los cítricos o de la uva, no se observa un aumento respiratorio durante la maduración, la cual es menos sensible a los niveles de etileno (véase Capítulo 26).

La tasa de respiración de las raíces depende de la actividad fotosintética de la planta. Cuanto más alta es la tasa de fotosíntesis, mayor es el aporte de carbohidratos a las partes subterráneas de la planta. De esta manera, la disponibilidad de sustrato es el principal determinante para la respiración de las raíces. Se ha observado que durante la noche, o en períodos donde la tasa fotosintética es baja, la respiración de las raíces disminuye. La respiración de las raíces también depende del estado de desarrollo de la planta. Tras la germinación de la semilla, las raíces deben crecer rápidamente para soste-

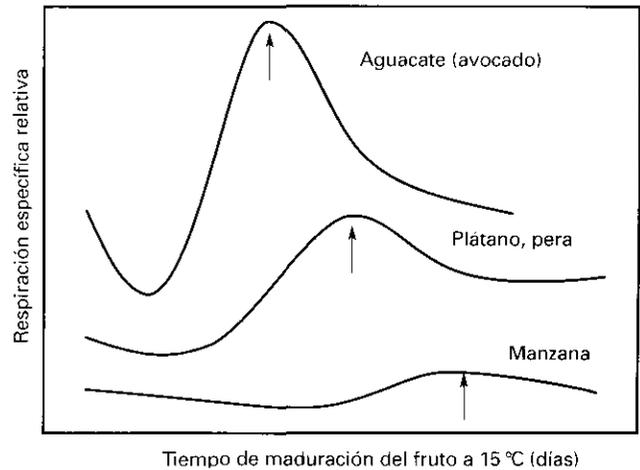


Figura 14-9. Típica curva de la respiración durante el proceso climatérico de los frutos. La respuesta climatérica de los frutos, indicada con una flecha en la figura, es más pronunciada en unos frutos que en otros. La duración de la respuesta climatérica también varía de unos frutos a otros entre 10 y 30 días.

ner la planta y absorber los nutrientes necesarios para el crecimiento. Aunque estas dos funciones se mantienen a lo largo de la vida de la planta, la tasa respiratoria disminuye desde los estados iniciales y pasa a depender del aporte de sustrato. Hacia el final de la vida de la planta, las raíces dejan de crecer y su tasa respiratoria específica disminuye.

4.3. La tasa respiratoria está influenciada por factores ambientales

Como se ha descrito, la respiración de los distintos órganos vegetales o de la planta entera depende de la edad del tejido o de la planta y de su estado de desarrollo. La respiración de las plantas también está enormemente influenciada por factores abióticos como la temperatura, los niveles de oxígeno, la concentración de dióxido de carbono, o la disponibilidad de agua y de nutrientes, entre otros. La tasa respiratoria de una planta que crece bajo unas condiciones ambientales específicas determina la cantidad de energía utilizable que puede ser invertida en procesos de crecimiento, de desarrollo y de mantenimiento de la planta. Por tanto, la cantidad de compuestos de carbono destinada a procesos respiratorios tiene un gran impacto sobre la producción neta de biomasa, y puede desempeñar un papel importante en la productividad vegetal en términos de interés económico en agricultura.

4.3.1. La respiración y la temperatura están en relación directa

Uno de los factores abióticos más significativos que afectan a la tasa respiratoria es la temperatura. Indepen-

dientemente de la tasa absoluta de respiración, incrementos en la temperatura generan incrementos exponenciales de la respiración.

El efecto de la temperatura sobre la respiración se puede cuantificar a través del **coeficiente de temperatura, o factor Q_{10}** , el cual refleja los cambios en la tasa de respiración por cada 10 °C de cambio en la temperatura a través de la expresión:

$$Q_{10} = \frac{\text{Respiración a la temperatura } (T + 10) \text{ } ^\circ\text{C}}{\text{Respiración a la temperatura } T \text{ } ^\circ\text{C}}$$

Para la mayoría de las plantas y los tejidos, el valor del factor Q_{10} respiratorio varía entre 1.9 y 2.8 cuando la respiración se mide entre 5 y 30 °C. Un valor de Q_{10} respiratorio de 2.0 significa que la tasa de respiración a 20 °C es el doble que la tasa respiratoria medida a 10 °C. Este valor coincide con el valor de factor Q_{10} de la mayoría de reacciones enzimáticas. Sin embargo, el valor Q_{10} respiratorio no es constante y varía sustancialmente a temperaturas extremas. A temperaturas muy bajas (menores de 5 °C), las membranas de los distintos compartimentos celulares pierden fluidez, lo que hace que el efecto de la temperatura sobre la respiración sea menor ($Q_{10} \approx 1.0$). A temperaturas muy altas (superiores a los 40 °C), el valor Q_{10} también disminuye hasta el valor de 1.0 porque la respiración empieza a ser limitada por la disponibilidad de oxígeno. La solubilidad del oxígeno disminuye a medida que la temperatura aumenta y la difusión del oxígeno dentro del tejido (con un factor $Q_{10} = 1.1$) no es suficiente para compensar el incremento en la actividad de las enzimas respiratorias. A temperaturas superiores a 45 °C, la respiración decae hasta pararse debido a la desnaturalización de las proteínas y a la disgregación de las membranas.

El factor Q_{10} respiratorio también varía ligeramente según el origen ecológico de la planta y depende de la temperatura de crecimiento. A grandes rasgos, las plantas de climas cálidos suelen tener valores respiratorios de Q_{10} cercanos a 2.5-3.0, mientras que en plantas de climas fríos el valor de Q_{10} de la respiración es algo menor, alrededor de 2.0.

Aparte del factor Q_{10} respiratorio, la temperatura de crecimiento también influye en la respiración vegetal. Al comparar la respiración de plantas adaptadas a regiones climáticas muy dispares, se ha observado las tasas de respiración específica medidas en las condiciones de crecimiento son muy parecidas entre sí. Es decir, la tasa de respiración de una hoja de una planta originaria de climas árticos medida a 4 °C es muy parecida a la tasa de respiración de una hoja de un árbol originario de climas tropicales medida a 30 °C. Esta es una indicación de que la respiración mantiene una cierta homeostasis respecto a la temperatura de crecimiento, lo que podría ser un mecanismo de adaptación y aclimatación de las plantas, tanto a las variaciones locales del clima como a las distintas regiones climáticas del planeta.

4.3.2. *La disponibilidad de oxígeno, en ciertas condiciones de crecimiento, limita la tasa respiratoria*

El oxígeno es el aceptor final de electrones durante el transporte electrónico mitocondrial y, como tal, su disponibilidad en el interior del tejido puede limitar la tasa respiratoria. El contenido de oxígeno en el aire es del 21 %, y la concentración de oxígeno en fase acuosa (como el citoplasma) a 25 °C es de 253 μM . Dado que la constante de Michaelis-Menten (K_m) para el oxígeno de la citocromo *c* oxidasa y de la oxidasa alternativa es inferior a 10 μM (lo que indica una alta afinidad), el oxígeno no limita la respiración en condiciones normales. Sin embargo, existen ciertas situaciones en las que el oxígeno podría limitar la tasa respiratoria. Por ejemplo, en tejidos compactos, como frutos o tubérculos con una baja relación superficie-volumen, la difusión del oxígeno hacia las células interiores del tejido es muy lenta respecto a la demanda de oxígeno por parte de las oxidasas respiratorias.

Existen mecanismos de adaptación a bajos niveles de oxígeno en tejidos que, con cierta frecuencia, se encuentran en hipoxia o anoxia. Uno de estos mecanismos es la expansión de los espacios intercelulares para formar espacios aéreos o aerénquimas en tejidos donde la difusión de oxígeno puede ser limitante. En raíces, estos aerénquimas pueden llegar a ocupar más de un 45 % del volumen total del tejido. Sin embargo, en los tubérculos de patatas, los espacios intercelulares representan menos del 2 % del volumen total. La finalidad de los aerénquimas es absorber el oxígeno del suelo o del aire y favorecer un intercambio gaseoso rápido y más eficiente entre las células que se encuentran alrededor. En condiciones extremas de raíces de plantas que viven en terrenos inundados o pantanosos, como es el caso de los arrozales, el intercambio gaseoso entre el aerénquima de las raíces y el aire exterior se realiza a través de los tallos, donde la conexión raíz-tallo es permeable al dióxido de carbono y al oxígeno. Este mecanismo es compartido por muchas especies que viven en zonas que siempre están inundadas o que se inundan frecuentemente. La concentración de oxígeno en los aerénquimas de raíces en casos como el del arroz puede llegar a mantenerse entre el 10 y el 16 %. Además, la estructura de la raíz no facilita que el agua desplace el aire de los aerénquimas, por lo que el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior de los aerénquimas queda garantizado. En condiciones naturales, la tolerancia a la anoxia prolongada por este tipo de especies vegetales es mayor cuando la temperatura y la tasa respiratoria son bajas y cuando las raíces o rizomas contienen suficientes reservas de carbono. La formación de aerénquimas es inducida por eventos de anoxia o hipoxia prolongada debido a la acumulación de etileno en las raíces anaeróbicas, lo que provoca la rotura de células del córtex de la raíz.

Otra adaptación a bajos niveles de oxígeno es la for-

mación de neumatóforos. Los neumatóforos son raíces que crecen por encima de la superficie del agua, recogiendo oxígeno del aire y difundiéndolo hacia las raíces que se encuentran sumergidas. Este es el caso de los manglares, árboles que viven en lagos de clima tropical. Otras especies responden a condiciones de anoxia radicular formando raíces adventicias a partir de los tallos. En general, las plantas que no tienen mecanismos para tolerar la anoxia son sensibles a las inundaciones y pueden llegar a morir por asfixia de las raíces, o por acumulación de compuestos derivados de la respiración anaeróbica (fermentación) si la inundación es prolongada.

4.3.3. El dióxido de carbono inhibe la tasa respiratoria

Cuando plantas u órganos vegetales son expuestos a atmósferas ricas en dióxido de carbono, la tasa respiratoria puede llegar a reducirse considerablemente. La respiración puede inhibirse cerca de un 50% a los pocos minutos de aumentar la concentración de dióxido de carbono desde los niveles atmosféricos normales (del 0.036%) hasta niveles de entre 1 y 5% en aire. Otra característica de este efecto rápido y directo del dióxido de carbono sobre la respiración es que se trata de un fenómeno reversible: cuando la concentración de dióxido de carbono disminuye hasta los valores iniciales, la tasa respiratoria también recupera su valor original. Aun cuando el mecanismo inhibitorio del dióxido de carbono no se conoce bien, este fenómeno sirve para la conservación y el almacenamiento de frutos climatéricos en cámaras antes de su distribución. Al inhibirse la respiración del fruto, en condiciones de dióxido de carbono elevado, no se producen ni etileno, ni aumento climatérico de la respiración, de manera que el proceso de maduración del fruto se retrasa considerablemente (apartado 4.2).

4.4. Los gastos respiratorios de carbono revierten en el crecimiento y el mantenimiento de la planta

La economía del carbono de una planta, es decir, la ganancia neta de biomasa, no sólo depende de la de fotosíntesis (ganancias de carbono), sino también de la utilización de los fotoasimilados en procesos respiratorios (pérdidas de carbono). La respiración utiliza el carbono para producir la energía necesaria para mantener y aumentar la biomasa existente. Una planta consume, en procesos respiratorios, entre la mitad y las tres cuartas partes de los carbohidratos producidos por la fotosíntesis. Una gran proporción de esta respiración se da en las raíces, ya que éstas respiran entre un 20 y un 40% del total de los fotoasimilados producidos por la planta durante el día. Esto significa que la respiración es un com-

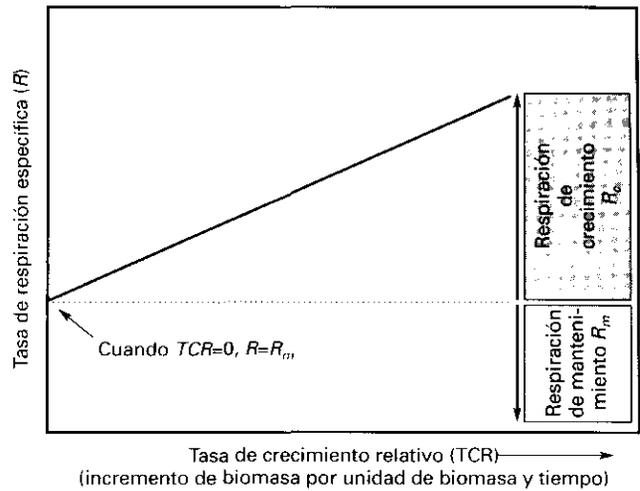


Figura 14-10. Respiración de crecimiento y de mantenimiento en función de la tasa de crecimiento relativo de la planta (expresado como aumento de biomasa por unidad de biomasa existente y unidad de tiempo). Al extrapolar la recta obtenida con datos de crecimiento (TCR) y de respiración (R) hasta que el valor de la tasa de crecimiento es cero, se obtiene el valor de la respiración de mantenimiento (R_m), es decir, el valor de R cuando el valor de TCR es cero. Asumiendo que la respiración de mantenimiento es constante, la diferencia entre este valor de respiración de mantenimiento (R_m) y la respiración total (R) representa el componente de crecimiento de la respiración (R_c) para cada valor dado de tasa de crecimiento relativo (TCR).

ponente muy importante para la economía del carbono de la planta entera.

Al comparar la tasa de crecimiento (aumento de biomasa por unidad de tiempo) de una planta, se observa que cuanto más rápido es el crecimiento, mayor es su tasa respiratoria. Esta observación permite distinguir dos tipos de respiración: 1) la **respiración de crecimiento**, que refleja los costes de carbono asociados a la producción de energía metabólica (poder reductor y ATP) utilizada durante la biosíntesis y el crecimiento; y 2) la **respiración de mantenimiento**, que refleja los gastos de energía que se invierten en procesos que no determinan una ganancia neta de biomasa orgánica, como son el recambio de enzimas, el mantenimiento de la estructura de las membranas y la incorporación y transporte de nutrientes inorgánicos. La Figura 14-10 describe la relación entre estos dos tipos de respiración. A medida que la tasa de crecimiento de la planta aumenta, también aumentan la tasa de respiración específica y la proporción de respiración de crecimiento respecto de la mantenimiento. En plantas cuya tasa de crecimiento es cero, toda la respiración estará destinada a procesos de mantenimiento.

Los gastos de mantenimiento son mucho mayores en las raíces debido a que los procesos de absorción de nutrientes son energéticamente costosos. En condiciones normales, las raíces utilizan una tercera parte del carbono que reciben de la parte aérea para sintetizar la energía necesaria para crecer, mantenerse y absorber

nutrientes. En condiciones limitantes de nutrientes, las raíces pueden llegar a respirar más del 70 % del total de los fotoasimilados que reciben durante el día de la parte aérea de la planta. Bajo estas condiciones limitantes para el crecimiento, la planta tiende a promover un mayor crecimiento de las raíces con el fin de explorar un mayor volumen de suelo en busca de nutrientes. Los costes de mantenimiento de las raíces en condiciones limitantes de nutrientes también son proporcionalmente mayores, debido a que hay una mayor cantidad de raíces que mantener.

Si se pudieran minimizar los costes respiratorios de mantenimiento, las plantas podrían destinar más carbono al crecimiento, mejorando la **economía del carbono**. Cuando se compara la respiración de diferentes genotipos de un cultivar, se ha observado que existe una relación inversa entre crecimiento y respiración. Es decir, genotipos que tienen una tasa de respiración baja crecen más rápido. Esto es debido a que los genotipos de crecimiento más rápido tienen costes de mantenimiento más bajos, de manera que la mayor parte de la energía producida por la respiración se destina a procesos de crecimiento. Una de las estrategias para mejorar la producción de cultivos es seleccionar genotipos que tengan bajo coste de respiración de mantenimiento.

Otra estrategia para mejorar la producción vegetal es optimizar la eficiencia respiratoria. La existencia de una oxidasa alternativa mitocondrial (véase apartado 2.6.2) hace que la respiración no convierta todo el carbono oxidado en forma de ATP con el máximo acoplamiento energético, sino que se libere energía en forma de calor. Si ésta y otras vías fútiles de la respiración no estuvieran activas, la conversión energética se maximizaría y la respiración sería más eficiente. A pesar del enorme potencial para la mejora agrícola a través de la manipulación de la respiración, se deben resolver algunas cuestiones fundamentales sobre la funcionalidad de la vía alternativa y otros aspectos de la fisiología de la respiración para comprender qué pasos se deben seguir para que esta mejora tenga lugar.

RESUMEN

La respiración celular, o respiración de oscuridad, es un proceso metabólico complejo que consiste en la utilización oxidativa de sustratos ricos en energía para producir ATP u otras formas adecuadas para sustentar el trabajo metabólico. Estos sustratos pueden derivar de reservas de carbohidratos, lípidos y proteínas, aunque en las plantas, los principales sustratos respiratorios son los carbohidratos producidos en la fotosíntesis (sacarosa y almidón). Aparte de la síntesis de ATP, existen otras funciones directamente relacionadas con el metabolismo respiratorio, como ser el origen de una serie de compuestos intermedios que son precursores biosintéticos en otras vías metabólicas (por ejemplo, vías del metabolismo nitrogenado, del metabolismo secundario, etc.).

En este capítulo, se han presentado desde el punto de vista bioquímico, las vías respiratorias con sus reacciones y su regulación, y también se han considerado las principales diferencias con la respiración de animales superiores, como la existencia de la oxidasa alternativa mitocondrial. Asimismo, se ha hecho un énfasis especial en la relación existente entre las vías respiratorias y las demás vías metabólicas, los productos que comparten y las importantes interacciones de regulación que se producen ejercen mutuamente. Desde el punto de vista fisiológico, se ha descrito la regulación de la respiración a nivel de planta entera, la importancia del sustrato respiratorio utilizado, el tipo de órgano, el estado de crecimiento y la edad de la planta. Asimismo, se han presentado los efectos de factores ambientales, como la temperatura o la composición de gases de la atmósfera. Finalmente, se ha hecho un estudio de la utilización de los productos respiratorios para el crecimiento y el mantenimiento de la planta.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Dé al menos dos razones importantes de por qué los componentes de la fosforilación oxidativa se encuentran en la membrana interna de la mitocondria en vez de estar en forma soluble en el citoplasma o en la matriz mitocondrial.
2. ¿Cuál es el nivel máximo y el nivel mínimo de síntesis de ATP cuando se oxida 1 mol de glucosa?
 - a) en presencia de oxígeno;
 - b) en ausencia de oxígeno.
3. ¿De qué manera se podría mejorar la productividad vegetal a través de la manipulación de la respiración?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Amthor, J. S. *Respiración and Crop Productivity*. Springer-Verlag, Nueva York, 1989.
2. Day, D. A., Copeland, L.: «Respiración». Azcón-Bieto J., Talón M. (eds.). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. pp. 173-191. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid 1993.
3. González-Meler, M. A., Drake, B. G., Azcón-Bieto, J.: «Rising atmospheric carbon dioxide and plant respiration». A. I. Breymeyer, D. O. Hall, J. M. Melillo, G. I. Ågren, eds. *Global Change: Effects on Coniferous Forests and Grasslands*. SCOPE, vol. 56. pp. 161-181. John Wiley & Sons Ltd., UK 1997.
4. Hobson, G. E.: «Maduración del fruto». Azcón-Bieto, J., Talón, M. (eds.). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. pp. 463-478. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, 1993.
5. Lambers, H., Chapin III, F. S., Pons, T. L.: *Plant Physiological Ecology*. pp. 96-238. Springer, Nueva York, 1998.
6. Plaxton, W. C.: «The organization and regulation of plant glycolysis». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 185-214, 1996.

7. Ribas-Carbó, M., Berry, J. A., Yakir, D., Giles, L., Robinson, S. A., Lennon, A. M., Siedow, J. N. «Electron partitioning between the cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria». *Plant Physiol.* 109:829-837, 1995.
8. Salisbury, F. B., Ross, C. W.: *Plant Physiology* (4.^a ed.) pp. 266-288. Wadsworth Publishing Company, 1996.
9. Davies, D. D.: *The Biochemistry of Plants. Vol. 2. Metabolism and Respiration*. Academic Press, Inc. Nueva York, 1980.

Cuadro anexo. Enzimas del metabolismo respiratorio

1. Invertasa	(EC. 3.2.1.26)
2. Sacarosa sintasa	(EC. 2.4.1.13)
3. Hexoquinasa	(EC. 2.7.1.1)
4. Fosfoglucomutasa	(EC. 5.4.2.2)
5. Hexosafosfato isomerasa	(EC. 5.3.1.9)
6. Fructoquinasa	(EC. 2.7.1.4)
7. Fosfofructoquinasa	(EC. 2.7.1.11)
8. Fosfofructofosfotransferasa	(EC. 2.7.1.90)
9. Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	(EC. 4.1.2.13)
10. Triosa-fosfato isomerasa	(EC. 5.3.1.11)
11. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	(EC. 1.2.1.12)
12. Glicerato-3-fosfato quinasa	(EC. 2.7.2.3)
13. Fosfoglicerato mutasa	(EC. 5.4.2.1)
14. Enolasa	(EC. 4.2.1.11)
15. Piruvato quinasa	(EC. 2.7.1.40)
16. Fosfoenolpiruvato carboxilasa	(EC. 4.1.1.31)
17. Malato deshidrogenasa (citosólica)	(EC. 1.1.1.37)
18. Lactato deshidrogenasa	(EC. 1.1.1.27)
19. Piruvato descarboxilasa	
20. Alcohol deshidrogenasa	(EC. 1.1.1.1)
21. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	(EC. 1.1.1.49)
22. 6-Fosfo-glucono-lactonasa	(EC. 3.1.1.31)
23. 6-Fosfo-gluconato-deshidrogenasa	(EC. 1.1.1.44)
24. Ribulosa-5-epimerasa	(EC. 5.1.3.1)
25. Ribulosa-5-P isomerasa	(EC. 5.3.1.6)
26. Transcetolasa	(EC. 2.2.1.1)
27. Transaldolasa	(EC. 2.2.1.2)
28. Fructosa-1,6-bisfosfatasa	
29. Enzima málica	
30. Complejo piruvato deshidrogenasa	
31. Citrato sintasa	(EC. 4.1.3.7)
32. Aconitasa	(EC. 4.2.1.3)
33. Isocitrato deshidrogenasa	(EC. 1.1.1.41)
34. α -Cetoglutarato deshidrogenasa	(EC. 1.2.4.2)
35. Succinil-CoA sintasa	(EC. 6.2.1.5)
36. Succinato deshidrogenasa (Complejo II)	(EC. 1.3.99.1)
37. Fumarasa	(EC. 4.2.1.2)
38. Malato deshidrogenasa (mitocondrial)	(EC. 1.1.1.37)
39. NADH deshidrogenasa (Complejo I)	
40. NADH deshidrogenasa interna insensible a rotenona	
41. NADH deshidrogenasa externa	
42. Complejo citocromo b/c ₁ (Complejo III)	
43. Citocromo c oxidasa (Complejo IV)	
44. Oxidasa alternativa	
45. ATP sintasa (Complejo V)	

ASIMILACIÓN DEL NITRÓGENO Y DEL AZUFRE

José María Maldonado, Eloísa Agüera y Rafael Pérez Vicente

1. Introducción. 2. Asimilación del nitrógeno. 3. Asimilación del azufre.

1. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno y el azufre constituyen dos de los elementos químicos más abundantes en la materia viva (véase Capítulo 6). La razón N/S en la biomasa vegetal es de alrededor de 20, que es, aproximadamente, la proporción de ambos elementos en las moléculas de proteína. Todos los aminoácidos contienen nitrógeno, mientras que el azufre se encuentra en los aminoácidos cisteína y metionina. Ambos elementos se hallan presentes, además, en otras importantes biomoléculas. Los animales, a diferencia de las plantas, no son capaces de usar formas inorgánicas de nitrógeno o de azufre, por lo que necesitan ingerir formas orgánicas de dichos elementos, principalmente en forma de proteínas.

El nitrógeno y el azufre inorgánicos presentes en los suelos experimentan cambios en sus estados de oxidación como resultado de la actividad metabólica de diversos grupos de bacterias. En suelos aireados se encuentran principalmente en sus formas más oxidadas, esto es, como nitrato (NO_3^-) y como sulfato (SO_4^{2-}). Las plantas tienen la capacidad de reducir el nitrato y el sulfato a amonio (NH_4^+) y a sulfuro (H_2S) o tiol ($-\text{SH}$), respectivamente, e incorporar dichas formas reducidas a moléculas orgánicas. Estos procesos se denominan **asimilación del nitrato** y **asimilación del sulfato**. Las algas, cianobacterias (algas verde-azuladas) y muchas bacterias y hongos también asimilan el nitrato y el sulfato. Existen otros grupos de bacterias -anaerobias estrictas- que utilizan el nitrato o el sulfato, en lugar del oxígeno, como aceptores terminales de electrones en la oxidación de sustratos orgánicos, con lo que producen formas reducidas de nitrógeno o de azufre. En estos casos, la reducción del nitrato y del sulfato no tiene una finalidad asimiladora sino respiratoria.

2. ASIMILACIÓN DEL NITRÓGENO

Los dos procesos biológicos por los que el nitrógeno inorgánico es convertido en nitrógeno orgánico, son la fijación del nitrógeno molecular (N_2) y la asimilación del nitrato. Aunque el gas dinitrógeno presente en la atmósfera constituye el mayor reservorio de nitrógeno inorgánico disponible, sólo ciertos procariotas —en estado libre o en asociación con algunas plantas (principalmente leguminosas)—, son capaces de fijar y asimilar dicha forma de nitrógeno (véase Capítulo 16). La asimilación del nitrato consta de tres etapas: 1) absorción; 2) reducción del nitrato a amonio; y 3) incorporación del amonio a esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos, proceso que recibe el nombre específico de **asimilación del amonio**.

2.1. La absorción del nitrato es un proceso que requiere energía metabólica

La absorción del nitrato por la planta disminuye a bajas temperaturas, en anaerobiosis y en presencia de inhibidores de la respiración, lo que demuestra que es un proceso dependiente de energía metabólica. La absorción del nitrato se caracteriza, además, porque muestra una típica cinética de saturación, lo que indica que su transporte a través del plasmalema de las células de la raíz es facilitado por una permeasa o **proteína transportadora** (véase Capítulo 7). Dicha permeasa se induce por la presencia de nitrato.

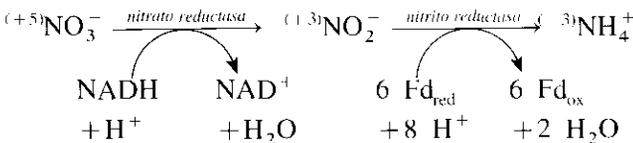
Muchas especies vegetales muestran dos sistemas de absorción de nitrato. El primero de ellos, inducible por nitrato, tiene una alta afinidad por dicho anión ($K_m < 100 \mu\text{M}$) y se satura a concentraciones externas inferior-

res a 1 mM. El segundo, que es especialmente operativo a concentraciones externas de nitrato superiores a 1 mM, no muestra cinética de saturación. Todo ello sugiere que el primer sistema está constituido por permeasas y el segundo por canales iónicos.

Las medidas de los cambios que experimenta el potencial de membrana de las células de la raíz durante la absorción del nitrato, y su dependencia del pH externo, han permitido proponer que el nitrato es transportado al interior celular mediante un mecanismo de **simporte** $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ (Fig. 15-1). El gradiente de potencial electroquímico de H^+ a través del plasmalema, necesario para sustentar dicho simporte, es mantenido por una H^+ -ATPasa que transporta unidireccionalmente H^+ al exterior con la energía del ATP proveniente de la respiración de las células de la raíz.

2.2. La reducción del nitrato a amonio tiene lugar mediante dos reacciones consecutivas

En primer lugar, el nitrato es reducido a nitrito por la enzima **nitrato reductasa** (NR). Dicha reacción consume dos electrones suministrados por una molécula de piridín-nucleótido reducido. Seguidamente, el nitrito es reducido a amonio por la **nitrito reductasa** (NiR) en una reacción que requiere seis electrones donados por la ferredoxina (Fd) reducida:



El poder reductor requerido se genera en las reacciones lumínicas de la fotosíntesis o en la glucólisis y respiración (véase el apartado 2.5).

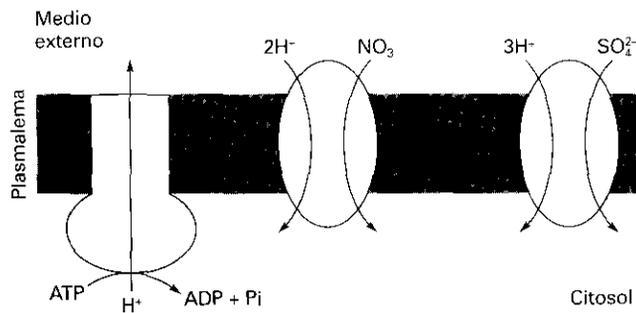


Figura 15-1. Mecanismos de transporte del nitrato y del sulfato a través del plasmalema. El gradiente electroquímico de protones requerido para el transporte activo de ambos iones es mantenido por una ATPasa que, con la energía del ATP, transporta protones al exterior (adaptado de Maldonado, 1993).

2.2.1. Nitrato reductasa

El poder reductor para la reducción del nitrato en algas y plantas superiores es suministrado por piridín-nucleótidos reducidos, siendo el NADH la forma más común. Algunas plantas, como la cebada, poseen dos isoformas de NR: una que es específica de NADH y otra que puede usar tanto NADH como NADPH como donador de electrones. La NR se localiza en el citosol, aunque en algunas especies se ha descrito que parte de la enzima también se puede encontrar unida débilmente al plasmalema o a la membrana externa del cloroplasto.

La NR es un homodímero con una masa molecular de 200-230 kDa. Cada una de las dos subunidades (100-115 kDa) contiene FAD, hemo (citocromo b_{557}) y un cofactor de molibdeno (MoCo) como grupos prostéticos redox. El MoCo es un complejo entre un átomo de molibdeno y una pterina fosforilada, y es similar al que se encuentra en otras molibdoenzimas, tales como la xantina deshidrogenasa y la aldehído oxidasa, pero distinto al de la dinitrógeno reductasa, el cual contiene hierro además de molibdeno (véase Capítulo 16). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la NR y su comparación con las secuencias conocidas de otras proteínas han permitido identificar en la molécula tres fragmentos funcionales de 28 kDa, 14 kDa y 75 kDa que se corresponden con los dominios del FAD, hemo y MoCo, respectivamente. Los tres dominios están unidos entre sí por regiones bisagras hidrófilas que son muy susceptibles al ataque de proteasas. Los electrones suministrados por el NADH son transportados, a través de los grupos FAD, hemo y MoCo, hasta el nitrato que, como resultado, es reducido a nitrito. En la Figura 15-2 se muestra la estructura de la molécula de NR y la transferencia interna de electrones desde el NADH al nitrato.

La NR es codificada por un único gen. Las dos isoformas de NR existentes en la cebada son codificadas por genes estructurales distintos. La biosíntesis del MoCo y su posterior ensamblaje a la apoenzima están controlados por entre tres y seis genes (según la especie) que son esenciales, por tanto, para la formación de NR activa.

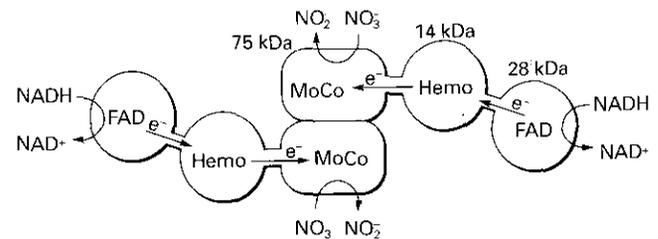


Figura 15-2. Modelo estructural y funcional de la nitrato reductasa de plantas. En cada una de las dos subunidades de la enzima se diferencian tres regiones (correspondientes a cada dominio de los tres grupos prostéticos) que se hallan unidas entre sí por regiones de bisagra sensibles a proteasas. Las flechas indican la dirección del flujo de electrones desde el NADH hasta el nitrato.

2.2.2. Nitrito reductasa

La NiR cataliza la reducción de nitrito a amonio en una reacción de seis electrones que son suministrados por ferredoxina reducida. Se encuentra en hojas y en raíces, localizándose exclusivamente en cloroplastos o en plastidios. La NiR de plantas es un monómero con una masa molecular de 60-63 kDa. Contiene un centro sulfoférrico del tipo [4Fe-4S] y un sirohemo como grupos prostéticos redox involucrados en la transferencia de los electrones de la ferredoxina reducida al nitrito:



El sirohemo es una tetrahidroporfirina de hierro del tipo de la isobacterioclorina que también se encuentra en la enzima sulfito reductasa (véase apartado 3.2).

Al igual que otras muchas proteínas cloroplásticas, la NiR es codificada por un gen nuclear y sintetizada en el citosol en forma de una proteína precursora que posee en su extremo N-terminal un fragmento de unos 30 aminoácidos que constituye el péptido de tránsito. Dicho péptido actúa como señal de paso a través de la envoltura del cloroplasto, escindiéndose posteriormente y liberándose en el interior la proteína madura (Fig. 15-3).

2.3. La absorción y reducción del nitrato son procesos sometidos a diversos mecanismos de regulación

La absorción y posterior reducción del nitrato por las plantas están reguladas por diferentes señales ambientales y metabólicas, principalmente la luz, el nitrato y diversas formas reducidas de nitrógeno y de carbono.

El nitrato promueve la síntesis *de novo* de su proteína de transporte a través del plasmalema. Dicho transporte se halla regulado negativamente por la presencia de amonio o de otras formas reducidas de nitrógeno, como la glutamina. Una elevada concentración interna de nitrato también ejerce un control negativo sobre su propia absorción.

El nitrato es también la principal señal que controla la síntesis de NR y de NiR. En efecto, la adición de nitrato a las plantas produce en las mismas un notable incremento de las actividades NR y NiR. Ambas son dos enzimas **inducibles por nitrato**, aunque en algunas especies se observan unos bajos niveles constitutivos. Tras la adición de nitrato se produce un rápido aumento de la cantidad de mRNA de la NR y de la NiR como resultado de la activación de la transcripción de los respectivos genes (Fig. 15-3). Además, el nitrato también ejerce un control positivo postranscripcional incrementando la estabilidad de los mRNA y de las proteínas enzimáticas sintetizadas *de novo*.

Aunque el nitrato es el inductor primario de la expresión de la NR y la NiR, **la luz incrementa la transcrip-**

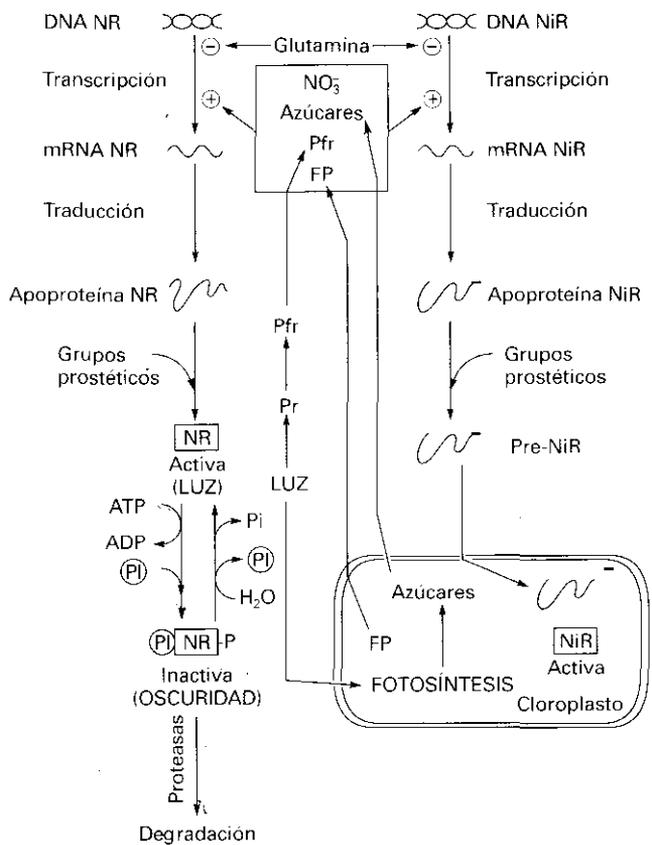


Figura 15-3. Mecanismos de regulación de la síntesis y de la actividad de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. Dichos mecanismos comprenden la modulación positiva o negativa de la transcripción génica por diversos metabolitos y señales y la regulación de la actividad de la nitrato reductasa en respuesta a cambios luz/oscuridad. FP: factor plastídico; NiR: nitrito reductasa; NR: nitrato reductasa; Pi: fosfato inorgánico; PI: proteína inactivadora; Pr y Pfr: formas inactiva y activa, respectivamente, del fitocromo.

ción de ambos genes y el nivel de las proteínas que codifican. Este efecto estimulador de la luz está mediado por el **fitocromo** (véase Capítulo 23). La luz también ejerce su efecto regulador a través de productos de la fijación fotosintética del CO₂. En efecto, la adición de distintos azúcares (glucosa, fructosa o sacarosa) a hojas mantenidas en oscuridad ocasiona un aumento de la síntesis de mRNA similar al producido por la luz, especialmente en el caso de la NR. Por otra parte, el nitrógeno reducido en forma de glutamina o de glutamato reprime la síntesis de los mRNA de la NR y la NiR. Así pues, la inducción de la transcripción de los genes de ambas enzimas parece estar regulada por el balance interno entre azúcares solubles y aminoácidos, lo que constituye una prueba de que el metabolismo del nitrógeno y el del carbono están regulados entre sí.

La expresión de los genes de la NR y la NiR precisa, además, de un «factor plastídico», de naturaleza aún desconocida, que actúa como señal primaria para que el nitrato y la luz puedan activar la transcripción. Este factor plastídico es también requerido para la activación

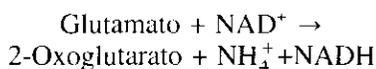
por la luz de la transcripción de genes nucleares que, como el de la NiR, codifican proteínas del cloroplasto. En este aspecto, la NR, a pesar de ser una enzima citosólica, se comporta como si fuese cloroplástica, posiblemente porque desde un punto de vista funcional está íntimamente conectada al metabolismo fotosintético del cloroplasto. En los tejidos vegetales existen proteasas con una alta especificidad por la NR, por lo que el nivel de esta enzima dependería de sus tasas relativas de síntesis y degradación.

Los mecanismos de regulación descritos afectan a la cantidad de NR y NiR en la célula. La NR está sujeta, además, a un mecanismo de regulación de su actividad por activación/inactivación en respuesta a los cambios luz/oscuridad. Estos cambios rápidos de actividad son el resultado de una fosforilación reversible de la molécula (Fig. 15-3). En oscuridad, la NR es fosforilada en un residuo de serina por una proteína quinasa. A la enzima fosforilada se une entonces una proteína inactivadora, originándose una forma de NR de baja actividad (sensible a inhibición por Mg^{2+}). En presencia de luz, la NR es desfosforilada por una proteína fosfatasa, lo que conduce a la reactivación de la enzima.

2.4. El amonio generado en distintos procesos metabólicos se asimila a través del ciclo GS/GOGAT

En los tejidos vegetales se produce amonio en diversos procesos metabólicos entre los que destacan los siguientes (Fig. 15-4):

1. **Reducción del nitrato y fijación del nitrógeno molecular.** Al conjunto de ambos procesos se le denomina asimilación primaria del nitrógeno.
2. **Fotorrespiración.** En la conversión de glicina a serina en la mitocondria se libera amonio que, en su mayor parte, es reasimilado en el cloroplasto (véase Capítulo 12). La cantidad de amonio que se genera en la fotorrespiración es hasta 10 veces superior a la producida por reducción del nitrato.
3. **Catabolismo de proteínas.** Durante la germinación de la semilla y en la senescencia foliar, las proteínas son hidrolizadas para suministrar nitrógeno orgánico a los órganos en crecimiento. Gran parte de los aminoácidos resultantes de dicha degradación son convertidos en glutamato que es desaminado por acción de la glutamato deshidrogenasa:



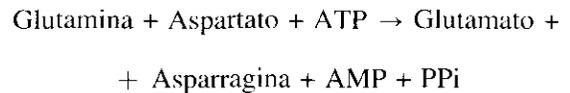
Aunque la glutamato deshidrogenasa también cataliza la reacción opuesta, esto es, la aminación reductiva del 2-oxoglutarato (o α -cetoglutarato) para formar glutamato, la contribución de esta reacción a la asimilación

del amonio en las plantas es escasa en circunstancias fisiológicas normales.

El amonio producido en los anteriores procesos metabólicos es asimilado (o reasimilado) por la actuación en tándem de las enzimas **glutamina sintetasa (GS)** y **glutamato sintasa (GOGAT: glutamina:2-oxoglutarato amido-transferasa)** que constituyen el denominado **ciclo GS-GOGAT** (Fig. 15-4). En primer lugar, la GS cataliza la incorporación, dependiente de ATP, del amonio en una molécula de glutamato para formar glutamina. A continuación, la GOGAT cataliza la transferencia reductiva del grupo amido de la glutamina al C-2 del 2-oxoglutarato, produciéndose dos moléculas de glutamato (Fig. 15-5).

Parte del nitrógeno asimilado como glutamina puede emplearse para la síntesis de aminoácidos y proteínas del propio tejido o bien ser transportado a otros órganos como tal glutamina o como asparragina o ureidos (Fig. 15-4). La **glutamina** y la **asparragina** son los principales compuestos transportadores de nitrógeno en las plantas, mientras que los ureidos constituyen la forma predominante de transporte del N_2 fijado y asimilado en los nódulos de leguminosas tropicales y subtropicales (véase Capítulo 16).

La asparragina es sintetizada a partir de glutamina y aspartato por la enzima **asparragina sintetasa**:



2.4.1. Glutamina sintetasa

La **glutamina sintetasa (GS)** de las plantas es una proteína octamérica con una masa molecular de 320-360 kDa y con una alta afinidad por el amonio ($K_m = 3-5 \mu\text{M}$). Existen varias **isoformas de GS** con diferente composición de subunidades y distinta localización subcelular (citosólica o plastídica) (Fig. 15-6).

En hojas y en cotiledones verdes, la GS cloroplástica (GS_2) es la más abundante y participa en la asimilación del amonio producido en la reducción del nitrato y en la reasimilación del amonio liberado en la **fotorrespiración** (véase Capítulo 12). En hojas y cotiledones senescentes predominan las isoformas citosólicas (GS_1), que actúan en la síntesis de glutamina para su transporte a otros órganos de la planta. En la raíz existe, al menos, una isoforma citosólica, denominada GS_r , cuyas propiedades son muy parecidas a las de la GS citosólica de las hojas. En los nódulos radicales de las leguminosas, como *Phaseolus vulgaris*, se encuentran, además, otras dos isoformas citosólicas: GS_{n1} y GS_{n2} . Ambas son las encargadas de asimilar el amonio producido en los nódulos por la reducción del nitrógeno molecular catalizada por la nitrogenasa. La glutamina formada en los nódulos es entonces transportada al vástago, o bien es

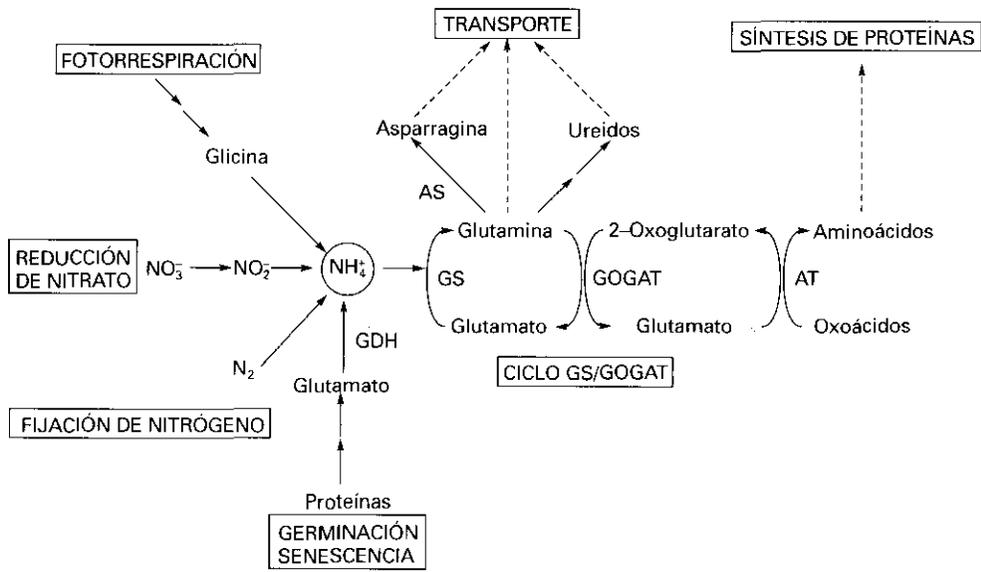


Figura 15-4. Procesos metabólicos que generan amoníaco en los tejidos vegetales y su asimilación y transporte. **AS:** asparagina sintetasa; **AT:** aminotransferasas; **GDH:** glutamato deshidrogenasa; **GOGAT:** glutamato sintasa; **GS:** glutamina sintetasa (adaptado de Maldonado, 1993).

utilizada para la síntesis de asparagina que es, asimismo, transportada (véase Capítulo 16).

Los diferentes polipéptidos o subunidades que componen las diversas isoformas de GS, son codificados por una pequeña familia de genes nucleares. En la Figura 15-6 se muestra la familia de genes GS de *Phaseolus* y sus productos de transcripción. Dicha familia está formada por cuatro genes (*gln- α* , *gln- β* , *gln- γ* y *gln- δ*) que codifican tres polipéptidos citosólicos (α , β , y γ) y un precursor del polipéptido plastídico (δ). Las isoformas GS_1 y GS_r están constituidas por subunidades α y β (40 kDa), con una mayor proporción de esta última en la isoforma GS_r . La isoforma GS_{n2} está formada exclusivamente por subunidades β , mientras que la isoforma

GS_{n1} contiene subunidades β y γ (40 kDa). La isoforma plastídica (GS_2) sólo contiene subunidades δ (42 kDa). El gen nuclear *gln- δ* codifica un polipéptido precursor (pre- δ) de 47 kDa que posee en su extremo amino una extensión de unos 50 aminoácidos. Esta extensión constituye el péptido de tránsito al cloroplasto.

La regulación de la GS se ejerce principalmente sobre la transcripción diferencial de los distintos genes de la familia. En efecto, dichos genes se expresan de forma distinta según el tipo de célula, el grado de desarrollo del tejido y en respuesta a factores nutricionales y ambientales. La luz activa en las hojas la transcripción del gen *gln- δ* y, en consecuencia, promueve la síntesis de la

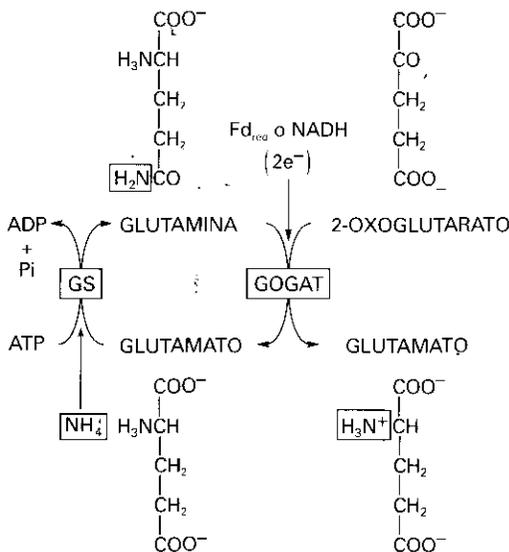


Figura 15-5. Asimilación del amoníaco por el ciclo GS/GOGAT. **GS:** glutamina sintetasa; **GOGAT:** glutamato sintasa.

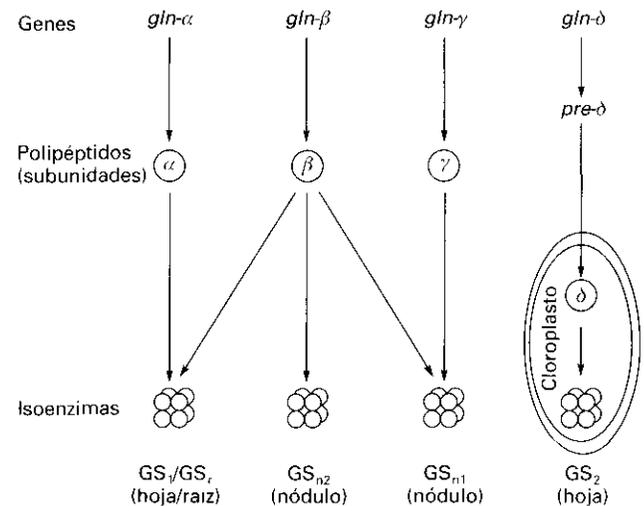


Figura 15-6. Genes e isoformas de glutamina sintetasa (GS) en *Phaseolus vulgaris*. Adaptado de B. G. Forde y J. V. Cullimore, en: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. B. J. Mifflin (ed.). Oxford University Press, Oxford, 246-296, 1989.

isoforma cloroplástica. El nitrato y el amonio también estimulan la síntesis de dicha isoforma. Durante la senescencia foliar, sin embargo, se activa preferentemente la transcripción de los genes *gln- α* y *gln- β* en detrimento de la transcripción del gen *gln- δ* , lo que se traduce en un incremento de la isoforma GS₁, que es la isoforma de GS involucrada en la formación de glutamina para el transporte de nitrógeno a los órganos en desarrollo. Durante el proceso de nodulación de las leguminosas, se produce la aparición en los nódulos de la isoforma GS_{n1}, como resultado de la estimulación de la transcripción del gen *gln- γ* en las células infectadas.

2.4.2. *Glutamato sintasa*

La **glutamato sintasa** (GOGAT) cataliza la transferencia reductiva del grupo amido de la glutamina al 2-oxoglutarato para producir dos moléculas de glutamato (Fig. 15-5). En plantas superiores existen dos formas de GOGAT, una dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT) y otra dependiente de NADH (NADH-GOGAT) como donadores de electrones, que son codificadas por genes distintos.

La **Fd-GOGAT** es una proteína monomérica, con una masa molecular de unos 150 kDa, que contiene una agrupación sulfoférica y flavinas (FAD y FMN) como grupos prostéticos. Es la forma de GOGAT más abundante en los tejidos verdes y se localiza en los cloroplastos. Allí, en colaboración con la GS cloroplástica, participa en la asimilación del amonio producido por la nitrito reductasa y en la reasimilación del amonio fototrespirado. Durante el desarrollo y enverdecimiento de las hojas en la luz, se produce un aumento de la actividad Fd-GOGAT como consecuencia de la activación de la transcripción del gen nuclear que la codifica.

La **NADH-GOGAT** es también una flavoproteína con una agrupación sulfoférica y constituida por un solo polipéptido de unos 200 kDa. La actividad de la isoforma NADH-GOGAT en hojas verdes es considerablemente menor que la de la Fd-GOGAT. Es, sin embargo, más abundante en tejidos no fotosintéticos (raíces, nódulos o tejidos etiolados). La NADH-GOGAT de los nódulos de las leguminosas desempeña un importante papel en la asimilación del nitrógeno fijado, como se infiere del hecho de que su síntesis se incrementa durante el desarrollo del nódulo de forma paralela a la síntesis de nitrogenasa, leghemoglobina y GS_{n1} (véase Capítulo 16).

2.5. **La asimilación del nitrógeno es dependiente de la fotosíntesis y del metabolismo del carbono**

La asimilación del nitrógeno por las plantas, esto es, la conversión del nitrógeno inorgánico (nitrato o amonio) en nitrógeno orgánico (glutamato, glutamina o asparra-

gina), es un proceso que requiere **poder reductor, ATP y esqueletos carbonados**. El poder reductor y el ATP pueden ser suministrados por las reacciones lumínicas de la fotosíntesis o por la glucólisis y respiración (véanse Capítulos 10 y 14). Asimismo, los esqueletos carbonados son proporcionados por la oxidación de carbohidratos que, en último término, son formados por reducción fotosintética del carbono. **La asimilación del nitrógeno** es, por tanto, un proceso íntimamente conectado al metabolismo del carbono. En la Figura 15-7 se ilustran esquemáticamente dichas interconexiones.

La reducción del nitrato a amonio y su posterior asimilación en glutamato requieren 10 electrones, de los cuales dos son usados en el citosol como NADH por la NR y los ocho restantes son utilizados en el cloroplasto en forma de ferredoxina reducida (seis por la NiR y dos por la Fd-GOGAT). En las hojas, el NADH para la reducción del nitrato a nitrito proviene, en su mayor parte, del NADPH generado fotosintéticamente en los cloroplastos y que es exportado al citosol mediante las lanzaderas triosa fosfato-fosfoglicerato y malato-oxalacetato. En tejidos no fotosintéticos, como la raíz, el NADH requerido por la NR es producido por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos en la mitocondria y exportado al citosol mediante la lanzadera malato-oxalacetato. En las hojas, la ferredoxina reducida que precisan la NiR y la Fd-GOGAT se genera fotoquímicamente en el cloroplasto, mientras que en la raíz, se forma a partir del NADPH producido en la vía oxidativa de las pentosas fosfato. En los plastidios de las células radicales se encuentran formas específicas de ferredoxina y de ferredoxina NADP⁺-oxidoreductasa, enzima que reduce la ferredoxina con NADPH.

La síntesis neta de una molécula de glutamina o de asparagina requiere la reducción y asimilación de dos moléculas de nitrato y el aporte de una molécula de 2-oxoglutarato o de oxalacetato, respectivamente, como esqueletos carbonados. Dichos oxoácidos, o precursores de los mismos, provienen del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Fig. 15-7). La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa contribuye a la formación de oxalacetato para la síntesis de asparagina o para el mantenimiento del acervo de ácidos orgánicos. Dicha contribución es cuantitativamente muy importante en el proceso de asimilación del amonio en los nódulos de las leguminosas.

La asimilación del nitrógeno origina, pues, un flujo de carbono desde carbohidratos hasta aminoácidos. En ausencia de fotosíntesis, el almidón o la sacarosa pueden suministrar dicho carbono. En la luz, los azúcares que se sintetizan en el ciclo reductivo de las pentosas fosfato constituyen la fuente última de esqueletos carbonados para sustentar la síntesis de aminoácidos. Así pues, en los tejidos fotosintéticos, el carbono asimilado se reparte entre la formación de carbohidratos y la síntesis de aminoácidos. El flujo de carbono orgánico hacia una u otra vía se modula a través de la regulación de enzimas claves de ambas rutas en respuesta, principalmente, a la luz y a la disponibilidad de carbono y nitrógeno.

