

Universitat Autònoma de Barcelona  
Servei de Biblioteques



1500411008

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE CIENCIAS

CATEDRA DE FISILOGIA VEGETAL

"Efectos del Cromo sobre la nutrición y relaciones hídricas de Phaseolus vulgaris"

Vº. Bº.

Los directores de la Tesis



Dr. Juan Barceló Coll



Dra. Charlotte Poschenrieder



Tesis presentada por D. Benito Gursé Forcadell para optar al grado de Doctor en Ciencias.



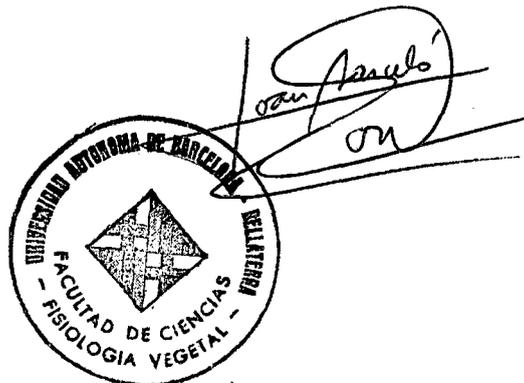
Bellaterra, Marzo de 1.987

JUAN BARCELÓ COLL, CATEDRÁTICO DE FISIOLÓGIA VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

C E R T I F I C A :

Que el presente trabajo titulado "Efectos del cromo sobre la nutrición y las relaciones hídricas de Phaseolus vulgaris" ha sido realizado en la cátedra de Fisiología Vegetal, bajo mi dirección y la co-dirección de la Dra. Charlotte Poschenrieder, Prof. Titular de Fisiología Vegetal, por D. Benito Gunsé Forcadell y constituye su tesis para optar al grado de Doctor.

Para que así conste a efectos académicos, firmo el presente certificado en Bellaterra a trece de marzo de mil novecientos ochenta y siete.



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Prof. Dr. Joan Barceló Coll, catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona y a la Dra. Charlotte Poschenrieder, profesora Titular de esta misma Facultad, ambos directores del presente trabajo, su gran ayuda y constante estímulo a la vez que la confianza depositada en mí al haberme permitido iniciar este trabajo.

Asimismo, quiero expresar mi gratitud al Dr. Jaume Terrades, catedrático de Ecología de esta misma Facultad por haber permitido desinteresadamente la realización de las medidas de potencial hídrico y área foliar en su laboratorio.

También quisiera agradecer al Dr. Oriol Marfà y al Dr. Robert Savé del Servei d'Investigacions agràries de la Generalitat de Catalunya la ayuda prestada en la determinación del potencial osmótico, realizada en dicho Centro.

Mi agradecimiento también es para la Dra. Rosa Flos, catedrática de Fisiología Animal, por las determinaciones espectrofotométricas, así como al servei d'espectroscòpia de la Universitat de Barcelona,

Al Departamento de cristalografía de la Sección de Geología de esta misma Facultad quiero expresar mi agradecimiento por su colaboración en las medidas mediante espectrofotometría de absorción atómica, así como al departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de esta Universidad por haber permitido la realización de las fotografías mediante microscopía óptica en su Departamento.

Quisiera también dar las gracias a todos los miembros de la Cátedra de Fisiología Vegetal y Edafología por la ayuda prestada a lo largo de este trabajo.

Finalmente, quisiera tener un recuerdo para todos aquellos amigos que, de una forma u otra, se han interesado por mi trabajo.

A M I S P A D R E S

# I N D I C E

## Página

### 1) I N T R O D U C C I O N

1.1 Metales pesados: definición y su relación con el medio ambiente y los vegetales .....	1
1.2 Propiedades químicas del cromo .....	4
1.3 Presencia del cromo en el medio ambiente. fuentes, estado y contenidos de cromo en el medio .....	7
1.3.1 El cromo en el suelo .....	7
1.3.2 El cromo en el agua y los sedimentos .....	9
1.3.3 El cromo en la atmósfera.....	10
1.4 Esencialidad y toxicidad del cromo para los animales .....	11
1.4.1 Esencialidad .....	11
1.4.2 Toxicidad .....	12
1.5 El cromo y los vegetales: esencialidad y fitotoxicidad .....	14
1.5.1 Absorción y transporte .....	14
1.5.2 Efectos fisiológicos: esencialidad .....	15
1.5.3 Efectos fitotóxicos .....	16
1.6 Relaciones hídricas .....	19
1.6.1 Parámetros que miden las relaciones hídricas	19

1.6.2	Elasticidad y plasticidad de la pared celular	21
1.6.3	Variaciones de los distintos parámetros de las relaciones hídricas .....	22
1.6.4	Significado fisiológico de los parámetros hídricos .....	23
1.6.5	Metales pesados y relaciones hídricas .....	26
2)	<u>OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO</u> .....	28
3)	<u>MATERIAL Y METODOS</u>	
3.1	Condiciones de cultivo y tipo de tratamientos .....	31
3.1.1	Experiencia I: Medida de niveles de nutrientes	31
3.1.2	Experiencia II: Medida de parámetros hídricos (Potenciales y elasticidad) .....	32
3.1.3	Experiencia III: Medida de transpiración y apertura estomática .....	34
3.2	Determinaciones analíticas .....	37
3.2.1	Determinación del crecimiento .....	37
3.2.2	Digestión de las muestra para determinaciones analíticas .....	38
3.2.3	Determinación de Na y K por fotometría de llama .....	38
3.2.4	Determinación de elementos mediante espectrofotometría de absorción atómica .....	39
3.2.5	Determinación del Mo mediante plasma .....	40

3.2.6	Determinación espectrofotométrica del P	41
3.2.7	Determinación del potencial hídrico ...	41
3.2.8	Medida del potencial osmótico .....	42
3.2.9	Medición del contenido hídrico relativo	43
3.2.10	Medida de la transpiración .....	43
3.2.11	Obtención de téplicas de la epidermis fo liar y medición del grado de apertura y densidad estomáticas .....	44
3.2.12	Medida del grado de apertura y densidad estomáticas .....	45
3.2.13	Análisis estadístico .....	45

#### 4) RESULTADOS Y DISCUSION

4.1	Experiencia I .....	46
4.1.1	Curso del crecimiento y desarrollo .....	46
4.1.2	Efectos sobre el crecimiento .....	47
4.1.2.1	Raíces .....	47
4.1.2.2	Parte aérea .....	47
4.1.3	Efectos sobre el contenido en cromo .....	48
4.1.4	Efectos sobre los diferentes nutrientes ...	51
4.1.4.1	Efectos sobre el P .....	51
4.1.4.2	Efectos sobre el K .....	53
4.1.4.3	Efectos sobre el Na .....	55
4.1.4.4	Efectos sobre la relación K/Na ..	55

4.1.4.5	Efectos sobre el Ca .....	56
4.1.4.6	Efectos sobre el Mg .....	57
4.1.4.7	Efectos sobre la relación Na/P .	58
4.1.4.8	Efectos sobre la relación K/P ..	58
4.1.4.9	Efectos sobre la relación Ca/P .	59
4.1.4.10	Efectos sobre la relación Mg/P .	59
4.1.4.11	Efectos sobre el Fe .....	60
4.1.4.12	Efectos sobre el Mn .....	62
4.1.4.13	Efectos sobre la relación Fe/Mn .	63
4.1.4.14	Efectos sobre el Zn .....	64
4.1.4.15	Efectos sobre el Cu .....	65
4.1.4.16	Efectos sobre el Mo .....	65
4.2	Experiencia II .....	106
4.2.1	Curso del crecimiento y desarrollo .....	106
4.2.2	Efectos sobre el crecimiento .....	109
4.2.3	Efectos del cromo sobre el contenido hídrico relativo, potencial hídrico, potencial osmótico y potencial de presión bajo suministro hídrico adecuado.....	117
4.2.4	Efecto del déficit hídrico sobre las plantas sometidas a los diferentes tratamientos con cromo en el medio .....	118
4.3	Experiencia III .....	144
4.3.1	Curso del crecimiento y desarrollo .....	144
4.3.2	Efecto sobre el crecimiento .....	145

4.3.3	Efectos sobre el contenido hídrico relativo, potencial hídrico, potencial osmótico y potencial de presión bajo condiciones de suministro hídrico adecuado y moderado stress osmótico.....	147
4.3.4	Efectos sobre la densidad estomática, grado de apertura estomática y transpiración	150

5)	<u>CONCLUSIONES</u> .....	185
6)	<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	188

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Metales pesados: definición y su relación con el medio ambiente y los vegetales

Se define con el término "metal pesado" a todo aquél cuya densidad supera los 5 g/cm<sup>3</sup> en su forma elemental (55). Las plantas, dentro de sus requerimientos nutritivos, necesitan de algunos de estos metales pesados, como el Fe, Mn, Cu, Zn y Mo (108) y, con toda probabilidad, el Ni (28).

Las funciones de los metales pesados esenciales pueden resumirse en la siguiente forma (108):

- Fe: Interviene en las cadenas de transporte electrónico y ciertos enzimas como la peroxidasa y algunas deshidrogenasas, actuando también en la síntesis de clorofilas en la probable formación de un ferroporfirina como compuesto intermedio.
- Mn: Capaz de activar algunas proteínas transportadoras de fosfatos. Su importancia en este aspecto aún no está claramente demostrada pero su papel parece ser importante al no poder ser substituido enteramente por el Mg o cualquier otro elemento. También interviene en la fotólisis del agua.
- Cu: Componente de algunos metaloenzimas incluyendo la ácido ascorbico oxidasa, fenolasa y citocromo oxidasa. Puede actuar como aceptor intermedio en la oxidación directa de substratos de origen molecular, debido a su capacidad de oxidación y reducción reversible.
- Zn: Interviene en la síntesis del Triptófano, precursor de las Auxinas.
- Mo: Esencial para la fijación del Nitrógeno, y para la asimilación de los nitratos. Posiblemente interviene en algunas reacciones fosforilativas en las que se forman complejos orgánicos de P y Mo.



vocados por un mismo metal.

Se ha propuesto que la toxicidad por metales pesados podría ser debida a una interferencia en el metabolismo (competición por absorción, inactivación de enzimas, desplazamiento de elementos esenciales o alteración de la estructura del agua (31). También podrían afectar la división celular, actuando sobre la replicación de los ácidos nucleicos (5,92). La sensibilidad a los metales pesados puede variar significativamente con la temperatura y la intensidad lumínica (30).

Las plantas presentan mecanismos de defensa frente al exceso de metales pesados como cambios de pH en la zona próxima a la raíz que pueden provocar la insolubilización de ciertos metales pesados. Ciertas variedades de trigo, cebada, arroz y maíz pueden incrementar el pH de su solución nutritiva y provocar la insolubilización y, por tanto, la precipitación del Al (19, 32, 48, 61). Por contra, las variedades sensibles Al disminuyen o no modifican el pH de las soluciones nutritivas y, por tanto, están expuestas a altas concentraciones de Al durante prolongados períodos de tiempo. También existen otros mecanismos como la inmovilización en vacuolas, exclusión activa o la existencia de barreras que impidan la translocación desde la raíz a la parte aérea (31).

Aunque poco se sabe sobre la genética de la resistencia a los metales pesados, se ha observado que hay variaciones de sensibilidad entre variedades diferentes de vegetales cultivados y parece que la poliploidía puede jugar un papel importante a la hora de desarrollar esta resistencia (26,66,73). A pesar de la resistencia al Al mencionada anteriormente, las tolerancias observadas entre soja y judía verde no parecen relacionadas con cambios diferenciales de pH en las zonas próximas a la raíz (33).

## 1.2 Propiedades químicas del cromo

El cromo, descubierto en 1.798 por Vauquelin, presenta una densidad elevada (7,19 g/cm<sup>3</sup> a 20 °C), lo cual le confiere la categoría de metal pesado. Este elemento no se halla libre en la naturaleza pero sí se halla combinado. El mineral más importante del cromo es la cromita, que contiene de un 15 a un 16% de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Según Woolhouse (123), tanto la agrupación de los elementos por su gravedad específica, a la que hace referencia el término de metal pesado, como su situación relativa en la tabla periódica, no son adecuadas para el conocimiento de la actividad biológica de los elementos. Para él es preferible una clasificación basada en la capacidad de formar ligandos, como la propuesta por Nieboer y Richardson (85) según la cual el Cr pertenece a la clase "B": ácidos o iones metálicos que se unen preferentemente a ligandos débiles, aunque otros autores, como Woolhouse (123), lo incluyen en la clase "borderline", que incluye aquellos que pueden formar complejos con una gran variedad de ligandos, no solamente los débiles.

El cromo, en la mayoría de las circunstancias, presenta su estado de oxidación más estable como Cr III. Los compuestos de Cr II son agentes de reducción y los compuestos de Cr VI son agentes de oxidación fuertes. Los dos estados de oxidación más frecuentes en el ambiente, Cr VI y Cr III son fácilmente interconvertibles, dependiendo la dirección de esta interconversión fundamentalmente del pH del medio, de la presencia de condiciones aerobias o anaerobias y de la temperatura. En condiciones ambientales la forma más abundante es, con mucho, la de Cr III. Los compuestos de Cr III frecuentemente sólo son solubles en agua a valores de pH muy bajos y con valores de pH por encima de 5 ó 6 normalmente precipitan en forma de Cr(OH)<sub>3</sub>.

Las propiedades ácido-básicas del Cr varían aumentando la aci

dez con el número de oxidación. El óxido de cromo (CrO) y el hidróxido (Cr(OH)<sub>2</sub>) son básicos, el Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> es anfótero y el CrO<sub>3</sub> es ácido, pudiendo formar ácidos complejos o condensados (isopoliácidos).

Desde el punto de vista termodinámico, el metal cromo es un buen agente de reducción, y cuando está finamente dividido reacciona rápida y completamente con el oxígeno. En estado masivo, sin embargo, el cromo se protege por una delgada capa transparente de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, y es extremadamente resistente a la corrosión.

El cromo III es capaz de formar gran cantidad de complejos bastante inertes, que cinéticamente hablando, tienen mayor estabilidad cinética que termodinámica y se pueden aislar como sólidos. Los complejos mejor conocidos son aminas (CrAm<sub>6-m-n</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>Rm)<sup>(3-m)</sup> donde Am es NH<sub>3</sub> o aminas polidentadas como etilendiamina. R es un ligando ácido tal como haluro, ión nitro o sulfato (82). El Cr III forma complejos polinucleados con puentes de hidróxido o de oxígeno. Ligandos neutros tales como la etilendiamina se unen muy fuertemente. Sillen y Martell (106) indican las constantes de estabilidad de numerosos complejos orgánicos del Cr, entre ellos los del EDTA, de la etilendiamina, de la sulfoxina, de los aminoácidos asparagina, serina, α-alanina y glicina y de los ácidos orgánicos oxálico, succínico y fítico.

Los otros iones di- y tripositivos de los metales de transición también presentan esta propiedad, pero los complejos del Cr III son particularmente estables.

Las soluciones alcalinas del Cr III son fácilmente oxidadas a Cr VI. Las soluciones de cromato (CrO<sub>4</sub><sup>-</sup>) son de color amarillo brillante. Cuando se acidifican estas soluciones se forma el ión dicromato (Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>), el cual es un agente de oxidación muy poderoso, lo cual provoca que las soluciones de ión bicromato sean intrínsecamente inestables con respecto a su descomposición en O<sub>2</sub> y Cr<sup>3+</sup>. Esta reacción es lenta, sin embargo, y las soluciones del ión dicromato se pueden mantener largo tiempo sin una descomposición significativa.

La adición de sales crómicas al ácido sulfúrico concentrado produce una solución de óxido rojo  $\text{CrO}_3$  que tiene propiedades oxidantes extremadamente potentes y se emplea para limpiar la grasa de utensilios químicos de vidrio.

Finalmente, se puede obtener ión cromoso acuoso reduciendo las soluciones de  $\text{Cr}^{3+}$  con el Zn. Estas soluciones reaccionan rápida y cuantitativamente con el oxígeno y se emplean algunas veces para eliminar el oxígeno de una mezcla gaseosa.

### 1.3. Presencia del cromo en el medio ambiente: fuentes, estado y contenidos de cromo en el medio

El único mineral de importancia económica para la producción de cromo es la cromita. Grandes cantidades de cromo se usan en la producción de acero inoxidable, de metales cromados y para la obtención de diversas sustancias químicas, que se emplean en la industria textil como pigmentos, mordientes y tintes, y en la industria del cuero para el curtido de pieles. También se usan en la fabricación de sacarina como catalizadores, en la purificación de aceites y grasas (21) e incluso como anticorrosivos en aguas de refrigeración (128) y en sales de impregnación junto con Cu y F para la protección de la madera contra la podredumbre (36).

#### 1.3.1 El cromo en el suelo

El contenido de cromo en los suelos superficiales varía grandemente y depende del tipo de roca madre, oscilando los valores normales de contenido en Cr en suelos entre 5 y 100 ppm (76,91). Como contenido medio a nivel mundial se indican 65 ppm. Los suelos con mayor abundancia en este metal, los llamados suelos serpentinos, son muy poco productivos desde el punto de vista agrícola y presentan una típica flora de serpentínofitas (27,89,92). Estos suelos se hallan en muchas zonas del mundo, como Escocia, Portugal, Los Balcanes, La U.R.S.S., Japón, Cuba, Africa y los E.E.U.U. (114).

El incremento de la actividad industrial o el aumento de las grandes aglomeraciones urbanas producen una serie de productos industriales ricos en metales pesados, entre ellos el cromo, que en muchas ocasiones se vierten sin tratar y pueden llegar a ser utilizados como aguas de riego en agricultura, con el consiguiente peligro de contaminación que ello comporta. En el caso del cromo proveniente de la actividad in-

trial cabe citar las factorías de lavado de mineral que contiene gangas ricas en metales pesados y la industria del curtido de la piel, que puede utilizar cromo en su tarea. El contenido de cromo en los fangos de las curtidoras varía con el método de curtido, desde un 0,97% en la materia seca en el caso de fangos procedentes de la curtición vegetal, hasta un promedio de un 2,05% en los resultantes de curtición con Cr (63). En el caso de las aglomeraciones urbanas el problema no es tanto de cantidad como de concentración, puesto que todas las aguas residuales se vierten en unos mismos emisores, aguas que una vez depuradas rinden unos fangos ricos en materia orgánica que pueden ser empleados en el abono de tierras de cultivo, con el riesgo que su contenido en metales pesados implica, sobre todo si estos fangos provienen de fábricas de curtido de pieles. En general, el cromo en fangos de depuradoras de aguas residuales suele hallarse en forma de Cr III y se pueden aplicar concentraciones relativamente grandes de estos fangos a suelos agrícolas sin que se produzcan efectos tóxicos. Sin embargo, se han establecido unas normas para evitar el peligo de toxicidad en suelos por al aplicación de fangos de depuradoras. Así, según Seto (102) el contenido máximo tolerable de Cr en suelos de cultivo es de 12 ppm y la adición máxima de 220 Kg/Ha. Chaney indica como máximo contenido permisible de Cr en fangos para su aplicación a suelos agrícolas 1000 ppm. El cromo también puede provenir de los fertilizantes fosfatados, aunque se considera más importante el aporte de cadmio que pueden ocasionar, del compost proveniente de basuras y del uso de combustibles fósiles en centrales eléctricas e industrias siderúrgicas, aunque estos aportes son mucho menores que los efectuados mediante fangos de depuradoras.

El cromo se puede presentar en el suelo en cuatro formas diferentes: como catión  $\text{Cr}^{3+}$  o anión  $\text{CrO}_2^-$  y en dos formas hexavalentes: cromato  $\text{CrO}_4^{2-}$  y dicromato  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ . El catión trivalente presenta una tendencia a coordinar con ligandos del suelo que presenten

agua y nitrógeno, muy estables (10). El cromo se mantiene soluble a pH 5,5 gracias a la presencia de ácido cítrico, ácido dietilendiamin pentaacético (DPA), ácidos fúlvicos y materia orgánica soluble en el agua.

Existen evidencias de que los ácidos fúlvicos juegan un papel más importante que los ácido húmicos en la quelación del cromo (2,51,103,104). Estos ácidos orgánicos se pueden encontrar en estiér col y aguas residuales urbanas e industriales.

La materia orgánica presente en el suelo puede provocar una reducción espontanea del Cr VI a Cr III, dado que este último es mucho más estable químicamente, aunque si hay Mn oxidado en el suelo puede oxidar al Cr, que pasaría de Cr III a Cr VI, actuando el Mn co mo aceptor de electrones. En este caso podrían empeorar los problemas de fitotoxicidad por cromo al aparecer la forma tóxica de dicho metal.

Dado que el Al adsorbe Cr y que esta adsorción puede ser evitada por la presencia de ortofosfato, se supone que el comportamiento del Cr VI en el suelo es parecido al delos ortofosfatos (10, 51,52). Como consecuencia de la alta capacidad de adsorción del cromo, éste suele estar en baja disponibilidad para los vegetales.

### 1.3.2 El cromo en el agua y los sedimentos

El cromo en los sistemas acuoso superficiales se halla fun damentalmente en los sedimentos o en forma particulada en suspensión, y muy poco en forma soluble en el agua. Puede hallarse en forma de com plejo orgánico o en forma inorgánica.

Las aguas naturales, no contaminadas, contienen cantida des bajas de cromo soluble (82)

Los dos estados de oxidación importantes de cromo en aguas

naturales son Cr III y Cr VI. En aguas bien oxigenadas el Cr VI es la forma termodinámicamente estable, aunque normalmente es rápidamente reducido a Cr III y adsorbido a partículas en suspensión y sedimentos (88). En las zonas contaminadas no parece que haya una importante liberación de Cr soluble desde los sedimentos (93), como ocurre con el Cd, Cu, Ni o Zn.

### 1.3.3 El cromo en la atmósfera

El contenido en cromo en el aire varía ampliamente entre zonas industriales y zonas no contaminadas, siendo las fuentes principales de contaminación la combustión de carbón. La emisión de cromo depende además de la capacidad de incineración de las industrias contaminantes y de las instalaciones de control de emisión de contaminantes que posean, así como del tipo de carbón que consuman (34,72).

El cromo emitido en la combustión de carbón se halla en las partículas de ceniza desprendidas al aire, que contienen entre 10-1000 ppm Cr/peso seco.

La población no ocupacionalmente expuesta inhala cantidades relativamente bajas de cromo; normalmente menos de 0,001 mg/día (4) y se han legislado los máximos permisibles, dependiendo éstos de los distintos países.

#### 1.4 Esencialidad y toxicidad del cromo para los animales

##### 1.4.1 Esencialidad

La esencialidad del cromo está bien demostrada en animales (78,79,80,100) y para el hombre (37,42,101), Así mismo, pudo ser observada la inducción de una deficiencia de Cr en pacientes que recibieron una nutrición por vía parenteral deficiente en cromo durante un espacio prolongado de tiempo (56). A partir de estos datos, diversos estudios realizados llevaron a la conclusión de que gran parte de la población de los E.E.U.U. está subalimentada con respecto al Cr (56).

El Cr, al contrario que otros metales, como por ejemplo el Cd, no se acumula en el organismo (44).

La forma biologicamente activa del cromo es la trivalente (80), y actúa como un complejo denominado "Factor de Tolerancia a la Glucosa -GTF-), probablemente un cofactor de la insulina, inicialmente aislado en ratas (80) y posteriormente de diversas fuentes, también en plantas superiores (50). Este complejo parece contener ácido nicotínico, glicina, ácido glutámico y cisteína por lo que respecta a los animales, siendo diferente en los vegetales. Actualmente se han hallado complejos sintéticos que contienen Cr III biologicamente activos para los animales y el hombre.

La función del cromo en el hombre y los animales parece estrechamente relacionada con el metabolismo glucídico, puesto que tras la ingestión de glucosa se produce un incremento de Cr en sangre directamente proporcional al nivel de glucosa. Se ha podido demostrar en experiencias "in vitro" que la adición de Cr potencia la acción de la insulina. (69). Experiencias con animales demostraron que la deficiencia de Cr provoca trastornos en la tolerancia a la glucosa. e in-

cluso cierta diabetes clínica.

No tan solo el cromo presenta acciones en el metabolismo glucídico sino que también puede intervenir en el metabolismo lipídico, inhibiendo el desarrollo de la arteriosclerosis (36,100).

No todo el cromo contenido en los alimentos está disponible para el organismo humano, por lo que el conocimiento del contenido de Cr biologicamente activo en los alimentos es de gran interés dietético.

Todos estos aspectos hacen que el estudio del cromo en los vegetales tenga interés no tan solo desde su aspecto de metal contaminante sino también por lo que respecta a su uso en alimentación, pues to que la subalimentación descrita anteriormente en países avanzados (56) ha puesto de manifiesto la necesidad de buscar plantas resistentes a concentraciones elevadas de cromo y que a la vez presenten una cantidad suficiente disponible para los animales y el hombre en sus tejidos comestibles; sin embargo, experiencias realizadas en este sentido no parecen muy esperanzadoras por lo que respecta a su disponibilidad, aunque existen diversas fuentes de Cr en plantas superiores, como la alfalfa, judías y trigo (50), siendo la mayor fuente la levadura de la cerveza (Saccharomyces carlsbergensis).

#### 1.4.2. Toxicidad

El Cr III (sales catiónicas puras) prácticamente no es tóxico. Cantidades de 35 a 350 g de  $Cr_2(SO_4)_3$  suministrado por vía oral no tienen efecto tóxico en el hombre (71). Sin embargo, no es así por lo que respecta al Cr VI, puesto que una única dosis de 0,5 a 1g de  $K_2CrO_4$  administrada por vía oral es mortal para el hombre. A esta elevada toxicidad hay que añadir el riesgo de absorción por la piel, que también es considerable. Los síntomas de intoxicación aguda por cromo consisten principalmente en diarreas, hemorragias estomacales e intesti

tinales, lesiones hepáticas y renales graves, convulsiones, pupilas dilatadas, trastornos circulatorios, sudores frios y profusos, aparición de ictericia intensa y, finalmente, puede sobrevenir la muerte (12,95).

La gran diferencia de toxicidad entre ambos tipos de iones parece debida a la facultad del Cr VI para atravesar las membranas biológicas unida a la fuerte acción oxidante de los cromatos. Dado que en el ambiente natural el Cr VI es fácilmente reducido a Cr III, el impacto tóxico de los residuos contaminados con Cr disminuye altamente.

Los síntomas de intoxicación crónica por Cr se manifiestan por irritación de las mucosas nasales y secreción de mocos, pudiéndose llegar en casos graves a la perforación del tabique nasal. También son típicas la producción de dermatitis, eczemas en las manos, ulceraciones, trastornos digestivos y bronquitis crónica (70).

Otro efecto tóxico del cromo para los animales es su capacidad para producir mutagénesis que puede originar cáncer y genotoxicidad. Las sales carcinogénicas más potentes son las fácilmente solubles, especialmente el cromato cálcico.

## 1.5 El cromo y los vegetales: esencialidad y fitotoxicidad

### 1.5.1 Absorción y transporte

La absorción del cromo desde la solución nutritiva del suelo es un mecanismo no muy bien conocido hasta el momento. Existen diversos hechos observados que dan una idea general de este mecanismo, pero todavía no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo concreto de absorción. Así, se ha observado que la absorción del cromo es sensible a la temperatura (16), lo que parece indicar que no se trataría de un mecanismo de absorción de tipo puramente físico, tal como la difusión a través de gradiente. Por otra parte, estudios realizados con inhibidores parecen indicar que la absorción de  $\text{CrO}_4^{2-}$  es activa, mientras que la de  $\text{Cr}^{3+}$  es pasiva, lo cual parece demostrar la presencia de algún tipo de transportador implicado en el transporte de este metal, el cual muestra cierta especificidad o reconocimiento de las formas químicas presentes en el medio. Cabe indicar a este respecto que el transporte de cromato parece ser inhibido por los sulfatos (107). Este último hecho podría ser indicativo de que no existe un verdadero transportador de cromato sino que éste aprovecha los transportadores de especies químicas similares, quizá debido a la baja especificidad de dichos transportadores.

A pesar de que las plantas acumulan cromo de las soluciones nutritivas, retienen la mayor parte en las raíces. Experimentos llevados a cabo con  $^{51}\text{Cr}$ , radiactivo, en forma de complejos de ácidos orgánicos tanto en forma trivalente como en forma hexavalente no produjeron un incremento en el paso de la barrera de translocación a pesar de incrementar la concentración de cromo en el medio (18,49,50).

Tal y como ya hemos comentado en apartados anteriores, la forma química más estable del cromo en el suelo es la trivalente, a pesar de lo cual y pese a la baja tasa de translocación del cromo de la raíz a la parte aérea, la mayor parte del cromo que es translocado lo

lo es en forma de Cr VI, creyéndose que la mayor parte del Cr III es adsorbida por intercambio iónico en las paredes de los vasos xilemáticos.

Existe una estrecha relación entre el transporte de cromo y el transporte de hierro. Las plantas o tejidos vegetales con tendencia a acumular Fe también tienen tendencia a acumular Cr, a pesar de que la absorción del Cr en plantas crecidas en deficiencia de Fe disminuye mientras que la tasa de translocación se incrementó. Otro hecho a destacar es que el Fe III mejora más el transporte de Cr VI que el Fe II, mientras que el EDTA-Fe no lo mejora en absoluto (18,50). Probablemente los mecanismos de transporte del cromo y del hierro son iguales o parecidos.

Existen también relaciones entre el Cr y otros componentes del suelo. Una deficiencia de P provoca una mayor absorción de Cr, posiblemente debido al daño producido en la raíz.

Posiblemente una de las razones de la baja tasa de transporte del Cr sea la compartimentación vacuolar o la falta de transportadores específicos, aparte de una inhibición por sulfatos, fuertemente disponibles en el suelo.

### 1.5.2 Efectos fisiológicos: esencialidad

Aunque la esencialidad del cromo está bien demostrada en los animales, no es así por lo que respecta a los vegetales (126). Se ha observado que no es requerido para el normal desarrollo en lechuga (Lactuca sativa L. ssp. longifolia), tomate (Lycopersicon esculentum Mill.), trigo (Triticum aestivum L.) o judía (Phaseolus vulgaris L.), por lo menos cuando estas plantas fueron cultivadas en solución nutritiva con tenienddo  $3,8 \times 10^{-4}$  uM Cr (50). Lemna sp. creció y se reprodujo en un medio con  $3,8 \times 10^{-5}$  uM Cr (49), pero estos valores no son indica

tivos de la esencialidad del cromo puesto que hay valores remanentes en las soluciones nutritivas e incluso se detectó presencia de cromo en los tejidos de las plantas sometidas a estos tratamientos. Probablemente parte de este cromo hallado en las plantas fue aportado por contaminación aérea, ya que los tratamientos no fueron realizados en cámaras con aire filtrado. Estos experimentos muestran que si el Cr fuera esencial lo sería a niveles inferiores a los del Mo, el elemento esencial requerido en menor concentración hasta el momento.

A pesar de que no ha podido ser demostrada la esencialidad del Cr para los vegetales, en numerosos estudios se ha observado un estímulo del crecimiento de las plantas por concentraciones bajas de este elemento. En Vitis vinifera se observó que la aplicación de Cr mediante aerosol provocaba un incremento en el rendimiento y calidad de los racimos, incrementándose N+P+K+Ca durante el período vegetativo, pero decreciendo en total el porcentaje de Ca. También fué provocada una reducción en la relación Ca/P y (Ca+Mg)/K y un incremento en la relación Mg/P (23). Sin embargo, no ha podido ser demostrada la participación del Cr en ningún proceso vital, pudiendo ser debido este estímulo a una probada actividad antifúngica del Cr.

### 1.5.3 Efectos fitotóxicos

Quien describió primeramente fitotoxicidad debida al cromo fué Klebs en 1888, seguido por Koenig en 1910 (60,64). La sensibilidad de las plantas varía según las especies, lo cual podría ser debido a una diferencia de absorción por parte de las diferentes especies.

