

V. EXPERIENCIA II

V. EXPERIENCIA II. TOMA DE LOS ISÓMEROS DE FeEDDHA POR PLANTAS DE ESTRATEGIA I Y II.

Como ya se estudió en el apartado de Introducción, las plantas superiores cuando se encuentran en situaciones de carencia de hierro desarrollan una serie de mecanismos que aumenta la disponibilidad de este nutriente en el medio. Así, dependiendo de su respuesta ante este déficit se pueden dividir en dos grupos: plantas de estrategia I y de estrategia II (Marschner et al., 1986; Römheld, 1987a; Brown y Jolley, 1988).

En muchas ocasiones, cuando el cultivo se desarrolla sobre suelos calizos, el funcionamiento de la estrategia I no es suficiente para evitar la aparición de la clorosis férrica en el vegetal. En estos casos, es necesario el uso de fertilizantes férricos, los cuales serán capaces de corregir las deficiencias de este nutriente.

De entre los diferentes aditivos que se pueden emplear (sales inorgánicas, disoluciones ácidas, complejos de Fe ...), los que mejores resultados dan cuando se aplican a suelos y aguas de riego calizos son los quelatos FeEDDHA (Lucena, 1990; Sanz et al., 1992).

Cabe señalar que aunque es un hecho demostrado que las plantas toman el Fe procedente de los quelatos FeEDDHA, no se sabe si lo harán independientemente del isómero que esté presente en la disolución, o si por el contrario, existen alguna preferencia en función de la estabilidad de los mismos. Tampoco se conoce si dicha toma será diferente dependiendo del tipo de estrategia que desarrolle el vegetal.

El objetivo que se plantea con esta experiencia es determinar como es la toma del Fe procedente de estos isómeros por parte de las plantas de estrategia I y II cuando han sido sometidas a situaciones de deficiencia de dicho nutriente.

V.1. Materiales y Métodos.

Esta experiencia se realizó con dos especies de plantas de estrategia I: *Capsicum annuum* cv. Roldan y *Lycopersicum esculentum* cv. Daniela, y con dos de estrategia II: *Triticum aestivum* cv. Chamorro y *Avena sativa* cv. Europa.

El estudio se llevó a cabo durante los meses de febrero, marzo y abril de 2002, en el invernadero de investigación del Departamento de Agroquímica y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alicante. Este invernadero está dotado de un sistema de calefacción eléctrica y de un *fog system*, que permiten el control de la temperatura y la humedad así como, de un sistema GLM (Gemini Logger Manager) que determina los valores de estos dos parámetros alcanzados en el interior del invernadero en todo momento. También dispone de un sistema de iluminación de apoyo mediante lámparas de sodio. El empleo de iluminación artificial no se utilizó para modificar la duración del día, sino que únicamente se buscó aportar luz supletoria a la luz natural, debido a la baja transparencia de la cubierta de cristal del invernadero. Esta falta de transparencia es producida por la acumulación de depósitos de cemento procedentes de una cementera situada en las proximidades del invernadero, lo que disminuye considerablemente la iluminación en el mismo.

Los cultivos se desarrollaron en hidroponía pura, realizando tres repeticiones por especie.

Las semillas de tomate y pimiento se dejaron germinar en bandejas con arena de cuarzo lavada al ácido, humedecida con agua desmineralizada. Una vez germinadas se mantuvieron en el semillero hasta que alcanzaron 15 cm de altura regándolas durante este periodo de tiempo, con la disolución nutritiva empleada en el estudio (Tabla.V.1), diluida a la mitad. Posteriormente, se transplantaron sobre las tapas perforadas de unos

recipientes opacos de 3 L de capacidad, que estaban provistos de un sistema de aireación para la disolución nutritiva (Fig.V.1 y V.2).



Fig.V.1. Diseño experimental empleado en el cultivo de pimienta.



Fig.V.2. Sistema de aireación empleado para el desarrollo de la experiencia.

Las semillas de trigo y avena se dejaron germinar directamente sobre las tapaderas agujereadas de los recipientes en las que se había colocado una pequeña capa de arena de cuarzo lavada al ácido, humedecida con agua desmineralizada (Fig.V.3).

En el caso del pimiento y tomate (Fig.V.1) se transplantó una plántula por recipiente mientras que, en el trigo y la avena se dejaron 5 de las plántulas que habían germinado (Fig.V.3)



Fig.V.3. Diseño experimental empleado en los cultivos de trigo y avena.



Fig.V.4. Diseño experimental empleado en los cultivos de trigo y avena.

La composición de la disolución nutritiva que se empleó en el estudio se recoge en la Tabla.V.1. Como se puede observar es una disolución típica utilizada en fertirrigación (Martínez y García, 1993), con la salvedad de que para prepararla se usó agua desmineralizada, por lo que es una disolución tipo en la que no hay aporte de nutrientes por parte del agua de riego. Las sales empleadas son de Panreac (para análisis) y el FeEDDHA fue sintetizado en el laboratorio siguiendo la técnica descrita por Hill-Cottingham (1962). Para ajustar el valor final del pH de la disolución nutritiva se empleó KOH (Panreac).

Cada recipiente se llenó con 3 L de disolución nutritiva, y a partir de este momento se fueron tomando muestras de 50 mL cada 3-4 días a lo largo de 74 días. Antes de cada toma de muestra, el recipiente se rellenó hasta los tres litros con agua desmineralizada para asegurarnos de que el volumen de la disolución fuese el mismo durante todo el ensayo.

Cabe señalar que a la hora de realizar esta experiencia también se emplearon unos recipientes iguales a los descritos anteriormente que se llenaron con 3 L de disolución nutritiva pero en los que no se colocó ningún vegetal. Esta disolución nutritiva se utilizó como blanco y permitió conocer

la pérdida de quelato que se produjo como consecuencia de las condiciones del medio.

Tabla.V.1. Composición de la disolución nutritiva.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (M)	COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (M)
FeEDDHA	$3'58 \cdot 10^{-5}$	Ca(NO₃)₂·4H₂O	$3'5 \cdot 10^{-3}$
NH₄NO₃	$5'0 \cdot 10^{-4}$	MnSO₄·H₂O	$1'27 \cdot 10^{-5}$
MgSO₄·7H₂O	$1'25 \cdot 10^{-3}$	CuSO₄·5H₂O	$3'14 \cdot 10^{-7}$
KNO₃	$4'5 \cdot 10^{-3}$	ZnSO₄·7H₂O	$1'36 \cdot 10^{-6}$
K₂SO₄	$7'5 \cdot 10^{-4}$	(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O	$5'95 \cdot 10^{-8}$
KH₂PO₄	$1'5 \cdot 10^{-3}$	H₃BO₄	$4'63 \cdot 10^{-5}$

En cada una de las muestras tomadas a lo largo de la experiencia se determinó:

- El valor de pH y la conductividad eléctrica de la disolución nutritiva.
- La concentración de hierro quelado y el porcentaje de cada uno de los isómeros presentes en la disolución, mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), siguiendo el método descrito por Lucena et al. (1996).

V.1.1. Parámetros cinéticos de la toma del Fe procedente de los isómeros d,l-racémico y meso.