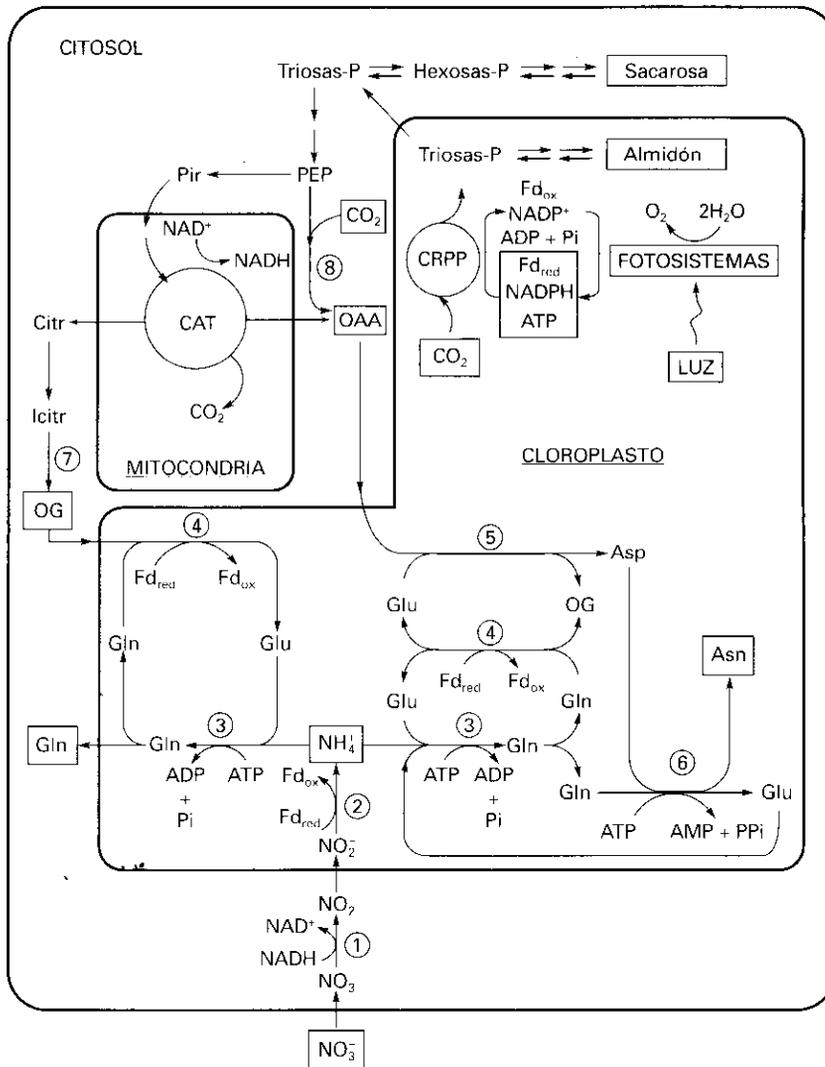


Figura 15-7. Conexiones entre el metabolismo del nitrógeno y el del carbono. **Asn:** asparragina; **Asp:** aspartato; **CAT:** ciclo de los ácidos tricarboxílicos; **Citr:** citrato; **CRPP:** ciclo reductor de las pentosas fosfato; **Fd_{ox}** y **Fd_{red}**: formas oxidada y reducida, respectivamente, de la ferredoxina; **Glu:** glutamato; **Gln:** glutamina; **Icitr:** isocitrato; **OAA:** oxalacetato; **OG:** 2-oxoglutarato; **PEP:** fosfoenolpiruvato; **Pi:** fosfato inorgánico; **Pir:** piruvato; **PPi:** pirofosfato. Enzimas: 1) nitrato reductasa; 2) nitrito reductasa; 3) glutamina sintetasa; 4) glutamato sintasa; 5) aspartato aminotransferasa; 6) asparragina sintetasa; 7) isocitrato deshidrogenasa; 8) fosfoenolpiruvato carboxilasa.

2.6. El nitrógeno absorbido y asimilado es transportado a distintos órganos de la planta

Como resultado de la actividad metabólica de las bacterias nitrificantes, la mayor parte del nitrógeno inorgánico del suelo se encuentra en forma de nitrato. El nitrato absorbido por la raíz puede ser reducido y asimilado en la propia raíz o ser transportado a la parte aérea de la planta, en donde es asimilado (Fig. 15-8). Cuando en el suelo existe amonio, éste puede ser también absorbido; no obstante, al ser bastante tóxico, la mayoría de las plantas evita su acumulación incorporándolo rápidamente en aminoácidos. Parte del nitrógeno asimilado en

la raíz es exportada a la parte aérea, principalmente en forma de glutamina y asparragina.

Del total del nitrato absorbido del suelo por la planta, las proporciones que se asimilan en la raíz o en las hojas dependen tanto de factores externos como de factores intrínsecos de la propia planta. Así, si existe una baja concentración de nitrato en el suelo, una elevada proporción del total absorbido es reducida en la raíz, mientras que, si hay suficiente nitrato disponible, la mayor parte es transportada al vástago, en donde puede acumularse tanto en el tallo como en las hojas. Las vacuolas constituyen el principal sitio de almacenamiento de nitrato. La acumulación de nitrato es especialmente frecuente en representantes de las familias *Cruciferae*,

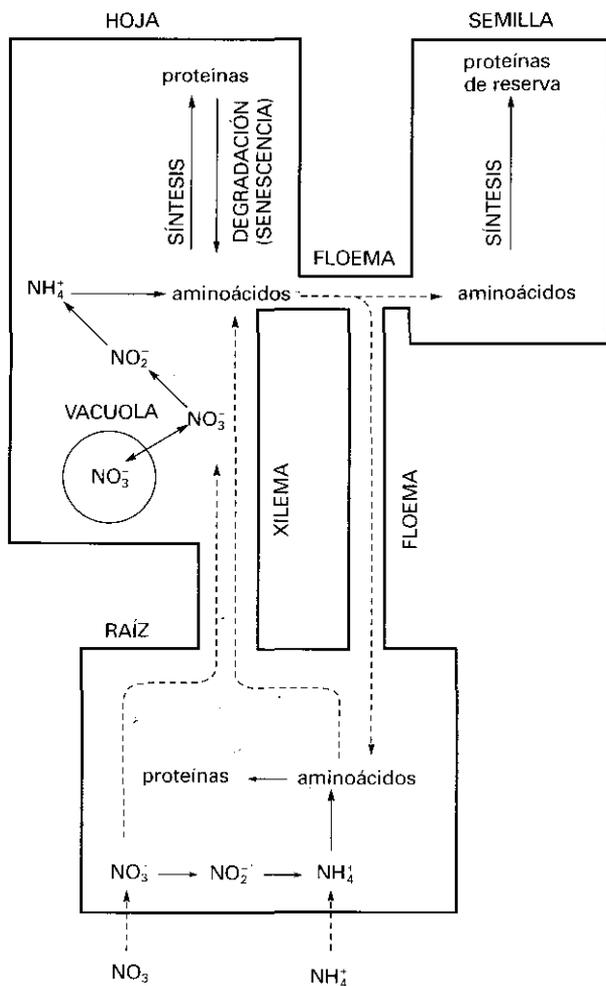


Figura 15-8. Esquema de la ruta del nitrógeno en la planta, que comprende los procesos de absorción, asimilación y transporte, y su acumulación final en la semilla.

Compositae, *Gramineae*, *Solanaceae*, y sobre todo, en las llamadas plantas nitrófilas como *Chenopodium album*, *Anthriscus sylvestris* o *Urtica dioica*. Asimismo, muchas halófitas pueden acumular nitrato, en lugar de cloruro, como ion osmóticamente activo.

El reparto de la asimilación de nitrato entre la raíz y las hojas es también una característica de la especie vegetal. Las especies de los géneros *Xanthium*, *Gossypium* y *Cucumis* poseen una baja actividad nitrato reductasa en la raíz y, como consecuencia, prácticamente todo el nitrato tomado por la planta es transportado a las hojas para su asimilación. Por el contrario, otras especies, entre las que se encuentran representantes de los géneros *Lupinus*, *Rhaphanus* y *Pisum*, así como diversas especies leñosas, principalmente gimnospermas y de las familias *Ericaceae* y *Proteaceae*, asimilan en la raíz la mayor parte del nitrato absorbido.

Otro factor que modifica la distribución interna de la asimilación del nitrato es la edad de la planta. En las primeras etapas de crecimiento, la contribución de la

raíz es significativa; sin embargo, a medida que la planta se desarrolla, la reducción de nitrato desciende en la raíz y aumenta en las hojas.

Cuando la planta entra en su fase reproductora, surgen nuevos requerimientos de nitrógeno. En efecto, los frutos y las semillas en desarrollo demandan gran cantidad de nitrógeno orgánico. En cereales, la mayor cantidad (70-80% del total) del nitrógeno orgánico para el llenado del grano proviene de la degradación de proteínas de los órganos vegetativos, principalmente de la hoja bandera (Fig. 15-8). El resto lo constituye el nitrógeno asimilado *de novo* en la fase postantesis. La **movilización de nitrógeno orgánico** desde las hojas senescentes hacia las semillas constituye, pues, un proceso muy importante en la economía del nitrógeno de las plantas (véase Capítulo 28).

3. ASIMILACIÓN DEL AZUFRE

La asimilación del azufre constituye una importante vía metabólica, a través de la cual las plantas sintetizan una amplia variedad de compuestos orgánicos azufrados de vital importancia para el crecimiento. Aunque la mayor parte del azufre orgánico vegetal se encuentra formando parte de los aminoácidos **cisteína** y **metionina** en las moléculas de proteína, también se halla presente en otras importantes biomoléculas como el **glutatió**n y diversas coenzimas y vitaminas. El **sulfato** (SO_4^{2-}) constituye la principal fuente de azufre inorgánico en los suelos para las plantas. Dicho sulfato (S:+6) es absorbido por la raíz y transportado en su mayor parte por el xilema hasta las hojas, en donde es reducido y asimilado como grupo tiol (-SH) (S: -2) de moléculas orgánicas. No todo el sulfato es reducido, ya que parte del mismo es incorporada como tal sulfato a sulfolípidos y a diferentes metabolitos secundarios.

3.1. La absorción del sulfato se asemeja a la del nitrato

El **sulfato** es transportado activamente al interior de la célula mediante un mecanismo de **simporte con protones** ($3\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$). Al igual que sucede con el nitrato, el gradiente electroquímico de H^+ requerido para dicho simporte es mantenido por una H^+ -ATPasa del plasmalema que transporta unidireccionalmente H^+ hacia el exterior (Fig. 15-1).

La velocidad de absorción de sulfato por las raíces generalmente muestra una cinética bifásica que refleja la actuación, a bajas concentraciones externas de sulfato, de un transportador de alta afinidad ($K_m = 10-20 \mu\text{M}$) y, a elevadas concentraciones, de un sistema de libre difusión.

3.2. La reducción del sulfato conduce directamente a la síntesis de cisteína

En la Figura 15-9 se muestra la **asimilación del sulfato** por las plantas. La primera etapa consiste en la **activación del sulfato** por ATP en una reacción catalizada por la enzima **ATP sulfurilasa**, que forma adenosina 5'-fosfosulfato (APS), es decir, una molécula de 5'-AMP unida al sulfato. El sulfonucleótido APS es un «sulfato activo», ya que contiene un enlace anhídrido fosfato-sulfato rico en energía que capacita a la molécula para iniciar las ulteriores reacciones de reducción del azufre.

A partir de APS se han descrito dos posibles vías de reducción del sulfato hasta tiol: la **vía de intermediarios libres**, en la que los estados intermedios de reducción del azufre —sulfito (SO_3^{2-}) y sulfuro (H_2S)— apa-

recen en estado libre, y la **vía de intermediarios unidos**, denominada así porque el azufre, durante su reducción, permanece unido a una molécula portadora.

La **vía de intermediarios libres** opera, sobre todo, en procariotas (bacterias y cianobacterias) y en hongos. La reducción del sulfato por esta vía requiere la fosforilación previa del APS mediante la enzima **APS quinasa**, en la que se forma 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS). El grupo sulfato del PAPS es, entonces, susceptible de ser reducido a sulfuro en dos reacciones consecutivas de dos y seis electrones catalizadas, respectivamente, por las enzimas **PAPS sulfotransferasa** (= PAPS reductasa) y **sulfito reductasa**. Finalmente, el sulfuro, en una reacción catalizada por la **cisteína sintasa**, se añade a una molécula de *O*-acetilserina que, simultáneamente, se escinde para producir cisteína y acetato.

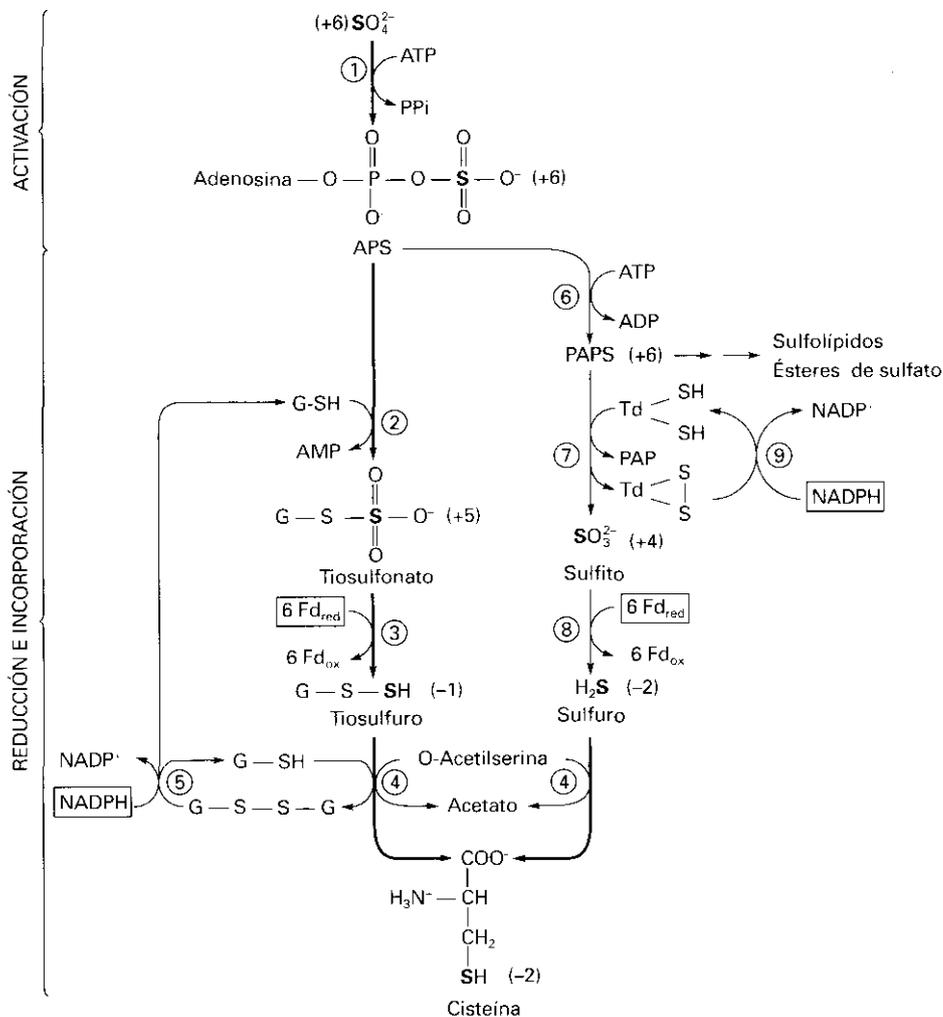


Figura 15-9. Asimilación del sulfato por las plantas. Las reacciones de la izquierda (flechas con trazo grueso) constituyen la vía preferente de asimilación del sulfato, en la que éste es transferido a un portador al que permanece unido durante su reducción. Las reacciones de la derecha constituyen la vía de intermediarios libres que opera en bacterias y que, en ciertas situaciones, puede también funcionar en plantas. Los números entre paréntesis indican el estado de oxidación del azufre en los diferentes compuestos intermedios. **APS:** adenosina 5'-fosfosulfato; **Fd_{ox}** y **Fd_{red}**: formas oxidada y reducida, respectivamente, de la ferredoxina; **G-SH** y **G-S-S-G**: formas reducida y oxidada, respectivamente, del glutatión; **PAP:** 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato; **PAPS:** 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato; **PPi:** pirofosfato; **Td:** tiorredoxina. Enzimas: **1)** ATP sulfurilasa; **2)** APS sulfotransferasa; **3)** tiosulfonato reductasa; **4)** cisteína sintasa; **5)** glutatión reductasa; **6)** APS quinasa; **7)** PAPS sulfotransferasa; **8)** sulfito reductasa; **9)** tiorredoxina reductasa.

Aunque las plantas, así como las algas, poseen las mencionadas actividades enzimáticas, la reducción del sulfato en estos organismos transcurre mayoritariamente a través de la **vía de intermediarios unidos**. La función principal del PAPS en las plantas es actuar como molécula donadora de sulfato para la síntesis de sulfolípidos y ésteres de sulfato, mientras que la sulfito reductasa (enzima muy parecida a la nitrito reductasa) opera, sobre todo, como mecanismo de destoxificación de azufre —mediante emisión de H_2S — en plantas expuestas a altas concentraciones de dióxido de azufre (SO_2) en la atmósfera. En la vía de intermediarios unidos, la **APS sulfotransferasa** (= APS reductasa) cataliza la transferencia reductiva del sulfato del APS al grupo tiol del glutatión para formar un tiosulfonato o tiosulfato orgánico (S: +5). El glutatión actúa como molécula portadora del azufre durante su reducción. El tiosulfonato unido al glutatión es después reducido a tiosulfuro (S: -1) por una **tiosulfonato reductasa** (= tiosulfato orgánico reductasa) dependiente de ferredoxina. Finalmente, la **cisteína sintasa** da lugar a la síntesis de **cisteína** mediante la transferencia del tiosulfuro a *O*-acetilserina. En dicha reacción participa una segunda molécula de glutatión que resulta oxidada (G-S-S-G). Las dos moléculas de glutatión reducido que intervienen en la reducción del sulfato se restablecen por reducción del glutatión oxidado con NADPH mediante la glutatión reductasa. La asimilación del sulfato a cisteína consume, pues, ocho electrones: seis son suministrados por ferredoxina reducida y dos, en último término, por NADPH. Dicho poder reductor así como el ATP necesario para la activación del sulfato se producen en el cloroplasto, sitio en el que tiene lugar la asimilación del azufre.

A partir de cisteína, las plantas sintetizan **metionina** (Fig. 15-10), **glutatión** (apartado 3.3) y otros compuestos azufrados. Como resultado de la acción secuencial de las enzimas **cistationina sintasa** y **cistationasa**, se produce una «transulfuración», esto es, la transferencia del grupo tiol de la cisteína a homoserina con la consiguiente formación de homocisteína. La posterior adición de un grupo metilo a la homocisteína por la **metionina sintasa** produce, finalmente, metionina.

3.3. El glutatión es un compuesto azufrado con múltiples funciones en la planta

El **glutatión** es el tripéptido glutamato-cisteína-glicina (Fig. 15-11) y constituye el principal compuesto de almacenamiento y transporte de azufre orgánico en las plantas. Se sintetiza en las hojas, especialmente en los cloroplastos, y una gran parte es exportada a la raíz y a órganos en crecimiento. En estos órganos importadores, el glutatión es degradado en sus tres componentes aminoácidos y la cisteína resultante se emplea en la síntesis de proteínas y de compuestos azufrados.

El glutatión puede encontrarse en forma reducida

(GSH) o en forma oxidada como un dímero (GSSG) en el que dos moléculas están unidas por un puente disulfuro. El glutatión reducido, en función de su grupo sulfhidrilo (tiol), protege de la oxidación a los grupos tiólicos de los centros catalíticos de muchas enzimas y evita así su inactivación. Asimismo, junto con el **ascorbato**, desempeña un importante papel en la destoxificación de especies activas de oxígeno que se forman en el cloroplasto en determinadas situaciones de estrés (véase Capítulo 30). El glutatión también desempeña una importante función de defensa frente a diversos herbicidas (triazinas y cloroacetamidas), debido a su capacidad de formar conjugados con los mismos a través de su átomo de azufre.

Las **fitoquelatinas** son moléculas sintetizadas por las plantas a partir del glutatión o de su precursor γ -glutamilmcisteína. Su estructura general es (γ -glutamilmcisteinil) $_n$ -glicina, donde $n = 3-7$. Las fitoquelatinas tienen la capacidad de **secuestrar metales pesados**, con lo que impiden su acumulación interna y consiguiente toxicidad. Su síntesis se estimula por la presencia en el medio de dichos metales (véase Capítulo 30).

3.4. La asimilación del sulfato está regulada por la disponibilidad de azufre

La absorción activa de sulfato se halla regulada negativamente por la concentración interna de azufre, ya que se estimula cuando se priva a la planta de sulfato y se reduce, cuando se le suministra sulfato o formas reducidas de azufre como cisteína o glutatión. La inducción de la absorción por privación de sulfato es el resultado de un aumento de la transcripción del gen que codifica la proteína transportadora del sulfato.

La asimilación del azufre también está controlada por regulación enzimática. La ATP sulfurilasa y la APS sulfotransferasa, al igual que la absorción de sulfato, se inducen por privación de sulfato y se reprimen por exceso de sulfato, o por suministro de formas reducidas de azufre. La síntesis final de cisteína también se halla retroregulada negativamente por el nivel interno de cisteína. En efecto, la cisteína inactiva la enzima serina acetiltransferasa, que cataliza, según la siguiente reacción, la formación de la *O*-acetilserina requerida para la síntesis de cisteína (Fig. 15-9):



De manera que si el nivel de cisteína es bajo, la serina acetiltransferasa permanece activa, se forma *O*-acetilserina y se sintetiza cisteína. Cuando la concentración interna de cisteína aumenta en exceso, se inactiva la serina acetiltransferasa, desciende la producción de *O*-acetilserina y, como consecuencia, se ve disminuida la síntesis de cisteína.

De lo anterior se deduce que, en su conjunto, la asi-

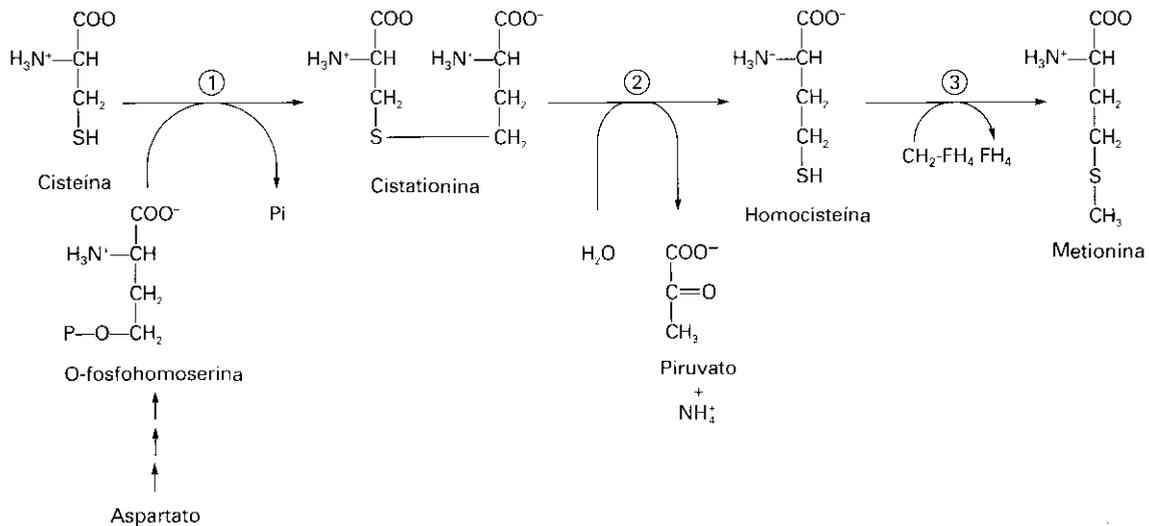


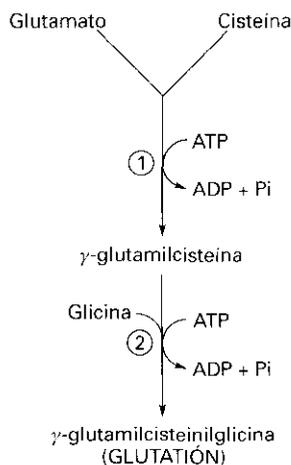
Figura 15-10. Síntesis de metionina por las plantas. $\text{CH}_2\text{-FH}_4$: metilén-tetrahidrofolato. Enzimas: 1) cistationina sintasa; 2) cistationasa; 3) metionina sintasa.

La asimilación del sulfato por las plantas se estimula en condiciones de alta demanda de azufre y se ralentiza cuando desaparece dicha demanda, o se suministra azufre orgánico.

Es interesante, además, destacar el hecho de que las rutas de asimilación del nitrógeno y del azufre se regulan mutuamente. En efecto, el nitrato y formas redu-

cidas de nitrógeno actúan como metabolitos reguladores de enzimas de la ruta de asimilación del azufre y, a la inversa, el sulfato y formas reducidas de azufre regulan ciertas enzimas de la asimilación del nitrógeno. Puesto que ambas rutas convergen en la síntesis de proteínas, su recíproca regulación permite coordinar las velocidades de asimilación de nitrógeno y de azufre para la producción de las cantidades adecuadas de aminoácidos y aminoácidos azufrados.

A



B

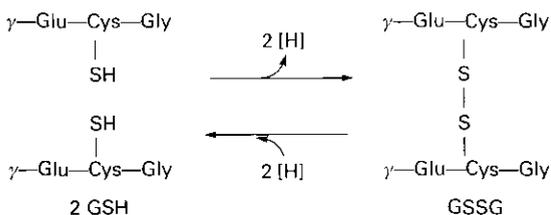


Figura 15-11. A. Biosíntesis del glutatión. Enzimas: 1) γ -glutamilcisteína sintetasa; 2) glutatión sintetasa. B. Formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG) del glutatión.

RESUMEN

El nitrógeno y el azufre se encuentran en los suelos principalmente en forma de nitrato (NO_3^-) y de sulfato (SO_4^{2-}), respectivamente. Las plantas tienen la capacidad de reducir y asimilar dichas formas inorgánicas oxidadas convirtiéndolas en las correspondientes formas orgánicas reducidas: grupos amino o amido ($-\text{NH}_2$) y grupos tiólicos ($-\text{SH}$) de aminoácidos y otras moléculas nitrogenadas y azufradas.

El nitrato es reducido a amonio por la acción secuencial de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa. A continuación, el amonio, mediante la actuación concertada de las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa (ciclo GS/GOGAT), es incorporado a esqueletos carbonados para la formación de aminoácidos y de compuestos transportadores de nitrógeno (glutamina y asparragina). El ciclo GS/GOGAT también participa en la reasimilación del amonio que se genera en la fotorrespiración y en el catabolismo de las proteínas de reserva durante la germinación y la senescencia. La asimilación del nitrógeno es un proceso dependiente de la fotosíntesis y del metabolismo del carbono para el aporte de poder reductor, ATP y esqueletos carbonados. Por ello, no sólo el nitrato, sino también la luz y los azúcares, actúan como señales que modulan positivamente la

síntesis y la actividad de diversas enzimas de la asimilación del nitrógeno.

El sulfato es reducido y asimilado, sobre todo, en las hojas. Durante su reducción, el sulfato permanece unido a una molécula portadora hasta que, finalmente, es transferido —como tior— a una molécula de *O*-acetilserina para formar cisteína. A partir de ésta, la planta sintetiza metionina y glutatión. El glutatión constituye la forma bajo la cual el azufre asimilado en las hojas es transportado a la raíz y a otros órganos de la planta. Dicha molécula desempeña otras importantes funciones en la planta, como son la reducción de puentes disulfuro de centros activos de enzimas y la detoxificación de especies activas de oxígeno. Las fitoquelatinas son moléculas estructuralmente derivadas del glutatión que desempeñan un importante papel de detoxificación de metales pesados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean dedicar este capítulo al Profesor D. Manuel Losada Villasante, en reconocimiento a las valiosas enseñanzas de él recibidas y a su dilatada y fecunda labor investigadora en el campo de la fisiología y bioquímica de las plantas, especialmente, en el tema objeto del presente capítulo.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. ¿Qué se entiende por asimilación del nitrato y del sulfato por las plantas?
2. ¿Es la reducción del nitrato la principal fuente de amonio en los tejidos vegetales?
3. ¿Cuál es el origen del poder reductor necesario para la reducción del nitrato en las hojas? ¿Y en las raíces?
4. ¿Qué factores o señales promueven la aparición de nitrato reductasa activa en la célula?
5. ¿Qué papel desempeñan las enzimas glutamina sintetasa, glutamato sintasa, asparragina sintetasa y glutamato deshidrogenasa en la asimilación del amonio?
6. ¿De dónde provienen los esqueletos carbonados necesarios para la síntesis de glutamina y asparragina?
7. Nitrato, nitrito, amonio, aminoácidos, proteínas. ¿Bajo

qué forma de las antes mencionadas se exporta el nitrógeno de la raíz a las partes aéreas de la planta?

8. ¿Qué similitudes existen entre la absorción del nitrato y la del sulfato por las plantas?
9. ¿Cuáles son el producto inicial y el producto final de la asimilación del sulfato por la vía de los intermediarios unidos y qué enzimas intervienen?
10. ¿Qué es el glutatión y qué funciones desempeña en la planta?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Hopkins, W. G. (ed.): *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley and Sons, Chichester (Inglaterra), 1995.
2. Ireland, R.: «Amino acid and ureide biosynthesis». En: *Plant Metabolism*, 2.^a ed. D. T. Dennis *et al.* (eds). Longman, Harlow (Inglaterra), 1997.
3. Lea, P. J.: «Nitrogen metabolism». En: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. P. J. Lea, R. C. Leegood (eds.). John Wiley and Sons, Chichester (Inglaterra), 1993.
4. Lea, P. J.: «Primary nitrogen metabolism». En: *Plant Biochemistry*. P. M. Dey, J. B. Harborne (eds.). Academic Press, San Diego (California), 1997.
5. Maldonado, J. M.: «Asimilación del nitrato por las plantas». En: *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno*. J. González, C. Lluch (eds.). Editorial Rueda, Madrid, 1992.
6. Maldonado, J. M.: «Asimilación del nitrógeno y del azufre». En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. J. Azcón-Bieto, M. Talón (eds.). McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 1993.
7. Peoples, M. B., Gifford, R. M.: «Regulation of the transport of nitrogen and carbon in higher plants». En: *Plant Metabolism*, 2.^a ed. D. T. Dennis *et al.* (eds.). Longman, Harlow (Inglaterra), 1997.
8. Rennenberg, H. *et al.* (eds.): *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants. Fundamentals, Environmental and Agricultural Aspects*. SPS Academic Publishing, La Haya (Holanda), 1990.
9. Turpin, D. H. *et al.*: «Interaction between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation». En: *Plant Metabolism*, 2.^a ed. D. T. Dennis *et al.* (eds.). Longman, Harlow (Inglaterra), 1997.
10. Vance, C. P.: «The molecular biology of N metabolism». En: *Plant Metabolism*, 2.^a ed. D. T. Dennis *et al.* (eds.). Longman, Harlow (Inglaterra), 1997.

FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

Pedro M. Aparicio-Tejo, César Arrese-Igor y Manuel Becana

1. Fijación biológica de nitrógeno. 2. Organismos fijadores de nitrógeno. 3. Fijación de nitrógeno por la simbiosis rizobio-leguminosa. 4. Fijación de nitrógeno y agricultura.

1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

El nitrógeno (N) es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, encontrándose distribuido en tres principales reservorios: el atmosférico, donde representa alrededor del 78 %, el suelo y el N contenido en la biomasa. Las complejas relaciones de intercambio entre estos tres reservorios se conoce como **ciclo del N** (Fig. 16-1). El N existente en la litosfera, a pesar de representar cuantitativamente el mayor depósito de dicho elemento, tiene una participación muy baja en el ciclo del N de la biosfera, y la mayor parte del N necesario para el crecimiento de las plantas proviene en último término de la atmósfera. El nitrógeno gas o dinitrógeno (N_2) es relativamente inerte, pero puede reaccionar con otros compuestos y convertirse en productos asimilables por las plantas y por otros organismos. La cantidad de N_2 fijado en la naturaleza es de unas 230×10^6 Tm por año. De esta cantidad, aproximadamente un 13 % es fijado por oxidación, provocada por las descargas eléctricas de las tormentas, del N_2 a ácido nítrico en presencia de O_2 y vapor de agua, y el 87 % restante es fijado por microorganismos. Este último proceso se denomina **fijación biológica de N_2** .

El N es un elemento muy importante para las plantas ya que tan sólo el C, el H y el O son más abundantes que él como constituyentes de los tejidos vegetales (véase Capítulo 6). El N forma parte de numerosas biomoléculas de las plantas, como proteínas, ácidos nucleicos, porfirinas y alcaloides. El N puede ser obtenido por las plantas por absorción del suelo en forma de nitrato y amonio (véase Capítulo 15), o bien por reducción del N_2 atmosférico estableciendo asociaciones simbióticas con diversas bacterias. La principal vía de producción de fertilizantes nitrogenados es la reacción

de Haber-Bosch, mediante la cual el N_2 es reducido a amonio por el H_2 a temperaturas y presiones muy elevadas (aproximadamente $500^\circ C$ y 350 atm). La utilización de fertilizantes conlleva un coste económico considerable, al ser su producción dependiente de la energía derivada de los combustibles fósiles, y constituye un riesgo potencial de contaminación y eutrofización de las aguas dulces por lixiviación del nitrato de los suelos. La fijación biológica del N_2 representa, pues, una alternativa económica y ecológicamente limpia frente a la fijación química. Además, la fijación biológica desempeña un papel muy importante en la economía del N en la práctica agrícola, ya que la cantidad de N disponible en la mayoría de los suelos cultivados es baja y en la actualidad no puede ser suplementada a escala mundial por la producción de fertilizantes.

2. ORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO

La fijación biológica de N_2 es catalizada por el complejo enzimático **nitrogenasa**, que se encuentra exclusivamente en procariotas. La capacidad de un organismo para fijar N_2 puede determinarse experimentalmente por incorporación de $^{15}N_2$, si bien la presencia en un organismo de los genes que codifican las proteínas necesarias para la síntesis de la nitrogenasa (genes *nif*) se considera también un indicador de su capacidad fijadora. El espectro de **organismos diazotrofos** o fijadores de N_2 es muy amplio, hasta el punto de que éstos pueden encontrarse en casi cualquier hábitat. Sin pretender ser exhaustivo, el Cuadro 16-1 resume algunos de los grupos más representativos.

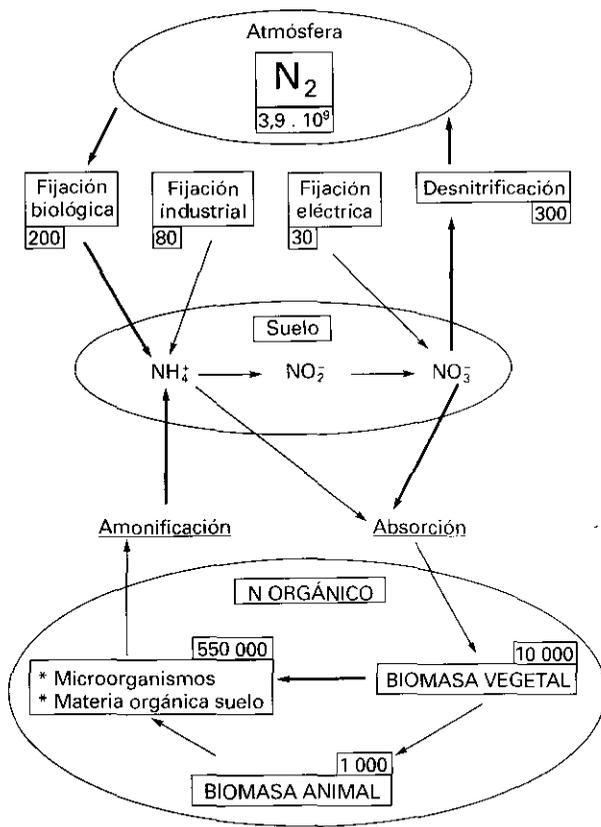


Figura 16-1. Ciclo del N, donde se ilustran los principales procesos y relaciones entre los reservorios de N: atmosférico, edáfico y biológico (las cifras indicadas corresponden a millones de Tm de N).

2.1. Los diazotrofos en vida libre ocupan nichos ecológicos muy diversos

La nitrogenasa es muy sensible al O₂. Entre las bacterias diazotrofas existen, sin embargo, anaerobios estrictos (*Desulfovibrio*, *Clostridium*), anaerobios facultativos que fijan N₂ sólo en condiciones anaeróbicas (*Klebsiella*, *Citrobacter*) o microaeróbicas (*Azospirillum*, *Xanthobacter*), y aerobios estrictos (*Azotobacter*, *Beijerinckia*). Los anaerobios facultativos como *Klebsiella* o *Azospirillum* carecen de sistemas para proteger la nitrogenasa frente al O₂ y sólo fijan N₂ en ausencia, o casi ausencia, de O₂. En cambio, *Azotobacter* es una de las bacterias más aerotolerantes que se conocen. La adaptación de *Azotobacter* a concentraciones crecientes de O₂ se produce a dos niveles: cambio en el contenido de algunos citocromos que determina un incremento de la actividad respiratoria («protección respiratoria») y formación de un complejo inactivo, pero estable al O₂, entre las proteínas de la nitrogenasa y una tercera ferrosulfoproteína («protección conformacional»). La fijación de N₂ que llevan a cabo estos organismos es de gran importancia ecológica, pero su contribución global a la fijación biológica es inferior al 25 %.

2.2. Las cianobacterias diazotrofas han desarrollado diversas estrategias para proteger su nitrogenasa del oxígeno fotosintético

Entre las cianobacterias, las hay que fijan N₂ en condiciones aeróbicas y microaeróbicas. Las células vegetativas de las cianobacterias llevan a cabo fotosíntesis oxigénica de forma similar a las plantas. Las fijadoras aeróbicas contienen, además, **heterocistos**, células especializadas en las que se encuentra la nitrogenasa. Los heterocistos poseen una pared celular engrosada que contiene abundantes polisacáridos y glicolípidos y que restringe la difusión de O₂. Poseen además hidrogenasa, pero carecen de fotosistema II, características ambas que tienden también a mantener mínima la concentración intracelular de O₂. La diferenciación de heterocistos supone una reorganización del genoma, que permite que el gen *nifD* sea funcional, mientras que en células vegetativas el gen se encuentra dividido por una interposición de 11 kb. Los heterocistos reciben disacáridos de las células vegetativas y exportan a cambio el N₂ fijado en forma de glutamina.

Las cianobacterias diazotrofas carentes de heterocistos fijan N₂ sólo en condiciones microaeróbicas (*Plectonema*, *Phormidium*) o pueden hacerlo en aerobiosis pero separando temporalmente fijación de N₂ y fotosíntesis (*Gloeotheca*, *Oscillatoria*). Así, durante el día, tiene lugar la fotólisis del agua y la formación de ATP, y la nitrogenasa permanece inactiva; durante la noche, la respiración mantiene el nivel de O₂ bajo y la nitrogenasa se encuentra activa y utiliza la energía acumulada durante el período luminoso previo.

La combinación de fijación biológica de N₂ y fotosíntesis en las cianobacterias debió de ser crucial para el desarrollo de la vida tal como existe en la Tierra, como parece atestiguarlo el hecho de que los heterocistos se encuentran ya presentes en los primeros fósiles de organismos vivos que se conocen. En la actualidad, la fijación de N₂ por cianobacterias representa más de un tercio del total de la fijación biológica.

2.3. Las actinorrizas son angiospermas no leguminosas que establecen simbiosis fijadoras con Frankia

Frankia es un actinomiceto capaz de formar asociaciones simbióticas con plantas de ocho familias de angiospermas no leguminosas. Estas plantas presentan unas tumoraciones o nódulos en las raíces tras la infección con *Frankia* y se denominan, por ello, plantas actinorrízicas o **actinorrizas**. Las actinorrizas son generalmente arbustos o árboles pioneros en suelos pobres en N o en climas adversos y, por tanto, tienen importancia desde un punto de vista ecológico y forestal. Por ejemplo, *Alnus rubra* (aliso) y *Casuarina* son utilizadas por su madera. Además, éstas y otras actinorrizas pueden plantar-

Cuadro 16-1. Grupos representativos de organismos fijadores de N₂ y algunas de sus características

I. Fijadores de vida libre		
Arqueobacterias	<i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcus</i>	Constituyen un reino diferenciado de las eubacterias Presentan algunas características peculiares como poseer intrones
Anaerobios	<i>Clostridium</i>	Suelos, aguas dulces y marinas, sedimentos, tracto intestinal...
Anaerobios facultativos	<i>Klebsiella</i>	Flora intestinal, suelos, aguas
Microaerobios	<i>Azospirillum</i>	Suelos, generalmente asociado a raíces de plantas
Aerobios	<i>Azotobacter</i> <i>Beijerinckia</i>	Suelos, aguas y superficies vegetales. Generalmente más eficientes a bajas concentraciones de O ₂
Bacterias fotosintéticas	<i>Rhodospirillum</i> <i>Chromatium</i>	Acuáticas. Fijan N ₂ en anaerobiosis utilizando la energía de la fotosíntesis
Cianobacterias sin heterocistos	<i>Oscillatoria</i> <i>Gloeotheca</i>	Fijan N ₂ en microaerobiosis o en aerobiosis con separación temporal de la fijación y de la fotosíntesis
Cianobacterias con heterocistos	<i>Nostoc</i> <i>Anabaena</i>	Capaces de fijar N ₂ en condiciones aeróbicas y anaeróbicas
II. Fijadores en simbiosis		
Con leguminosas	<i>Rhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Allorhizobium</i> <i>Azorhizobium</i>	Leguminosas de origen templado. Leguminosas de origen tropical y subtropical <i>Sesbania</i>
Con no leguminosas	<i>Frankia</i>	<i>Alnus</i> , <i>Casuarina</i> , <i>Myrica</i> , <i>Comptonia</i> , <i>Coriaria</i>
Otras simbiosis	<i>Nostoc</i> <i>Anabaena</i>	Hongos (formando líquenes), briófitos (<i>Blasia</i>), gimnospermas (<i>Macrozamia</i>) y angiospermas (<i>Gunnera</i>) Pteridófitos (<i>Azolla</i>)

se dispersas entre árboles de cultivo, o alternativamente con ellos, para mejorar su producción en suelos deficientes en N. Las actinorrizas se han utilizado también como especies colonizadoras de suelos mineros o de dunas costeras en las que su tolerancia a condiciones extremas es importante.

El proceso de infección de la raíz y de desarrollo nodular en actinorrizas es muy poco conocido comparado con el de leguminosas y nos limitaremos a dar sólo algunas indicaciones. En *Alnus*, la infección de los pelos radicales, como en leguminosas, está precedida por la modificación de las raíces. En este caso, en lugar de curvamiento se produce una ramificación. Tras la entrada de *Frankia*, la planta produce abundante material de la pared secundaria; este material es colonizado por las hifas de *Frankia*, las cuales progresan hacia la base, inter e intracelularmente. En *Eleagnus*, la infección por las hifas se produce entre las células epidérmicas; las hifas progresan por los espacios intercelulares y la planta secreta abundante material a su alrededor.

Contrariamente a lo que ocurre en leguminosas, el endófito (*Frankia*) está confinado en el córtex nodular. En la mayoría de las actinorrizas (las pertenecientes a las *Casuarinaceae* son una excepción) se desarrollan vesículas en los extremos de las hifas. Estas vesículas

son, en cierta medida, equivalentes desde un punto de vista funcional a los heterocistos de cianobacterias ya que contienen la nitrogenasa y poseen paredes multilaminares con lípidos que limitan el paso de O₂. Por otra parte, las paredes de las células vegetales que las albergan también sufren cambios que tienden a impermeabilizarlas, mediante deposición de sustancias tipo lignina y suberina.

3. FIJACIÓN DE NITRÓGENO POR LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA

3.1. Las leguminosas establecen las simbiosis diazotrofas más evolucionadas

Las simbiosis fijadoras de N₂ más conocidas e importantes desde una perspectiva económica son las que se establecen entre las raíces de leguminosas y bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* (colectivamente denominados **rizobios**; Cuadro 16-2). Excepcionalmente, estas bacterias también forman nódulos en simbiosis con la ulmácea *Parasponia*. Pasaremos ahora al estudio más detallado, aunque necesariamente limitado,

Cuadro 16-2. Clasificación de las bacterias capaces de formar nódulos en leguminosas

Género	Especie	Biovariedad	Nombres antiguos	Huésped
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i>	<i>phaseoli</i> <i>trifolii</i> <i>viciae</i>	<i>R. phaseoli</i> <i>R. trifolii</i> <i>R. leguminosarum</i> —	Judía Trébol Haba, guisante, lenteja <i>Galega</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>galegae</i> <i>tropici</i> <i>etli</i> <i>meliloti</i> <i>fredii</i> <i>huakuii</i> <i>saheli</i> <i>teranga</i>		<i>R. phaseoli</i> (tipo II) <i>R. phaseoli</i> (tipo I) <i>R. meliloti</i> <i>R. fredii</i> <i>R. sp. (Astragalus)</i> — —	Judía, <i>Leucaena</i> Judía, <i>Leucaena</i> Alfalfa Soja <i>Astragalus</i> <i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i> <i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i> <i>ciceri</i> <i>mediterraneum</i> <i>huakuii</i>		<i>R. sp. (Lotus)</i> <i>R. ciceri</i> — —	<i>Lotus</i> Garbanzo Garbanzo <i>Astragalus</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>		<i>A. sesbaniaea</i>	<i>Sesbania</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i> <i>sp. (Lupinus)</i> <i>sp. (cowpea)</i> <i>sp. (BTAi1)</i>		<i>R. japonicum</i> <i>R. lupini</i> — <i>Photorhizobium</i>	Soja Lupino «Cowpea», cacahuete, acacia <i>Aeschynomene</i>

de esta simbiosis: desde la iniciación de la misma por colonización de la superficie radical e infección de las raíces por las bacterias hasta la senescencia del **nódulo**, natural o inducida por estrés.

Se ha examinado la capacidad para nodular de 3395 especies, lo que supone cerca de un 57 % de los géneros de leguminosas. El porcentaje de especies susceptibles de ser noduladas varía mucho en las diversas subfamilias de leguminosas: 25 % en *Caesalpinioideae*, 90 % en *Mimosoideae* y 97 % en *Papilionoideae*. Estas proporciones pueden experimentar variaciones cuando se amplíe el número de especies estudiadas respecto a su capacidad para nodular.

Los rizobios tienen morfología normalmente bacilar y no son formadores de esporas. Son móviles por la presencia de un flagelo polar o subpolar, o de dos a seis flagelos peritricos. Las colonias tienen un aspecto mucilaginoso debido a la presencia de polisacáridos extracelulares; a veces, los cultivos envejecidos tienden a formar asociaciones estrelladas o rosetas. Son aerobios, gramnegativos y pueden utilizar una gran variedad de azúcares como fuente de C. Desde una perspectiva taxonómica, los rizobios se encuentran actualmente clasificados en diferentes géneros atendiendo a criterios moleculares. Los problemas taxonómicos derivan de que la antigua clasificación atendía a características fenotípicas, como la especificidad de la planta huésped, la morfología de las colonias, el crecimiento en medios selectivos y las propiedades metabólicas; mientras que los estudios actuales, basados en criterios moleculares, aún distan de ser completos.

El género *Rhizobium* forma nódulos en leguminosas

originarias de climas templados (Cuadro 16-2) y crece rápidamente en medios de cultivo, con acidificación de los mismos. Su especificidad de huésped es bastante estricta y los genes relacionados con su fijación se encuentran localizados en plásmidos, generalmente de gran tamaño y con mayor tendencia a asociarse que en *Bradyrhizobium*, formando racimos (*clusters*). Es un género taxonómicamente relacionado con *Agrobacterium*.

Bradyrhizobium forma nódulos en simbiosis con plantas de origen tropical y subtropical (Cuadro 16-2). Son bacterias de crecimiento generalmente lento, producen alcalinización del medio y poseen una mayor resistencia intrínseca a los antibióticos. Su especificidad por la planta huésped es menos estricta. Los genes relacionados con la simbiosis están localizados en el cromosoma. Se encuentra muy alejado taxonómicamente del resto de los rizobios.

El Cuadro 16-2 recoge también otros géneros de rizobio según la taxonomía actualizada. Así, *Mesorhizobium* es un género recientemente descrito, que presenta una velocidad de crecimiento intermedia entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, y un grado de similitud con otros rizobios del 93 %. *Sinorhizobium* fue descrito originalmente como un género integrado por bacterias formadoras de nódulos en soja, pero con características fenotípicas de los rizobios de crecimiento rápido. Tras esta descripción de *S. fredii*, una parte importante de los rizobios que nodulan alfalfa y otras especies de *Medicago* han sido reclasificados en este género, que posee una similitud con *Rhizobium* del 95-96 % en la secuencia del rRNA 16S. Finalmente, *Azorhizobium* es un gé-

nero excepcional por cuanto es capaz de formar nódulos en los tallos de la especie *Sesbania rostrata* y fija N₂ en vida libre, pero sólo con concentraciones de O₂ inferiores al 3%.

Los **rizobios** viven como saprófitos en el suelo, donde compiten con bacterias quimioheterótrofas. Su densidad media de población en tierras de barbecho se sitúa entre 10² y 10⁵ células por gramo de suelo. Su supervivencia parece asociada a la condición de poder utilizar compuestos orgánicos presentes en muy baja concentración. La multiplicación de los rizobios en la rizosfera es un proceso que antecede al de la propia infección. En general, la **rizosfera** es colonizada por una amplia gama de microorganismos. Sin embargo, en algunos casos, la composición química de los exudados de la raíz puede condicionar cierta selectividad de las bacterias. Este es el caso de la secreción de homoserina por las raíces de guisante, ya que este aminoácido es una excelente fuente de C y N para los rizobios.

Algunos **flavonoides** (véase Capítulo 17) a concentración nanomolar, provocan quimiotaxis activa en los

rizobios hacia la superficie radical (Fig. 16-2). Estos mismos flavonoides, a concentración micromolar, activan los genes responsables de la **nodulación** (**genes nod**) de la bacteria. Los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* son también denominados genes *nod* comunes, ya que se encuentran presentes en todos los rizobios. Los productos de los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* son requeridos para la síntesis de un quitín-oligosacárido. Esta estructura es acilada por los productos de los genes *nod FEG* y modificada por genes específicos de cada una de las especies bacterianas, de manera que las distintas moléculas señalan ligeras diferencias entre ellas (Fig. 16-3). Así, en *Sinorhizobium meliloti*, la estructura es convertida a una forma sulfatada por los productos de los genes de la nodulación específicos *nodH*, *nodP* y *nodQ*. La adición de estas moléculas, en ausencia de las bacterias, a concentraciones tan bajas como 0.1 nM induce la división activa de las células meristemáticas del córtex interno (en nódulos de crecimiento indeterminado) o externo (en los de crecimiento determinado). Recientemente, se ha descrito que estos lipo-quitín-oligosacáridos también tienen efectos morfogénicos en sistemas heterólogos, como plantas de tabaco y embriones de peces.

En la adhesión de las bacterias a la raíz aparecen implicados dos tipos de moléculas: **lectinas** (glicoproteínas sin actividad enzimática producidas por la planta) y polisacáridos de la pared celular de la bacteria. Una vez que los rizobios se han unido a los pelos radicales, se induce un cambio en la dirección de su crecimiento apical. Este fenómeno requiere la presencia de bacterias, si bien no parece existir especificidad en la respuesta. Durante los últimos años se han descrito varios tipos de procesos de infección. Uno de ellos es la entrada a través de heridas, de manera que los microorganismos consiguen introducirse en el tejido radical a través del punto de emergencia de la raíz lateral, como en *Arachis* y *Stylosanthes*. Esta modalidad parece ser relativamente común en la familia *Aeschynomeneae*. Otro mecanismo de infección es el que se produce a través del tejido epidérmico intacto, bastante común en las especies arbóreas.

Con todo, la forma de entrada de los rizobios en la raíz más estudiada hasta la fecha es la asociada a los pelos radicales. En este caso, las bacterias penetran a través de la pared celular del pelo radical mediante la secreción de **celulasas**, quedando envueltas en una estructura tubular, conocida como **cordón de infección**, que progresa hacia la base del pelo radical. Este cordón de infección contiene una matriz de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal.

Cuando el cordón de infección alcanza el tejido vegetal con actividad meristemática, comienza la **diferenciación nodular** propiamente dicha. El desarrollo nodular sigue dos patrones básicos dependiendo de la planta huésped (Cuadro 16-3). En las especies que poseen **nódulos de crecimiento indeterminado**, el cordón de infección alcanza las células cercanas al cilindro

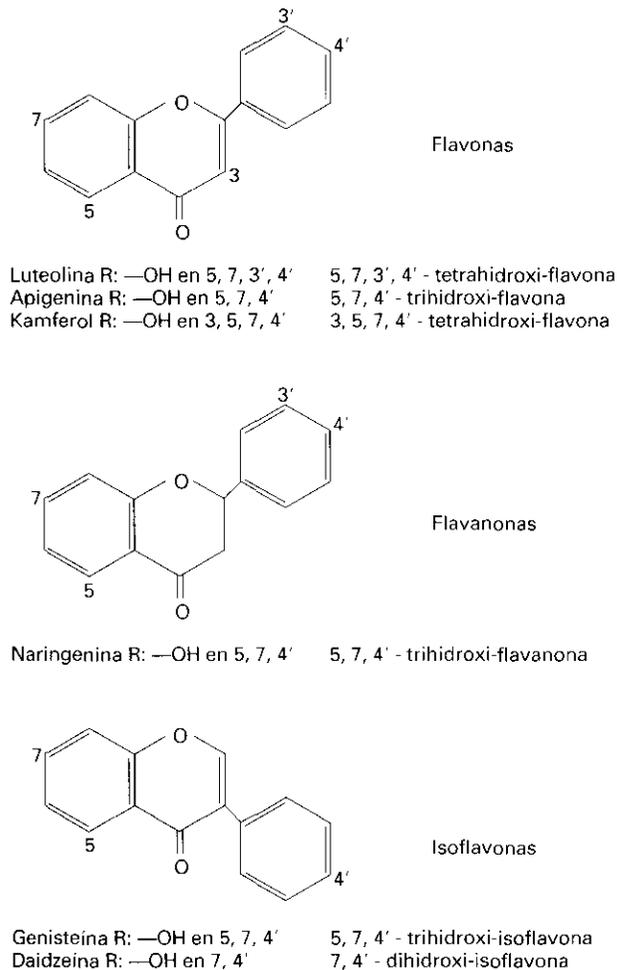
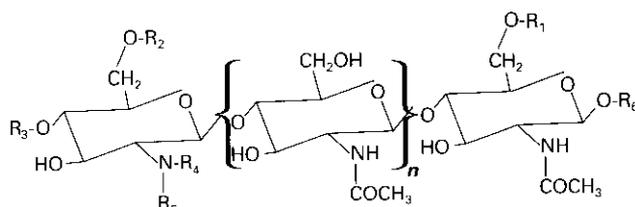


Figura 16-2. Estructuras de algunos tipos de flavonoides implicados en respuestas quimiotácticas, en la activación de genes *nod* o en el aumento de la tasa de crecimiento de los rizobios.



Especie	R1	R2	R3	R4	R5	R6	n
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Acetil	Acetil	H	H	C18:1, C18:4	H	2,3
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	H, acetil	Acetil	H	H	C18:1, C18:4	H	2,3
<i>R. tropici</i>	Sulfatil, H	Acetil	H	Metil	C18:1	manosil	3
<i>R. etli</i>	4-O-acetil-L-fucosil	Acetil	Carbamil	Metil	C18:1	H	
<i>S. meliloti</i>	Sulfatil	Acetil	H	H	C16:3, C16:2	H	2,3
<i>S. fredii</i>	2-O-metilfucosil, fucosil	Acetil	H	H	C18:1	H	1,2,3
<i>M. loti</i>	H	Acetil	Carbamil	Metil	C18:1	H	
<i>A. caulinodans</i>	Arabinosil, H, fucosil	Carbamil	H	Metil	C18:1, C18:0	H	2,3
<i>B. japonicum</i>	2-O-metilfucosil	Acetil	H	H	C18:1, C16:0	H	3

Figura 16-3. Estructura de los lipo-quítin-oligosacáridos producidos por diferentes especies de rizobios.

vascular; el proceso de infección continúa a lo largo de la existencia del nódulo. En especies con **nódulos de crecimiento determinado** tan sólo algunas células son infectadas por los cordones de infección; tanto las células como las bacterias (o mejor dicho, bacteroides) se dividen activamente hasta conformar el nódulo funcional. Las células que no resultan infectadas se denominan células intersticiales o parenquimáticas.