Los síntomas de fitotoxicidad por exceso de Cr, manifestados exteriormente, pueden resumirse en la siguiente forma:

- Inhibición del crecimiento: Tanto de las raíces como de la parte aérea. 5 ppm de Cr VI en solución nutritiva inhiben el crecimiento de soja (Glicine max L.) (29). También

se ha observado en algunos casos un asevera marchitez, sin embargo, tanto a lo largo de una experiencia anterior (39), como a lo largo de este trabajo, no nos ha sido posible observar síntom alguno de marchitez en la especie estudiada.

- Inducción de clorosis: Debida a una deficiencia de Fe, en soja (29). También observada en remolacha azucarea y, en nuestro caso, en judías.
- Inhibición de la germinación: Observado en cebada (Hordeum vulgare L.) y, relacionado con ello, se ha observado una disminución en la permeabilidad al agua. En rodajas de patata tratadas con Cr, fue posible observar una notable pérdida de agua (84).

Tanto estos síntomas de toxicidad como la fuerte acumulación de Cr en las raíces, ya comentada por nosotros en anteriores estudios (7,39), sugieren que el efecto primario del Cr se da en las raíces, siendo el resto consecuencia más o menos directa de estos efectos primarios.

Estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión muestran que raíces tratadas con Cr VI presentan abundantes precipitaciones vacuolares en las zonas más internas, lo cual habla en favor de la acumulación de Cr en este compartimento celular (115). En hojas apenas se observaron efectos citotóxicos a nivel ultrestructural y unicamente fueron afectados los cloroplastos de las hojas jóvenes, expuestas desde el inicio de su desarrollo, punto éste que apoya la observación de la aparición de clorosis en las hojas más jóvenes.

El Cr presenta una estrecha relación con el Fe, tal y como ya hemos comentado anteriormente, bajando la relación Fe/Mn en semillas de espinaca, a pesar de que esta relación se incrementó en las partes vegetativas, lo cual indica que la elevada concentración de Cr reduce la translocación de Fe (17,18). Relacionado con ello está el hecho de que a pesar de que se acumula más cromo en hojas inferiores que en superiores la fotosíntesis se ve más afectada en las hojas superiores, apareciendo una marcada clorosis en ellas (3).

No tan solo existe relación con el Fe, sinó que también la hay con otros nutrientes, como ya hemos visto en el caso de Vitis vinifera y en el que fue observada interacción con N, P, K, Ca y Mg.

Respecto al N existen datos contradictorios. Por una parte, el contenido en N en Glicine max no fue afectado al ser trarada con Cr (29),pero en experiencias con Hordeum vulgare se ha observado una reducción en el contenido en N en cenizas (43).

## 1.6 Relaciones hídricas

### 1.6.1 Parámetros que miden las relaciones hídricas

Los vegetales no presentan flujos masivos de líquidos en circuito cerrado como los animales, sino que presentan un flujo de agua abierto desde la raíz hasta las partes aéreas que permite el transporte de los nutrientes absorbidos por las raíces a las zonas superiores. Este flujo abierto aprovecha las diferencias de potencial hídrico entre el suelo y la atmósfera para provocar un movimiento del agua a través de la planta. Este flujo de agua es posible gracias al gradiente de potencial hídrico que se produce en el sistema suelo-planta-atmósfera, siendo de los tres componentes la atmósfera el que presenta el potencial más bajo.

El potencial hídrico ( $\psi_w$ ) está formado por varios componentes, siendo éstos el potencial osmótico ( $\psi_\pi$ ), el potencial de presión ( $\psi_p$ ) y el potencial Matricial ( $\psi_z$ ). Su expresión es:

$$\psi_w = \psi_p + \psi_\pi + \psi_z$$

Dado que el potencial matricial normalmente es muy bajo respecto a los otros parámetros, se puede despreciar, pudiéndose escribir la ecuación anterior, a fines prácticos, de la siguiente forma:

$$\psi_w = \psi_p + \psi_\pi$$

Los potenciales matriciales fueron originalmente concebidos como un componente del potencial total resultante de las interacciones entre el agua y la matriz por analogía con un componente matricial en el suelo (109). Los potenciales matriciales en el suelo fueron considerados como resultantes principalmente de la capilaridad entre los poros y las "fuerzas de superficie". En un principio se supuso que potenciales similares podrían existir en las paredes celulares y posible

mente también en el citoplasma. Sin embargo, este potencial se halla en discusión y su importancia no es tenida muy en cuenta. Su influencia decrece rápidamente con la distancia a la superficie y su valor puede ser considerado como despreciable en el conteto de un vegetal en tero, de proporciones macroscópicas (113).

El potencial osmótico varía según consideremos una solución ideal o no ideal, puesto que la actividad de los solutos varía con la concentración debido a las interacciones intermoleculares. En nuestro caso, por supuesto, tomaremos una solución no ideal. De esta forma pue de escribirse:

$$\psi_{\pi} = -RT \times \rho_w \times C = -R \times T \times N_s / V$$

Donde:

$\psi_{\pi}$  = potencial osmótico

R = Constante de los gases

T = Temperatura absoluta

$\rho_w$  = densidad del agua. Varía con la temperatura, pero suele considerarse como la unidad.

$N_s$  = Número de osmoles de soluto en la savia celu lar de la muestra.

V = Volumen de la solución.

Warren Wilson (119) propone que todas las desviaciones de la idealidad en una solución sean añadidas al potencial matricial debido a que parte del agua se une a las moléculas del soluto.

El potencial de presión suele ser deducido de la expresión:

$$\psi_p \approx \psi_w - \psi_{\pi}$$

Donde:

$\psi_p$  = Potencial de presión

$\psi_w$  = Potencial hídrico

$\psi_{\pi}$  = Potencial osmótico

Parece ser que potenciales de presión negativos nunca se desarrollan en células vivas, debido a que las células sufren plasmolisis al perder agua, momento en que el citoplasma deja de presionar sobre la pared celular y se asume un valor de  $\psi_p = 0$ , igualándose entonces el potencial hídrico al potencial osmótico. a este punto se le denomina punto de pérdida de turgencia (107).

### 1.6.2 Elasticidad y plasticidad de la pared celular

Cuando una fuerza actúa sobre un material se produce un esfuerzo. Este esfuerzo o deformación puede ser elástico, plástico o participar de ambas características a la vez. Diremos entonces que una deformación es plástica cuando no recupera la forma inicial al cesar la fuerza aplicada, mientras que será elástica cuando se recupere la forma inicial. Del mismo modo, una deformación que participe de ambas propiedades recuperará la forma inicial pero no totalmente. Muchos materiales, incluyendo la pared celular presentan ambos tipos de propiedades (46). Una célula en crecimiento presentará una pared celular más plástica que una célula madura, a pesar de que incluso las células maduras presentan considerables propiedades de plasticidad. En una célula viva, llena de agua, esto se traduce en el hecho de que la elasticidad provoca un incremento grande del potencial de presión con pequeñas variaciones de volumen, mientras que la plasticidad produce grandes variaciones de volumen sin que se produzcan variaciones importantes del potencial de presión.

El módulo de volumen elástico ( $\epsilon_v$ ) describe la cuantía en que un pequeño cambio de volumen se traduce en un cambio de potencial de presión (129). Se expresa de la siguiente forma:

$$\Delta P = \epsilon_v \times \Delta V/V \quad \text{ó} \quad \epsilon_v = (dP/dV) \times V$$

Este módulo, también llamado módulo de elasticidad de Young, se refiere a esfuerzos unidireccionales, pero en los vegetales la pared celular suele ser anisótropa respecto a sus propiedades de elasticidad direccionales, por lo que se usa, con fines prácticos, un módulo de elasticidad medio para variaciones globales de volumen (116):

$$\bar{\epsilon} = d\bar{P}/dW \times W$$

Sin embargo,  $\epsilon_v$  y  $\bar{\epsilon}$  no son totalmente equivalentes, puesto que  $v$  es definido en términos de volumen celular y  $\bar{\epsilon}$  en términos de peso del agua simplástica ( $W$ ), a pesar de que cuantitativamente son similares (116,129).

### 1.6.3 Variaciones de los distintos parámetros de las relaciones hídricas

Los ajustes de  $\psi_n$  son conocidos desde hace tiempo. Walter, en 1955 (117) y Kreeb en 1963 (65) ya describieron descenso de  $\psi_n$  en respuesta al stress hídrico y salino. En algunos casos, esta respuesta se debe simplemente a una respuesta pasiva a la pérdida de agua, pero recientemente se ha prestado una mayor atención a lo que parece ser una osmorregulación o ajuste osmótico (124), cuya consecuencia es el mantenimiento de un potencial de presión positivo que permite el mantenimiento de la turgencia.

Han sido observadas oscilaciones diurnas de  $\psi_n$  entre 0,4 y 1,6 MPa en plantas superiores que pueden afectar a vías metabólicas o bombas iónicas (25,129).

Un bajo  $\psi_n$  permite que la planta siga absorbiendo agua incluso en condiciones de stress salino (124). También es posible mantener la turgencia por encima de 0, de forma que se permite que los estomas se mantengan abiertos, con la consiguiente elevada conductancia estomática y tasa fotosintética (48,73). Finalmente, el mantenimiento de

la turgencia permite que no se detenga el crecimiento.

En el caso de  $\bar{\epsilon}$ , éste es parcialmente responsable de la tasa en que variaciones de turgencia relacionen  $\psi_w$  y  $\psi_p$ . En un tejido rígido, las variaciones de  $\bar{\epsilon}$  afectarán poco a  $\psi_p$  y viceversa. Un tejido más elástico presentará más turgencia que uno menos elástico (121) por lo que un  $\bar{\epsilon}$  pequeño contribuirá al mantenimiento de la turgencia mejor que un grande. De lo expuesto anteriormente se desprende que el mantenimiento de la turgencia depende tanto de  $\psi_\eta$  como de  $\bar{\epsilon}$ .

#### 1.6.4 Significado fisiológico de los parámetros hídricos

Quienes primeramente expresaron matemáticamente la relación de la presión de turgencia con otros parámetros de las relaciones hídricas celulares fueron Renner en 1915 y Ursprung y Blum en 1916 (107).

El primer cálculo de un módulo de elasticidad para las paredes celulares fué realizado por Boyer en 1952 (107). El desarrollo de métodos de estudio de las relaciones hídricas de la planta (Cámara de presión de Scholander, psicrometría, etc...) ha hecho posible el estudio fácil de las relaciones hídricas de tejidos u órganos enteros.

~~Si tenemos en cuenta~~ la ley de Boyle-Mariotte-Van't Hoff en el caso de una célula vegetal:

Presión osmótica x volumen de la vacuola = constante

que puede transformarse en:

Potencial osmótico x contenido hídrico relativo = constante

Si representamos esta relación usando el inverso del contenido hídrico relativo ( $CHR^{-1}$ ) frente al potencial hídrico obtendremos una línea recta (diagrama de Richter), siempre que el potencial de presión sea nulo, es decir, que el potencial hídrico dependa exclusivamente del potencial osmótico, lo cual se consigue cuando las células de los te-

jididos estudiados han entrado en plasmolisis, debido a que el citoplasma se ha separado de la pared celular y no presiona contra ella.

Para derivar la relación entre el potencial de presión y el contenido hídrico relativo se usa una función exponencial, que puede ser expresada de la siguiente forma:

$$\psi_p = \psi_{p(\text{máx})} \times e^{\beta \times (\text{CHR}^{-1} - 1)} \quad (1)$$

Esta expresión puede ser transformada en una función lineal que nos permita realizar un análisis de regresión y así calcular  $\beta$  y  $\psi_p$  (Máx).

$$\ln \psi_p - \ln \psi_{p(\text{máx})} = \beta \times (\text{CHR}^{-1} - 1)$$

de donde

$$\ln \psi_p = \beta \times (\text{CHR}^{-1} - 1) + \ln \psi_{p(\text{máx})}$$

Si tomamos

$$\ln \psi_p = \psi_p'$$

y

$$(\text{CHR}^{-1} - 1) = \text{CHR}'$$

puesto que  $\psi_{p(\text{máx})}$  y  $\beta$  son constantes, obtendremos:

$$\psi_p' = \beta \times \text{CHR}' + \ln \psi_{p(\text{máx})}$$

Por otra parte, el coeficiente de elasticidad puede ser calculado de la ecuación propuesta por Broyer en 1952 (107):

$$\epsilon_v = d\psi_p/dV/V \text{ o bien } \epsilon_v = d\psi_p/d(\text{CHR})/\text{CHR} = \text{CHR} \times d\psi_p/d\text{CHR} \quad (2)$$

De la ecuación (1) se sigue:

$$d\psi_p/d\text{CHR} = -\psi_{p(\text{máx})} \times \beta \times 1/\text{CHR}^2 \times e^{\beta}$$

Substituyendo en la ecuación (2) obtenemos:

$$\epsilon_v = -\psi_p (\text{máx}) \times (\beta \times 1/\text{CHR} \times e^{\beta(\text{CHR}^{-1} - 1)} = -\psi_p \times \beta \times 1/\text{CHR}$$

El conocimiento de  $\psi_p$  (máx) y de  $\epsilon_v$  nos permitirá conocer el comportamiento celular o, en nuestro caso, de todo un órgano o tejido frente a condiciones de stress hídrico. Para ello procederemos primeramente a la representación gráfica de  $\psi_w$  frente a  $\text{CHR}^{-1}$ , de forma que obtendremos dos zonas diferenciadas:

- Una zona exponencial, en la cual  $\psi_w = \psi_p + \psi_\pi$ , cuyo carácter exponencial viene determinado por la existencia de una turgencia que provocará la existencia de un potencial de presión.
- Una zona lineal, en la cual el tejido habra entrado en plasmolisis, en cuyo caso el potencial de presión será nulo y el potencial hídrico dependerá exclusivamente del potencial osmótico.

Determinando qué puntos pertenecen a cada una de las zonas y aplicando el análisis de regresión podemos llegar a conocer todos los parámetros que nos interesan.

El significado fisiológico de estos parámetros deriva del hecho de que la elasticidad de la pared celular es inversamente proporcional al valor de  $\epsilon_v$ . Organos con un  $\epsilon_v$  menor que otros, para un mismo CHR presentarán una mayor resistencia a las condiciones de stress osmótico o hídrico, lo cual se traducirá en una pérdida de turgencia a valores de CHR más bajos, pues las paredes celulares podrán adaptar su volumen mejor a las condiciones cambiantes de CHR que se producen por la pérdida de aguay, consecuentemente, de volumen.

En cuanto al significado de  $\beta$ , nos indica la velocidad de pérdida de presión de túrgencia respecto a la variación de CHR. Si  $\beta$  es muy bajo, esta pérdida será muy rápida y, por lo tanto,  $\epsilon_v$  será alto.

$\psi_p$  (máx) nos permite calcular  $\beta$  y, consecuentemente,  $\epsilon v$ . Por otra parte,  $\psi_p$  (máx) nos indica el estado de turgencia que presentan los tejidos u órganos cuando el CHR es máximo (100 %), obtenido por extrapolación lineal a partir de los datos de la zona lineal. De esta forma, tejidos con un  $\psi_p$  (máx) más elevado que otros presentarán una mayor turgencia en condiciones de saturación hídrica.

#### 1.6.5. Metales pesados y relaciones hídricas

A pesar de la escasa información existente sobre los efectos que los metales pesados pueden tener sobre las relaciones hídricas, existen algunos trabajos que tratan de los efectos de los metales pesados sobre distintas especies vegetales.

Se ha observado que el Cd provoca una progresiva marchitez en las plantas tratadas con este metal, a la vez que se ha observado una relación entre el Cd y la transpiración en hojas de maíz (35,39,68). También se han comunicado efectos sobre el peso seco y el crecimiento. Posiblemente el Cd disminuye la conductividad hídrica en el tallo puesto que se ha observado que disminuye el xilema disponible para la translocación y Fuhrer et al. (35) observaron la aparición de un complejo autofluorescente de la pared alrededor de los vasos del xilema. Por otra parte, se ha observado que el Cd presenta efectos distintos según sea su concentración: a concentraciones bajas provoca un incremento en el  $\psi_p$  y la tasa de transpiración y disminuye la resistencia estomática, mientras que a concentraciones más elevadas ocurre lo contrario (59), lo cual podría estar relacionado con el hecho, observado por otros autores (11, 40), de que el Cr a bajas concentraciones estimula el crecimiento de plantas tratadas con este metal.

El Cr también puede disminuir la permeabilidad al agua en semillas e inhibir la germinación. En rodajas de patata tratadas con Cr

fue posible apreciar una notable pérdida de agua (84). Relacionado con ello, Watendorf (120) habla de una pérdida de la semipermeabilidad en las membranas celulares de Elodea tratadas con Cr, que incluso llegaron a perder su capacidad de ser plasmolisadas.

Respecto a los otros metales, Klimashevskii y Delov encontraron que el Al provocaba una disminución de la plasticidad e incluso podía inhibir completamente el crecimiento de la raíz (61,62), postulando Matsumoto que podría tener relación con la pared celular, especialmente con el grado de metilación del ácido galacturónico (74), sugiriendo Klimashevskii et al. (61,62) que el Al daña la pared celular por activación de la poligalacturonasa, que hidroliza las pectinas.

## 2 OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

El presente trabajo se inscribe dentro de una línea de investigación iniciada por el profesor Dr. D. Joan Barceló Coll, catedrático de Fisiología Vegetal, y por la Dra. Charlotte Poschenrieder, profesor titular, ambos de esta Facultad, sobre la fitotoxicidad de los metales pesados.

El vegetal, como cualquier ser vivo, presenta para su desarrollo normal, un equilibrio entre determinados parámetros fisiológicos, bioquímicos, etc... que regulan su crecimiento y cuyo desequilibrio puede dar lugar a un desarrollo anormal que incluso puede llegar a la muerte del organismo en los casos más graves. Por otra parte, desequilibrios exógenos pueden dar lugar a daños ecológicos que, según el nivel de la escala trófica en el que se produzcan pueden ser más o menos importantes para la comunidad estudiada. Finalmente, hay que considerar los perjuicios económicos o sanitarios que la rotura del equilibrio nutricional en los niveles tróficos más bajos puede producir, bien sea por la baja productividad de los cultivos (tanto para alimentación humana como forrajeros), bien sea por la incorporación y/o acumulación de elementos extraños y potencialmente tóxicos para los consumidores como el hombre, de forma directa a través del consumo de vegetales contaminados o indirecta a través de la ingestión de carnes cuya alimentación se haya producido con vegetales expuestos al contaminante.

El Cr, como hemos mencionado en la introducción, no es un metal que se presente frecuentemente de forma espontánea en niveles tóxicos; únicamente aparece de forma natural en ciertas zonas constituidas por rocas ultrabásicas y muy localizadas desde el punto de vista geográfico. Su importancia ha empezado a ser tenida en cuenta a raíz del desarrollo del proceso de industrialización, que ha incrementado en el medio ambiente sustancias hasta ahora presentes en niveles no tóxicos. Aunque la cantidad global de dichas sustancias se mantenga, no es así por lo que respecta a su concentración local, que en algunos puntos pueden

den llegar a alcanzar valores peligrosos.

Este trabajo se ocupa de los efectos fitotóxicos del Cr en una especie en concreto: una variedad de judía enana (Phaseolus vulgaris L. cv. Contender de mata baja). La elección de esta especie está condicionada por varias razones: la corta duración de su ciclo vital y su reducido tamaño la hacen ideal para el cultivo en cámara de cultivo cerrada que permite mantener unas condiciones controladas, imposibles de alcanzar en el campo o de muy difícil consecución en invernadero. Por otra parte, ésta es una especie ampliamente cultivada a lo largo de nuestra geografía, por lo que se ve expuesta a condiciones desfavorables de todo tipo, entre las cuales se hallan la presencia de metales pesados y el déficit hídrico.

En un trabajo anterior (7,39) habíamos iniciado el estudio de los efectos nutricionales del Cr sobre P. vulgaris, puesto que tal y como hemos visto en el apartado 1.5.2 los estudios realizados por diversos equipos de investigación coinciden en señalar que el Cr a concentraciones tóxicas afecta fuertemente el crecimiento y rendimiento de las plantas, y que esta disminución va acompañada de diversos trastornos metabólicos, entre los que podemos destacar cambios a nivel de los pigmentos fotosintéticos (clorosis), a nivel de la absorción y translocación de nutrientes inorgánicos y cambios en la economía hídrica de las plantas. Como continuación a ello planteamos la primera experiencia de este trabajo, en la que se realizará una medición más detallada de los niveles de nutrientes en los distintos órganos por separado a la vez que se ampliará el número de elementos a determinar.

Una parte muy importante de este trabajo se centrará en las relaciones hídricas de las plantas tratadas con Cr (dos de las 3 experiencias planteadas están referidas a ello). Esto es debido a que, a pesar de que diversos autores coinciden en señalar la influencia del Cr sobre las relaciones hídricas de las plantas, son escasos los estudios

que cuantifiquen estas relaciones en términos de potencial hídrico o que relaciones los efectos que sobre la elasticidad de las paredes celulares pueda tener el Cr, que pueden estar relacionados con la importante reducción del crecimiento observada, especialmente dado el importante papel que juega el potencial hídrico en el proceso de crecimiento por elongación celular. Por otra parte, la elasticidad de las paredes celulares influye sobre la resistencia al déficit hídrico y creemos que sería muy interesante calcular la variación que esta elasticidad (conocida a partir del módulo de elasticidad de Young -  $\epsilon v$  -) pueda sufrir al ser sometidas las plantas a tratamientos con cromo.

Las experiencias relacionadas con los parámetros hídricos se dividirán en dos partes. Una es la ya mencionada en la que intentaremos calcular la relación del cromo con la elasticidad de la pared celular y sus implicaciones con la variación del potencial de presión. En ella será utilizado sustrato sólido inerte puesto que su gradual desecación provoca la entrada en marchitez de las plantas de forma lenta pero continuada, pudiendo así obtener registros a lo largo de todo el proceso de desecación que nos permitan construir curvas de presión - volumen a partir de las cuales calcular los coeficientes que relacionan los cambios de  $\Psi_p$  con la variación en el CHR.

En la segunda experiencia se utilizará cultivo hidropónico líquido al que se añadirá polietilenglicol (PEG) para alcanzar un  $\Psi_n$  adecuado para someter a las plantas a un moderado stress osmótico sin provocar su entrada en marchitez. Estas condiciones deben realizarse de forma muy controlada y el desecado de un sustrato sólido poroso como la perlita no permite un control muy exacto de las condiciones de déficit hídrico.

Del conjunto de resultados de estas experiencias esperamos obtener datos concretos acerca de la influencia del cromo sobre las relaciones nutritivas e hídricas de las plantas que posiblemente nos permitan relacionar estos fenómenos con las anomalías de crecimiento observadas en plantas con toxicidad de Cr.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 Condiciones de cultivo y tipo de tratamientos

##### 3.1.1 Experiencia I: Medida de niveles de nutrientes

En esta primera experiencia se procedió a la medición de los niveles de nutrientes por separado en raíz, tallo, hojas inferiores y primera hoja trifoliada.

Tanto en esta experiencia como en las siguientes se utilizó como material de experimentación plantas de judía (Phaseolus vulgaris L. cv. Contender de mata baja), cuyas semillas fueron suministradas por la casa Ramón Batlle S.A. de Barcelona.

En esta experiencia el cultivo se realizó en cubetas de plástico de 25 x 25 x 16 cm, de 10 l de capacidad, empleando como material de soporte inerte perlita del tipo A-13 suministrada por la casa Dicalite Española S.A. de Rubí (Barcelona). Se plantaron 20 jardineras repartidas en 5 lotes distribuidos de forma que en cada uno hubiera por lo menos una jardinera con cada una de las concentraciones de Cr utilizadas en la experiencia. En cada jardinera se sembraron 23 semillas previamente esterilizadas con  $\text{HgCl}_2$  al 0,2 % durante 5 minutos con posterior lavado con agua destilada hasta la no reacción con  $\text{AgNO}_3$ . A los 5 días de haberse producido la germinación se seleccionaron las plántulas para obtener plantas de tamaño uniforme.

Como fuente de cromo se empleó cromato sódico de grado analítico. Se escogieron 4 concentraciones tóxicas de Cr (1, 2.5, 5 y 10 ppm) además de un control sin tratar con el metal.

La solución nutritiva empleada fue la de Long-Ashton modificada por Poschenrieder y Barceló (90). Cada día se regó cada lote con 300 ml de solución nutritiva y posteriormente se drenó para eliminar el exceso de solución. La solución nutritiva se mantuvo a un valor de pH de  $6 \pm 0,1$  para mantener el cromato sódico en su máxima solubilidad y así conseguir una disponibilidad máxima de Cr VI para las plantas.

Para realizar el cultivo se utilizó una cámara de cultivo con iluminación por fluorescentes blancos. El fotoperíodo fué de 12 h y la temperatura osciló entre 18°C en la fase oscura y 26°C en la fase lumínica, mientras que la humedad relativa del aire osciló entre el 85% y el 70% respectivamente. Dentro de la cámara, la posición de los diferentes lotes de la plantación se intercambiaba siguiendo una rotación para paliar al máximo las diferencias en el ambiente de la cámara.

Las muestras se recogieron a los 21 días de edad de las plantas (contados a partir del día de la germinación).

Los parámetros determinados y las técnicas empleadas en esta experiencia fueron:

- Determinación del crecimiento
- Digestión de las muestras para determinaciones analíticas.
- Determinación de nutrientes mediante espectrofotometría de absorción atómica
- Determinación de Mo por emisión en plasma
- Determinación de Na y K por fotometría de llama
- Determinación espectrofotométrica del P
- Análisis estadístico de los datos (regresión y análisis de la varianza).

### 3.1.2 Experiencia II: Medida de parámetros hídricos (Potenciales y elasticidad)

Como material de experimentación se empleó el mismo que en la experiencia anterior, plantas de P. vulgaris L. cv. Contender de mata baja, siendo el mismo el soporte inerte empleado (perlita del tipo A-13). La solución nutritiva utilizada también fue la misma de la experiencia anterior y las concentraciones de Cr VI utilizadas fueron iguales. Como fuente de cromo se utilizó  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  de grado analítico. Las condi ciones de plantación fueron las mismas que en la experiencia anterior, salvo la temperatura, que fue incrementada, y la humedad relativa del aire, que fue disminuida, todo ello encaminado a mantener una evapotranspiración relativamente elevada que nos permitiera alcanzar rápidamente las condiciones de stress hídrico. La temperatura osciló entre los 26°C durante la fase lumínica del fotoperiodo (12 h) y 21°C durante la fase oscura, mientras que la humedad relativa osciló entre el 65% y el 80% respectivamente.

Veintiún días después de la germinación (día 0 del período de stress hídrico), cuando las hojas inferiores y la primera hoja trifolia da de las plantas control estuvieron completamente expandidas, se interrumpió el suministro de solución nutritiva, a la vez que las jardine ras fueron drenadas exhaustivamente y la humedad relativa del aire fué disminuida hasta un 25% y 50% respectivamente durante el período lumínico y el período oscuro. En este día se determinó el crecimiento, potencial hídrico, potencial osmótico y contenido hídrico relativo para cada tratamiento. A partir de este momento, las plantas fueron expuestas a déficit hídrico que fue mantenido durante 35 días, tomándose medidas de  $\Psi_w$ ,  $\Psi_n$  y CHR a diversos intervalos durante la duración del período. Estas determinaciones se llevaron a cabo separadamente en hojas inferiores y primera hoja trifoliada.

Las determinaciones fueron llevadas a cabo en los día 0, 7 y 14 del período de déficit hídrico para las plantas control y las tratadas con 1 y 2,5 ppm Cr VI. Mediciones adicionales se efectuaron los días

18 y 21 en plantas tratadas con 5 y 10 ppm Cr VI. Una última determinación en las hojas trifoliadas de las plantas tratadas con 10 ppm Cr VI se llevó a cabo el día 36.

Los parámetros determinados y las técnicas empleadas en esta experiencia son:

- Determinación del crecimiento
- Determinación de  $\Psi_w$ .
- Determinación de  $\Psi_{\pi}$
- Determinación del CHR
- Análisis estadístico (Regresión y análisis de la varianza)
- Cálculo de los parámetros de elasticidad y relaciones hídricas.

### 3.1.3 Experiencia III: Medida de transpiración y apertura estomática

Como material vegetal de experimentación se empleó el mismo que en las anteriores experiencias.

En esta experiencia se modificó la técnica de cultivo. las semillas fueron germinadas en perlita, igual que en las experiencias anteriores, siéndoles suministrada agua destilada para mantener la humedad del substrato. Las plántulas germinadas de esta manera se seleccionaron a la semana de la siembra (4 días después de la germinación), de forma que las plántulas que habían desplegado las hojas inferiores y comenzaban a extenderlas fueron transferidas a cubetas cilíndricas opacas de 5 litros de capacidad, llenas de solución nutritiva con buena aireación y manteniendo las raíces en contacto directo con la solución nutritiva.

Las condiciones de iluminación y humedad relativa del aire fueron las mismas que en la experiencia anterior, hasta la primera toma de muestras. La solución nutritiva se cambió dos veces por semana pa

ra evitar el agotamiento de los nutrientes y cambios de pH por variación en el contenido salino de la solución.

Como fuente de Cr VI se empleó  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Dado que la disponibilidad del cromo en esta forma de cultivo es mayor que en el caso del cultivo en soporte de perlita, se procedió previamente a determinar las concentraciones más adecuadas para efectuar la experiencia, obteniéndose que una concentración de Cr VI en el medio de 1,5 ppm provocaba una reducción del crecimiento y unos síntomas visuales parecidos a los que provocaba una concentración de 10 ppm en el cultivo con perlita. Así pues, se procedió a realizar el experimento empleando como concentraciones tóxicas de Cr VI 0,2, 1 y 1,5 ppm.

A los 21 días contados a partir de la siembra se procedió a tomar la primera muestra de crecimiento, potencial hídrico y potencial osmótico, así como a obtener la primera réplica de la epidermis foliar inferior, todo ello en hojas inferiores y primera hoja trifoliada por separado. En este momento se añadió PEG 4000 a la solución nutritiva a una concentración de 3 g/l, que en pruebas anteriores habíamos encontrado que provocaba un ligero stress osmótico sin llegar a marchitar las plantas. Una vez provocado este stress osmótico se procedió a tomar una segunda muestra al cabo de una semana de haber añadido el PEG a la solución nutritiva, tomándose medidas de los mismos parámetros que en la toma de muestras anterior.

Las determinaciones analíticas y técnicas empleadas en esta experiencia son:

- Determinación del crecimiento
- Medida de  $\psi_w$
- Medida de  $\psi_\pi$
- Medida de CHR
- Medición de la transpiración
- Obtención de réplicas de la epidermis foliar y medida del grado de apertura estomática.

Solución nutritiva empleada en todas las experiencias

MACRONUTRIENTES Concentración(g/l)

$\text{KNO}_3$ .....	0,505
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	1,181
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0,208
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,369

MICRONUTRIENTES Concentración(mg/l)

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	1,692
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	2,177
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,286
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	0,035
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0,251
EDDHA Fe .....	8,350

### 3.2 Determinaciones analíticas

#### 3.2.1 Determinación del crecimiento

En todas las experiencias realizadas se determinaron los si guientes parámetros de crecimiento por separado en raíces, tallo, hojas inferiores y primera hoja trifoliada: peso fresco, peso seco y área fo liar.

La determinación del crecimiento en todos los tipos de medi ciones fué hecha en plantas escogidas al azoar en cada tipo de trata- miento. En el caso de las determinaciones de crecimiento de las raíces, cuando la experiencia sellevó a cabo con perlita como substrato inerte, los valores obtenidos son más bajos que en el caso del cultivo hidropó- nico líquido, lo cual debe interpretarse por el hecho de que las raíces presentan una gran adhesión al substrato sólido poroso que es laperlita que impedía su separación completa, con la consiguiente pérdida de ma- teria vegetal.