A fin de establecer la cinética de la toma del hierro procedente de cada uno de los isómeros del FeEDDHA por las plantas, los datos experimentales obtenidos para las cuatro especies en estudio se ajustaron mediante el programa SPSS (versión 10.0.6) a distintas ecuaciones matemáticas. Tras diferentes ensayos se comprobó que el mejor ajuste correspondía a la ecuación que se muestra a continuación:

$$y = C \cdot \left(\frac{t^n}{K^n + t^n} \right) + A \cdot \left(\frac{t^m}{H^m + t^m} \right) \quad (V.1)$$

donde la variable t corresponde al tiempo (días) y la variable y son los moles de Fe tomados por la planta.

Del estudio de la Ecuación (V.1) se deduce que la absorción de Fe por la planta vendrá dada por dos etapas diferentes cuyo comportamiento lo describe cada uno de los sumandos que componen dicha ecuación. De esta forma, la tendencia que sigue la planta a la hora de tomar el Fe de la disolución en cada una de las etapas se ajustaría a una ecuación del tipo:

$$y = \frac{D \cdot t^b}{P^b + t^b} \quad (V.2)$$

Tal y como se ha indicado en la Ecuación (V.1), y sería la cantidad de moles de Fe tomados por la planta y t el tiempo. D correspondería a los parámetros C y A en la Ecuación (V.1), b correspondería a los parámetros n y m de dicha ecuación y P a K y H .

El cálculo del límite cuando t (el tiempo) tiende a ∞ de la ecuación (V.2) permite encontrar cual será el número de moles de Fe tomados por la planta en el equilibrio (moles Fe)_{eq}.

$$(\text{moles Fe})_{\text{eq}} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{D \cdot t^b}{P^b + t^b} = D \quad (V.3)$$

De acuerdo con el resultado obtenido, D es el número de moles de Fe que la planta ha absorbido de la disolución cuando llega al equilibrio ((molesFe)_{eq}).

Por otro lado, el parámetro P debe tener unidades de tiempo pues se suma a t . De esta forma cuando $t=P$, la ecuación (V.2) quedaría como se muestra a continuación:

$$(\text{molesFe}) = \frac{D \cdot t^b}{P^b + t^b} = \frac{D \cdot P^b}{2P^b} = \frac{D}{2} \quad (\text{V.4})$$

Ya que D se ha definido como moles de Fe que las plantas han consumido en el equilibrio ((moles Fe)_{eq}), P sería el tiempo que tarda el sistema en alcanzar la mitad de (moles Fe)_{eq}. Por tanto, P se define como $\tau_{1/2}$, y la ecuación (V.2) quedaría de la siguiente forma:

$$(\text{molesFe}) = \frac{(\text{molesFe})_{\text{eq}} \cdot t^b}{\tau_{1/2}^b + t^b} \quad (\text{V.5})$$

Si se deriva la ecuación (V.5) con respecto al tiempo, se obtiene la expresión que permite calcular la velocidad de toma del Fe por la planta.

$$v = \frac{dy}{dt} = \frac{(\text{molesFe})_{\text{eq}} \cdot \tau_{1/2}^b \cdot b \cdot t^{(b-1)}}{(\tau_{1/2}^b + t^b)^2} \quad (\text{V.6})$$

Sin más que hacer $t=\tau_{1/2}$, se puede calcular el valor de la velocidad de toma de Fe alcanzada cuando el número de moles consumidos por la planta sea la mitad de los del equilibrio.

$$v_{\tau_{1/2}} = \frac{(\text{molesFe})_{\text{eq}} \cdot b}{4 \cdot \tau_{1/2}} \quad (\text{V.7})$$

Por otro lado, si tratásemos en conjunto las diferentes etapas en las que se divide el proceso de toma de Fe por la planta, a partir de la ecuación (V.1) se podrían determinar los moles de hierro que consume el vegetal en el equilibrio $(\text{moles Fe})'_{\text{eq}}$. Para conocer este valor, se calculó el límite de dicha ecuación cuando el tiempo tiende a ∞ , obteniendo que los moles consumidos en el equilibrio son la suma del valor de este parámetro para cada una de las etapas.

$$(\text{molesFe})'_{\text{eq}} = [(\text{molesFe})_{\text{eq}}]_{\text{etapa1}} + [(\text{molesFe})_{\text{eq}}]_{\text{etapa2}} \quad (\text{V.8})$$

Si se deriva la ecuación (V.1) con respecto al tiempo, se obtiene la velocidad de toma de Fe por la planta.

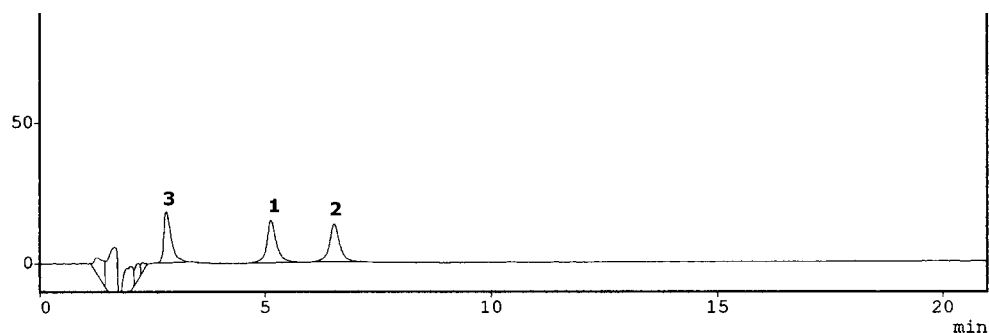
$$v = \frac{dy}{dt} = \left(\frac{(\text{molesFe})_{\text{eq}} \cdot \tau_{1/2}^n \cdot n \cdot t^{(n-1)}}{(\tau_{1/2}^n + t^n)^2} \right)_{\text{etapa1}} + \left(\frac{(\text{molesFe})_{\text{eq}} \cdot \tau_{1/2}^m \cdot m \cdot t^{(m-1)}}{(\tau_{1/2}^m + t^m)^2} \right)_{\text{etapa2}} \quad (\text{V.9})$$

V.2. Resultados y discusión.

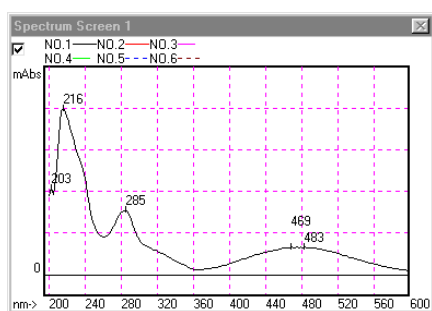
A fin de conocer si las plantas consumen de la misma forma el Fe procedente de cada uno de los isómeros que constituyen el quelato FeEDDHA, o si por el contrario, existe alguna preferencia por alguno de ellos en función de la estabilidad del isómero y/o de la estrategia que presente el vegetal, las muestras de disolución nutritiva tomadas a lo largo del ensayo se sometieron a análisis por HPLC, siguiendo la metodología indicada en el Apartado de Materiales y Métodos (Apartado.V.1).

Como se comprobó en la Experiencia I, la técnica de HPLC además de identificar y cuantificar los isómeros d,l-racémico y meso, también permite determinar la presencia de otros compuestos que se puedan haber formado durante la preparación de la disolución nutritiva. Así, en el cromatograma de HPLC correspondiente a la disolución nutritiva inicial (Fig.V.5) se observan los dos picos característicos de los isómeros del FeEDDHA (el isómero d,l-racémico a 5'1 min (pico 1) y el meso a 6'5 min (pico 2)) y un tercer pico a 2'8 min. (pico 3). Como se muestra en la Fig.V.5, el espectro UV-Vis del pico 3 coincide con el del pico con un tiempo de elución en torno a 3 min que aparecía en las disoluciones nutritivas del Ensayo 3 de la Experiencia I, y que fue identificado como un complejo hidratado de sulfato y/o nitrato con algunos de los cationes que constituyen la disolución.