En algunas simbiosis primitivas los cordones de infección no llegan a formarse o, si lo hacen, las bacterias siempre quedan incluidas en ellos. En los **nódulos de las leguminosas** típicas, entre las que se incluyen las de importancia agronómica, la liberación de los **bacteroides** de los cordones de infección es un requisito esencial para la fijación de N_2 . La liberación de las bacterias del cordón de infección al citoplasma de las células de la planta huésped se produce a través de un proceso similar a la endocitosis, de manera que los microorganismos quedan englobados en una vesícula denominada

simbiosoma (Fig. 16-4). La membrana del simbiosoma contiene material de tres orígenes: cordón de infección, retículo endoplásmico y síntesis *de novo* de membrana por el aparato de Golgi. Por otra parte, las bacterias se diferencian en bacteroides y sufren profundas alteraciones morfológicas. Los **bacteroides** expresan actividad nitrogenasa y determinados citocromos que no estaban presentes en las bacterias de vida libre. En los bacteroides de nódulos de crecimiento determinado es muy frecuente observar abundantes gránulos de **poli- β -hidroxi-butarato** (Fig. 16-4), que parece actuar como reservorio de C.

La formación de los primeros nódulos inhibe la formación de los nódulos subsiguientes en un proceso típico de retroalimentación reguladora. Las respuestas autorreguladoras son sistémicas y requieren la presencia de la parte aérea. La escisión de los primeros nódulos posibilita la formación de otros nuevos. En general, la posibilidad de iniciación nodular se halla restringida a

Cuadro 16-3. Características de los nódulos con crecimiento determinado e indeterminado

Parámetro	Determinado	Indeterminado
Planta huésped	Soja, judía, <i>cowpea</i>	Alfalfa, guisante, trébol
Origen geográfico	Tropical y subtropical	Templado
Forma del nódulo	Esférica	Cilíndrica, a menudo ramificada
Área principal de intercambio gaseoso	Lenticelas, formadas de un cambium cortical	Espacios intercelulares en la mayor parte de la superficie
Divisiones celulares iniciales	Córtex externo	Córtex interno
Tipo de sistema vascular	«Cerrado»	«Abierto»
Células vasculares de transferencia	Ausentes	Presentes
Células infectadas	Prácticamente no vacuoladas	Generalmente vacuoladas
Destino de las primeras moléculas de N_2 fijadas	Crecimiento nodular	Exportación a la planta (vía xilema)
Producto exportado	Ureidos	Amidas

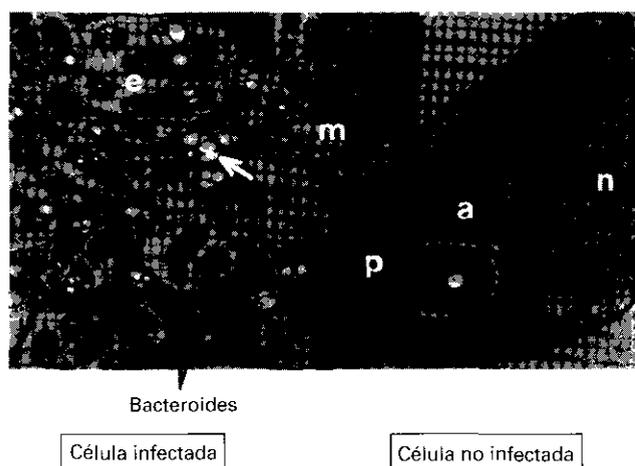
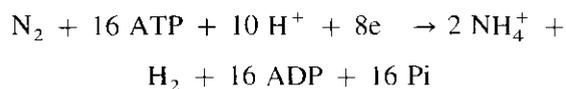


Figura 16-4. Microfotografía de un nódulo de soja mostrando una célula infectada, repleta de bacteroides, y una célula no infectada o intersticial, que contiene amiloplastos. Los bacteroides se encuentran formando grupos dentro de los simbiosomas y contienen abundantes gránulos de poli- β -hidroxibutirato (flecha). *Abreviaturas:* a, granos de almidón dentro de un amiloplasto; e, espacio peribacteroidal; m, membrana del simbiosoma; n, núcleo; p, pared celular.

la región donde se forman pelos radicales. El proceso de autorregulación depende de la especie de leguminosa.

3.2. La nitrogenasa cataliza la reducción de dinitrógeno a amonio

La fijación biológica de N_2 es catalizada por el complejo enzimático **nitrogenasa**. La reacción es altamente endergónica (≈ 960 kJ/mol de N_2 fijado) y su estequiometría es:



En condiciones fisiológicas, los electrones son utilizados para reducir N_2 a amonio y, en menor cuantía, H^+ a H_2 (Fig. 16-5). Sin embargo, la enzima puede utilizar otros sustratos como cianuro, azida, ciclopropeno, óxido nitroso y acetileno. El «test de reducción de acetileno» se utiliza habitualmente como prueba de la enzima debido a su sencillez y sensibilidad.

La nitrogenasa consta de dos ferrosulfoproteínas. La Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa, componente II) es un dímero con estructura α_2 y masa molecular de ≈ 62 kDa, y contiene un centro $[4Fe \cdot 4S]$. La FeMo-proteína (dinitrogenasa, componente I) es un tetrámero, con estructura $\alpha_2\beta_2$ y masa molecular de ≈ 220 kDa, y contiene ≈ 30 átomos de Fe, un número casi equivalente de átomos de S ácido-lábiles y dos átomos de Mo. De los

≈ 30 átomos de Fe, 16 se encuentran formando cuatro centros $[4Fe \cdot 4S]$, llamados centros «P»; otros dos átomos de Fe se encuentran formando un centro «S»; y los restantes átomos de Fe forman parte de dos centros que contienen además Mo. La estequiometría aproximada de cada uno de estos centros es $[Fe_6MoS_8]$. Los dos centros constituyen el llamado cofactor FeMo o FcMoco. La Fe-proteína y la FeMo-proteína son extremadamente sensibles al O_2 y se inactivan de forma irreversible cuando se exponen al aire.

La reacción catalizada por la nitrogenasa requiere un donador de electrones, ATP, Mg^{2+} y una concentración extremadamente baja de O_2 (Fig. 16-5). La actividad nitrogenasa puede medirse *in vitro* utilizando un sistema generador de ATP, Mg^{2+} y ditionito sódico como reductor. En cambio, el reductor *in vivo* de la nitrogenasa es una proteína de potencial redox muy negativo, tipo flavodoxina (en fijadores de vida libre como *Klebsiella*) o ferredoxina (en bacteroides de *B. japonicum*).

El mecanismo de reacción de la nitrogenasa ha sido estudiado principalmente en los microorganismos fijadores de vida libre. Sin embargo, el modelo propuesto parece ser generalizable a la nitrogenasa de bacteroides con modificaciones mínimas (Fig. 16-5). Durante la reacción de la nitrogenasa, el ATP debe encontrarse como complejo ATP Mg ya que el ATP libre es un inhibidor. La Fe-proteína enlaza el ATP·Mg y reduce específicamente la FeMo-proteína, mientras que la FeMo-proteína enlaza y reduce el sustrato. La Fe-proteína reducida es «activada» por el enlace de dos moléculas de ATP·Mg. La activación de la Fe-proteína consiste en un cambio conformacional que hace su potencial redox más negativo en, al menos, 100 mV. Esta Fe-proteína pasa a tener el potencial redox necesario para reducir la FeMo-proteína. Durante cada ciclo de transferencia de un electrón, la Fe-proteína se asocia y disocia de la FeMo-proteína, y dos moléculas de ATP·Mg son hidrolizadas.

La nitrogenasa está regulada *in vivo* a muy diversos niveles: transcripción, traducción, disponibilidad de sustrato, modificación covalente y moduladores alostéricos. En *Klebsiella pneumoniae*, un fijador de vida libre de genética muy estudiada, la síntesis de nitrogenasa requiere unos 17 genes agrupados en unos ocho operones. Algunos de estos genes se han identificado también en (*Brady*)*rhizobium*. Los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* codifican las proteínas estructurales de la nitrogenasa; esto es, la única subunidad α (31 kDa) de la Fe-proteína y las subunidades α (56 kDa) y β (60 kDa) de la FeMo-proteína, respectivamente. Los genes *nifA* y *nifL* tienen función reguladora, afectando a otros genes *nif*. Los genes *nifA* y *nifL*, que forman un operón, están controlados por diversos genes llamado *ntr*. En condiciones anaeróbicas y limitantes de N combinado, los productos de los genes *ntrA* y *ntrC* activan la transcripción del operón *nifLA*. Entonces, los productos de los genes *ntrA* y *nifA* activan la transcripción de otros ope-

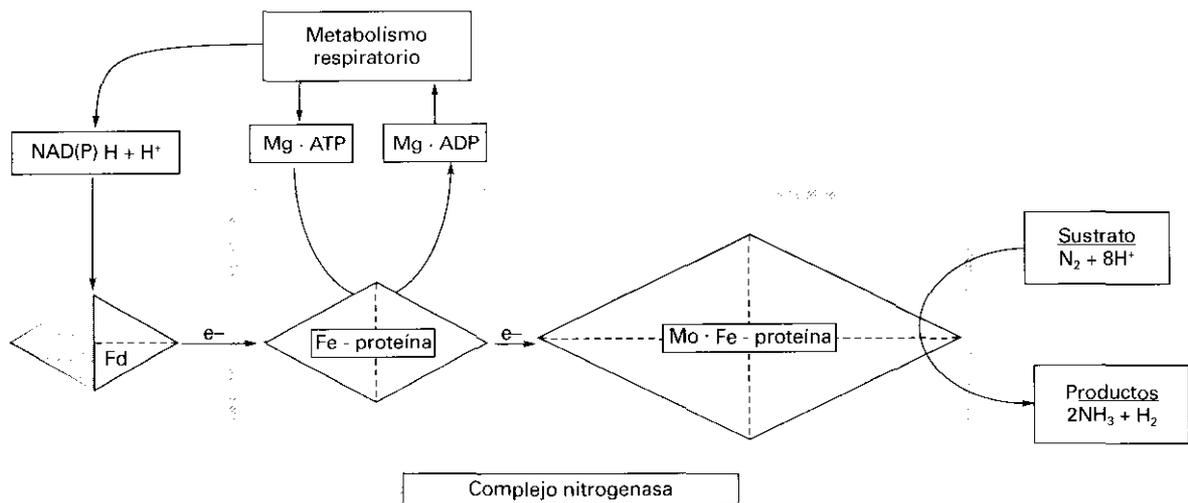


Figura 16-5. Esquema de la reacción catalizada por la nitrogenasa. El principal donador de electrones es la ferredoxina (Fd), una proteína de potencial redox muy negativo, que recibe los electrones a su vez, de la cadena respiratoria.

rones *nif*. Por el contrario, en presencia de O_2 y alta concentración de N combinado, los productos de *ntrB* y *nifL* reprimen la expresión de la nitrogenasa.

3.3. Los ácidos dicarboxílicos proporcionan energía y esqueletos carbonados para la fijación de nitrógeno

La energía necesaria para la fijación de N_2 proviene originariamente de la fotosíntesis. El compuesto carbonado más importante transportado desde la parte aérea a los nódulos, vía floema, es la sacarosa (Fig. 16-6). En las células nodulares, la sacarosa se hidroliza a monosacáridos por la actividad de los enzimas invertasa alcalina (que produce glucosa y fructosa) y sacarosa sintasa (que cataliza la reacción reversible $\text{sacarosa} + \text{UDP} \rightleftharpoons \text{fructosa} + \text{UDP-glucosa}$). A pesar de que hasta muy poco tiempo se pensaba que la actividad invertasa alcalina era preponderante, los datos actuales indican que la mayor parte de la sacarosa es hidrolizada por la sacarosa sintasa, al igual que sucede en otros tejidos (véase Capítulo 11). Los monosacáridos son hidrolizados a través de la ruta glucolítica (véase Capítulo 14), hasta la obtención de fosfoenolpiruvato. La **fosfoenolpiruvato carboxilasa**, una enzima citosólica muy abundante en los nódulos (1-2 % de la proteína soluble total) cataliza la incorporación de hasta un 10 % del CO_2 respiratorio (realmente HCO_3^- , ya que el CO_2 debe estar disuelto) al fosfoenolpiruvato para producir oxalacetato. El oxalacetato, bastante inestable, es reducido rápidamente a malato por la malato deshidrogenasa. El malato puede ser utilizado como fuente de C y energía para los bacteroides, entrar en la mitocondria y ser oxidado por el ciclo de Krebs (véase Capítulo 14) o contribuir a la asimilación del amonio en el ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa (Fig. 16-6) (véase Capítulo 15). También se originan pequeñas cantidades de productos de fer-

mentación como etanol, lactato y acetaldehído. El que uno o varios de los compuestos de carbono citados sean utilizables por los bacteroides como fuente de energía y C, depende de la velocidad de incorporación de éstos en los bacteroides, lo que es determinado a su vez por la velocidad de transporte a través de la membrana simbiosomal. Dicha membrana es altamente permeable a succinato y malato, pero poco permeable a α -cetoglutarato, glutamato, piruvato y arabinosa. Ello se debe a que existe un sistema transportador de dicarboxilatos en dicha membrana con alta afinidad por el malato ($K_m = 2 \text{ mM}$) y el succinato ($K_m = 15 \text{ mM}$). Una vez incorporados, los **ácidos dicarboxílicos** son oxidados durante la intensa respiración del bacteroide lo que proporciona ATP y poder reductor a la nitrogenasa.

3.4. La asimilación de amonio tiene lugar en la fracción vegetal de los nódulos

El primer producto estable de la fijación de N_2 es el amonio. Dado que los bacteroides expresan muy poca actividad asimiladora de amonio, éste es excretado en un 95 % por los bacteroides al citoplasma de las células nodulares, donde es incorporado en compuestos carbonados. Dicha incorporación debe ser rápida para evitar la acumulación de amonio hasta un grado que pueda inhibir la síntesis de la nitrogenasa y causar daño celular. La principal vía metabólica de asimilación de amonio está constituida por dos enzimas de las células nodulares que actúan coordinadamente (Fig. 16-6). La **glutamina sintetasa** cataliza la incorporación de amonio al glutamato con consumo de ATP, y la **NADH-glutamato sintasa** transfiere el grupo amida de la glutamina al α -cetoglutarato con formación de dos moléculas de glutamato. Además de glutamato, la glutamina puede donar su grupo amida al aspartato para formar asparragina. La reacción es catalizada por la **asparragi-**

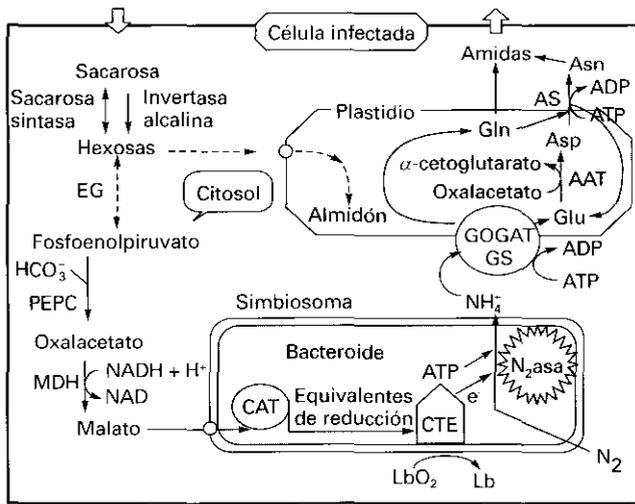


Figura 16-6. Esquema general del metabolismo del C y del N en células infectadas de nódulos exportadores de amidas (nódulos de crecimiento indeterminado). *Abreviaturas:* AAT, aspartato aminotransferasa; AS, asparagina sintetasa; CAT, ciclo de los ácidos tricarboxílicos; CTE, cadena de transporte de electrones; EG, enzimas glucolíticas (fructoquinasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, hexoquinasa, fosfohexosa isomerasa, fosfoglucomutasa, fosfofructoquinasa, fosfofructofosfotransferasa, aldolasa, triosafosfatoisomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, glicerato-3-fosfato quinasa; gliceratofosfato mutasa, enolasa); GS/GOGAT, ciclo de la glutamina sintetasa/glutamato sintetasa; Lb, leghemoglobina; MDH, malato deshidrogenasa; *N₂asa*, nitrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa.

na sintetasa y requiere hidrólisis de ATP a AMP y PP_i. La otra vía de asimilación de amonio la constituye la **NADH-glutamato deshidrogenasa**, que cataliza la incorporación de un grupo amino al α-cetoglutarato para producir glutamato.

El amonio asimilado puede ser exportado desde los nódulos a la parte aérea de la planta por el xilema en forma de amidas o ureidos (Fig. 16-7). Las leguminosas de origen templado (alfalfa, guisante, trébol, lupino) exportan el N en forma de **amidas**, como la glutamina, la asparagina y la 4-metilenglutamina. Las leguminosas de origen tropical y subtropical (soja, judía, caupí) exportan el N en forma de **ureidos**, como la alantoína, el ácido alantoico y la citrulina. Una excepción es el cacahuate, una leguminosa tropical que exporta 4-metilenglutamina.

La síntesis de ureidos se realiza a partir de las amidas glutamina y asparagina (Fig. 16-7) e implica la síntesis *de novo* de purinas y su posterior oxidación para formar los ureidos. En la síntesis de ureidos intervienen enzimas de las células infectadas y de las células intersticiales. La utilización de ureidos para el transporte de N conlleva un ahorro de C, ya que la alantoína y el ácido alantoico poseen un cociente C:N de 4:4 frente a un 5:2 de la glutamina o un 4:2 de la asparagina. Sin embargo, los ureidos son considerablemente menos solubles que las amidas, lo que podría explicar por qué son ma-

yoritariamente exportados en las leguminosas tropicales, que presentan **nódulos de crecimiento determinado**. Se ha sugerido que el sistema vascular cerrado y sin ramificaciones de los nódulos determinados puede tolerar un mayor flujo de agua suficiente para «arrastrar» durante la transpiración de la planta los ureidos producidos en los nódulos. En cambio, los **nódulos de crecimiento indeterminado**, propios de las leguminosas de origen templado, presentan abundantes ramificaciones y, por tanto, una mayor resistencia al flujo de agua, lo que probablemente impida mantener los ureidos en forma soluble.

3.5. Además de fijar nitrógeno, la nitrogenasa produce hidrógeno que puede ser reciclado parcial o totalmente en los nódulos

La producción de H₂ por la nitrogenasa supone una limitación importante de la fijación de N₂ por cuanto sólo una parte del flujo de los electrones que atraviesa la nitrogenasa es utilizada para la reducción de H⁺ en vez de para la reducción de N₂. Schubert y Evans, en 1976, definieron el término de **eficiencia relativa** (ER) como la proporción del flujo total de electrones que atraviesa la nitrogenasa, y que no es «perdido» en la producción de H₂:

$$ER = 1 - \frac{\text{electrones para la reducción de H}^+}{\text{electrones para la reducción de H}^+ \text{ y N}_2}$$

Un valor de ER = 1 indica que no se libera H₂ en el sistema simbiótico en estudio. Mientras que la mayoría de las simbiosis presenta valores de ER = 0.3-0.6, unas pocas dan valores cercanos a 1. Se ha demostrado que estas últimas expresan una hidrogenasa (de captación) que oxida el H₂ y que es, por tanto, capaz de reciclar parcial o totalmente el H₂ producido por la nitrogenasa. La **hidrogenasa** de bacteroides tiene una masa molecular de 100 kDa y consta de dos subunidades de ≈ 63 y ≈ 33 kDa. Contiene Ni y Fe en proporción aproximada de 1:10, y el Fe se encuentra formando un centro [Fe · S]. El enzima exhibe una K_m para el H₂ de ≈ 1 mM y su vida media en el aire es de ≈ 70 min.

Si la producción de H₂ disminuye la eficiencia de la fijación de N₂, cabe esperar que las simbiosis que no produzcan H₂ sean más eficientes. ¿Puede manifestarse esta mayor eficiencia en una mayor producción vegetal? Se han llevado a cabo estudios comparativos de la biomasa y del contenido total de N de plantas de soja inoculadas con cepas de *B. japonicum* cuyos genotipos diferían únicamente por la capacidad de expresar o no hidrogenasa (genotipos Hup⁺ o Hup⁻). Las plantas inoculadas con cepas Hup⁺ mostraron incrementos significativos (≈ 10%) de biomasa y N total.

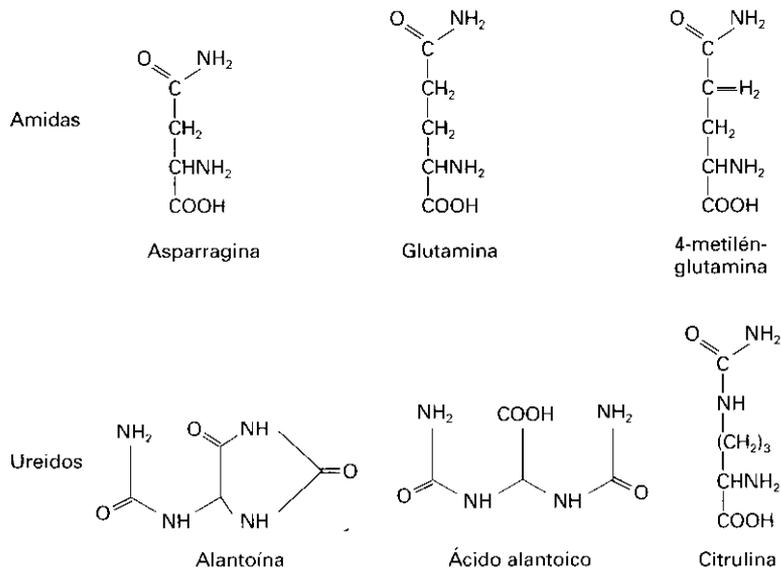


Figura 16-7. Estructura química de las amidas y ureidos transportados vía xilema desde los nódulos a la parte aérea de la planta. La 4-metilenglutamina es una amida transportada mayoritariamente por las plantas de cacahuete, mientras que la citrulina, considerada generalmente como un ureido, es transportada por algunas no leguminosas, como el aliso.

Se han sugerido tres mecanismos por los que el reciclaje de H_2 por la hidrogenasa puede aumentar la eficiencia de la fijación de N_2 . Primero, la utilización de H_2 puede estar acoplada a la síntesis de ATP. Esto ha sido demostrado con preparaciones de bacteroides de *R. leguminosarum* y *B. japonicum*. Segundo, puesto que la oxidación de H_2 por la hidrogenasa está acoplada al consumo de O_2 , la presencia de este enzima podría disminuir la concentración interna de O_2 en los nódulos y proteger así la nitrogenasa frente a la inactivación por O_2 . Tercero, el H_2 es un inhibidor específico y competitivo de la reducción de N_2 . La hidrogenasa podría servir para reducir la concentración de H_2 en los nódulos y aliviar o eliminar la inhibición de la nitrogenasa por el H_2 .

3.6. La concentración de oxígeno que se alcanza en los bacteroides debe ser estrictamente controlada en los nódulos

Los bacteroides requieren O_2 para sintetizar el ATP necesario para los procesos biosintéticos y para fijar N_2 . Sin embargo, el O_2 inhibe la síntesis de la nitrogenasa e inactiva irreversiblemente la Fe-proteína (vida media en aire ≈ 45 s a unos pocos min) y MoFe-proteína (vida media en aire ≈ 4.5 -60 min). Los nódulos deben poseer, pues, mecanismos que mantengan el O_2 a una concentración suficientemente baja, pero constante en las células infectadas, para permitir simultáneamente tasas elevadas de respiración y fijación de N_2 en los bacteroides.

En los nódulos de leguminosas, el suministro de O_2 a la zona central o infectada está controlado por una **resistencia variable a la difusión de O_2** localizada en el córtex interno (Fig. 16-8A). La existencia de dicha re-

sistencia se ha puesto de manifiesto de forma indirecta y directa. Las pruebas indirectas son la observación de un descenso de la actividad nitrogenasa en presencia de acetileno (un sustrato alternativo de la nitrogenasa, véase apartado 3.2). Otra prueba indirecta de la existencia de la barrera de O_2 consiste en la observación de que un aumento gradual en el porcentaje de O_2 en la atmósfera externa a los nódulos desde el 21 hasta el 100% no causa daño a la nitrogenasa y no afecta a la respiración nodular, lo que solamente puede explicarse por un aumento en la resistencia a la difusión de O_2 . La prueba directa proviene de la utilización de microelectrodos específicos para medir la concentración de O_2 en las diferentes zonas de los nódulos que indica una caída de dicha concentración en el córtex interno (Fig. 16-8A). Cuando se incrementa la concentración de O_2 externa, hay un aumento transitorio en la concentración de O_2 en la zona infectada de los nódulos, para recuperarse después el valor inicial. Estos resultados se han interpretado admitiendo la existencia de una resistencia a la difusión en el córtex interno de los nódulos, capaz de ajustarse en respuesta a fluctuaciones en la concentración externa de O_2 , o ante diferentes situaciones de estrés a las que puedan estar sometidas las plantas.

El mecanismo celular y molecular por el que opera dicha resistencia está todavía por determinar, así como el flujo y el gradiente de O_2 que tienen lugar en la realidad dentro del nódulo. Sin embargo, estudios con modelos matemáticos del flujo de O_2 a través del nódulo sugieren que la variación de la resistencia a la difusión de O_2 puede obedecer a cambios en la cantidad de agua contenida en los espacios intercelulares, ya que la solubilidad del O_2 en agua es baja, y esto determinaría la velocidad de paso del O_2 hacia la zona infectada. Las variaciones en el contenido de agua de los espacios in-

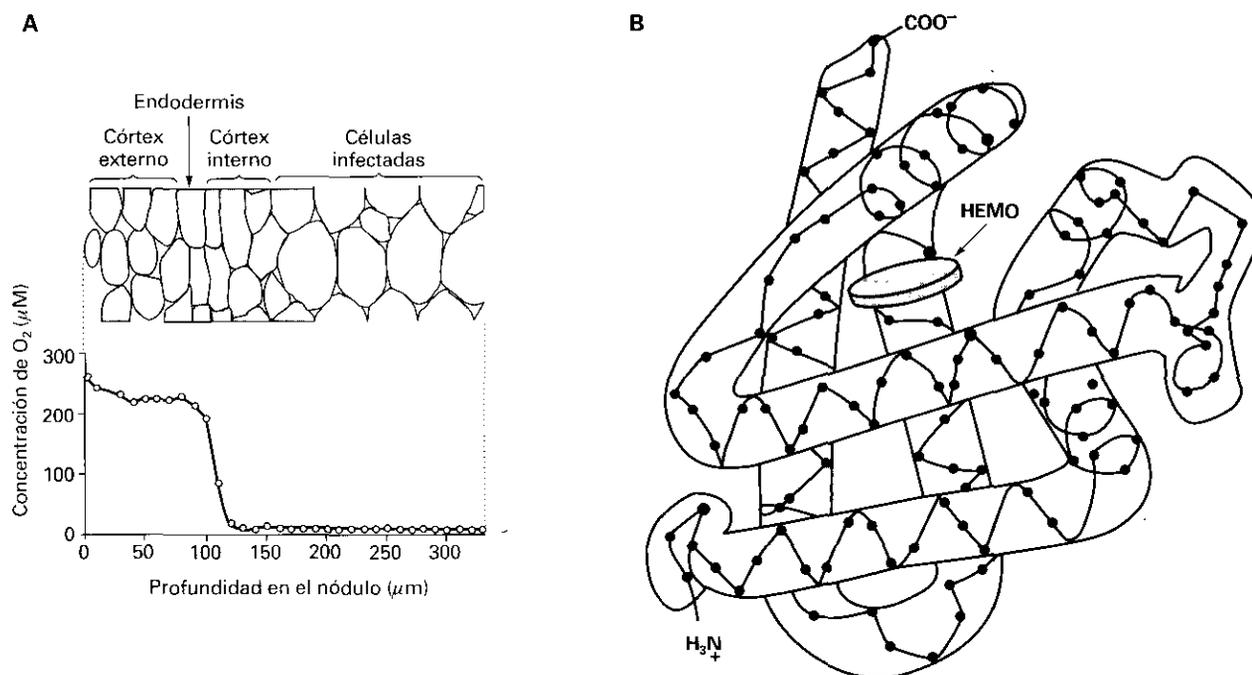


Figura 16-8. Control de la concentración de O_2 disuelto en el interior de los nódulos. **A**, Resistencia a la difusión de O_2 localizada en la zona de la endodermis y el córtex interno (también denominado parénquima nodular) de un nódulo de guisante. Su existencia queda puesta de manifiesto por la abrupta caída de la concentración de O_2 , que se midió con un microelectrodo selectivo colocado a distancias de penetración conocidas (adaptado de Witty, J. F. et al. Oxford Surveys of Plant Mol Cell Biol, 3:275-314, 1986). **B**, Estructura terciaria de la leghemoglobina de lupino, donde se señala el grupo hemo y los extremos amino y carboxi terminales (adaptado de Aparicio-Tejo et al., 1993).

tercelulares pueden deberse a cambios en la conformación de glicoproteínas que alteren su grado de avidez por el agua, o a cambios en el contenido de sacarosa que, a su vez, determinen osmóticamente la entrada o salida de agua de las células adyacentes. También se ha sugerido la existencia de células osmocontráctiles que actuarían de forma similar a los pulvínulos (véase Capítulo 24).

Una vez que el O_2 difunde hasta la zona central de los nódulos, la **leghemoglobina** (Lb) transporta el O_2 desde la membrana plasmática de las células infectadas a la membrana del simbiosoma. El O_2 libre difunde entonces a través del espacio peribacteroide, que carece de Lb, para alcanzar las oxidasas terminales de alta afinidad de los bacteroides. La difusión facilitada de O_2 por la Lb y las altas tasas respiratorias de los bacteroides aseguran que la concentración de O_2 en el entorno de la nitrogenasa se mantenga alrededor de 20-100 nM.

La Lb es una proteína monomérica de ≈ 16 kDa (unos 150 aminoácidos), con un grupo prostético tipo protohemo IX que se enlaza de forma reversible con el O_2 (Fig. 16-8B). Experimentos recientes indican que tanto la globina como el hemo son sintetizados por la planta, contrariamente a la hipótesis admitida hasta ahora de que el hemo es sintetizado exclusivamente por los bacteroides. Dentro de las células infectadas, la Lb se encuentra exclusivamente en el citosol, y no en el espacio peribacteroidal.

En condiciones fisiológicas, la Lb se encuentra en los

nódulos con el Fe de su grupo hemo en estado reducido (forma ferrosa). En nódulos de soja, aproximadamente un 20% de la Lb reducida se encuentra oxigenado (unido al O_2). Este porcentaje varía con la especie de leguminosa, la edad del nódulo o el estrés aplicado a la planta. La Lb presenta una gran afinidad por el O_2 ($K_m \approx 48$ -60 nM). Con esta constante de afinidad, y sabiendo el porcentaje de oxigenación de la Lb *in vivo*, se puede calcular que la concentración de O_2 , unido a la Lb es 50 000 veces mayor que la concentración de O_2 libre en el citosol de las células infectadas. Es decir, prácticamente todo el O_2 que alcanza los bacteroides es transportado por la Lb, mientras que una cantidad casi insignificante, llega como O_2 libre, por simple difusión.

La gran mayoría de los estudios sobre la bioquímica de la respiración en rizobios de vida libre y simbiótica se ha llevado a cabo utilizando *B. japonicum*. Los bacteroides de *B. japonicum* contienen varias **oxidasas terminales** con diferente afinidad por el O_2 , lo que determina que la concentración de O_2 regule el flujo de electrones de la cadena respiratoria. Se considera que la función de estas oxidasas en la fijación de N_2 es permitir tanto la síntesis de ATP para bajas concentraciones de O_2 (respiración «eficiente») como la eliminación de O_2 desacoplada a la síntesis de ATP para altas concentraciones de O_2 (respiración «ineficiente»).

En vida libre, *B. japonicum* expresa los citocromos *aa*₃, *y*, *o* como oxidasas terminales, mientras que los bacteroides contienen otros citocromos que también

reaccionan con el CO y que son, por tanto, posibles oxidasas. La respiración eficiente de los bacteroides tiene lugar a bajas concentraciones de O₂, con una K_m de 7 nM e implica al citocromo *cbh*₃, producto del gen *fix-NOPO*.

La Lb es una **nodulina**. Este término fue propuesto por Van Kammen en 1984 para referirse a aquellas proteínas específicas del nódulo que sintetiza la planta en respuesta a la infección, durante el desarrollo nodular, o cuando se inicia la fijación de N₂. No obstante, actualmente el término se emplea para designar a las proteínas cuya expresión aparece incrementada drásticamente en los nódulos, aunque puedan detectarse pequeñas cantidades de ellas en otros tejidos. Se distinguen dos tipos de nodulinas, según el estado de desarrollo del nódulo en el que comienza la expresión de los genes de las nodulinas. La mayoría de las nodulinas hasta ahora identificadas está codificada por genes cuya expresión comienza, más o menos, con el inicio de la fijación de N₂; se denominan nodulinas tardías. La más típica es la Lb, que ya ha sido estudiada con cierto detalle. Otras nodulinas de este tipo son la uricasa de los peroxisomas de las células no infectadas y una de las subunidades de la sacarosa sintasa. Los genes de las nodulinas tempranas se expresan durante la infección y la morfogénesis nodular. La nodulina temprana más estudiada implicada en el desarrollo nodular es la ENOD2, localizada exclusivamente en el parénquima nodular y que puede estar relacionada con la resistencia a la difusión del O₂.

3.7. La fijación de nitrógeno disminuye durante la senescencia, o en condiciones de estrés

La pérdida o disminución en la capacidad fijadora de N₂ es una característica de la senescencia, tanto natural («envejecimiento»), como inducida de los nódulos. Durante la senescencia tiene lugar una serie de importantes cambios metabólicos en los nódulos, entre los que destaca una degradación generalizada de las proteínas del citosol y, especialmente, de la Lb. Las proteínas de los bacteroides parecen ser, sin embargo, más estables que las del citosol nodular. La degradación de proteínas posiblemente se deba a una activación de las proteasas (en la que un cambio en el pH citosólico parece ser un factor importante) junto con su descompartmentación por rotura de membranas de diversos orgánulos. A la disminución del contenido de proteínas durante la senescencia podría contribuir también la inhibición de la síntesis de proteínas, tal como ocurre en condiciones de estrés hídrico.

Una característica común a casi todos los tipos de **senescencia inducida por estrés** (déficit hídrico, inundación, baja temperatura, N combinado, salinidad, defoliación, oscuridad continua), es la caída de la respiración nodular, como consecuencia de un aumento de la resistencia a la difusión de O₂. Esto es particularmente

patente en el caso del estrés hídrico, o del debido a la inundación del suelo. Los nódulos formados en suelos con exceso de agua, por ejemplo, desarrollan la presencia de más espacios intercelulares (aerénquima) para contrarrestar, aparentemente, el déficit de O₂. Otros factores añadidos al estrés hídrico son la disminución de la fotosíntesis por cierre estomático y, por tanto, del suministro de fotosintetizados a los nódulos, y la acumulación de los productos nitrogenados de la fijación (amidas, ureidos) debido a la reducción de la transpiración.

La **senescencia nodular** inducida por aplicación de nitrato presenta algunas peculiaridades. Sorprendentemente, todavía no se conoce el mecanismo por el que el tratamiento con nitrato inhibe la actividad nitrogenasa, aunque se han propuesto varias hipótesis: disminución del aporte de fotosintetizados; producción de metabolitos tóxicos (nitrito y óxido nítrico) por reducción del nitrato en los nódulos; y disminución del suministro de O₂ a los bacteroides por aumento de la resistencia a la difusión de O₂ en el córtex. La posibilidad de que el nitrito o el óxido nítrico que pueda derivarse de él, se acumulen en los nódulos e interfieran la actividad de la nitrogenasa, o de la Lb merece, sin duda, un estudio más riguroso que el dedicado hasta ahora. Recientemente, se ha sugerido que el estado de la nutrición nitrogenada de la planta podría regular la fijación de nitrógeno a través de los niveles de glutamina presentes en el floema.

4. FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y AGRICULTURA

Mundialmente, los dos tipos de cultivos más importantes son los de cereales y leguminosas. En el Cuadro 16-4 se muestra una lista de las leguminosas a las que se dedica mayor extensión de cultivo. La fijación simbiótica de N₂ contribuye directamente a la producción de las leguminosas de grano y forrajeras; asimismo, las leguminosas tienen un enorme interés como enriquecedoras de N en los suelos. Todas las culturas agrícolas han practicado **rotación de cultivos cereal-leguminosa**. Esta importancia de la asociación cereal-leguminosa no sólo se debe a su complementariedad en la dieta humana y del ganado, sino también a su papel beneficioso como alternativa de cultivos, ya que con ella se rompe la continuidad de plagas y enfermedades, a la vez que se incrementa la fertilidad del suelo.

Ya que el rendimiento de un cultivo depende marcadamente de la disponibilidad de N en las etapas críticas del desarrollo de las plantas (véase Capítulo 8), es muy importante conocer si la fijación simbiótica de N₂ es capaz de cubrir los requerimientos de la planta para un rendimiento óptimo. Cuando se compara el crecimiento de plantas noduladas y fertilizadas, se puede concluir que, si existe una simbiosis bien adaptada, el sistema simbiótico es igual de eficiente en el crecimiento. Para que una leguminosa fije eficientemente N₂, debe estar

Cuadro 16-4. Algunas especies de leguminosas ampliamente distribuidas

I. Leguminosas de grano		
<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete	América del Norte y del Sur, África, Asia
<i>Cicer arietinum</i>	Garbanzo	Principalmente la India, pero ampliamente distribuida por el área mediterránea
<i>Glycine max</i>	Soja	América del Norte y del Sur, Asia
<i>Lens culinaris</i>	Lenteja	India, Turquía, área mediterránea
<i>Lupinus sp.</i>	Lupino, altramuz	Europa, Rusia, Australia
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Judía	Este de África, América del Norte y del Sur, Suroeste de Europa
<i>Pisum sativum</i>	Guisante	La mayoría de las regiones del mundo
<i>Vicia faba</i>	Haba	África, Asia, Europa
<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Cowpea</i>	África (zonas semiáridas)
II. Leguminosas forrajeras		
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Ampliamente cultivada en regiones templadas
<i>Trifolium sp.</i>	Trébol	Cultivado en zonas templadas y subtropicales
<i>Vicia sativa</i>	Veza	Cultivada en regiones templadas

bien nodulada, tener tasas fotosintéticas y respiratorias elevadas, encontrarse en condiciones ambientales adecuadas y poseer un sistema vascular eficaz en el transporte de los productos de la fijación fuera del nódulo para su posterior distribución a otros tejidos de la planta. Desde un punto de vista fisiológico, es interesante resaltar que, aunque las plantas no noduladas pueden tener más C disponible para el crecimiento de la planta y, por tanto, un mayor potencial productivo, una gran proporción del C, es utilizada en el mantenimiento de estructuras inertes, de donde no puede ser fácilmente recuperado, lo que desde un punto de vista agronómico puede reducir la superioridad relativa de las plantas dependientes de N combinado con respecto a las fijadoras de N₂.

RESUMEN

La fijación biológica de N₂ es llevada a cabo por organismos procariontes, que poseen el complejo multienzimático **nitrogenasa**. Éste cataliza la reducción altamente endergónica de N₂ atmosférico a amonio en presencia de Mg, ATP y un donador de electrones (tipo ferredoxina). La nitrogenasa es muy sensible al O₂, por lo que los organismos diazotrofos fijan N₂ en ambientes anaerobios o, alternativamente, deben desarrollar estrategias para evitar el daño irreversible del complejo nitrogenasa. Algunos diazotrofos sólo fijan N₂ en asociaciones simbióticas, entre las que destacan las formadas entre rizobios y leguminosas. La formación de estas

simbiosis implica el intercambio de señales entre la planta y las bacterias, que culmina con la formación de una estructura tumoral, normalmente localizada en la raíz, que se denomina **nódulo**, donde se localizan los simbiosomas que albergan los bacteroides. El nódulo proporciona a la nitrogenasa un entorno donde la concentración de O₂ está regulada por una resistencia variable en el córtex y la presencia de leghemoglobina en la zona central. El funcionamiento del nódulo depende del suministro de carbono, en forma de sacarosa, por parte de la planta. La sacarosa es metabolizada hasta ácidos dicarboxílicos que sirven de fuente energética a los bacteroides. El amonio fijado por éstos, es excretado al citosol de la célula huésped que lo incorpora en forma de amidas o ureidos, los cuales son exportados al resto de la planta, que puede satisfacer así su requerimiento de nitrógeno en ausencia de nitrógeno mineral en el suelo.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Explique por qué la producción de hidrógeno supone una disminución de la eficiencia energética del proceso de fijación de nitrógeno.
2. ¿Qué estrategias poseen los organismos diazotrofos para proteger la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno?
3. ¿En qué se basa la especificidad de la simbiosis entre las diferentes especies de leguminosas y rizobios?
4. ¿Es necesaria la presencia de rizobios para la estimula-

ción de las divisiones meristemáticas que dan lugar a la formación del nódulo?

5. ¿Por qué se habla de un complejo nitrogenasa y no de una enzima nitrogenasa?
6. Si se aíslan simbiosomas intactos de los nódulos y se incuban en condiciones microaeróbicas, ¿podrían fijar nitrógeno con glucosa como fuente de energía?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Aparicio-Tejo, P. M. *et al.*: «Fijación de nitrógeno». En *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.) McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.
2. Dilworth, M. J. y Glenn, A. R. (eds.): *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*, Elsevier, Amsterdam, 1991.
3. Elmerich, C. *et al.* (eds.): *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998.
4. Gallon, J. R. y Chaplin, A. E.: *An Introduction to Nitrogen Fixation*. Cassell, Londres, 1987.
5. González, J. y Lluch, C. (eds.): *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno*. Ed. Rueda, Alcorcón, 1992.
6. Gresshoff, P. M. (ed.): *Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1990.
7. Hansen, A. P.: *Symbiotic N₂ Fixation of Crop Legumes*. Margraf Verlag, Weikersheim, 1994.
8. Legocki, A. *et al.* (eds.): *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. Springer-Verlag, Berlín, 1997.
9. Olivares, J., Barea, J. M. (eds.): *Fijación y Movilización de Nutrientes, Vol. II*, Colección Nuevas Tendencias, CSIC, Madrid, 1991.
10. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. J. (eds.): *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998.
11. Sprent, J. I. y Sprent, P.: *Nitrogen Fixing Organisms. Pure and Applied Aspects*. Chapman and Hall, Londres, 1990.

INTRODUCCIÓN AL METABOLISMO SECUNDARIO

María Teresa Piñol, Javier Palazón y Rosa María Cusidó

1. Conceptos generales. 2. Terpenos. 3. Fenoles. 4. Alcaloides.

1. CONCEPTOS GENERALES

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como los azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros), esenciales para la vida celular y, en general, de la planta. Estos procesos constituyen, en su conjunto, el **metabolismo primario**, y los compuestos indicados se denominan **metabolitos primarios**. Además de estos procesos metabólicos primarios, en las plantas se pueden desarrollar otras rutas que conducen a la formación de compuestos usualmente peculiares de ciertos grupos taxonómicos. Estas rutas constituyen el **metabolismo secundario**, y sus productos se denominan **metabolitos secundarios**. Sin embargo, debido a que los metabolitos secundarios derivan biosintéticamente de ciertos compuestos primarios (Fig. 17-1), ambas clases de metabolismo están interconectadas en una extensión que hace difícil el establecimiento de una clara división entre ellas.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios suele hallarse restringida a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo como de las células especializadas, y a períodos de estrés causados, por ejemplo, por la deficiencia de nutrientes, factores ambientales, o el ataque de microorganismos. Este fenómeno se debe a la formación, dependiente de fase, de las correspondientes enzimas, lo que significa que la expresión del metabolismo secundario se basa en un proceso de diferenciación. Las proteínas formadas como resultado de procesos de diferenciación se pueden clasificar, según su significación biológica y función en la célula productora, como proteínas del metabolismo primario, o como proteínas de

especialización. De acuerdo con esta clasificación, el metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, transformación y degradación de compuestos endógenos mediante **proteínas de especialización**.

Comúnmente, los metabolitos secundarios de las plantas se habían considerado sustancias de desecho para el vegetal, carentes de una función fisiológica definida. En la actualidad, se conoce que, si bien los denominados compuestos secundarios no tienen como los metabolitos primarios una importancia directa para la célula productora, sí pueden tener significación para el organismo productor como un todo. Muchos metabolitos secundarios están implicados en relaciones ecológicas, es decir, de la planta productora con los otros organismos de su medio natural. Ejemplos de ello son los

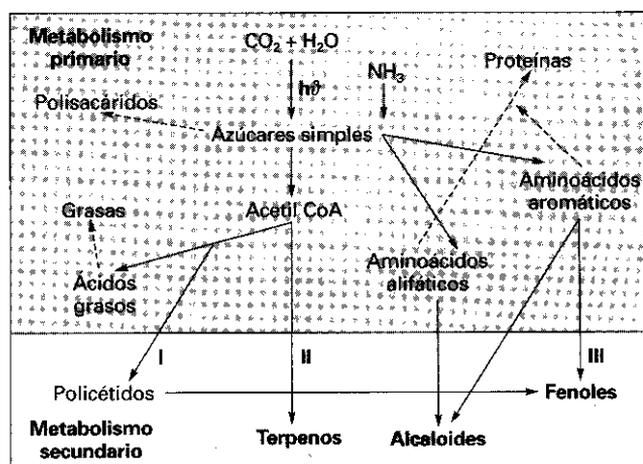


Figura 17-1. Relaciones entre el metabolismo primario y secundario de las plantas. I, ruta del acetato-malonato. II, ruta del acetato-mevalonato. III, ruta del ácido siquímico.

pigmentos de las flores que atraen a los insectos polinizadores y los compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos vegetales (sustancias alelopáticas), o que protegen a la planta productora de infecciones (fitoalexinas) o de los depredadores (disuasorios nutritivos o alimentarios). Otros compuestos formados en las rutas del metabolismo secundario tienen importancia fisiológica (p. ej., los esteroides constituyentes de las biomembranas o el polímero estructural lignina) (véase Capítulo 1), o sirven como señales que integran la diferenciación celular y el metabolismo en diferentes partes del organismo vegetal multicelular (p. ej., muchas fitohormonas) (véase Capítulo 18). Estos compuestos esenciales para las plantas y formados por las rutas del metabolismo secundario tienen que ser considerados metabolitos primarios por su significación fisiológica.

El metabolismo primario, como queda reflejado en la Figura 17-1, proporciona un número de pequeñas moléculas, entre las que cabe destacar el ácido siquímico, el acetato y los aminoácidos, los cuales constituyen los materiales de partida para las más importantes rutas del metabolismo secundario. El **ácido siquímico**, por la ruta metabólica que lleva su nombre, da origen a muchos compuestos aromáticos, entre ellos, los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles. El **acetato** es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos por la **ruta del acetato-malonato**, y de los terpenos o isoprenoides por la **ruta del acetato-mevalonato**. Los **aminoácidos** son precursores de los alcaloides y de antibióticos peptídicos que incluyen las penicilinas y las cefalosporinas. Finalmente, existen metabolitos secundarios en cuya formación concurren varias rutas metabólicas. Entre estos compuestos de síntesis mixta destacan los flavonoides, formados por la **ruta del ácido siquímico** y del acetato-malonato.

También, variaciones en las rutas del metabolismo primario pueden conducir a la formación de metabolitos secundarios. Así, variaciones de la ruta de las pentosas-fosfato (véase Capítulo 14) son fuente de los azúcares raros encontrados en los glucósidos cardiotónicos, y variaciones en las rutas de síntesis de los aminoácidos proteicos dan origen a los aminoácidos no proteicos.

En este capítulo se estudiará la biosíntesis y significación biológica de los tres principales grupos de metabolitos secundarios vegetales: los terpenos, los fenoles y los alcaloides. Para cada uno de estos grupos, se ofrecerá también una visión de su interés para la industria, ya que el metabolismo secundario vegetal es una fuente importante de valiosos productos químicos.

2. TERPENOS

Los **terpenos** o **isoprenoides** constituyen uno de los grandes grupos de compuestos secundarios ampliamente presentes en el reino vegetal. Entre ellos se encuentran metabolitos claramente secundarios (como los componentes de esencias, bálsamos y resinas) y un im-

portante grupo de metabolitos considerados fisiológicamente primarios. Entre los isoprenoides considerados primarios figuran las fitohormonas giberelinas (véase Capítulo 20) y el ácido abscísico (véase Capítulo 22); la cadena isoprenoide de algunas citoquininas (véase Capítulo 21), de la plastoquinona y de la ubiquinona; el fitol de la clorofila; los carotenoides; los fitoesteroides esenciales para la integridad de las biomembranas y los dolicoles.

En las plantas, igual que en los mamíferos, los isoprenoides se sintetizan a partir del compuesto C_5 isopentenil pirofosfato (IpPP) (1), que se puede considerar el **isopreno activo**, hipotético, de Ruzicka. Los isoprenoides se clasifican, según el número de unidades teóricas de isopreno de que se componen en: monoterpenos (2 unidades); sesquiterpenos (3 unidades); diterpenos (4 unidades); triterpenos (6 unidades); tetraterpenos (8 unidades) y politerpenos (más de 8 unidades).

2.1. Todos los isoprenoides naturales proceden del acetato activo, es decir, del acetyl CoA

En los primeros pasos de la biosíntesis de los isoprenoides (Fig. 17-2), en una reacción catalizada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR), se condensan tres moléculas de acetyl CoA (CH_3-CO CoA) (2) y originan el ácido mevalónico (AMV) (3): compuesto de 6 carbonos que experimenta una descarboxilación y dos fosforilaciones consecutivas para transformarse en el IpPP. Este compuesto puede transformarse en su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (4) por desplazamiento del doble enlace de la posición 3-4 a la 2-3. Estos dos compuestos dan origen de todos los terpenos naturales.

IpPP y el DMAPP se condensan siguiendo un modelo cabeza-cola, aportando DMAPP el resto isoprenoide α o inicial para formar el geranyl pirofosfato (C_{10}) (GPP) (5). La enzima que cataliza esta reacción es la geranyl pirofosfato sintasa, que está localizada en los plastos. El compuesto que se forma, el GPP, da lugar a todos los monoterpenos de las plantas (Fig. 17-3).

También estos dos compuestos, DMAPP e IpPP, se pueden unir en forma cabeza-cola para originar farnesil pirofosfato (C_{15}) (FPP) (6), aunque en este caso es un DMAPP y 2 IpPP los que dan lugar a FPP. La enzima que cataliza esta reacción es la farnesil pirofosfato sintasa que se encuentra localizada en el retículo endoplásmico. El FPP es el compuesto que da lugar a todos los sesquiterpenos y, también, a los triterpenos mediante una reacción de dimerización, por unión cola-cola de dos moléculas de sesquiterpeno.

La extensión de la cadena terpénica puede proseguir en el cloroplasto, donde se condensan, por la acción de la enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa, una unidad de DMAPP y 3 de IpPP para formar geranylgeranyl pirofosfato (C_{20}) (GGPP) (7). Este compuesto es el precur-

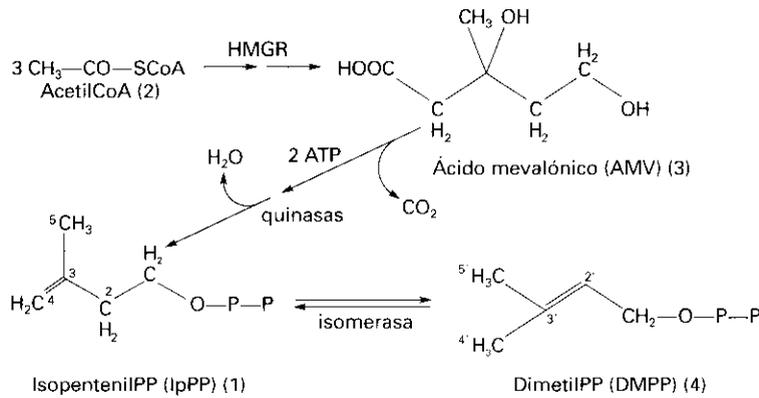


Figura 17-2. Biosíntesis de los terpenos o isoprenoides. Formación del isopentenil pirofosfato.

El precursor directo de los diterpenos y, por la dimerización de estos últimos, de los tetraterpenos.

Existen también otras enzimas, las preniltransferasas, que pueden incrementar con más unidades de IpPP la longitud de la cadena terpénica hasta formar grandes polímeros, los politerpenos (C > 40), como son la parte isoprenoide de la plastoquinona y la ubiquinona, los dolícoles, el caucho y la gutapercha.

Como ya hemos comentado, en la biosíntesis de los terpenos o isoprenoides se producen, además de las uniones cabeza-cola para incrementar la longitud de la cadena terpénica, reacciones de dimerización o uniones cola-cola (Fig. 17-4). En estas reacciones, la cola reactiva de un terpeno se une al doble enlace de las posicio-

nes 2-3, creándose un ciclopropano (8) muy inestable que se abre y rompe para producirse al final una unión 1'-1.

Por la unión de dos moléculas de FPP se forma escualeno (9) (Fig. 17-5), que es un compuesto de 30 átomos de carbono, precursor de los triterpenos. La enzima que cataliza esta reacción, la escualeno sintasa, requiere poder reductor en forma de NADPH y se localiza en la fracción microsomal. El mecanismo de la reacción es el mismo si se unen dos moléculas de GGPP; pero, en este caso, el compuesto que se forma tiene 40 átomos de carbono y recibe el nombre de fitoceno (10) (Fig. 17-8). Esta dimerización sólo se produce en el cloroplasto, puesto que la enzima fotoinducida que la cataliza, la

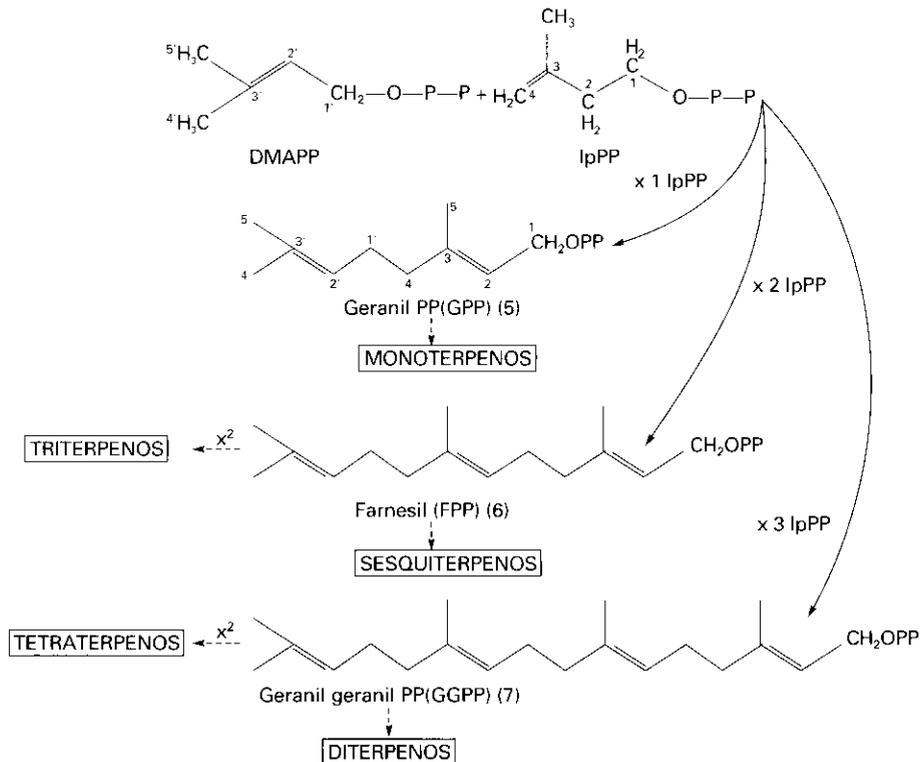


Figura 17-3. Extensión de la cadena terpénica o isoprenoide de C₅ a C₂₀, x², reacciones de dimerización.