El peso fresco fue determinado inmediatamente después de la recogida de las muestras para evitar pérdidas de humedad que se traduci- rían enpérdidas de peso. Las determinaciones fueron hechas mediante una balanza SARTORIUS, digital, con precisión de hasta la diezmilésima de gramo. Una vez efectuadas las mediciones de peso fresco se introdujeron las muestras en una estufa a la temperatura de 105°C hasta obtener peso constante (24 h), momento en que se midió el peso seco, procurando evi tar ganancias de peso debidas a la absorción de agua del vapor atmosfé- rico, para lo cual las muestras se dejaron enfriar en un desecador cerra do.

La medición del área foliar fue realizada con un planímetro LI-COR modelo 3100. Cuando la extensión de la hoja rebasaba los lími- tes de medición del aparato se procedió a dividirla en porciones que no

excediesen dichos límites, sumando las áreas de todos ellos. Todas las mediciones de área foliar fueron hechas sin tener en cuenta el peciolo.

### 3.2.2 Digestión de las muestras para determinaciones analíticas

Basada en el método de Schaumlöffel (94)

Se lleva a un matraz Kjeldhal de fondo plano y cuello normal de 50 ml, 1 g de material seco y se añaden unos 10 ml de una mezcla de  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HClO}_4$  de grado analítico en la proporción 10:1:1 respectivamente. Se deja reaccionar durante toda una noche para evitar la formación excesiva de humos y se calienta moderadamente sobre una placa calefactora. Se ha de observar la formación de vapor de  $\text{HNO}_3$ , de color ámbar. Cuando desaparezca la espuma formada en esta fase se sube la temperatura a un valor elevado y se espera a que todo el  $\text{HNO}_3$  se evapore. La destrucción de la materia orgánica unicamente es completa cuando solamente queda ácido sulfúrico. si se mantiene algún color es señal de que queda materia orgánica sin digerir y es necesario añadir unas gotas de  $\text{HClO}_4$  al 60% o de toda la mezcla si el color es muy intenso, y se repite el proceso. Una vez digerida la muestra se continúa calentando hasta que se evapore el  $\text{HClO}_4$ . se deja enfriar a temperatura ambiente y se añaden 10 ml de agua destilada. Posteriormente se filtra en un matraz aforado de 50 ml, lavando el matraz Kjeldhal, así como el embudo y el papel de filtro y finalmente se enrasa.

Todos los recipientes han de ser de vidrio lavado con  $\text{HNO}_3$  concentrado y agua destilada. No se puede emplear mezcla crómica puesto que los restos de cromo podrían enmascarar las determinaciones de este metal.

### 3.2.3 Determinación de Na y K por fotometría de llama

Se parte del digerido realizado según el método de Schaumlöffel. Para medir ambos elementos se empleó un fotómetro de llama "CORNING-EEL

con escala de 0 a 100, empleando un margen de concentraciones para realizar una recta patrón entre 0 y 20 ppm, con cloruro de ambos metales, de grado analítico. El blanco, correspondiente al 0 de la escala se realizó con el mismo agua destilada empleada para realizar las diluciones del digerido ácido. La fuente de calor empleada para la ionización de los cloruros fué una llama de aire-butano.

### 3.2.4 Determinación de elementos mediante espectrofotometría de absorción atómica

Se parte del digerido realizado según el método de Schaumlöffel. Se empleó un espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN-ELMER modelo 703, utilizando como fuente de excitación una llama de aire-acetileno.

Los parámetros empleados para realizar las medidas fueron:

<u>Elemento</u>	<u>Longitud de onda (nm)</u>	<u>Linearidad de respuesta (ppm)</u>
Ca	422,7	0 - 5
Cr	357,9	0 - 5
Cu	324,8	0 - 5
Fe	248,3	0 - 5
Mg	285,2	0 - 0,5
Mn	279,5	0 - 3
Zn	213,9	0 - 1

Para la determinación de Ca y Mg se diluyeron las muestras en  $\text{LaCl}_3$  a fin de evitar interferencias con otros elementos, principalmente el P.

### 3.2.5 Determinación del Mo mediante plasma

Se parte del digerido realizado anteriormente. Mediante esta técnica se consiguen resoluciones muy elevadas, del orden de las ppb, siendo su linealidad de respuesta muy elevada.

Para la determinación del Mo se empleó la técnica del plasma acoplado inductivamente, que provoca la emisión de los átomos del elemento a determinar mediante su excitación por un gas muy caliente y altamente ionizado (plasma), que permite que pequeñas fracciones del elemento que no serían detectadas por otra técnica presenten la suficiente energía como para ser medidas, previo aislamiento de las condiciones que provocan una menor interferencia con otros elementos presentes en la muestra.

Los parámetros utilizados en la determinación del Mo son:

- Aparato: Jobin Yvon VHR 38

- Fuente de plasma:

Gas interior: Argon Flujo: 0,35 l/min

Gas exterior: Argon Flujo 18 l/min

Gas nebulizador: Argon Flujo: 0,2 l/min

- Presión de nebulización 56 Psi

Flujo de nebulización (muestra): 1 l/min

- Red de difracción: 3400 surcos/mm

- Longitud de onda: 202,030 nm

- Slit: 30  $\mu$ m entrada

40  $\mu$ m salida

### 3.2.6 Determinación espectrofotométrica del P

Realizado según el método descrito por Allen (1) y Chapman.  
Se parte del digerido descrito anteriormente.

Se preparan los siguientes reactivos:

- Solución A: 6,333 g de molibdato amónico en 100 ml de agua destilada caliente.
- Solución B: 316 mg de Metavanadato (monovanadato) amónico en 300 ml de agua destilada hirviendo.

Se mezclan ambas soluciones en un vaso de precipitados de 1 litro de capacidad que contenga 400 ml de agua destilada fría. Se añaden 28 ml de  $H_2SO_4$  concentrado de grado analítico y se afora a 1 litro con agua destilada.

Para realizar las determinaciones se añaden 4 ml de patrón o muestr a 15 ml de reactivo y se lee a 440 nm teniendo cuidado de esperar por lo menos 30 minutos para dar tiempo a realizarse completamente la reacción.

Todos los recipientes utilizados han de ser lavados con HCl y agua destilada abundante. No se pueden emplear detergentes puesto que contienen fosfatos.

### 3.2.7 Determinación del potencial hídrico

La determinación del potencial hídrico se realizó mediante el método de cámara de presión descrito por Scholander (96,97,98,118).

La medición del potencial hídrico se realizó sobre las plantas en la fase del fotoperíodo correspondiente al mediodía. Para la realización de las mediciones se empleó una cámara de presión SOIL MOISTURE modelo 3000 utilizando aire no respirable comprimido como gas a pre

sión, realizando las mediciones a temperatura ambiente.

Las medidas de potencial hídrico se realizaron por separado en hojas inferiores y primera hoja trifoliada, para lo cual se separaron de la planta cortándolas con una cuchilla muy afilada a pocos milímetros del peciolo. Posteriormente la hoja se introdujo en la cámara de presión procurando que salieran al exterior unos pocos milímetros del extremo del peciolo cortado. Se aumentó la presión en la cámara a una velocidad de aproximadamente 0,15 MPa cada 30 segundos y se observó con una lente de aumento la formación de pequeñas gotas en el extremo del peciolo. Debido a que los tallos de la especie empleada contienen cierta cantidad de aire, la primera aparición de gotas en el extremo libre del peciolo en muchas ocasiones era debida a la expulsión de aire y no a la extrusión de savia, debido a lo cual fue necesario proceder a la eliminación de estas burbujas con papel secante para poder observar la verdadera aparición de savia.

### 3.2.8 Medida del potencial osmótico

Las hojas utilizadas para la medida del potencial hídrico fueron introducidas inmediatamente después de su lectura en una bolsa hermética y sumergidas en una mezcla de acetona y nieve carbónica, preparada introduciendo nieve carbónica en acetona previamente enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se dejara de producir ebullición violenta. Las muestras congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  fueron guardadas en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la lectura del potencial osmótico.

Para proceder a la lectura del potencial osmótico se descongelaron las muestras y se procedió a extraer la savia mediante una pequeña prensa de mano y con ella se humedeció un papel de filtro que fue introducido en la cámara de lectura, la cual se dejó estabilizar y se enfrió hasta el punto de rocío, midiendo la resistencia de un termopar a dicha temperatura y refiriéndola a una escala patrón realizada con di-

ferentes soluciones de molaridad conocida.

Las lecturas fueron efectuadas con un Psicrómetro WESCOR HR-33T DEW POINT MICROVOLTMMETER.

### 3.2.9 Medición del contenido hídrico relativo

El CHR fué determinado en las hojas inferiores y primera hoja trifoliada siguiendo el método de Barrs y Weatherley (8), según la modificación propuesta por Kim y Lee Stadelman (58) en una hoja de la misma edad y tamaño que la utilizada para la medición del potencial osmótico e hídrico. Fueron extraídos 5 discos de 9 mm de diámetro de la lámina foliar, excluyendo la nerviación principal, los cuales fueron depositados en un pesasubstancias, Después de proceder al pesaje de los discos, éstos se introdujeron en una solución que contenía aproximadamente  $2,0 \text{ mol/m}^3 \text{ Ca}^{2+}$ ,  $1,3 \text{ mol/m}^3 \text{ Mg}^{2+}$ ,  $0,6 \text{ mol/m}^3 \text{ Na}^+$  y  $0,15 \text{ mol/m}^3 \text{ K}^+$  a  $25^\circ\text{C}$  bajo tenue iluminación proporcionada por lámparas fluorescentes. Los discos se mantuvieron en estas condiciones durante 4 h al cabo de las cuales fueron secados con papel de filtro y pesados de nuevo, tras lo cual fueron desecados en una estufa a  $80^\circ\text{C}$  durante por lo menos 15 h, momento en que se determinó el peso seco. El CHR fue calculado de la forma siguiente:

$$\text{CHR} = (\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / (\text{Peso turgente} - \text{Peso seco})$$

### 3.2.10 Medida de la transpiración

Realizada por el método de pesada. Para realizar la medida de tranpiración se procedió a separar la planta del substrato e introducir la en un depósito tarado previamente con solución nutritiva. La planta se mantuvo en la balanza iluminada convenientemente para evitar el cierre de los estomas, durante 15 minutos, anotando cada minuto el peso del conjunto. Previamente se realizó un ajuste del tiempo calculando la linealidad de la respuesta y seobservó que en el tiempo utilizado la linea

ridad era perfecta. Tiempos más cortos hubieran podido falsear los datos por desviaciones en la pendiente, mientras que tiempos más largos hubieran entrado en la fase de cierre de los estomas.

Las medidas de transpiración fueron expresadas en relación al peso de la planta, en forma de  $\text{mg H}_2\text{O g}^{-1} \text{ min}^{-1}$

### 3.2.11 Obtención de réplicas de la epidermis foliar y medición del grado de apertura y densidad estomáticas

Diferentes tipos de material han sido usados para realizar microimpresiones de la superficie foliar. En 1901, Buscalloni y Pollaci describieron el uso de colodión (al 4% en una solución peso/volumen de nitrocelulosa en una mezcla de etanol y dietil éter (122)) para estudiar la transpiración mediante la observación de reducciones locales en la transparencia de la impresión basadas en la presencia de vapor de agua. Gloser (38) experimentó en 1967 con soluciones de Perspex (Metil-metacrilato) en cloroformo y Jones, en 1983, describió el uso de laca para uñas (soluciones variables generalmente basadas en una mezcla de disolventes orgánicos) (54). En nuestro caso se empleó gelatina fotográfica disuelta en cloroformo, proveniente de películas fotográficas de blanco y negro no expuestas y sometidas a un proceso de revelado y fijado normales, el cual eliminó todas las sales de plata que pudieran reducir la transparencia de la película. Una vez disueltala gelatina se procedió a retirar los soportes no solubles y se filtró la solución resultante, dejándose concentrar por evaporación hasta alcanzar la consistencia de seada.

Para la realización de la réplica de la epidermis foliar se procedió a depositar una pequeña cantidad de la solución sobre la epidermis inferior de la hoja mediante un pincel de pelo fino y se dejó evaporar. Una vez evaporado el cloroformo se separó la película formada sobre la hoja mediante unas pinzas finas. Las películas así obtenidas se

depositaron, sobre un cristal portaobjetos que se cubrió con un cubreobj<sub>et</sub>os y se selló el conjunto bajo presión de forma que la película quedara plana para su posterior observación microscópica.

### 3.2.12 Medida del grado de apertura y densidad esomáticas

La medición del grado de apertura y densidad esomáticas fue realizada utilizando las preparaciones obtenidas por el método anterior, utilizando un microscopio Zeiss con objetivo de 40 X en aire y ocular de 12 X.

Se midió la superficie del campo cubierto por el objetivo mediante un portaobjetos graduado, procediéndose posteriormente al recuento del número de estomas presentes en cada campo, los cuales fueron separados en abiertos y cerrados sin distinción del grado de apertura. Esta distinción se realizó considerando abiertos aquellos estomas que claramente presentaban los bordes de sus células guarda separados, presentando una abertura elipsoidal, mientras que el resto se consideró cerrado.

Las mediciones se efectuaron en por lo menos tres campos, llegando a 10 en el caso de las preparaciones más perfectas.

### 3.2.13 Análisis estadístico

En todas las experiencias se utilizaron los métodos clásicos de regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados de Gauss, regresión polinomial de 2º y 3er. grado y análisis de la varianza con un solo factor de variación, que por ser de uso generalizado en cualquier estudio no discutiremos en profundidad en este trabajo.

En todas las tablas, las medias seguidas de distinta letra indican diferencias significativas al 5%.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Experiencia I

#### 4.1.1 Curso del crecimiento y desarrollo

Tanto las plantas crecidas en ausencia de cromo como las tratadas con las diferentes concentraciones del metal alcanzaron el mismo porcentaje de germinación (90%).

Por lo que respecta al crecimiento, las primeras diferencias claras aparecieron a los ocho días de haberse efectuado la siembra, observándose una graduación en el desarrollo de la planta y sus hojas inferiores, que en este momento son las únicas que han aparecido, desde los controles, que ya las habían desarrollado plenamente, hasta el tratamiento con 10 ppm Cr VI, en el que empezaban su desarrollo todavía. El crecimiento longitudinal también era más desarrollado en las plantas control que en los distintos tratamientos.

La extensión de las hojas juveniles empezó el día noveno desde la siembra, observándose ya en este estadio que las hojas juveniles de las concentraciones más elevadas de Cr VI (2.5, 5 y 10 ppm) eran más pequeñas que las tratadas con concentraciones inferiores y los controles sin cromo. La diferencia en el crecimiento longitudinal fué marcándose a medida que transcurría la experiencia.

La primera hoja trifoliada apareció en los controles a los 9-10 días contados a partir de la siembra, tardando más las plantas tratadas con cromo. A partir de 2,5 ppm Cr VI en el medio se pudo observar que estas hojas presentaban una clorosis que contrastaba con el verde más intenso de las hojas juveniles y que se fue acentuando a lo largo de la experiencia.

A los veintiún días de edad, momento de la recogida de las muestras para el análisis del crecimiento y contenido mineral, las plantas presentaban el siguiente aspecto:

- Disminución en el crecimiento longitudinal proporcional al suministro de cromo
- Mayor debilidad del tallo a mayor concentración de cromo en el medio
- Incremento en la intensidad del color verde de las hojas juveniles (inferiores)
- Clorosis proporcionalmente más acusada a mayor concentración de cromo en el medio en las hojas trifoliadas.

#### 4.1.2 Efectos sobre el crecimiento

##### 4.1.2.1 Raíces

Se observa una fuerte reducción en el crecimiento (tablas 1 y 2 y gráficos 1 y 2), especialmente para las concentraciones de 1 y 2,5 ppm Cr VI en el medio, llegándose a una zona asintótica en la que apenas hay reducción del crecimiento al incrementarse la concentración de Cr VI en el medio.

El tratamiento con cromo afecta también negativamente al crecimiento longitudinal, como pudimos observar visualmente.

Teniendo en cuenta los valores de reducción porcentual se detecta una mayor disminución en el peso seco respecto al peso fresco.

##### 4.1.2.2 Parte aérea

También es afectado el crecimiento en la parte aérea en todos los parámetros estudiados, disminuyendo en forma exponencial inversamen

te con el incremento en la concentración en Cr VI suministrada, lo cual indica que se alcanza, al igual que en la raíz, una concentración cuyo efecto es máximo y a partir de la cual no se producen efectos posteriores sobre el crecimiento.

#### 4.1.3 Efectos sobre el contenido en cromo

El principal hecho observado es que, al igual que en la experiencia anterior (7), la relación entre el cromo suministrado y el contenido interno en cromo es lineal en la mayor parte de los órganos y concentraciones estudiados (tabla 2 y figura 2). Aún siendo conocido que la absorción del cromo puede variar con diversos factores, siendo el más importante de ellos la temperatura (16), éste no ha sido nuestro caso, puesto que todos los tratamientos estuvieron expuestos a las mismas condiciones ambientales, siendo la concentración de Cr VI en el medio el único facto de variación al que fueron sometidos los tratamientos, por lo que podemos decir que el contenido en cromo es función de su suministro, aunque, como veremos por los resultados obtenidos en experiencias posteriores en las que las plantas fueron sometidas a cultivo en contacto directo con la solución nutritiva (Experiencia III), no es función exacta del suministro sinó que también lo es de la disponibilidad de cromo en el medio, puesto que en la experiencia anteriormente mencionada idénticos síntomas visuales aparecieron a concentraciones de cromo en la solución nutritiva unas 10 veces menores que en esta experiencia. También fué posible observar una mayor concentración de cromo en las raíces que en la parte aérea. Así, mientras que las plantas control presentaban una relación Cr raíz/Cr parte aérea de aproximadamente únicamente 2, para las diferentes concentraciones de cromo en los tratamientos, esta relación es muy superior, lo cual indica que siempre la concentración de Cr en las raíces es muy superior que en la parte aérea, hecho relacionado con la presencia de una especie de barrera para la translocación de cromo

mo análoga a la observada por otros autores para otros metales pesados (18, 50). Relacionado con la existencia de esta hipotética barrera y respecto al experimento realizado con anterioridad y que dió lugar a la Tesina de licenciatura hay que resaltar un nuevo hecho observado al suministrar una concentración de cromo doblemente superior a la máxima utilizada en la anterior experiencia: la aparición de indicios de saturación en la concentración de cromo interno en la planta, saturación que unicamente se ha producido de forma clara en raíz, y, en menor grado en el tallo y hojas.

La explicación de la saturación observada está en el hecho, observado por otros autores (105) de que el cromo suministrado aparece en su mayor parte en vacuolas en la raíz y, del resto, la mayor parte se halla ligado a la pared celular. Teniendo en cuenta este efecto y combinándolo con la mencionada barrera de translocación obtendremos un cuadro análogo al obtenido en esta experiencia. Primeramente el cromo incrementa su concentración en la raíz proporcionalmente al cromo disponible en el medio, translocándose a su vez proporcionalmente a su concentración en raíz, de forma que el incremento en la concentración de cromo en todos los órganos es lineal y depende, en último término, de la concentración de cromo en el medio. Sin embargo, una vez la raíz comienza a saturarse de cromo, no se produce un incremento proporcional a la disponibilidad de cromo en el medio sino que la acumulación se hace más lentamente y se acerca a un valor máximo, perdiéndose de esta forma la linealidad seguida hasta entonces. A pesar de ello, no se han alcanzado todavía las concentraciones de saturación en la parte aérea, puesto que la barrera de translocación impide que todo el cromo presente en la raíz se transloque a la parte aérea, y se produciría una ligera reducción en el incremento de la concentración de cromo en el tallo como consecuencia de la disminución en el incremento de la concentración de cromo en la raíz. Según este modelo, los datos de concentración esperada en las distintas partes estudiadas debieran ser:

Raíz >> Tallo > Hojas inferiores > 1ª Hoja trifoliada

Sin embargo, no ha sido así y los valores observados han sido:

Raíz >> Hojas inferiores > Tallo > 1ª Hoja trifoliada

Este hecho podría ser explicado si las hojas inferiores actuaban como sumidero de las sustancias translocadas, de forma que fueran acumuladas por ellas, lo cual haría posible que su concentración fuera mayor que en el tallo. Respecto a la primera hoja trifoliada juegan otros factores que evitan que se conviertan en sumideros de sustancias translocadas y es debido ello a los efectos del cromo, lo cual no es así para las hojas inferiores que ya se encuentran preformadas en las semillas, de forma que resultan menos afectadas en su metabolismo que la primera hoja trifoliada ( en muchos de los nutrientes estudiados en esta experiencia se presentan concentraciones menores en las hojas trifoliadas que en las inferiores).

Estos datos posiblemente indican que la translocación del Cr desde la raíz hacia la parte aérea es un mecanismo pasivo, desarrollado conjuntamente con los flujos de masas de los diferentes nutrientes por la vía del xilema, actuando normalmente las hojas activas como sumideros de estos nutrientes.

Nuestros datos obtenidos en P. vulgaris son parecidos a los obtenidos por Hara et al. en plantas de Brassica sativa Clav. (45), de forma que ambas especies tienen una sensibilidad parecida, y acusada, frente al cromo.

Al igual que en la experiencia anterior hay que destacar que se observó la presencia de cromo en las plantas control a pesar del cuidado tomado para evitar posibles contaminaciones. Existen dos explicaciones a este fenómeno, que son:

- El cromo proviene de impurezas en las sales empleadas, restos fijados en el material utilizado y en el sustrato.

- El cromo proviene de la deposición del polvo atmosférico.

En nuestro caso nos inclinamos por una combinación de ambas, teniendo un gran peso específico la segunda, como corrobora el hecho de que la relación Cr raíz/Cr parte aérea sea más baja en los controles que en el resto de tratamientos.

Finalmente, dada la concentración de cromo en las plantas en relación con las del medio, podemos concluir que P. vulgaris es una especie acumuladora de cromo.

#### 4.1.4 Efectos sobre los diferentes nutrientes

##### 4.1.4.1 Efectos sobre el P

Se observa una relación polinomial cuadrática entre el contenido en P en la raíz y el suministro de cromo (tabla 4 y figura 4), mientras que en la parte aérea las relaciones no son tan claras (tabla 4 y figura 4), salvo en el tallo, en el que es posible observar un incremento en la concentración de P al incrementarse la concentración de cromo en el medio, aunque sin seguir una relación definida. Por lo que respecta a las hojas, no se detectan pautas de ningún tipo, salvo en la primera hoja trifoliada en la que se produce una brusca disminución en el contenido de P a partir de un suministro de Cr VI de 2,5 ppm.

Cuando se analizan las relaciones entre el P y el contenido interno en cromo de las diferentes plantas se observa que las relaciones son las mismas que en el caso del suministro, hecho ya esperado dada la estricta dependencia lineal entre el suministro de cromo y los contenidos internos en dicho metal.

Existe un comportamiento en el contenido en P que, al igual como será comentado más adelante para otros nutrientes, puede ser dividido en dos zonas. En el caso de la raíz estas dos zonas serían:

- Una primera zona de incremento en la concentración de P hasta 2,5 ppm Cr VI en el medio, que se corresponde con datos obtenidos anteriormente (7,38).
- Una segunda zona de disminución en el contenido en P para las concentraciones más elevadas de cromo (5 y 10 ppm), que no se corresponde con los datos obtenidos anteriormente (7,38), en los cuales el P se incrementó hasta la máxima concentración de cromo suministrada (5 ppm).

Este comportamiento diferencial en las dos zonas puede ser explicado por el hecho de que probablemente el Cr no afecta plenamente a las plantas hasta alcanzar determinadas concentraciones, en nuestro caso 5 ppm, de forma que estos datos estarían de acuerdo con el trabajo previo mencionado ya que los efectos detectados en aquél para un suministro de 5 ppm de cromo visualmente son parecidos a los obtenidos en éste para un suministro de 2,5 ppm Cr VI. A concentraciones más bajas, probablemente el metabolismo a pesar de estar afectado el crecimiento, no se dañe muy seriamente, mientras que a concentraciones más elevadas deben jugar otros factores un papel muy importante en el metabolismo.

El incremento en el contenido en P en la raíz no se traduce en un incremento similar en la parte aérea, por lo que podemos pensar que la translocación del P de la raíz a la parte aérea se ve afectada por el cromo. Para el incremento del contenido en P en la raíz podrían darse varias explicaciones. Una de ellas sería que este incremento fuera debido únicamente a un efecto de concentración al ser afectado el crecimiento y no la absorción, mientras que la disminución en el contenido podría ser debida a un efecto más severo sobre el transporte que sobre el crecimiento. Sin embargo, hay que tener en cuenta que otros autores han observado una estrecha relación entre el Cr y el P (17,50). Dichos autores han observado que plantas crecidas con deficiencia de P absorben más cromo y sugieren que posiblemente el Cr y el P comparten un mismo tipo de transportador.

Otra posible explicación del incremento de P en las raíces de las plantas tratadas con bajas concentraciones de Cr VI sería la de que el Cr, al ser absorbido, pudiera inducir la formación de nuevos puntos de unión para el Cr que también fueran utilizados por el P, lo cual incrementaría la absorción de ambos elementos, mientras que concentraciones mayores de Cr provocarían una toxicidad tal que los efectos sobre el metabolismo impedirían la inducción de nuevos puntos de fijación y, al ser la relación Cr/P elevada tendería a entrar más Cr que P. Que ciertos metales pesados son capaces de inducir nuevos puntos de unión e incrementar así su propia absorción en las raíces fué encontrado en 1978 por Petit (87) para el Cd. Si éste puede ser el caso de otros metales, como el Cr, requiere una mayor comprobación. Sin embargo, la sugerencia hecha por Shewry y Peterson (105) de que el  $\text{CrO}_4^{2-}$  puede ser absorbido por un mecanismo bi o multifásico de forma que el incremento en la concentración de Cr en el medio incrementaría su absoerción, refuerza esta interpretación.

Una tercera posibilidad sería una interacción P-Cr no en el mecanismo de absorción sino en la disponibilidad de P en el substrato. A favor de esta hipótesis está la observación hecha por Turner y Rust en plantas de soja (Glicine max) (112) de que el contenido en P de plantas tratadas con Cr aumenta en experiencias en suelo pero no en cultivo hidropónico líquido. En nuestro caso el cultivo fué realizado sobre un substrato que presenta cierta capacidad de intercambio, lo cual le da una cierta semejanza al suelo, por lo que podrían haberse dado este tipo de interacciones.

#### 4.1.4.2 Efectos sobre el K

Se observa, en general, una disminución en el contenido en K en todas las partes estudiadas (Tabla 5, figura 5). Sin embargo, en la raíz de las plantas control el valor mínimo observado más parece debido

a un error de medición que a un verdadero valor de contenido interno.

Por lo que respecta a los incrementos registrados en el tallo y las hojas inferiores de las plantas tratadas con 1 y 2,5 ppm Cr VI, no es significativo. El órgano que presenta una tendencia más clara es la primera hoja trifoliada. Esta relación se produce en el sentido de una disminución en el contenido en K respecto al suministro de Cr.

Dado que el Cr afecta de forma similar tanto a la raíz como a la parte aérea, no podemos concluir que haya sido afectada la translocación, aunque sí parece haberlo sido la absorción, lo cual se halla plenamente de acuerdo con el trabajo realizado anteriormente (7, 39) y con los datos reportados por Zaccheo et al. acerca del efecto inhibitorio del Cr sobre la absorción de K en segmentos de raíces de maíz (126,127).

La absorción y translocación del K parece estar ligada a una ATPasa localizada en muchas células y que requiere  $Mg^{2+}$ , siendo activada por el  $K^+$ . Jouany et al., en 1982, en estudios realizados en el alga Chlorella vulgaris pudieron demostrar que el Cr VI a 300 ug/ml reduce en un plazo rápido de únicamente dos horas el contenido en ATP en un 25% y que la reducción aumentaba con la concentración de cromo en el medio y el tiempo. Sin embargo, la disminución en la concentración en K en las raíces no parece directamente ligada a una falta de ATP necesario para su absorción, por lo menos por lo que respecta a las concentraciones bajas de Cr (2,5 ppm o menor) pues, como veremos más adelante, el contenido en Na en las raíces se ve más disminuido que el K a pesar de que las plantas tratadas con Cr VI reciben más Na en la solución nutritiva ya que se empleó  $Na_2CrO_4$  como sal de cromo y el Na penetra en las raíces mediante absorción pasiva (a favor de gradiente) y, generalmente, es bombeado activamente fuera de las raíces, proceso que requiere de ATP para ser realizado, puesto que realiza un trabajo en contra de gradiente, de aquí que la falta de ATP resultaría en un incremento en la concentración de Na. Esta evidencia indirecta acerca de que la in

hibición de la absorción de K no viene causada por un efecto inhibitorio del Cr sobre las bombas iónicas viene apoyada por los resultados experimentales de Zaccheo et al(126).

Sería necesario un estudio más profundo de los niveles de K en diferentes compartimentos celulares para observar realmente los efectos metabólicos a que puede dar lugar esta disminución en los niveles del metal. Así, la concentración de K a elevados suministros de Cr VI disminuye en las células guarda estomáticas y podrían darse un cierre de los estomas, lo cual, de hecho, fué observado en experiencias posteriores (Experiencias II y III), aunque en estos resultados podría jugar un papel importante un cierre hidroactivo por incremento en la concentración de ácido abscísico, lo cual podría ser motivo de posteriores estudios.

#### 4.1.4.3 Efectos sobre el Na

El Na no sigue una relación clara respecto al suministro de cromo en ninguno de los órganos estudiados (tabla 6, figura 6), salvo en el tallo (figura 6 B), en el que se observa una tendencia a bajar su concentración a medida que se incrementa el suministro de cr VI. En la hoja inferior y en la primera hoja trifoliada también se presenta esta tendencia aunque de forma menos definida. Estos resultados probablemente indican que es afectada la translocación, probablemente más que la absorción.

#### 4.1.4.4 Efectos sobre la relación K/Na

La relación K/Na en raíces pone de manifiesto que a concentraciones bajas de Cr en el medio el Na es más afectado que el K (tabla 7 y figura 7 A), puesto que se observa un incremento en la relación. A concentraciones mayores de 2,5 ppm Cr VI en el medio, esta relación

tiende a disminuir, indicando un mayor efecto sobre el K que sobre el Na. Este comportamiento, comparado con los valores obtenidos para el K y el Na indica que en la raíz el elemento verdaderamente afectado es el K, puesto que la relación K/Na sigue la pauta de comportamiento del K, lo que probablemente sea indicativo de un efecto del Cr sobre la absorción del K.

Respecto a la parte aérea el efecto es totalmente contrario, puesto que en el tallo (figura 7 B) la relación K/Na se incrementa a medida que se incrementa el suministro de Cr VI, aunque en las hojas esta relación no es clara (figura 7 C y D). probablemente este hecho sea indicativo de efectos sobre la translocación de ambos metales, principalmente del Na, cuyos niveles tienden a disminuir en todos los órganos de la parte aérea estudiados.

#### 4.1.4.5 Efectos sobre el Ca

El comportamiento del Ca respecto al suministro de Cr es igual en todos los órganos estudiados (tabla 8 y figura 8). En todos ellos se produce un incremento en el contenido en Ca seguido de una disminución a suministros elevados, hecho indicativo de que la translocación del Ca no ha sido tan afectada como su absorción.

Shewry y Peterson (105) han indicado que el Ca favorece la absorción, no tan solo de ortofosfato sino también de cromato. También Turner y Rust (112) observaron en plantas de soja (Glicine max L.) una interacción Cr-Ca. Al igual que ellos observaron en cultivo en suelo un incremento significativo en el contenido en Ca en las partes aéreas, en nuestro caso, para las menores concentraciones de Cr VI suministradas (menos de 2,5 ppm) hemos observado también un incremento en el contenido en Ca en todos los órganos estudiados salvo en la primera hoja trifoliada.

Dada la interacción Cr-Ca, una probable explicación de la acusada disminución del contenido en Ca para las concentraciones más elevadas de Cr podría ser que el alcance de concentraciones suficientemente elevadas de cromo como para provocar una saturación en la capacidad de intercambio catiónico en los vasos del xilema se hubiera realizado y el Ca hallara imposible su fijación para su posterior translocación. En el caso de la raíz la no fijación del Ca provocaría una disminución en la concentración de Ca observada.