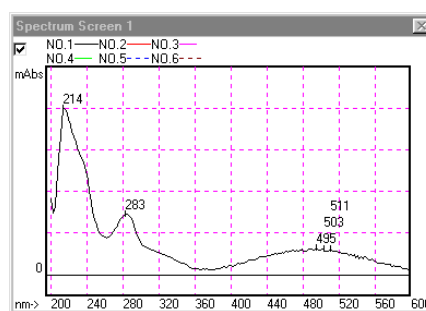
Cabe destacar que en los cromatogramas de HPLC de las muestras de disolución nutritiva recogidas en los primeros días del ensayo (Fig.V.6.A, V.6.C, V.7.A y V.7.C), aparecen los mismos picos que en el de la disolución nutritiva inicial (Fig.V.5). Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de cultivo, el pico 3 va disminuyendo su área hasta que llega un momento en que desaparece (Fig.V.6.B, V.6.D, V.7.B y V.7.D), observándose únicamente los picos de los isómeros que componen el quelato (picos 1 y 2), los cuales también han reducido su área con respecto a la que presentaban en la Fig.V.5.



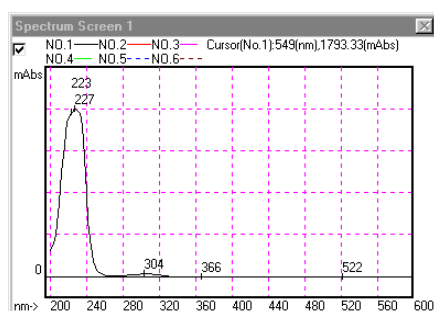
Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. Fe (M) en D.N.
1	d,l-racémico	5'1	224843	$1'83 \cdot 10^{-5}$
2	meso	6'5	216255	$1'75 \cdot 10^{-5}$
	Total	--	441098	$3'58 \cdot 10^{-5}$
3	--	2'8	212348	--



Pico 1

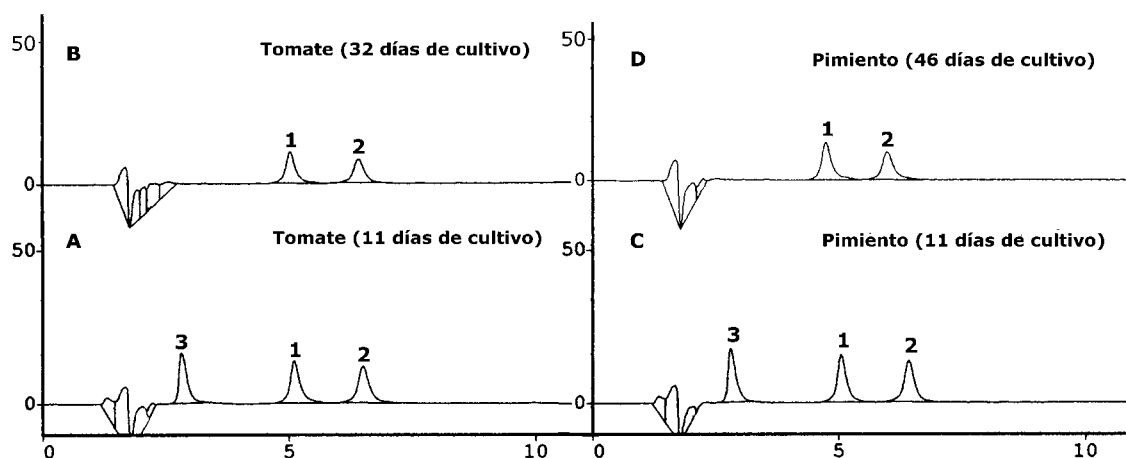


Pico 2



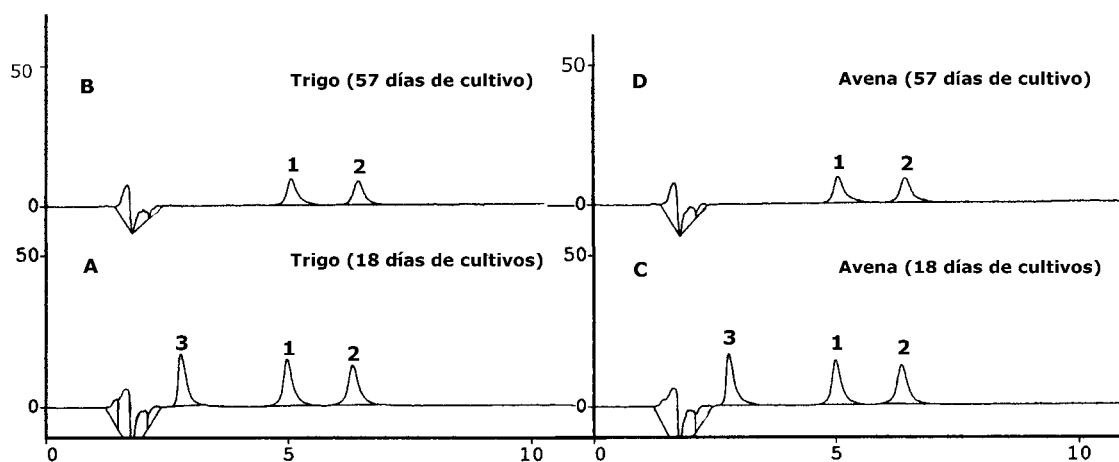
Pico 3

Fig.V.5. Cromatograma de HPLC y espectros UV-Vis correspondientes a la disolución nutritiva inicial. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.



		Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. Fe (M) en D.N.
TOMATE	A	1	d,l-racémico	5'1	224177	1'82·10 ⁻⁵
		2	meso	6'5	213420	1'73·10 ⁻⁵
		Total	--	--	437597	3'55·10⁻⁵
		3	--	2'8	196317	--
PIMIENTO	C	1	d,l-racémico	5'0	223787	1'82·10 ⁻⁵
		2	meso	6'4	210091	1'70·10 ⁻⁵
		Total	--	--	433878	3'52·10⁻⁵
		3	--	2'8	202347	--
PIMIENTO	D	1	d,l-racémico	4'7	204500	1'39·10 ⁻⁵
		2	meso	6'0	154908	1'05·10 ⁻⁵
		Total	--	--	359408	2'44·10⁻⁵

Fig.V.6. Cromatogramas correspondientes a la disolución nutritiva con plantas de estrategia I. A: primera toma de muestra cultivo de tomate; B: tomate tras 32 días de cultivo; C: primera toma de muestra cultivo de pimienta; D: pimienta tras 46 días de cultivo. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.