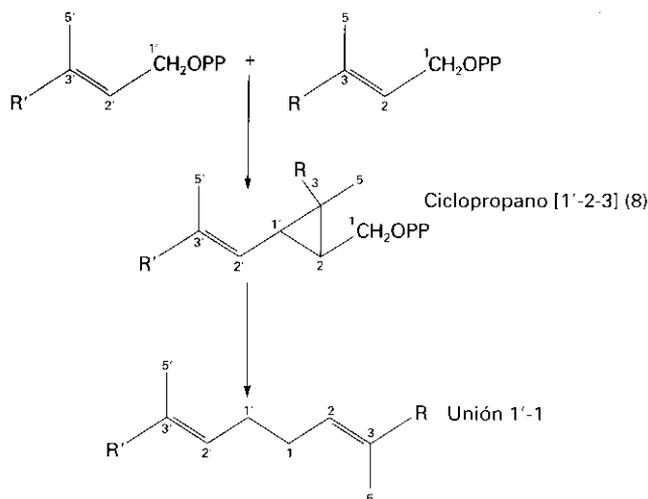


Figura 17-4. Formación y apertura del ciclopropano en las reacciones de dimerización.

fitoeno sintasa, sólo se localiza en dicho orgánulo. Sin embargo, a diferencia de la escualeno sintasa, la fitoeno sintasa no requiere poder reductor.

2.2. Los monoterpenos son compuestos C₁₀ que derivan del GPP

Del GPP se originan directamente los monoterpenos acíclicos, o bien el mismo compuesto se puede conver-

tir en neril pirofosfato (isómero *cis*) y originar los terpenos cíclicos. La mayoría de los monoterpenos presenta funciones oxigenadas, como aldehídos o alcoholes, y las reacciones de oxidación tienen lugar en el citoplasma celular. Como ejemplos se pueden destacar: limoneno (11), mentol (12), timol (13) y alcanfor (14); todos ellos con acción antiséptica y expectorante. Muchos de estos compuestos se acumulan en estructuras vegetales específicas y constituyen las **esencias naturales**, por lo que se utilizan en cosmética y perfumería. También, muchos monoterpenos están implicados en relaciones ecológicas de las plantas que los producen, ya que, debido a sus propiedades organolépticas, atraen insectos y otros animales que favorecen la polinización (véase Capítulo 26).

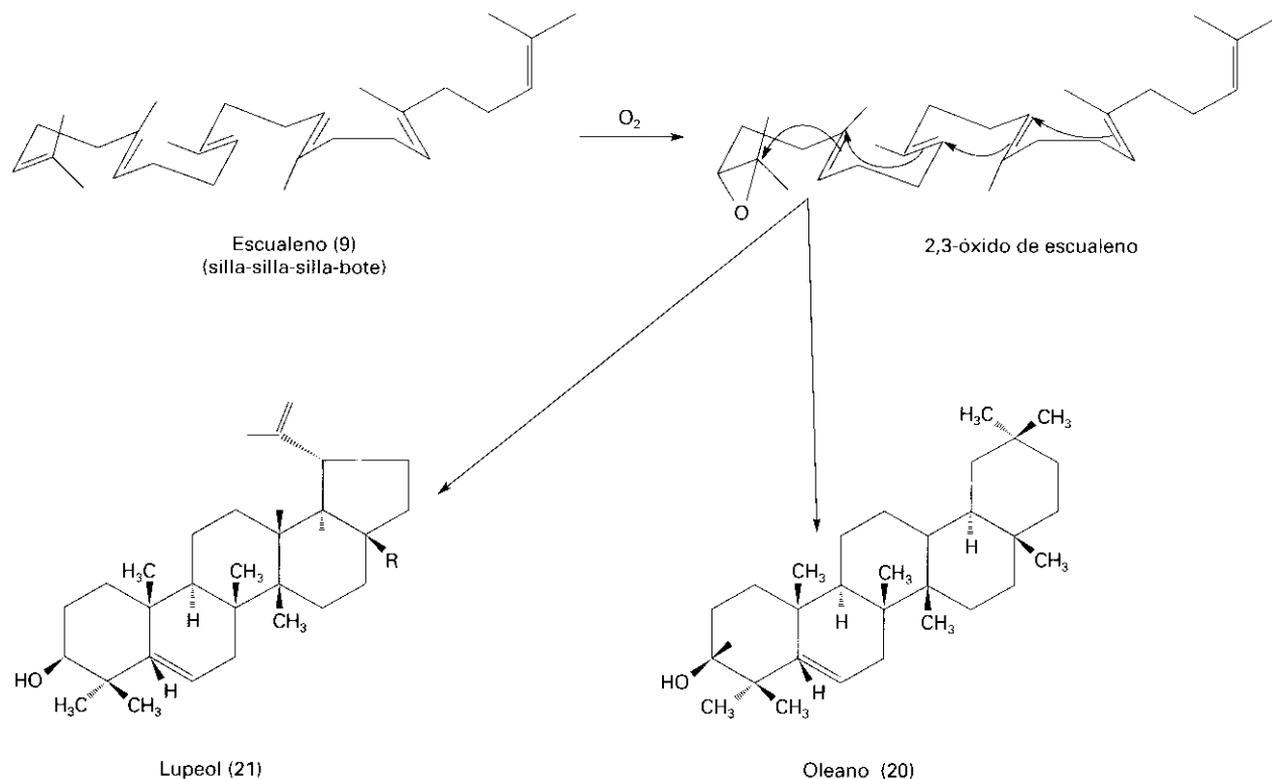
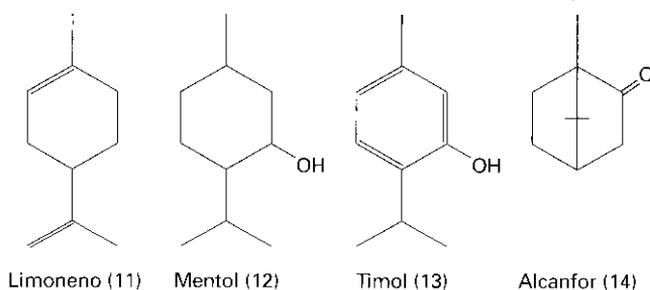
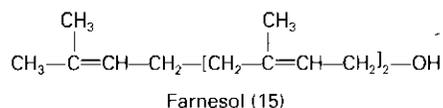


Figura 17-5. Sistema de ciclación del escualeno, con la configuración silla-silla-silla-bote, en organismos eucariotas.

2.3. Los sesquiterpenos son compuestos C₁₅ que derivan del FPP

Se pueden encontrar sesquiterpenos con estructuras cíclicas o acíclicas, saturadas o con dobles enlaces aislados. Muchos de ellos poseen funciones hidroxilo, cetona, carboxilo, etc. En general, son compuestos lipófilos y volátiles, y se localizan en glándulas de esencias junto con monoterpenos.

En este grupo de sesquiterpenos, además de componentes de esencias como el farnesol (15), se encuentran, entre otros compuestos, la fitohormona ácido abscísico (16) (véase Capítulo 22) y feromonas (metabolitos secundarios de origen animal).

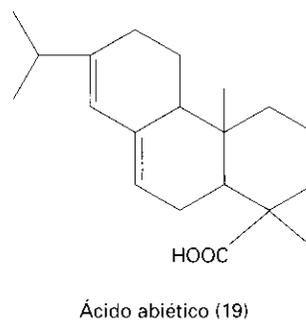
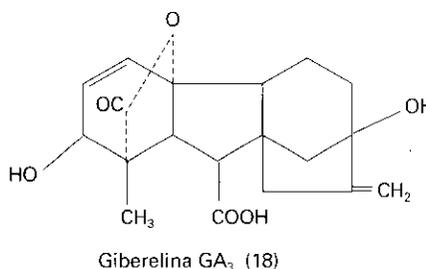
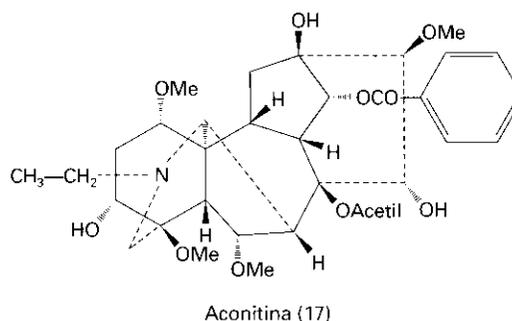


2.4. Los diterpenos son compuestos C₂₀ derivados del GGPP

Los diterpenos se pueden encontrar en forma de cadena abierta (p. ej., el fitol, que constituye la cadena lipófila de la clorofila) (véase Capítulo 9), o en forma de estructuras cíclicas con diversos grupos funcionales (-OH, -CO, -COOH). Incluso pueden contener nitrógeno y formar alcaloides diterpénicos, como la aconitina (17). Junto con metabolitos de relevancia fisiológica (giberelinas (18), fitol, tocoferoles y filoquinonas), se encuentran compuestos con evidente carácter secundario, como son los ácidos resínicos abiético (19) y agático, constituyentes de las **resinas** localizadas en depósitos o canales de las gimnospermas.

2.5. Los triterpenos son compuestos principalmente C₃₀ procedentes de la dimerización del FPP

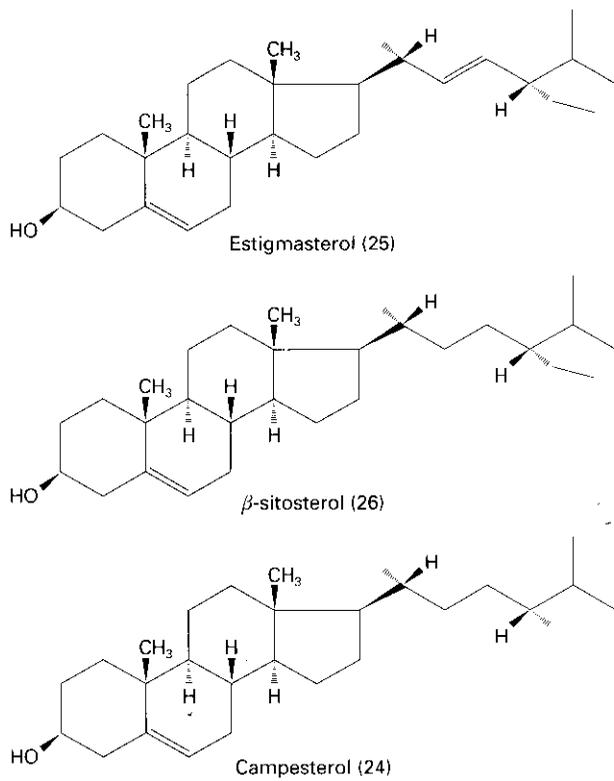
Los triterpenos y los esteroides (subclase de los triterpenos de C₁₈ a C₂₉) figuran entre los isoprenoides más relevantes. En general, son compuestos policíclicos y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Triterpenos y esteroides desempeñan importantes funciones fisiológicas en las plantas, y algunos tienen un gran interés farmacológico.



Como ya se ha comentado previamente, los triterpenos se forman en el citoplasma celular a partir del escualeno (9). Este compuesto, presente en todos los seres vivos y carente de una función fisiológica definida, se cicla fácilmente para dar lugar a distintos compuestos. El mecanismo de ciclación se inicia por una oxidación, lo que hace que, en la mayoría de los casos, los triterpenos presenten un hidroxilo en la posición 3 de su molécula.

Si el escualeno adopta una configuración silla-silla-silla-bote, conduce a la formación de un grupo de compuestos triterpénicos con 5 ciclos, tipo oleano (20) o lupeol (21), entre otros (Fig. 17-5). Estos compuestos, que normalmente se encuentran glucosilados en el hidroxilo de la posición 3, constituyen el grupo de las **saponinas triterpénicas**. De entre estos compuestos destacan los ginsenosídeos, aislados de *Panax ginseng*, utilizados ampliamente en medicina por su acción estimulante y antiasténica.

Si el escualeno adquiere la configuración espacial silla-bote-silla-bote, puede dar lugar a cicloartenol (22) en vegetales y lanosterol en animales (23) (Fig. 17-6). A partir de cicloartenol, se forman los diversos esteroides vegetales o **fitoesteroides**, mediante una serie de reacciones que incluyen: eliminación de los grupos me-



tilo de las posiciones 4 y 14, apertura del ciclopropano entre las posiciones 9-10 y modificaciones de la cadena lateral C_{17} . Una vez formados, estos compuestos se caracterizan por poseer el sistema tetracíclico del esterano en *trans*, presentar un grupo hidroxilo en la posición 3 y modificaciones en la cadena C_{17} . Los esteroides vegetales más universales son campesterol (24), estigmasterol

(25) y sitosterol (26). Respecto a la función en la planta de estos compuestos, es similar a la de los esteroides en los animales, así:

- Son constituyentes de membranas biológicas. En animales, las membranas contienen cantidades elevadas de colesterol, que actúa regulando la fluidez de la misma y dándole estabilidad. En general, cuanto mayor es la riqueza en colesterol, mayor es el carácter lipófilo de las membranas, es decir, son más impermeables al paso del agua e iones. Las membranas vegetales, aunque tienen colesterol, son más ricas en sitosterol, campesterol y estigmasterol, variando la concentración de estos compuestos en función del tipo de membrana y su función en la célula. Se ha comprobado que para que un esteroide vegetal sea componente de membrana ha de tener la configuración planar característica del núcleo esterano, presentar el hidroxilo de la posición 3 libre y carecer de grupos metilo en la cara α o plano inferior de la molécula.
- Presentan acción hormonal. En su conjunto, los esteroides que presentan cierta acción hormonal en las plantas se denominan brasinoesteroides (Fig. 17-7) (véase también Capítulo 22). Estos compuestos poseen dos hidroxilos vecinos en el anillo A y el anillo B de siete eslabones con una función lactona, o de seis eslabones con un grupo cetona. La cadena C_{17} está siempre polihidroxilada. Los brasinoesteroides actúan de forma similar y sinérgica con las auxinas, activando las ATPasas de membrana, y de forma similar y adi-

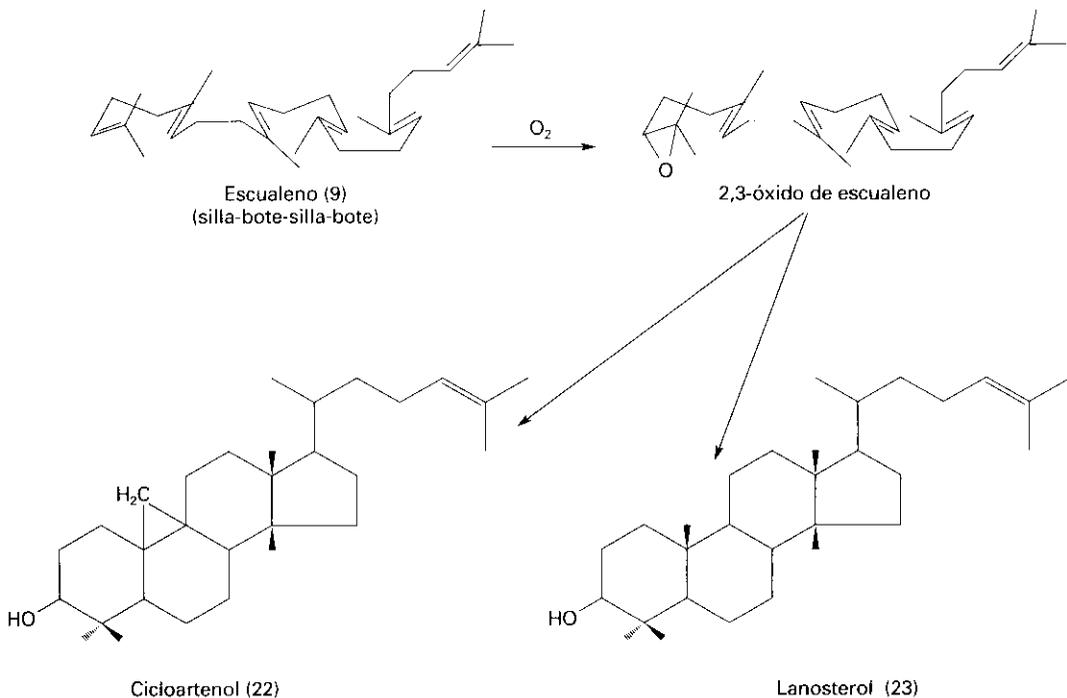


Figura 17-6. Sistema de ciclación del escualeno, con la configuración silla-bote-silla-bote, en organismos eucariotas.

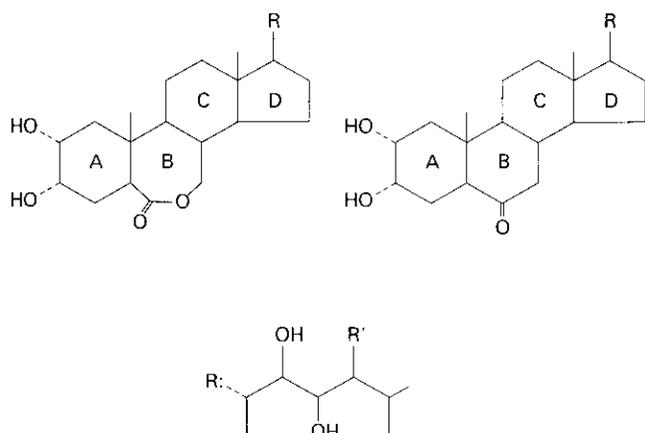
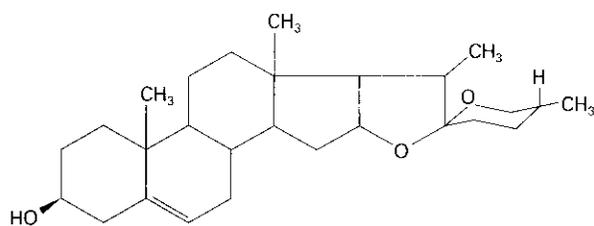


Figura 17-7. Estructuras principales de los brasinoesteroides.

tiva a las giberelinas. Igual que las auxinas, a altas dosis promueven un incremento de la síntesis de etileno al impedir la conjugación a azúcares de las auxinas (los -OH que contienen se unen muy fácilmente a azúcares) y, a la vez, activar la enzima ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa, responsable de la biosíntesis de etileno.

Además de los esteroides indicados, de distribución general en los vegetales, las plantas presentan otros grupos de esteroides de distribución más restringida y característicos de determinadas familias y géneros, pero de gran interés para la industria. Entre este grupo de esteroides figuran las saponinas esteroidicas y los glucósidos cardiotónicos. Tales saponinas son glucósidos, cuyas geninas poseen dos heterociclos con oxígeno unidos a los C₁₆ y C₁₇ y, a su vez, conectados por un grupo espiroacetal. Normalmente, las geninas se glucosidan en su hidroxilo C₃.

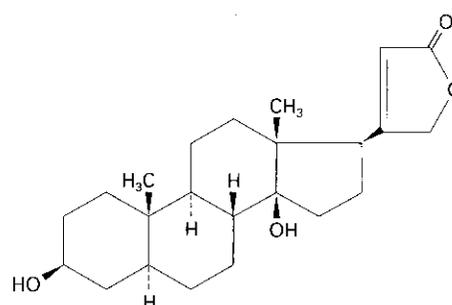


Diosgenina (27)

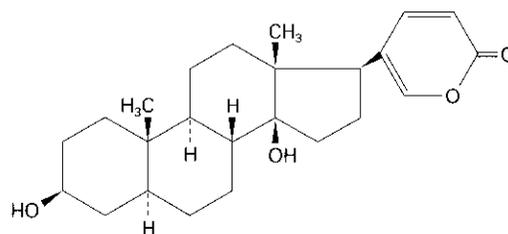
Las saponinas esteroidicas se hallan en la célula vegetal asociadas a sistemas de membrana y ejercen diferentes acciones biológicas, entre ellas, la promoción de la germinación de las semillas y la inhibición del crecimiento de la raíz. En general, se consideran compuestos de defensa para el vegetal. Estos compuestos tienen, además, importancia como moléculas de partida en la

semisíntesis de hormonas esteroidicas utilizadas en medicina. La saponina esteroidica más utilizada con este fin es la diosgenina (27), aislada de varias especies del género *Dioscorea*. También, estas saponinas son ampliamente utilizadas como expectorantes, antiinflamatorios, antifúngicos y antibacterianos.

Los glucósidos cardiotónicos son esteroides que presentan una función hidroxilo en la posición C₁₄ del anillo esteroidico y, en la posición C₁₇, un anillo lactónico de cinco eslabones en los cardenólidos y de seis en los bufadienólidos. La unión entre los anillos A y B puede ser *cis* o *trans*, y la unión entre C y D suelen ser *cis* a diferencia de la gran mayoría de esteroides. Finalmente, el hidroxilo del C₃ se encuentra glucosilado por una cadena de azúcares poco comunes (p. ej., digitoxosa),



Tipo Cardenólido (28)



Tipo Bufadienólido (29)

Los glucósidos cardiotónicos más importantes para la industria son la digoxina y la digitoxina, aisladas de especies del género *Digitalis*. En medicina, estos compuestos se utilizan principalmente como cardiotónicos, fármacos irremplazables en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y algunas arritmias. La digoxina es uno de los 10 productos naturales más prescritos actualmente.

2.6. Los tetraterpenos son compuestos C₄₀ procedentes de la dimerización del GGPP

Los tetraterpenos son compuestos formados por la unión de 8 unidades de isopreno. En general, presentan una serie de dobles enlaces conjugados y uno o dos anillos con la estructura de la ionona α o β , según la posición del doble enlace.

Los tetraterpenos sin funciones oxigenadas forman el grupo de los carotenos, mientras que los que poseen oxígeno en su molécula constituyen el grupo de las xantofilas (Fig. 17-8); ambos grupos de compuestos constituyen los **carotenoides**. Carotenos y xantofilas se presentan en las hojas de todas las plantas y, también, en flores y frutos, localizados en los plastos. Actúan en la fotosíntesis como pigmentos accesorios en la captación y el transporte de la energía luminosa (véase Capítulo 9) y protegen a los vegetales del efecto letal combinado de la luz y el oxígeno formando epóxidos (véanse Capítulos 10, 13 y 30).

En las plantas superiores, la biosíntesis de carotenoides se efectúa en los plastos, asociada a sistemas membranosos e interdependiente de la biosíntesis de clorofilas. El 15-*cis*-fitoeno (10) (precursor formado por dimerización de GGPP) experimenta una serie de deshidrogenaciones dependientes de NAD que lo transforman en licopeno (30). Este compuesto se puede ciclar por acción de una enzima dependiente de FAD para originar los carotenoides cíclicos, que presentan anillos terminales de ionona. Posteriormente, en los propios plastos, se puede producir la incorporación de funciones oxigenadas en los carotenos (p. ej., el α -caroteno, 31) para formar las xantofilas (p. ej., la luteína, 32). La

biosíntesis de carotenoides, dependiente de la luz, podría ser activada por el fitocromo (véase Capítulo 23) en las plantas superiores, aunque se desconoce el mecanismo por el cual actúa este fotorreceptor.

2.7. Los politerpenos son alcoholes primarios monohídricos de cadena abierta

Los politerpenos, o poliisoprenoides, se forman por la unión cabeza a cola de más de 8 residuos de isopreno. Estos alcoholes pueden encontrarse libres o unidos a estructuras quinónicas. Entre estos últimos figuran la cadena isoprenoide de la plastoquinona (sintetizada en los cloroplastos) y la correspondiente a ubiquinona (sintetizada en las mitocondrias). Otros poliisoprenoides, sintetizados en el citoplasma/retículo endoplásmico a partir del farnesil pirofosfato, son los dolicoles. Estos compuestos, en su forma fosforilada, participan en el transporte de azúcares a través de las membranas del retículo endoplásmico.

Los poliisoprenoides pueden llegar a presentar un grado de polimerización muy elevado, como es el caso del caucho (3000-6000 restos de isopreno) y la gutapercha. El caucho es el todo *cis*-poliisopreno, y la gutapercha

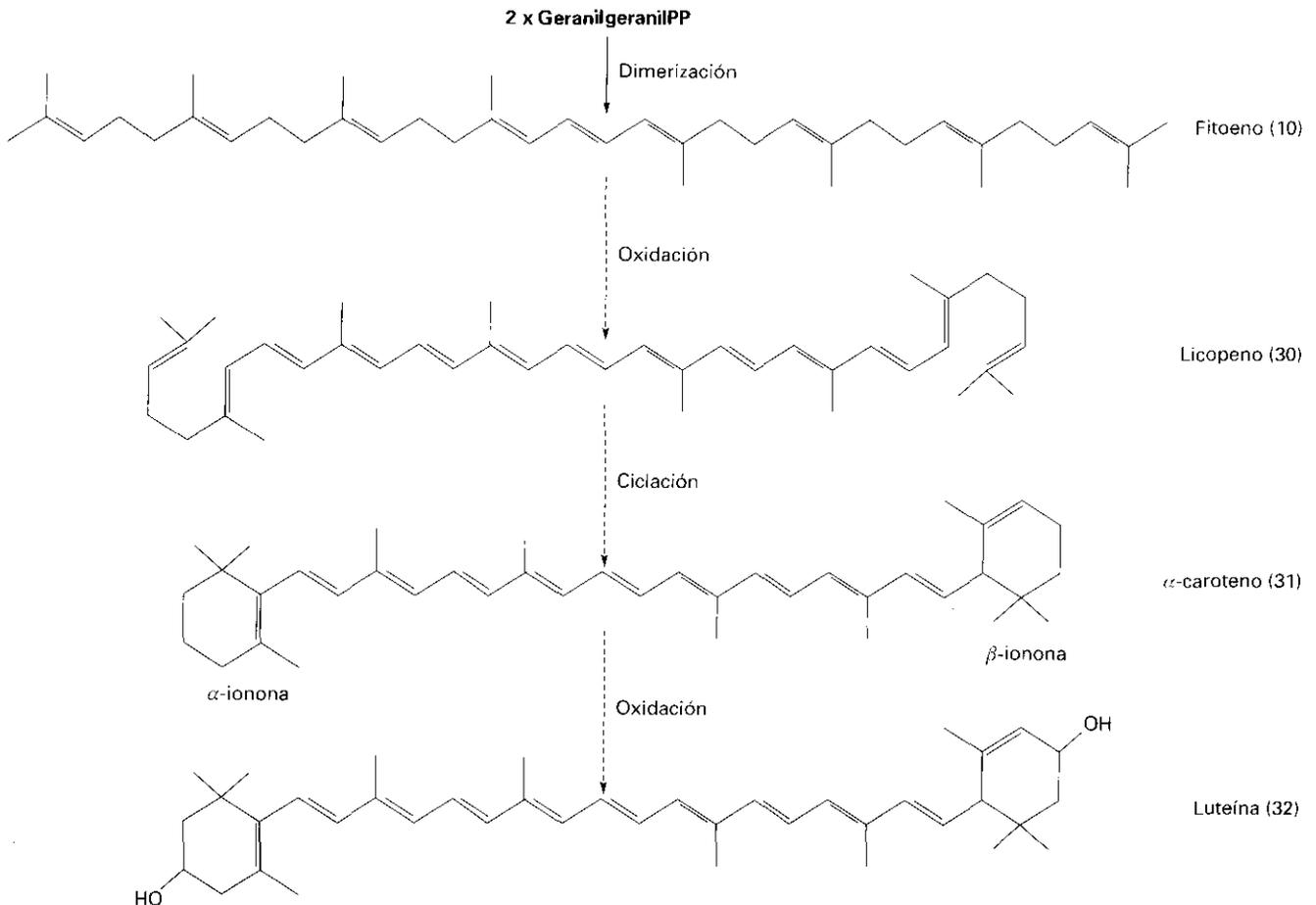
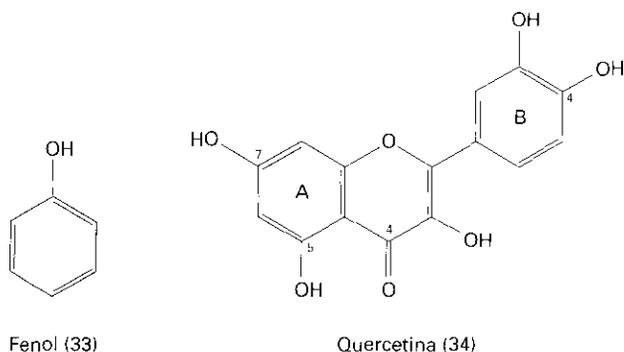


Figura 17-8. Biosíntesis de carotenoides. Etapas fundamentales y ejemplos de algunas estructuras tetraterpénicas.

cha (de menor peso molecular) es el todo *trans*-poliisopreno. Para su uso comercial, el caucho se extrae de *Hevea brasiliensis* y la gutapercha, principalmente, de la especie *Palaquium gutta*. Ambos compuestos forman micelas que se hallan en una fase dispersa, constituyendo el látex, generalmente contenido en unas células o vasos especializados llamados laticíferos.

3. FENOLES

La presencia de fenoles es una característica de todos los tejidos vegetales. Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos. El compuesto básico es el **fenol** (33), pero la mayoría de estos compuestos son **polifenoles**. Entre los polifenoles vegetales, de los que actualmente se conocen más de 8000, figuran las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos y los flavonoides. Estos últimos compuestos forman el grupo más numeroso; un flavonoide típico es la quercetina (34). Además de las estructuras monoméricas y diméricas, existen importantes grupos de polímeros fenólicos, como las ligninas y los taninos. También se encuentran unidades fenólicas entre los compuestos nitrogenados, de los que un buen ejemplo es el aminoácido aromático tirosina.



Los fenoles se oxidan fácilmente en las plantas, debido a la presencia en sus tejidos de fenolasas, enzimas que catalizan, entre otras, la oxidación de los monofenoles a difenoles, de los difenoles a quinonas y de estos productos a los flobafenos, polímeros de naturaleza amorfa que frecuentemente muestran una coloración rojiza. Por otra parte, los flavonoides, por su condición de polifenoles, pueden actuar como antioxidantes e inactivar el centro activo de numerosas enzimas, por ejemplo, de las indicadas fenolasas.

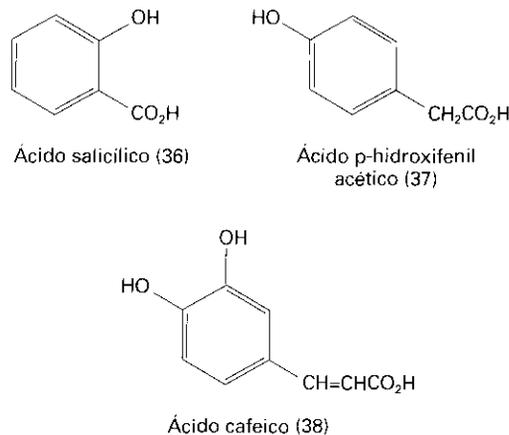
Los polifenoles son importantes económicamente, porque contribuyen al sabor, aroma y color de alimentos y bebidas. El aroma y el sabor del té están relacionados con el contenido en polifenoles de la hoja. Asimismo, el amargor de la cerveza se debe a su contenido en un derivado del floroglucinol (35), la humulona; mientras que el color rojo del vino es debido a la presencia

de antocianinas. También son de destacar las interacciones moleculares entre fenoles vegetales, como los taninos, y las uniones peptídicas de las proteínas en la llamada reacción de «curtido».

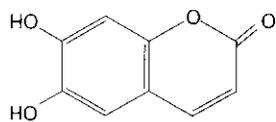
En la naturaleza, los compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la protección de la planta frente a depredadores, y como fitoalexinas y sustancias alelopáticas. También actúan como señales químicas en la floración y la polinización de las plantas, y en los procesos de simbiosis vegetal (p. ej., en la fijación del nitrógeno; véase Capítulo 16) y de parasitismo vegetal (p. ej., por *Agrobacterium*). A su vez, el contenido y la naturaleza de los fenoles en la planta pueden actuar sobre su crecimiento mediante un mecanismo que modifica los niveles endógenos del ácido 3-indolacético (AIA). Se ha comprobado que los derivados fenólicos monohidroxilados actúan como cofactores de la enzima AIA-oxidasa, responsable de la degradación de esta hormona, mientras que los derivados *o*-difenílicos, fácilmente oxidables, protegen el AIA de su degradación (véase Capítulo 19). Por ello, los niveles relativos de mono- y *o*-difenoles podrían ejercer un efecto regulador del crecimiento de los vegetales.

3.1. Los fenoles se clasifican de acuerdo con el número de átomos de carbono en su estructura básica

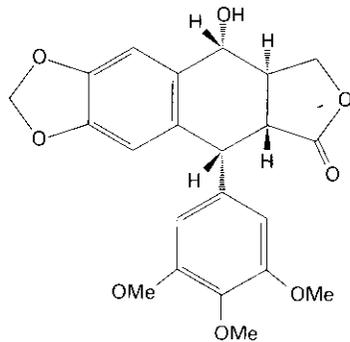
Existen fenoles simples (C_6), como el fenol, el catecol (1,2-dihidroxibenceno) y el floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno). Existen también derivados con cadenas laterales de uno, dos o tres carbonos, representados, entre otros compuestos, por el ácido salicílico (C_6-C_1) (35), el ácido *p*-hidroxifenilacético (C_6-C_2) (36) y el ácido cafeico (C_6-C_3) (37), un ácido hidroxicinámico ubicuo en las células de las plantas superiores. El ácido salicílico es un efectivo agente alelopático, por ejemplo, en *Quercus falcata*. Un derivado de este compuesto, el ácido acetilsalicílico, es ampliamente utilizado en medicina como analgésico.



Los ácidos hidroxycinámicos forman parte de la clase de compuestos C_6-C_3 , denominados **fenilpropanoides**. La lactonización y el cierre del anillo de los ácidos *o*-hidroxycinámicos dan lugar a las cumarinas. Una cumarina típica es la esculetina (39), formada teóricamente a partir del ácido *o*-hidroxicafeico. Los fenilpropanoides diméricos constituyen los lignanos, los cuales suelen ser componentes de resinas. La podofilotoxina (40), aislada del rizoma de *Podophyllum peltatum* y utilizada en forma modificada para el tratamiento de ciertos cánceres, es un buen ejemplo de lignano.



Esculetina (39)

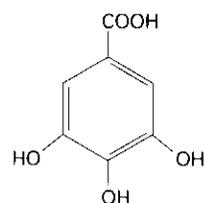


Podofilotoxina (40)

Entre los polímeros fenólicos destacan las ligninas y los taninos. Las **ligninas** son los polímeros fenólicos más importante en la naturaleza, puesto que proporcionan fuerza y rigidez estructural a la pared de la célula vegetal. La lignificación fue un suceso clave en la evolución de los vegetales, permitió el desarrollo de las plantas herbáceas como árboles y separa a las plantas vasculares de las algas y las briófitas, las cuales no están lignificadas. Las ligninas se forman a partir de los alcoholes coniferílico (41), 4-cumarílico y sinapílico. Estos compuestos son incorporados en diferentes cantidades, según el nivel de evolución alcanzado por los vegetales. En general, los organismos más primitivos son ricos en alcohol coniferílico; con la evolución, aumenta la proporción de alcohol cumarílico y sinapílico en las ligninas.

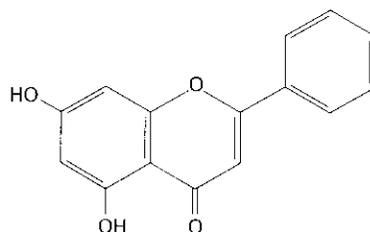
Los **taninos** se clasifican en hidrolizables y condensados (no hidrolizables por el calor o los ácidos diluidos, a diferencia de los primeros). Los taninos hidrolizables más comunes son ésteres del ácido gálico (42) con azúcares. El ácido tánico comercial es una mezcla de ácido gálico con diferentes galol ésteres de glucosa. Los taninos condensados son derivados de los flavonoides. Los taninos reaccionan con las proteínas salivares y las glucoproteínas de la boca ejerciendo un efecto astringente, lo cual hace que actúen como disuasorios alimentarios para depredadores.

Los **flavonoides** derivan estructuralmente del compuesto básico, flavona (43), especialmente abundante en las hojas de *Primula*. Los flavonoides se clasifican, de acuerdo con el grado de oxidación del anillo central

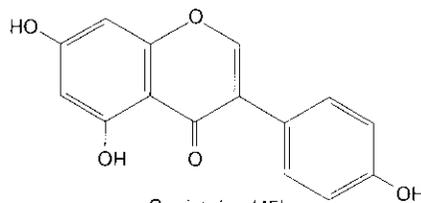


Ácido gálico (42)

de pirano, en antocianinas (p. ej., cianidina 3-glucósido, 44), flavonoles (p. ej., quercetina, 34) y otras clases. Dentro de cada clase, estos compuestos varían en el número y la posición de los grupos hidroxilo y metilo y de otros sustituyentes. También se conocen flavonoides diméricos (biflavonoides) y oligoméricos (flavolanos o taninos condensados). Un grupo relacionado es el de los isoflavonoides, representado por la genisteína (45), una sustancia estrogénica aislada del trébol.

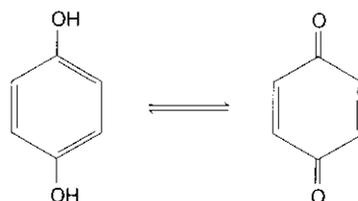


Flavona (43)



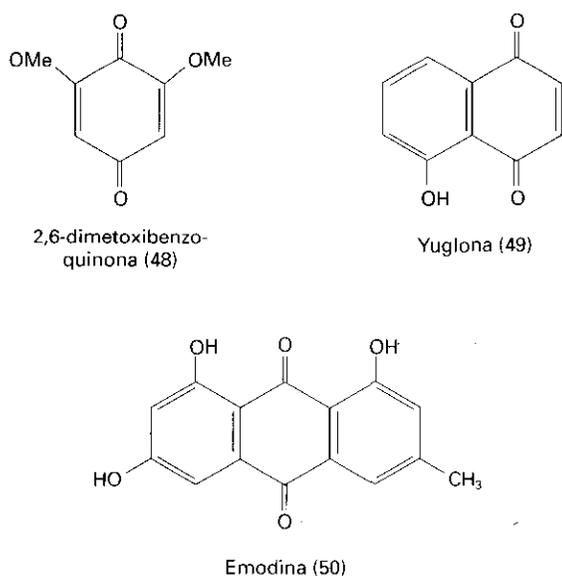
Genisteína (45)

La oxidación del 1,4-dihidroxibenceno (46) da lugar a la 1,4-benzoquinona (47), el compuesto básico de las benzo- nafto- y antraquinonas. Compuestos representativos son la 2,6-dimetoxibenzoquinona (48) del salvado de trigo, la yuglona (49), una naftoquinona del nogal; y la emodina (50), una antraquinona amarilla del ruibarbo (*Rheum palmatum*) y de la cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*). La yuglona es una sustancia alelopática responsable de la falta de crecimiento de hierbas debajo del nogal. Las antraquinonas ejercen, según la dosis administrada, una acción laxante o purgante.



1,4-dihidroxibenceno (46)

1,4-benzoquinona (47)



3.2. Las plantas superiores pueden formar compuestos fenólicos por dos rutas

Las dos rutas son la de los policétidos, mayoritaria en las bacterias y los hongos, y la ruta del ácido siquímico, mayoritaria en las plantas superiores. Muchos compuestos con dos o más núcleos fenólicos, como los flavonoides, son el producto de una biosíntesis mixta, poseen un anillo formado por la ruta del ácido siquímico y otro por la ruta de los policétidos.

Los **policétidos**, biosintetizados por el camino del acetato-malonato, igual que los ácidos grasos, se distinguen de estos últimos en su biogénesis. Ésta implica la formación de una hipotética cadena de grupos ceto y metileno alternantes (cadena policétida; $-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-$), mientras que los precursores de los ácidos grasos sólo contienen grupos metileno. Las cadenas policétidas derivan de unidades de malonil

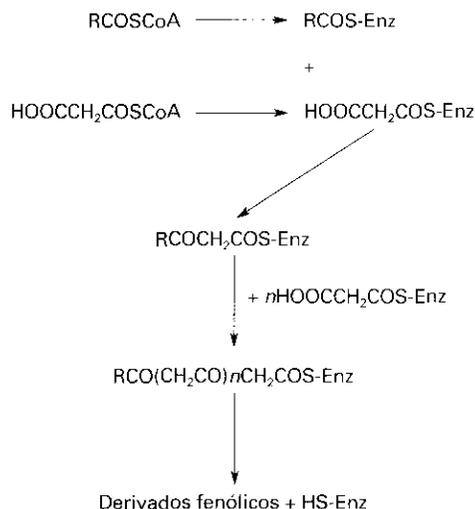


Figura 17-9. Biosíntesis de los policétidos.

CoA ($HOOC-CH_2-CO CoA$) (51) y de una unidad de iniciación (un cebador), la cual es, en la mayoría de los casos, el acetil CoA ($CH_3-CO CoA$ (2), aunque también pueden ser otros CoA-ésteres. Ambas, la unidad de partida y la unidad malonil se unen a través de grupos sulfhidrilo a la enzima que realiza la condensación antes de que ésta se produzca, y el producto de la condensación permanece unido a la enzima hasta que tenga lugar la ciclación de la cadena policétida.

Con frecuencia se produce la reducción de alguno de los grupos ceto durante la biosíntesis de los derivados policétidos, pero esta reducción siempre tiene lugar después de la formación de las correspondientes cadenas policétidas. Además, la gran variedad estructural de los derivados policétidos se debe a las numerosas modificaciones secundarias, entre las cuales se puede incluir la apertura de los anillos aromáticos. Como ejemplo de la formación de compuestos fenólicos por la vía de los policétidos, en la Figura 17-10 está representada la biosíntesis de floroglucinol.

3.3. La ruta del ácido siquímico es un proceso fundamental por el que se biosintetizan diferentes metabolitos aromáticos, entre ellos, los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano

Químicamente, la **ruta del ácido siquímico** es un proceso por el cual un ciclohexano adquiere la estructura aromática en tres etapas (Fig. 17-11). En la primera es introducido un doble enlace en la ciclación del ácido fosfoheptulosónico (52) a 5-desidroquinato (53). El segundo doble enlace es introducido, por la pérdida de agua, en la conversión del ácido siquímico (54) a ácido corísmico (55) y el tercero, en la conversión del ácido prefénico (56) a fenilpirúvico (57). La fenilalanina (58) es el principal producto final de la vía del ácido siquímico; este aminoácido puede ser después canalizado a la síntesis de proteínas o a la de sustancias fenólicas, según los requerimientos fisiológicos de la planta.

Los fenoles formados por la vía del ácido siquímico derivan del ácido cinámico (59), biosintetizado de la fenilalanina por la acción de la enzima fenilalanina: amonio liasa (PAL) (Fig. 17-11). En la formación de los fenoles por esta ruta, el ácido cinámico resultante es siempre oxidado en la posición *para*, lo que origina el

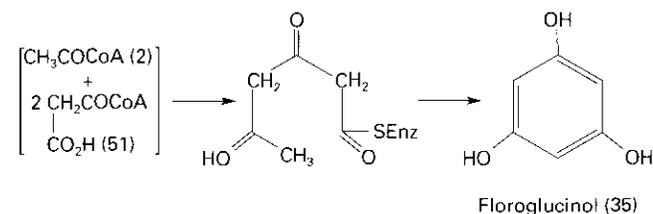


Figura 17-10. Biosíntesis del floroglucinol por el camino policétido.

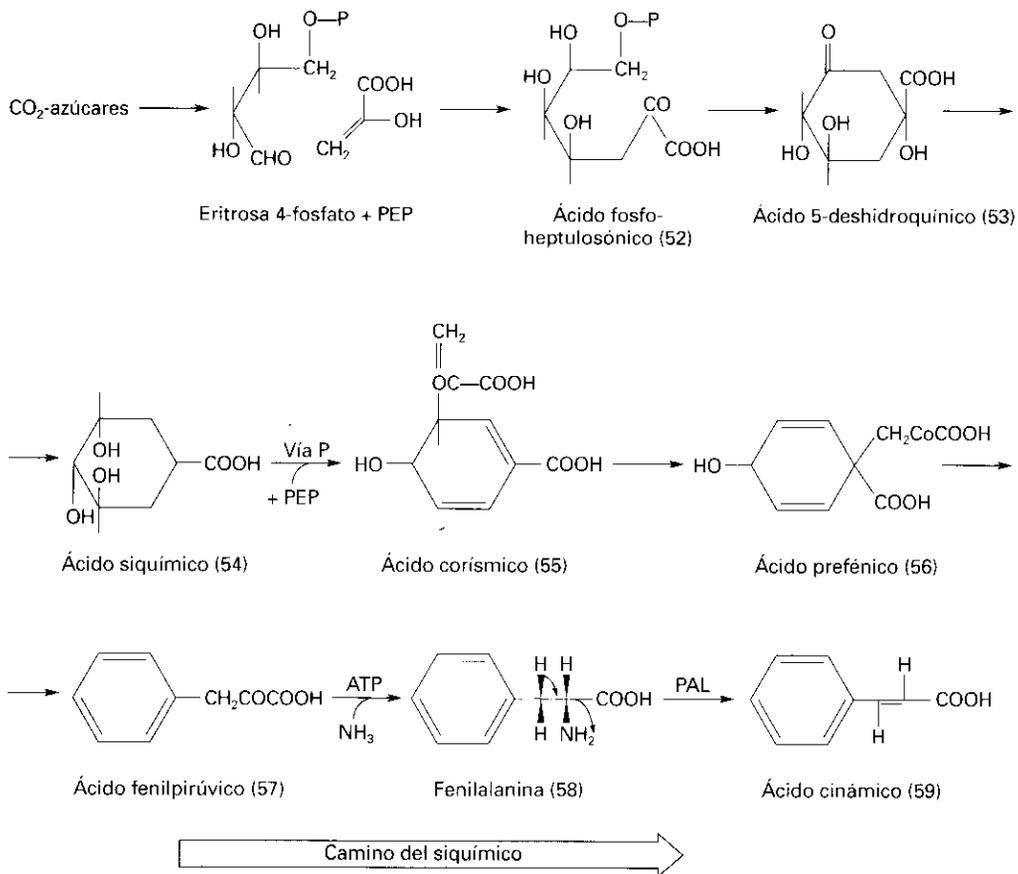


Figura 17-11. Ruta del ácido siquímico.

ácido 4-cumárico (60) (Fig. 17-12). Seguidamente, cuando este ácido es oxidado enzimáticamente de nuevo, el oxígeno se agrega en posiciones adyacentes para dar lugar al modelo 3,4-dihidroxi (catecol) o al modelo 3,4,5-trihidroxi (pirogalol). El origen biosintético determina el modelo de hidroxilación del producto fenólico, lo que usualmente hace posible determinar por cual de

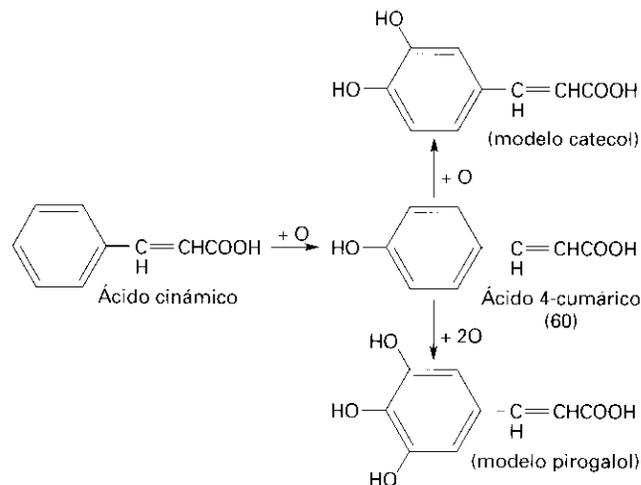


Figura 17-12. Modelos de oxidación de los fenoles derivados del ácido siquímico.

las dos rutas ha sido biosintetizado. En contraste con la ruta del ácido siquímico, la ruta policétida produce inicialmente fenoles con los grupos hidroxilo en las posiciones 1, 3 y 5, como es el caso del floroglucinol.

La actividad de la PAL está claramente controlada por el sistema fitocromo (véase Capítulo 23); su actividad se incrementa en respuesta a la luz roja ($\lambda_{\text{máx}}$ a 660 nm), pero este incremento no se produce si el tratamiento con luz roja va seguido de una dosis de luz roja lejana ($\lambda_{\text{máx}}$ a 730 nm). Se ha comprobado que este efecto es ejercido sobre el mRNA para la PAL. Además de por la luz, la actividad PAL está influida por otros factores, entre ellos, las hormonas vegetales. En relación con el metabolismo de los fenoles, es de destacar que el etileno incrementa la actividad de la enzima en los tejidos vegetales lesionados, lo que explicaría la estrecha correlación positiva existente entre los altos niveles de ciertos compuestos fenólicos y los de hormonas en dichos tejidos.

3.4. Los flavonoides son biosintetizados a partir de un precursor fenilpropanoide enlazado a tres unidades de malonil CoA

Como ejemplo de la biosíntesis de flavonoides, que implica la participación de la ruta del ácido siquímico y la

de los policétidos, se describe la formación de una antocianidina, la cianidina 3-glucósido, un pigmento natural ampliamente distribuido (Fig. 17-13). La etapa inicial en la biosíntesis de todos los flavonoides es la condensación del 4-cumarato CoA (61) con tres moléculas de malonil CoA para dar origen a la 2',4',6',4-tetrahidrochalcona (62), reacción catalizada por la enzima chalcona sintasa. La chalcona formada es, seguidamente, isomerizada a flavanona naringenina (63). Esta flavanona es un intermediario clave que puede ser convertido en diversos productos finales. En la biosíntesis de cianidina 3-glucósido, la oxidación del

anillo B da lugar al eriodictiol (64), el cual es después oxidado en la posición 3 para producir dihidroquercetina (65). Seguidamente, el 4-carbonil es reducido a 4-hidroxil, lo que da lugar a leucocianidina (66), un intermediario inestable que puede existir en diversas formas estereoisómeras. Una de estas formas origina, por oxidación, la cianidina. Se supone que la enzima responsable va unida a una glucosiltransferasa, puesto que el producto final es siempre un pigmento glicosilado, en el caso más simple la cianidina 3-glucósido. Las restantes antocianidinas, unas 270, se forman de manera similar.

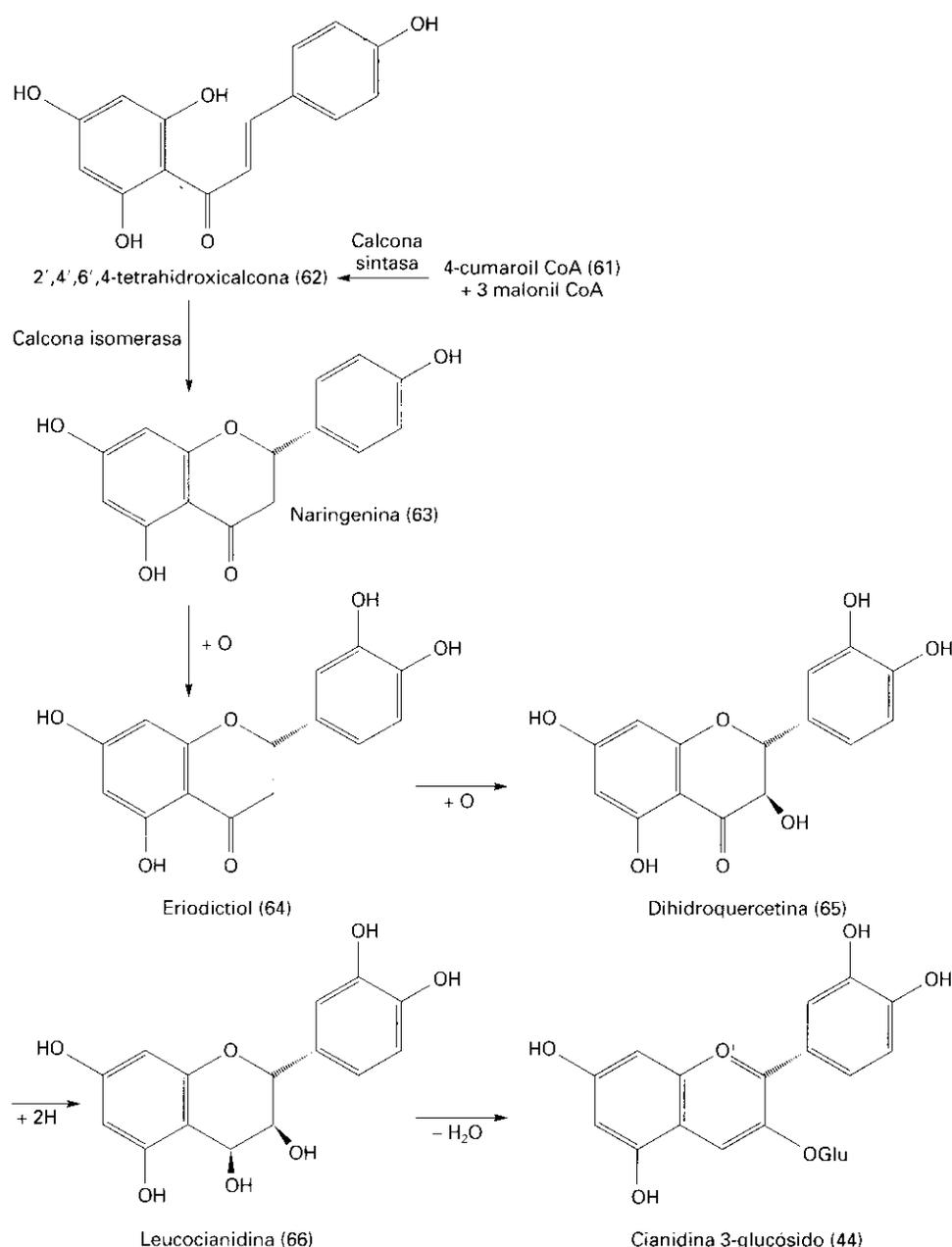


Figura 17-13. Biosíntesis de la antocianidina cianidina 3-glucósido.

3.5. Un carácter general de la biosíntesis de los compuestos fenólicos es la capacidad de estos compuestos para experimentar el llamado acoplamiento oxidativo de los fenoles

Por la acción de peroxidasas, el hidrógeno del grupo hidroxilo de un fenol se separa fácilmente, originándose así radicales fenolato libres muy reactivos. Estos radicales están en equilibrio con las formas mesoméricas, las cuales experimentan entre sí el acoplamiento *orto-orto*, *para-para* u *orto-para*. El proceso de acoplamiento de radicales libres de fenilpropanoides, concretamente de los alcoholes coniferílico, 4-cumarílico o sinapílico (derivados de los correspondientes ácidos cinámicos), es la etapa final de la biosíntesis de las ligninas, donde se forma un polímero al azar sobre la matriz de celulosa de la pared de la célula vegetal (véase Capítulo 1). El acoplamiento oxidativo de los fenoles es también esencial para la formación de los lignanos y los taninos condensados, entre otros compuestos fenólicos. En las Figuras 17-14 y 17-15 están representadas, respectivamente, la formación de radicales del alcohol coniferílico en la biosíntesis de ligninas y la dimerización de este alcohol para dar origen a un lignano, el pinorresinol (67).