Sabemos que no solo la capacidad de intercambio en los vasos del xilema y en el apoplasto influye en la translocación de Ca, sino que una elevada tasa de transpiración favorece de forma importante la translocación de este elemento (75).

El Cr también puede influir en la transpiración, como de hecho observamos en experiencias posteriores (Experiencias II y III), de forma que a mayor suministro de Cr se produce una menor tasa de transpiración, por lo tanto, una menor translocación, conjuntada con los efectos que el Cr pueda tener sobre el metabolismo, reduciendo la absorción (Vía activa o difusión facilitada), no tan solo del Ca sino también de otros elementos, obteniéndose así una drástica reducción en los contenidos a medida que nos alejamos de la raíz (el efecto más patente se observa en las hojas trifoliadas). Relacionado con ello, está el hecho de que incrementos en la concentración de Ca en la solución nutritiva disminuyen las diferencias de tolerancia al Al entre líneas puras de maíz.

#### 4.1.4.6 Efectos sobre el Mg

Al igual que en el caso del Ca existe una relación inversa entre el suministro de Cr y el contenido en Mg de las diferentes partes estudiadas (tabla 9 y figura 9), obteniéndose un efecto mayor en raíces y un efecto menor en la primera hoja trifoliada, en la que incluso se incrementa el contenido en Mg, de forma significativa, para un suminis

tro de 1 ppm Cr VI.

El Mg es más afectado en la raíz que en la parte aérea, según se desprende de los datos obtenidos; a bajas concentraciones de Cr se produce un marcado descenso en los niveles de Mg en la raíz, mientras que a medida que se incrementa la concentración de Cr se produce una cierta estabilización. De este hecho podemos deducir que es más afectada la absorción que la translocación, supuesto que viene apoyado por el significativo incremento en el contenido en Mg en la primera hoja trifoliada.

Aunque el hecho de ser menos afectada la parte aérea que la raíz podría ser debido a un efecto de concentración debido a que el crecimiento también es afectado, esta hipótesis no parece probable ya que la raíz también ve afectado su crecimiento y, sin embargo, no se produce concentración del Mg en ella.

#### 4.1.4.7 Efectos sobre la relación Na/P

Aunque la raíz no sigue una pauta muy definida, es posible observar una tendencia a la disminución en la relación Na/P que se observa claramente en el tallo (tabla 11 y figura 11), no observándose en las hojas inferiores ninguna tendencia clara, pareciendo haber incluso en la primera hoja trifoliada una cierta tendencia a incrementarse esta relación a medida que se incrementa la concentración de Cr VI en el medio, por lo que a partir de estos datos es difícil conocer cuál de ambos elementos resulta más afectado por el tratamiento con cromo en el medio.

#### 4.1.4.8 Efectos sobre la relación K/P

Igualmente que en el caso del Na es posible observar que no existe una clara tendencia en la relación K/P-en raíz ni primera hoja

trifoliada, aunque en el tallo y las hojas inferiores se observa una clara tendencia a la disminución en la relación K/P (tabla 10 y figura 10). El comportamiento en la raíz y la primera hoja trifoliada es explicable debido a los comportamientos antagónicos del P y el K, mientras que en el tallo y las hojas inferiores el comportamiento tendente a la disminución en esta relación viene explicado por la disminución en la concentración interna del K a medida que se incrementa el suministro de Cr VI, mientras que la concentración interna de P no sigue una pauta clara, lo cual podría indicar un mayor efecto del Cr sobre el K que sobre el P.

#### 4.1.4.9 Efectos sobre la relación Ca/P

Al igual que en el caso del K, los únicos datos que siguen una tendencia clara son los pertenecientes al tallo y hojas inferiores (tabla 12 y figura 12). En ellos existe una tendencia al incremento en la relación Ca/P seguida de una disminución en esta relación para los suministros de Cr VI más elevados empleados (10 ppm), lo cual indica que el comportamiento viene determinado por el Ca más que por el P, siendo así probable que el Ca haya sido más afectado que el P.

#### 4.1.4.10 Efectos sobre la relación Mg/P

Tanto en la raíz como en el tallo y las hojas inferiores es posible observar una disminución en la relación Mg/P a medida que se incrementa el suministro de Cr VI (tabla 13 y figura 13). En la raíz es posible observar un incremento no significativo en la relación Mg/P para un suministro de cromo de 10 ppm, aunque probablemente sea debido a la conjugación de múltiples efectos del cromo sobre las plantas tratadas con elevadas concentraciones de cromo, al igual que hemos discutido ya para otros elementos (entre ellos el P, en el apartado 4.1.4.1) y que se repetirá en sucesivos nutrientes.

Al igual que hemos observado en nutrientes ya comentados anteriormente y como también observaremos al comentar los nutrientes sucesivos, la primera hoja trifoliada presenta un comportamiento diferente respecto al del resto de las partes estudiadas, probablemente debido a que dichas hojas están más afectadas que el resto de la planta puesto que se hallan expuestas al Cr desde el inicio de su formación, lo cual posibilita que el Cr ejerza sus efectos tanto a nivel replicativo como a nivel metabólico.

De los datos obtenidos es posible llegar a la conclusión de que el Mg es más afectado que el P por el Cr, puesto que la relación Mg/P, al disminuir claramente, indica un menor contenido en Mg que en P a medida que se incrementa el suministro de Cr VI.

#### 4.1.4.11 Efectos sobre el Fe

Se observa una disminución en el contenido en Fe en la raíz hasta un suministro de Cr de 2,5 ppm (el bajo valor del control parece debido a un error más que a un valor real) (tabla 14 y figura 14). A 5 ppm Cr VI se produce un incremento no significativo en el nivel de Fe respecto al nivel de 2,5 ppm Cr VI, siendo para un suministro de 10 ppm Cr VI este incremento significativo respecto al valor máximo alcanzado por el suministro de 2,5 ppm Cr VI, aunque todos estos valores son significativamente inferiores a los observados para un suministro de 1 ppm Cr VI.

Tanto en el tallo como en las hojas inferiores se observa el mismo comportamiento que en la raíz, es decir, una disminución en el contenido en Fe hasta un suministro de Cr VI de 2,5 ppm seguido de un incremento en los niveles de Fe para los mayores suministros de Cr VI que, sin embargo, mantienen sus niveles de Fe significativamente inferiores a los de las plantas no tratadas con cromo.

En la primera hoja trifoliada esta disminución es progresiva a medida que se incrementa el suministro de Cr VI.

Nuestros resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por otros autores. Así, Turner y Rust (112) observan, al igual que nosotros, una disminución en la concentración de Fe en raíces y partes aéreas en plantas de soja (G. max) tratadas con Cr en cultivo hidropónico, mientras que en cultivo en suelo no se observan diferencias significativas en las concentraciones de Fe. Por el contrario, Misra y Jaiswal (81) observan en espinaca (Spinacea oleracea) una correlación positiva significativa entre la concentración de cromo en las raíces y tallos + peciolo respecto a su concentración en Fe. Cary et al. (18) encontraron que la ausencia de Fe en la solución nutritiva inhibía fuertemente la absorción de Cr, y estos autores, después de un estudio con diferentes especies alimenticias, consideran que plantas que son capaces de translocar grandes cantidades de Fe también son capaces de translocar bien el Cr. Otros metales, así el Mn, también son capaces de provocar una deficiencia de Fe.

En nuestro caso, la translocación del Fe no ha sido claramente inhibida por el cromo; sin embargo, la drástica reducción en el contenido en Fe en la primera hoja trifoliada junto con el incremento en P en la misma está de acuerdo con la clorosis observada y con la observación hecha por Austenfeld de que aunque se acumula más Cr en las hojas inferiores, es más afectada la fotosíntesis en las hojas superiores (3).

Diversos autores han observado que tejidos cloróticos presentan, en general, un incremento en la relación P/Fe respecto a los no cloróticos (15,22,57). La concentración de Fe es de poca utilidad por sí misma en los estudios sobre clorosis y los niveles de Fe en tejidos cloróticos incluso pueden ser superiores a los de tejidos no cloróticos (76), lo cual es indicativo de una inactivación del Fe. Dekock et al. sostienen el punto de vista de que la relación P/Fe es una medida de la relación  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  en la célula (22). Una relación P/Fe elevada indica

ría una derivación hacia Fe III, que podría unirse a fosfoproteínas y ser inactivado biológicamente.

En nuestro estudio hemos observado que la relación P/Fe se incrementa con el suministro de Cr (tabla 15 y figura 15) en raíces y, especialmente tallo, por lo que podemos suponer que en estos órganos hay menos Fe biológicamente activo. No se produce, sin embargo, incremento en esta relación en hojas inferiores ni en la primera hoja trifoliada, aún cuando disminuye el contenido en Fe. En las hojas inferiores la disminución es menor que en las hojas trifoliadas, lo cual podría dar lugar a la no aparición de clorosis en las hojas inferiores, mientras que en la primera hoja trifoliada la no inactivación del Fe no podría suplir la drástica disminución en el contenido en Fe que, conjuntamente con otros efectos del cromo sobre el metabolismo, daría lugar a la aparición de la observada clorosis.

#### 4.1.4.12 Efectos sobre el Mn

En raíz se observan diferencias significativas en el contenido en Mn a lo largo del tratamiento. Existe una tendencia a aumentar el contenido en Mn hasta un suministro de Cr VI de 2,5 a 5 ppm. mientras que a 10 ppm se produce una disminución no significativa (tabla 16 y figura 16).

En la parte aérea el comportamiento es complejo y similar en los tres órganos estudiados, teniendo que recurrirse a un polinomio de tercer grado para hallar un buen ajuste entre el contenido en Mn y el suministro de cromo. En estos órganos pueden distinguirse tres partes:

- Incremento en el contenido en Mn hasta un suministro de Cr de 1 ppm.
- Disminución en el contenido en Mn hasta un suministro de Cr 5 ppm.

- Nuevo incremento para un suministro de 10 ppm.

La primera zona es explicable por un comportamiento anómalo que ocurre a bajas concentraciones de Cr y que no tan solo potencia los niveles de algunos nutrientes sino que, como veremos más adelante, incluso puede llegar a modificar el crecimiento y las relaciones hídricas, así como la transpiración, lográndose de esta forma una serie de efectos ligados que provocan que las plantas tratadas con bajas concentraciones de cromo presenten un comportamiento anómalo respecto a la tónica general del resto de tratamientos.

La segunda zona es explicable como una inhibición de la translocación, puesto que, a pesar de que existe un incremento en los niveles de Mn en la raíz, se produce una disminución en los niveles de Mn en toda la parte aérea.

Finalmente, la tercera zona se explicaría como un mayor efecto sobre el crecimiento que sobre el contenido en Mn que provocaría una concentración pasiva de dicho elemento.

#### 4.1.4.13 Efectos sobre la relación Fe/Mn

Nuestros datos se hallan parcialmente de acuerdo con los de Misra y Jaiswal (81), quienes encontraron que en Spinacea oleracea existía una correlación lineal positiva entre el nivel interno de Cr y la relación Fe/Mn, tanto en raíces como en parte aérea. En nuestro caso únicamente se ha producido un incremento en esta relación para los más elevados suministros de Cr VI. Sin embargo, hay que señalar que el Al provoca un incremento en esta relación, por lo que no se puede hablar de efectos generales de los metales pesados sobre la misma (31,32).

De los datos obtenidos (tabla 17 y figura 17) podemos deducir que el Cr, a bajas concentraciones, afecta de forma directa y negativa la relación entre ambos elementos, comportándose, al igual que en el tra

bajo realizado anteriormente (7,39), de forma opuesta a como se comporta S. oleracea según Misra y Jaiswal. A concentraciones elevadas de Cr deben existir factores que provocan el incremento en esta relación.

Nuevamente el comportamiento diferencial en la primera hoja trifoliada respecto al resto de órganos indica un diferente efecto sobre la misma, probablemente, como ya ha sido comentado, debido a las diferentes condiciones de exposición al Cr.

#### 4.1.4.14 Efectos sobre el Zn

No se observa una tendencia clara en el contenido en Zn en la raíz, si exceptuamos el elevado valor que dicho contenido alcanza para un suministro de 1 ppm Cr VI (tabla 18 y figura 18), que podría hacer pensar en un error en la medición del control pero que se repite en el tallo y, no tan acusadamente en las hojas inferiores.

Tanto en el tallo como en las hojas inferiores se produce una tendencia al incremento en el contenido en Zn para el mayor suministro de Cr VI empleado, lo cual probablemente sea debido a un mayor efecto sobre el nutriente en cuestión. La primera hoja trifoliada presenta un comportamiento diferencial respecto al resto de órganos estudiados, resolviéndose en un descenso en el contenido en Zn a medida que se incrementa el suministro de Cr VI, lo cual es indicativo de que ha sido más afectada que el resto de órganos.

De los datos obtenidos no podemos concluir que haya sido más afectada la translocación del Zn de la raíz hacia la parte aérea, pues el comportamiento de ambas partes es muy parecido, aunque probablemente sí haya sido más afectada la translocación hacia la primera hoja trifoliada.

El incremento en el contenido en Zn para el tratamiento con 1 ppm Cr VI en el medio es difícil de explicar, pero podría deberse a

los efectos estimulantes del Cr a bajas concentraciones ya observado por otros autores (11,40).

#### 4.1.4.15 Efectos sobre el Cu

Se presenta una elevada dispersión de los datos al estudiar la raíz, el tallo y la primera hoja trifoliada, no siendo así para las hojas inferiores (tabla 19 y figura 19). En todos los casos los contenidos en Cu son similares en raíz y parte aérea, lo cual, juntamente con el hecho de que las hojas inferiores presenten un comportamiento diferencial, podría indicar unos efectos tanto sobre la absorción como sobre la translocación (aunque exista una clara tendencia a disminuir el contenido en la raíz y tallo, se produce un incremento claro y significativo en los niveles de Cu en las hojas inferiores).

El incremento en hojas inferiores podría ser debido a un efecto estimulante del Cu por el Cr, aún difícil de discutir debido a la escasa información acerca de los mecanismos de translocación del Cu.

#### 4.1.4.16 Efectos sobre el Mo

En todos los órganos estudiados se produce una clara tendencia a la disminución de los niveles de Mo, principalmente en la raíz (tabla 20 y figura 20). Este claro efecto sobre el Mo en la raíz va siendo diluido a medida que nos alejamos de ella, lo cual probablemente sea debido a un mayor efecto sobre la absorción que sobre la translocación.

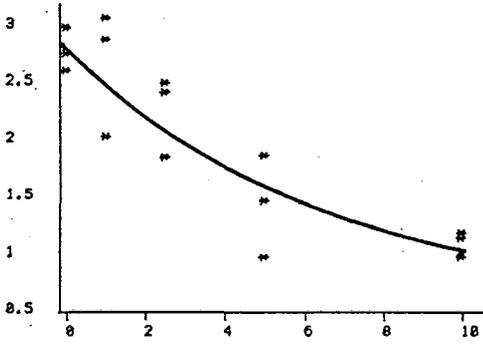
Hemos de resaltar que se produce un incremento significativo en los niveles de Mo en las plantas tratadas con 1 ppm Cr VI en el medio en el tallo, lo cual probablemente sea debido a los efectos estimulantes del Cr, que, sin embargo, no se han traducido en efectos visuales ni de crecimiento patentes en esta experiencia, aunque sí en una experiencia posterior (experiencia III).

Tabla 1: Peso fresco, expresado en g de las distintas partes de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos

		Concentración de cromo en el medio (ppm)				
		RAIZ		TALLO		
		0	1	2,5	5	10
		2,578	2,844	2,457	0,956	1,115
		2,951	3,026	1,818	1,445	0,963
		2,716	1,994	2,392	1,838	1,166
x		2,748a	2,621a	2,225ab	1,413bc	1,081c
s.d.		0,189	0,550	0,354	0,442	0,105
<hr/>						
		HOJAS INFERIORES		PRIMERA HOJA TRIFOLIADA		
		0	1	2,5	5	10
		2,916	2,798	1,830	0,584	0,554
		2,957	2,728	1,372	1,047	0,778
		3,180	2,192	1,714	0,929	0,806
x		3,018a	2,573a	1,638b	0,853cd	0,712d
s.d.		0,142	0,332	0,238	0,241	0,138
		2,057a	1,770a	1,395b	0,668c	0,706c
		0,281	0,194	0,246	0,085	0,119
		0,914	0,866	0,712	0,070	-----
		1,131	0,590	0,138	0,097	-----
		1,081	0,7086	0,677	0,105	-----
		1,052a	0,722b	0,401bc	0,090c	-----
		0,100	0,139	0,269	0,018	-----

-. FIGURA 1 .-

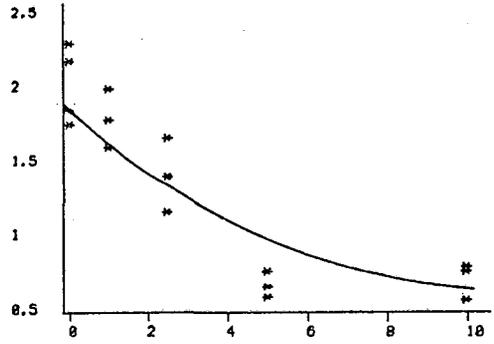
Peso fresco en la experiencia I



A: RAIZ

$$y = 2,7065 e^{-0,0998x}$$

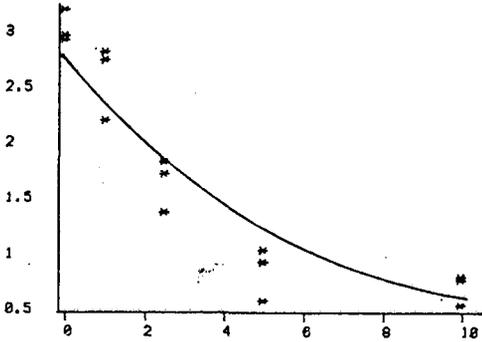
r = -0,88



B: TALLO

$$y = 1,8107 e^{-0,1152 x}$$

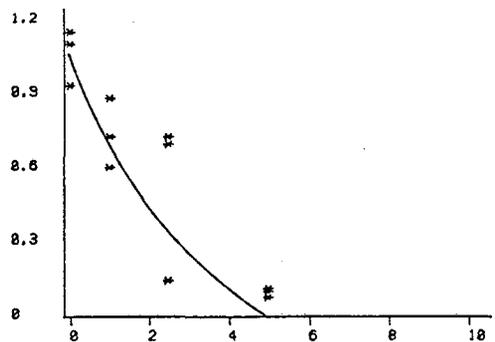
r = -0,85



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 2,6072 e^{-0,1512 x}$$

r = -0,90



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 1,116 e^{-0,4998 x}$$

r = -0,94

Ordenadas: Peso (g)

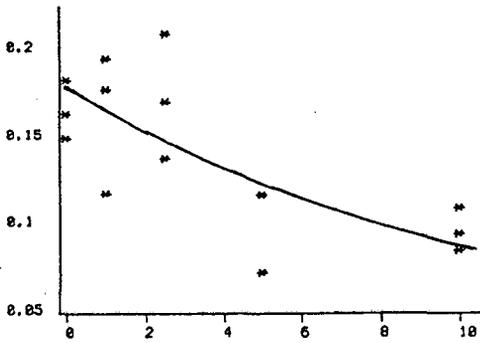
Abcisas: Concentración de cromo en el medio

Tabla 2: Peso seco, expresado en g, de las distintas partes de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos

		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ			TALLO						
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
		0,162	0,176	0,169	0,072	0,093	0,137	0,186	0,163	0,082	0,078
		0,181	0,193	0,137	0,116	0,084	0,180	0,164	0,124	0,086	0,110
		0,148	0,117	0,207	0,116	0,108	0,176	0,124	0,154	0,107	0,114
x		0,164a	0,162a	0,171a	0,145ab	0,098b	0,164a	0,158ad	0,147b	0,092c	0,101c
s.d.		0,016	0,040	0,171	0,042	0,012	0,023	0,031	0,021	0,013	0,020
PRIMERA HOJA TRIFOLIADA											
		0,250	0,255	0,185	0,074	0,082	0,127	0,117	0,057	0,011	-----
		0,252	0,265	0,151	0,128	0,112	0,120	0,075	0,012	0,016	-----
		0,251	0,167	0,189	0,177	0,122	0,138	0,088	0,092	0,017	-----
x		0,251a	0,229ab	0,175b	0,126b	0,105c	0,128a	0,093ab	0,053bc	0,015c	-----
s.d.		0,001	0,054	0,021	0,051	0,021	0,009	0,021	0,040	0,015	-----
HOJAS INFERIORES											
		0,250	0,255	0,185	0,074	0,082	0,127	0,117	0,057	0,011	-----
		0,252	0,265	0,151	0,128	0,112	0,120	0,075	0,012	0,016	-----
		0,251	0,167	0,189	0,177	0,122	0,138	0,088	0,092	0,017	-----
x		0,251a	0,229ab	0,175b	0,126b	0,105c	0,128a	0,093ab	0,053bc	0,015c	-----
s.d.		0,001	0,054	0,021	0,051	0,021	0,009	0,021	0,040	0,015	-----

-. FIGURA 2 .-

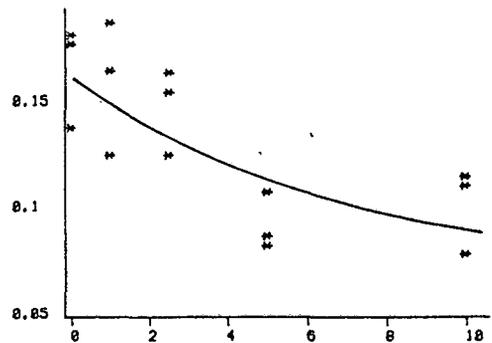
Peso seco en la experiencia I



A: RAIZ

$$y = 0,1696 e^{-0,0613 x}$$

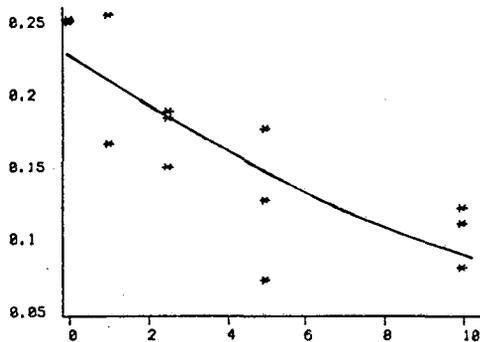
$$r = -0,71$$



B: TALLO

$$y = 0,15714 e^{-0,05653 x}$$

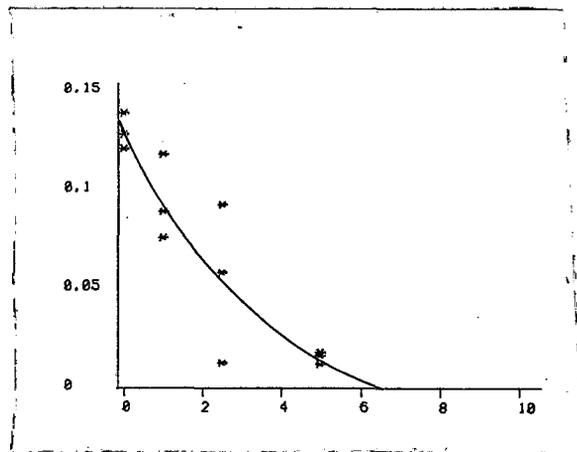
$$r = -0,72$$



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 0,23032 e^{-0,0909 x}$$

$$r = -0,81$$



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 1,3116 e^{-0,4454 x}$$

$$r = -0,88$$

Ordenadas: Peso (g)

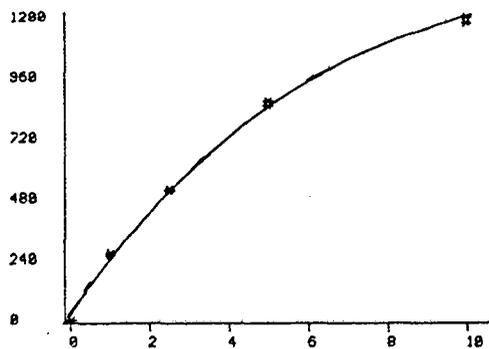
Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 3: Concentración de Cr respecto a la materia seca, expresada en mg/Kg, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ					TALLO				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	3,45a	264b	517c	861d	1190e	2,23a	9,57b	13,25c	29,07d	45,96e	
s.d.	---	1,41	3,54	72,61	14,14	1,37	0,37	1,24	0,53	3,74	
		HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
	1,26	19,80	33,33	61,17	124,2	3,21	6,81	10,20	19,20	---	
	2,16	20,10	30,25	63,13	158,2	6,28	11,46	11,08	---	---	
x	1,71a	19,95b	31,79c	62,15d	141,20d	4,74a	9,13bc	10,64c	19,20d	---	
s.d.	0,64	0,22	9,73	1,38	24,09	2,17	3,29	0,62	---	---	

-. FIGURA 3 .-

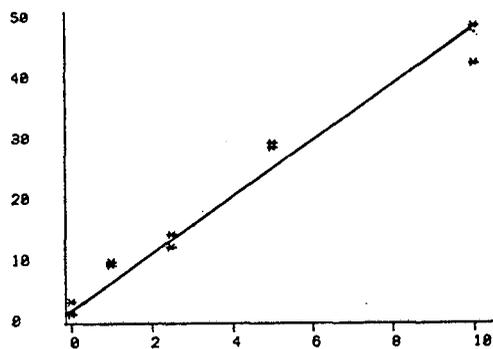
Contenido en cromo



A: RAIZ

$$y = 335,59 x^{0,5065}$$

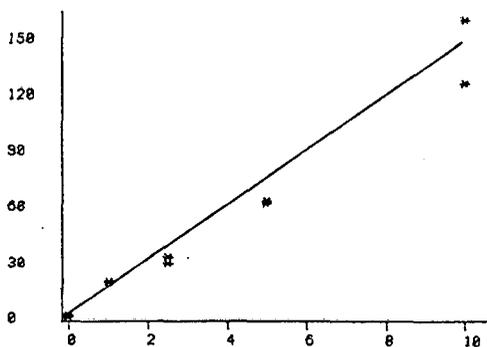
$$r = 0,997$$



B: TALLO

$$y = 4,014 + 4,298 x$$

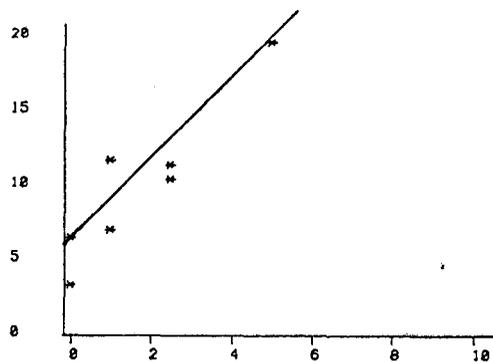
$$r = 0,986$$



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 0,787 + 13,668 x$$

$$r = 0,984$$



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 5,175 + 2,668 x$$

$$r = 0,924$$

Ordenadas: Contenido en cromo (mg/Kg)

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 4: Contenido en P, expresado en % respecto a la materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

Concentración de cromo en el medio (ppm)

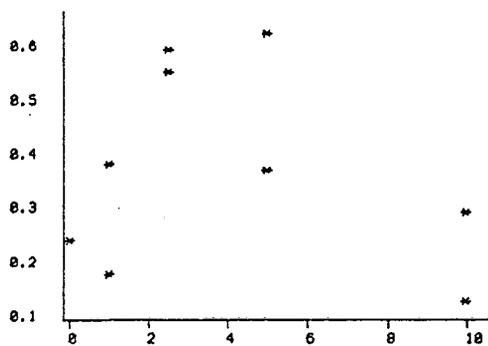
	RAIZ					TALLO				
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	0,24	0,18	0,55	0,62	0,29	0,19	0,24	0,30	0,23	0,55
s.d.	-----	0,38	0,59	0,37	0,13	0,89	0,25	0,29	0,25	0,78
x	0,24a	0,28b	0,57c	0,49bc	0,21b	0,53ab	0,25a	0,30b	0,24a	0,66c
s.d.	-----	0,14	0,02	0,18	0,12	0,48	0,001	0,001	0,01	0,16

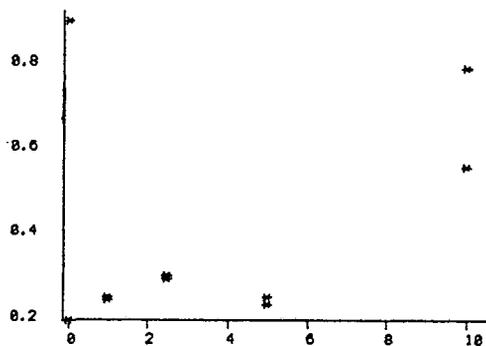
	HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	0,27	0,28	0,77	0,22	0,71	0,39	0,53	0,22	0,15	-----
s.d.	0,44	0,42	1,50	0,30	0,83	0,47	0,84	0,009	-----	-----
x	0,36a	0,35a	1,14b	0,26a	0,77b	0,43ab	0,65b	0,15ab	0,15b	-----
s.d.	0,11	0,10	0,52	0,05	0,10	0,06	0,12	0,10	-----	-----

FIGURA 4 .-

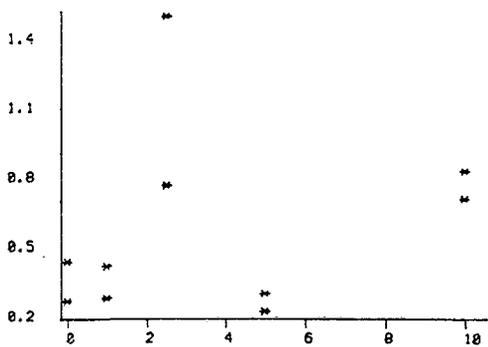
Contenido en fósforo



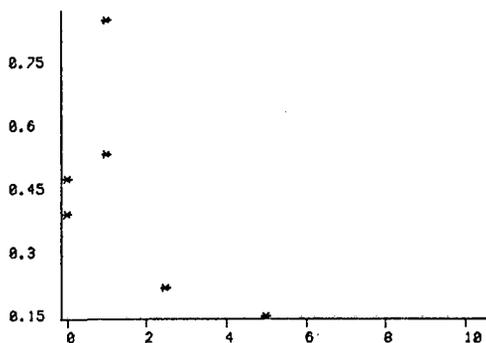
A: RAIZ



B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Contenido en fósforo (%)

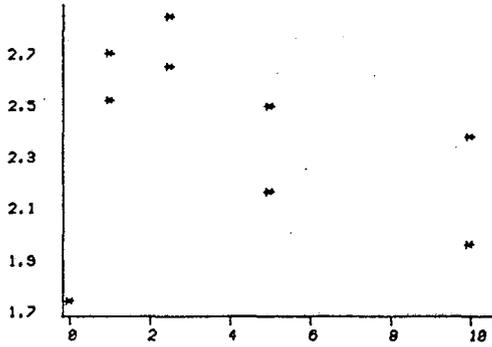
Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 5: Contenido en K, expresado en % respecto a la materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

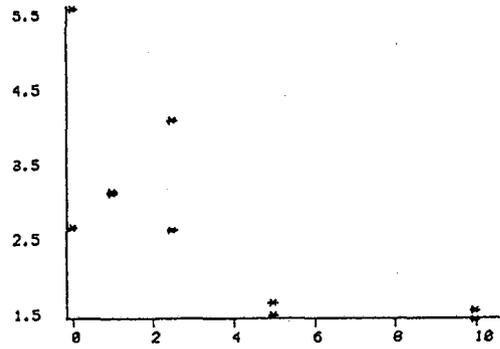
		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ					TALLO				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
1,75		2,51	2,83	2,16	2,37	2,65	3,14	2,62	1,52	1,43	
---		2,69	2,64	2,49	1,96	5,55	3,10	4,08	1,68	1,57	
x	1,75a	2,60b	2,74b	2,32c	2,17a	4,06a	3,12a	3,35a	1,60b	1,50b	
s,d,	----	0,13	0,14	0,23	0,29	2,11	0,02	1,03	0,11	0,10	
HOJAS INFERIORES											
PRIMERA HOJA TRIFOLIADA											
0		1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10	
2,85		3,17	3,05	2,07	2,08	3,86	3,68	2,86	2,74	---	
2,81		3,37	2,88	2,13	2,57	4,02	3,50	2,90	---	---	
x	2,83a	3,27b	2,96c	2,10d	2,33d	3,94a	3,57b	2,87c	2,74c	---	
s,d,	0,03	0,15	0,12	0,04	0,35	0,12	0,12	0,02	---	---	