		Picos	Isómeros	Tiempo (min)	Área	Conc. Fe (M) en D.N.
TRIGO	A	1	d,l-racémico	4'9	219049	$1'78 \cdot 10^{-5}$
		2	meso	6'3	206705	$1'69 \cdot 10^{-5}$
		Total		--	425754	$3'47 \cdot 10^{-5}$
		3	--	2'8	208232	--
TRIGO	B	1	d,l-racémico	5'0	133877	$0'99 \cdot 10^{-5}$
		2	meso	6'4	129729	$0'95 \cdot 10^{-5}$
		Total		--	263606	$1'94 \cdot 10^{-5}$
AVENA	C	1	d,l-racémico	5'0	221085	$1'80 \cdot 10^{-5}$
		2	meso	6'3	208808	$1'70 \cdot 10^{-5}$
		Total		--	429893	$3'50 \cdot 10^{-5}$
		3	--	2'8	216282	--
AVENA	D	1	d,l-racémico	5'0	148992	$1'09 \cdot 10^{-5}$
		2	meso	6'4	132558	$0'97 \cdot 10^{-5}$
		Total		--	281551	$2'06 \cdot 10^{-5}$

Fig.V.7. Cromatogramas correspondientes a la disolución nutritiva con plantas de estrategia II. A: primera toma de muestra cultivo de trigo; B: trigo tras 57 días de cultivo; C: primera toma de muestra cultivo de avena; D: avena tras 57 días de cultivo. Pico 1: isómero d,l-racémico; Pico 2: isómero meso.

A partir de las áreas de los picos 1 y 2 obtenidas para cada una de las muestras de disolución nutritiva tomadas a lo largo del ensayo, se determinaron los moles de Fe perdidos, tanto de quelato como de cada uno de los isómeros con el paso del tiempo. A estos valores se les restaron los moles de Fe perdidos en el blanco así como aquellos moles que se habían eliminado de la disolución como consecuencia de la toma de muestra. De este modo se calcularon los moles de Fe que realmente habían tomado las plantas. Una vez obtenidos estos datos se sometieron mediante el programa informático Origin (versión 6.0) a un tratamiento (smoothing Adjacent Averaging of 2 points) que permitió definir más claramente la tendencia marcada por cada una de las especies en estudio a la hora de absorber el Fe de la disolución. Los valores obtenidos tras aplicar este tratamiento se muestran en las Fig.V.8, V.9, V.12 y V.13.

Plantas de Estrategia I

En las Fig.V.8 y V.9 se representa el número de moles de Fe consumidos por las plantas de tomate y pimiento con el paso del tiempo. En ellas se observa que las dos plantas de estrategia I toman preferentemente el Fe que está en forma de isómero meso, sin embargo, el comportamiento de estos dos cultivos no es del todo igual.

La primera diferencia observada es que en el cultivo de tomate, los vegetales absorben el Fe de la disolución tanto en forma de isómero d,l-racémico como de meso, aunque de este último en mayor proporción (Fig.V.8). Sin embargo, las plantas de pimiento únicamente toman el Fe que pueda estar en forma de isómero meso, siendo el consumo de d,l-racémico prácticamente nulo (Fig.V.9).

Por otro lado, en el tomate, durante los primeros días de cultivo tiene lugar un aumento progresivo de las necesidades de Fe en la planta mientras que a partir de los 21 días, la toma se hace prácticamente constante hasta el final del ensayo. En consecuencia, el proceso de toma de Fe por parte de

las plantas de tomate viene descrito por una única etapa. Sin embargo, en la Fig.V.9 se aprecia claramente que la curva que describe el comportamiento de las plantas de pimiento está formado por la suma de dos procesos diferentes. Así, durante los primeros días de cultivo también se produce un aumento en el número de moles de Fe tomados por el vegetal hasta que a los 35 días, se alcanza un máximo en el que el consumo se hace prácticamente constante (primera etapa). Seguidamente, entre los días 42 y 53 la toma de este nutriente vuelve a aumentar bruscamente y tras 57 días, se hace de nuevo constante (segunda etapa). Es de señalar que cada una de estas etapas podrían coincidir con diferentes estados fenológicos por los que atraviesa el vegetal (floración, cuajado, fructificación, etc...) en las que los requerimientos de Fe son diferentes.

A fin de establecer la cinética de toma de Fe por las plantas de estrategia I, los datos experimentales (Tabla.IX.16 del Anexo.IX.2) se ajustaron a las diferentes ecuaciones propuestas en el Apartado.V.1.1 de Materiales y Métodos. En el caso del cultivo de tomate, como el proceso consta de una sola etapa, los datos experimentales se ajustaron a la ecuación (V.5). De igual modo, la cinética que las plantas de pimiento muestran en cada una de las etapas también fue descrita por esta misma ecuación. En cambio, para determinar la cinética del proceso global de la toma de Fe en el cultivo de pimiento, los datos experimentales (Tabla.IX.16 del Anexo.IX.2) se ajustaron a la ecuación (V.1).

En las Tablas.V.2 y V.3 se recogen los valores de los parámetros cinéticos calculados para los dos cultivos en estudio donde, $(\text{moles Fe})_{\text{eq}}$ es la cantidad de moles de Fe tomados por la planta en el equilibrio, $\tau_{1/2}$ es el tiempo necesario para alcanzar la mitad de $(\text{moles Fe})_{\text{eq}}$, $V_{\tau_{1/2}}$ es la velocidad que desarrolla el vegetal a la hora de captar el Fe de la disolución a un tiempo $\tau_{1/2}$ y R^2 son los coeficientes de correlación.

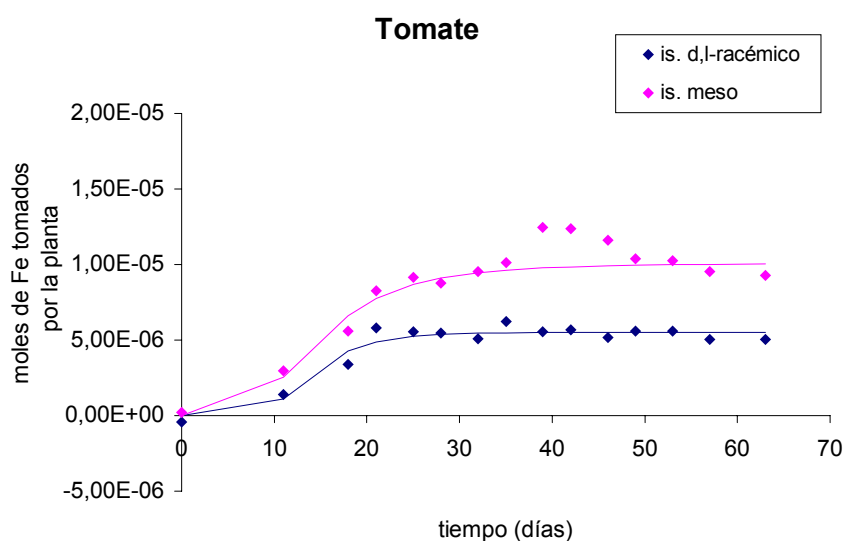


Fig.V.8. Moles de Fe tomados por las plantas de tomate con el paso del tiempo

Tabla.V.2. Parámetros cinéticos para el cultivo de tomate.

Tomate	Isómero	(molesFe) _{eq}	$\tau_{1/2}$ (días)	$V\tau_{1/2}$ (molesFe/día)	R ²
Total	Racémico	$5'5 \cdot 10^{-6} \pm 0'2 \cdot 10^{-6}$	14 ± 1	$5 \cdot 10^{-7} \pm 2 \cdot 10^{-7}$	0'9306
	Meso	$10'1 \cdot 10^{-6} \pm 0'1 \cdot 10^{-6}$	$15'0 \pm 0'8$	$6 \cdot 10^{-7} \pm 2 \cdot 10^{-7}$	0'9711

De acuerdo con los resultados de la Tabla.V.2, las plantas de tomate consumen el Fe procedente de ambos isómeros aunque con la diferencia de que cuando la disolución alcanza el equilibrio, la cantidad de moles de Fe tomados en forma de isómero meso ($10'1 \cdot 10^{-6}$ moles de Fe) es el doble de la de d,l-racémico ($5'5 \cdot 10^{-6}$ moles de Fe); confirmando que el consumo de hierro en este tipo de cultivo se produce preferentemente en forma del isómero menos estable.