Finalmente, otro carácter general de los compuestos fenólicos es que la mayoría de ellos se halla en forma conjugada en la planta, principalmente con un resto de azúcar unido a uno o más grupos fenólicos. La variedad de formas conjugadas es considerable, y esto dificulta la caracterización química de estos compuestos. Entre los monosacáridos asociados con los compuestos fenólicos figuran glucosa, galactosa, arabinosa (en la forma pirano o furano), ramnosa, xilosa, manosa y los ácidos glucurónico y galacturónico. Además, estos azúcares pueden encontrarse como combinaciones de di-, tri- o tetrasacáridos.

4. ALCALOIDES

Los alcaloides, a diferencia de la mayoría de los otros grupos de productos naturales, son química y biológica-

mente muy heterogéneos, constituyendo el grupo de sustancias vegetales secundarias más representativo, numeroso y diverso. Debido a su diversidad, los alcaloides son muy difíciles de definir de forma general y precisa. No obstante, los alcaloides presentan unos caracteres comunes que los diferencian de los demás compuestos secundarios: son moléculas orgánicas más o menos complejas, de carácter básico por la presencia en ellas de uno o más átomos de nitrógeno formando parte de un heterociclo; se sintetizan de aminoácidos o de sus derivados inmediatos; su presencia en las plantas está limitada a determinados grupos taxonómicos; finalmente, son sustancias más o menos tóxicas, preferentemente activas sobre el sistema nervioso central. Sin embargo, existe una variedad de compuestos secundarios que, aunque no cumplen todas las características mencionadas, se incluyen en este amplio grupo de compuestos naturales.

Los alcaloides experimentan frecuentemente un metabolismo activo y no son en ese caso, productos finales. Así, se ha observado que la vida media de estos compuestos es muy variable; por ejemplo, en la tomatina es de 6 días, mientras que en la morfina y la ricinina es tan sólo de 7 y 4 horas, respectivamente. Este hecho es la causa de las fluctuaciones que se observan en su concentración a lo largo del día; en el caso de la morfina, su máxima acumulación tiene lugar al mediodía que, consecuentemente, es el mejor momento para la recolección del opio.

La importancia de los alcaloides para la planta que los produce radica en que constituyen reservorios de nitrógeno para la misma; a la vez, pueden actuar como sustancias alelopáticas o como disuasorios alimentarios, con lo que contribuyen a la defensa del vegetal frente a la competencia con otras especies vegetales o el ataque de determinados patógenos o depredadores.

Existe una relación directa entre la complejidad de la estructura química del alcaloide y su distribución en el reino vegetal; así, la gramina (68), un alcaloide de estructura simple, está mucho más ampliamente distribuido que la estricnina (69), alcaloide muy complejo que sólo se encuentra en algunas especies de *Strychnos*.

Según su estructura molecular y origen biosintético,

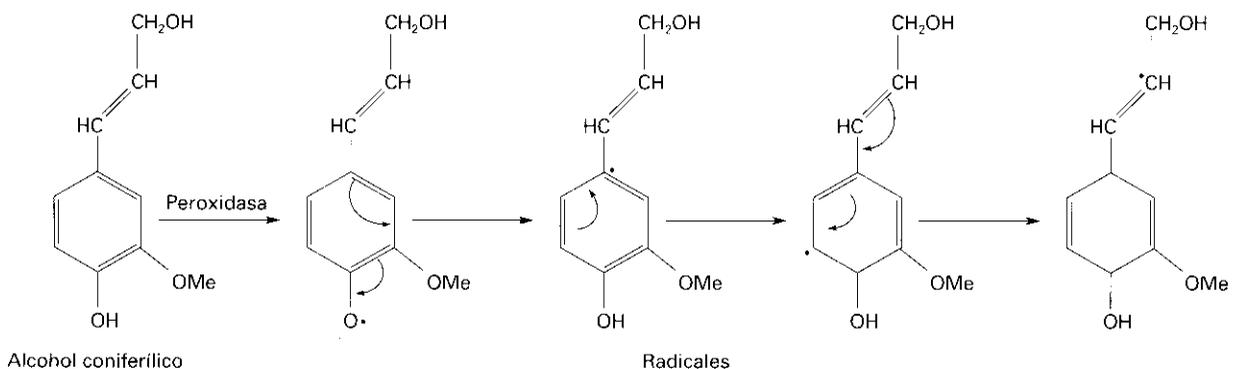


Figura 17-14. Formación de radicales del alcohol coniferílico en la biosíntesis de ligninas.

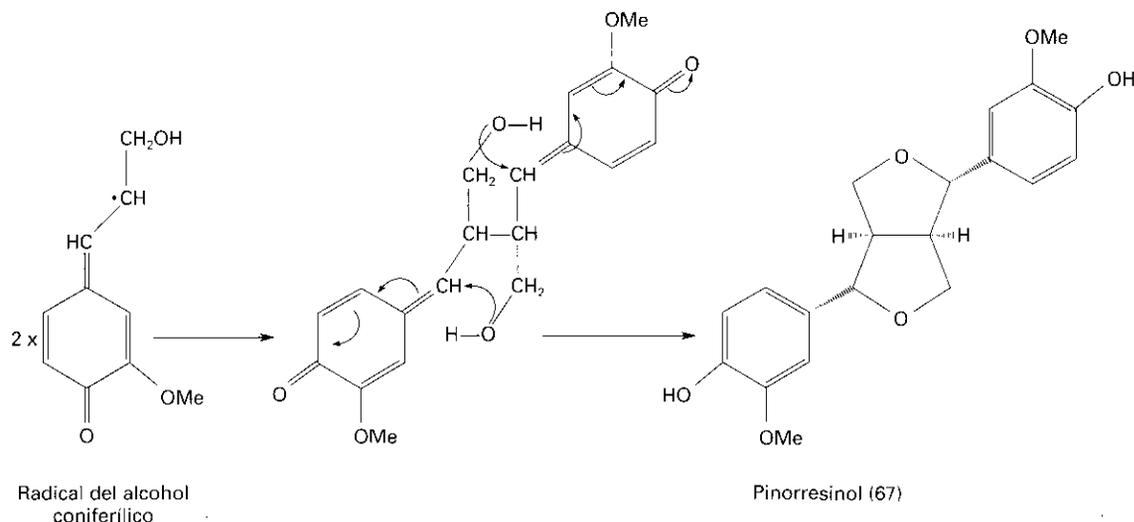
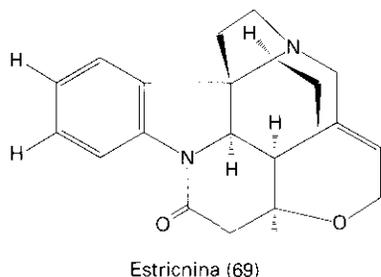
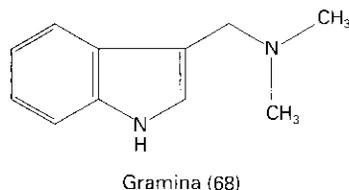


Figura 17-15. Dimerización del alcohol coniferílico para dar origen a un lignano.

los alcaloides se clasifican en tres categorías principales: alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides.



4.1. Los alcaloides verdaderos son compuestos que poseen un átomo de nitrógeno formando parte de un heterociclo

En general, los **alcaloides verdaderos** se sintetizan a partir de una amina biógena formada por descarboxilación de un aminoácido, por lo que el átomo de nitrógeno del aminoácido contribuye a la formación del heterociclo.

Aunque los diferentes alcaloides presentes en el reino vegetal se originan por rutas biosintéticas diversas, la formación de la estructura N-heterocíclica principal tiene lugar a través de reacciones de ciclación comunes

a todos ellos. Los principales reacciones de ciclación son:

- Formación de bases de Schiff. Las bases de Schiff (azometinas) se forman, espontáneamente o mediante sistemas enzimáticos, a partir de una molécula con un grupo carbonilo (aldehído o cetona) y una amina primaria o secundaria. Los compuestos con el grupo carbonilo provienen de aminas, por transaminación, aunque también pueden formarse a partir de acetato/mevalonato.
- Reacción de Mannich. Esta reacción tiene lugar entre una amina, un grupo carbonilo (aldehído o cetoácido) y una molécula con un hidrógeno ácido. La reacción de Mannich puede producirse espontáneamente o ser catalizada por enzimas.
- Formación de lactamas. Proviene de la unión enzimática de un ácido activado y una amina. La formación de lactama parece estar restringida principalmente a la biosíntesis de dioxopiperacinas y alcaloides que contienen enlaces peptídicos. Una activación del grupo carboxilo de un aminoácido con ATP o CoA es necesaria antes de la reacción, como para las otras formaciones de enlace peptídico no ribosómicas.

Una vez formada la estructura principal de la molécula, los pasos biosintéticos sucesivos dependen, lógicamente, del alcaloide que se sintetice. Sin embargo, debido a la habitual complejidad estructural de los alcaloides, muchos de ellos poseen caminos biosintéticos que aún no están totalmente establecidos, a pesar de los

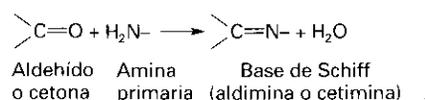


Figura 17-16. Formación de bases de Schiff.

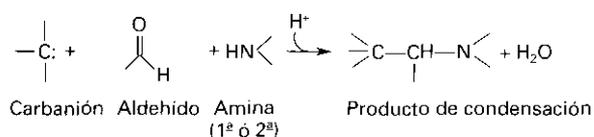


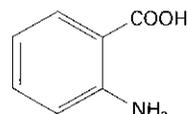
Figura 17-17. Reacción de Mannich.

numerosos estudios que actualmente se están llevando a cabo acerca de este amplio grupo de metabolitos secundarios. Dada la extensión del libro, y debido a que los alcaloides se forman por rutas biosintéticas muy diversas, en este capítulo sólo se tratarán aspectos fundamentales de estas rutas.

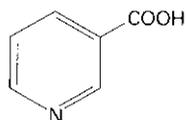
La necesidad de una mayor o menor diferenciación estructural para la formación de un alcaloide depende de la naturaleza química del mismo. La biosíntesis de alcaloides tiene lugar únicamente en células de determinados tejidos u órganos específicos del vegetal; así, por ejemplo, mientras que la nicotina (70) se sintetiza en las áreas meristemáticas de la raíz, los alcaloides del opio sólo se forman en vasos laticíferos. A su vez, algunos alcaloides se acumulan en los lugares de síntesis, mientras que otros son transportados a otros tejidos donde, además de acumularse, pueden experimentar posteriores transformaciones; por ejemplo, en *Datura stramonium*, la hiosciamina (71) se sintetiza en la raíz pero es transportada a las hojas donde puede convertirse en escopolamina (72).

4.1.1. Usualmente, los alcaloides verdaderos se agrupan según los aminoácidos de que proceden

Los grupos más representativos de alcaloides verdaderos son los derivados de ornitina y lisina (Fig. 17-19); de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina (Fig. 17-21) y del aminoácido aromático triptófano y una parte derivada del ácido mevalónico (Fig. 17-23). Además, algunos de estos alcaloides también derivan del ácido antranílico (73) o del ácido nicotínico (74).



Ácido antranílico (73)



Ácido nicotínico (74)

4.1.2. Alcaloides derivados de ornitina y lisina

Los principales tipos estructurales están representados en la Figura 17-19 e incluyen los alcaloides caracterizados por la presencia de anillos de pirrolidina, piperidina, pirrolidicina, quinolidina y piridina. En general, el

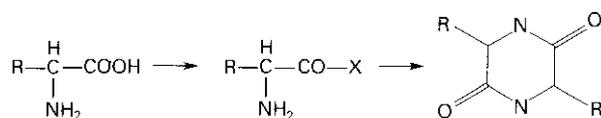
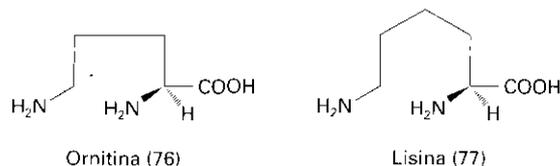


Figura 17-18. Formación de lactamas.

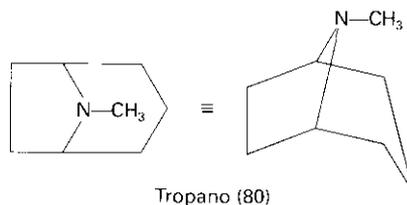
proceso químico implicado en la biosíntesis de los alcaloides de este grupo es relativamente sencillo, e implica la formación de una base de Schiff a partir del aminoaldehído (75) (derivado en la reacción de ornitina) y subsiguientes condensaciones de tipo Mannich (Fig. 17-20).



Alcaloides de pirrolidina

Se destaca en este tipo de alcaloides la higrina (78), aislada de *Erythroxylum truxillense* (que también contiene cocaína, 79) y probablemente biosintetizada a partir de la reacción representada en la Figura 17-20, donde la cadena lateral (R¹) deriva del acetilCoA (2).

Por una extensión de la ruta descrita para la biosíntesis de higrina (Fig. 17-20), se forman los alcaloides tropánicos, caracterizados por poseer el sistema anillado bicíclico del tropano (80). Ejemplos típicos de alcaloides tropánicos son hiosciamina (cuya forma racémica es la atropina) y escopolamina (derivado 6,7-epóxido de la hiosciamina), abundantes en especies de *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus* y *Scopolia*, y ampliamente utilizados en medicina como anticolinérgicos. Otro alcaloide tropánico, probablemente de mayor interés farmacológico, es la cocaína (79). Este alcaloide, característico del género *Erythroxylum*, tiene propiedades anestésicas y fuertemente narcóticas.



Tropano (80)

Alcaloides de piperidina

Un número de estos alcaloides se forma a partir de la lisina por una ruta análoga a la descrita para los alcaloides de pirrolidina (Fig. 17-20). Un ejemplo clásico es la isopeletierina (81), aislada de *Punica granatum*, *Witha-*

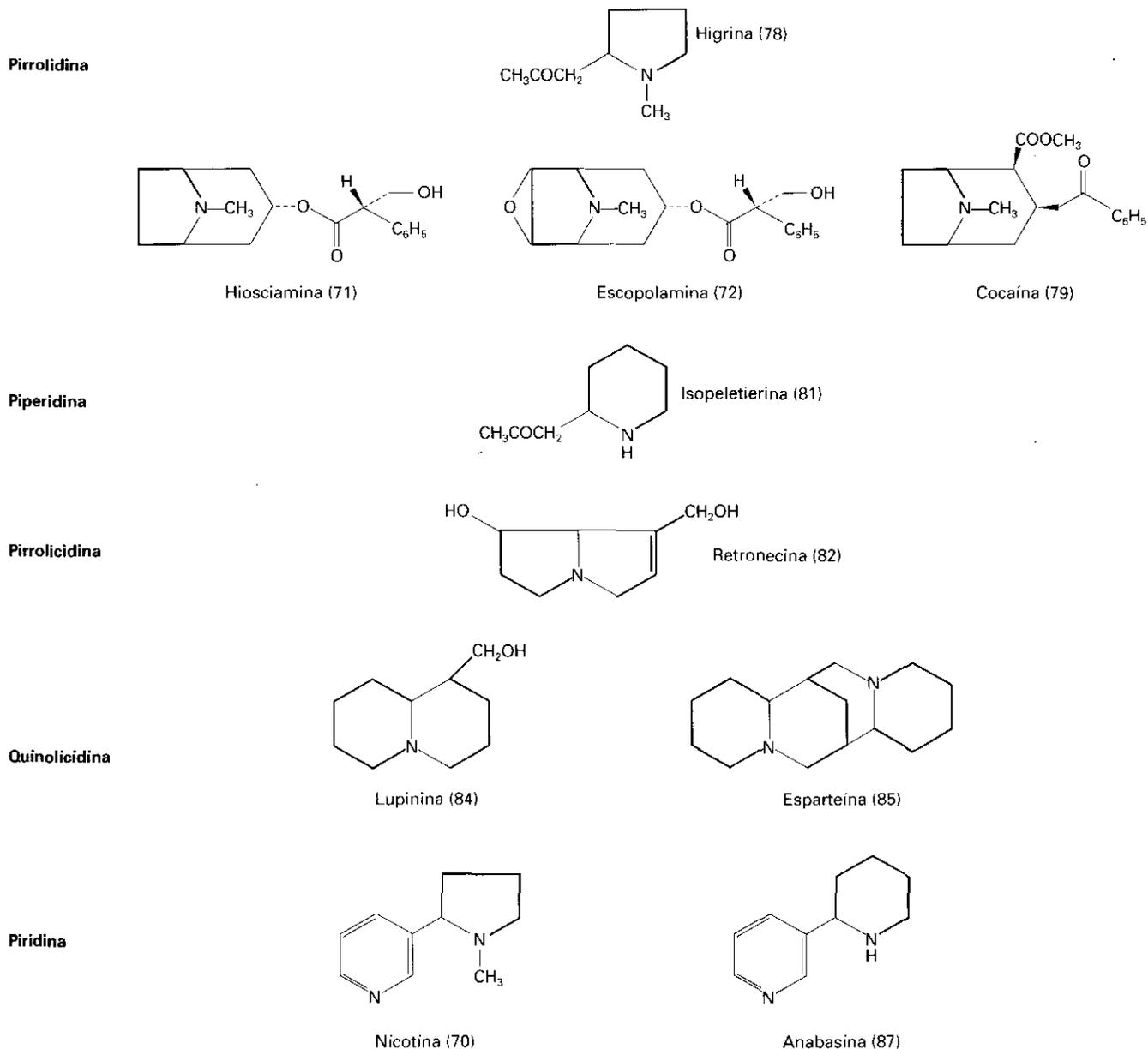


Figura 17-19. Alcaloides derivados de ornitina y lisina. Las líneas de trazo grueso indican las partes originarias de los aminoácidos.

nia somniferum y especies de *Sedum*. Este alcaloide es sólo ligeramente tóxico, y las plantas que lo acumulan no se pueden vincular al envenenamiento de seres humanos. La isopeletierina es un antihelmíntico eficaz.

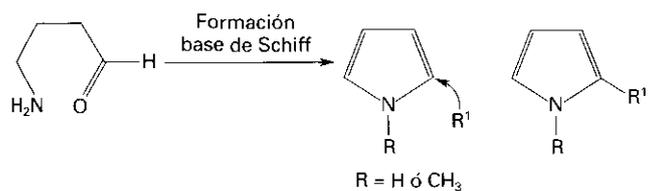
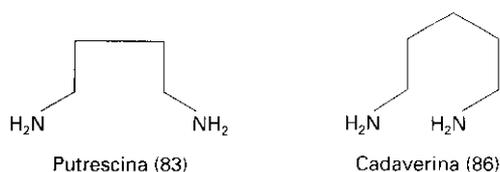


Figura 17-20. Proceso químico implicado en la biosíntesis de muchos alcaloides derivados de ornitina y lisina.

Alcaloides de pirrolicidina

Estos alcaloides, de los que la retronecina (82) es un ejemplo típico, son abundantes en especies de *Senecio* y *Heliotropium*. El anillo de pirrolicidina de estos alcaloides se forma a partir de ornitina vía su producto de descarboxilación, la diamina putrescina (83) (véase Capítulo 22). Los alcaloides de pirrolicidina son hepatotóxicos. Los efectos tóxicos de estos alcaloides son acumulativos y, frecuentemente, los síntomas no aparecen hasta después de semanas o meses de la ingestión. Sin embargo, a grandes dosis causan convulsiones y una muerte rápida. En general, actúan como disuasorios alimentarios.



Alcaloides de quinolicidina

Estos alcaloides, caracterizados por poseer uno o dos sistemas de quinolicidina, se encuentran particularmente en especies del género *Lupinus*. Los alcaloides más representativos de este grupo son la lupinina (84), con un sistema quinolicidina, y la esparteína (85), con dos sistemas quinolicidina. La esparteína se utiliza en medicina como antiarrítmico.

Estudios de marcado han permitido comprobar que lupinina y esparteína se forman enteramente de lisina vía cadaverina (86), participando respectivamente dos y tres moléculas de la diamina. Todos estos alcaloides son tóxicos, pero también amargos, por ello pueden actuar como disuasorios alimentarios de mamíferos e insectos.

Alcaloides de piridina

Entre los alcaloides de este tipo figuran la nicotina (70) y la anabasina (87), presentes en las especies de *Nicotiana*. Como se ha indicado, la ornitina da lugar al anillo de pirrolidina de nicotina, mientras la lisina es el precursor del anillo de piperidina de anabasina. El anillo de piridina de estos alcaloides deriva del ácido nicotínico (74). Además de una poderosa actividad sobre el sistema nervioso central, la nicotina posee también actividad insecticida, siendo utilizada comercialmente con este fin. En la planta puede actuar como disuasorio alimentario para insectos.

4.1.3. Alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina

Los principales tipos de alcaloides derivados de fenilalanina (58) y tirosina (88) están representados en la Figura 17-21, e incluyen los alcaloides de isoquinolina, de bencilisoquinolina y de *Amaryllidaceae*. Por lo general, los precursores reales son los productos de descarboxilación de los aminoácidos, es decir, la dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina) (89), o los ácidos arilpirúvicos, como el fenilpirúvico (57) derivado de la fenilalanina por transaminación. Las etapas iniciales de la mayor parte de las rutas biosintéticas que conducen a la formación de este grupo de alcaloides son similares a la representada en la Figura 17-22, pero existe una considerable diversidad en las respectivas etapas finales.

Alcaloides de isoquinolina

Muchos de los alcaloides del peyote (*Lophophora williamsii*), entre ellos la pelletina (90), poseen el anillo de la tetrahidroisoquinolina. La biosíntesis de estos alcaloides es rigurosamente análoga a la mostrada en la Figura 17-22. Por esta ruta química también se originan los precursores de los alcaloides bencilisoquinolínicos, que se describen seguidamente. Otros diversos tipos de alcaloides también derivan de los precursores de bencilisoquinolina; éstos incluyen las protoberberinas, de las cuales la berberina (91) es un buen ejemplo. Este alcaloide es un agente bacterioestático y bactericida. Parece que la berberina endógena inhibe el crecimiento de la célula vegetal. Así, los rizomas de *Coptis japonica* que contienen el alcaloide crecen lentamente, requiriendo por lo general unos 15 años para alcanzar la madurez. También se ha comprobado el importante efecto inhibitorio de la berberina sobre la germinación de las semillas.

Alcaloides de bencilisoquinolina

En este grupo se halla la papaverina (92), la tebaína (93), la codeína (94) y la morfina (95), alcaloides principales de *Papaver somniferum*. La papaverina, la codeína y la morfina son importantes principios activos de medicamentos. La tebaína, aunque no tiene acción farmacológica, tiene interés para la industria por su fácil conversión en codeína. La morfina es el constituyente activo principal del opio comercial, el cual contiene, referido a peso seco, cerca de un 10 % de este alcaloide y un 25 % de alcaloides totales. En el hombre, la morfina ejerce un marcado efecto analgésico y narcótico. La heroína o diacetil-morfina, un derivado sintético de la morfina, es el más peligroso de todos los fármacos que crean adicción.

En *Papaver somniferum*, la morfina se metaboliza a normorfina (sin grupos metilo), que posteriormente es degradada. Debido a que la secuencia de reacciones que conduce de tebaína a morfina también conlleva una serie de desmetilaciones, se ha sugerido que estos alcaloides pueden actuar como agentes alquilantes endógenos. Es evidente que el alto porcentaje de transformación *in vivo* de tebaína y morfina proporciona un excelente ejemplo para reconsiderar la idea generalizada de que los alcaloides son productos terminales del metabolismo.

Alcaloides de *Amaryllidaceae*

Son alcaloides casi exclusivos de la familia *Amaryllidaceae*. Experimentos con compuestos marcados han demostrado que la O-metilnorbelladina (96) es un precursor común de estos alcaloides, entre los que figura la licorina (97), un eficaz disuasorio de insectos. Se ha

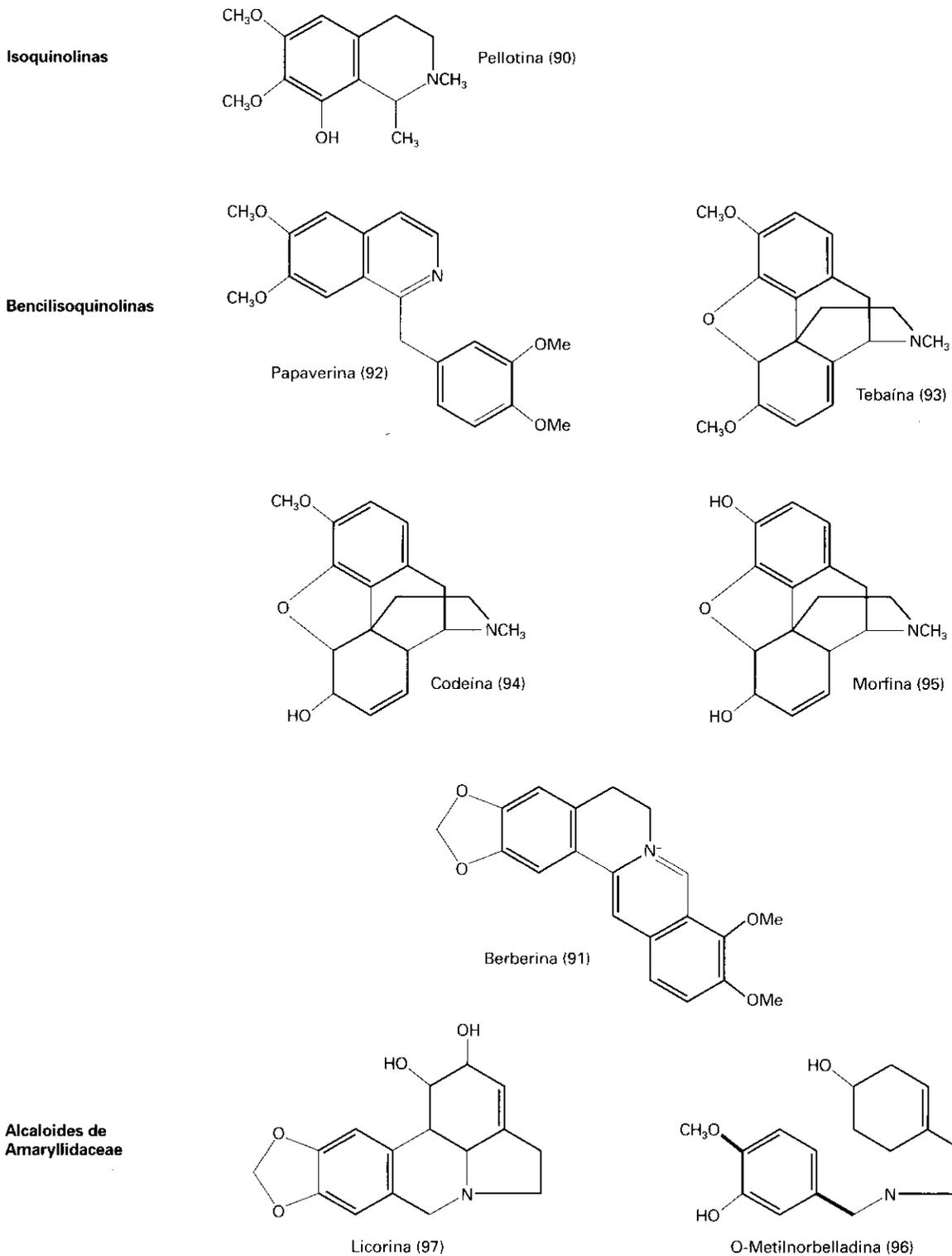


Figura 17-21. Alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina. Las líneas de trazo grueso indican las partes originarias de los aminoácidos.

comprobado que la tirosina es incorporada en O-metilnorbeldadina como tiramina (el producto de descarboxilación del aminoácido), mientras que la otra parte de la molécula la proporciona una unidad C₆-C₁ que deriva de la fenilalanina.

4.1.4. Alcaloides biosintetizados del triptófano

El triptófano (98) es el precursor de un gran número de alcaloides que se caracterizan por la presencia de un

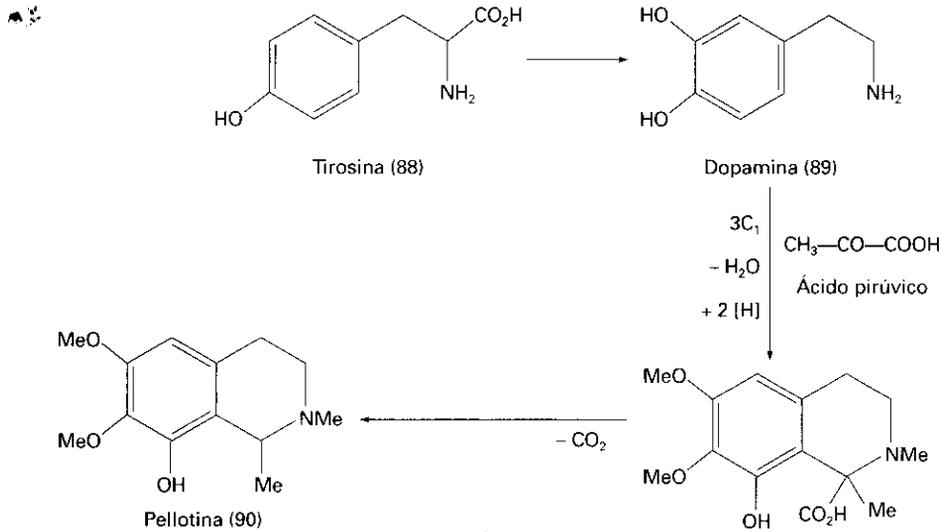
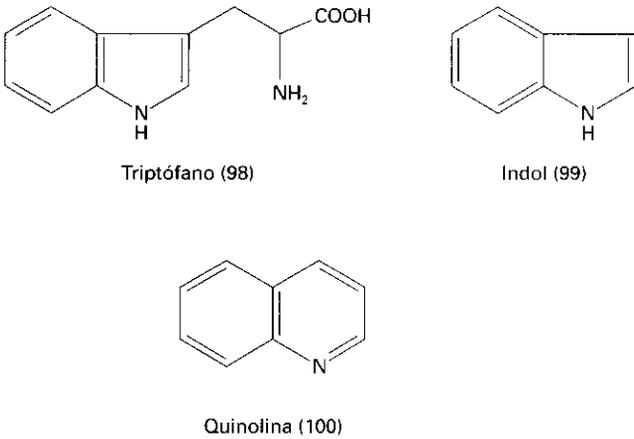


Figura 17-22. Etapas iniciales en la biosíntesis de los alcaloides de isoquinolina.

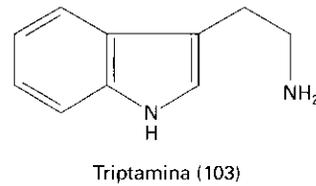
núcleo indol (99). Frecuentemente, en el anillo indol se incorporan una o dos unidades C_5 derivadas del ácido mevalónico (3), lo que origina alcaloides de estructura más compleja. Además, el anillo indol puede abrirse para originar, después de otra forma de cierre del anillo, el sistema quinolina (100), propio de algunos alcaloides de *Chinchona*, como la quinina (101).



Alcaloides indólicos simples

El alcaloide fisostigmina (102), del haba del Calabar (*Physostigma venenosum*), es representativo de esta clase de alcaloides indólicos. La fisostigmina deriva del triptófano, vía la formación de su amina biógena, la triptamina (104). La fisostigmina es extremadamente tóxica y puede causar la muerte en el hombre por parálisis respiratoria. Este alcaloide es un inhibidor de la acetilcolinesterasa, la enzima que destruye la acetilcolina una vez que este compuesto ha sido utilizado para transmitir el impulso nervioso, y por ello se emplea en medicina como agente anticolinesterásico. En la planta,

la fisostigmina actúa como disuasorio alimentario para los depredadores.



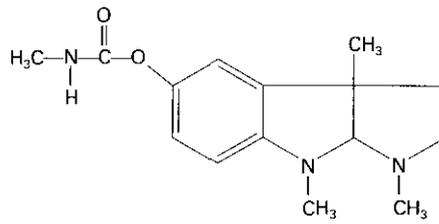
Alcaloides indólicos complejos

Como se ha indicado, muchos alcaloides incorporan en su estructura una unidad derivada del triptófano y otra derivada del ácido mevalónico. Entre ellos figuran los alcaloides del cornezuelo y de *Catharanthus*, y otros como la estriquina (69) y la quinina (101) presentes, respectivamente, en especies de *Strychnos* y *Chinchona*.

En hongos del género *Claviceps*, particularmente en el cornezuelo (el esclerocio de *C. purpurea*) y también en especies de *Convolvulaceae* (es decir, en plantas superiores), se encuentran alcaloides que se caracterizan por su estructura de ergolina. Entre los alcaloides de ergolina figuran los derivados del ácido lisérgico (104), cuya dietilamida es el potente alucinógeno LSD.

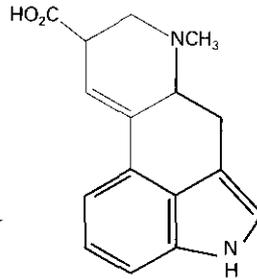
Catharanthus roseus sintetiza un gran número de alcaloides indólicos complejos de triptófano y una unidad monoterpenoide (C_{10}) como moléculas de partida. Estos alcaloides presentan tres tipos estructurales básicos, simbolizados por vindolina (105), catarantina (106) y ajmalicina (107). Además, esta especie vegetal sintetiza alcaloides diméricos, importantes en medicina por sus propiedades antitumorales. Dos de los más valiosos fármacos en la quimioterapia del cáncer, la vinblastina y la vincristina, pertenecen a esta clase de alcaloides dimé-

Indólicos simples

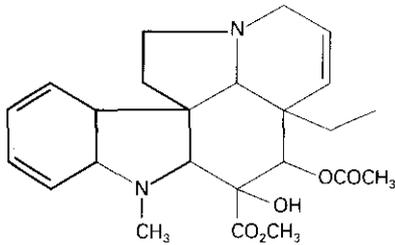


Fisostigmina (102)

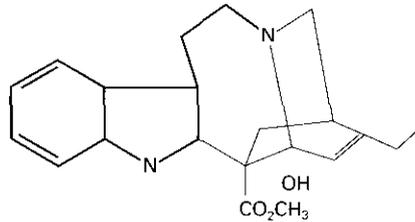
Indólicos complejos



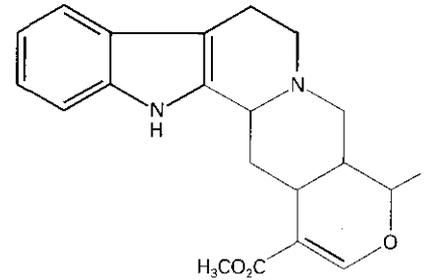
Ácido lisérgico (104)



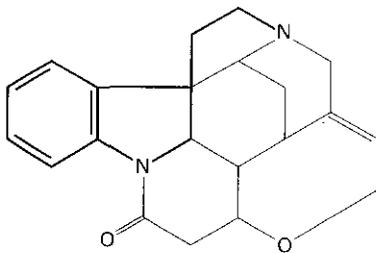
Vindolina (105)



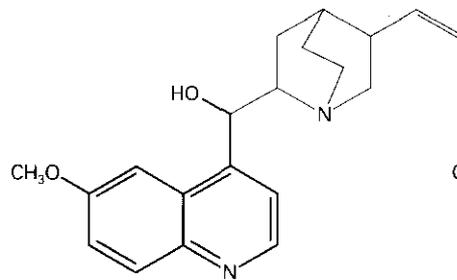
Catarantina (106)



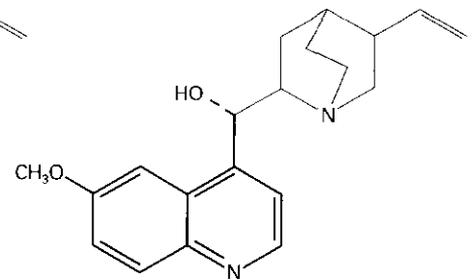
Ajmalicina (107)



Estrictina (105)



Quinina (101)



Quinidina (108)

Figura 17-23. Alcaloides derivados del triptófano. Las líneas de trazo grueso indican las partes originarias del aminoácido.

ricos. Su síntesis *in vivo* implica el acoplamiento de los monómeros vindolina y la catarantina.

La estrictina, un alcaloide muy tóxico, se encuentra, según se ha indicado, en algunas especies de *Strychnos*. Es improbable que sus propiedades tóxicas sean útiles para estas plantas, pero su intenso sabor amargo (perceptible a una dilución de una parte de estrictina en 500 000 partes de agua) le confiere propiedades como disuasorio alimentario de depredadores. Este alcaloide, en pequeñas dosis, estimula la actividad mental y mus-

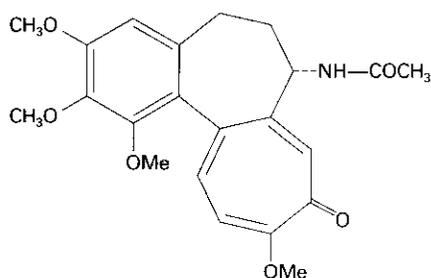
cular y, por ello, se utiliza en medicina para combatir el estupor debido a la morfina y a la sobredosis de fármacos con efectos depresivos.

Finalmente, son de destacar los alcaloides estereoisómeros quinina y quinidina (108), caracterizados por la presencia del anillo de quinolina (100), que se encuentran principalmente en especies del género *Chinchona*. La quinina es utilizada como agente antipalúdico, particularmente en los casos resistentes (que no responden al tratamiento con fármacos de síntesis), y también

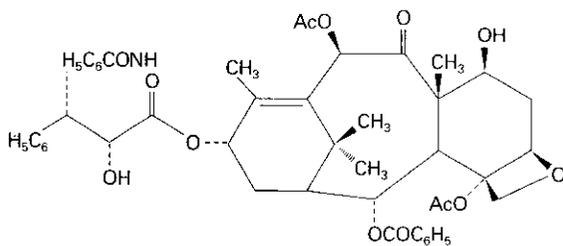
como amargo. La quinidina se utiliza como agente antiarrítmico en el tratamiento de ciertas alteraciones cardíacas.

4.2. Los protoalcaloides son generalmente aminas aromáticas

Derivan de aminoácidos o aminas biógenas, pero, a diferencia de los alcaloides verdaderos, el nitrógeno se halla en una cadena alifática y no en un sistema heterocíclico, excepto en el caso de que el precursor sea el triptófano. Su síntesis conlleva una descarboxilación del aminoácido precursor que da lugar a las respectivas aminas simples, de las que, mediante modificaciones estructurales, se producen los diferentes **protoalcaloides**. En este grupo destacan los alcaloides colchicina y taxol, entre otros.



Colchicina (109)

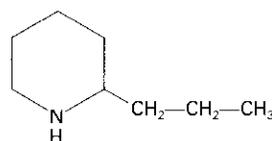


Taxol (110)

La colchicina, aislada de *Colchicum autumnale*, tiene la capacidad de inducir la formación de poliploides al ocasionar duplicación del número de cromosomas; recientemente ha sido evaluada como agente anticancerígeno, pero parece resultar demasiado tóxica para uso clínico. Contrariamente, el taxol es uno de los agentes anticancerígenos más utilizados actualmente en medicina. Este alcaloide diterpénico, aislado de diferentes especies de *Taxus*, es portador de una cadena lateral derivada de la fenilalanina, la N-benzoil-(2R,3S)-3-fenilisoserina. La acción anticancerígena del taxol radica en sus propiedades antimitóticas. Este alcaloide se une a los microtúbulos e inhibe su despolimerización, lo que bloquea la división y el desplazamiento celulares.

4.3. Los pseudoalcaloides se forman por incorporación posterior del nitrógeno en compuestos libres de este elemento

Los **pseudoalcaloides** que, a pesar de presentar un nitrógeno heterocíclico, aparentemente no están relacionados con los aminoácidos. Se forman por la adición de compuestos de amonio o nitrógeno libre a estructuras terpénicas o derivadas de policétidos. Entre ellos cabe destacar algunos alcaloides del género *Solanum* (esteroides); la aconitina (diterpénico) y la conina (derivado de policétidos). La aconitina (17), característica de especies de *Aconitum* y *Delphinium*, es altamente tóxica para los animales. La conina (111), un compuesto de estructura relativamente simple aislado de la cicuta (*Conium maculatum*), es un conocido veneno de cuyos efectos Platón hace una dramática referencia en su libro *Phaedo* por ser los causantes de la muerte de Sócrates.



Conina (111)

RESUMEN

Históricamente, los procesos por los que se generan compuestos vegetales han sido separados en metabolismo primario y secundario. Sin embargo, de acuerdo con los conocimientos actuales, esta distinción puede considerarse arbitraria, puesto que en muchos casos no hay una división definida entre metabolitos primarios y secundarios.

La definición, antes popular, de un metabolito secundario como carente de un papel indispensable en la planta y no omnipresente, ya no es aplicable. Se sabe ahora que hay **metabolitos secundarios** muy necesarios para la vida de la planta, ya que muchos de ellos proporcionan un mecanismo de defensa frente al ataque de bacterias, virus y hongos análogo al sistema inmunitario de los animales. Por otra parte, compuestos formados en las rutas del metabolismo secundario son esenciales para las plantas. Ejemplos de ello son los **esteroides** constituyentes de las biomembranas, el polímero estructural **lignina** y muchas **fitohormonas**. Además, debido a que los metabolitos secundarios derivan biosintéticamente de los primarios y que, en cada caso, el precursor es utilizado también para la biosíntesis de otros **metabolitos primarios** (p. ej., los aminoácidos son precursores de los alcaloides verdaderos y de las proteínas), los dos tipos de metabolismo están interconectados en una extensión que todavía hace más difícil el establecimiento de una clara división entre ambos.

El número y la diversidad de metabolitos secundarios han despertado, durante muchos años, el interés de los científicos. Significan diversidad en muchos sentidos: de moléculas químicas y de fuentes de estos metabolitos. En algunos casos los metabolitos secundarios tienen un alto valor comercial, principalmente, por la dificultad de producirlos por síntesis química. Las moléculas biológicamente útiles suelen ser usualmente estereoisómeros específicos, y los métodos de síntesis química suelen producir estereoisómeros no deseados, impurezas de reacciones laterales y trazas de reaccionantes. La capacidad de las plantas para producir estos compuestos en cantidades considerables y en estado puro es utilizada por el hombre mediante el cultivo a gran escala de la variedad productora y la subsiguiente extracción de los compuestos deseados. Asimismo, la producción de metabolitos secundarios de alto valor comercial mediante el **cultivo vegetal in vitro** constituye una parte importante de la biotecnología vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento al Dr. Manuel Serrano García, catedrático jubilado de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, por la lectura crítica del manuscrito y por sus acertados consejos.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Indíquense tres posibles maneras de actuar de los metabolitos secundarios en las relaciones de la planta productora con los otros organismos de su medio natural.
 2. ¿Qué relación existe entre los metabolitos secundarios y las proteínas de especialización?
 3. Indíquense los precursores más importantes de los diferentes grupos de metabolitos secundarios.
 4. Indíquense algunos metabolitos de naturaleza isoprenoide que ejercen funciones primarias en la planta.
 5. ¿Qué compuestos terpenicos se forman por unión de ca-
6. beza a cola y cuáles por unión de cola a cola de otras moléculas isoprenoides más pequeñas?
 6. ¿Qué semejanzas y diferencias existen entre esteroides y brasinoesteroides?
 7. De la variedad de pigmentos producidos por las plantas por rutas secundarias, indíquense algunos con funciones primarias y otros con funciones simplemente ecológicas?
 8. ¿En qué grupo de metabolitos secundarios concurren dos rutas fundamentales de síntesis comunes a este metabolismo?
 9. En función del modelo de hidroxilación del producto fenólico, ¿cómo es posible determinar por qué ruta ha sido biosintetizado?
 10. ¿Cómo actuaron ciertos polifenoles en la evolución y el desarrollo de las plantas?
 11. ¿Cuáles son los caracteres que distinguen los alcaloides de otros grupos de metabolitos secundarios?
 12. Indíquense los rasgos esenciales que distinguen a los alcaloides, protoalcaloides y pseudoalcaloides.
 13. Describa las principales reacciones de ciclación en los alcaloides.
 14. Indíquese algún alcaloide en cuya constitución figuren derivados del triptófano y del ácido mevalónico.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. CIBA FOUNDATION (eds.): *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*. John Wiley & Sons, Chichester y Nueva York, 1992.
2. Haslam, E.: *Shikimic Acid. Metabolism and Metabolites*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester y Nueva York, 1993.
3. Luckner, M.: *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, Nueva York, Tokio, 1990.
4. Mann, J. et al: *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*. Longman Group UK Limited, 1994.
5. Piñol, M. T., Palazón, J.: «Metabolismo secundario». En *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. J. Azcón-Bieto y M. Talón (eds.), pp. 237-283. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1993.
6. Roberts, M. F., y Wink, M. (eds.): *Alkaloids. Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. Plenum Press, Nueva York y Londres, 1998.

INTRODUCCIÓN AL DESARROLLO. CONCEPTO DE HORMONA VEGETAL

Juan Segura

1. Terminología y conceptos básicos. 2. Ciclo vital de las plantas. 3. Formación del cuerpo de la planta. 4. Organización estructural y funcional de los meristemos apicales. 5. Introducción a las hormonas vegetales.

1. TERMINOLOGÍA Y CONCEPTOS BÁSICOS

En sentido figurado, cualquier organismo puede compararse con una computadora en la que se ejecuta, de forma secuencial, una serie de programas de desarrollo: embriogénesis, estado juvenil, fase reproductora, senescencia y muerte. Aunque las plantas también cumplen esta secuencia de eventos, sus programas de desarrollo muestran una gran plasticidad, lo cual se traduce en una amplia variedad de formas y hábitos de crecimiento, apreciable tanto al comparar especies distintas como individuos de la misma especie o clones mantenidos bajo condiciones ambientales diferentes. La plasticidad en los programas de desarrollo de las plantas es una consecuencia evolutiva de su adaptación a un hábito fijo de vida autótrofa, en el que los órganos aéreos utilizan directamente la energía luminosa y las raíces adquieren agua y nutrientes minerales del suelo. En este marco, las plantas deben crecer asegurándose, de forma continuada, un aporte adecuado de materia y energía.

1.1. El desarrollo es el proceso que construye la planta

En el párrafo anterior se han introducido términos tales como crecimiento y desarrollo que, necesariamente, debemos definir, máxime cuando en la literatura científica no existe una terminología rigurosamente estandarizada aplicada a los fenómenos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Entendemos por **desarrollo** el conjunto de eventos que contribuyen a la progresiva elaboración del cuerpo de la planta y que la capacitan para obtener alimento, reproducirse y adaptarse plenamente a su ambiente.

El desarrollo comprende dos procesos básicos: creci-

miento y diferenciación. El **crecimiento** denota los cambios cuantitativos que tienen lugar durante el desarrollo, mientras que la **diferenciación** se refiere a los cambios cualitativos. El desarrollo se considera sinónimo de morfogénesis. El desarrollo (o morfogénesis) puede, por lo tanto, definirse como el conjunto de cambios graduales y progresivos en tamaño (crecimiento), estructura y función (diferenciación) que hace posible la transformación de un cigoto en una planta completa. Esta definición también es aplicable al desarrollo de un órgano, un tejido o, incluso, una célula.

Aunque la terminología que hemos adoptado tiene la virtud de unificar conceptos (desarrollo y morfogénesis), otros investigadores consideran que el desarrollo comprende tres procesos interrelacionados: crecimiento, diferenciación y morfogénesis. Según este punto de vista, la morfogénesis es el proceso que integra y coordina crecimiento y diferenciación, explicando el origen de los caracteres morfológicos y la forma global del organismo.

1.2. La elongación celular determina el crecimiento de las plantas

El crecimiento se define como un incremento irreversible en tamaño o volumen. Esto significa que el crecimiento de las plantas se produce, fundamentalmente, a través del alargamiento o expansión celular. Aunque algunos investigadores sugieren que la división celular es un proceso distinto que acompaña al crecimiento en los tejidos meristemáticos, es más correcto considerar que el crecimiento incluye tanto **división** como **expansión** de las células. De hecho, el crecimiento continuado de las plantas requiere, con muy pocas excepciones, una asociación espacio-temporal de divisiones y expansio-

nes celulares. No obstante, la división celular nunca es, por sí misma, un mecanismo de crecimiento ya que no conduce, necesariamente, a un incremento en el tamaño global de la estructura implicada. Por el contrario, la expansión de las células individuales siempre produce crecimiento. El aislamiento, en *Arabidopsis thaliana*, de los genes *diminuto*, *1-6C* y *stunted plant-1* (*planta achaparrada-1*) corrobora la conexión entre expansión celular y crecimiento. Las plantas con mutaciones en los mencionados genes presentan fenotipos enanos causados por una reducción general en el tamaño de sus células.

La expansión celular es, generalmente, un proceso polarizado. En otras palabras, durante el crecimiento, las células se expanden siguiendo una dirección predefinida, es decir, se elongan. Ello, obviamente, implica la existencia de mecanismos capaces de establecer la polaridad celular antes de que se inicie su elongación (véase apartado 3.1).

La rigidez de la pared celular condiciona el crecimiento de las células vegetales y, por tanto, el de todos los órganos de la planta. Durante la elongación, la pared celular primaria pierde parte de su rigidez y se extiende gracias a la fuerza generada por la presión de turgencia. La entrada de agua concomitante permite que se incremente el volumen celular. La irreversibilidad del proceso está asegurada por una nueva ganancia de rigidez de la pared celular. La elongación celular está regulada por diversos factores, entre los que se incluyen algunas hormonas vegetales. Muy posiblemente, el factor determinante del proceso es la activación de las expansinas, proteínas presentes en las paredes celulares de los órganos en crecimiento que promueven la pérdida de rigidez de las paredes celulares.

1.3. El ciclo celular y el tamaño de las células regulan las frecuencias de división celular

El control primario de la división celular en las plantas reside en el **ciclo celular**, que se define como la secuencia de eventos bioquímicos y morfológicos (síntesis de DNA y replicación de los cromosomas, mitosis y citocinesis) que conducen a la generación de dos células hijas. Cuando las células se dividen repetidamente, hay un intervalo de tiempo (la interfase) entre cada evento mitótico. La interfase se subdivide en tres fases diferenciadas, delimitadas por la síntesis del DNA: 1) fase de presíntesis (fase G1, del inglés *gap*= brecha); 2) fase de síntesis del DNA (fase S) y 3) fase de postsíntesis (fase G2).

El ciclo celular está regulado por controles internos y externos. En las plantas existen, como mínimo, dos puntos de control interno del ciclo celular. El primero reside en la fase G1 y determina si la célula inicia una nueva replicación del ADN o abandona el ciclo. El segundo se sitúa en la fase G2 y determina si las células entran o no en mitosis. En la regulación de ambos puntos de control participan las ciclinas, proteínas sinteti-

zadas durante el ciclo celular, y los productos de una serie de genes denominados *CDC* (del inglés *cell division cycle*). La mayoría de los productos de los genes *CDC* son quinasas que se activan (fosforilan) al unirse con ciclinas específicas. Por ello, estos productos génicos también se denominan quinasas dependientes de ciclinas (*CDK*, del inglés *cyclin-dependent kinases*).

El ciclo celular también está bajo el control de una serie de estímulos externos que determinan cuándo y dónde deben realizarse las divisiones celulares. Algunos de estos estímulos son de carácter hormonal. Por ejemplo, una serie de datos experimentales demuestra que las auxinas y citoquininas participan en la regulación del ciclo celular (véase Capítulo 21). En los vertebrados, la salida del ciclo (interrupción de la división celular) está regulada por inhibidores de las proteínas *CDK*. Aunque estos compuestos también han sido identificados en plantas (por ejemplo, inhiben la mitosis durante el desarrollo del endospermo del maíz), no parecen ser los únicos agentes responsables de la regulación de la división celular. A tal respecto, se ha identificado un gran número de genes cuyos productos antagonizan la multiplicación celular en puntos específicos de rutas particulares del desarrollo.

La frecuencia de divisiones celulares también está controlada por el tamaño de las propias células, por cuanto éstas sólo se dividen cuando alcanzan un volumen predeterminado. Este mecanismo está perfectamente definido, incluso a nivel genético, en las levaduras, donde la duración del ciclo celular es inversamente proporcional al tamaño de la célula en el momento de su generación. Un comportamiento similar se ha observado en algunas células vegetales que sufren una división celular muy desigual. En tales casos, la célula más voluminosa entra en mitosis antes que la de menor tamaño. Si se asume como válido este mecanismo de control, puede sugerirse que la ruta por defecto de las células capaces de elongar es la división celular. Esta hipótesis explicaría la complejidad del control de la división celular en las plantas, en las que se ha identificado un gran número de genes cuya misión básica es limitar la frecuencia de divisiones celulares.

1.4. La diferenciación conduce a la especialización de las células

El crecimiento, por sí mismo, no produce un cuerpo organizado. Para que este cuerpo se desarrolle es necesario que las células se especialicen y lleguen a ser estructural y funcionalmente diferentes. El conjunto de cambios que hacen posible la especialización celular se denomina diferenciación. Básicamente, la diferenciación celular depende de la expresión diferencial del material genético. Las células diferenciadas retienen, por lo tanto, toda la información requerida para regenerar una planta completa, es decir, son **totipotentes**, una propiedad muy poco frecuente en las células animales.

La totipotencia celular puede demostrarse fácilmente aplicando la tecnología del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. La proporción de células del cuerpo de la planta que mantiene su totipotencia varía entre especies e, incluso, entre variedades. La capacidad de reproducción vegetativa, esto es, la habilidad de organizar nuevos meristemos (denominados meristemos adventicios) a partir de órganos preexistentes también es dependiente del genotipo. Prácticamente todos los órganos de la planta, incluyendo raíces, tallos y hojas, pueden formar meristemos adventicios de tallos o de raíces que emiten, respectivamente tallos o raíces adventicias. Entre los ejemplos más llamativos de esta capacidad merecen citarse la producción de plántulas ectópicas en los márgenes de las hojas de *Kalanchoe (Bryophyllum)* o la neoformación de raíces o tallos en una gran variedad de esquejes o estaquillas.

Aunque en ciertos casos puede haber crecimiento sin diferenciación (y viceversa), lo usual es que ambos procesos tengan lugar en íntima asociación. De hecho, el desarrollo de un cuerpo organizado depende de la integración del crecimiento y la diferenciación.

1.5. La división celular y la comunicación entre células controlan la diferenciación celular

Uno de los problemas fundamentales de la biología del desarrollo es conocer los mecanismos que regulan la diferenciación de tipos celulares especializados en los organismos pluricelulares. Para referirse a este proceso de especialización, los científicos utilizan los términos competencia y determinación (especificación del destino celular).

La **competencia** es la capacidad de las células para reconocer señales (hormonales o de otra naturaleza) que activan una ruta particular de diferenciación. Algunos autores la consideran como una fase de transición, en la que las células pueden adquirir el estado de determinación. En dicho estado, las células sufren un cambio en su carácter interno que las «compromete» a seguir una ruta de diferenciación (un destino) genéticamente programada. El estado de **determinación** conlleva la activación de un «mecanismo de memoria», que se mantiene incluso cuando las condiciones que indujeron su adquisición son alteradas mediante manipulación ambiental.

Como consecuencia de sus distintas estrategias de crecimiento, la determinación y competencia celulares no operan en las plantas con la misma extensión y precisión que en los animales. En las células vegetales, la determinación es menos estable y su adquisición, mucho más gradual.

Las células vegetales pueden adquirir el estado de determinación mediante dos mecanismos: 1) división desigual de una célula polarizada para generar dos células hijas que siguen destinos diferentes; y 2) comunica-

ción intercelular, que suministra la información necesaria para emprender una ruta de diferenciación (un destino) que es dependiente de la posición ocupada por la célula en el organismo.