-. FIGURA 5 .-

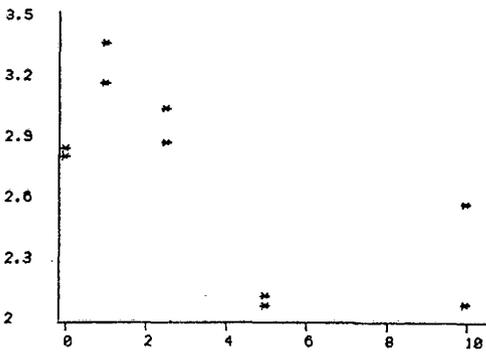
Contenido en potasio



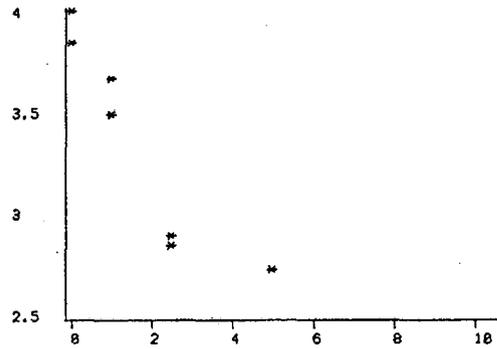
A: RAIZ



B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Contenido en potasio (%)

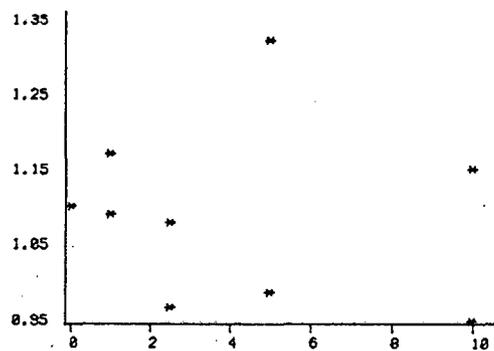
Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 6: Contenido en Na, expresado en % respecto a la materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

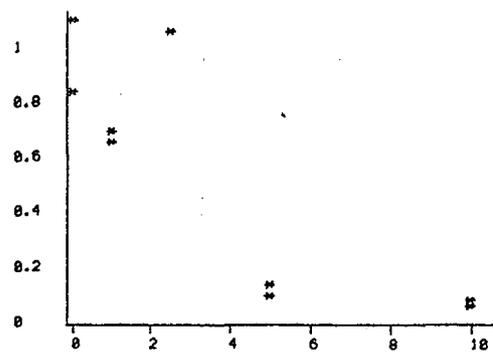
		Contenido en cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ					TALLO				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x		1,10	1,09	1,08	1,32	1,15	0,83	0,65	1,25	0,10	0,08
		---	1,17	0,97	0,99	0,95	1,09	0,69	1,05	0,14	0,06
<hr/>											
x		1,10a	1,13a	1,02b	1,15a	1,05a	0,96a	0,67b	1,15a	0,12c	0,07d
s.d.		---	0,06	0,08	0,23	0,14	0,18	0,03	0,14	0,03	0,02
<hr/>											
		HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
		0,40	0,32	0,63	0,53	0,12	0,36	0,38	0,063	0,18	---
		0,44	0,86	0,28	0,38	0,16	0,38	0,22	0,28	---	---
<hr/>											
x		0,42a	0,59a	0,46a	0,46a	0,14b	0,37a	0,30ab	0,11bc	0,18c	---
s.d.		0,02	0,39	0,25	0,11	0,03	0,02	0,11	0,07	---	---

- . FIGURA 6 .-

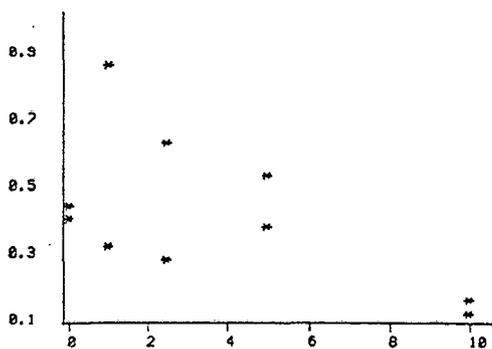
Contenido en sodio



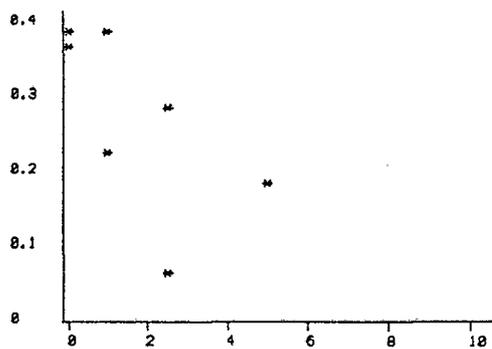
A: RAIZ



B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Contenido en sodio (%)

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 7: Relación K/Na en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

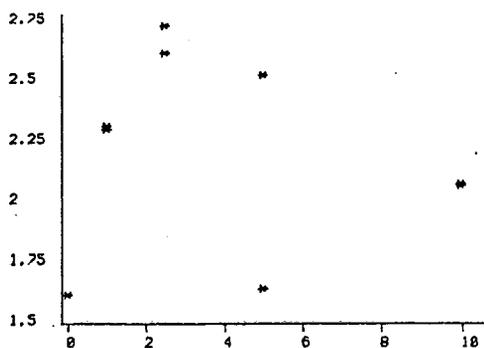
		Concentración de cromo en el medio (ppm)				
		RAIZ		TALLO		
		0	1	2,5	5	10
		1,61	2,31	2,61	1,64	2,07
		---	2,30	2,73	2,52	2,06
x		1,61a	2,31b	2,67c	2,086bd	2,07d
s.d.		---	0,01	0,08	0,62	0,01
		4,15a	2,31b	3,00b	13,30c	21,33d
		1,36	0,01	1,27	1,84	5,91
		0	1	2,5	5	10
		3,18	2,31	2,10	14,6	17,15
		5,11	2,30	3,90	12,0	25,51
		0	1	2,5	5	10
		10,73	9,66	42,01	9,70	---
		10,46	15,62	18,02	---	---
		10,60a	12,64ab	30,02c	9,70b	---
		0,19	4,21	16,96	---	---
		0	1	2,5	5	10
		7,05	10,02	3,05	3,90	18,00
		6,41	3,90	10,25	5,58	16,29
		6,73a	6,96a	6,65a	4,74a	17,20b
		0,45	4,33	5,09	1,19	1,14
		0	1	2,5	5	10
		10,73	9,66	42,01	9,70	---
		10,46	15,62	18,02	---	---
		10,60a	12,64ab	30,02c	9,70b	---
		0,19	4,21	16,96	---	---

HOJAS INFERIORES

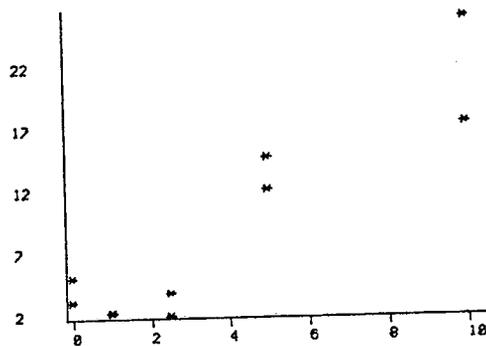
PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

-. FIGURA 7 .-

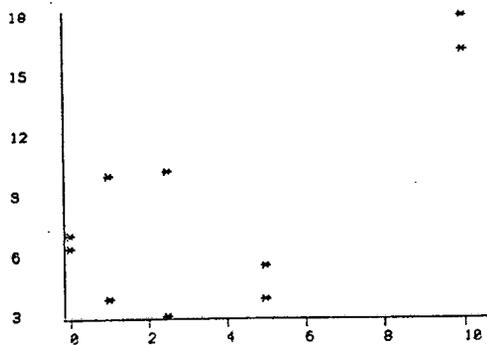
Relación K/Na



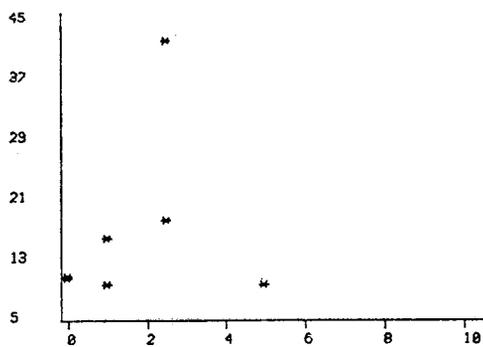
A: RAIZ



B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Relación K/Na

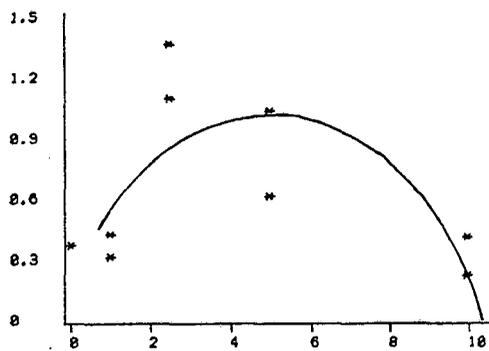
Abscisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 8: Contenido en Ca, expresado en % respecto a la materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ			TALLO						
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	0,37a	0,37	0,32	1,10	1,04	0,41	0,30	0,42	0,62	0,40	0,05
s.d.	-----	0,43	1,37	0,62	0,23	0,54	0,62	0,47	0,54	0,02	0,02
<hr/>											
x	0,37a	0,38a	1,23b	0,83b	0,32a	0,42a	0,52ab	0,55a	0,47a	0,04b	0,04b
s.d.	-----	0,08	0,20	0,30	0,13	0,17	0,14	0,11	0,10	0,02	0,02
<hr/>											
		HOJAS INFERIORES			PRIMERA HOJA TRIFOLIADA						
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	0,38a	0,40	1,56	1,02	0,85	0,09	0,45	0,65	0,33	-----	-----
s.d.	0,03	0,36	0,84	0,67	0,53	-----	0,19	0,40	0,46	-----	-----
<hr/>											
x	0,38a	1,12b	0,84c	0,69bc	0,09d	0,32a	0,53ab	0,39a	-----	-----	-----
s.d.	0,03	0,50	0,26	0,23	-----	0,19	0,17	0,09	-----	-----	-----

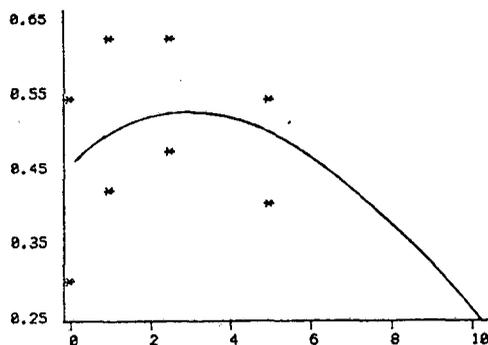
-. FIGURA 8 .-

Contenido en calcio



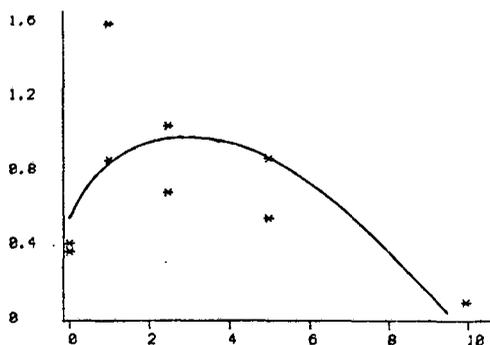
A: RAIZ

$$y = 0,337 + 0,2826 x - 0,0288 x^2$$
$$r^2 = 0,559$$



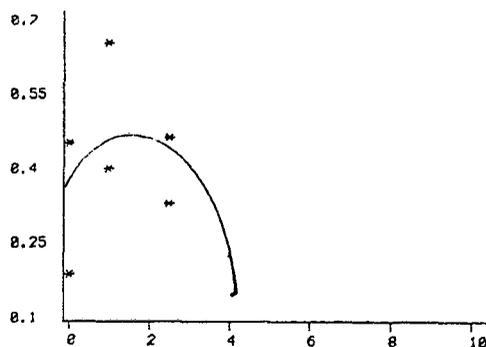
B: TALLO

$$y = 0,4412 + 0,06113 x - 0,01018 x^2$$
$$r^2 = 0,820$$



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 0,6717 + 0,1271 x - 0,0193 x^2$$
$$r^2 = 0,516$$



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 0,353 + 0,1444 x - 0,0437 x^2$$
$$r^2 = 0,661$$

Ordenadas: Contenido en calcio (%)

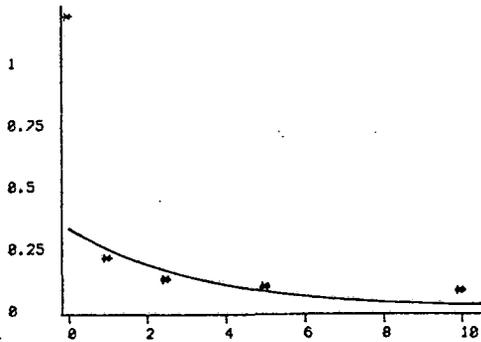
Abscisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 9: Contenido en Mg, expresado en % respecto a la materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ					TALLO				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	1,18a	0,22b	0,13c	0,10d	0,09e	0,18ab	0,20a	0,17b	0,09c	0,09c	
s.d.	-----	0,00	0,03	0,01	0,001	0,03	0,01	0,03	0,00	0,001	
		HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	0,34a	0,22b	0,25c	0,16d	0,15d	0,19a	0,25b	0,19a	0,14c	-----	
s.d.	0,03	0,001	0,01	0,002	0,02	0,004	0,01	0,01	-----	-----	

-. FIGURA 9 .-

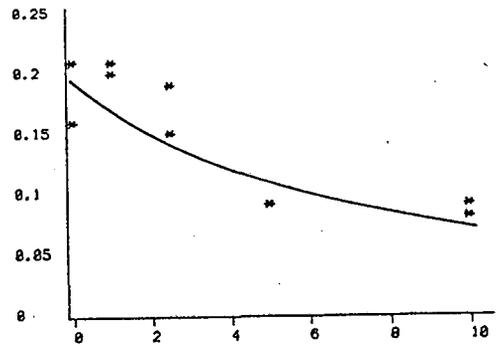
Contenido en magnesio



A: RAIZ

$$y = 0,3068 e^{-0,1546 x}$$

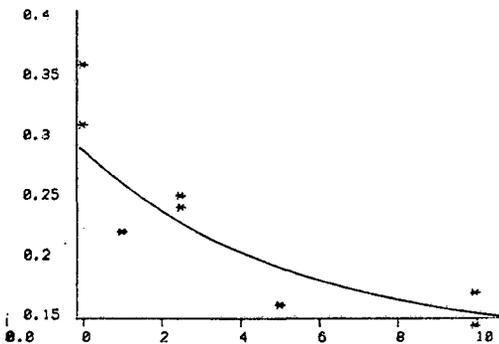
$$r = -0,706$$



B: TALLO

$$y = 0,1961 e^{-0,1098 x}$$

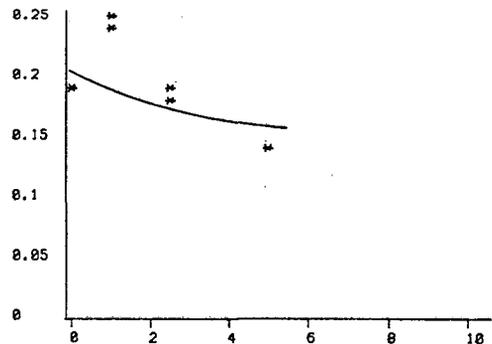
$$r = -0,926$$



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 0,2846 e^{-0,0747 x}$$

$$r = -0,867$$



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 0,2118 e^{-0,0698 x}$$

$$r = -0,749$$

Ordenadas: Contenido en magnesio (%)

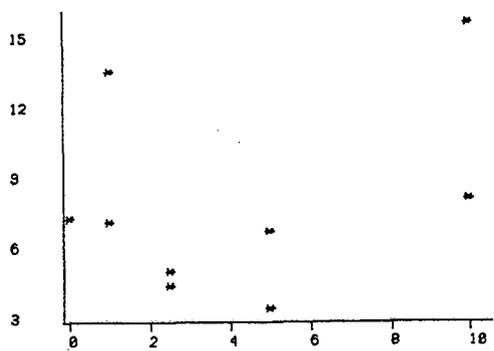
Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 10: Relación K/P en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

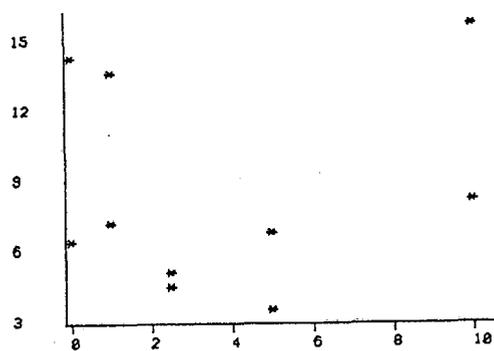
		Concentración de cromo en el medio (ppm)										
		RAIZ			TALLO							
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10	
		7,33	13,62	5,11	3,48	8,17	14,22	13,62	5,11	3,48	8,17	
		----	7,14	4,50	6,77	15,68	6,39	7,14	4,50	6,77	15,68	
x		7,33ab	10,38b	4,81c	5,13c	11,93b	10,31a	10,38a	4,81b	5,13b	11,93a	
s.d.		----	4,58	0,43	2,33	5,31	5,54	4,58	0,43	2,33	5,31	
		HOJAS INFERIORES						PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10	
		10,28	11,41	3,94	9,39	2,95	9,83	6,93	13,20	18,14	----	
		6,43	8,08	1,91	7,19	3,08	8,54	4,17	35,71	----	----	
x		8,36a	9,75a	2,93b	8,29a	3,02b	9,19a	5,55b	24,47c	18,14c	----	
s.d.		2,72	2,35	1,44	1,56	0,09	0,91	1,95	15,92	----	----	

-. FIGURA 10 .-

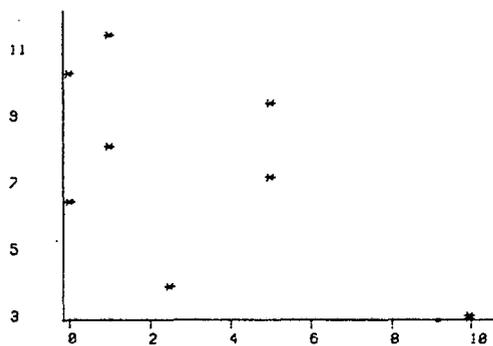
Relación K/P



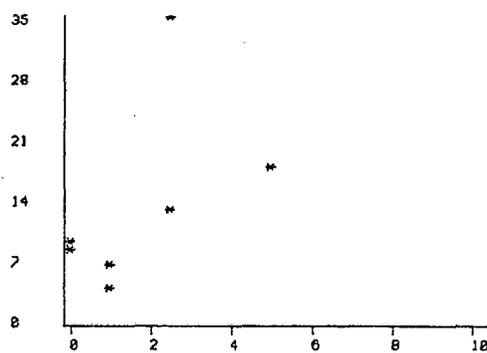
A RAIZ



B: TALLO



C HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

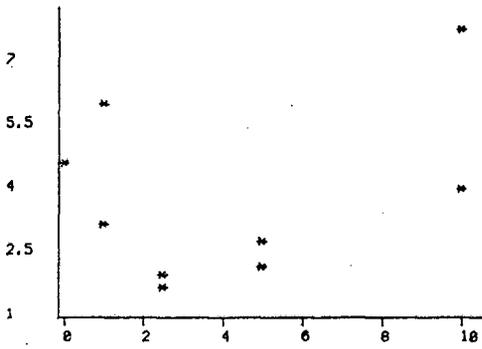
Ordenadas: Relación K/P

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

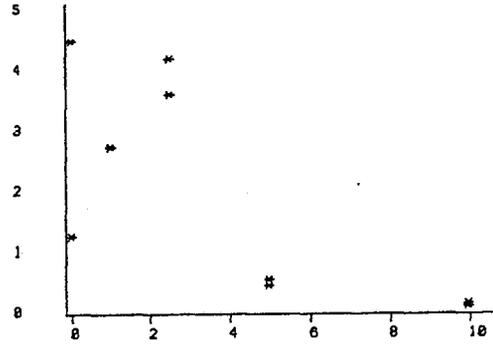


-. FIGURA 11 .-

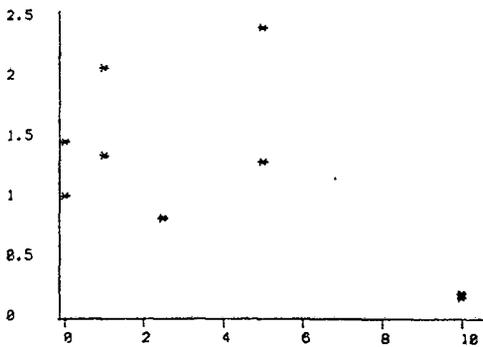
Relación Na/P



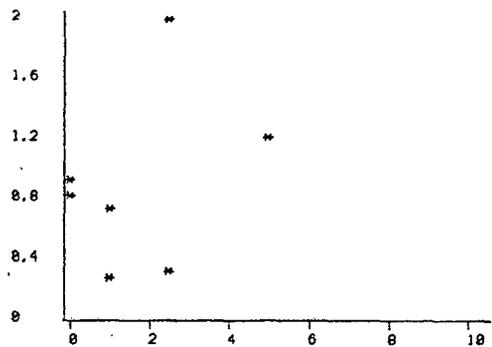
A: RAIZ



B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Relación Na/P

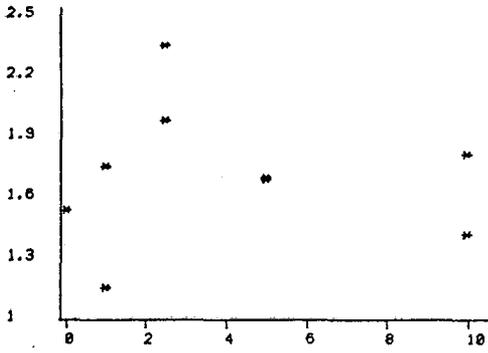
Abscisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 12: Relación Ca/P en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

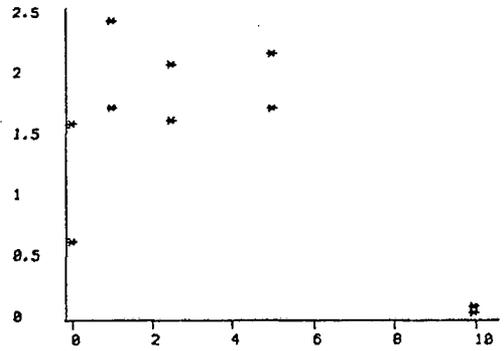
		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ					TALLO				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x		1,53	1,75	1,97	1,68	1,40	1,59	1,73	2,08	1,73	0,10
s.d.		-----	1,15	2,34	1,69	1,80	0,62	2,44	1,62	2,17	0,03
<hr/>											
x		1,53ab	1,45bc	2,07d	1,69c	1,60ac	1,11a	2,09b	1,85b	1,95b	0,07c
s.d.		-----	0,42	0,39	0,01	0,28	0,69	0,50	0,33	0,31	0,05
<hr/>											
		HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x		1,43	5,60	1,32	3,88	0,12	1,45	1,22	1,53	0,000	-----
s.d.		0,82	2,02	0,44	1,80	0,00	0,40	0,48	5,66	-----	-----
<hr/>											
x		1,13a	3,81b	0,88a	2,84b	0,06c	0,93a	0,85a	3,60b	0,00c	-----
s.d.		0,43	2,53	0,62	1,47	0,08	0,74	0,52	2,92	-----	-----

-. FIGURA 12 .-

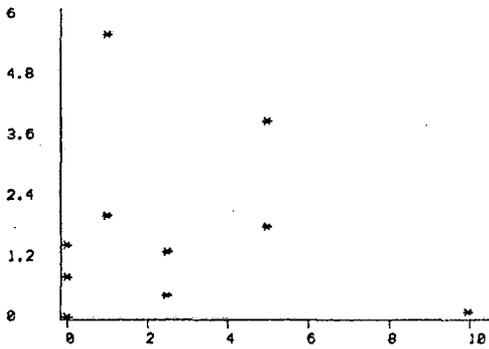
Relación Ca/P



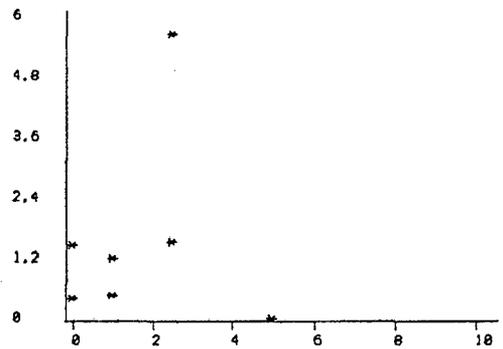
A: RAIZ



B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Relación Ca/P

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

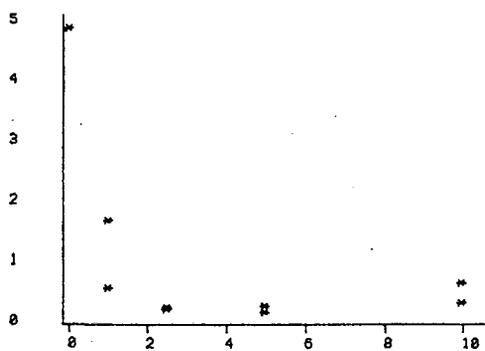
Tabla 13: Relación Mg/P en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

Concentración de cromo en el medio (ppm)

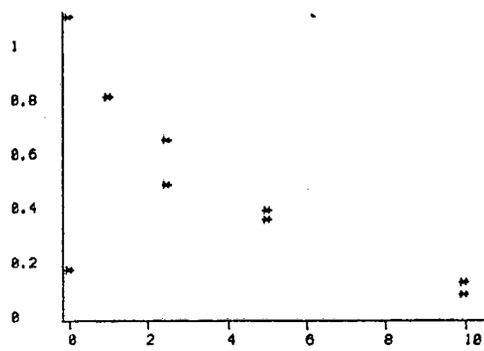
	RAIZ					TALLO				
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
	4,88	1,68	0,25	0,17	0,32	1,10	0,81	0,49	0,39	0,13
	---	0,57	0,23	0,26	0,66	0,18	0,81	0,65	0,36	0,09
x	4,88a	1,13b	0,24c	0,22c	0,49d	0,64a	0,81b	0,57c	0,38d	0,11e
s.d.	-----	0,78	0,01	0,06	0,24	0,65	0,00	0,11	0,02	0,03
	HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
	1,13	0,86	0,29	0,72	0,19	0,49	0,45	0,83	0,91	-----
	0,82	0,61	0,17	0,53	0,20	0,40	0,24	2,38	-----	-----
x	0,98ab	0,74ab	0,23c	0,63b	0,20d	0,45a	0,35a	1,61b	0,91c	-----
s.d.	0,22	0,18	0,08	0,13	0,01	0,06	0,15	1,10	-----	-----

-. FIGURA 13 .-

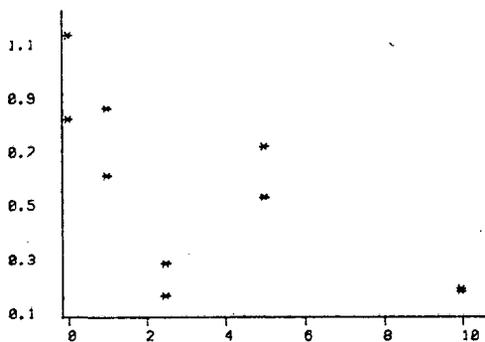
Relación Mg/P



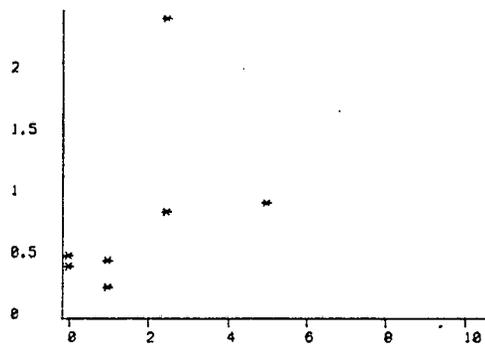
A: RAIZ



B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Relación Mg/P

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

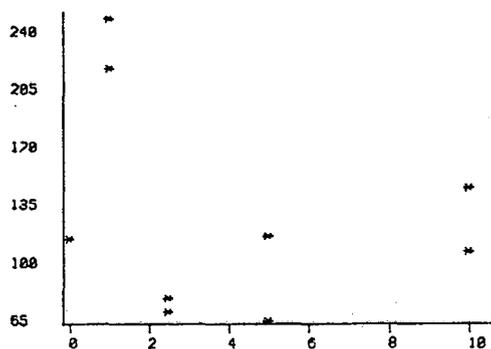
Tabla 14: Contenido en Fe, expresado en mg/KG de materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

Concentración de cromo en el medio (ppm)

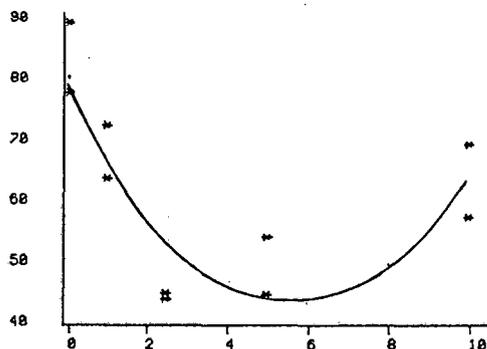
	RAIZ					TALLO				
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
	113,4	214,9	70,8	64,8	106,22	77,7	63,7	45,0	44,8	57,4
	----	244,9	79,1	114,9	144,14	89,3	72,4	43,9	54,1	69,4
x	113,4a	229,9b	74,96c	89,8ac	63,41ac	83,0a	68,1b	44,5c	49,5c	63,4bc
s.d.	----	21,25	5,84	35,4	8,54	7,45	6,18	9,75	6,54	8,54
	HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
	150,9	130,1	109,5	107,2	128,3	154,0	115,8	96,9	164,6	----
	158,5	129,7	110,7	118,8	169,1	213,6	141,5	96,3	----	----
x	154,7a	130,0b	110,1c	113,0c	148,7ab	183,8a	128,6b	96,6c	164,6d	----
s.d.	5,83	0,28	0,81	8,14	28,8	42,1	18,2	0,42	----	----

-. FIGURA 14 .-

Contenido en hierro

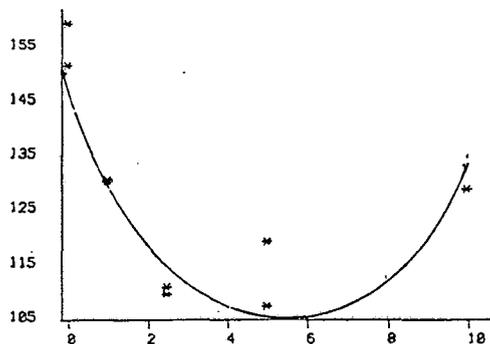


A: RAIZ



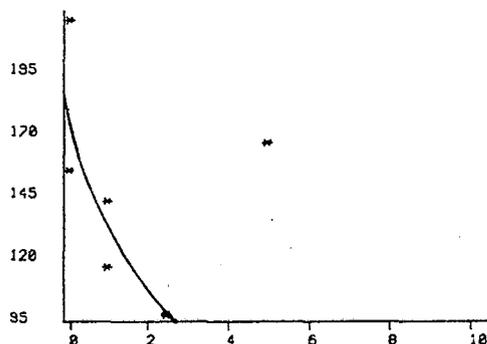
B: TALLO

$$y = 79,820 - 13,316 x + 1,183 x^2$$
$$r^2 = 0,7608$$



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 148,46 - 15,535 x + 1,3796 x^2$$
$$r^2 = 0,819$$