Con respecto al $\tau_{1/2}$, ambos isómeros presenta un valor de muy similar (Tabla.V.2), lo que parece lógico ya que como se muestra en la

Fig.V.8, el comportamiento de dichos isómeros a lo largo de todo el ensayo es paralelo.

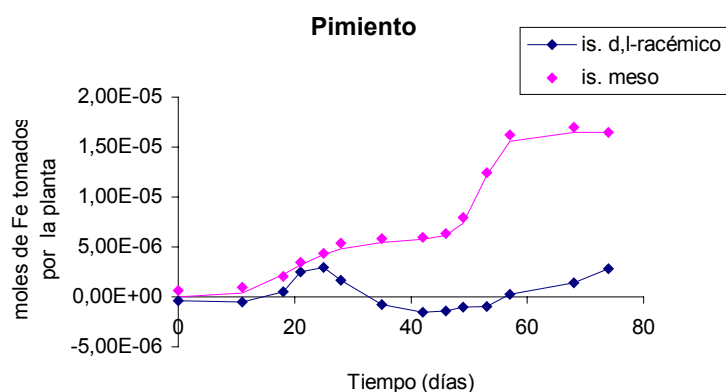


Fig.V.9. Moles de Fe tomados por las plantas de pimiento con el paso del tiempo

Tabla.V.3. Parámetros cinéticos para el cultivo de pimiento.

Pimiento	Isómero	(molesFe) _{eq}	$\tau_{1/2}$ (días)	$V\tau_{1/2}$ (molesFe/día)	R ²
Etap 1	Racémico	--	--	--	--
	Meso	$7 \cdot 10^{-6} \pm 1 \cdot 10^{-6}$	21 ± 3	$3 \cdot 10^{-7} \pm 2 \cdot 10^{-7}$	0'9675
Etap 2	Racémico	--	--	--	--
	Meso	$10'8 \cdot 10^{-6} \pm 0'2 \cdot 10^{-6}$	$52'1 \pm 0'2$	$14 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-7}$	0'9981
Total	Racémico	--	--	--	--
	Meso	$17 \cdot 10^{-6} \pm 1 \cdot 10^{-6}$	--	--	0'9971

En referencia al cultivo del pimiento, es de destacar que únicamente se ha podido determinar la cinética de la toma del Fe en forma de isómero meso ya que el consumo de d,l-racémico, es prácticamente nulo (Tabla.V.3).

De las dos etapas en que se divide el proceso (Tabla.V.3), en la segunda ($10,8 \cdot 10^{-6}$ moles) la toma de este nutriente es superior que en la primera ($7 \cdot 10^{-6}$ moles), lo que puede ser debido a que durante la etapa 1 el tamaño de planta sea pequeño y el requerimiento de nutrientes sea menor que en la etapa 2, donde el cultivo está mucho más desarrollado o incluso, que en la segunda etapa fenológica por la que atraviesa el vegetal las necesidades de Fe sean superiores a las de la primera.

Cuando se comparan los valores de $\tau_{1/2}$ que muestran las plantas de estrategia I, se observa que el valor de este parámetro en las dos etapas en las que se divide el cultivo de pimiento (Tabla.V.3) es muy superior que el obtenido para el tomate (tanto para el isómero d,l-racémico como para el meso). Por tanto, durante los primeros días del ensayo el consumo de Fe en las plantas de tomate fue superior al del pimiento, lo que puede ser debido a que las plantas de tomate sufriesen un rápido crecimiento vegetativo. Este comportamiento podría explicar el hecho de que el proceso de toma de Fe por parte de las plantas de pimiento venga descrito por dos etapas mientras que en las de tomate sólo exista una, ya que si el desarrollo del tomate ha sido tan rápido, puede que estas etapas se hayan solapado y que no sea posible su identificación.

Por otro lado, a partir del programa informático Origin (versión 6.0) se calculó la derivada de las curvas representadas en las Fig.V.8 y V.9. La curva resultante permitió conocer como era la variación de la velocidad con que las plantas de estrategia I absorben el Fe de la disolución a lo largo del cultivo (Fig.V.10 y V.11).

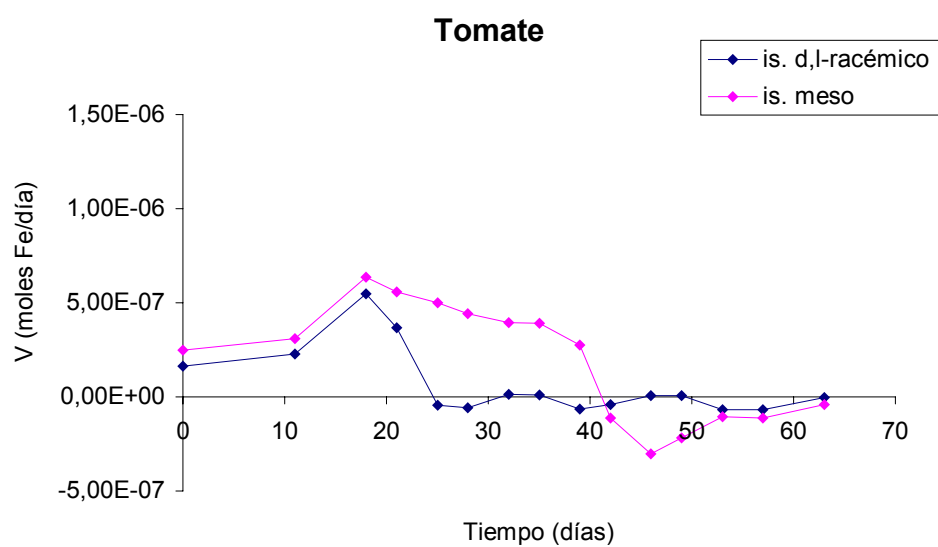


Fig.V.10. Variación en la velocidad de toma de Fe en el cultivo de tomate con el paso del tiempo.

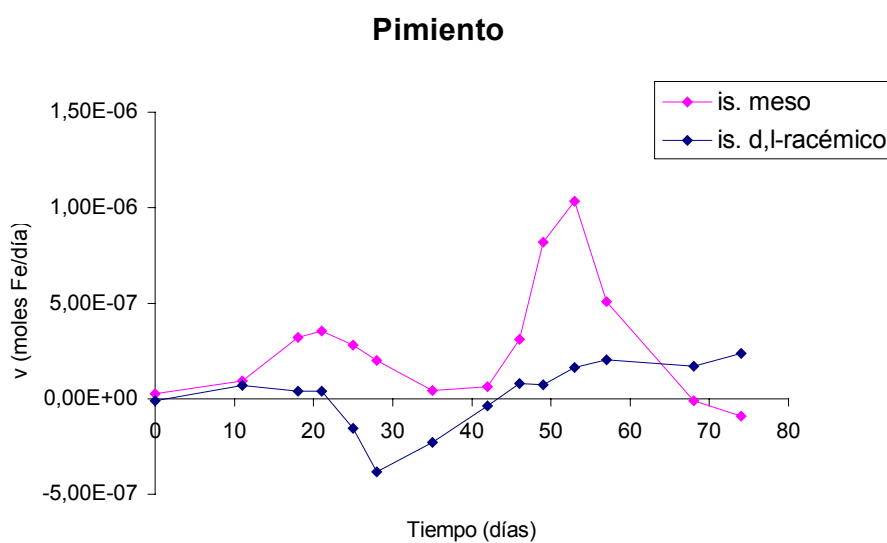


Fig.V.11. Variación en la velocidad de toma de Fe en el cultivo de pimiento con el paso del tiempo.