Aunque las orientaciones en los planos de división celular pueden explicar casos muy específicos de determinación (división asimétrica del cigoto, por ejemplo; véase apartado 3.1), no parecen ser el mecanismo que determina el plan básico del cuerpo de la planta. De hecho, la existencia de divisiones celulares muy irregulares en ciertos mutantes de *Arabidopsis thaliana* no impide que todos los tipos celulares se formen en la posición correcta.

Actualmente, existen pocas dudas de que las células meristemáticas se diferencian de acuerdo con las posiciones que ocupan y utilizan la comunicación intercelular para verificar estas posiciones. Así, una célula del suspensor puede dar lugar a un embrión, si el embrión propiamente dicho es eliminado. De manera similar, una célula que entra en una nueva zona meristemática, se diferencia de acuerdo con su nueva posición (véase apartado 4.1.2).

El desarrollo de las plantas es un proceso coordinado e integrado a través de gran número de señales, entre las que se encuentran las **hormonas**. Por ejemplo, el transporte polar de las auxinas (véase Capítulo 19) en el embrión globular es fundamental para el establecimiento de la simetría bilateral del embrión. Sin embargo, no hay pruebas de la participación directa de las hormonas en la determinación de destinos celulares específicos. El factor crítico parece ser la comunicación entre células adyacentes a través de **plasmodesmos**. De hecho, la inyección de colorantes fluorescentes demuestra que las células meristemáticas de la raíz forman dominios simplásticos, que exhiben un elevado transporte vía plasmodesmos. Sin embargo, a medida que progresa la diferenciación, las capas de tejidos van perdiendo gradualmente sus conexiones simplásticas. Desgraciadamente, nuestros conocimientos sobre la naturaleza de las señales utilizadas por las células para comunicarse entre sí son mínimos, aunque hay pruebas de la participación de moléculas solubles. En algunos sistemas, las moléculas que determinan el destino celular residen en la pared celular. Así sucede, por ejemplo, durante las primeras fases del desarrollo vegetativo en algas pardas de la familia Fucales. También se han identificado moléculas de la pared celular que son requeridas para la inducción de embriogénesis somática en células de zahnoria.

2. CICLO VITAL DE LAS PLANTAS

El ciclo vital de las angiospermas (Fig. 18-1) transcurre con alternancia de generaciones heteromórficas entre un gametofito haploide y un esporofito diploide. En este caso, los gametofitos están muy reducidos e incluidos en los esporofitos, aunque en los vegetales inferior-

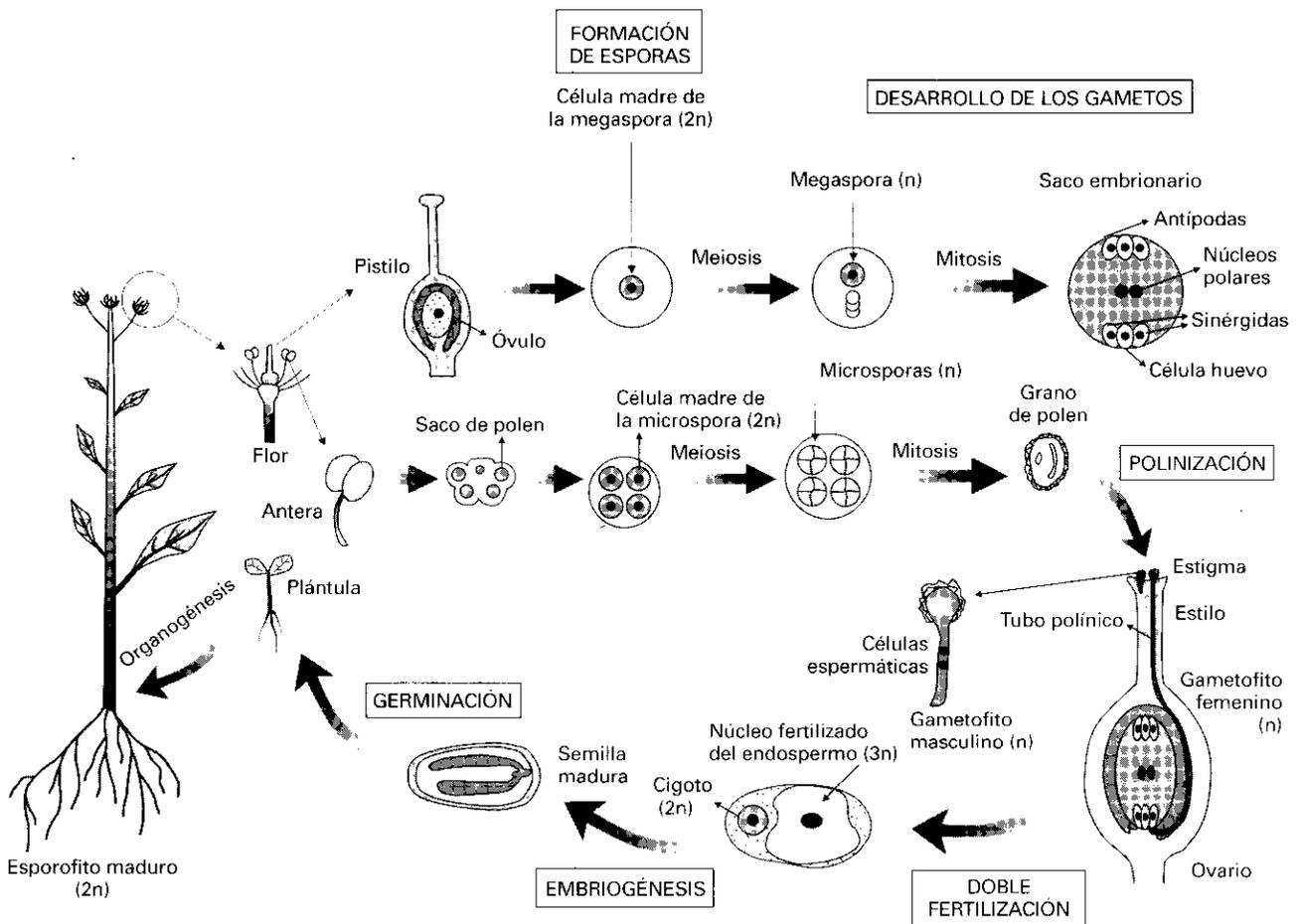


Figura 18-1. Ciclo vital de una angiosperma (adaptado de Chasan, R., Walbot, V. *Plant Cell*, 5: 1139-1146, 1993).

res ambas generaciones pueden estar formadas por individuos independientes (véase Capítulo 28).

2.1. Los gametofitos femenino y masculino se forman dentro de las estructuras florales del esporofito

Las flores del esporofito, la generación dominante en angiospermas, no producen gametos directamente. En su lugar, las divisiones meióticas en determinadas células de los órganos sexuales de las flores originan las megasporas y microsporas haploides que, por sucesivas divisiones mitóticas, dan lugar a la generación gametofítica.

La megaspóra desarrolla, dentro de los óvulos, el gametofito femenino (saco embrionario), que típicamente contiene siete células. Una se convierte en célula huevo y las restantes ayudan en la fertilización o en el desarrollo del embrión. El gametofito masculino (grano de polen) surge de una microspóra producida en el lóculo de la antera y contiene tres células al madurar: dos células espermáticas y la célula vegetativa.

El proceso de formación de gametos en las plantas se diferencia significativamente del que opera en los animales, donde los gametos descienden directamente de las células de la línea germinal. Las plantas, por el contrario, no establecen una línea germinal, y todas sus células retienen el potencial para la reproducción. La probabilidad de que una célula vegetal origine un gameto es función de su posición en el organismo.

2.2. Durante la polinización el grano de polen es transferido desde las anteras a los óvulos

La polinización comienza cuando un grano de polen se posa sobre un estigma receptivo. El grano de polen absorbe agua y nutrientes de la superficie del estigma e inicia su germinación. Durante este proceso, la célula vegetativa desarrolla el tubo polínico, que crece a través del pistilo hacia el óvulo, donde libera las dos células espermáticas en el saco embrionario.

2.3. El esporofito inicia su desarrollo con la doble fecundación que conduce a la formación del embrión y el endospermo

Las dos células espermáticas liberadas en el saco embrionario son dimórficas: la más grande se fusiona con la célula huevo y forma el **cigoto**, que originará el embrión, mientras que la más pequeña se fusiona con la célula central binucleada del saco embrionario, para dar lugar al **endospermo**.

El endospermo comparte todos los alelos con el cigoto; sin embargo, su programa de desarrollo es completamente diferente ya que se divide hasta originar un tejido terminal que nutre al embrión en desarrollo o a la plántula en germinación. El tipo más común de endospermo es el triploide (resulta de la fusión de una célula central del saco embrionario $2n$ con una célula espermática $1n$); no obstante, es posible encontrar otros niveles de ploidía. En las gimnospermas, el endospermo es normalmente haploide y deriva sólo del gametofito femenino.

Formado el embrión, se inicia un proceso adaptativo único, que conduce a la maduración de la semilla y asegura su supervivencia en condiciones adversas. Estas adaptaciones incluyen la acumulación de reservas nutritivas, desecación y adquisición de diversos mecanismos de dormición, que se mantienen hasta que la semilla encuentra condiciones favorables para germinar (véase Capítulo 27). Las semillas también pueden desarrollarse sin fertilización. Tal fenómeno se produce a través de una serie de rutas diferentes que, colectivamente, reciben el nombre de **apomixis**.

Cuando las condiciones son favorables, la semilla absorbe agua e inicia el proceso de germinación. Durante la germinación, se produce la elongación del embrión y la emergencia de los meristemos apicales del tallo y de la raíz. La actividad continuada de estos meristemos forma la planta madura capaz de florecer e iniciar un nuevo ciclo.

3. FORMACIÓN DEL CUERPO DE LA PLANTA

Las plantas son estructuras axiales (se ordenan simétricamente sobre un eje) y polares (los extremos apical y basal del eje son diferentes). Normalmente, las plantas poseen muchos ejes. El eje mayor (orientado perpendicularmente a la superficie de la tierra) está definido por el tallo y la raíz principales, mientras que los ejes subsidiarios forman las ramas y raíces laterales, que también son estructuras polares.

La polaridad del eje determina, por lo tanto, la organización básica y el plan del cuerpo de las plantas. De hecho, este atributo fundamental del desarrollo de las plantas se establece durante la embriogénesis (formación del embrión a partir del cigoto). A continuación, se describen los conceptos fundamentales del proceso embriogénico.

3.1. Durante la formación del embrión se establece la polaridad apical-basal del eje de la planta y el modelo básico de tejidos del eje

El embrión presenta características de desarrollo muy variadas y alcanza distintos tamaños y grados de diferenciación en las angiospermas. El modelo de **embriogénesis** que se presenta (Fig. 18-2) es fundamentalmente aplicable a las dicotiledóneas y se centra en los procesos que tienen lugar durante el desarrollo del embrión: iniciación de los meristemos apicales o primarios y diferenciación de los primeros tejidos. Una exposición complementaria puede encontrarse en el Capítulo 27. Recuérdese, también, que la embriogénesis siempre va acompañada del desarrollo del endospermo (véase apartado 2).

Después de la fertilización, el cigoto sufre una fase inicial de elongación que lleva a la formación del proembrión lineal (Fig. 18-2 A y B). La división asimétrica del proembrión lineal origina una célula apical pequeña, que generará el embrión, y una célula basal grande y clongada, que da lugar al suspensor, estructura terminal que nutre al embrión y lo une con el saco embrionario. La célula apical sufre una serie de divisiones sucesivas, en el plano tanto longitudinal como transversal, y produce una estructura globular que forma el embrión propiamente dicho (Fig. 18-2 C). En el transcurso de la fase globular, se diferencian los meristemos apicales del tallo y la raíz en los extremos opuestos del embrión y se inicia la formación de los tres primeros tejidos meristemáticos (Fig. 18-2 D): protodermis periférica (precursora de la epidermis), procambium central (precursor de los tejidos vasculares) y tejido fundamental subepidérmico (precursor del córtex). La diferenciación del meristemo apical del tallo marca los primeros procesos organogénicos del embrión (desarrollo de los cotiledones), mientras que en el polo opuesto se diferencia la caliptra, que recubre el meristemo apical de la raíz (Fig. 18-2 E). En la fase final (Fig. 18-2 F y G), el embrión alcanza la forma cotiledonar típica, en la que se pueden distinguir el eje embrionario, con los meristemos apicales del tallo y la raíz en extremos opuestos, y los cotiledones. La porción del eje situada entre el meristemo radicular y los cotiledones se denomina hipocótilo, mientras que la situada entre los cotiledones y el ápice caulinar recibe el nombre de epicótilo.

La inducción *in vitro* de embriones somáticos, capaces de regenerar plantas completas demuestra que la polaridad apical-basal del embrión cigótico puede establecerse sin influencia de los tejidos maternos. No obstante, la estricta correlación existente entre la orientación del eje embrionario y la estructura del óvulo sugiere que tal información podría ser importante en la embriogénesis cigótica. Desgraciadamente, se desconoce la naturaleza de esa información materna, aunque se discute la posible influencia de factores químicos difusibles o de fuerzas físicas.

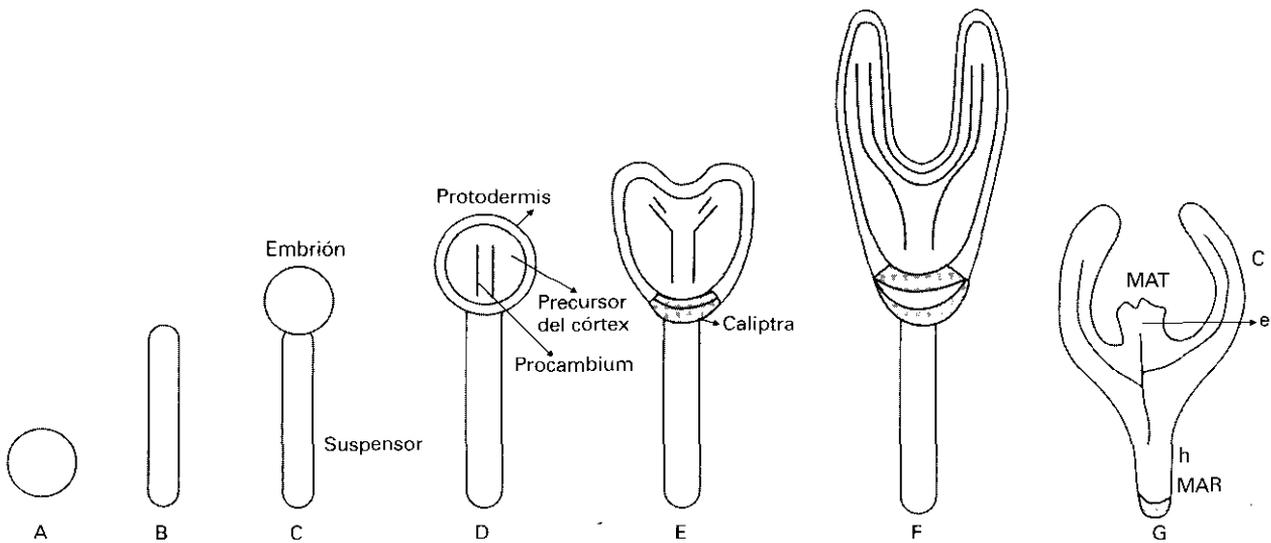


Figura 18-2. Fases principales de la embriogénesis en dicotiledóneas (adaptado de Kaplan, D. R. y Cooke, T. J., 1997). **A-C:** Morfogénesis inicial del embrión. **A,** cigoto; **B,** proembrión lineal; **C,** embrión propiamente dicho.

D: Histogénesis inicial y organización de los meristemas. Durante esta fase se inicia la diferenciación de los tres tejidos meristemáticos primarios: protodermis (precursora de la epidermis), procambium central (precursor vascular) y tejidos fundamentales subepidérmicos (precursores del córtex). Simultáneamente comienza la formación de los meristemas apicales del tallo y la raíz en los extremos opuestos del embrión.

E: Organogénesis inicial. Comienzan a formarse los cotiledones y se diferencia la caliptra a partir de células de la protodermis.

F: Desarrollo del embrión. Se completa el desarrollo de los tejidos y órganos del embrión y se produce la elongación de los órganos principales incluyendo cotiledones e hipocótilo.

G: Embrión maduro. MAT, meristemo apical del tallo; e, epicótilo; c, cotiledones; h, hipocótilo; MAR, meristemo apical de la raíz.

La polaridad apical-basal del eje embrionario y, por extensión, de la planta adulta, atributo fundamental del desarrollo vegetal, persiste incluso durante el crecimiento de órganos aislados. En las estaquillas, por ejemplo, las raíces siempre se forman en el extremo morfológicamente basal, mientras que las yemas lo hacen en el extremo opuesto. Esta pauta de desarrollo es independiente de la zona del tallo donde se aisló la estaquilla y de las condiciones ambientales. Además, la respuesta no está afectada por la gravedad, hecho que puede demostrarse invirtiendo la posición de las estaquillas o colocándolas horizontalmente. Muy probablemente, el desarrollo polarizado está regulado por el transporte auxínico (véase Capítulo 19).

Por el momento, se desconoce el mecanismo responsable del establecimiento de la polaridad a nivel celular, aunque la orientación de las células durante la mitosis puede ser el factor desencadenante del proceso. La interrelación entre la dirección de la elongación (polaridad) celular y la orientación de la división celular es sugerida por estudios con los mutantes *tonneau* (*ton*, del francés tonel) de *Arabidopsis thaliana*. Las mutaciones en los genes *TÓN* provocan expansiones celulares muy irregulares y una orientación anormal de los planos de división celular. Este fenotipo también se asocia con cambios en la orientación de los microtúbulos corticales. Como es bien sabido, los microtúbulos corticales controlan la orientación de las microfibrillas de celulo-

sa en la pared celular que, a su vez, determina la dirección de la elongación celular. Pese a lo expuesto, los cambios en la polaridad celular no siempre se acompañan de alteraciones en la orientación de los microtúbulos corticales. Así sucede, por ejemplo, en los mutantes *cobra* de *Arabidopsis thaliana*, donde las células epidérmicas de la raíz sufren expansiones radiales en lugar de las típicamente longitudinales de la planta silvestre.

3.2. Los meristemas apicales del tallo y la raíz producen el cuerpo primario de la planta

La actividad de los meristemas apicales (o primarios) conduce al desarrollo del denominado cuerpo primario de la planta. Los órganos vegetativos principales del cuerpo primario (raíces, tallos y hojas) están formados por tres sistemas de tejidos que se inician durante el desarrollo del embrión: dérmico (representado por la epidermis), vascular (xilema y floema primarios) y fundamental (parénquima, colénquima y esclerénquima).

El sistema tisular fundamental de las hojas se denomina mesófilo (Fig. 18-3). En raíces y tallos, el sistema fundamental se divide en dos regiones morfológicamente diferenciadas: el córtex (situado por fuera del sistema vascular) y la médula (situada en la zona central y delimitada por el sistema vascular). Este modelo presenta algunas modificaciones en las raíces ya que: 1)

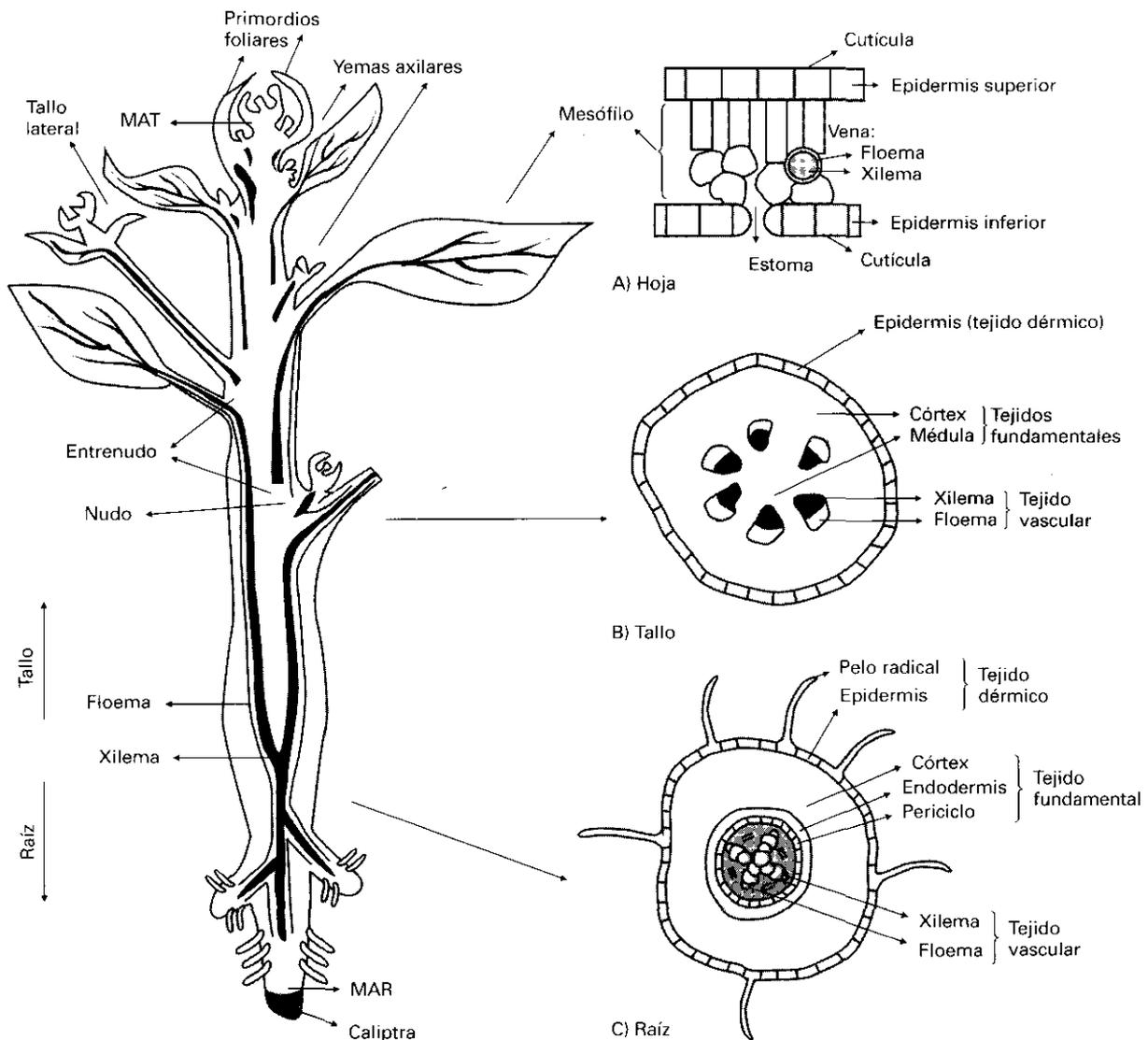


Figura 18-3. Representación esquemática del cuerpo primario de una dicotiledónea. Las secciones transversales de la hoja (A), el tallo (B) y la raíz (C) muestran la disposición de los tejidos principales.

la médula puede estar ausente; 2) la zona del sistema fundamental adyacente al sistema vascular aparece separada del córtex por un cilindro de células especializadas (el periciclo). El conjunto formado por periciclo, sistema vascular y médula (si la hay) constituye el cilindro central de la raíz, y 3) la capa más interna de células del córtex se diferencia, estructural y funcionalmente, del resto y forma la endodermis.

3.2.1. El cuerpo primario de la planta crece de forma modular

El cuerpo primario incrementa en tamaño mediante la adición de estructuras en forma modular (**metámeros**). A medida que las células meristemáticas proliferan, se

van produciendo nuevos metámeros que se alejan progresivamente de los ápices (Fig. 18-4).

El módulo generado por el meristemo apical del tallo (denominado **fitómero**) comprende un órgano lateral (la hoja), un nudo, al que se une la hoja, un meristemo axilar (la yema axilar), localizada en la axila de la hoja, y un entrenudo (véase también Capítulo 25). La posición de las hojas en los fitómeros sigue un modelo característico, determinado genéticamente, que se denomina filotaxia. Básicamente, existen dos modelos de filotaxia, el espiral y el verticilado. El ángulo entre las hojas que se van formando en el modelo espiral es muy regular. Dentro de un verticilo puede haber una hoja (modelo dístico), dos hojas (modelo decusado) o tres o más hojas (filotaxia verticilada típica). Los modelos filotáticos son muy estables y sólo cambian bajo la in-

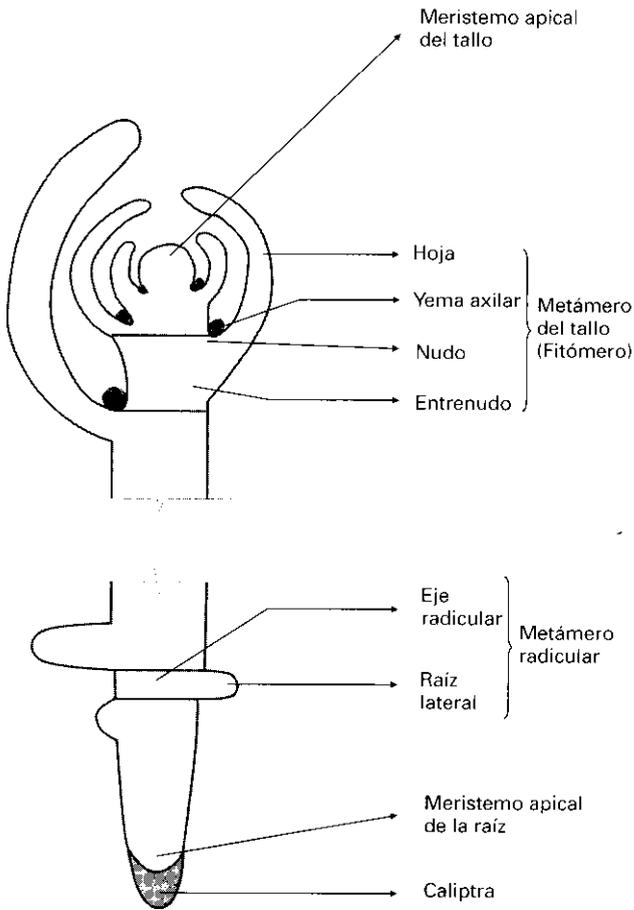


Figura 18-4. Construcción repetitiva del cuerpo primario de la planta mediante la adición de metámeros de tallo y raíz (adaptado de Fosket, D. E., 1994).

fluencia de ciertos estímulos ambientales o del desarrollo (transición floral, por ejemplo).

La forma de la planta depende de las pautas de ramificación del tallo principal que, en última instancia, son determinadas por el tipo de filotaxia ya que las yemas axilares se originan en las axilas de las hojas. Si el crecimiento del ápice caulinar es mayor que el de las yemas axilares respectivas, resulta una ramificación monopódica (plantas de forma piramidal), mientras que si ocurre lo contrario resulta una ramificación simpódica, que son los dos modelos de ramificación básicos. La forma final de la planta también depende del número de ramas laterales de distinto orden que se produce, del modelo espacial que adoptan éstas y del grado de crecimiento relativo de cada una de ellas.

El meristemo apical de la raíz genera tanto las células que forman la caliptra como las células que constituirán los tejidos primarios del eje radicular. El metámero formado por este meristemo es menos evidente, pero sus células se dividen repetidamente, siguiendo pautas precisas, para producir el modelo tisular característico de la raíz primaria. A diferencia del meristemo apical del tallo, el meristemo apical de la raíz nunca produce órganos laterales. Las raíces laterales se forman a partir

de meristemos adventicios (primordios radiculares) que se diferencian en el periciclo.

El modelo de desarrollo que acabamos de comentar es muy diferente del que opera en los animales. En estos organismos, todo el plan del cuerpo completo y el de sus sistemas de órganos se establece durante el desarrollo embrionario, por lo que la forma del animal al nacer es muy similar a la del adulto. En contraste, el desarrollo de las plantas es básicamente postembrionario. Aunque las plantas también sufren embriogénesis y la semilla contiene una planta embrionaria, esta planta carece de la mayoría de órganos y sistemas de tejidos de la planta madura. En lugar de desarrollarse durante la embriogénesis, tales órganos se forman después de la germinación gracias a la actividad de los meristemos.

3.3. Las plantas también pueden desarrollar un cuerpo secundario

En muchos casos, el cuerpo primario constituye la planta completa. En otros, sin embargo, hay un componente adicional del desarrollo que conduce a un crecimiento secundario en grosor del eje. Tal crecimiento deriva de la actividad de dos meristemos adicionales, que se inician en la fase postembrionaria, y que se sitúan paralelos al eje tallo-raíz, por lo que se denominan **meristemos secundarios o laterales**: 1) cambium vascular, que origina el floema y xilema secundarios; y 2) cambium del felógeno, que forma el tejido protector (suber) que reemplaza a la epidermis. Estos dos meristemos, junto con los tejidos que producen, constituyen el cuerpo secundario de la planta (Fig. 18-5). A diferencia del primario, el cuerpo secundario no da lugar a una planta completa ya que sólo está formado por un número limitado de tejidos y no contiene órganos. El cambium puede también considerarse como un tipo de meristemo intercalar. Estos meristemos se denominan así porque se sitúan entre las células que derivan de su actividad mitótica.

En las plantas maduras también se desarrolla un tercer tipo de meristemos que no estaba presente en el embrión. Tales meristemos son los reproductores (**yemas florales**), que originan las flores. Aunque los meristemos producen, normalmente, un solo tipo de módulo, los meristemos reproductores se inician a partir de meristemos vegetativos preexistentes. Ello implica un cambio en la identidad del meristemo, que tiene lugar en respuesta a factores internos y ambientales, como se explica en el Capítulo 25.

3.4. Potencialmente, las plantas son inmortales

De acuerdo con su pauta de crecimiento, las estructuras generadas por la actividad de los meristemos se clasifican en determinadas e indeterminadas. Las **estructuras**

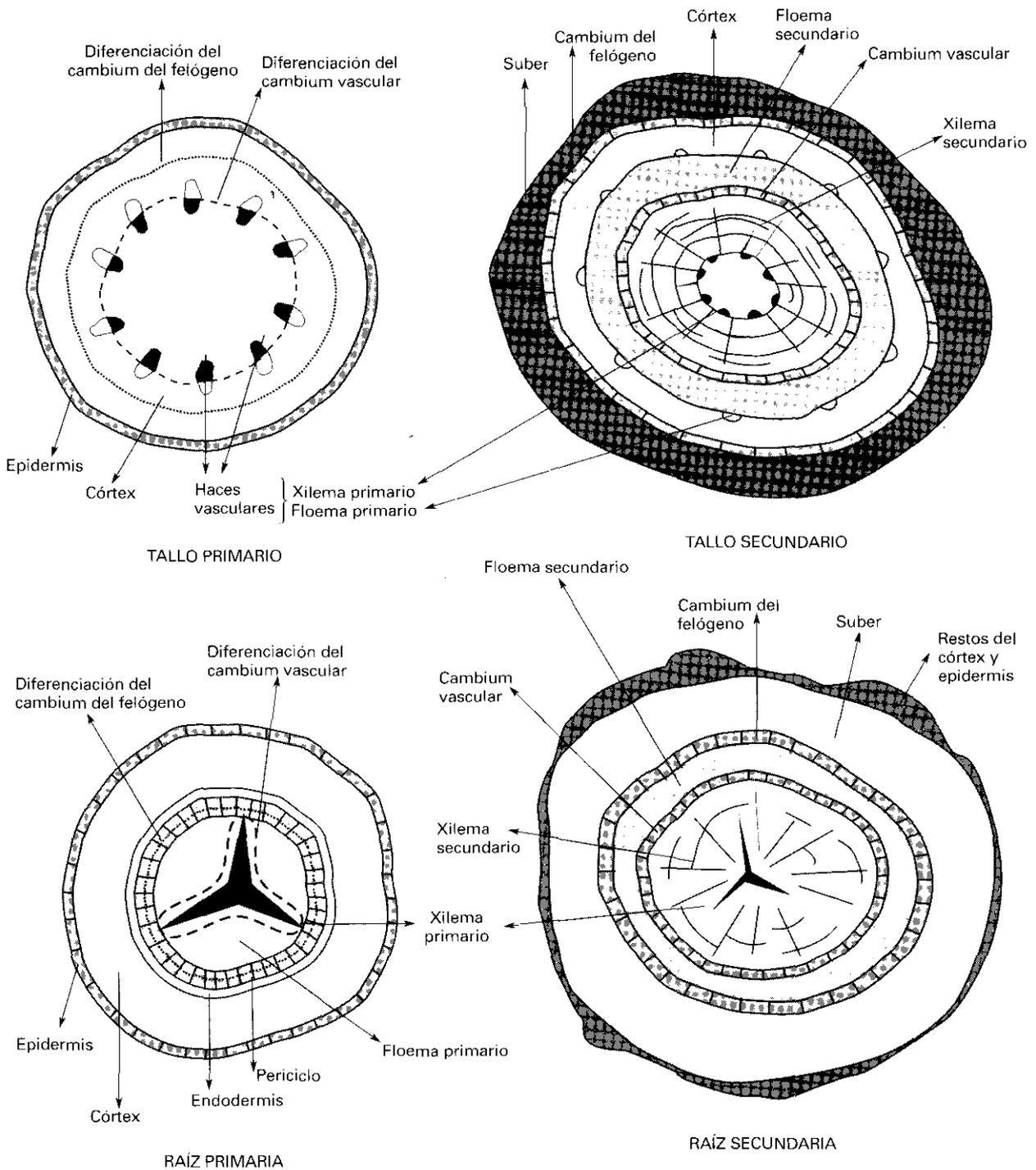


Figura 18-5. Representación esquemática del crecimiento en grosor del tallo (parte superior) y de la raíz (parte inferior) de una dicotiledónea. Los puntos y líneas discontinuos representan las zonas donde se inicia la formación de los meristemos laterales (cambium del felógeno y cambium vascular, respectivamente).

determinadas se caracterizan por presentar crecimiento limitado, es decir, crecen hasta alcanzar un cierto tamaño y, después de un período variable, envejecen y mueren. Las hojas, flores y frutos son ejemplos típicos de **estructuras determinadas**. Por el contrario, el tallo y la raíz son estructuras indeterminadas, capaces de crecer indefinidamente gracias a la actividad de sus meristemos vegetativos. Este hábito de crecimiento indeter-

minado de los meristemos vegetativos es consecuencia de la adaptación de las plantas al medio terrestre y posibilita que estos organismos, carentes de capacidad locomotora, puedan responder a los cambios ambientales activando nuevos programas de desarrollo. Potencialmente, los meristemos apicales del tallo y la raíz pueden considerarse, por lo tanto, inmortales. No obstante, cuando un meristemo vegetativo se transforma en re-

productor (yema floral), la estructura que origina (flor) es determinada.

En sentido amplio, la planta completa también puede seguir una pauta de desarrollo que guarda grandes similitudes con el crecimiento determinado o indeterminado. Así, las denominadas especies monocárpicas sólo florecen una vez y mueren, mientras que las policárpicas florecen durante varias estaciones antes de morir.

4. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS MERISTEMOS APICALES

Los meristemos realizan tres funciones básicas: iniciación de tejidos y órganos, comunicación de señales y automantenimiento como región formadora. Esta última función la realizan ciertas células del meristemo capaces de auto-perpetuarse y de formar nuevas células del cuerpo de la planta. Dichas células se denominan **células iniciales** y los productos de su división, células derivadas.

La comprensión del concepto de célula inicial requiere una definición precisa de los términos región meristemática y meristemo apical. Las regiones meristemáticas son zonas de división y expansión celulares, difíciles de delimitar de forma exacta, que contienen un meristemo apical. Estrictamente, los meristemos apicales están constituidos por las células iniciales y sus derivadas más inmediatas, que actuarán como progenitoras de los tejidos y órganos que conforman el cuerpo de la planta.

4.1. Meristemo apical del tallo

El meristemo apical del tallo es la porción más distal de la región meristemática, denominada ápice caulinar o yema apical. El ápice caulinar comprende varios tipos de células y tejidos: el propio meristemo, una región muy próxima al meristemo que origina los primordios de los órganos laterales, una región subapical en la que el tallo se ensancha y los primordios se elongan y la región de maduración, en la que la diferenciación se hace aparente (Fig. 18-6 A).

En general, el meristemo apical es una estructura de aproximadamente 100 μm en diámetro, en forma de domo, que agrupa entre 800 y 1200 células pequeñas, con paredes delgadas y citoplasma denso. No obstante, tanto el tamaño como la forma de los meristemos varían ampliamente en el transcurso del desarrollo y entre especies.

4.1.1. El meristemo apical presenta una apariencia estratificada

El meristemo apical de la mayoría de las angiospermas está compuesto por tres capas celulares, que le confie-

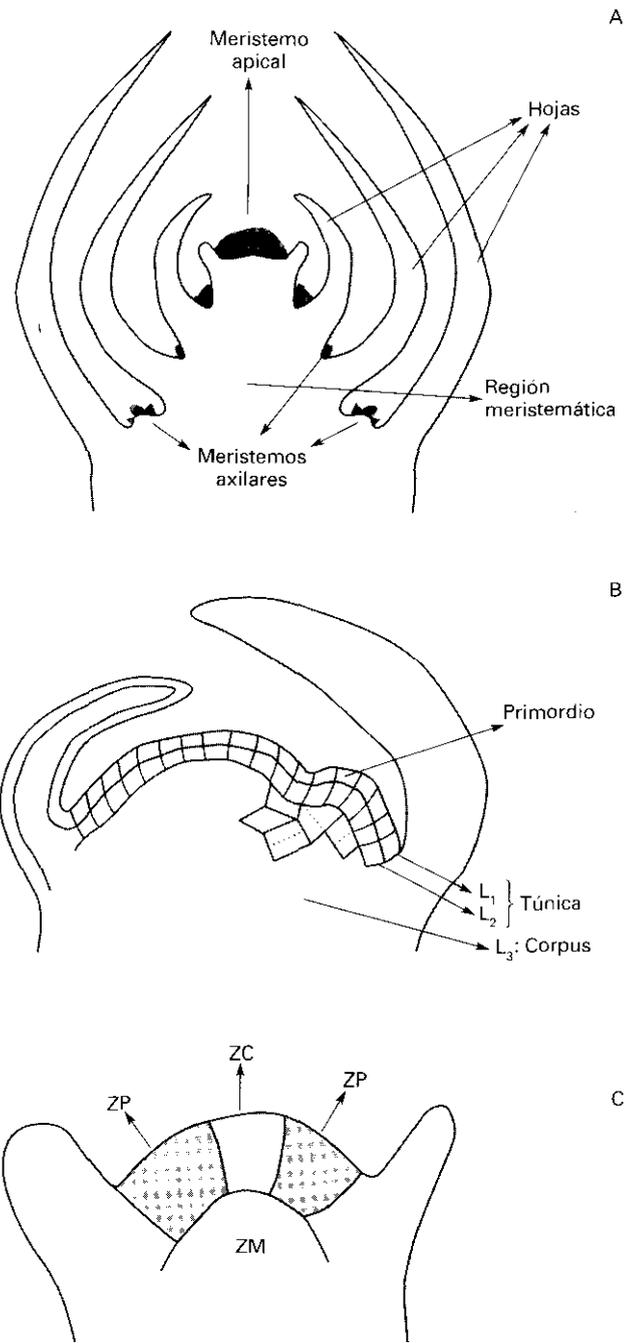


Figura 18-6. Estructura del meristemo apical del tallo. **A**, comparación de la región meristemática (ápice caulinar) y del meristemo apical del tallo; **B**, organización en capas celulares del meristemo apical del tallo (adaptado de Laufs et al.: *Plant Physiol Biochem*, 36: 33-45, 1998); **C**, división del meristemo apical en tres zonas concéntricas denominadas central (ZC), periférica (ZP) y medular (ZM) (adaptado de Clark, S. E., 1997).

ren una apariencia estratificada, distinguibles por los planos de división de las células que las integran (Fig. 18-6 B). La capa más externa, de una célula de grosor, se denomina L1. Las células de esta capa se dividen exclusivamente en el plano anticlinal (perpendicular a

la superficie). La segunda capa, o L2, está formada por células que se dividen mayoritariamente en el plano anticlinal, excepto en las zonas donde se originan los órganos, donde lo hacen en el plano periclinal (paralelo a la superficie). Las células de la capa más interna, o L3, muestran planos de división al azar. El grosor de las capas L2 y L3 difiere entre especies y puede variar durante el desarrollo. En *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, el grosor de estas capas es de una (L2) o 2-3 células (L3). Las dos capas más externas (L1 y L2) forman la denominada **túnica**, mientras que las células de la capa más interna (L3) constituyen el **corpus** del meristemo.

Las restricciones en los planos de división y la incapacidad migratoria de las células vegetales hacen que la progenie de las células meristemáticas quede confinada en sus respectivas capas. De hecho, estudios con meristemas quiméricos (formados por capas o sectores de células con características genéticas distintas, lo que facilita la identificación de estas células y sus derivadas) demuestran que la organización celular en capas tiende a mantenerse en el tallo y órganos laterales del tallo. En general, la capa L1 origina la epidermis, mientras que las más internas (L2 y L3) contribuyen a la formación de los tejidos centrales del tallo y las hojas. Sin embargo, a veces, se producen alteraciones en los planos de división y las células hijas son forzadas a entrar en otras capas. Si ello sucede, estas células adoptan otra identidad, lo que indica que el destino celular no está estrictamente determinado por el linaje, sino por la posición que ocupan en el meristemo (véase apartado 1.5).

4.1.2. La división en zonas del meristemo apical ayuda a comprender sus funciones

La organización del meristemo apical en las capas L1, L2 y L3 ha sido confirmada mediante el aislamiento de genes que se expresan específicamente en cada capa. Sin embargo, este modelo no tiene en cuenta otros hechos estructurales del meristemo, especialmente la **existencia de zonas** que se distinguen entre sí no sólo atendiendo a los planos de división, sino también al tamaño, las características estructurales y la frecuencia mitótica de sus células. Según el concepto de zonas, el meristemo apical puede ser dividido en tres regiones (Fig. 18-6 C): la zona central (ZC), situada en el extremo distal, la zona periférica (ZP), que flanquea la ZC, y la zona medular (ZM), situada en la base del meristemo.

Las células de la ZC, además de ser más grandes que las de las otras dos zonas, poseen núcleos muy prominentes, están muy vacuoladas y se dividen menos frecuentemente que el resto. Actualmente, se asume que las células de la ZC actúan como iniciales para la ZP y ZM. Incluso, se ha propuesto que las iniciales son permanentes, lo que implica que al menos un descendiente de cada inicial permanece en la ZC después de dividir-

se. Sin embargo, análisis sectoriales demuestran que, a veces, todas las células derivadas de una inicial salen de la ZC.

Las células de la ZP y ZM presentan índices más elevados de división. La función principal de la ZP es la formación de órganos laterales, especialmente primordios foliares. La ZM (también denominada meristemo medular o *rib meristem* en la terminología anglosajona) origina las células de la parte central del tallo y los tejidos vasculares.

El meristemo apical es una estructura muy dinámica en la que, constantemente, se están produciendo crecimiento, división celular y formación de órganos. Durante el desarrollo vegetativo se mantiene la organización del meristemo, pero la posición y el destino de las células derivadas del mismo cambian con el tiempo. En la Figura 18-7 se muestra la dinámica de una célula inicial (indiferenciada) de la ZC. A medida que el meristemo se autopropaga, algunas de las células derivadas de la inicial alcanzan la ZP. Cuando estas células se integran en dicha zona, realizan la transición hacia un estado más diferenciado y se incorporan en un órgano (p. ej., primordio foliar). El factor determinante de la activación de esta transición es la información de posición. Además, el lugar donde se inicia un nuevo órgano está regulado por informaciones de posición procedentes de los órganos que se formaron previamente, lo que sugiere que la misma señal puede regular ambos procesos.

4.1.3. El aislamiento de plantas mutantes con defectos específicos en el desarrollo de los meristemas apicales del tallo está permitiendo conocer la base molecular de la función de los meristemas

Estudios de microcirugía, en los que se eliminan selectivamente regiones del meristemo apical del tallo, demuestran que la división en zonas es la base estructural y funcional de los meristemas. No obstante, las mayores pruebas en este campo se están consiguiendo gracias al análisis de mutaciones que afectan a dos de las funciones fundamentales de los meristemas: automantenimiento como región formadora e iniciación de tejidos y órganos. En *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, estas funciones están reguladas por los genes *STM* (*shootmeristemless*), *WUS* (*wuschel*) y *CLV* (*clavata*). La mutación en el gen *STM* impide la formación y el mantenimiento del meristemo apical, mientras que la del gen *WUS* produce fenotipos con meristemas apicales no funcionales. En contraste, las mutaciones en el gen *CLV* originan fenotipos opuestos a los de los dos mutantes anteriores, ya que se forman meristemas muy elongados (el alargamiento resulta de una acumulación gradual de células indiferenciadas en la zona central, lo que aleja al ápice de la formación de órganos).

Aunque aún existen muchas lagunas sobre la función

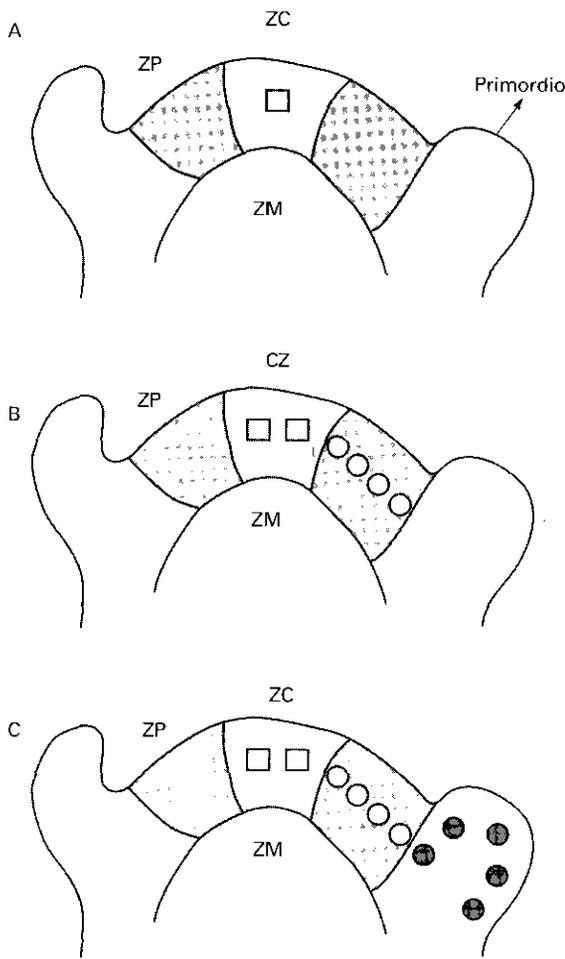


Figura 18-7. Dinámica del desarrollo del meristemo apical del tallo mostrando el destino de una célula de la zona central (ZC). **A**, célula indiferenciada (cuadrado) de la ZC; todas las células en B y C derivan de esta célula; **B**, el crecimiento conduce las células de la progenie hacia los flancos (círculos vacíos), donde se organizan los primordios de los órganos; **C**, las células que anteriormente residían en la ZP se incorporan (círculos negros) al primordio foliar y se dividen a medida que dicho primordio crece (adaptado de Clark, S.E., 1997).

de estos genes, se sugiere que *STM* y *CLV* actúan de forma competitiva para mantener la estructura del meristemo apical, regulando la proliferación celular y la organogénesis. El gen *WUS* establecería o interpretaría la información posicional en el meristemo, organizando los subdominios central y periférico. Obviamente, este modelo no excluye la participación de otros genes en la regulación del desarrollo de los meristemos apicales del tallo.

Los mecanismos que controlan la posición de los primordios foliares (filotaxia) en los flancos del meristemo apical del tallo son menos conocidos. En cualquier caso, la posición de un nuevo primordio se determina por cambios específicos en los planos de división celular. Estos cambios están provocados por tensiones me-

cánicas desarrolladas en el propio meristemo. La generación de tensiones localizadas es una consecuencia lógica de la actividad del meristemo ya que las divisiones, las elongaciones celulares y los cambios de turgencia no suceden de forma sincrónica. Dado que las células meristemáticas están íntimamente asociadas entre sí, las tensiones se propagan fácilmente a través del meristemo, generando zonas puntuales con tensiones altas o bajas. También se ha aislado una serie de genes meristemáticos que controlan la organización del primordio foliar, la forma de la hoja y su simetría dorsi-ventral.

4.2. Meristemo apical de la raíz

Pese a su nombre, el meristemo apical de la raíz no ocupa una posición terminal ya que está cubierto por la caliptra, estructura multicelular que lo protege de daños mecánicos durante el crecimiento radicular. La extensión exacta del meristemo es difícil de definir. No obstante, en las raíces de las angiospermas siempre aparecen entre una y cuatro capas de células iniciales, que originan todas las células del cuerpo de la raíz.

4.2.1. El meristemo apical de la raíz también presenta una división en zona característica

Estructuralmente, en el meristemo apical de la raíz también aparece una zonación característica. En muchos casos (Fig. 18-8), es posible distinguir cuatro grupos de células iniciales: 1) células iniciales del cilindro central; 2) células corticales iniciales; 3) células iniciales centrales (iniciales permanentes o centro quiescente); y 4) células iniciales de la columela (región central de la caliptra) o caliptrógeno. El conjunto formado por el centro quiescente y las células iniciales se denomina **promeristemo**, o centro de construcción mínimo de la raíz. Como se deduce de los nombres, las células iniciales del cilindro central originan los tejidos internos de la raíz, incluyendo el sistema vascular; las iniciales corticales producen el córtex; y el caliptrógeno produce la columela.

En muchas plantas, el caliptrógeno y la caliptra forman una estructura independiente del resto de la raíz, de la que quedan separados por las células iniciales de la epidermis (protodermis). Estos meristemos se definen como cerrados, en contraposición con los denominados meristemos abiertos, en los que no existe una delimitación clara entre las células iniciales del córtex y de la columela. De hecho, en la interfase entre ambas, la misma célula inicial puede originar córtex o columela. En los meristemos abiertos tampoco existe protodermis diferenciada, siendo usual que la epidermis se origine a partir de las células iniciales de la caliptra o de la capa más externa de las células iniciales corticales. Otra im-

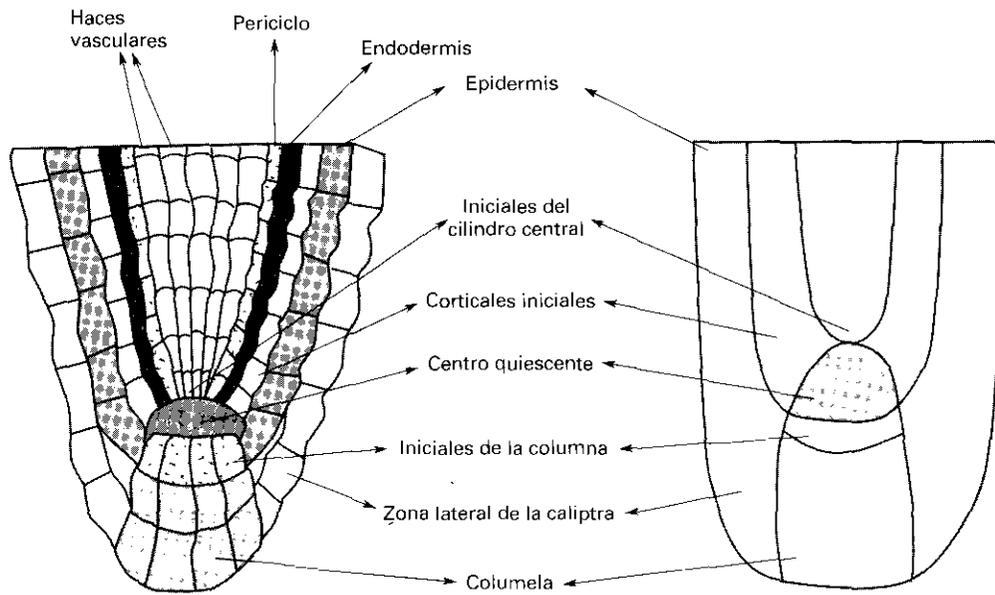


Figura 18-8. Representación esquemática de la división en zonas del meristemo apical de la raíz (adaptado de Mauseth, J. D., 1988).

portante diferencia entre ambos tipos de meristemos es que el centro quiescente de los meristemos cerrados nunca incluye células del caliptrógeno.

El **centro quiescente** es comparable a la zona central del meristemo apical del tallo y, como en ésta, la frecuencia de divisiones celulares es relativamente baja. El centro quiescente puede detectarse mediante autorradiografía, después de suministrar a la raíz timidina triada. De ese modo, se visualiza una región central en la que muy pocos de sus núcleos han incorporado radiactividad, lo que indica que sus células tienen ciclos celulares muy largos. El tamaño del centro quiescente varía con la actividad de la raíz. Así, las raíces en crecimiento activo tienen centros quiescentes muy voluminosos, que se extienden, incluso más allá de la región de las células iniciales. Lo opuesto sucede cuando el centro quiescente se analiza, por ejemplo, durante el período de reposo invernal.

Hasta muy recientemente, se desconocían las funciones del centro quiescente. Aunque tradicionalmente se le ha considerado la reserva de células para las distintas zonas del promeristemo, estudios en *Arabidopsis thaliana* han demostrado que el centro quiescente inhibe la diferenciación de las células iniciales adyacentes, lo que corrobora el papel desempeñado por la comunicación intercelular en el control del destino de las células vegetales (véase apartado 1.4.1). Dado que las señales que promueven la especialización celular provienen de las células más diferenciadas, puede sugerirse que el destino de una célula particular del meristemo radical es el resultado de un balance preciso entre señales que retrasan la diferenciación (procedentes del centro quiescente) y señales que la promueven (procedentes de células más diferenciadas).

4.2.2. El análisis de mutantes está permitiendo conocer las bases moleculares que regulan el destino de las células iniciales del meristemo apical de la raíz

Por el momento, se desconocen los mecanismos que regulan el desarrollo del meristemo apical de la raíz. No obstante, estudios con mutantes de *Arabidopsis thaliana* han permitido identificar una serie de genes que controlan la organización radial y axial (apical-basal) del cuerpo de la raíz. Por ejemplo, los mutantes del gen *SHR* (*shortroot*) carecen de endodermis y los del gen *SCR* (*scarecrow*) poseen una capa de células con atributos de endodermis y parénquima cortical. Investigaciones con dobles mutantes sugieren que el gen *SCR* regula la división asimétrica que conduce a la separación de las células corticales y endodérmicas. En este contexto, el gen *SHR* controlaría directamente la formación de la endodermis. Estos resultados sugieren que los modelos de formación de tejidos en las raíces son el resultado de una interacción entre genes que regulan ciertas divisiones asimétricas y genes implicados en la especificidad celular.

Los genes que participan en la organización axial de la raíz se denominan *MP* (*monopteros*) y *HBT* (*hobbit*). El análisis de mutantes del gen *MP*, que se requiere para la formación de la raíz e hipocótilo en el embrión, sugiere que dicho gen participa específicamente en la orientación axial de las células provasculares. Las mutaciones en el gen *HBT* producen plántulas con meristemos radicales inactivos debido a la falta de centro quiescente y columela, por lo que este gen debe ser requerido para la formación de la raíz.

Por último, el análisis de las mutaciones en los genes *GL2* (*glabra 2*) y *TTG* (*transparent testa glabra*) sugiere que la formación de pelos radicales es la ruta de desarrollo por defecto durante la diferenciación de la epidermis. Por lo tanto, los productos de ambos genes actuarían como reguladores negativos del desarrollo de los pelos radicales. Asimismo, existen evidencias experimentales de que la hormona gaseosa etileno actúa como regulador positivo de la formación de los pelos radicales en *Arabidopsis thaliana*.