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 174,56 e^{-0,2467 x}$$
$$r = -0,965$$

Ordenadas: Contenido en hierro (mg/Kg)

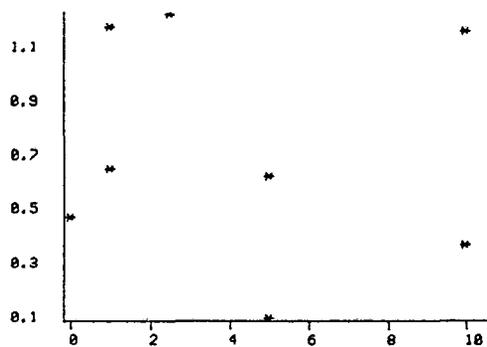
Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 15: Relación Fe/P en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

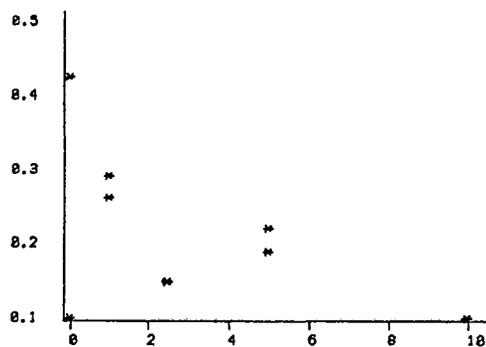
		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ					TALLO				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
		0,47	1,17	1,22	0,10	0,37	0,42	0,26	0,15	0,19	0,10
		---	0,65	1,40	0,62	1,15	0,10	0,29	0,15	0,22	0,10
x		0,47a	0,91b	1,31c	0,36bc	0,76ab	0,26abcd	0,28a	0,15b	0,21c	0,10d
s.d.		---	0,37	0,13	0,37	0,55	0,23	0,02	0,00	0,02	0,00
PRIMERA HOJA TRIFOLIADA											
		HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
		0,54	0,47	0,14	0,49	0,18	0,39	0,22	0,45	0,34	---
		0,36	0,31	0,07	0,40	0,20	0,45	0,17	1,20	---	---
x		0,45a	0,39a	0,12b	0,45a	0,19c	0,42a	0,20b	0,83ab	0,34c	---
s.d.		0,13	0,11	0,05	0,06	0,01	0,04	0,04	0,53	---	---

-. FIGURA 15 .-

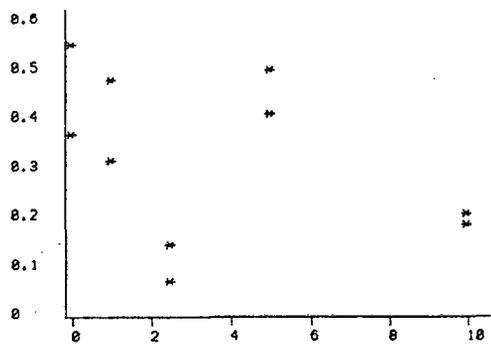
Relación Fe/P



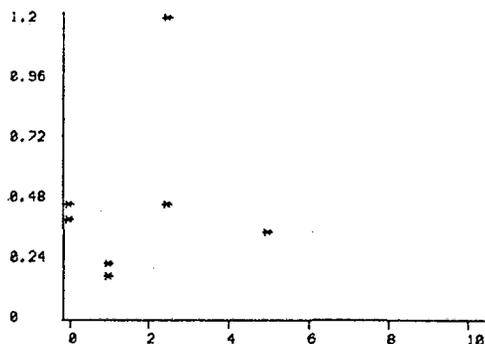
A: RAIZ



B: TALLO



C HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Relación Fe/P

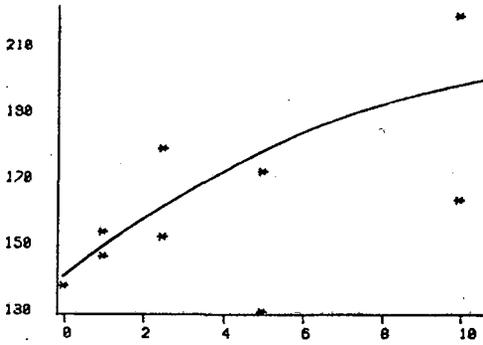
Abscisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 16: Contenido en Mn, expresado en mg/Kg de materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ			TALLO						
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
138,1		146,8	152,6	129,6	218,7	32,0	39,2	33,7	17,9	218,7	
-----		153,7	179,2	172,3	163,3	37,8	41,4	37,7	18,0	163,3	
x		138,1a	150,3b	165,9b	150,9ab	191,02b	34,9a	40,3b	35,7a	17,98c	191,02d
s.d.		-----	4,84	18,9	30,18	39,14	4,13	1,55	2,77	0,06	39,14
HOJAS INFERIORES											
PRIMERA HOJA TRIFOLIADA											
0		1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10	
119,5		183,8	128,6	63,5	65,9	89,9	115,8	86,7	54,9	-----	
129,7		184,8	121,1	62,5	84,5	100,5	107,8	81,9	-----	-----	
x		124,6a	184,3b	125,1a	64,02c	75,21c	95,17a	117,8b	84,3c	54,9d	-----
s.d.		7,2	0,71	4,83	2,15	13,17	7,54	5,6	3,43	-----	-----

-. FIGURA 16 .-

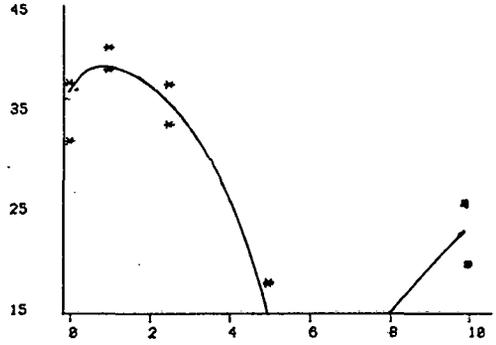
Contenido en manganeso



A: RAIZ

$$y = 140,89 + 9,769 x - 0,4802 x^2$$

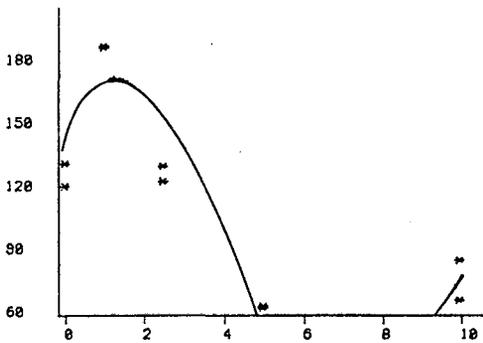
$$r^2 = 0,559$$



B: TALLO

$$y = 35,23 + 7,68 x - 3,585 x^2 + 0,27 x^3$$

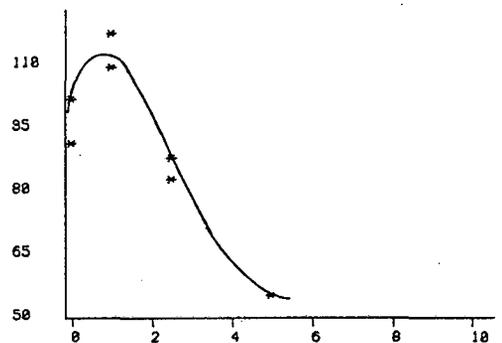
$$r^2 = 0,960$$



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 135,72 + 38,74 x - 17,20 x^2 + 1,27 x^3$$

$$r^2 = 0,856$$



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 95,17 + 38,41 x - 24,9 x^2 + 3,12 x^3$$

$$r^2 = 0,958$$

Ordenadas: Contenido en manganeso (mg/Kg)

Abscisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

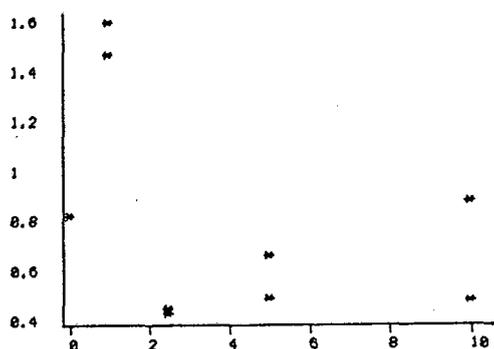
Tabla 17: Relación Fe/Mn en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

Concentración de cromo en el medio (ppm)

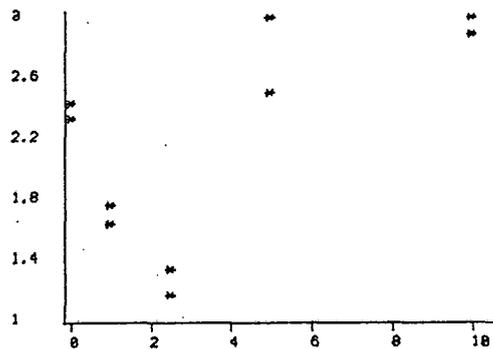
	RAIZ				TALLO					
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	0,82	1,46	0,46	0,50	0,49	2,43	1,63	1,33	2,50	2,89
s.d.	-----	1,59	0,44	0,67	0,88	2,33	1,75	1,17	3,00	3,00
<hr/>										
	0,82a	1,53b	0,45c	0,59d	0,69d	2,38a	1,69b	1,25c	2,75d	2,95d
	-----	0,09	0,01	0,12	0,28	0,07	0,08	0,11	0,35	0,08
<hr/>										
	HOJAS INFERIORES				PRIMERA HOJA TRIFOLIADA					
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	1,26	0,71	0,85	1,63	1,95	1,71	1,00	1,12	0,93	-----
s.d.	1,22	0,70	0,90	1,90	2,00	2,12	1,31	1,18	-----	-----
<hr/>										
x	1,24a	0,71b	0,88c	1,77d	1,98e	1,92a	1,16b	1,15b	0,93c	-----
s.d.	0,03	0,01	0,04	0,19	0,04	0,29	0,22	0,04	-----	-----

-. FIGURA 17 .-

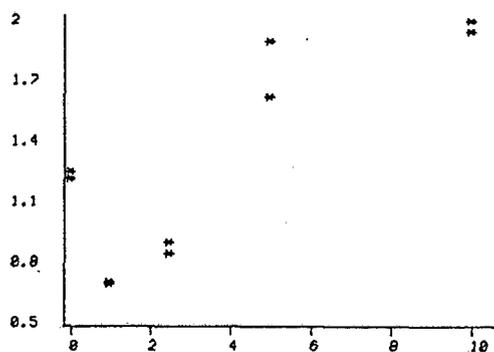
Relación Fe/Mn



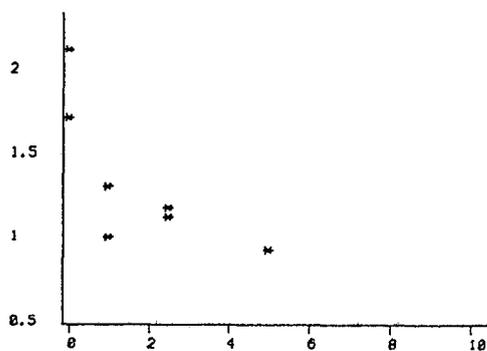
A: RAIZ



B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Relación Fe/Mn

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

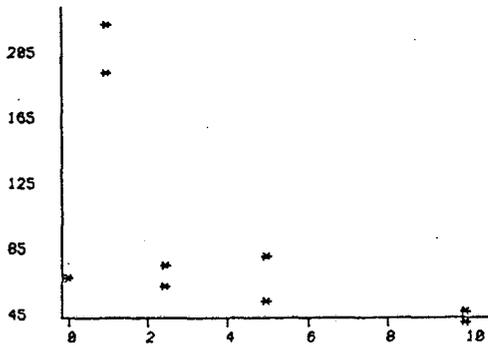
Tabla 18: Contenido en Zn, expresado en mg/Kg de materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

Concentración de cromo en el medio (ppm)

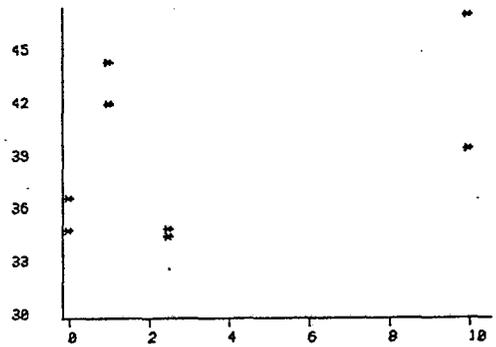
	RAIZ					TALLO				
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
68,05	193,1	63,75	54,36	39,37	34,75	41,90	34,39	54,36	39,37	
-----	222,9	75,39	81,36	46,96	36,58	44,25	34,84	81,36	46,96	
x	68,05a	208,0b	69,57a	57,96a	43,16c	35,7a	43,08b	34,67a	57,96c	43,16b
s.d.	-----	21,08	8,23	15,88	5,37	1,30	1,66	0,24	15,88	5,37
	HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
34,80	38,46	35,71	34,95	39,19	71,23	70,14	47,96	36,40	-----	-----
35,30	43,45	32,46	35,00	49,36	84,17	61,32	48,17	-----	-----	-----
x	35,05a	40,96b	34,08c	47,79ab	44,28b	77,70a	65,73b	48,07c	36,40d	-----
s.d.	0,35	3,53	2,30	18,15	7,19	9,15	6,24	0,15	-----	-----

-. FIGURA 18 .-

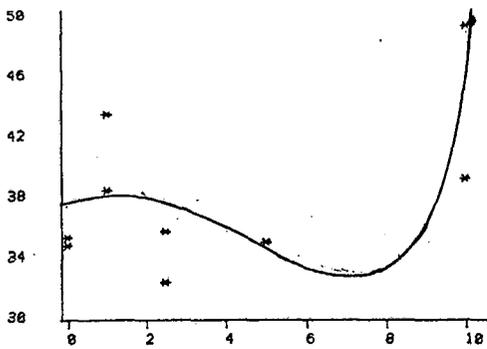
Contenido en zinc



A: RAIZ

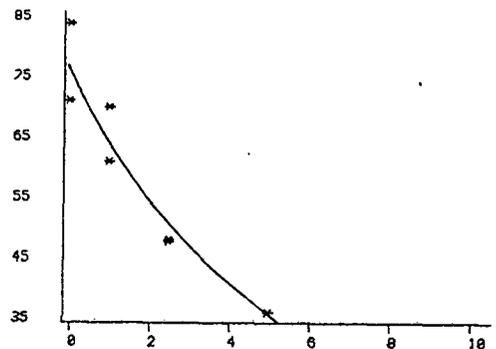


B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 36,58 + 1,46 x - 0,70 x^2 + 0,064 x^3$$
$$r^2 = 0,708$$



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 75,86 e^{-0,158 x}$$
$$r = -0,965$$

Ordenadas: Contenido en zinc (mg/Kg)

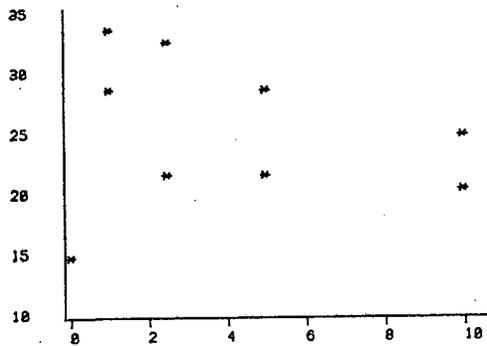
Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 19: Contenido en Cu, expresado en mg/Kg de materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

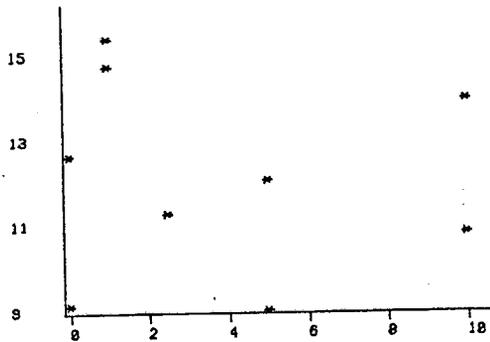
		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ					TALLO				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	14,79	28,65	32,69	21,60	24,99	9,14	14,70	11,24	8,97	10,76	
s.d.	-----	33,62	21,63	28,71	20,42	12,61	15,53	22,55	12,02	13,89	
<hr/>											
x	14,79a	31,14b	32,16c	25,16b	22,71b	10,88a	15,11b	11,90a	10,49ab	12,32a	
s.d.	-----	3,51	0,75	5,03	3,24	2,45	0,58	0,92	2,16	2,22	
<hr/>											
		HOJAS INFERIORES					PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	12,58	22,62	23,81	27,80	31,22	19,25	27,24	20,41	27,44	-----	
s.d.	14,14	19,46	22,13	31,25	40,57	25,13	26,95	19,27	-----	-----	
<hr/>											
x	13,49a	21,04b	22,97b	29,53c	35,89d	22,19a	27,10b	19,84a	27,44c	-----	
s.d.	1,29	2,24	1,18	2,44	6,62	4,15	0,20	0,81	-----	-----	

-. FIGURA 19 .-

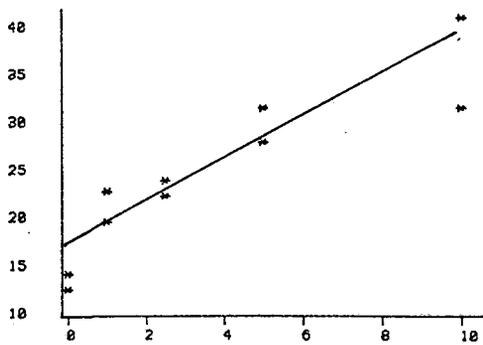
Contenido en cobre



A: RAIZ



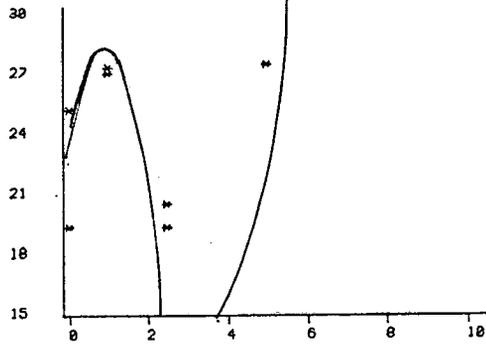
B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 17,032 + 2,041 x$$

$$r = 0,912$$



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 22,19 + 11,74 x - 8,01 x^2 + 1,17 x^3$$

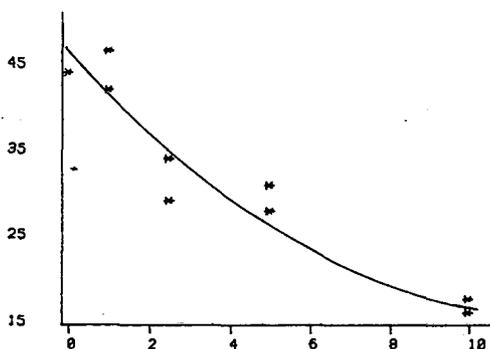
$$r^2 = 0,894$$

Tabla 20: Contenido en Mo, expresado en mg/Kg de materia seca, en las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ			TALLO						
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
		43,73	41,90	33,94	30,82	17,87	53,49	60,33	44,65	12,60	11,61
		---	46,30	29,10	27,85	16,17	52,47	60,34	43,50	12,86	11,57
x		47,73a	44,10b	31,52c	29,34c	17,02d	52,98a	60,34b	44,08c	12,73d	11,59e
s.d.		---	3,11	3,42	2,10	1,20	0,72	0,01	0,81	0,18	0,03
		HOJAS INFERIORES			PRIMERA HOJA TRIFOLIADA						
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
		10,44	16,80	6,71	7,27	4,75	22,14	18,18	8,32	18,35	---
		10,91	6,55	11,62	4,38	5,00	47,04	40,16	12,04	---	---
x		10,68a	11,68a	9,17a	5,83ab	4,88b	34,69ab	29,17a	10,18c	18,35b	---
s.d.		0,33	7,25	3,47	2,04	0,18	17,75	15,54	2,63	---	---

-. FIGURA 20 .-

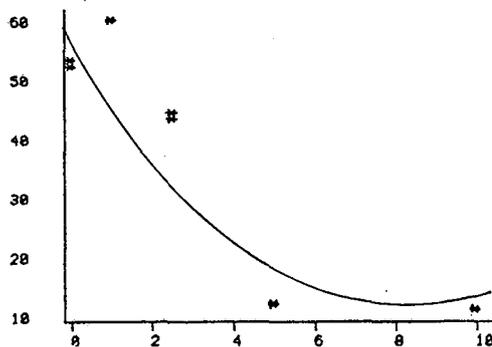
Contenido en molibdeno



A: RAIZ

$$y = 45,85 e^{-0,0995 x}$$

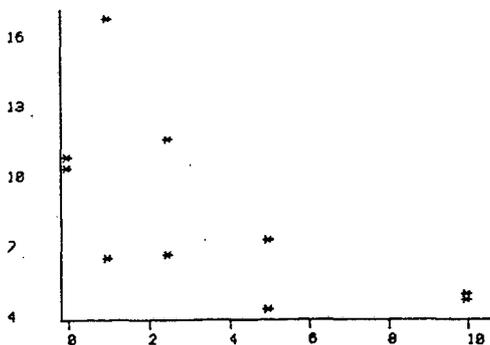
$$r = 0,938$$



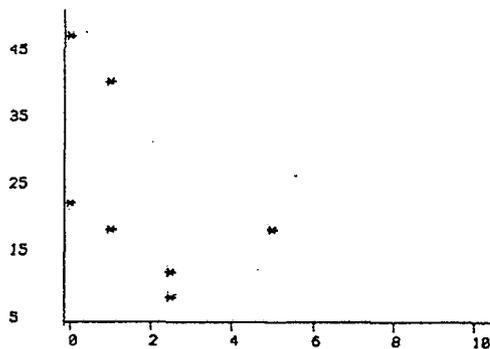
B: TALLO

$$y = 61,92 - 11,24 x + 0,61 x^2$$

$$r^2 = 0,932$$



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Contenido en molibdeno (mg/Kg)

Abscisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

## 4.2 Experiencia II

### 4.2.1 Curso del crecimiento y desarrollo

El curso de la germinación aconteció igual que en la experiencia anterior (apartado 4.1.1).

Las primeras diferencias entre las plantas control, sin cromo y las tratadas con cromo aparecieron a los 8 días a partir de la siembra, momento en que las plantas no tratadas con cromo empezaron a desplegar los cotiledones. Las hojas trifoliadas en los controles comenzaron a aparecer a los 13 días desde la siembra, llegando a su completo desarrollo a los 21 días. Los síntomas visuales de la fitotoxicidad por cromo aparecieron igualmente que en la experiencia anterior y se caracterizaron por las mismas manifestaciones externas: falta de crecimiento, clorosis ecentuada en las hojas trifoliadas y color verde más intenso en las hojas inferiores, hecho éste que parece indicar que el cromo actúa de la misma forma independientemente del tipo de sal empleado para realizar el tratamiento, siempre que se halle en forma de Cr VI.

Las plantas, cesadas en su suministro hídrico a los 23 días contados a partir de la siembra, siguieron su curso de diferente forma en los distintos tratamientos, incrementándose el tiempo necesario para alcanzar la marchitez a medida que se incrementaba la concentración de cromo en el medio (tabla 21). La secuencia de acontecimientos que tuvo lugar durante el período de déficit hídrico fué la siguiente:

- Caída de las hojas inferiores en los controles entre los 7 y 9 días después de comenzar el déficit hídrico, mientras que las hojas trifoliadas se mantuvieron hasta el día 16.
- Caída de las hojas inferiores del tratamiento con 1 ppm Cr VI entre los días 16 y 18 ( el día 16 presentaban una severa marchitez que permitió establecer la zona lineal del diagrama de Richter). Las hojas trifoliadas no cayeron hasta

el día 18.

- Caída de las hojas inferiores del tratamiento con 2,5 ppm Cr VI entre los días 18 y 20. El día 16 ya presentaban potenciales hídricos y CHR dentro de la zona lineal. Las hojas trifoliadas se mantuvieron hasta el día 21 sin alcanzar dicha zona.
- Las plantas tratadas con 5 y 10 ppm Cr VI se mantuvieron mucho más tiempo que las tratadas con menor concentración de Cr VI. Las plantas tratadas con 5 ppm se agotaron el día 21 y no nos fué posible conocer cuál hubiera sido su resitencia, sin embargo, las hojas trifoliadas ya presentaban una clara zona lineal en el diagrama de Richter que no se traducía en síntomas externos de marchitez. Las plantas tratadas con 10 ppm Cr VI resistieron sin marchitarse hasta el día 36, momento en que empezaron a entrar en la zona lineal del citado diagrama.

Hay que resaltar un hecho observado en esta experiencia y que hasta este momento no habíamos observado: las plantas tratadas con 10 ppm Cr VI, una vez retirado el cromo de la solución nutritiva, fueron capaces de crecer, florecer y fructificar con un mes de retraso respecto a las plantas no tratadas con cromo (controles).

Tabla 21: Dias sin suministro hídrico necesarios para alcanzar una completa marchitez en las hojas inferiores y las primeras hojas trifoliadas

	<u>Control</u>	<u>1,0 ppm</u>	<u>2,5 ppm</u>	<u>5 ppm</u>	<u>10 ppm</u>
Hojas inferiores	7-9	16-18	18-20	21	21
1ª Hoja trifoliada	16	18	21	21	>36

#### 4.2.2 Efectos sobre el crecimiento

Como en la experiencia anterior y el trabajo previo realizado (7, 39), existe una clara tendencia a la disminución del crecimiento a medida que se incrementa la concentración de cromo en el medio, siguiendo pautas parecidas, alcanzando valores mínimos a 10 ppm Cr en el medio (tablas 22, 23 y 24 y figuras 21, 22 y 23).

No se observa un claro estímulo del crecimiento en ninguno de los parámetros estudiados para ninguna de las concentraciones de cromo empleadas aunque las concentraciones de hasta 2,5 ppm Cr VI presentan una disminución en peso menor que el resto de tratamientos (5 y 10 ppm Cr), llegando incluso en el caso de 2,5 ppm Cr a ser superior que el de 1 ppm.

El área foliar presenta el mismo comportamiento que el crecimiento en peso, pero se manifiesta una diferencia de comportamiento entre las hojas inferiores y la primera hoja trifoliada, presentando u mayor disminución porcentual en el área foliar las hojas trifoliadas que las hojas inferiores para una misma concentración de cromo, ello en todos los tratamientos.

Si comparamos el crecimiento en peso y el crecimiento longitudinal de las raíces tratadas con cromo observamos que se produce la máxima reducción del crecimiento hasta concentraciones de 2,5 ppm Cr VI en el medio, mientras que en el caso de 5 y 10 ppm esta disminución parece detenerse y apenas se produce efecto al pasar de la concentración de 5 ppm Cr VI a 10 ppm. La presencia de un estímulo observado en el crecimiento longitudinal de las raíces a la concentración de 10 ppm Cr VI puede ser debido al hecho de que el cromo presente su máximo efecto sobre el desarrollo a concentraciones inferiores y a partir de ellas las fluctuaciones observadas sean debidas al azar. Puesto que el cromo presenta, al igual que la mayoría de los otros metales pesados, una barrera de translocación, este efecto no se traduce en la misma forma en la

parte aérea, puesto que su concentración en ella es mucho menor. este hecho podría explicar muy bien que mientras que las raíces no son apenas afectadas en su crecimiento por concentraciones elevadas de cromo, las partes aéreas todavía lo son, puesto que, una vez realizado el efecto máximo sobre el metabolismo y el crecimientp de las raíces, el cromo se acumularía de forma pasiva en ellas, siendo su translocación hacia la parte aérea directamente proporcional a su concentración en el medio (excluyendo una posible saturación), ejerciendo su mayor influjo en ella a medida que su concentración interna se incrementara. a este respecto cabe señalar que Shewry y Peterson (105) observaron que 2/3 del cromo interno en raíces se presenta en vacuolas en forma soluble, mientras que la mayor parte del resto se halla asociado a las paredes celulares. Si tenemos en cuenta que a las mayores concentraciones empleadas las células de la raíz deben encontrarse saturadas de cromo, como ya discutimos en el apartado 4.1.3, el transporte de cromo a la parte aérea no se incrementaría de forma lineal y por lo tanto tampoco lo harían sus efectos, de forma que nos encontraríamos con efectos menores sobre el crecimiento a mayores concentraciones de cromo que se traducirían en funciones de tipo exponencial como las obtenidas por nosotros en este trabajo y en el que le precedió (7,39).

Existe además un hecho que podría hacer parecer el razonamiento anterior si no como carente de valor, cuando menos como de poco peso, y es el que las hojas trifoliadas se vean más afectadas en su reducción en el crecimiento que las hojas inferiores, efecto que también se hace patente al observar otros parámetros como la reducción en la fotosíntesis ya observada por Austenfeld (3) y que se manifiesta en grado más elevado en las hojas superiores que en las inferiores a pesar que éstas presentan un contenido en cromo mayor que las primeras; sin embargo, ello se debe a las diferentes condiciones de exposición al cromo a lo largo de su desarrollo.