Del análisis de los resultados representados en las Fig.V.10 y V.11 se deduce que en general, la velocidad con que las plantas de tomate y pimiento consumen el Fe en forma de isómero meso es superior a la del d,l-racémico. Es más, en el caso del pimiento, la velocidad con que el vegetal toma el Fe en forma de d,l-racémico es prácticamente cero durante todo el ensayo, lo que es indicativo de que esta especie únicamente va a ser capaz de consumir el Fe que proviene del isómero de menor estabilidad.

Es de destacar que mientras que en la gráfica correspondiente al cultivo de tomate únicamente se observa un máximo en la velocidad (Fig.V.10), el cultivo de pimiento presenta dos, el primero a los 21 días y el segundo a los 53 días de haberse iniciado el ensayo. Estos máximos corresponderían a la máxima velocidad de toma del Fe en cada una de las diferentes etapas que describen el comportamiento de la planta en la Fig.V.9.

Por otro lado, de la comparación de las curvas de velocidad con que ambos cultivos consumen el Fe en forma de isómero meso, se observa que para del tomate (Fig.V.10) el máximo es tan ancho que podría englobar a los dos máximos encontrados para el pimiento (Fig.V.11). Este hecho podría confirmar que un rápido crecimiento vegetativo en las plantas de tomate puede haber provocado que las dos etapas que se diferencian en el cultivo de pimiento, se hayan solapado.

Plantas de estrategia II

A partir datos representados en las Fig.V.12 y V.13, se deduce que las plantas de trigo y avena consumen el Fe de la disolución tanto en forma de isómero meso como de d,l-racémico, siendo el comportamiento de ambos isómeros muy similar. Esta tendencia difiere de la encontrada para las plantas de estrategia I en las que la toma de este nutriente se producía preferentemente en forma del isómero de menor estabilidad (meso).

Como ocurría en el cultivo de pimiento (Fig.V.9), las curvas que describen el comportamiento de las plantas de estrategia II parecen estar formadas por la suma de dos procesos diferentes (Fig.V.12 y Fig.V.13) los cuales, como se ha mencionado anteriormente, podrían coincidir con distintas etapas fenológicas del vegetal en las que las necesidades de Fe fuesen diferentes.

Para conocer la cinética del proceso global de toma de hierro por parte de las plantas de trigo y avena así como, la de cada una de las etapas en las que se divide dicho proceso, los datos experimentales (Tabla.IX.17 del Anexo.IX.2) se ajustaron a las ecuaciones (V.1) y (V.5) respectivamente (Apartado.V.1.1. del Materiales y métodos).

A la vista de los parámetros cinéticos recogidos en la Tabla.V.4, en la primera etapa del cultivo de trigo, la cantidad de moles de Fe consumidos en forma de meso es igual a la de d,l-racémico (Tabla.V.4). Con respecto a la etapa 2, cabe destacar que el valor de $(\text{moles Fe})_{\text{eq}}$ para el isómero d,l-racémico es el doble que el del meso (Tabla.V.4), sin embargo, la gran dispersión que encontramos en los datos experimentales provocan que no existan diferencias estadísticas entre estos dos parámetros y por tanto, que tal y como ocurría en la etapa 1, el consumo de Fe sea estadísticamente igual, independientemente del isómero que esté presente en la disolución nutritiva.

Por otro lado, a diferencia de lo ocurrido para el cultivo de pimiento, el consumo de ambos isómeros en la primera etapa es igual que en la segunda (Tabla.V.4). Sin embargo, los valores de $\tau_{1/2}$ alcanzados en la etapa 1 son inferiores a los de la etapa 2 y como consecuencia, la velocidad con la que las plantas de trigo toman el Fe de la disolución es superior en la primera etapa (Tabla.V.4).

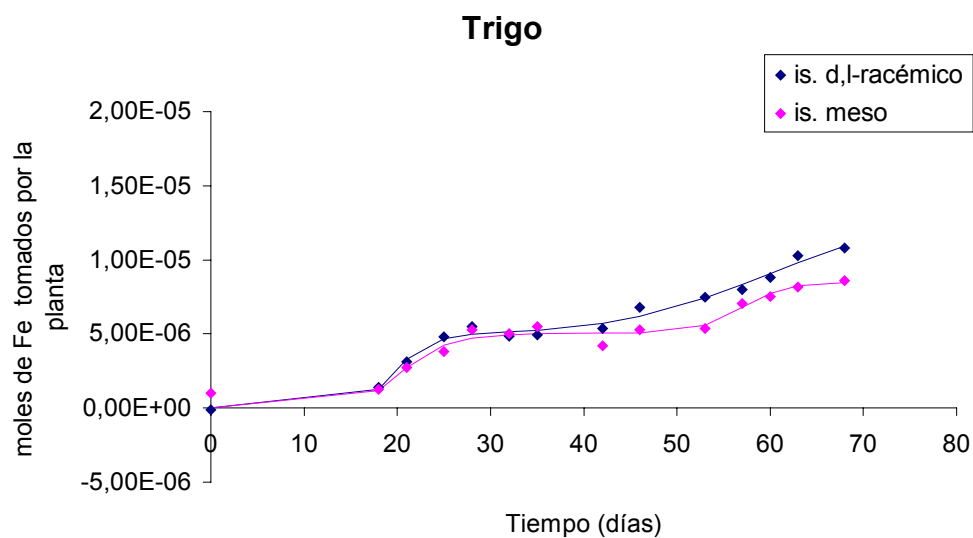


Fig.V.12. Moles de Fe tomados por las plantas de trigo con el paso del tiempo.

Tabla.V.4. Parámetros cinéticos para el cultivo de Trigo.

Trigo	Isómero	(molesFe) _{eq}	$\tau_{1/2}$ (días)	$V\tau_{1/2}$ (molesFe/día)	R ²
Etapa 1	Racémico	$5'2 \cdot 10^{-6} \pm 0'3 \cdot 10^{-6}$	$20'1 \pm 0'5$	$7 \cdot 10^{-7} \pm 2 \cdot 10^{-7}$	0'9869
	Meso	$5'6 \cdot 10^{-6} \pm 0'7 \cdot 10^{-6}$	$21'1 \pm 0'5$	$5 \cdot 10^{-7} \pm 3 \cdot 10^{-7}$	0'9361
Etapa 2	Racémico	$10 \cdot 10^{-6} \pm 5 \cdot 10^{-6}$	64 ± 11	$2 \cdot 10^{-7} \pm 2 \cdot 10^{-7}$	0'9685
	Meso	$5 \cdot 10^{-6} \pm 1 \cdot 10^{-6}$	57 ± 3	$2 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-7}$	0'9579
Total	Racémico	$15 \cdot 10^{-6} \pm 6 \cdot 10^{-6}$	--	--	0'9885
	Meso	$9 \cdot 10^{-6} \pm 1 \cdot 10^{-6}$	--	--	0'9622