Los ejemplos expuestos con mutantes de *Arabidopsis thaliana* demuestran que los análisis genéticos son una herramienta idónea para comprender cómo los meristemos apicales forman la planta. Estos análisis han permitido estudiar una serie de genes que regulan la función y organización de los meristemos apicales del tallo y la raíz. Algunos de estos genes mantienen las células iniciales y otros dirigen la diferenciación de las células derivadas. Las interacciones entre los dos grupos de genes son necesarias para mantener la organización y función de los meristemos.

5. INTRODUCCIÓN A LAS HORMONAS VEGETALES

5.1. Las hormonas vegetales coordinan las actividades de células, tejidos y órganos de las plantas

El funcionamiento normal de los organismos pluricelulares requiere mecanismos precisos de regulación que permitan una perfecta coordinación de las actividades de sus células, tejidos y órganos. Igualmente, el organismo debe ser capaz de percibir y responder a las fluctuaciones en su ambiente. Entre los posibles mecanismos de regulación, el más conocido es el sistema de mensajeros químicos (señales químicas) que permite la comunicación entre las células y coordina sus actividades. En las plantas, la comunicación química se establece fundamentalmente a través de **hormonas (o fitohormonas)**, aunque no se excluye la existencia de otros posibles mediadores químicos cuya naturaleza, por el momento, es desconocida (véase apartado 1.4.1).

5.2. Las hormonas vegetales no cumplen estrictamente el concepto clásico de hormona animal

El concepto clásico de hormona, tal como se define en fisiología animal, incluye tres premisas básicas: 1) sitio localizado de biosíntesis; 2) transporte hasta células diana separadas espacialmente del lugar de biosíntesis; y 3) control de la respuesta fisiológica a través de cambios en los niveles endógenos de la hormona.

Las hormonas vegetales conocidas no cumplen, de modo estricto, las tres premisas básicas que conforman

el concepto clásico de hormona animal. Esta constatación ha sido motivo de un importante debate científico, cuyos puntos principales se resumen a continuación.

5.2.1. *Cualquier órgano de la planta tiene capacidad para sintetizar hormonas*

Las hormonas vegetales no se sintetizan en estructuras especializadas comparables a las glándulas endocrinas de los animales. De hecho, pueden formarse en un amplio abanico de células y tejidos. Sin embargo, las pruebas experimentales disponibles muestran que no todas las células y tejidos tienen la misma capacidad para sintetizar hormonas. En general, los lugares principales de biosíntesis son los ápices meristemáticos de tallos y raíces, primordios de órganos vegetativos o reproductores y semillas en desarrollo. La expresión de programas específicos de desarrollo (p. ej., senescencia) o la acción de diversos tipos de estrés también pueden desencadenar la biosíntesis de algunas hormonas en órganos maduros.

5.2.2. *El transporte no es un componente esencial para la acción de las hormonas*

El análisis de los fluidos de xilema y floema permite detectar la presencia de hormonas, lo que demuestra que estas sustancias son distribuidas por toda la planta. Sin embargo, la mera presencia de las hormonas en los sistemas conductores no implica una relación directa con una determinada acción fisiológica. De hecho, todas las hormonas vegetales pueden ejercer efectos en el lugar donde fueron sintetizadas, por lo que el transporte no es un componente esencial del concepto de hormona vegetal. Pese a ello, el transporte también puede intervenir, directa o indirectamente, en la acción hormonal. Así, el transporte polar de las auxinas (véase Capítulo 19) se requiere para la diferenciación del xilema o para la iniciación de las raíces laterales. La síntesis de ácido abscísico (ABA) en los ápices radicales, en respuesta a un déficit hídrico, y su transporte por el xilema hasta las hojas, donde causa el cierre de los estomas (Capítulo 22) también son ejemplos ilustrativos de comunicación química a larga distancia entre órganos de la planta.

5.2.3. *El concepto de células diana en plantas es impreciso*

En las plantas resulta difícil definir órganos, tejidos o células que actúen específicamente como diana para las hormonas. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que no existen razones teóricas para asumir que una hormona deba actuar exclusivamente sobre un único tipo de célula diana. En sentido amplio, la capa de aleurona de los cereales puede considerarse un tejido diana para las gi-

berelinas (véanse Capítulos 20 y 27). Asimismo, la zona de abscisión del peciolo funciona como diana para etileno y auxinas (véanse Capítulos 22 y 28).

5.2.4. *El control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y sensibilidad de los tejidos a las hormonas*

El concepto clásico de hormona asume, como premisa fundamental, que el **control hormonal** del desarrollo está dictado por los cambios en la **concentración de la hormona** en las células diana. Este criterio no es, sin embargo, suficiente para definir las hormonas vegetales, ya que la respuesta también está modulada por cambios en la **sensibilidad** de las células a las hormonas.

Las variaciones en sensibilidad se hacen evidentes cuando observamos que la respuesta de un tejido a una concentración dada de hormona ha cambiado. La sensibilidad puede, no obstante, definirse con mayor precisión si se relaciona con los sistemas de percepción y transducción de la señal hormonal (véase apartado 5.4). De ese modo, la mayor o menor sensibilidad se correlaciona con el número de receptores, la afinidad de los receptores o los cambios en la cadena de eventos subsecuentes que conducen a un efecto bioquímico o fisiológico (capacidad de respuesta).

La inclusión de la sensibilidad en el concepto de hormona vegetal se debe, fundamentalmente, a los trabajos del fisiólogo británico Anthony J. Trewavas. La frecuente falta de correlación entre las concentraciones hormonales medidas en el tejido y la respuesta del tejido, fue el argumento principal utilizado por Trewavas para proponer, al inicio de la década de los ochenta, que: 1) las hormonas vegetales no son factores limitantes del desarrollo y, por lo tanto, no pueden considerarse hormonas, y 2) el control del desarrollo se realiza, exclusivamente, a través de cambios en la sensibilidad de los tejidos a las hormonas.

Como consecuencia lógica de las propuestas de Trewavas, algunos investigadores defendieron incluso, mediada la década de los años ochenta, abandonar el término hormona y sustituirlo por el de sustancia reguladora del crecimiento vegetal o regulador del crecimiento vegetal. Sin embargo, esta terminología, aunque comúnmente empleada, resulta confusa, ya que también se utiliza para nombrar productos sintéticos con acción hormonal; además, sólo hace referencia a una de las posibles funciones de las hormonas.

Las investigaciones realizadas en los últimos años demuestran claramente que la sensibilidad de las células a las hormonas desempeña un importante papel en el control del desarrollo. La sensibilidad varía con el genotipo, el tejido, la edad y fase del desarrollo de la planta, las condiciones ambientales y la presencia (o ausencia) de otras hormonas. Muy posiblemente, la prueba definitiva de la importancia de la sensibilidad en el control hor-

monal del desarrollo sea la existencia de mutantes insensibles a la mayoría de las hormonas conocidas.

Pese a lo expuesto, resulta difícil construir un modelo de control del desarrollo basado exclusivamente en la sensibilidad de las células a las hormonas. De hecho, la imposibilidad de demostrar correlaciones positivas entre los cambios en el desarrollo y los cambios en los niveles de hormonas se debe, en gran medida, a errores de tipo metodológico. Muchos de los estudios de correlación entre concentración hormonal y respuesta se basan en medidas de la cantidad total de hormona extraída del órgano o tejido estudiado. Dado que estas estructuras están formadas por grupos celulares heterogéneos, con importantes diferencias cualitativas y cuantitativas en sus contenidos hormonales, el análisis de la totalidad del tejido u órgano nunca dará una correlación estricta entre concentración hormonal y respuesta. Lo correcto es, obviamente, analizar la cantidad de hormona en el lugar donde actúa. Desgraciadamente, la información que se posee sobre la distribución de las hormonas a nivel subcelular e, incluso, intercelular es muy escasa. La utilización de plantas transgénicas, en las que es posible manipular los niveles hormonales, demuestra, no obstante, que las variaciones en la concentración de estas sustancias son decisivas para el control de diversos procesos fisiológicos.

Teniendo en cuenta todas las consideraciones anteriores, las hormonas vegetales (fitohormonas) se definen como un grupo de sustancias orgánicas, sintetizadas por las plantas, que tienen la capacidad de afectar a los procesos fisiológicos en concentraciones mucho más bajas que los nutrientes o las vitaminas ($< 1\text{mM}$, frecuentemente $< 1\ \mu\text{M}$). El control de la respuesta hormonal se lleva a cabo, por tanto, a través de cambios en la concentración y la sensibilidad de los tejidos a las hormonas. No obstante, en determinadas situaciones, uno de los factores puede dominar o excluir al otro. Los factores ambientales también afectan a los niveles hormonales y a la sensibilidad de las células a las hormonas, lo que se traduce en cambios en los programas de desarrollo de las plantas.

5.3. **El control hormonal del desarrollo de las plantas lo realizan, al menos, nueve grupos de hormonas diferentes**

El desarrollo de las plantas está afectado por un gran número de sustancias orgánicas. El reconocimiento como hormona de cualquiera de estas sustancias depende, en última instancia, de su aislamiento y de la determinación de sus propiedades biológicas y químicas. Hasta fechas recientes ha existido un acuerdo general en clasificar como hormonas vegetales a las auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico, que constituyen los cinco grupos hormonales clásicos. En los últimos años, sin embargo, se ha ido aislando una serie de sustancias que también pueden clasificarse

como hormonas basándose en sus efectos sobre el desarrollo o el fenotipo de mutantes con defectos en su síntesis o percepción. En este nuevo grupo de hormonas se incluyen: brasinosteroides, jasmonatos, poliaminas y salicilatos, como se detalla en el Capítulo 22.

Aunque no existe consenso generalizado, algunos autores también incluyen entre las hormonas vegetales la sistemina (oligopéptido de 18 aminoácidos) y las oligosacarinas (oligosacáridos derivados de la pared celular). Ambos compuestos participan en las respuestas de las plantas al ataque de insectos o de agentes patógenos. La sistemina, a diferencia de las oligosacarinas, se transporta a otras partes de la planta (de ahí su nombre).

En contraste con la mayoría de las hormonas animales, que pueden ejercer efectos fisiológicos muy específicos, las funciones reguladoras de las fitohormonas se solapan ampliamente. En las plantas, ninguna hormona tiene el control exclusivo de un determinado proceso fisiológico. De hecho, cualquier hormona vegetal ejerce efectos notables sobre la mayoría de las fases del desarrollo de la planta. El control hormonal del desarrollo debe, por lo tanto, contemplarse desde la perspectiva de una interacción, positiva o negativa, entre los diferentes grupos de hormonas. Esta compleja regulación hormonal es consecuencia de la plasticidad evolutiva de las plantas. Muy probablemente, muchos procesos del desarrollo evolucionaron de forma independiente en más de un grupo taxonómico, lo que conllevaría sistemas diferentes de control. Este modelo evolutivo puede explicar que en la senescencia foliar, por ejemplo, aparezcan implicadas como hormonas antisenescentes las citoquininas, las giberelinas o las auxinas. Igualmente explicaría el que una misma hormona ejerza efectos opuestos en tejidos distintos.

5.4. Las células están programadas para responder a las señales hormonales mediante un sistema de acoplamiento estímulo-respuesta

El mecanismo de acción de una hormona se define como la reacción primaria capaz de iniciar una serie de eventos moleculares que, en última instancia, conducen a un efecto fisiológico medible. Por lo tanto, la célula debe estar programada para responder a las señales hormonales (**primeros mensajeros**) mediante mecanismos específicos. De un modo general, el mecanismo de acción tiene lugar mediante un acoplamiento estímulo-respuesta, que puede dividirse en tres fases:

1. Percepción de la señal (primer mensajero) por la célula.
2. Generación y transmisión de la señal (transducción).
3. Activación de un cambio bioquímico (respuesta).

El conjunto de los tres procesos constituye la denominada **cadena de percepción y transducción de la señal**, que requiere el reconocimiento del primer mensajero por un **receptor** y la utilización subsecuente de una serie de moléculas (**segundos mensajeros o proteínas efectoras**), capaces de transmitir la señal que activará la respuesta. Esta cadena es la vía que utilizan las plantas para responder a todos los estímulos, tanto externos (luz, temperatura, fuerzas mecánicas, agua, etc.) como internos (hormonas, péptidos, oligosacarinas, fuerzas mecánicas generadas por la pared, etc.), que modulan su desarrollo.

Las propiedades fundamentales de la cadena de transducción son: rapidez, sensibilidad y especificidad. Todas esas propiedades están, a su vez, controladas por la interacción de una red de elementos que actúan de forma positiva o negativa. Por tanto, los sistemas de transducción de señales no deben ser contempladas como meras cadenas lineales de causa y efecto.

A continuación, se resumen los principios básicos que regulan la percepción y transducción de las señales hormonales.

5.4.1. La señal hormonal se percibe por proteínas de membrana o solubles

Por analogía con las células animales se asume que las células vegetales están equipadas con una serie de receptores, de naturaleza proteica, capaces de unirse, reversible y específicamente, con las hormonas. Sin embargo, y hasta muy recientemente, no se ha logrado la identificación de receptores específicos de hormonas vegetales. Ello ha sido posible gracias al aislamiento de plantas mutantes insensibles a las hormonas. El caso más paradigmático a este respecto es el del receptor del etileno (véase Capítulo 22). Con muy pocas excepciones, la búsqueda de posibles receptores aplicando la metodología clásica (identificación de sitios de unión utilizando hormonas marcadas y posterior aislamiento y purificación del hipotético receptor) no ha dado buenos resultados. En relación con la localización de los receptores, no hay dudas de que éstos pueden ser, tanto proteínas de membrana (plasmática o de compartimentos intracelulares), como solubles (del citoplasma o núcleo).

5.4.2 La transducción de la señal conlleva la activación de una cascada de proteínas quinasas o la síntesis o liberación de segundos mensajeros

Los receptores no sólo detectan la señal, sino que actúan como transductores de la misma. La formación del complejo hormona-receptor provoca un cambio conformacional en el receptor que causa su activación. En su estado activado, el receptor inicia la cadena de trans-

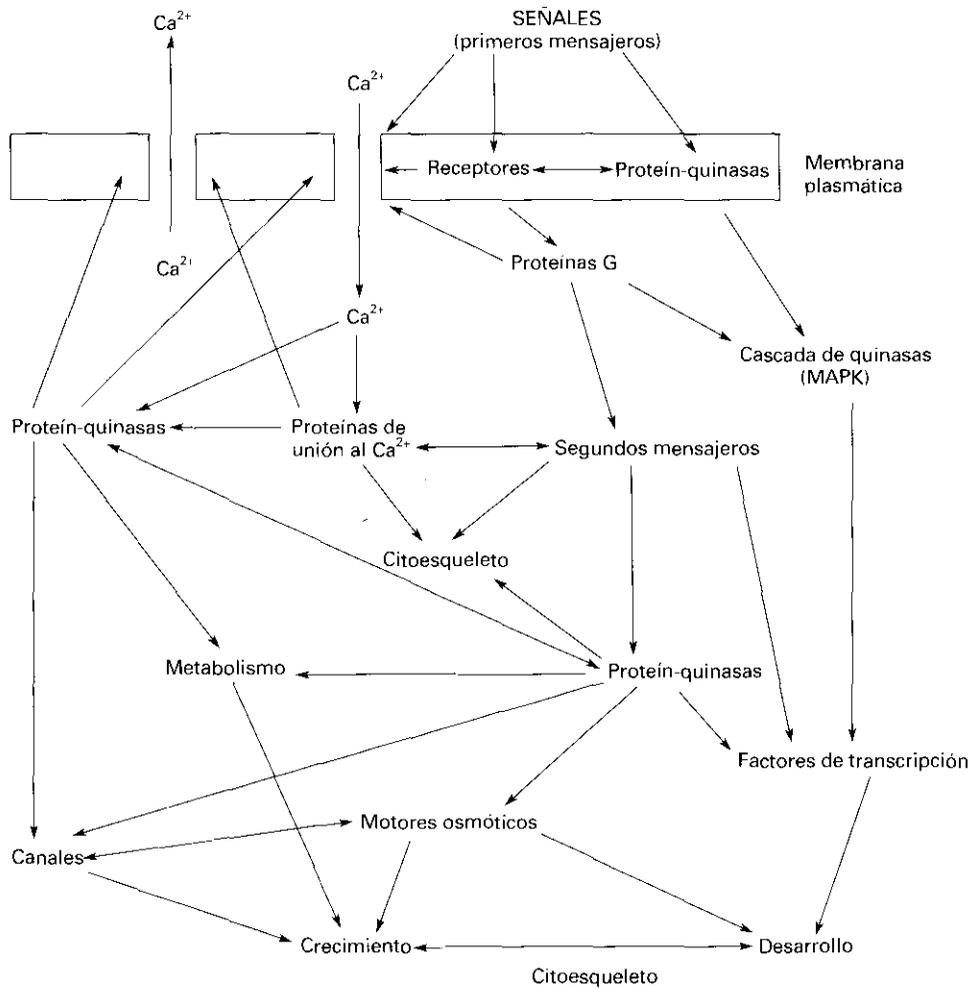


Figura 18-9. Modelo de percepción y transducción de señales en células vegetales. Las señales, incluyendo las hormonas pueden alterar los potenciales de membrana, activar los receptores o modificar proteín-quinasas. En el modelo no se muestran los receptores solubles ni la síntesis de segundos mensajeros (adaptado de Trewavas y Malhó, 1997).

ducción (Fig. 18-9). Las cadenas de transducción en plantas comparten una serie de mecanismos básicos comunes con las identificadas en animales. Sin embargo, la mayor plasticidad evolutiva de las plantas ha supuesto la existencia de nuevos componentes en la maquinaria de señalización. En algunos casos, las cadenas de transducción guardan más relación con las de procariontas que con las de los animales.

La cadena de transducción generada depende del tipo de receptor. Si el receptor es una proteín-quinasa, la unión del ligando induce la actividad quinasa del receptor y la cadena de transducción sucede a través de una cascada de proteín-quinasas que se fosforilan secuencialmente. Las proteín-quinasas fundamentales en esta cascada pertenecen a la familia de las MAP-quinasas (*mitogen-activated protein kinases* = proteín-quinasas activadas por agentes mitógenos, MAPK). Las MAPK son proteín-quinasas de serina/treonina cuya activación total requiere la fosforilación de los dos aminoácidos. La proteín-quinasa que cataliza esta doble fosforilación se denomina MAPKK (MAP-quinasa-quinasa). La ne-

cesidad de fosforilar los dos aminoácidos asegura que estas enzimas se mantengan inactivas a no ser que sean activadas por MAPKK. A su vez, las MAPKK son activadas por MAPKKK. En la Fig. 18-10 se resume el módulo básico de actuación de una cadena de MAPK.

Cuando los receptores no son proteín-quinasas, las rutas de transducción se inician con la activación de enzimas de la superfamilia de la GTPasa (proteínas G). Estas enzimas pueden localizarse en la membrana plasmática o el citoplasma y están formadas por varias sub-unidades, una de las cuales fija el GTP. Otra de las sub-unidades puede interactuar con el receptor, pero sólo cuando se ha formado el complejo hormona-receptor. De ese modo, las proteínas G activan una serie de fosfolipasas de membrana (A, C o D), ciclasas y canales iónicos que regulan la producción de segundos mensajeros. A su vez, algunos de estos segundos mensajeros pueden activar proteín-quinasas específicas (véase Fig. 18-9).

Hasta el momento, se han identificado los siguientes segundos mensajeros: ácido fosfatídico (producto de la

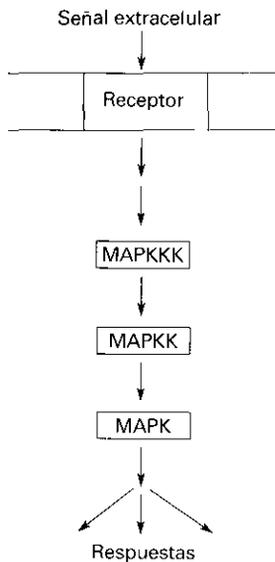


Figura 18-10. Representación esquemática de la cascada de MAP-quinasas (adaptado de Hirt, H., *Trends Plant Science*, 2: 11-15, 1997). La señal es percibida por un receptor de membrana. La activación del módulo MAP-quinasa (MAPKKK, MAPKK y MAPK) puede llevarse a cabo a través de pasos intermedios y por rutas diferentes. La MAPK activa puede: activar otras proteínas-quinasa, catalizar la fosforilación de componentes del citoesqueleto o ser transportada al núcleo, donde activa factores de transcripción que inducen la expresión de genes específicos.

actividad de la fosfolipasa D), lisofosfolípidos (productos de la actividad de la fosfolipasa A), inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), 1,2-diacilglicerol (DAG) (ambos producidos por la acción de la fosfolipasa C), guanosina monofosfato cíclica (cGMP), adenosina difosfato cíclico-ribosa (cADPR), Ca^{2+} , H^+ , agentes redox como ácido ascórbico o glutatión, peróxido de hidrógeno y radicales libres. Aunque la mayoría de los organismos utiliza también la adenosina monofosfato cíclica (cAMP) como segundo mensajero, las angiospermas parecen ser una excepción (las cantidades detectadas son mínimas, por lo que es difícil asignarle un papel en la transducción). La mayoría de los segundos mensajeros se libera al citoplasma, aunque los lisofosfolípidos y el DAG pueden permanecer en el plano de la membrana plasmática.

Todos los segundos mensajeros citados pueden, en teoría, participar en la transducción de cualquier señal, incluyendo las hormonales. Algunos (p. ej., ion calcio y lisofosfolípidos), pueden activar proteínas-quinasa, mientras que otros (IP_3) movilizan el calcio activando la apertura de canales. El IP_3 también se fija al citoesqueleto y altera su conformación y funciones.

La serie de reacciones activada por la cascada de proteínas-quinasa y segundos mensajeros induce, finalmente, la respuesta apropiada. Algunos de estos efectores llegan al núcleo donde activan proteínas reguladoras denominadas factores *trans* (factores de transcripción),

que se unen a las secuencias *cis* (sitios de reconocimiento en el promotor génico) para regular la actividad de la RNA polimerasa e inducir la expresión de genes específicos.

En el ámbito de la acción hormonal, se acostumbra a distinguir entre respuestas rápidas (que pueden no requerir cambios en la expresión génica) y respuestas lentas (que requieren tales cambios). De acuerdo con Trewavas, esta distinción es incorrecta ya que los dos tipos de respuestas son controlados por el mismo sistema de transducción. Las acciones rápidas (p. ej., cambios en flujos iónicos) y lentas (p. ej., cambios en transcripción) estarían estrechamente conectadas y la única diferencia radicaría en su separación temporal.

RESUMEN

El desarrollo se define como el conjunto de cambios graduales y progresivos en tamaño (crecimiento), estructura y función (diferenciación) que hace posible la transformación del cigoto en una planta adulta capaz de reproducirse. Todos los órganos de la planta derivan, en última instancia, de la actividad de distintos tipos de meristemos. El denominado cuerpo primario es producido por los meristemos apicales del tallo y de la raíz, que se forman durante la embriogénesis. Las plantas maduras también poseen otros meristemos que no están presentes en el embrión. Estos incluyen los meristemos reproductores, que originan flores, y el cambium que produce el engrosamiento secundario de los tallos y raíces de muchas plantas. Los meristemos realizan tres funciones básicas: automantenimiento como región formadora, comunicación de señales e iniciación de tejidos y órganos. El análisis de mutantes con defectos específicos en el desarrollo de los meristemos ha permitido el aislamiento de genes que regulan su función y organización. Algunos de estos genes mantienen las células iniciales y otros dirigen la diferenciación de las células derivadas. Las interacciones entre los dos grupos de genes son necesarias para mantener la organización de los meristemos. Las hormonas son señales químicas que facilitan la comunicación entre las células y coordinan sus actividades. El control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y sensibilidad de los tejidos a las hormonas. Las funciones de las hormonas vegetales se solapan ampliamente, por lo que la regulación hormonal del desarrollo de las plantas debe contemplarse desde la perspectiva de una interacción entre los distintos grupos de hormonas. Las células responden a las señales hormonales mediante un sistema de acoplamiento estímulo-respuesta que requiere el reconocimiento de la hormona por un receptor y la utilización subsecuente de una serie de moléculas capaces de transmitir la señal que activará la respuesta. El conjunto constituye la denominada cadena de transducción de la señal hormonal.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Profesora Isabel Arrillaga sus sugerencias y revisión crítica del manuscrito.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. ¿Por qué las angiospermas presentan alternancia de generaciones? ¿Qué representa el grano de polen?
2. Compare estructural y funcionalmente los meristemos apicales del tallo y la raíz.
3. ¿Desarrollan cuerpo secundario todas las plantas? ¿Qué meristemos dan origen al cuerpo secundario de las plantas?
4. Diferencie entre estructuras indeterminadas y determinadas.
5. Compare y contraste el papel de la embriogénesis en el desarrollo de las plantas y animales.
6. Comente los puntos básicos del control del ciclo celular en las plantas.
7. Defina el concepto de determinación en relación con la diferenciación celular. ¿Qué factores están implicados en su regulación?
8. ¿Cumplen las hormonas vegetales las premisas fundamentales del concepto clásico de hormona?
9. Enumere las etapas fundamentales de la cadena de percepción y transducción de la señal hormonal en plantas.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Clark S. E.: «Organ formation at the vegetative shoot meristem». *Plant Cell*, 9:1067-1076, 1997.
2. Davies P. J.: «The Plant Hormone Concept: Concentration, Sensitivity and Transport». En: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Davies, P. J. (ed.). Dordrecht, Kluwer Academic, 13-18, 1995.
3. Fosket D. E.: *Plant Growth and Development, a Molecular Approach*. San Diego, Academic Press, 1994.
4. Hülskamp M. et al.: «Cell morphogenesis in *Arabidopsis*». *BioEssays*, 20:20-29, 1998.
5. Jacobs T.: «Why do plant cells divide?» *Plant Cell*, 9: 1021-1029, 1997.
6. Kaplan, D. R., Cooke, T. J.: «Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants». *Plant Cell*, 9: 1903-1919, 1997.
7. Mauseth J. D.: «*Plant anatomy*», Menlo Park, California, The Benjamin/Cummings Company, 1988.
8. Scheres B.: «Embryo patterning genes and reinforcement cues determine cell fate in the *Arabidopsis thaliana* root». *Seminars in Cell Developmental Biology*, 7: 857-865, 1996.
9. Steeves T. A., Sussex, I. M.: *Patterns in plant development*. Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
10. Trewavas A. J., Malhó, R.: «Signal perception and transduction: the origin of the phenotype». *Plant Cell*, 9: 1181-1195, 1997.

AUXINAS

Manuel Acosta Echeverría, José Sánchez Bravo y Marino Bañón Arnao

1. Estructura. 2. Actividad. 3. Metabolismo. 4. Transporte. 5. Efectos fisiológicos. 6. Mecanismo de acción.
7. Aplicaciones comerciales.

1. ESTRUCTURA

1.1. Las características estructurales y fisiológicas de las plantas justifican la existencia de hormonas

Las plantas superiores pueden considerarse estructuras pluricelulares complejas caracterizadas por su inmovilidad y por su autotrofia para el carbono. Esto significa que poseen un entorno limitado para la captación de nutrientes que, por lo general, se encuentran en concentraciones muy bajas, tanto en la atmósfera como en la disolución del suelo.

Con el fin de soslayar este impedimento las plantas desarrollan una estructura dendrítica (ramas, hojas, raíces con pelos radicales) que favorece su contacto superficial con el medio. El soporte para tal estructura consiste en el relleno con agua de las vacuolas de las células, lo que reduce su compresibilidad para formar, así, un sistema hidráulico que mantiene el conjunto desplegado y erecto. Las células se dotan, además, de unas paredes celulares construidas con materiales relativamente económicos, procedentes de la asimilación autótrófica del carbono (celulosa, hemicelulosas y pectinas), que aportan rigidez al sistema. La adición de lignina completa el refuerzo necesario.

Sin embargo, la eficacia mostrada por esta estructura para la captación de luz, agua y nutrientes se ve contrarrestada por el aislamiento que impone a las células individuales. Estas, rodeadas por materiales aislantes, no pueden transmitir impulsos eléctricos a través de sus membranas. Por eso, la transmisión de información es mucho más difusa que en las células animales.

Por tanto, el control del medio interno (**homeostasis**) en las plantas se lleva a cabo mediante sustancias químicas que portan la información en sus estructuras mo-

leculares. El hecho de que la transmisión de estas señales se tenga que realizar mediante difusión pasiva o facilitada por algún sistema de transporte masivo (xilema o floema) implica una lentitud en los procesos de correlación. Por ello, los cambios morfogénéticos y de comportamiento se confunden a veces en las plantas y las correlaciones espaciales pueden llegar a ser más importantes que las temporales. Así es como destacan en las plantas fenómenos como: polaridad, simetría, tropismos, etc.

1.2. Las observaciones sobre los tropismos contribuyeron al descubrimiento de las hormonas vegetales

Consideraciones similares a las del epígrafe anterior llevaron a Julius von Sachs, a finales del siglo XIX, en Alemania, a postular la existencia de sustancias morfogénéticas, que se moverían de forma polarizada a través de la planta y que determinarían la forma definitiva de cada órgano (raíz, tallo). Por las mismas fechas, Charles Darwin, en Inglaterra, se interesaba en la capacidad de movimiento que poseen las plantas, a pesar de las restricciones descritas antes. Sus observaciones se extendieron a plantas trepadoras y carnívoras aunque fueron determinantes, sobre todo, sus estudios sobre el fototropismo en coleóptilos de gramíneas. El coleóptilo es una estructura de protección que envuelve la primera hoja de las gramíneas, para evitarle el daño mecánico cuando tiene lugar la germinación de la semilla. Esta primera hoja precisa protección porque deberá abrirse camino a través del suelo para desarrollarse e iniciar la fotosíntesis (Fig. 19-1). En ausencia de luz, el coleóptilo (etiolo) crece considerablemente y si es estimulado con iluminación unilateral (asimétrica), se curva hacia el lu-

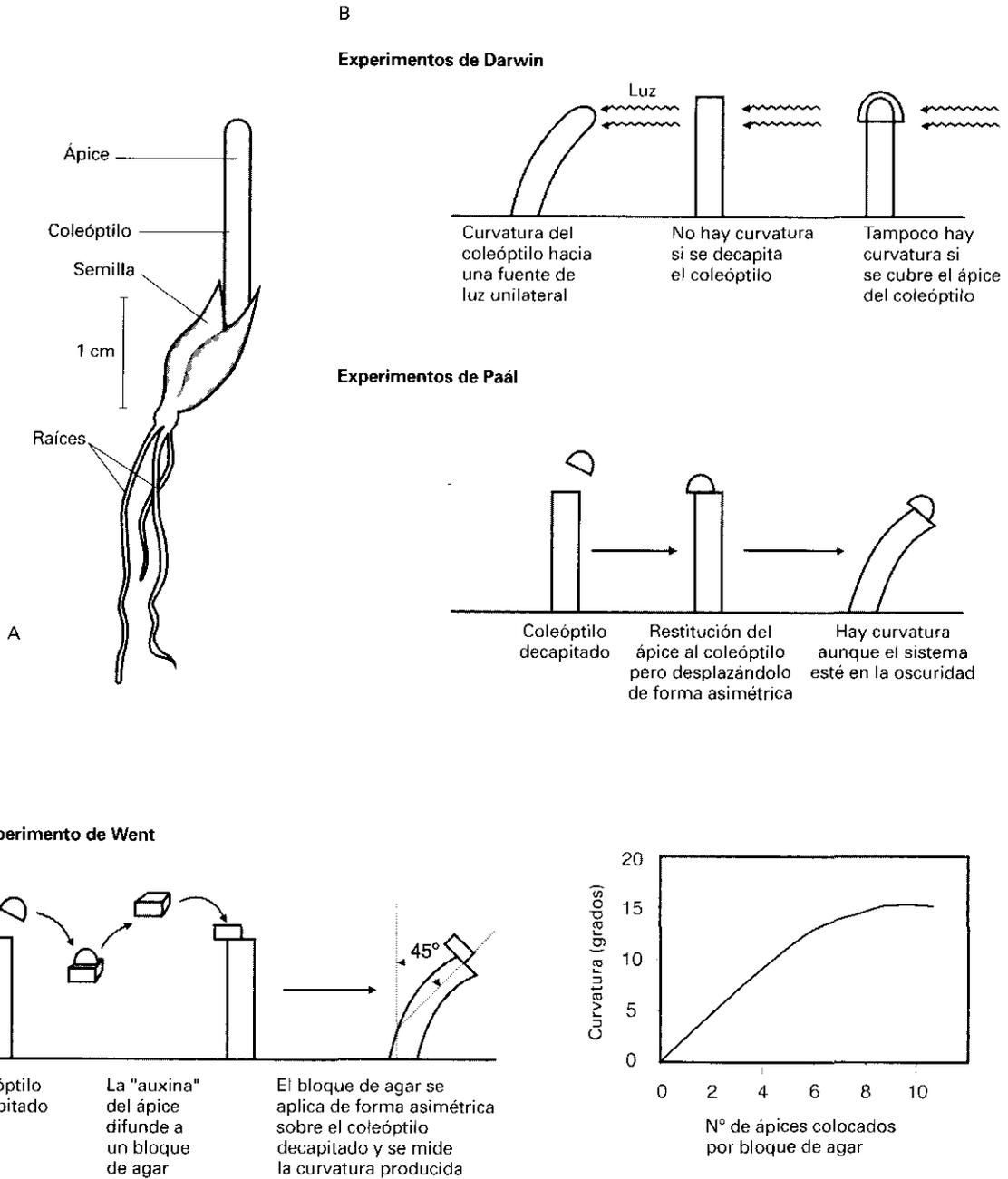


Figura 19-1. A) Emergencia del coleóptilo durante la germinación de gramíneas. B) Algunos de los experimentos con coleóptilos que permitieron el descubrimiento y la cuantificación de las auxinas. El experimento de Went es un bioensayo que permite relacionar la cantidad de estímulo (número de ápices que se colocan sobre un mismo bloque de agar para que difunda desde ellos la hormona) con la magnitud de la respuesta (curvatura producida por el crecimiento asimétrico de las células del coleóptilo: las que reciben el estímulo crecen más que las del lado opuesto, que no lo reciben).

gar de donde procede el estímulo en una típica respuesta fototrópica (véase Capítulo 24). La observación de este fenómeno llevó a Darwin a concluir que la plántula percibía el estímulo luminoso en el ápice del coleóptilo, pero algo se transmitía desde allí hasta las zonas más inferiores, desde donde se regía la curvatura (Fig. 19-1).

Posteriormente, A. Paál consiguió provocar la curvatura en un coleóptilo decapitado tras restituir el ápice,

pero desplazado de forma asimétrica respecto a su posición inicial. Esto sucedía en ausencia de estímulo fototrópico, manteniendo el sistema en la oscuridad. La sustancia estimuladora difundía hacia abajo sólo por un lado del coleóptilo, en una distribución asimétrica, de tal forma que las células del lado que recibía el estímulo crecían más que las del opuesto, originándose así la curvatura en el coleóptilo.

1.3. La hormona (estímulo) se puede cuantificar mediante un bioensayo (respuesta fisiológica)

Todas esas observaciones previas llevaron a F. W. Went a elaborar en 1928 el primer **bioensayo** que permitía establecer una relación entre la cantidad de estímulo aplicado y la respuesta fisiológica observada. Utilizó *Avena sativa* como material vegetal y, por ello, se conoce a este bioensayo como el «test de curvatura del coleóptilo de avena». La peculiaridad del método de Went consistía en recoger la sustancia que difundía desde los ápices de los coleóptilos sobre bloques de agar. Los bloques cargados se colocaban de forma asimétrica sobre los coleóptilos decapitados y los ensayos se hacían en la oscuridad. Al cabo del tiempo, se medía la curvatura que presentaban los coleóptilos y se relacionaba con la cantidad de sustancia recogida en el bloque de agar. Posteriormente se han descrito otros bioensayos, siendo también muy conocido el «test de crecimiento recto (elongación) del coleóptilo de avena».

1.4. La primera hormona descubierta resultó ser el ácido indolil-3-acético y se denominó «auxina»

Una vez conocida la existencia de una sustancia estimuladora, se iniciaron los trabajos para aislar e identificar químicamente el compuesto. La escasa cantidad que podía obtenerse a partir de los ápices de coleóptilo, dejando que difundiese sobre bloques de agar, no permitía su análisis dada la escasa sensibilidad de las técnicas analíticas de la época. Por tanto, se buscaron materiales alternativos para obtener una cantidad importante de sustancia como la obtenida en el bioensayo de Went. Tras varios intentos, entre 1934 y 1935, dos grupos (Kögl, Haagen-Smit y Erxleben, partiendo de orina humana, y K. V. Thimann, usando extractos de cultivos del hongo *Rhizopus suinus*) consiguieron obtener una sustancia a la que se denominó «auxina» (del griego: hacer crecer, incrementar) y cuya estructura química resultó ser la del ácido indolil-3-acético, comúnmente llamado ácido indolacético o AIA (Fig. 19-2).

La presencia de AIA endógeno en las plantas se comprobó después, en 1946, al analizar el endospermo inmaduro de semillas de maíz. Desde entonces se ha detectado y cuantificado en otros muchos materiales vegetales.

El conocimiento de una estructura química capaz de alterar el crecimiento de las plantas (**plant growth regulator**) introduce nuevos enfoques agronómicos a final de los años cuarenta y durante los cincuenta. Así surge el concepto de «modificación química de las

plantas» y se inicia la carrera para buscar nuevas estructuras. También se acuñan nuevos vocablos para designar estas sustancias que, a bajas concentraciones (< 1 mM), afectaban al desarrollo de las plantas, modificando algunos de sus procesos fisiológicos. Así, una **fitohormona** sería un producto de origen natural, endógeno en las plantas, mientras que un **fitorregulador** podría ser tanto una sustancia natural como una sintética, aunque ambas desempeñarían funciones similares. Alguno de estos fitorreguladores, a concentraciones altas, podría tener un carácter letal para la planta y entonces pasaría a la categoría de **herbicida**.

1.4.1. ¿Cuáles son las características químicas comunes a cualquier auxina?

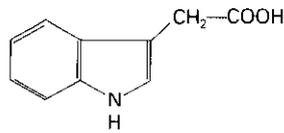
El interés por diseñar nuevas moléculas activas llevó a plantearse cuáles eran los requerimientos mínimos necesarios para ser una auxina. Además, los bioensayos sugerían la existencia de sistemas saturables (receptores) y capaces de ser incluso inhibidos por concentraciones altas de hormona. Esto último hacía pensar en un sitio de unión de la auxina al receptor que tuviese dos o tres puntos de contacto, lo que provocaría inhibiciones en la acción al unirse varias moléculas de auxina, cada una a distinto punto de contacto del receptor, impidiendo así una unión eficaz y, por tanto, la acción fisiológica adecuada.

Actualmente, se acepta que una auxina debe poseer una estructura con una carga negativa en el carboxilo, separada por una distancia de 0.55 nm (5.5 Å) de otra carga residual positiva (Fig. 19-3). Esta última puede estar localizada sobre un anillo indólico o aromático, como en el AIA o el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), respectivamente. Se ha podido comprobar que el anillo no es estrictamente necesario, ya que el N,N-dimetilcarboximetiltiocarbamato, carente de anillo pero con la distancia adecuada entre las cargas, posee carácter auxínico (Fig. 19-3).

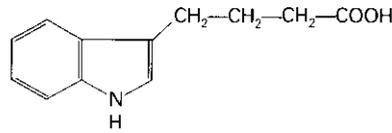
El compuesto natural que se acepta como auxina es el AIA, distribuido ampliamente por todo el reino vegetal. Junto a él, también se aceptan como auxinas naturales el ácido fenilacético (detectado en tallos de tomate y girasol), algunos cloro-indoles (en guisante) y, recientemente, el ácido indolbutírico.

En cuanto a las **auxinas sintéticas**, las hay de naturaleza química muy diversa: ácidos indólicos, ácidos naltalénicos, clorofenoxiácidos y derivados de los ácidos benzoico y picolínico. Tienen, además, interés las llamadas antiauxinas (como el ácido p-clorofenoxi-isobutírico) que, por su analogía estructural y carencia de efecto fisiológico, pueden inhibir la acción de las auxinas (véase Fig. 19-2).

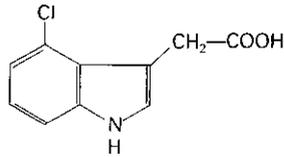
Auxinas naturales



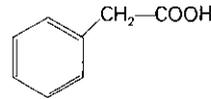
Ácido indolacético (AIA)



Ácido indolbutírico (IBA)

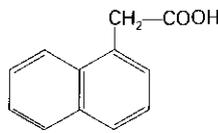


Ácido 4-cloro-indolacético

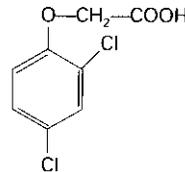


Ácido fenilacético

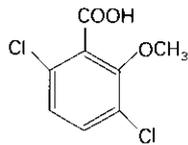
Auxinas sintéticas



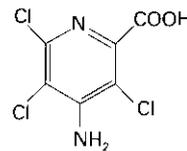
Ácido α -naftalenacético (NAA)



Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

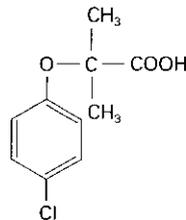


Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico



Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro picolínico

Antiauxina



Ácido α -(p-clorofenoxi)-isobutírico

Figura 19-2. Estructuras químicas correspondientes a algunas auxinas naturales y sintéticas típicas. La antiauxina tiene analogía estructural con las auxinas, pero contrarresta su acción fisiológica.

2. ACTIVIDAD

2.1. Las respuestas que se producen tras la aplicación de auxinas a las plantas dependen de la concentración de hormona así como del tipo de órgano tratado

En la Fig. 19-4 se aprecia que el crecimiento del tallo aumenta con la concentración de auxina hasta alcanzar una respuesta máxima para una concentración próxima a 10^{-5} M. Concentraciones supraóptimas reducen el crecimiento hasta inhibirlo, llegando a producir, incluso, la

muerte de la planta. Resultados similares se observan cuando se estudia el crecimiento de yemas y raíces en los que la máxima respuesta se consigue a concentraciones 10^{-8} y 10^{-10} M, respectivamente.

2.1.1. La regulación de la concentración de AIA es importante

La primera conclusión que se deduce de estos datos es que, para un determinado órgano, la intensidad de la respuesta a la auxina depende de la concentración, lo cual pone de manifiesto la importancia que tiene para la

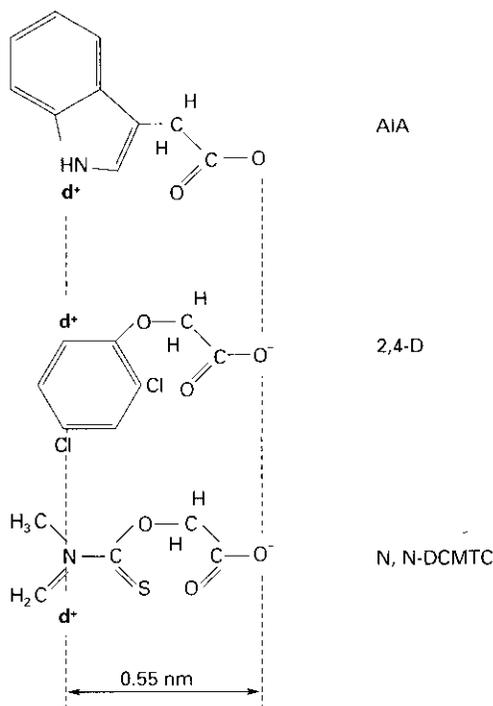


Figura 19-3. Requerimientos estructurales para ser auxina. El ácido indolacético (AIA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el N,N-dimetilcarboximetiltiocarbamato (N,N-DCMTC) poseen la misma distancia (0,55 nm) entre dos extremos con cargas residuales opuestas.

planta la existencia de mecanismos que regulen de forma eficaz la **concentración de hormona**, a fin de mantener en cada momento y lugar la concentración óptima. El esquema de la Fig. 19-5 muestra los diferentes procesos que pueden modificar la concentración de AIA en un determinado tejido u órgano. La velocidad de biosíntesis, conjugación, hidrólisis de conjugados y oxidación (descarboxilativa y no descarboxilativa), así como la intensidad del transporte de llegada (importación) y de salida (exportación) son factores decisivos en la regulación de la concentración local de auxina. A su vez, hay que tener en cuenta todos los factores que influyen en cada uno de estos procesos y que serán comentados en los apartados siguientes (concentración de precursores de biosíntesis, activadores e inhibidores de las distintas enzimas, inhibidores naturales del transporte polar, etc.). A la hora de considerar la efectividad de la concentración auxínica, hay que tener en cuenta también su posible **compartimentación**. Teniendo en cuenta el pH de los diferentes compartimentos celulares (véase apartado 4.4), el citoplasma podría ser la localización preferente del AIA donde se encontraría en forma de anión. La entrada a las vacuolas, vesículas del retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, así como a orgánulos como los cloroplastos, podría realizarse mediante proteínas transportadoras que posibilitaran el paso a través de las membranas. En este sentido, se sabe

de la existencia de transferasas (algunas dependientes de glutatión) que contribuyen a almacenar en vacuolas los conjugados de xenobióticos (sustancias extrañas a la célula). No se descarta que éste pueda ser el destino de algunos conjugados de AIA.

2.1.2. La sensibilidad frente a las auxinas también es importante

La segunda conclusión que se deduce de la Fig. 19-4 es que cada órgano presenta una **sensibilidad** diferente frente a la auxina. Si consideramos la concentración de hormona que produce la máxima respuesta, debemos concluir que las raíces son más sensibles que las yemas, y éstas más sensibles que los tallos. Así, el tratamiento con una disolución 10^{-8} M de auxina produciría un crecimiento máximo en las yemas y una ligera estimulación en los tallos, mientras que el crecimiento de las raíces estaría fuertemente inhibido. La sensibilidad de un tejido u órgano puede variar con la edad y las condiciones ambientales. Los factores de los que depende la sensibilidad son muy diversos, pero los que probablemente desempeñen un papel mayor son la concentración de receptores hormonales, la efectividad de la unión receptor-hormona y la cadena de acontecimientos que se sucede con posterioridad a dicha unión, de la que depende la respuesta final. Aunque para algunos autores la respuesta hormonal estaría condicionada únicamente por la sensibilidad, la opinión más extendida es que tanto la variación de la concentración de hormona como la sensibilidad frente a ella son importantes en la acción hormonal.

2.1.3. La medida de la concentración hormonal endógena requiere técnicas complejas: físicoquímicas e inmunológicas

Aunque los bioensayos pueden establecer una relación cuantitativa entre la concentración exógena de hormona aplicada y la magnitud de la respuesta fisiológica, los valores de concentración endógena de hormona, en general, son del orden de nanogramos de sustancia activa por gramo de peso fresco. La estimación de estos valores, por tanto, requiere técnicas analíticas de sensibilidad y especificidad muy elevadas.

En el caso de las auxinas, los extractos, después de varios fraccionamientos con distintos disolventes, se analizan por **cromatografía líquida de alta resolución** (HPLC), usando detectores fluorimétricos o electroquímicos. Al principio se incorpora al extracto una pequeña cantidad de AIA marcado radiactivamente para conocer y corregir las pérdidas en cada etapa. No obstante, se consideran más fiables los ensayos de dilución isotópica que utilizan como patrón interno AIA marcado con ^{13}C (isótopo no radiactivo). La separación

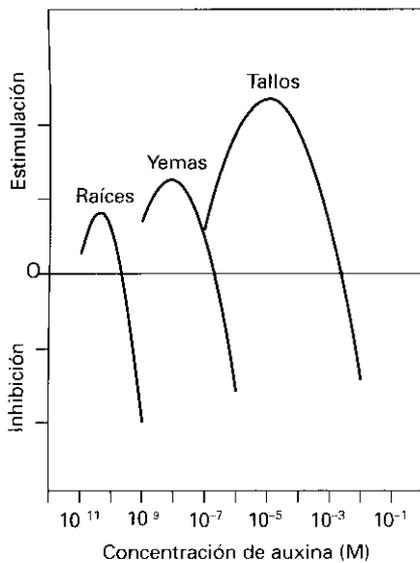


Figura 19-4. Influencia de la concentración de auxina sobre la respuesta de crecimiento (estimulación o inhibición) de raíces, yemas y tallos.

y cuantificación se realizan mediante **cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas**.

Cuando los extractos están muy purificados también se puede utilizar un inmunoensayo para cuantificar el AIA. Se dispone comercialmente de diversos anticuerpos monoclonales que reconocen el AIA unido a una proteína que actúa como antígeno.

Conviene no olvidar que los valores de concentración obtenidos variarán mucho si consideramos que el AIA puede estar en compartimentos subcelulares con volumen diferente, como el citoplasma, la vacuola, el espacio apoplástico o el cloroplasto.

3. METABOLISMO

3.1. Existen varias rutas para la biosíntesis de AIA

Durante muchos años se ha considerado que el precursor en la síntesis de AIA es el aminoácido triptófano. Hoy se acepta que el AIA puede sintetizarse también a partir de un precursor de triptófano. Algunos estudios indican que, incluso en una misma planta y dependiendo de la edad, la síntesis de AIA puede ser dependiente o independiente de triptófano.

3.1.1. El aminoácido triptófano se considera como el principal precursor del AIA

La conversión de triptófano en AIA puede producirse por diferentes rutas (Fig. 19-6). En la mayoría de las especies vegetales, la ruta más frecuente es la del ácido indolpirúvico. Algunas especies presentan además la ruta de la triptamina, mientras que la ruta de la indolacetaldoxima es característica de la familia *Brassicaceae*. La funcionalidad de las distintas rutas se confirma por la presencia de los intermediarios como compuestos endógenos, la actividad biológica de los intermediarios (es decir, su capacidad para producir respuestas típicas de auxinas cuando se aplican a las plantas), la formación de AIA cuando se adicionan los intermediarios a las plantas y la detección en extractos vegetales de las actividades enzimáticas implicadas en las diferentes reacciones de cada ruta.

a) *Ruta del ácido indolpirúvico.* La transaminación de triptófano produce ácido indolpirúvico que se des-

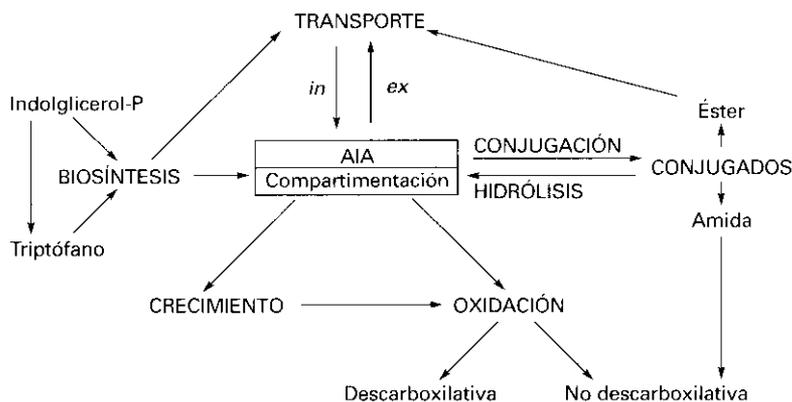


Figura 19-5. Regulación de la concentración de AIA. Los procesos que favorecen la acumulación de AIA en un tejido u órgano son: la biosíntesis *in situ*, el transporte de llegada (importación, *in*) y la hidrólisis de conjugados. Los que favorecen la disminución de la concentración de hormona libre son: la conjugación, la oxidación y el transporte de salida (exportación, *ex*). Tras la actuación de la auxina en el crecimiento, se produce su destrucción. La concentración efectiva de hormona también depende de su adecuada compartimentación en la célula.

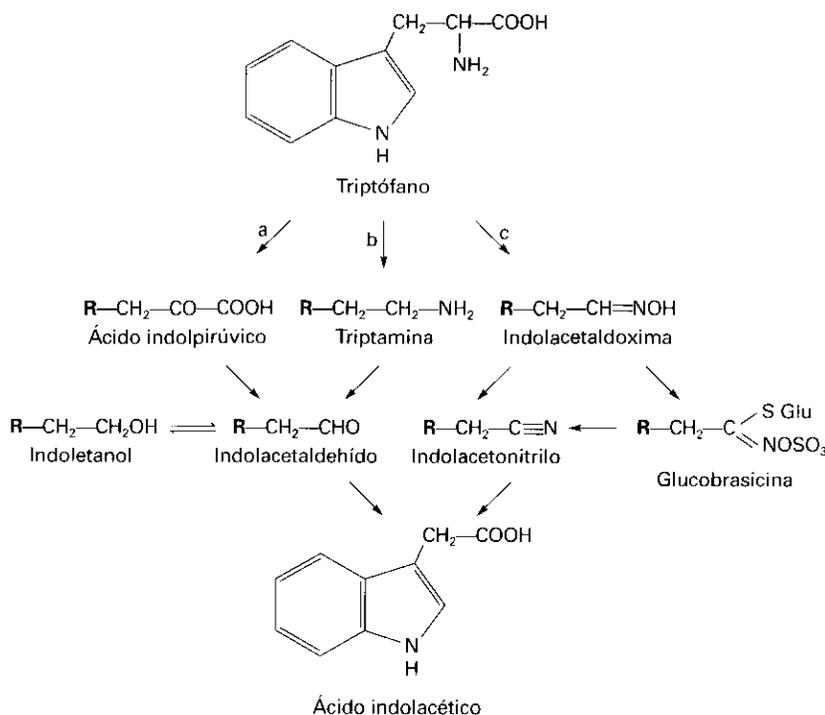


Figura 19-6. Biosíntesis del AIA a partir de triptófano. a) Ruta del ácido indolpirúvico; b) ruta de la triptamina; c) ruta de la indolacetaldoxima. (R = anillo indólico).

carboxila para dar indolacetaldehído; la oxidación del aldehído a ácido produce AIA. Alternativamente, algunas plantas pueden reducir el indolacetaldehído a indoleetanol, lo que puede incidir en la regulación de la biosíntesis de AIA.

b) Ruta de la triptamina. La descarboxilación del triptófano produce triptamina que, tras una desaminación oxidativa, se transforma en indolacetaldehído. Este compuesto es, por tanto, un intermediario común con la ruta anterior.

c) Ruta de la indolacetaldoxima. La descarboxilación oxidativa del triptófano produce indolacetaldoxima que, por pérdida de agua, genera indolacetonitrilo. Esta transformación también puede producirse a través de la formación de glucobrasicina, un metabolito característico de las brassicáceas. La hidrólisis de indolacetonitrilo produce AIA.

Algunas de las enzimas que catalizan las distintas reacciones de cada ruta son poco específicas y sólo han podido aislarse en algunas especies. Aunque la triptófano-oxidasa, que actúa en la ruta de la triptamina, es muy específica de la forma L-triptófano, estudios recientes indican que el AIA deriva de la forma D-triptófano. Este hecho, que debe ser investigado en profundidad, abre nuevas posibilidades a la regulación de la biosíntesis de AIA basadas en la variación racémica del L-triptófano, que es el isómero más abundante.

La síntesis del ácido fenilacético (otra auxina natural menos frecuente) se produce a partir de la fenilalanina siguiendo dos rutas similares a las descritas en la síntesis de AIA dependiente de triptófano: la ruta del ácido fenilpirúvico y la de la feniletilamina (análogas a las del ácido indolpirúvico y la triptamina).

3.1.2. Pueden existir otras rutas alternativas independientes del triptófano

Existen evidencias experimentales de que la síntesis de AIA puede ser independiente de triptófano. Así, después de aplicar agua deuterada (2H_2O) a ciertos tejidos, el AIA marcado con deuterio (2H -AIA) se sintetiza antes que el 2H -triptófano. El precursor de esta ruta parece ser el indolglicerolfosfato, que a su vez es precursor del triptófano (fig. 19-7). La existencia de mutantes que bloquean la síntesis de triptófano y son deficientes en AIA apoya la idea de una ruta independiente de triptófano. Uno de los intermediarios de esta ruta sería el indolacetonitrilo, que también es intermediario en la ruta del triptófano.