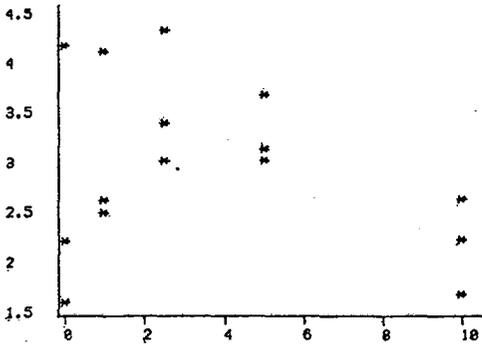
Tabla 22: Peso fresco, expresado en g, de las distintas partes de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos

Concentración de cromo en el medio (ppm)

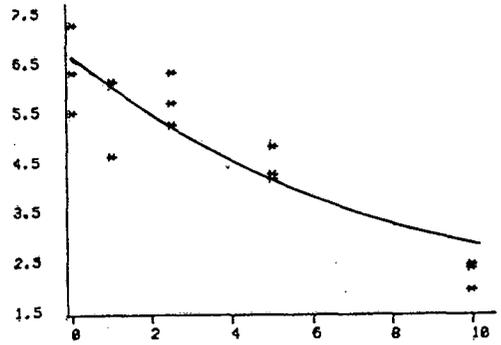
	RAIZ					PARTE AEREA				
	0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
x	1,61	4,09	3,01	3,66	1,69	5,46	6,08	5,63	4,23	1,95
s.d.	4,15	2,49	4,31	3,12	2,23	7,21	4,59	6,25	4,79	2,37
	2,21	2,61	3,39	3,02	2,63	6,24	6,07	5,20	4,14	2,44
<hr/>										
x	2,65ab	3,06ab	3,57ab	3,27b	2,01c	6,30ab	5,58ab	5,70ab	4,39ab	2,26b
s.d.	1,33	0,89	0,67	0,34	0,75	0,88	0,86	2,53	0,35	0,26
<hr/>										
TOTAL										
	0	1	2,5	5	10					
x	7,06	10,17	8,64	7,89	3,65					
s.d.	11,36	7,08	10,57	7,91	4,59					
	8,45	8,68	9,59	7,17	5,07					
<hr/>										
x	8,96ab	8,64ab	9,59a	7,65b	4,44a					
s.d.	2,19	1,54	0,96	0,42	0,72					

-. FIGURA 21 .-

Peso fresco en la experiencia II



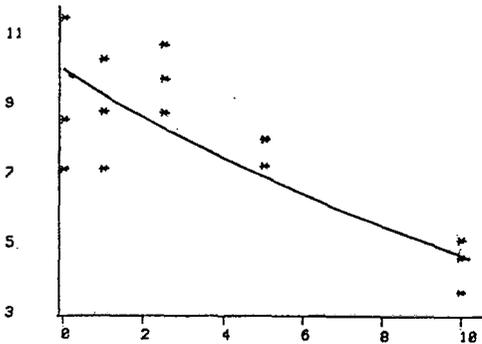
A: RAIZ



B: PARTE AEREA

$$y = 6,6144 e^{-0,1016 x}$$

$$r = -0,943$$



C: TOTAL

$$y = 9,8122 e^{-0,0717x}$$

$$r = -0,830$$

Ordenadas: Peso (g)

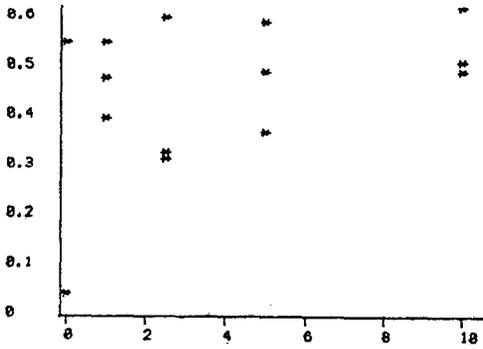
Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 23: Peso seco, expresado en g, de las distintas partes de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos

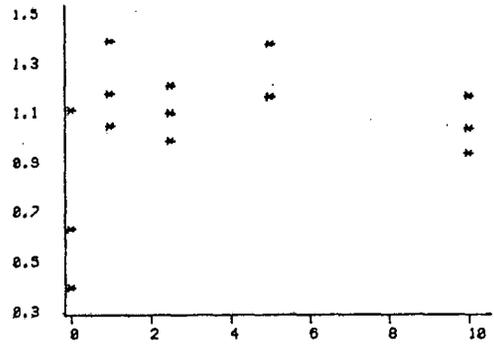
		Concentración de cromo en el medio (ppm)									
		RAIZ					PARTE AEREA				
		0	1	2,5	5	10	0	1	2,5	5	10
		0,04	0,54	0,59	0,58	0,50	0,40	1,38	1,09	1,37	0,93
		0,95	0,39	0,31	0,36	0,61	0,63	1,04	0,98	1,16	1,16
		0,54	0,47	0,32	0,48	0,48	1,10	1,17	1,20	1,16	1,03
x		0,28a	0,47a	0,41a	0,47a	0,53a	0,76a	1,20ab	1,09ab	1,23b	1,04c
s.d.		0,25	0,07	0,16	0,11	0,07	0,36	0,17	0,11	0,13	0,12
		TOTAL									
		0	1	2,5	5	10					
		0,43	1,92	1,68	1,96	1,43					
		0,88	1,44	1,29	1,52	1,76					
		1,64	1,63	1,52	1,64	1,56					
x		0,98a	1,67a	1,50a	1,70a	1,57a					
s.d.		0,61	0,24	0,20	0,23	0,18					

-. FIGURA 22 .-

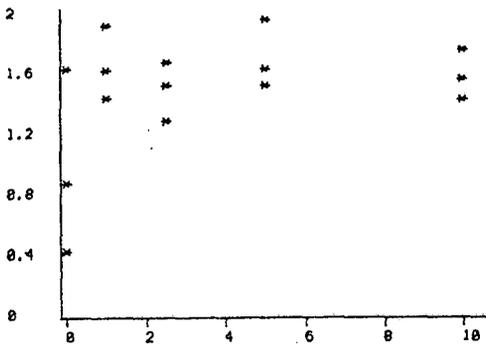
Peso seco en la experiencia II



A: RAIZ



B: PARTE AEREA



C: TOTAL

Ordenadas: Peso (g)

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 24: Area foliar, expresada en cm<sup>2</sup>, de las plantas sometidas a los diferentes tratamien-

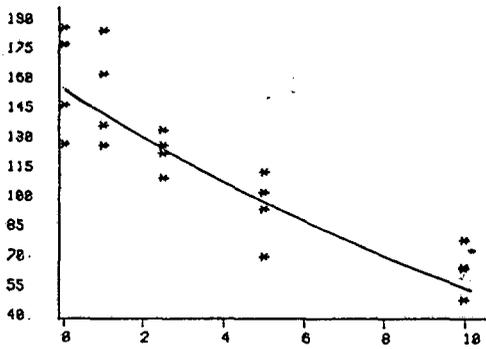
tos

Concentración de cromo en el medio (ppm)

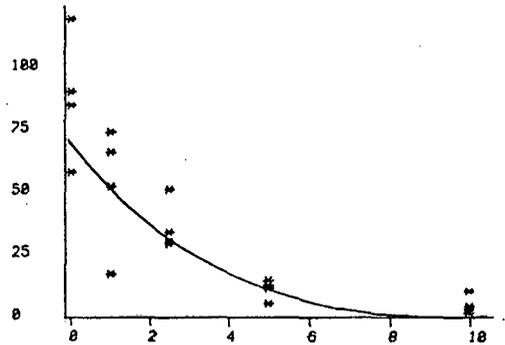
	HOJAS INFERIORES						PRIMERA HOJA TRIFOLIAD				
	0	1	2,5	5	10		0	1	2,5	5	10
x	124,8	134,1	107,9	101,0	64,0		83,0	16,6	28,6	10,8	3,6
	174,6	124,5	124,6	69,4	63,2		88,5	72,0	49,6	11,7	9,3
	182,9	180,9	120,1	92,8	77,5		117,4	50,8	32,6	13,6	2,0
	144,2	159,5	132,3	111,1	48,1		56,1	64,4	28,2	4,8	0,7
x	156,4a	149,7a	121,2ab	93,6bc	63,2c		86,2a	50,9ab	34,8b	10,2c	3,9c
s.d.	27,3	25,5	10,2	17,8	12,0		25,1	24,5	10,1	3,8	3,8
TOTAL											
	0	1	2,5	5	10						
	207,0	150,7	136,6	111,7	67,6						
	263,1	196,5	174,2	81,1	72,4						
	300,3	231,7	152,7	106,4	79,5						
	200,3	223,9	160,5	115,9	48,7						
x	242,7a	200,8ab	156,0b	103,8c	67,1c						
s.d.	47,6	36,6	15,7	15,6	13,2						

-. FIGURA 23 .-

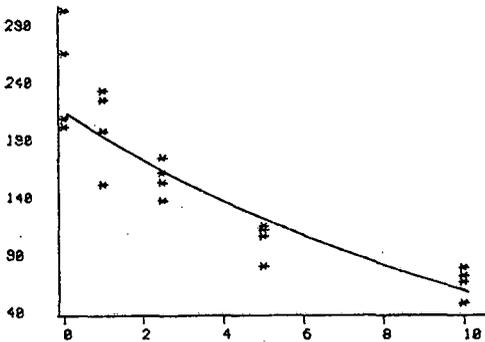
Area foliar en la experiencia III



A: HOJAS INFERIORES  
 $y = 155,36 e^{-0,0939 x}$   
 $r = -0,91$



B: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA  
 $y = 70,933 e^{-0,3577 x}$   
 $r = -0,922$



C: TOTAL  
 $y = 221,693 e^{-0,128 x}$   
 $r = -0,937$

Ordenadas: Area foliar (cm<sup>2</sup>)

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

4.2.3 Efectos del cromo sobre el contenido hídrico relativo, potencial hídrico, potencial osmótico y potencial de presión bajo suministro hídrico adecuado

Las plantas tratadas y las plantas control mostraron un comportamiento distinto en sus relaciones hídricas, presentando además un comportamiento distinto las hojas inferiores y la primera hoja trifoliada dentro de cada tipo de tratamiento (tablas 25,31 y 37 y figura 24).

En las hojas inferiores todas las concentraciones de cromo empleadas provocaron una reducción en el potencial osmótico y a la vez un incremento en el potencial de presión. También disminuyó el potencial hídrico en las hojas inferiores a la vez que se incrementaba el contenido en Cr en el medio, salvo para la concentración de 1 ppm Cr VI, que presentaba el potencial hídrico superior al del resto de tratamientos, e incluso al del control. Por lo que respecta al CHR también disminuyó al incrementarse la concentración de cromo en el medio, presentando también una anomalía en el caso de 1 ppm Cr VI, cuyo CHR es más bajo que en el tratamiento con 2,5 ppm Cr VI.

En las hojas trifoliadas también disminuyó el potencial osmótico, aunque las diferencias no fueron significativas entre el control y 2,5 ppm Cr VI o más. También se presentó un comportamiento anómalo en el caso del tratamiento con 1 ppm Cr VI, en el que se puede observar un incremento en el potencial osmótico tanto respecto al control como respecto al resto de tratamientos. Lo mismo, pero de forma inversa, ocurre para el potencial de presión. En el caso del potencial hídrico es posible observar que, si bien presenta una tendencia a disminuir a medida que aumenta la concentración de cromo en el medio, esta disminución es muy acusada para el caso de 1 y 2,5 ppm y vuelve a disminuir, aunque con un valor no significativamente menor que el control, a 5 ppm, disminuyendo finalmente a un valor significativamente menor que el del control a

10 ppm Cr VI. El CHR disminuye a medida que se incrementa la concentración de cromo en el medio.

Los efectos contrapuestos observados en el comportamiento de las relaciones hídricas entre las hojas inferiores y la primera hoja trifoliada no se detienen aquí, y se manifiestan mucho más claramente en el comportamiento de ambos tipos de hojas frente al stress hídrico, de forma que el comentario al comportamiento de las relaciones hídricas de las plantas sometidas a diferentes tratamientos con cromo en el medio se realizará en el apartado siguiente, conjuntamente con el comentario al comportamiento frente a las condiciones de déficit hídrico.

#### 4.2.4 Efecto del déficit hídrico sobre las plantas sometidas a los diferentes tratamientos con cromo en el medio

A medida que se incrementaba la concentración de cromo en el medio las plantas requirieron mayor tiempo de déficit hídrico para entrar en marchitez permanente. Dentro del comportamiento diferencial entre las hojas inferiores y las primeras hojas trifoliadas cabe destacar que estas últimas fueron las que más tiempo necesitaron para marchitarse completamente (tabla 21).

Los diagramas de Richter realizados para las hojas inferiores y primera hoja trifoliada de cada tratamiento (salvo para las hojas inferiores de las plantas tratadas con 5 ppm Cr VI debido al número insuficiente de datos) nos permiten observar el comportamiento diferencial de ambos tipos de hojas frente al déficit hídrico: mientras que en las hojas inferiores de todos los tratamientos es posible calcular el punto de pérdida de turgencia (figura 25) o punto que determina el CHR al que el  $p$  se hace nulo y a partir del cual el  $\psi_w$  dependerá únicamente del  $\psi_{rr}$ , no ocurre así en la primera hoja trifoliada (figura 26), en las que únicamente es posible calcular este punto para las concentraciones de 0 y 1 ppm Cr VI (tabla 42) debido a que no se presenta intersección entre la

zona lineal y la zona exponencial del diagrama de Richter calculado según el método propuesto por Stadelmann (107). Incluso para 5 ppm de cromo o mayores el coeficiente de regresión  $\beta$  se hace positivo. Teniendo en cuenta que  $\epsilon v$  se define como  $\epsilon v = dV/dP$ , éste nunca puede ser negativo. También parece falso el  $\Psi_p$  máximo negativo obtenido para las hojas trifoliadas de las plantas tratadas con 10 ppm Cr VI (tabla 42), tal y como indica Tyree (113).

Otro dato a observar es que el punto de pérdida de turgencia, tanto para las hojas inferiores como para la primera hoja trifoliada es menor a medida que se incrementa la concentración de cromo en el medio (tabla 42), lo cual es indicativo de una mayor tolerancia al déficit hídrico de las plantas tratadas con cromo. El potencial de presión máxima para las hojas inferiores se incrementa a medida que se incrementa la concentración de cromo en el medio, indicando una mayor turgencia de las plantas tratadas. Relacionado con ello es posible observar que el coeficiente de elasticidad de las hojas inferiores de las plantas tratadas con 1 ppm Cr VI es mucho más bajo que en los controles, indicando una mayor elasticidad de la pared celular de las plantas tratadas con esta concentración de cromo en el medio, lo cual también es cierto para el resto de tratamientos e incluso para las hojas trifoliadas.

Tal y como hemos visto anteriormente, todas las concentraciones de cromo suministradas afectaron las relaciones hídricas de las plantas tratadas, presentando claras diferencias en lo que respecta al comportamiento de las hojas inferiores respecto de las primeras hojas trifoliadas. Bajo condiciones de suministro hídrico normal, la concentración de 1 ppm Cr VI provocó un mayor potencial de presión e hídrico en las hojas inferiores, mientras que en las hojas trifoliadas fue al contrario. Kir kham (59) encontró que concentraciones de Cd que no provocaban reducción del crecimiento incrementaban el  $\Psi_p$  en hojas de crisantemo y sugiere que el estímulo del crecimiento en estas hojas provocada por elementos tales



como el Cd pueden ser debidos a este fenómeno. A este respecto cabe mencionar que aunque en esta experiencia no hemos observado un estímulo significativo del crecimiento, sí que se manifestó en una experiencia posterior (experiencia III) y será discutido en el apartado correspondiente.

El incremento observado en el  $\psi_p$  podría ser debido a un incremento en los solutos presentes en los tejidos de plantas tratadas con Cr y, aunque existe poca información al respecto, Lahouti y Peterson (67) ponen de manifiesto que más de la mitad del cromo suministrado como Cr VI encontrado en coliflor, trigo y rábano se presenta en forma soluble. Según Shewry y Peterson (105), en estudios con raíces de trigo, más de las dos terceras partes del Cr interno se presentaba en vacuolas, mientras que la mayor parte del resto lo hacía en las paredes celulares. Esta acumulación de cromo en las vacuolas podría ser la responsable de la disminución del  $\psi_w$  observada en las hojas inferiores en esta experiencia, mientras que el incremento del  $\psi_{\pi}$  en las hojas trifoliadas de las plantas tratadas con 1 ppm Cr VI podría ser debido a una interferencia del cromo en el transporte de sustancias osmóticamente activas como ácidos orgánicos o iones inorgánicos como  $K^+$  y  $Na^+$  (7), mientras que el mantenimiento de la turgencia a elevadas concentraciones de Cr podría ser debida a una disminución del  $\psi_{\pi}$ . El efecto del Cr sobre las relaciones hídricas es altamente dependiente de la concentración.

De los resultados obtenidos en esta experiencia se deduce una menor resistencia al déficit hídrico por parte de las hojas inferiores, al igual que en el trabajo efectuado por Lee-Stadelmann (58), siendo las diferencias observadas probablemente debidas a la diferencia en la variedad empleada y las diferentes condiciones de cultivo.

La reducción en el módulo de elasticidad de las plantas tratadas con 1 ppm Cr VI no se debe seguramente a una reducción en el tamaño celular, puesto que apenas existen diferencias de crecimiento entre estas plantas y las control (tablas 22 y 24 y figuras 21 y 23), pero al

gunos autores han observado la presencia de pequeños gránulos electrodenos depositados en la pared celular de raíces de coliflor tratadas con Cr VI que podrían tener relación con una capacidad de reforzamiento de las uniones entre los componentes de la pared celular que dieran lugar a una mayor elasticidad. Klimashevskii y Delov encontraron que el Al producía una disminución de la plasticidad en segmentos de melocotón en elongación e incluso inhibía completamente el crecimiento celular en la raíz. Matsumoto et al. (74) especulan que las diferencias estructurales en la pared celular, particularmente en la extensión de la metilación del ácido galacturónico podrían explicar la diferencia en la tolerancia de los vegetales al Al; sin embargo, no se ha encontrado interacción significativa positiva entre el Al y ácidos urónicos en raíces de melocotón tratadas con Al. El Al se acumuló preferentemente en el núcleo y la pared celular (74). Klimashevskii et al. (61,62) concluyeron que el Al daña la pared celular por activación de la poligalacturonasa, que hidroliza pectinas y, por lo tanto, provoca una más rápida penetración del Al.

Finalmente, la diferencia de comportamiento entre las hojas inferiores y las trifoliadas pueden ser debidas a las diferencias en las condiciones en que se vieron afectadas por el cromo. Las hojas inferiores recibieron el cromo cuando los cotiledones se desplegaron, momento en que la división celular está casi completamente completada y el crecimiento producido posteriormente es por extensión principalmente, mientras que en las hojas trifoliadas, por el contrario, la exposición al cromo, al menos a bajas concentraciones, se produjo desde el inicio de su desarrollo, por lo que su maquinaria metabólica y replicativa y, por lo tanto, su crecimiento, pudieron ser afectados grandemente.

Por lo que respecta al déficit hídrico, pueden jugar dos factores: por un lado está el hecho de que estas hojas son tejidos más jóvenes que las hojas inferiores y, por lo tanto, presentan unas paredes celulares más elásticas que aquéllas, lo que les permite adaptarse mejor a condiciones que exijan cambios en el volumen celular, como un déficit hídrico.

drico ( su  $\xi v$  es menor para cualquier CHR que en las hojas inferiores en todos los tratamientos). Por otro lado está la posible relación, mencionada anteriormente, del cromo con las paredes celulares, puesto que cuando las hojas trifoliadas realizan su crecimiento ya se hallan expuestas al metal, que puede así pasar a formar parte del material de la pared celular, no ocurriendo así en las hojas inferiores que cuando son expuestas al cromo ya tienen prácticamente formada su pared celular.

Tabla 25: Potencial hídrico, expresado en MPa, en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. T=0 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

		HOJAS INFERIORES				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-0,06	-0,02	-0,18	-0,10	-0,12
		-0,14	-0,04	-0,18	-0,18	-0,16
		-0,16	-0,06	-0,18	-0,20	-0,24
		-0,18	-0,10	-0,20	-0,20	-0,32
x		-0,14a	-0,061b	-0,19c	-0,17	-0,21
s.d.		0,053	0,034	0,010	0,050	0,089
		PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-0,04	-0,06	-0,02	-0,02	-0,04
		-0,06	-0,12	-0,04	-0,04	-0,10
		-0,06	-0,14	-0,18	-0,04	-0,20
		-0,10	-0,16	-0,20	-0,16	-0,30
x		-0,07	-0,12	-0,11	-0,065	-0,16
s.d.		0,025	0,043	0,093	0,064	0,110

Tabla 26: Potencial hídrico, expresado en MPa, en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. T=7 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

		HOJAS INFERIORES				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-0,10	-0,10	-0,08	-0,16	-0,20
		-0,16	-0,10	-0,14	-0,30	-0,20
		-0,26	-0,18	-0,18	-0,32	-0,32
		-0,36	-0,22	-0,26	-0,40	-0,40
x		-0,22	-0,15	-0,17	-0,30	-0,40
s.d.		0,11	0,06	0,08	0,10	0,10
		PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-0,20	-0,08	-0,04	-0,10	-0,06
		-0,20	-0,12	-0,04	-0,16	-0,12
		-0,24	-0,12	-0,06	-0,18	-0,18
		-0,24	-0,22	-0,10	-0,24	-0,34
x		-0,22	-0,14	-0,06	-0,17	-0,18
s.d.		0,23	0,60	0,03	0,06	0,12

Tabla 27: Potencial hídrico, expresado en MPa, en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. T=16 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

		HOJAS INFERIORES				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-----	-0,74	-0,70	-0,30	-0,38
		-----	-0,80	-0,80	-0,40	-0,46
		-----	-0,90	-0,97	-0,54	-----
		-----	-1,20	-1,10	-0,60	-----
		<hr/>				
x		-----	-0,91	-0,93	-0,46	-0,42
s.d.		-----	0,20	0,17	0,140	0,057
		PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-0,40 -1,00	-----	-----	-----	-----
		-0,50 -1,02	-----	-----	-----	-----
		-0,80 -1,04	-----	-----	-----	-----
		-0,88 -1,20	-----	-----	-----	-----
		-0,92 -1,26	-----	-----	-----	-----
		-1,00	-----	-----	-----	-----
		<hr/>				
x		-0,92	-----	-----	-----	-----
s.d.		0,253	-----	-----	-----	-----

Tabla 28: Potencial hídrico, expresado en MPa, en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. T=18 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)					
HOJAS INFERIORES					
	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	-----	-----	-0,40	-0,40	-0,46
	-----	-----	-0,70	-0,60	-0,74
x	-----	-----	-0,55a	-0,50a	-0,60a
s.d.	-----	-----	2,12	0,14	0,20
PRIMERA HOJA TRIFOLIADA					
	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	-----	-0,40	-0,40	-0,52	-0,16
	-----	-0,60	-0,50	-0,60	-0,17
	-----	-0,60	-0,70	-----	-----
	-----	-1,02	-0,86	-----	-----
x	-----	-0,66	-0,62	-0,56	-0,17
s.d.	-----	0,26	0,21	0,06	0,01

Tabla 29: Potencial hídrico, expresado en MPa, en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos. T=21 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

HOJAS INFERIORES

	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	-----	-----	-----	-0,40	-0,14
	-----	-----	-----	-0,50	-0,40
	-----	-----	-----	-----	-0,42
x	-----	-----	-----	-0,45	-0,32
s.d.	-----	-----	-----	0,07	0,16

PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	-----	-----	-0,72	-0,40	-0,52
	-----	-----	-0,74	-0,40	-0,52
	-----	-----	-0,74	-0,56	-0,74
x	-----	-----	-0,73	-0,45	-0,59
s.d.	-----	-----	0,01	0,09	0,21

Tabla 30: Potencial hídrico, expresado en MPa, en las plantas tratadas con 10 ppm Cr VI en el medio a tiempos superiores a 21 días

HOJAS INFERIORES

	<u>T=22</u>	<u>T=30</u>	<u>T=36</u>	
	-0,40	-0,50	-0,50	-1,18
	-0,42	-0,60	-0,98	-1,20
	-0,44	-0,70	-1,00	-1,32
	-----	-0,70	-1,00	-1,40
	<hr/>			
x	-0,42	-0,63		-1,07
s.d.	0,03	0,096		0,28

Tabla 31: Contenido hídrico relativo, expresado en %, en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos. T=0 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

HOJAS INFERIORES

	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	100,00	97,35	100,00	96,57	96,63
	99,41	97,04	97,64	95,40	95,54
	98,32	96,29	97,42	94,79	93,18
	93,82	94,95	95,04	94,46	76,68
x	97,89	96,41	97,53	95,36	90,51
s.d.	2,80	1,07	2,03	0,93	9,33

PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	98,73	97,64	92,05	96,21	86,99
	96,69	94,89	93,88	91,46	86,11
	94,26	94,72	93,44	89,74	85,23
	90,08	90,81	88,76	88,02	88,00
x	94,74	94,54	92,53	91,36	84,58
s.d.	3,72	2,77	2,53	3,53	3,14

Tabla 32: Contenido hídrico relativo, expresado en %, en las plantas so-  
metidas a los distintos tratamientos. T=7 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

HOJAS INFERIORES

	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	97,14	100,00	99,16	99,57	95,64
	96,75	99,60	98,17	98,61	95,06
	96,46	98,82	97,00	97,79	95,73
	94,05	97,46	96,02	96,60	93,25
x	96,10	98,97	97,81	98,14	94,42
s.d.	1,39	1,12	1,31	1,26	1,11

PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	96,24	98,47	95,39	94,23	89,51
	94,44	96,89	93,69	93,58	84,15
	92,71	96,74	91,47	91,98	84,05
	90,74	89,46	88,49	88,03	80,28
x	93,53	95,39	92,26	91,96	84,50
s.d.	2,36	4,03	2,98	2,78	3,80

Tabla 33: Contenido hídrico relativo, expresado en %, en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. T=16 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

		HOJAS INFERIORES				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	-----		83,74	94,04	97,19	93,74
	-----		71,75	92,54	96,03	93,32
	-----		64,79	90,33	95,55	-----
	-----		56,91	81,82	93,75	-----
	-----		-----	67,63	-----	-----
x	-----		69,30	85,27	95,62	93,53
s.d.	-----		11,38	10,94	1,44	0,30
		PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
100,00	83,26	-----	-----	-----	-----	-----
88,18	82,55	-----	-----	-----	-----	-----
84,82	76,72	-----	-----	-----	-----	-----
83,83	70,84	-----	-----	-----	-----	-----
83,20	65,55	-----	-----	-----	-----	-----
x	80,40	-----	-----	-----	-----	-----
s.d.	10,22	-----	-----	-----	-----	-----

Tabla 34: Contenido hídrico relativo, expresado en %, en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. T=18 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

		HOJAS INFERIORES				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-----	-----	88,25	93,64	90,97
		-----	-----	87,25	89,00	90,08
x		-----	-----	87,75	91,32	90,52
s.d.		-----	-----	0,70	3,28	0,63
		PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-----	87,44	95,68	97,57	97,57
		-----	86,02	93,43	92,16	92,16
		-----	85,80	92,23	-----	-----
		-----	67,30	84,74	-----	-----
x		-----	81,64	91,52	91,52	84,86
s.d.		9,59	4,74	4,74	3,83	

Tabla 35: Contenido hídrico relativo, expresado en %, en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. T=21 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

		HOJAS INFERIORES				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-----	-----	-----	95,10	93,60
		-----	-----	-----	92,49	93,28
		-----	-----	-----	-----	86,12
		<hr/>				
x		-----	-----	-----	93,79	91,00
s.d.		-----	-----	-----	1,85	4,23
		PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-----	-----	95,59	97,95	88,63
		-----	-----	89,84	97,48	87,86
		-----	-----	87,32	92,46	83,16
		<hr/>				
x		-----	-----	90,92	95,96	86,55
s.d.		-----	-----	4,24	3,04	2,96

Tabla 36: Contenido hídrico relativo, expresado en %, en las plantas tratadas con 10 ppm Cr VI en el medio a tiempos superiores a 21 días

	HOJAS INFERIORES			
	<u>T=22</u>	<u>T=30</u>	<u>T=36</u>	
	100,00	100,00	85,40	78,51
	93,12	93,28	83,03	72,76
	88,138	92,62	82,73	68,45
	-----	92,38	81,84	60,87
	<hr/>			
x	93,75	94,57	70,15	
s.d.	5,96	3,64	7,43	

Tabla 37: Potencial osmótico, expresado en MPa, en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. T=0

Concentración de cromo en el medio (ppm)					
HOJAS INFERIORES					
	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	-0,195	-0,47	-0,24	-0,213	-0,515
	-0,149	-0,545	-0,370	-0,240	-0,545
	-0,179	-0,514	-0,454	-0,574	-0,551
	-0,386	-0,507	-1,096	-0,900	-0,600
x	-0,227	-0,509	-0,540	-0,482	-0,553
s.d.	0,108	0,031	0,381	0,324	0,035
PRIMERA HOJA TRIFOLIADA					
	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	-0,653	-0,026	-0,340	-0,449	-0,530
	-1,083	-0,351	-0,546	-0,694	-0,693
	-0,495	-0,452	-0,649	-0,818	-0,794
	-0,575	-0,530	-1,172	-0,936	-1,172
x	-0,702	-0,34	-0,68	-0,724	-0,797
s.d.	0,262	0,226	0,335	0,208	0,272

Tabla 38: Potencial osmótico, expresado en MPa, en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. T=7 días

Concentración de cromo en el medio (ppm)

HOJAS INFERIORES

	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	-0,411	-0,50	-0,344	-0,47	-0,747
	-0,575	-0,531	-0,401	-0,550	-0,778
	-0,490	-0,590	-0,530	-0,59	-0,844
	-0,256	-0,806	-0,560	-0,635	-0,904
x	-0,433	-0,607	-0,459	-0,562	-0,818
s.d.	0,136	0,138	0,103	0,070	0,070

PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
	-0,653	-0,260	-0,260	-0,411	-1,527
	-1,083	-0,350	-0,323	-0,575	-----
	-0,495	-0,450	-0,653	-1,124	-----
	-0,575	-0,530	-1,555	-1,173	-----
x	-0,702	-,340	-0,698	-0,821	-1,517
s.d.	0,262	0,261	0,597	0,385	-----

Tabla 39: Potencial osmótico, expresado en MPa, en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos. T=16 días

		Concentración de cromo en el medio (ppm)				
		HOJAS INFERIORES				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-----	-----	-----	-0,539	
		-----	-----	-----	-0,653	-1,402
		-----	-----	-----	-0,694	-1,123
		<hr/>				
x		-----	-----	-----	-0,635	-1,120
s.d.		-----	-----	-----	0,069	0,248
		PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>
		-0,102	-0,637	-0,500	-0,590	-0,103
		-0,545	-0,721	-0,612	-0,485	
		-0,721	-0,947	-1,154	-0,857	-0,694
		-----	-----	-----	-1,083	-0,745
		<hr/>				
x		-0,762	-0,768	-0,792	-0,786	-0,507
s.d.		0,240	0,160	0,333	0,232	0,292

Tabla 40: Resumen de los diferentes parámetros hídricos en las hojas inferiores. Los valores corresponden a las medias de los valores detallados en las tablas anteriores

	<u>T=0</u>	<u>T=7</u>	<u>T=16</u>	<u>T=18</u>	<u>T=36</u>
CONTROL	$\Psi_w$ (MPa)	-0,135	-0,22		
	$\Psi_n$ (MPa)	-0,230	-0,43		
	CHR ( % )	97,90	96,10		
1 ppm Cr	$\Psi_w$ (MPa)	-0,055	-0,15	-0,91	
	$\Psi_n$ (MPa)	-0,51	-0,61	-----	
	CHR ( % )	96,40	98,90	69,30	
2,5 ppm	$\Psi_w$ (MPa)	-0,185	-0,165	-0,93	
	$\Psi_n$ (MPa)	-0,540	-4,590	-----	
	CHR ( % )	97,50	97,80	85,30	
5 ppm Cr	$\Psi_w$ (MPa)	-0,17	-0,30	-0,46	-0,45
	$\Psi_n$ (MPa)	-0,48	-0,56	-0,64	-----
	CHR ( % )	95,30	98,1	95,6	91,3
10 ppm Cr	$\Psi_w$ (MPa)	-0,21	-0,28	-0,42	-0,60
	$\Psi_n$ (MPa)	-0,53	-0,82	-1,12	-----
	CHR ( % )	90,5	94,4	93,5	90,5
					76,6

Tabla 41: Resumen de los diferentes parámetros hídricos en las hojas trifoliadas. Los valores corresponden a las medias de los valores detallados en las tablas anteriores

	<u>T=0</u>	<u>T=7</u>	<u>T=16</u>	<u>T=18</u>	<u>T=21</u>
CONTROL					
$\psi_w$ (MPa)	-0,065	-0,22	-0,92		
$\psi_n$ (MPa)	-0,70	-0,45	-0,76		
CHR ( % )	94,90	93,50	80,40		
1 ppm Cr					
$\psi_w$ (MPa)	-0,12	-0,14	-0,66		
$\psi_n$ (MPa)	-0,34	-0,31	-0,77		
CHR ( % )	94,50	95,40	81,60		
2,5 ppm					
$\psi_w$ (MPa)	-0,11	-0,06	---	-0,62	-0,73
$\psi_n$ (MPa)	-0,68	-0,69	---	-0,79	---
CHR ( % )	92,50	92,30	---	91,50	90,90
5 ppm Cr					
$\psi_w$ (MPa)	-0,065	-0,17	---	-0,56	-0,45
$\psi_n$ (MPa)	-0,72	-0,82	---	-0,79	---
CHR ( % )	91,40	92,00	---	94,90	96,00
10 ppm Cr					
$\psi_w$ (MPa)	-0,16	-0,18	---	-0,17	-0,59
$\psi_n$ (MPa)	-0,80	---	---	-0,51	---
CHR ( % )	84,60	84,50	---	95,10	86,60

Tabla 42: Parámetros hídricos calculados según el método propuesto por Stadelmann