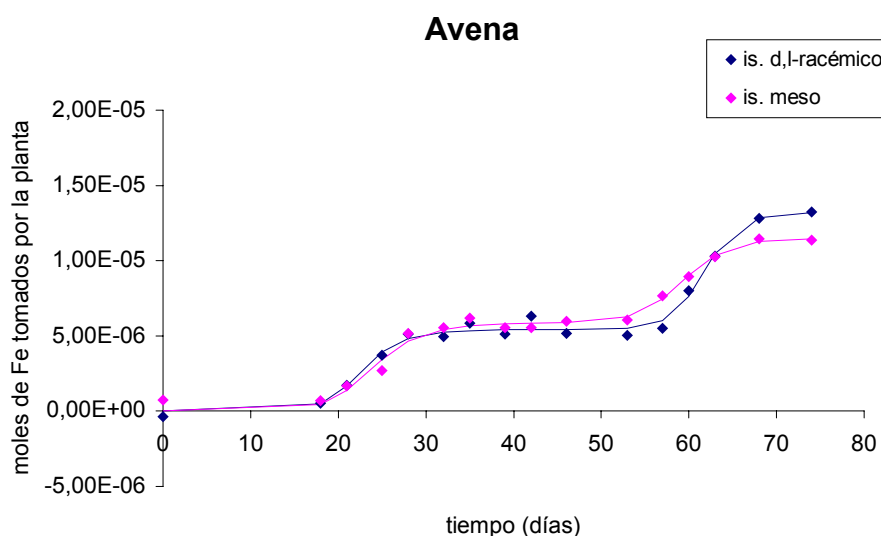


Fig.V.13. Moles de Fe tomados por las plantas de avena con el paso del tiempo.

Tabla.V.5. Parámetros cinéticos para el cultivo de Avena.

Avena	Isómero	(molesFe) _{eq}	$\tau_{1/2}$ (días)	$V\tau_{1/2}$ (molesFe/día)	R ²
Etapa 1	Racémico	$5'5 \cdot 10^{-6} \pm 0'2 \cdot 10^{-6}$	$24,1 \pm 0,6$	$11 \cdot 10^{-7} \pm 5 \cdot 10^{-7}$	0'9689
	Meso	$6'1 \cdot 10^{-6} \pm 0'6 \cdot 10^{-6}$	24 ± 1	$5 \cdot 10^{-7} \pm 2 \cdot 10^{-7}$	0'9539
Etapa 2	Racémico	$8'2 \cdot 10^{-6} \pm 0'2 \cdot 10^{-6}$	$61'6 \pm 0'3$	$10 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-7}$	0'9960
	Meso	$6'0 \cdot 10^{-6} \pm 0'2 \cdot 10^{-6}$	$59'0 \pm 0'4$	$5'1 \cdot 10^{-7} \pm 0'7 \cdot 10^{-7}$	0'9945
Total	Racémico	$13'2 \cdot 10^{-6} \pm 0'7 \cdot 10^{-6}$	--	--	0'9901
	Meso	$11'5 \cdot 10^{-6} \pm 0'7 \cdot 10^{-6}$	--	--	0'9883

Con respecto al cultivo de avena (Tabla.V.5), el comportamiento mostrado en la primera etapa es muy parecido al del trigo (Tabla.V.4), ya que este vegetal ha consumido la misma cantidad de moles de meso que de d,l-racémico en el equilibrio, siendo el valor de $\tau_{1/2}$ estadísticamente igual para ambos isómeros. Por el contrario, en la etapa 2 los valores de (molesFe)_{eq} y $\tau_{1/2}$ que presenta el isómero meso son estadísticamente

inferiores a los de d,l-racémico (Tabla.V.5) y por tanto, la toma de Fe en forma del isómero de mayor estabilidad es ligeramente superior y se produce a una mayor velocidad que en forma de meso.

Como ocurría en los cultivos de pimiento y trigo, los valores de $\tau_{1/2}$ que ambos isómeros presentan en la segunda etapa son superiores a los de primera, de lo que se deduce que la etapa 2 debe ser la más lenta (Tabla.V.5).

Del mismo modo que para las plantas de estrategia I, se calculó la derivada de la curva en la que se había representado los moles de Fe consumidos por el trigo y la avena con el paso del tiempo (Fig.V.12 y V.13). Las curvas resultantes muestran la variación de la velocidad con que las plantas de estrategia II toman el Fe de la disolución (Fig.V.14 y V.15).

Como se observa en las Fig.V.14 y V.15, la velocidad de toma de los isómeros que componen el FeEDDHA muestra dos máximos, los cuales se corresponden a las diferentes etapas en las que se divide el proceso de absorción del Fe (Tabla.V.4 y V.5). Estos máximos se alcanzan en un periodo de tiempo que coincide con el valor de $\tau_{1/2}$ que las plantas de trigo y avena presentan en cada una de estas etapas (Tabla.V.4 y V.5), por lo que el valor de $V_{\tau_{1/2}}$ debe coincidir con la velocidad máxima con el que estos vegetales toman el Fe de la disolución en dichas etapas.

Por otro lado, es de destacar que para el cultivo de trigo, la velocidad con que el vegetal toma el Fe de la disolución será muy similar para ambos isómeros. Este comportamiento también se observa en la etapa 1 del cultivo de avena sin embargo en la etapa 2, la máxima velocidad alcanzada por el isómero d,l-racémico será prácticamente el doble de la del meso, resultados que se corroboran con los valores de $V_{\tau_{1/2}}$ recogidos en la Tabla.V.5.

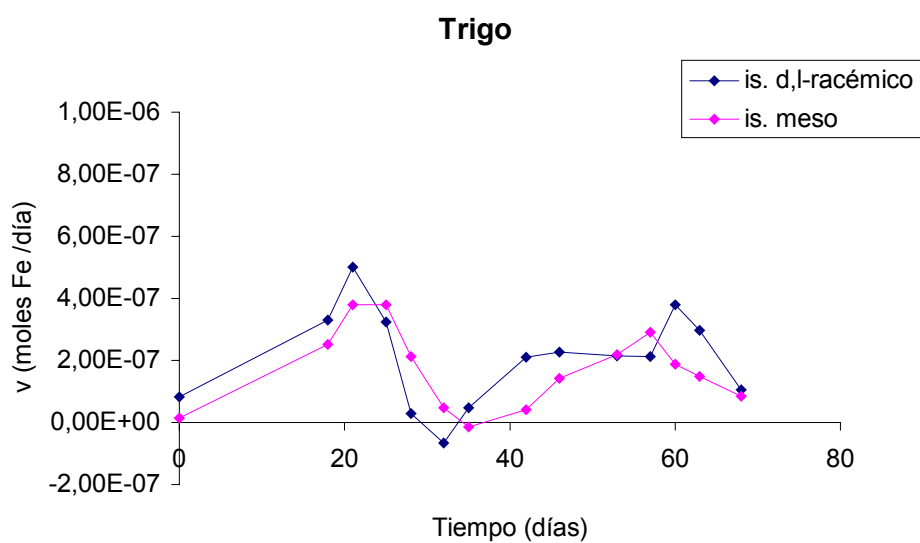


Fig.V.14. Variación en la velocidad de toma de Fe en el cultivo de trigo con el paso del tiempo.