Además de la síntesis de AIA a partir de triptófano o de indolglicerolfosfato, existe otra vía que puede generar AIA. En determinadas etapas del desarrollo, como la germinación de semillas, el AIA necesario para el crecimiento de la planta joven puede producirse, como

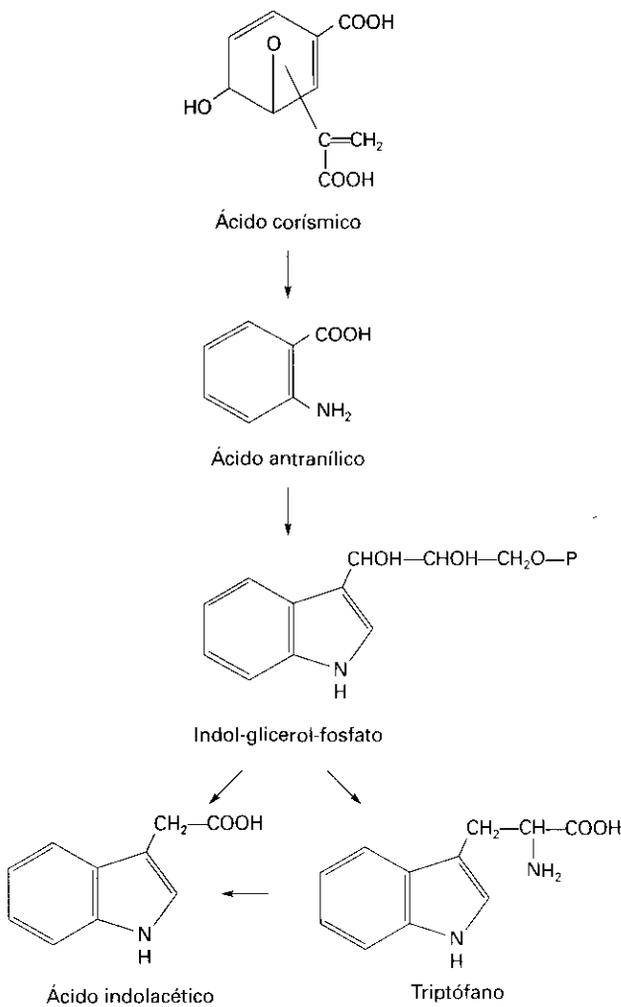


Figura 19-7. Biosíntesis de AIA independiente de triptófano. El AIA puede sintetizarse en una ramificación de la ruta del ácido siquímico, ruta general de síntesis de anillos aromáticos, a partir de un precursor del triptófano, el indol-glicerol-fosfato.

se describe en el siguiente apartado, a partir de la hidrólisis de auxinas ligadas y almacenadas en la semilla.

3.1.3. ¿Dónde se produce la biosíntesis de AIA en la planta?

La presencia de una alta concentración de AIA en un determinado tejido u órgano podría deberse a un balance favorable del transporte (AIA importado > AIA exportado) y no necesariamente a su capacidad de biosíntesis. Además, deben tenerse en cuenta otros aspectos, como la capacidad del tejido para transformar en AIA los intermediarios de las diferentes rutas, para lo que se requiere la presencia en el tejido de dichos precursores e intermediarios, así como de las enzimas biosintéticas correspondientes. La información disponible en este sentido indica que los ápices de coleóptilos, los tallos y hojas jóvenes, el cambium y las semillas en desarrollo

son, en general, los lugares más importantes de biosíntesis. No obstante, se ha demostrado que otros órganos, como las hojas adultas, también pueden sintetizar AIA. Aunque las raíces contienen AIA, se ha cuestionado su capacidad para sintetizarlo, y se considera que la mayor parte procede del tallo.

3.2. La conjugación del AIA permite conservar la estructura de la hormona, pero la priva de actividad biológica

Los términos «auxina ligada» o «conjugada» se utilizan para designar los compuestos formados por la unión covalente del AIA con otras moléculas. Es muy frecuente la conjugación con aminoácidos y glucosa, aunque también se han detectado auxinas ligadas de elevado peso molecular en las que el AIA está unido a oligosacáridos, péptidos e, incluso, proteínas. La unión del AIA con los aminoácidos se produce mediante enlaces amida, que forman compuestos como el ácido indolacetilaspártico (AIAasp), mientras que la unión con azúcares se produce mediante enlaces éster, para dar compuestos como el indolacetilglucósido (AIAGlu) (Fig. 19-8). Este compuesto puede transformarse en AIAinositol (AIAinos). En algunos tejidos, la mayor parte del AIA se encuentra en forma de conjugados. Los conjugados amida son característicos de las leguminosas, mientras que los ésteres abundan en cereales. Al suministrar AIA a tejidos vegetales de muchas especies se forma AIAasp, aunque también se han descrito conjugados con otros aminoácidos como alanina, glicina y ácido glutámico. AIAGlu y AIAinos son los conjugados éster más frecuentemente encontrados tras la aplicación de AIA. El sistema enzimático responsable de la síntesis de AIAasp no está caracterizado, pero parece inducible por AIA. Recientemente se ha clonado el gen *iaglu* que codifica la enzima que esterifica AIA con glucosa.

3.2.1. Las auxinas conjugadas pueden desempeñar funciones de almacenamiento, de protección, de transporte y de desintoxicación

La función de almacenamiento o reserva de AIA estriba en la posibilidad de que las auxinas conjugadas puedan ser hidrolizadas en ciertas situaciones para dar AIA libre, lo que implica que algunos procesos de conjugación sean reversibles. En relación con esta suposición es de destacar el hecho de que ya se han clonado genes que codifican enzimas capaces de hidrolizar AIAGlu y AIAalanina. También se ha comprobado que el AIAasp se hidroliza durante las etapas de desarrollo en que aumenta la demanda de AIA, mientras que se acumula cuando la demanda es baja. Por otra parte, las auxinas

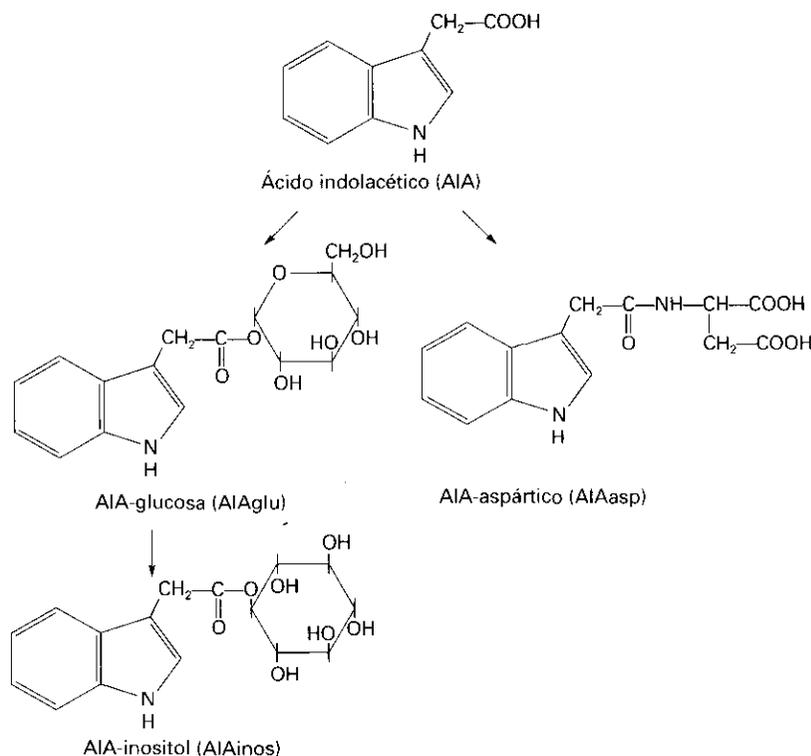


Figura 19-8. Conjugación del AIA. El AIA puede formar conjugados mediante enlace éster con glucosa o inositol, o enlace amida con aminoácidos como el aspártico.

ligadas protegen el AIA de la oxidación por peroxidasa. Durante la germinación de semillas de maíz, las auxinas ligadas como AIAinos se transportan desde el endospermo hasta el tallo, donde se hidrolizan para liberar el AIA necesario para el crecimiento. Finalmente, la conjugación puede actuar como mecanismo de desintoxicación para eliminar el exceso de auxina, ya que en algunos tejidos el proceso es irreversible y puede incluir la compartimentación en vacuolas u otro espacio intra o extracelular. Además, el AIAasp puede ser oxidado de forma no descarboxilativa (véase apartado 3.3.2), lo que contribuye al catabolismo auxínico.

3.3. La oxidación del AIA es un proceso catabólico irreversible que implica la pérdida de la actividad biológica de la hormona

La oxidación puede ser descarboxilativa, si se produce la pérdida como CO_2 del grupo COOH de la cadena lateral, o no descarboxilativa, si se conserva dicha cadena.

Las dos rutas oxidativas son irreversibles y los productos resultantes carecen de actividad biológica, lo

que indica que ambos procesos actúan como mecanismos de inactivación y desintoxicación de la hormona.

3.3.1. La oxidación descarboxilativa está catalizada por AIA oxidasa, una actividad que poseen las peroxidases vegetales

El peróxido de hidrógeno, los monofenoles y algunos iones metálicos como Mn^{+2} activan la reacción, mientras que los di y polifenoles la inhiben. Los productos iniciales de la reacción son indolmetanol e hidroximetiloxindol, dependiendo de que la oxidación se produzca en la cadena lateral o el núcleo indólico, respectivamente (Fig. 19-9). Indolmetanol es sustrato de peroxidasa y se transforma en indolaldehído que, mediante reacción no catalizada por peroxidasa, puede transformarse en el ácido indolcarboxílico. Por su parte, hidroximetiloxindol puede deshidratarse hasta metilenoindol. La relación enzima/sustrato, el pH del medio y la presencia de fenoles y Mn^{+2} pueden modificar la proporción relativa de los productos formados. Tanto el indolmetanol como el ácido indolcarboxílico se han identificado como metabolitos endógenos de algunos tejidos. Cuando se aplica a la planta AIA marcado radiactivamente (con ^{14}C en el C-2 de la cadena lateral o

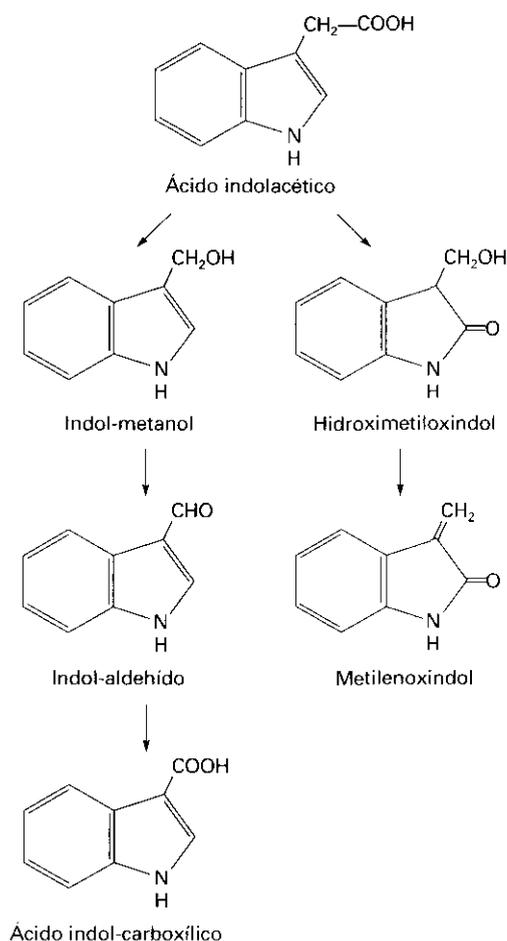


Figura 19-9. Productos formados en la oxidación descarboxilativa del AIA. La reacción, catalizada por AIA oxidasa, sería: $AIA + O_2 \rightarrow \text{Productos} + CO_2$.

con 3H en el núcleo indólico), se han podido identificar los diferentes productos de reacción.

3.3.2. La oxidación no descarboxilativa se produce en el anillo indólico del AIA sin pérdida del grupo carboxilo

La reacción da lugar al ácido 2-oxindol-3-acético y, posteriormente, al ácido 7-hidroxi-2-oxindol-3-acético. Como ya se ha indicado, el AIAasp también puede ser oxidado por esta vía hasta el ácido 3-hidroxi-2-oxindol-3-acetilaspártico (Fig. 19-10). Los grupos OH de estos compuestos pueden reaccionar con glucosa para formar los correspondientes derivados glicosilados (Fig. 19-10). A diferencia de la oxidación descarboxilativa, la oxidación no descarboxilativa sólo se ha podido comprobar en ciertas especies, en alguna de las cuales se ha confirmado la presencia de los productos de oxidación como constituyentes naturales.

En estos aspectos del catabolismo auxínico se presenta como tarea importante la identificación de las enzimas implicadas, así como el aislamiento de los genes

que las codifican. Todo ello contribuirá a la localización subcelular de los procesos.

4. TRANSPORTE

4.1. Las auxinas se transportan en la planta

Una de las características esenciales de las hormonas es la capacidad para desplazarse desde su lugar de biosíntesis hasta otras partes de la planta donde ejercen su acción. No obstante, las hormonas vegetales, a diferencia de las animales, también pueden ejercer una acción local en las mismas células donde se produce su biosíntesis. Esta biosíntesis puede ser estimulada por factores ambientales que, de esta forma, actúan como señal moduladora del desarrollo. Todas las hormonas vegetales pueden recorrer distancias cortas (entre células próximas) por difusión, y llegar a los diferentes órganos a través de los tejidos vasculares (xilema y floema). El AIA, además, puede ser transportado por células no vasculares, como las células del cambium y células parcialmente diferenciadas asociadas al floema, mediante un proceso diferente que se denomina **transporte polar**. Las auxinas sintéticas también experimentan transporte polar cuando se aplican a la planta.

4.2. El transporte polarizado es típico de las auxinas

Las principales características del transporte polar son: 1) la velocidad de transporte oscila alrededor de 10 mm h^{-1} , unas 100 veces menor que la del floema, pero casi 100 veces mayor que la de difusión; 2) la dirección del transporte está polarizada, es decir, se produce desde el ápice hacia la base del tallo (transporte basípeto) con independencia de que el tallo se mantenga en posición normal (extremo apical hacia arriba) o invertida (Fig. 19-11); en la raíz, la dirección es preferentemente acrópeta (desde la base hacia el ápice), y 3) el movimiento del AIA requiere energía metabólica ya que no se produce en ausencia de oxígeno ni en presencia de inhibidores de la síntesis de ATP.

4.3. Los parámetros de transporte de mayor significado fisiológico son la velocidad y la intensidad

La velocidad es el espacio recorrido por unidad de tiempo, mientras que la intensidad representa la cantidad de hormona transportada por unidad de tiempo. Uno de los métodos más utilizados para medir estos dos parámetros fue el propuesto por Van der Weij, tal como se describe en la Fig. 19-11. Desde su primer diseño en 1932, la principal modificación que ha experimentado este método es la utilización de AIA radiactivo que per-

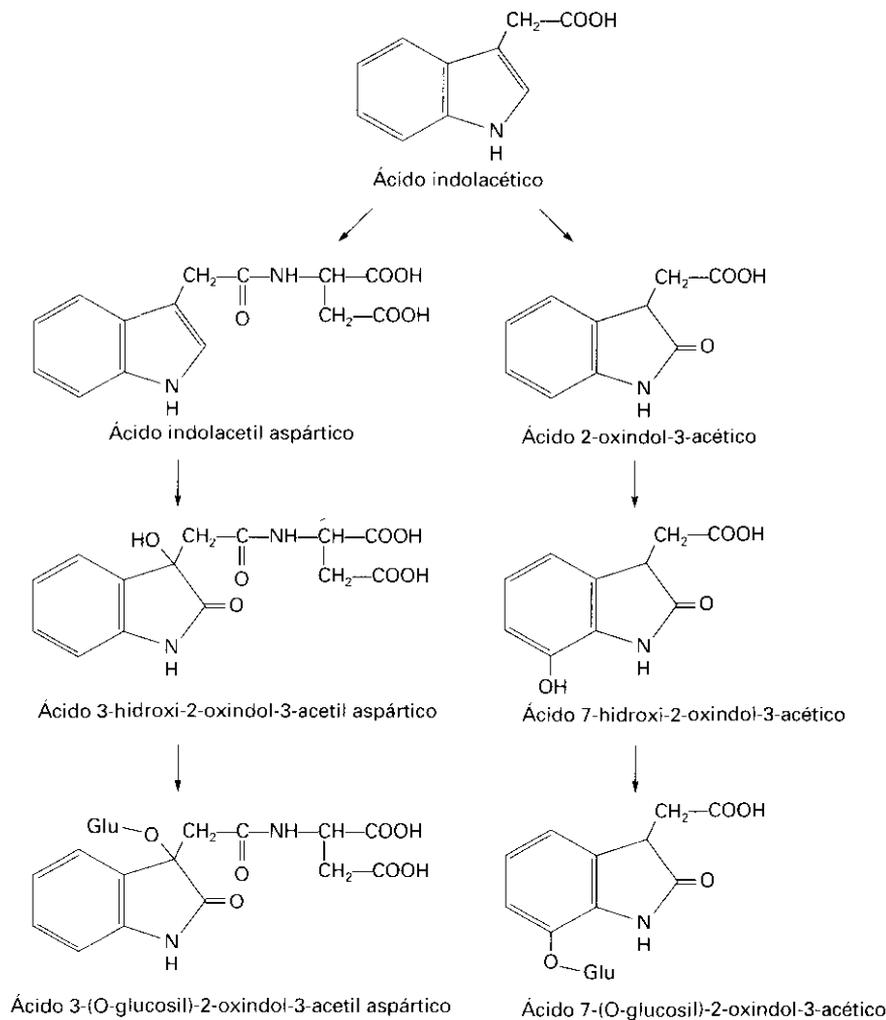


Figura 19-10. Productos formados en la oxidación no descarboxilativa del AIA.

mite una medida más correcta de la cantidad de hormona transportada que la que proporciona el bioensayo de curvatura utilizado en la formulación original. Los numerosos estudios sobre transporte polar indican que la velocidad de transporte depende de características inherentes a la planta tales como la especie, tipo de tejidos, edad, estado de desarrollo, etc., mientras que la intensidad depende, además, de factores metodológicos, como la longitud de las secciones o la concentración de hormona aplicada.

4.4. Para explicar el transporte polar de las auxinas, se ha propuesto una hipótesis quimiosmótica

Esta hipótesis presupone el movimiento del AIA de una célula a la inmediatamente inferior a lo largo de una columna de células transportadoras (Fig. 19-12). La entrada del AIA a las células transportadoras se produciría por toda la superficie celular, bien mediante transportadores de entrada bien por difusión del AIA no disociado

(AIAH). La difusión estaría favorecida por el gradiente de pH existente a ambos lados de la membrana plasmática. Este gradiente de pH sería generado por bombas protonicas (H^+ -ATPasas de la membrana plasmática) que mantendrían un pH más bajo en la pared celular (pH=5) que en el citoplasma (pH entre 7 y 7.5). La membrana plasmática, permeable al AIA no disociado (AIAH), permitiría la entrada de la molécula que, una vez en el interior de la célula, se disociaría en $AIA^- + H^+$ debido al mayor pH. La membrana es impermeable al anión (AIA^-) que sólo podría salir de la célula mediante transportadores específicos. La polaridad del transporte vendría dada por la distribución asimétrica de estos transportadores de salida que estarían localizados, exclusivamente, en la base de las células transportadoras. Fuera de la célula, el bajo pH de la pared regeneraría la molécula de AIA (AIAH) que, de esta forma, entraría en la célula siguiente. La existencia de sustancias, como el ácido naftilfitalámico (NPA) y el ácido 2,3,5-triyodobenzoico (TIBA), que interactúan con los transportadores de salida e inhiben el transporte polar, respalda la hipótesis quimiosmótica. Los inhibidores del transporte

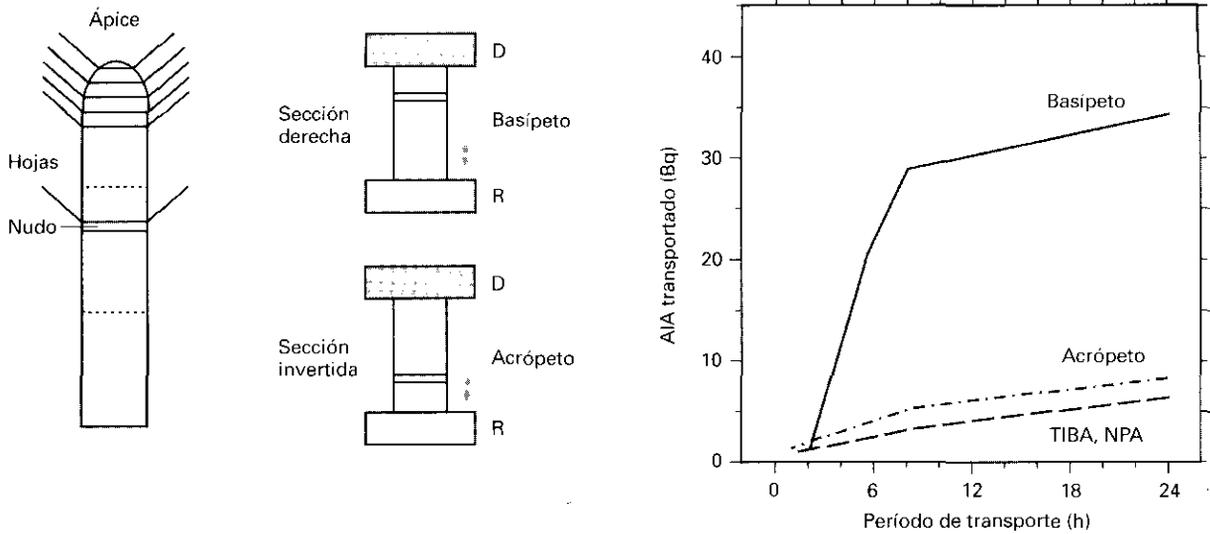


Figura 19-11. Transporte polar de AIA en tallo de clavel. Una sección de tallo que contiene un nudo se coloca sobre un bloque de agar receptor (R); en el extremo opuesto de la sección se deposita un bloque de agar donador (D) con AIA radiactivo. A intervalos de una hora, se cambia el bloque receptor y se determina la radiactividad transportada. En la gráfica se representa la radiactividad transportada en diferentes períodos por secciones derechas (nudo arriba) para medir el transporte basipeto, y por secciones invertidas (nudo abajo) para estudiar el transporte acrópeto. También se muestra el efecto de la adición de los inhibidores TIBA y NPA en las secciones derechas.

polar, como NPA y TIBA, actúan como antiauxinas y algunos son utilizados en agricultura como herbicidas.

4.5. El transporte polar desempeña un importante papel en el modo de acción de las auxinas

Aunque no hay duda de la existencia del transporte polar de auxinas, éste sigue siendo objeto de investigación ya que diferentes estudios indican que el transporte polar puede intervenir en procesos como el crecimiento del tallo, la dominancia apical, la diferenciación vascular, el enraizamiento de esquejes, etc. La regulación del transporte polar es una de las cuestiones pendientes de resolver. En este sentido, los factores que pueden influir en la síntesis, el metabolismo y la distribución de los transportadores pueden desempeñar un papel importante. El descubrimiento de que algunos fenoles naturales, como la quercetina, son inhibidores del transporte polar amplía las posibilidades para una regulación eficaz del proceso.

5. EFECTOS FISIOLÓGICOS

5.1. Las auxinas están implicadas en muchos procesos del desarrollo vegetal porque afectan a la división, crecimiento y diferenciación de las células

En general, la acción de las auxinas no es aislada y otras hormonas como etileno, giberelinas y citoquininas tam-

bién influyen. Desde su descubrimiento, el efecto producido por las auxinas en el crecimiento ha sido objeto de numerosos estudios. La respuesta a nivel celular, **alargamiento o elongación de las células** inducido por auxinas, ha permitido proponer una hipótesis para el mecanismo de acción (la hipótesis del crecimiento por acidificación, que se describe más adelante). Los efectos producidos en el alargamiento de raíz y tallos ya han sido comentados (véase Fig. 19-4). Además de esta acción sobre el crecimiento, las auxinas influyen de forma decisiva en procesos como la división celular del cambium, la diferenciación vascular, la formación de raíces adventicias, la dominancia apical y el desarrollo de frutos.

La reanudación de la actividad mitótica del cambium en primavera está relacionada con la activación de la biosíntesis de AIA en la yema apical del tallo que se produce después del letargo invernal. Así, la actividad del cambium cesa cuando se suprime la yema, y se reanuda cuando se aplica auxina al corte.

La aplicación de una yema, o un bloque de agar con auxina, sobre la superficie de un callo (masa indiferenciada de células que se obtiene por cultivo *in vitro* de una pequeña porción de raíz o tallo) estimula la formación de traqueidas por diferenciación de las células del callo. En secciones de tallo de *Coleus* se ha encontrado una correlación positiva entre el número de elementos vasculares (traqueidas y células cribosas) regenerados y la concentración de auxina aplicada. En algunos casos los efectos de las auxinas parecen estar producidos por la presencia de un gradiente de concentración entre distintas zonas de un órgano. Tal es el caso de las respuestas de crecimiento producidas por luz y gravedad (fototropismo y

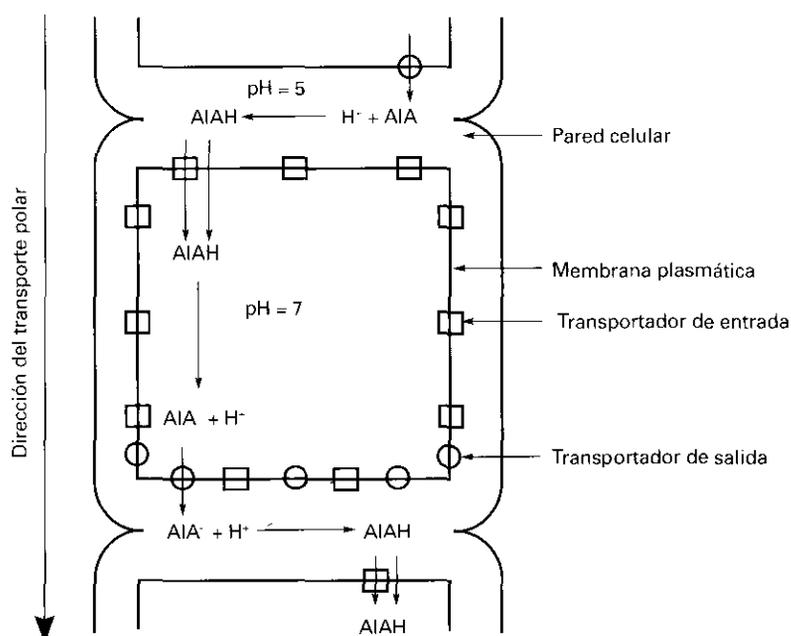


Figura 19-12. Esquema del transporte polar de AIA de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica. En el exterior de la célula, la hormona se encuentra en forma no disociada (AIAH) debido al pH ácido de la pared. El AIAH puede pasar al interior por toda la superficie celular, bien por difusión, o mediante transportadores de entrada. Al pH neutro o ligeramente alcalino del citoplasma, el AIAH se disocia en AIA⁻ + H⁺. La membrana celular es impermeable al anión, que sólo puede pasar mediante los transportadores de salida situados en la base de las células transportadoras.

gravitropismo), y de la abscisión de las hojas, descritas con detalle en los Capítulos 24 y 28, respectivamente.

5.1.1. *La regeneración por estaquillas o esquejes de tallo es una práctica muy utilizada en la propagación vegetativa de muchas especies agrícolas y ornamentales*

En muchos casos el **enraizamiento**, es decir, la formación de raíces adventicias en la base del esqueje, es un proceso espontáneo, mientras que en especies recalcitrantes se ha comprobado que la aplicación de AIA y auxinas sintéticas como IBA y NAA estimula el enraizamiento. La formación de raíces adventicias en esquejes es un proceso complejo que consta de, al menos, dos etapas: la formación de primordios de raíz a partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de las raíces. Ambas etapas requieren auxina, aunque las necesidades de cada una son diferentes y dependen de la especie.

5.1.2. *El término «dominancia apical» se utiliza para definir la limitación del crecimiento de yemas y brotes laterales impuesta por la yema apical del tallo principal*

En muchos árboles y arbustos la dominancia apical es débil y la ramificación abundante, lo que da una forma

más o menos esférica a la parte aérea de la planta. Otras especies como girasol, cereales, etc. presentan una dominancia apical extrema que se traduce en una inhibición del crecimiento de las yemas laterales y, por tanto, ausencia de tallos secundarios. En algunas coníferas, como abeto, ciprés, etc., la dominancia apical disminuye al aumentar la distancia al ápice del tallo principal, por lo que los tallos secundarios crecen menos cuanto más próximos están a dicho ápice. En especies donde se manifiesta la dominancia apical, la supresión de la yema principal permite el crecimiento de las yemas laterales, crecimiento que es inhibido cuando se aplica auxina al corte. Aunque estos resultados apoyan la idea de que la auxina procedente del ápice inhibe el crecimiento de las yemas laterales, algunos autores critican esta interpretación basándose en que la concentración de auxina exógena necesaria es muy superior a la de la yema suprimida. Recientemente, se ha comprobado que la yema apical puede inhibir el transporte polar de la auxina endógena en la yema lateral, transporte que sería imprescindible para su crecimiento.

5.1.3. *En muchas angiospermas, las auxinas estimulan la partenocarpia de los frutos*

Los frutos partenocárpicos se caracterizan por la ausencia de semillas (véase Capítulo 26). La **partenocarpia** puede producirse de forma espontánea en algunas plantas (p. ej., en algunas variedades de uva y especies cítri-

cas) cuyos ovarios contienen mayor concentración de auxina que aquellas que precisan fertilización. La auxina es esencial para el crecimiento de los frutos lo que, en gran medida, se debe al alargamiento de sus células. En algunas especies se ha comprobado que la polinización es la señal que estimula la biosíntesis de AIA en el ovario.

6. MECANISMO DE ACCIÓN

6.1. Investigar el mecanismo de acción de la auxina es una tarea reduccionista que permite conocer las piezas que lo componen y cómo funciona

En el apartado 5.4 del capítulo anterior se indica la forma en que actúa una hormona. En este caso, habría que describir (o reconstruir *in vitro*) todos los pasos que llevan desde la unión de la auxina a su receptor, pasando por la transducción de esta señal, hasta la medida de una respuesta fisiológica concreta (crecimiento o diferenciación). Por el momento, faltan elementos para completar esta secuencia y no hay criterios suficientes para asociar la simple unión de una molécula de auxina a una posible proteína receptora con una determinada respuesta fisiológica. Mientras tanto, la investigación se puede continuar siguiendo alguno de los siguientes enfoques:

- Escoger un modelo fisiológico concreto (crecimiento de un coleóptilo o hipocótilo) y diseccionar las fases y procesos que lo componen, aislando aquéllos en que la auxina puede participar. Sucesivamente se iría acotando el campo de estudio, desde el nivel tisular hacia el celular y el molecular.
- Buscar piezas sueltas del sistema (receptores, mensajeros secundarios, genes), caracterizarlas e integrarlas, para demostrar que forman parte del mecanismo que se investiga.

El objetivo final, obviamente, será encontrar una convergencia mutua entre (a) y (b).

6.2. El crecimiento de órganos sencillos es un buen modelo para saber cómo actúan las auxinas

La germinación de las semillas produce unas plántulas que poseen órganos sencillos (coleóptilos en monocotiledóneas, hipocótilos o epicótilos en dicotiledóneas) que responden a las auxinas de forma similar a la que muestra la Fig. 19-4. El crecimiento, que se observa en secciones aisladas de dichos órganos, puede reflejar la liberación de las restricciones que unos tejidos imponen sobre otros (la epidermis limita la expansión de otras células). Sin embargo, el incremento global e irreversible

del tamaño del órgano integra el crecimiento de las células individuales de los distintos tejidos que lo constituyen.

6.2.1. ¿Cómo crece la célula vegetal?

La estructura de las células vegetales (véase Capítulo 1) está condicionada por su contenido en agua y su pared rígida. Para que una célula crezca es necesaria una fuerza directriz (gradiente de potencial hídrico favorable para la entrada de agua en la célula), así como una alteración en las propiedades elásticas y plásticas de la pared (ablandamiento que permita la expansión celular gracias a la tensión de turgencia celular). El aumento de tamaño irá acompañado por la síntesis de nuevos materiales que refuercen las membranas y rellenen las paredes y espacios apoplásticos en incremento. Este crecimiento continuará hasta que, por razones deterministas todavía poco aclaradas, se produzca su cese. La consolidación de las nuevas estructuras formadas hará irreversible el proceso y la célula habrá alcanzado, definitivamente, un mayor tamaño.

El crecimiento tiene una interpretación biofísica

Una ecuación que exprese la velocidad de incremento en el volumen celular (dV/dt) debe incluir términos relativos a las fuerzas directrices que se acaban de indicar. En tal sentido se ha deducido la ecuación:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{m \cdot L}{m + L} (\psi_a - \pi - Y)$$

en la que m (extensibilidad de la pared) e Y (valor umbral de turgencia que debe superarse para que haya expansión celular) son términos que regulan la extensión irreversible de la pared. Por otra parte, L (conductividad hidráulica), π (potencial osmótico de la célula) y ψ_a (potencial hídrico apoplástico) son parámetros determinantes de la absorción de agua.

En consecuencia, cualquier factor que desencadene el fenómeno del crecimiento celular deberá aumentar m , L o ψ_a ; o bien disminuir π o Y .

El crecimiento tiene una interpretación bioquímica

La pared celular es un entramado de fibras de celulosa unidas a hemicelulosas, sustancias pécticas y algunas proteínas estructurales. El crecimiento implica una ruptura en algunos de estos enlaces para permitir la expansión celular. En el caso de las monocotiledóneas parece existir una degradación en ciertos glucanos de la pared, mientras que en las dicotiledóneas probablemente tenga lugar una despolimerización en los xiloglucanos. En

ambos casos no se conocen del todo las enzimas implicadas en tales procesos. La ruptura de puentes de hidrógeno entre microfibrillas de celulosa, mediada por las proteínas llamadas «expansinas», podría ser otro mecanismo importante.

6.2.2. ¿Cómo hace el AIA crecer a la célula?

Los apartados anteriores nos llevan a concluir que la auxina debe estimular algún tipo de comunicación entre la célula y la pared que la envuelve. Desde el punto de vista bioquímico significa la producción, por parte de la auxina, de algún/algunos «factores de ablandamiento de la pared» cuya naturaleza hay que investigar. Por otra parte, desde el punto de vista biofísico, parece ser que la auxina ejerce su efecto causando un rápido incremento en la extensibilidad celular (**m**).

El efecto de la auxina se observa siguiendo la cinética del crecimiento

Existen dispositivos (auxanómetros) que permiten seguir la evolución del crecimiento en el tiempo. La Fig. 19-13 representa el efecto de la adición de AIA a una sección de hipocótilo de una dicotiledónea. Modificando las distintas condiciones experimentales en estos ensayos, se han podido conocer algunas de las características de la elongación celular inducida por auxinas. Así: (a) se observa un período de latencia (8-10 min) entre la aplicación de la hormona y el incremento en la velocidad de crecimiento; (b) se requiere la presencia continua de auxina y una osmorregulación suficiente para que la turgencia esté siempre por encima del umbral (**Y**) necesario para iniciar el crecimiento, y (c) el proceso requiere energía (ATP; ATP-asas funcionales), así como la síntesis de proteínas, ya que inhibidores específicos, en ambos casos, bloquean la acción auxínica.

La auxina podría ejercer su acción a través de la acidificación del apoplasto

En 1970, Rayle y Cleland en los Estados Unidos y Hager en Alemania propusieron, de forma independiente, que los protones serían el «factor de ablandamiento celular». Aunque existen diferencias de pH entre compartimentos celulares (Fig. 19-12), esta «teoría del crecimiento por acidificación» propone que la estimulación del crecimiento producida por la auxina se debería a la excreción de protones hacia el espacio apoplástico, con la disminución de su pH por debajo de 5.5, y la consiguiente alteración en la estabilidad de los enlaces de la pared o la actividad de ciertas enzimas. La teoría requiere que: (a) la auxina provoque la excreción de protones en las células que crecen; (b) la adición de ácidos a los tejidos ejerza un efecto similar al de la auxina

(siempre que la acidez alcance las paredes celulares); (c) las disoluciones reguladoras neutras, infiltradas en los tejidos, contrarresten la acción de la hormona, y (d) cualquier agente que induzca la excreción de protones también provoque un crecimiento celular rápido. Diversos tejidos cumplen estos requisitos, pero existen lagunas que impiden generalizar la teoría. El crecimiento mediante ácidos no es sostenido, mientras que con auxina sí lo es. Deben de existir más «factores de ablandamiento», además de los protones. Además, es difícil explicar el período de latencia en la acción. No está todavía claro si hay activación de ATP-asas, alteración en su velocidad de recambio (aumento en el número de moléculas de enzima) o si la excreción de protones se realiza de forma masiva a través de la fusión de vesículas del aparato de Golgi (cargadas de protones) con la membrana celular externa.

El crecimiento podría implicar varios procesos con fases que se solapan

La observación de la cinética de la Fig. 19-13 llevó a Vanderhoef a extrapolar el trazo continuo y sugerir que, tras la aplicación de auxina, existiría una primera fase del crecimiento que duraría aproximadamente una hora, seguida de una segunda fase más prolongada en la que se mantendría un estado estacionario en la velocidad de crecimiento. Podría hablarse de una respuesta rápida a la auxina (mediada por factores químicos), junto con otra más lenta (mediada por la expresión de genes), pero falta apoyo experimental suficiente para sostener esta hipótesis.

6.3. El aislamiento de elementos de la cadena de percepción y transducción de la señal hormonal es otra forma de investigar el mecanismo de acción

Esta estrategia se basa en asumir el modelo propuesto en el apartado 5.4 del capítulo anterior, profundizando en las distintas etapas que allí se indican. Conviene tener siempre en cuenta que hay que distinguir entre aquellos efectos debidos estrictamente a la hormona y aquellos otros que pueden aparecer como consecuencia de una situación de estrés por alterar el sutil equilibrio entre concentración y sensibilidad en los tejidos. A veces, un tratamiento excesivo con auxina se traduce en síntomas similares a los producidos por el etileno y la aparición de éste puede ser la respuesta al estrés causado por la otra.

6.3.1. Existen receptores auxínicos

Una proteína se considera receptor auxínico cuando presenta una elevada especificidad para estas sustancias

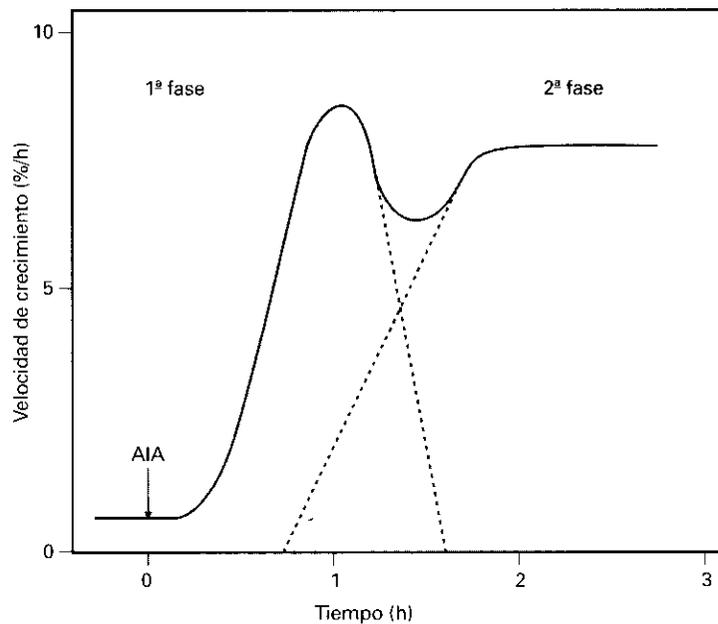


Figura 19-13. Efecto de la adición de AIA sobre la velocidad de crecimiento de una sección de hipocótilo de dicotiledónea.

(naturales o sintéticas), así como una alta afinidad, con valores de la constante de disociación del complejo hormona-receptor próximos a la concentración endógena de auxina (10^{-7} M). La unión es reversible y no tiene carácter catalítico.

El uso de técnicas sofisticadas de separación (incluyendo columnas de inmunoafinidad) ha permitido la caracterización de algunas proteínas que podrían englobarse en la categoría de receptores. No obstante, se han descartado varias por tratarse en realidad de transportadores o, incluso, una transferasa de glutatión con alta afinidad por el AIA, pero cuya función era la desintoxicación.

El receptor más aceptado, por el momento, es una ABP-1 (*auxin binding protein 1*) aislada en coleótilos de maíz y consistente en un dímero con dos subunidades de 22 kDa cada una. La proteína se ha purificado y secuenciado, habiéndose obtenido su correspondiente cDNA. Lo curioso es que la secuencia proteica contiene un motivo KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) característico de proteínas que son retenidas en el lumen del retículo endoplásmico. Esta podría ser su localización subcelular, pero contrasta con la idea de que el receptor debería estar situado en la membrana externa de la célula. También se admite que puedan existir dos tipos de receptores, uno externo y otro intracelular. Al fin y al cabo, como se indicó en el apartado 4.4, el citoplasma es una trampa para el AIA⁻ y esto se ve favorecido por el pH externo más ácido (el AIA y el pH no tienen efectos aditivos sobre el crecimiento, es decir, no actúan independientemente sino más bien de modo sinérgico).

En cualquier caso, la unión al receptor es el primer paso de una cadena de transmisión de señales que puede implicar mensajeros secundarios como los señalados en el apartado 5.4.2 del capítulo anterior. En el caso de

las auxinas todavía se debe profundizar más en este campo.

6.3.2. Las auxinas modifican la expresión génica

En los años sesenta, mediante el uso de inhibidores de la transcripción y traducción, se demostró que la clonación sostenida de secciones de coleótilos e hipocótilos requería la síntesis continua de RNA y proteínas. Posteriormente, las nuevas técnicas de biología molecular han permitido otros enfoques. La incubación de las secciones con disoluciones que contienen aminoácidos marcados radiactivamente permite separar, por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, distintos polipéptidos marcados *in vivo*. La incubación en presencia o ausencia de auxina muestra la inducción por ésta de marcaciones específicas. Por otra parte, se han construido genotecas de cDNA preparadas a partir de mRNA extraído de tejido tratado con auxina. Mediante métodos de búsqueda por hibridación diferencial, se han caracterizado numerosos cDNA de respuesta auxínica que se pueden agrupar en dos clases: (a) secuencias que se inducen después de una hora o más de exposición a la auxina (respuestas a largo plazo), y (b) secuencias que son moduladas a los pocos minutos de la aplicación de auxina (respuestas a corto plazo). A esta última clase pertenece un grupo de RNA que se induce en hipocótilos de soja, al cabo de 5 minutos de ser tratados con auxina. Se les denomina SAUR (*small auxin up-regulated RNA*). Las proteínas que codifican podrían afectar al crecimiento, aunque su expresión más típica se ha observado en experimentos sobre gravitismo. Los SAUR se acumulan en la parte inferior

de un hipocótilo de soja que se curva en respuesta a la gravedad (Fig. 19-14). La expresión rápida de estos genes es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas, por lo que se piensa que los factores necesarios para observar la respuesta ya existirían antes de la adición de auxina. Además de los anteriores, existen otros genes inducibles por auxinas (relacionados con la división celular o con proteínas moduladas por calcio, de unión al DNA, asociadas a las paredes celulares o transferasas). También se han descrito algunos genes del metabolismo secundario o relacionados con la patogénesis que son reprimidos por auxina. En todo caso, no debe olvidarse lo dicho al principio (apartado 6.3) sobre efectos primarios de la hormona y efectos del estrés.

6.3.3. Se han aislado mutantes y se han obtenido plantas transgénicas para investigar la acción de las auxinas

Los mutantes sirven como herramientas para investigar la acción de las auxinas a todos los niveles, ya que las mutaciones definen los genes que se requieren para la actividad normal de la auxina en la planta. Usando *Arabidopsis thaliana* como planta modelo se han podido aislar mutantes con alteraciones en las rutas de biosíntesis o conjugación de AIA (*trp*, *surl*, *fass*), el transporte

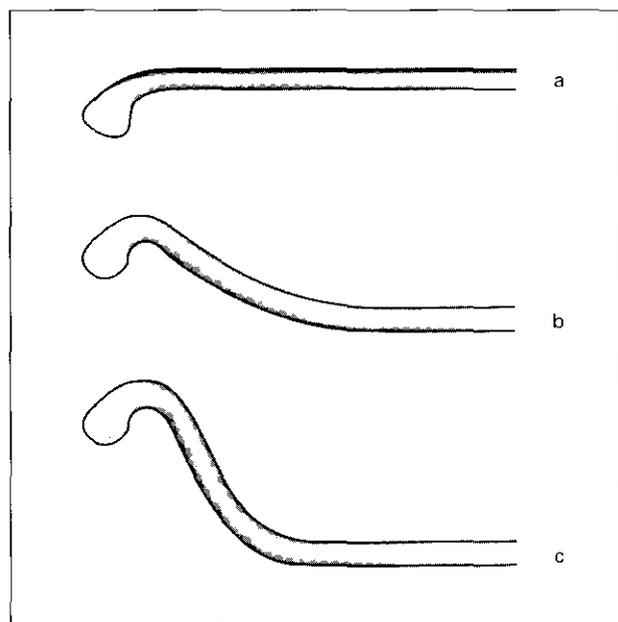


Figura 19-14. Representación esquemática de la expresión asimétrica de SAUR durante la respuesta gravitrópica de hipocótilos de soja. La línea indica el contorno del hipocótilo. Las zonas oscuras muestran la intensidad de la expresión de SAUR. La distribución simétrica inicial (a) se altera durante la curvatura gravitrópica produciéndose mayor expresión en la zona inferior con mayor crecimiento (b); la simetría se restablece en la porción erecta del hipocótilo (c). La expresión de SAUR se localiza principalmente en la epidermis y corteza.

polar (*aux1*, *mp*, *rcn1*) o la resistencia a la auxina (*axr1*, *axr2*). El estudio detallado de sus fenotipos puede aportar información importante sobre el mecanismo de acción de la hormona, al igual que la clonación de los genes definidos por la mutación.

La obtención de plantas transgénicas que sobreexpresen o subexpresen genes relacionados con el metabolismo del AIA también ha resultado ser una estrategia interesante de investigación. Así, se han podido transferir al tabaco los genes *iaaM* e *iaaH* de *Agrobacterium tumefaciens*. Estos genes constituyen una ruta peculiar de la bacteria para transformar triptófano en AIA. Su expresión en la planta aumenta entre cuatro y diez veces los niveles de auxina. Esto provoca un aumento en la conjugación de AIA y cambios fenotípicos, como dominancia apical y desarrollo del sistema vascular más intensos, así como proliferación de raíces adventicias en ciertos casos. También se incrementa la producción de etileno y se observan otros cambios fenotípicos achacables a éste: epinastia y reducción en el crecimiento de los entrenudos.

La transferencia del gen *iaaL* de *Pseudomonas savastanoi* expresa una enzima que conjuga AIA con lisina y reduce hasta veinte veces la concentración endógena de AIA libre. El cambio fenotípico en la planta transgénica se manifiesta tras la floración, con reducción de la dominancia apical y del sistema vascular y un comportamiento similar al de aquellas plantas que presentan niveles altos de citoquininas.

7. APLICACIONES COMERCIALES

7.1. Las auxinas, utilizadas como fitorreguladores, tienen numerosas aplicaciones comerciales, tanto agronómicas como biotecnológicas

En general, los fitorreguladores sintéticos constituyen, dentro de los agroquímicos, un grupo de sustancias que, añadidas en muy bajas cantidades, modifican las pautas normales de desarrollo de las plantas y pueden ayudar a incrementar la productividad, mejorar la calidad del cultivo, facilitar la recolección, etc.

Los fitorreguladores auxínicos sintéticos fueron utilizados al principio como herbicidas debido a su estabilidad, ya que son muy resistentes a la oxidación por la luz, enzimas u otros agentes. Actualmente se comercializan en diversas formulaciones atendiendo a un amplio abanico de posibilidades de empleo, según las situaciones agrícolas, los tipos de cultivo y las formas de aplicación que existen. Los fitorreguladores, sus aplicaciones, dosificación y precauciones suelen venir recogidos en catálogos, *vademecums* y guías de productos agroquímicos.

En el Cuadro 19-1 se muestran algunos de los fitorreguladores auxínicos más utilizados. Aparecen con la

Cuadro 19-1. Algunos fitorreguladores auxínicos utilizados en agronomía. El nombre químico, que da alguna idea sobre la estructura, suele simplificarse en un nombre común más sencillo de utilizar (siglas o acrónimo). En cada caso se indica su aplicación más típica

Nombre común	Nombre químico	Aplicaciones
IBA NAA	Ácido indol-3-butírico Ácido 1-naftilacético	<ul style="list-style-type: none"> • Enraizamiento • Enraizamiento • Aclareo • Retardante en caída de frutos
4-CPA 2-NOA NAA-m	Ácido 4-clorofenoxiacético Ácido 2-naftiloxiacético Ácido 2-(1-naftil) acetamida	<ul style="list-style-type: none"> • Cuajado de frutos • Cuajado de frutos • Aclareo • Cuajado de frutos
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético. (en forma de ésteres y sales)	<ul style="list-style-type: none"> • Retardo en la caída de frutos
2,4-DP	Ácido 2-(2,4- diclorofenoxi) propiónico	<ul style="list-style-type: none"> • Modificador del aspecto de frutos

nomenclatura química y sus nombres comunes. Junto a ellos se indican sus aplicaciones más extendidas.

RESUMEN

Las observaciones sobre los tropismos permitieron el descubrimiento de las primeras hormonas vegetales, a las que se llamó auxinas. Su representante característico es el ácido indolacético (AIA), aunque existen otras auxinas naturales y sintéticas. La respuesta de la planta a la auxina depende de su concentración y de la sensibilidad de los tejidos frente a ella. La regulación de la concentración hormonal endógena implica procesos metabólicos de biosíntesis, conjugación y oxidación. La compartimentación y el transporte de las auxinas son también importantes. El transporte polarizado es típico de las auxinas. La presencia y distribución subcelular asimétrica de los transportadores tiene una especial relevancia fisiológica. Las auxinas participan en muchos procesos del desarrollo vegetal: crecimiento, dominancia apical, enraizamiento, partenocarpia, tropismos, abscisión, etc. Por ello, se utilizan auxinas sintéticas como fitorreguladores, con numerosas aplicaciones agronómicas y biotecnológicas. Las auxinas favorecen el crecimiento porque modifican la extensibilidad celular al producir factores que ablandan la pared. Uno de estos factores podría ser la acidificación del espacio apoplásmico. Las auxinas también ejercen su acción modificando la expresión génica. Se han obtenido mutantes y plantas transgénicas como herramientas para investigar el mecanismo de acción del AIA.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Después de decapitar un coleóptilo, el ápice se coloca sobre un bloque de agar y éste, a su vez, se sitúa de

forma simétrica sobre el coleóptilo decapitado: a) ¿Qué respuesta cabe esperar ante una iluminación lateral? b) ¿Qué ocurriría si el bloque de agar se sustituye por una lámina metálica?

2. Para estudiar el metabolismo auxínico se utilizan disoluciones de AIA marcado con ^{14}C en el grupo carboxilo (I) o en el C-2 de la cadena lateral (II). Indique el tipo de productos metabólicos radiactivos que pueden aparecer, cuando a las disoluciones se adicionan secciones de tallo (a) o peroxidasa purificada (b).
3. Después de incubar material vegetal con ^3H -AIA, se aíslan, entre otros, los productos radiactivos A y B. Cuando una disolución de A se incuba en dicho material, se obtiene AIA radiactivo, lo que no sucede con B. Indique la posible naturaleza química de A y B y comente las capacidades metabólicas del material.
4. Teniendo en cuenta los requerimientos estructurales de las auxinas (Fig. 19-3), ¿cómo justificaría la ausencia de actividad auxínica en las auxinas ligadas y en los productos de oxidación?
5. El tramo lineal de la curva de transporte basípeta representado en la Figura 19-11, se ajusta por mínimos cuadrados, obteniéndose la ecuación $y = 6.0x - 12.6$. Teniendo en cuenta, que la pendiente de la ecuación representa la intensidad del transporte, y que el punto de corte con el eje de abscisas mide el tiempo del transporte, calcule la intensidad (en Bq h^{-1}) y la velocidad del transporte (en mm h^{-1}) para una longitud de sección de 10 mm.
6. Cuando una sección de epicótilo o hipocótilo localizada en la zona de crecimiento se divide, parcialmente, en sentido longitudinal, las dos mitades resultantes se separan y curvan hacia el exterior. La curvatura es escasa si previamente se suprime la epidermis, y cambia si la sección partida se mantiene inmersa durante unas horas en disolución de AIA. a) ¿Qué fenómeno puede explicar la curvatura? b) ¿Qué tejidos pueden limitar el crecimiento del órgano inducido por AIA?
7. Algunos autores han relacionado la curvatura fototrópica con alteraciones en el transporte polar del AIA. ¿Qué efectos podría producir la luz en el sistema de transporte polar de la zona iluminada?

8. Como se observa en la Figura 19-4, una alta concentración de auxina puede inhibir el crecimiento. Suponiendo que el receptor hormonal presente dos puntos de unión con la molécula de auxina, ¿cómo podría explicarse la citada inhibición?
9. Después de triturar un tejido, se obtiene un extracto capaz de catalizar la oxidación descarboxilativa del AIA. ¿Puede deducirse que la reacción también se produciría en el tejido intacto?
10. Cuando se determina el contenido endógeno de AIA a lo largo del tallo, la zona de crecimiento presenta, en general, una concentración mayor que las zonas inferiores sin crecimiento. En este caso, ¿cuál sería el factor limitante del crecimiento: la concentración de la hormona, o la sensibilidad del tejido?

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

1. Azcón-Bieto, J., Talón, M. (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, Madrid, McGraw/Hill-Interamericana, 1993.
2. Barceló, J. et al: *Fisiología Vegetal*, 6.^a ed. Madrid, Pirámide, 1992.
3. Davies, P. J. (ed.): *Plant Hormones*, 1.^a y 2.^a eds. Dordrecht, Kluwer, 1987 y 1995.
4. De Liñán, C. (ed.): *Vademecum de Productos Fitosanitarios*. Madrid, Ediciones Agrotécnicas, 1997.
5. Mohr, H., Schopfer, P.: *Plant Physiology*, Berlín, Springer-Verlag, 1995.
6. Moore, T. C.: *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. 2.^a ed. Nueva York, Springer-Verlag, 1989.
7. Salisbury, F. B., Ross, C. W.: *Fisiología Vegetal*. México, Grupo Editorial Iberoamérica, 1994.
8. Taiz, L., Zeiger, E.: *Plant Physiology*, Redwood City (California), Benjamin/Cummings, 1991.
9. Yagüe, J. I., Bolívar, C. (eds.): *Guía Práctica de Herbicidas y Fitorreguladores*. Madrid, Mundi-Prensa, 1995.
10. Varios autores: *Physiologia Plantarum*, vol. 100, n.º 3, págs. 407-473, 1997.
11. Varios autores: *The Plant Cell*, vol. 9, n.º 7, págs. 1077-1244, 1997.