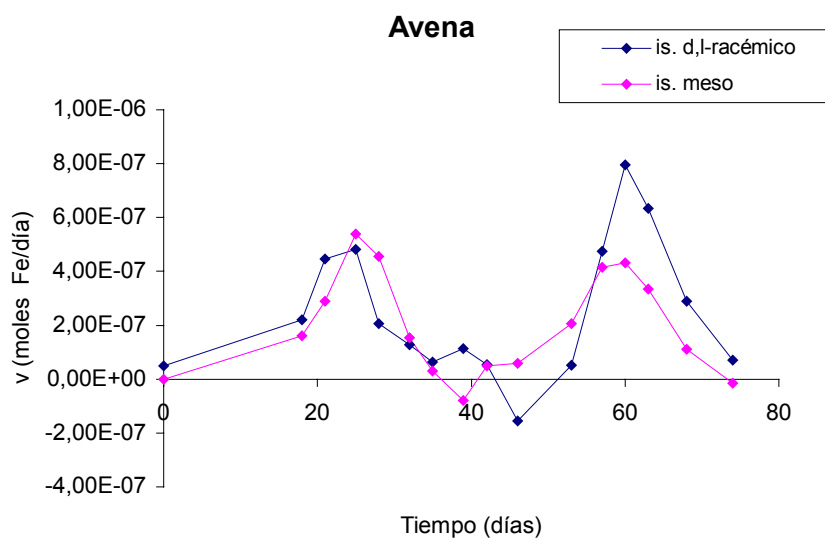


Fig.V.15. Variación en la velocidad de toma de Fe en el cultivo de Avena con el paso del tiempo.

Variación de la concentración de H⁺ en la disolución nutritiva.

En esta experiencia, además de estudiar como es la toma del Fe procedente de los isómeros del FeEDDHA por parte de las plantas de estrategia I y II, también se determinó como era la evolución del valor de pH de la disolución. El motivo de realizar el control de este parámetro es que como se indicó en la Introducción, uno de los mecanismos desarrollados por las plantas de estrategia I deficientes de Fe, es el descenso del pH de la disolución en la que crecen para de esta forma incrementar la concentración de Fe soluble del suelo y la actividad de la reductasa turbo.

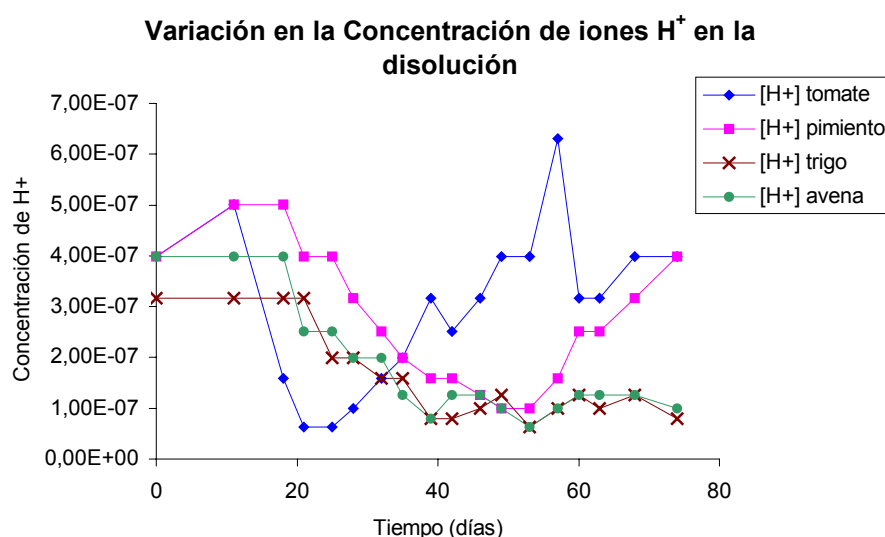


Fig.V.16. Evolución del contenido de iones H⁺ en la disolución nutritiva con el paso del tiempo.

En la Fig.V.16 se ha representado la variación de la concentración de protones en las muestras de disolución nutritiva que se tomaron a lo largo del ensayo para las cuatro especies vegetales en estudio (Tabla.IX.18 del Anexo.IX.2). En ellas se observa que para las plantas de estrategia I, a medida que aumenta el tiempo de cultivo y la deficiencia de Fe se hace

mayor, la concentración de iones H^+ en disolución aumenta de forma considerable. En consecuencia, se confirma que en este tipo de plantas se produce la activación de una bomba de protones, siendo su efectividad muy evidente. Por el contrario, en los cultivos de trigo y avena la concentración de iones H^+ irá decreciendo paulatinamente conforme el tiempo de cultivo aumente.

Las diferencias observadas en la evolución de la concentración de protones en los cultivos de tomate y pimiento pueden ser atribuidas a que como hemos visto a lo largo de este ensayo, el consumo de Fe por parte de las plantas de tomate fue mucho más rápido que en las plantas de pimiento. Esto ha debido provocar que las deficiencias de Fe en el cultivo de tomate aparezcan en un menor periodo de tiempo, y en consecuencia, que la activación de los mecanismos de respuesta ante este estrés aparezcan mucho antes.

Discusión.

De todo lo expuesto hasta el momento se deduce que dependiendo del tipo de estrategia que desarrolle el vegetal, la toma del Fe procedente de los isómeros que componen el FeEDDHA (isómero d,l-racémico y meso) será diferente.

Las dos plantas de estrategia I empleadas en este estudio (tomate y pimiento), consumen preferentemente el Fe que está en forma de isómero meso, es más, en el caso del pimiento únicamente toma el Fe que proviene de este isómero.

Para que las plantas de tomate y pimiento tomen el hierro de la disolución, éste debe estar en la forma Fe(II). Sin embargo, el quelato está constituido por Fe(III). Por tanto, es necesario que se produzca reducción de Fe (III) a Fe(II) y la ruptura del quelato. Como el isómero meso es 500 veces menos estable que el d,l-racémico (Bannochie y Martell, 1989), a la

planta le supone un menor gasto energético destruir el isómero de menor estabilidad, lo que explicaría que la toma de Fe en forma del isómero meso fuese superior a la de d,l-racémico.

En cuanto a las plantas de estrategia II, parece ser que la toma de Fe se produce indistintamente del isómero que esté presente en la disolución. La explicación a este hecho podría estar en que, a diferencia de lo que ocurre con las plantas de estrategia I, los fitosideróforos presentes en la disolución competirán con el agente quelante EDDHA por el Fe provocando finalmente, la formación del Fe(III)-fitosideróforo. Se ha de tener en cuenta que este complejo es específico para la toma del Fe en este tipo de plantas y por tanto, los equilibrios estarán desplazados en el sentido de la formación del Fe-fitosideróforo en lugar de la del FeEDDHA.

El que los fitosideróforos puedan captar el Fe que se encuentra en forma de isómero meso con la misma facilidad que cuando está como d,l-racémico dependerá de las constantes de estabilidad, de las concentraciones relativas y de la labilidad que presenten tanto los isómeros como los fitosideróforos en las condiciones del medio.

Por los datos recogidos en la bibliografía (Murakami et al., 1989), los fitosideróforos presentan una constante de estabilidad del orden de la de los isómeros que componen el quelato sin embargo, hay que tener en cuenta que este valor variará dependiendo del tipo de fitosideróforo segregado por la planta. En cuanto a la labilidad, tanto los isómeros de FeEDDHA como los fitosideróforos forman complejos hexacoordinados con el Fe, los cuales son compuestos bastante inertes. En consecuencia, la competencia entre ambos isómero y el fitosideróforo debe ser similar explicando el comportamiento que hemos observado a lo largo del ensayo para las plantas de estrategia II.