HOJAS INFERIORES

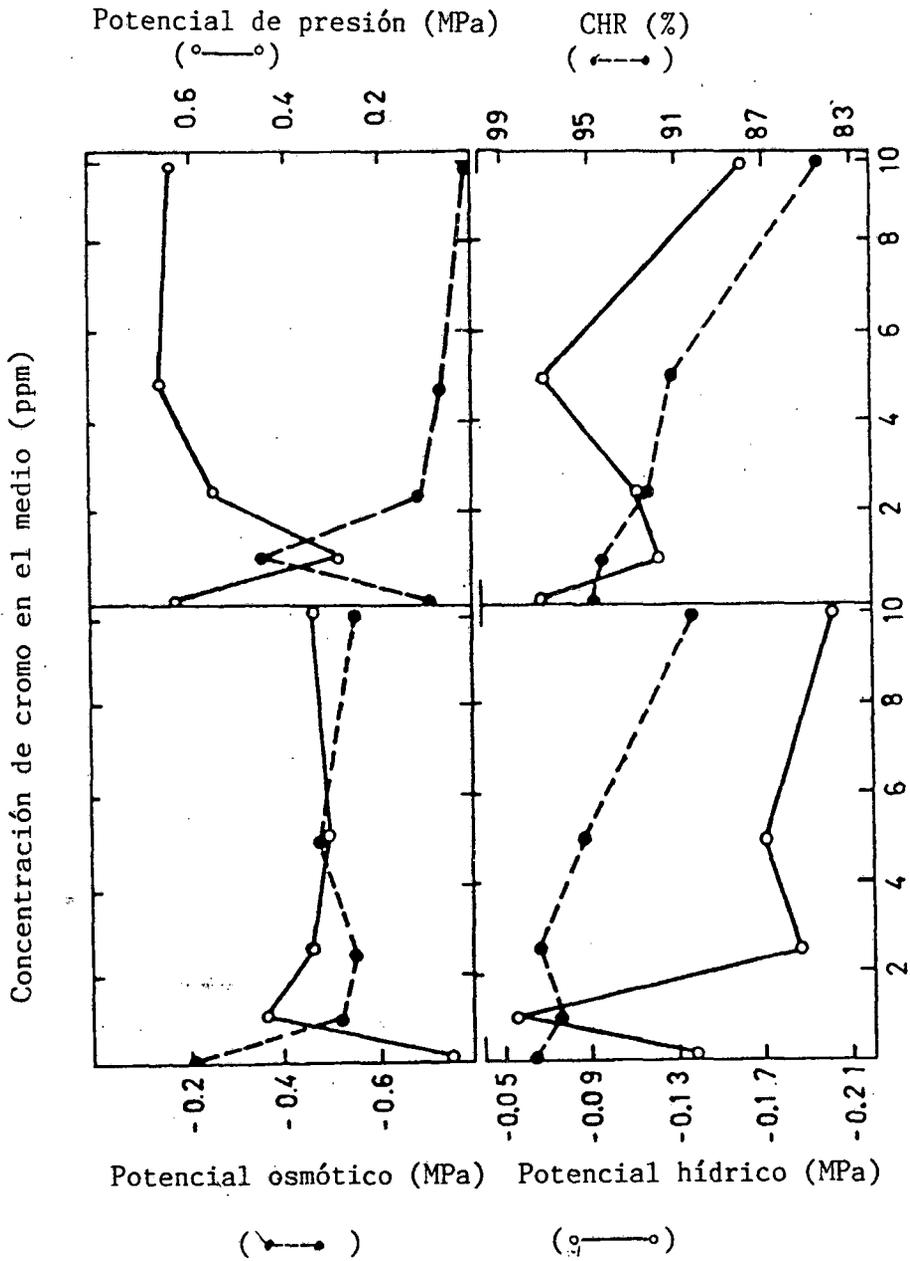
	$\psi_p(\text{máx})$ (MPa)	$\theta$	$\epsilon_v(\text{CHR.100\%})$	PPT (% CHR)
CONTROL	0,864	-10,39	8,978	76,90
1 ppm Cr	0,420	-3,81	1,601	63,30
2,5 ppm Cr	0,839	-6,910	5,795	63,90
5 ppm Cr	-----	-----	-----	-----
10 ppm Cr	0,995	-5,520	5,495	66,00

PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

CONTROL	0,743	-10,08	7,492	73,70
1 ppm Cr	0,386	-3,41	1,315	63,10
2,5 ppm Cr	0,522	-0,652	0,3401	-----
5 ppm Cr	0,3411	7,174	-2,4471	-----
10 ppm Cr	-0,090	-----	-----	-----

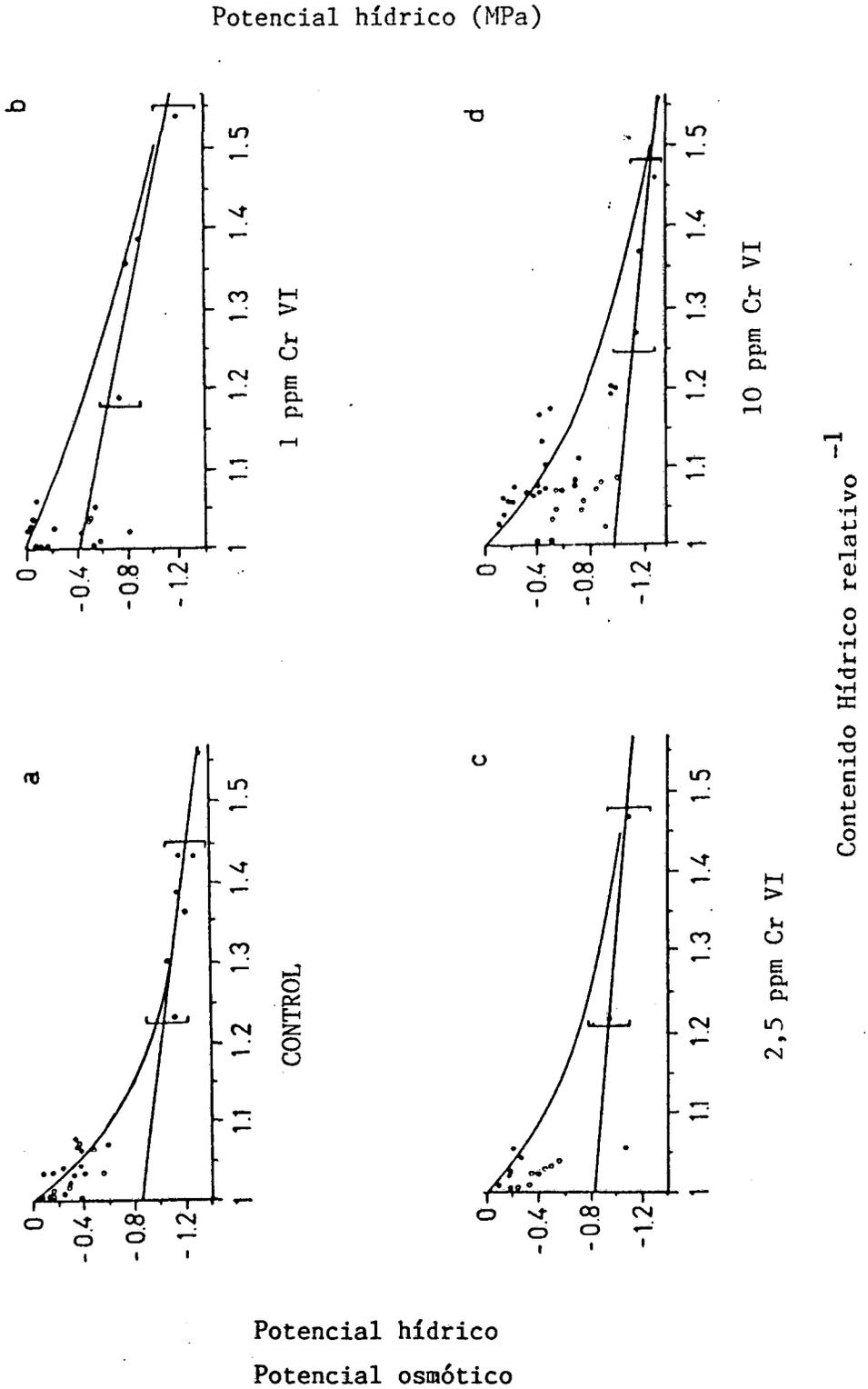
FIGURA 24 .-

Parámetros hídricos en las plantas sometidas a los distintos tratamientos en el día 0 del período de déficit hídrico.



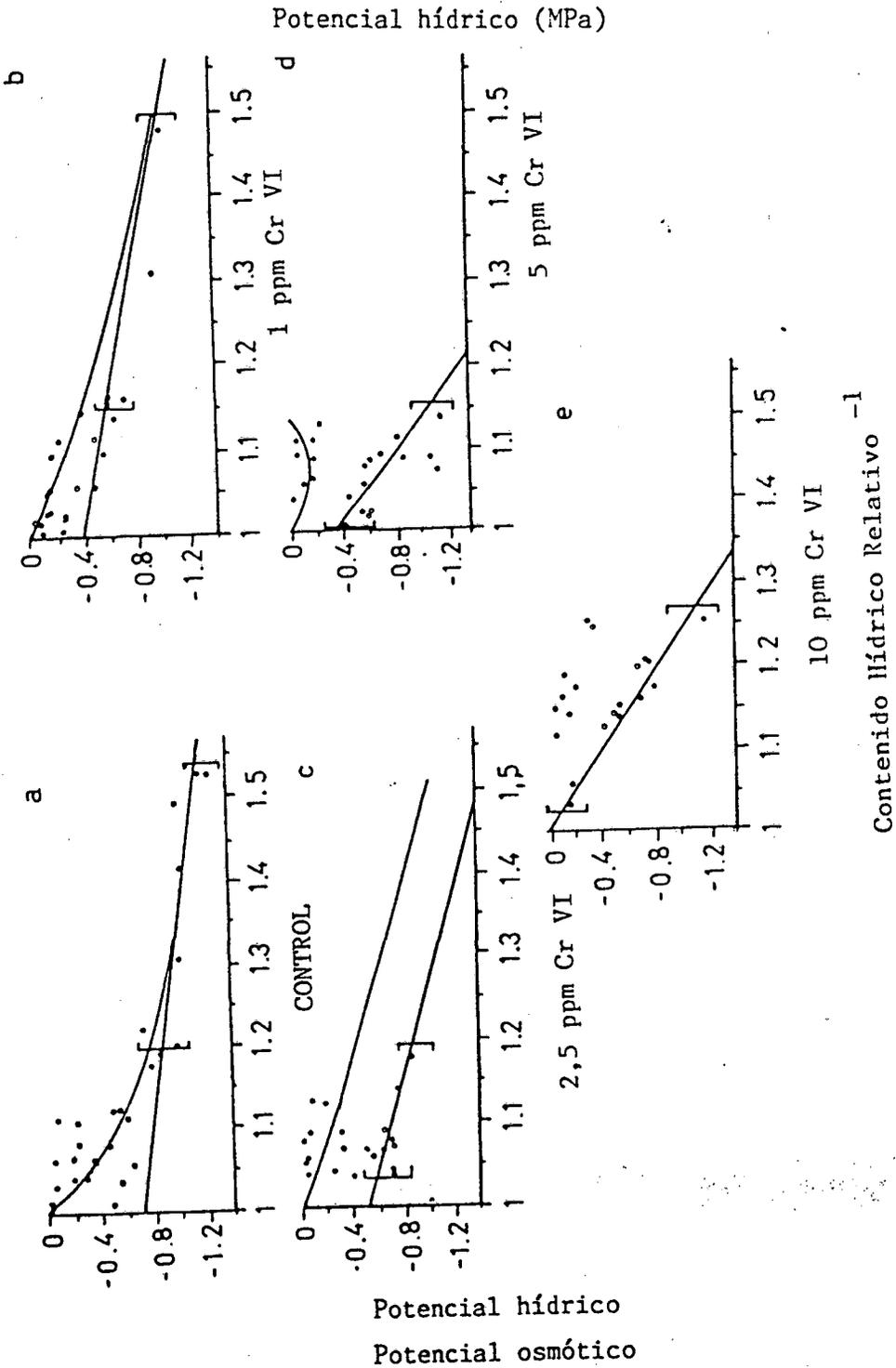
-. FIGURA 25 .-

Diagramas de Richter correspondientes a las hojas inferiores de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos con cromo.



-. FIGURA 26 .-

Diagramas de Richter correspondientes a la primera hoja trifoliada de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos con cromo.



### 4.3 Experiencia III

#### 4.3.1 Curso del crecimiento y desarrollo

El curso y porcentaje de la germinación resultó igual que en las dos experiencias anteriores, dado que las condiciones de germinación fueron las mismas que en ellas.

Al cabo de 3-4 días de haber germinado las semillas (7 días después de la siembra) las plantas fueron transplantadas a las soluciones conteniendo las diferentes concentraciones de cromo, puesto que hasta entonces las plantas únicamente habían estado en contacto con el sustrato de germinación (perlita) y agua destilada.

El primer efecto manifestado por las plantas tratadas con cromo fue el del retraso en el crecimiento de las plantas tratadas con las máximas concentraciones del metal (1 y 1,5 ppm Cr VI en el medio), mientras que las plantas tratadas con 0,2 ppm Cr VI no manifestaron síntoma alguno de toxicidad en la parte aérea.

A pesar de que las plantas tratadas con 0,2 ppm Cr VI no manifestaron ningún síntoma externo en la parte aérea, no fué así en sus raíces, en las que a pesar de no ser detenido de forma visible el crecimiento, sí que manifestaban una coloración más oscura. Las raíces de las plantas tratadas con concentraciones más elevadas de cromo también presentaron esta coloración más oscura, a la vez que una formación de raíces laterales mucho mayor que las plantas control o en las tratadas con 0,2 ppm Cr VI en el medio. Estas raíces laterales eran de un color más claro que en el resto de la raíz y se hallaban presentes en todas las raíces de la planta, creciendo perpendicularmente a la raíz madre y no alcanzando en ningún caso una longitud mayor a 0,5 cm, no dando a su vez lugar a la formación de ninguna raicilla lateral. Este efecto empezó a manifestar a partir de los 7 días de estar las plantas en la solución nu

tritativa conteniendo el cromo, se mantuvo e incrementó a lo largo del tratamiento.

En la parte aérea los síntomas de fitotoxicidad fueron los mismos que en las anteriores experiencias, aunque se manifestaban a concentraciones de cromo en el medio aproximadamente 10 veces menores que en ellos, prueba de que la disponibilidad del cromo en cultivo en perlita es mucho más baja que en la solución nutritiva, lo cual es indicativo de que la perlita no es un sustrato totalmente inerte.

La secuencia temporal de manifestación de síntomas en el crecimiento de la parte aérea fué la misma que en las experiencias anteriores.

A los 23 días desde la germinación las plantas fueron sometidas a un moderado déficit hídrico provocado por stress osmótico, durante tres días, lo cual provocó la aparición de síntomas de stress en las plantas que menos síntomas de toxicidad presentaban (control y 0, 2 ppm Cr VI en el medio), siendo menos apreciables en las plantas tratadas con las mayores concentraciones de cromo (1 y 1,5 ppm), lo cual está de acuerdo con los resultados de la experiencia anterior, en la que las plantas tratadas con las mayores concentraciones de cromo resultaron ser las más resistentes al déficit hídrico.

Los síntomas presentados por las plantas que los manifestaron fueron una pérdida de turgencia que no llegó a la marchitez, tanto en las hojas inferiores como en la primera hoja trifoliada. Por lo que respecta a las raíces, no manifestaron síntoma alguno nuevo durante el período de stress osmótico.

#### 4.3.2 Efecto sobre el crecimiento

Al igual que en todas las experiencias realizadas hasta ahora, el Cr VI ha tenido efectos negativos sobre el crecimiento en todos los órganos estudiados, observándose una graduación desde la raíz hasta las

más jóvenes hojas trifoliadas estudiadas. Mientras que en estas últimas el efecto fué negativo y patente, sin observarse en ningún momento un incremento en el peso de ninguna de ellas, en el resto de órganos el comportamiento es bien distinto (tablas 43,44 y 45 y figuras 27,28 y 29). En la raíz, tallo y hojas inferiores es posible observar un incremento, aunque no significativo, en el peso fresco de todos los órganos estudiados salvo la 3ª y 4ª hojas trifoliadas. Por otra parte, parece existir un incremento en el peso fresco en todos los órganos estudiados salvo a partir de la 2ª hoja trifoliada inclusive, en lo que respecta a la más elevada concentración de cromo empleada (1,5 ppm Cr VI).

Por lo que respecta al área foliar, se obseerva un incremento parecido en el crecimiento de las hojas inferiores para las concentraciones más bajas de Cr en el medio, mientras que en la priemera hoja trifoliada no aparece dicho efecto ya (tabla 45 y figura 29). La reducción porcentual es mayor en la primera hoja trifoliada, indicando claramente un mayor efecto del cromo sobre el crecimiento de éstas últimas.

Tal y como hemos podido comprobar, los dos tipos de hojas difieren en su comportamiento, tal y como ya habíamos visto en anteriores experiencias. A lo largo de este trabajo es posible constatar una diferencia de comportamiento entre los distintos tipos de hojas, tanto si se trata de crecimiento como el resto de los parámetros estudiados, como nutrición mineral o relaciones hídricas. Estos no son los únicos casos que es posible encontrar. Así el incremento en el crecimiento a dosis bajas de Cr ya fue descrito por Bertrand y Haas (11,40). En esta misma experiencia volveremos a encontrar ejemplos de comportamiento diferencial entre los distintos tipos de hojas presentes en la planta.

Otro de los efectos observados, el incremento en peso y área folialr para las bajas concentraciones de cromo en el medio parece estar ligado con comportamientos anómalos de otros parámetros debido a excesos de Cr que pueden provocar desequilibrios en el estado nutritivo y funcio

nal de la planta sin dañar seriamente su funcionamiento. Incluso pudiera ser que el nivel óptimo de cromo se halle en estos valores normales y que en condiciones control las plantas se encuentre en un estado deficiente de este metal.

#### 4.3.3 Efectos sobre el contenido hídrico relativo, potencial hídrico, potencial osmótico y potencial de presión bajo condiciones de suministro hídrico adecuado y moderado stress osmótico

Al igual que en todos los apartados anteriores, las plantas control y las plantas tratadas con las distintas concentraciones de  $\text{Cr VI}$  en el medio, mostraron un comportamiento distinto, presentando además diferencias entre las hojas juveniles y la primera hoja trifoliada. En esta experiencia fue posible observar un claro estímulo del crecimiento a bajas concentraciones de cromo en el medio, las cuales no provocaron síntomas visibles de toxicidad. Junto a esta observación es posible comprobar que se produce una marcada disminución en el potencial de presión a la vez que el potencial osmótico se incrementa en la primera hoja trifoliada. A pesar de ello el  $\Psi_w$  y el CHR disminuyen con la concentración de cromo en el medio (tablas 46 a 49 y figuras 30 y 31), hecho indicativo de que aunque el potencial osmótico se incrementa, la disminución del  $\Psi_p$  compensa con creces este incremento. Este hecho, junto con la observación del incremento del crecimiento hace pensar que la planta ha seguido creciendo, pero al mantener una tasa de transpiración elevada (tabla 54 y figura 34) ha disminuido el CHR a la vez que ha disminuido el  $\Psi_p$ . No se puede hablar en este caso de un ajuste osmótico puesto que en él, según propone Wynn Jones (124), se produciría una disminución del potencial osmótico que permitiría mantener un potencial de presión suficientemente elevado como para mantener los estomas abiertos y así continuar con una elevada tasa de intercambio gaseoso que permitiría mantener una elevada tasa fotosintética y productividad, a la vez que el crecimiento

también se mantendría. En nuestro caso, hemos observado el mantenimiento de una elevada transpiración y un alto grado de apertura estomática. Esto, sumado a los efectos que sobre la elasticidad de la pared celular parece tener el cromo, incrementándola a bajas concentraciones del metal, podría haber dado lugar al incremento del crecimiento observado. Cuando estas plantas fueron sometidas a un moderado stress osmótico se mantuvo el potencial de presión mientras que disminuyeron el  $\Psi_w$  y el  $\Psi_n$ , pudiéndose hablar en este caso de un ajuste osmótico, aunque no fuera igual para los dos tipos de hojas estudiados puesto que mientras que este comportamiento se produjo en las hojas inferiores, no fué a sí para la primera hoja trifoliada, la cual siempre ha demostrado ser más afectada por el cromo al ser expuesta al metal ya desde los inicios de su desarrollo, cosa que no ocurre en las hojas inferiores.

En el resto de tratamientos, el cromo provoca una disminución de  $\Psi_n$  e incremento de  $\Psi_p$  entre los distintos tratamientos y las plantas control, en las hojas inferiores. Estas diferencias son significativas entre el control y los distintos tratamientos, pero no en éstos entre sí. También es posible observar una disminución en el  $\Psi_w$  y del CHR en la primera hoja trifoliada. Todos los tratamientos, excepto el de mayor concentración de Cr VI en el medio, tienen un valor de  $\Psi_w$  superior al control en las hojas inferiores y el mismo comportamiento se da en las hojas trifoliadas en las que, además, hay una reducción del  $\Psi_p$  significativa y un incremento del  $\Psi_n$  respecto del valor mostrado por el control para la más baja concentración de cromo empleada. El alto valor del  $\Psi_p$  (mayor que el control en el tratamiento con mayor concentración de cromo en el medio) parece indicar la presencia de una mayor turgencia en las hojas de las plantas tratadas respecto a las no tratadas. Sin embargo, al ser sometidas a un moderado stress osmótico se produjo una disminución de la turgencia, hecho que parece relacionado con el mayor grado de apertura estomática y transpiración mostrado por estas plantas bajo condiciones hídricas adecuadas. En ambos tipos de

de hojas el CHR disminuye a medida que se incrementa la concentración de cromo en el medio.

Cuando las plantas fueron sometidas a un moderado stress osmótico se produjeron cambios sustanciales en el comportamiento de las relaciones hídricas. Es posible observar que se produce un comportamiento parecido entre las hojas inferiores y la primera hoja trifoliada (tablas 48 y 49 y figuras 30 y 31). En las hojas inferiores apenas hay variación del potencial osmótico, mientras que en la primera hoja trifoliada se produce una disminución seguida de un incremento no significativo a medida que se incrementa la concentración de cromo en el medio. En condiciones de stress osmótico se siguen produciendo anomalías de comportamiento para las menores concentraciones de cromo empleadas, al igual que ocurría en ausencia del mismo y en anteriores experiencias (experiencia II). El CHR se comporta de distintamanera en las hojas inferiores y la primera hoja trifoliada, aunque en este caso, las variaciones observadas no son significativas, de ahí que el tipo de evolución parezca un comportamiento al azar. Se ha producido un proceso de estabilización que también se produce en otros parámetros estudiados (tablas 50 a 54 y figuras 32 a 34).

De los datos obtenidos en esta experiencia y en experiencias anteriores podemos considerar la hipótesis de que el cromo actúa de diferente forma según la concentración a que se halle en el medio. A bajas concentraciones el Cr no provoca síntomas de toxicidad e incluso estimula el crecimiento y determinados procesos fisiológicos. A altas concentraciones se producen efectos claramente fitotóxicos más o menos característicos, todos ellos ya descritos anteriormente. Sin embargo, podría existir una tercera zona de efectos, en los que, a pesar de que podríamos hablar de fitotoxicidad, también se manifiesta una suspensión del desarrollo, recuperable, en la que no se desarrollan nuevos órganos pero se mantienen los ya formados. Este es el caso de la experiencia anterior (experiencia II) en la que las plantas tratadas con 10 ppm Cr VI al ser trans

plantadas a una solución nutritiva control, sin cromo, reanudaron su desarrollo normal y completaron su ciclo vital con un retraso de un mes respecto a las plantas no tratadas y sembradas a la vez.

#### 4.3.4 Efectos sobre la densidad estomática, grado de apertura estomática y transpiración

Tanto en las hojas juveniles como en la primera hoja trifoliada es posible observar un incremento en la densidad estomática, siendo mayor el incremento en la primera hoja trifoliada, hecho relacionado con el mayor efecto sobre el crecimiento (tablas 50 a 53 y figuras 32 y 33). Como era de esperar, los valores son muy parecidos tanto en las plantas antes de ser sometidas a stress osmótico como cuando son sometidas a dicho stress para un mismo tratamiento de Cr en el medio. Este hecho es explicable porque las hojas ya son maduras al efectuarse dicho tratamiento y no se ha producido ni nueva diferenciación de estomas ni una reducción significativa en el área foliar al ser sometidas las plantas a stress osmótico. Un hecho interesante a observar es el tipo de comportamiento de la densidad estomática, que tiende hacia valores constantes. Esta observación es explicable por dos causas: la primera de ellas es que la reducción del área foliar disminuye de forma exponencial, llegándose a valores mínimos a partir de los cuales la disminución se hace mínima aunque aumentemos considerablemente la concentración de cromo en el medio. El segundo hecho es la observación de efectos sobre la diferenciación estomática para las mayores concentraciones de cromo (fotografías 7 y 8), especialmente por lo que respecta a la primera hoja trifoliada. A la mayor concentración de cromo empleada es posible observar estomas en estados primarios de diferenciación estomática. Este hecho ha sido confirmado por observaciones con microscopía electrónica de barrido por la Dra. M.D. Vázquez en nuestro mismo laboratorio (comunicación personal), en plantas tratadas con cromo. Esto explicaría la reducción en la densidad estomática

tica para las mayores concentraciones de cromo en el medio, especialmente en la primera hoja trifoliada, la cual es más afectada por el cromo en todos los aspectos.

Donde sí es posible observar diferencias es en el grado de apertura estomática, medido, a falta de un método mejor y más fiable, a partir de la proporción de estomas claramente abiertos frente al número total de estomas. Hay varios hechos observables. En primer lugar se observa que hay un comportamiento diferencial entre las hojas inferiores y la primera hoja trifoliada. En las hojas inferiores se observa una reducción en la proporción de estomas abiertos a medida que se incrementa la concentración de cromo en el medio, mientras que en la primera hoja trifoliada, si bien hay una disminución inicial respecto al control, se produce un cierto incremento, aunque no significativo.

Tanto la disminución como el incremento no son significativos, al contrario de lo que ocurre en las hojas inferiores, manteniéndose el grado de apertura estomática en unos valores parecidos a lo largo de los distintos tratamientos con cromo. Diversos autores (24,25,47) han observado una relación directa entre el grado de apertura estomática y el  $p$ , siendo éste también nuestro caso, en donde las plantas control presentan un  $p$  más alto que las tratadas y también un grado de apertura estomática mayor que éstas. Sin embargo, cuando las plantas fueron sometidas a un moderado stress osmótico no se aprecia claramente, aunque ello podría ser debido a que las diferencias de apertura estomática son bajas, a la vez que las fluctuaciones en el  $p$  medio también son elevadas; no siendo las diferencias significativas entre los tratamientos de cromo, lo cual está relacionado con el que las diferencias en la transpiración tiendan a ser menores al ser sometidas las plantas a stress osmótico, tal y como observó Henson (47) en Penisetum americanum resistente a la sequía y que presentaban una resistencia estomática mayor que plantas no tratadas. Estas plantas resistentes a la sequía mantuvieron valores ele

vados y suficientes de transpiración e intercambio gaseoso respecto a las plantas no resistentes, que sufrieron un incremento mayor que ellas en la resistencia estomática al ser sometidas a déficit hídrico. Este hecho podría estar relacionado con algún tipo de estrategia de evitación en el que se minimizará el área transpirable y el metabolismo en favor de una menor pérdida de agua, lo cual explicaría el incremento de la turgencia, tanto en esta experiencia como en la experiencia anterior (experiencia II) de las plantas tratadas con Cr VI, por lo que podríamos reconsiderar la afirmación hecha por otros autores y nosotros mismos en un anterior trabajo (7, 39) de que P. vulgaris es una especie sensible al Cr, máxime cuando plantas tratadas con elevadas concentraciones de Cr VI en el medio fueron capaces de continuar su desarrollo normalmente al ser transferidas a condiciones similares a las de los controles, no tratados con cromo.

Al ser sometidas las plantas a stress osmótico, el comportamiento tiende a ser parecido en ambos tipos de hojas. se produce una disminución en el grado de apertura estomática, siendo más grande la disminución cuanto mayor es el grado de apertura estomática antes de ser sometidas a dicho stress. Se observa un fenómeno por el cual el grado de apertura estomática pasa a ser igual en prácticamente todos los tratamientos con Cr VI en el medio. Unicamente las hojas inferiores presentan una disminución respecto al control en todos los tratamientos sometidos al stress, aunque dicha disminución no sea significativa. En ambos tipos de hojas el grado de apertura estomática se sitúa entre un 40-70%, no sobrepasándose este límite, tanto superior como inferior, probablemente debido a que nos encontramos cerca del límite provocado directamente por el stress osmótico. Quizá con un stress osmótico superior se hubieran obtenido valores más bajos, aunque, con toda probabilidad se hubiera sometido a la planta a un shock osmótico que hubiera provocado su marchitamiento irreversible, lo cual no era nuestra intención en esta experiencia.

Respecto a la morfología de las células epidérmicas y estomáticas, determinado mediante la técnica descrita en el apartado 3.2.11, es posible observar:

#### HOJAS INFERIORES

- Control (fotografías 1 y 9): Presentan células epidérmicas lobuladas. Todos los estomas presentan la misma morfología, con células guarda rriñonadas típicas de las dicotiledóneas. La disposición de los estomas es de tipo paracítico o rubiáceo. Es posible distinguir claramente entre estomas abiertos y cerrados. Se observan tricomas unicelulares rodeados por seis células en la base, también lobuladas al igual que el resto de las células epidérmicas. También es posible observar tricomas secretore.
- 0,2 ppm (fotografías 2 y 10): No se observan diferencias morfológicas con el control.
- 1 ppm (fotografías 3 y 11): La morfología se mantiene parecida al control. Las céluals guarda estomáticas son más redondeadas que las del control y las células que rodean a los tricomas son proporcionalmente mayores.
- 1,5 ppm (fotografías 4 y 12): Sigue manteniéndose una estructura parecida a la anterior.

#### PRIMERA HOJA TRIFOLIADA:

- Control (fotografías 5 y 13): La morfología es parecida a la de las hojas inferiores, aunque parece haber una mayor proporción de estomas cerrados.
- 0,2 ppm (fotografías 6 y 14): Morfología parecida a la anterior. Empiezan a aparecer diferencias, sin embargo. Las células guarda empiezan a redondearse y las lobulaciones de las células epidérmicas se hacen más suaves.

- 1 ppm (fotografías 7 y 15): Las células epidérmicas son más pequeñas que en los anteriores tratamientos. Aparecen células triangulares no lobuladas que parecen estomas en fase de diferenciación.
- 1,5 ppm (fotografías 8 y 16): Las diferencias observadas con el control en el tratamiento anterior se acentúan. Las células son más pequeñas y la densidad estomática aumenta, a la vez que lo hace el número de tricomas.

Una vez sometidas las plantas a stress osmótico no se produjeron cambios en la morfología.

Relaciones entre la morfología y la tasa de transpiración han sido observados por otros autores (130) en plantas tratadas con Zn. En esta misma experiencia observaron que se producen cambios morfológicos en las células epidérmicas y en el parénquima empalizada, sugiriendo que la disminución de la transpiración puede estar relacionada con estos cambios.

Tabla 43: Peso fresco, expresado en g, de las distintas partes de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos

		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		RAIZ			TALLO				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
	x	5,955	8,455	2,045	3,307	2,622	2,335	1,018	1,413
	s.d.	3,399	5,058	2,280	2,660	2,488	2,107	1,460	1,484
	x	4,068	8,714	2,326	1,953	2,161	3,078	1,429	0,887
	s.d.	4,471a	7,409a	2,220b	2,640b	3,022a	2,507a	1,303b	1,261b
	s.d.	1,320	2,040	0,153	0,677	0,765	0,508	0,247	0,326
		HOJAS INFERIORES			PRIMERA HOJA TRIFOLIADA				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
	x	1,742	2,109	0,502	1,008	1,735	0,546	0,617	0,220
	s.d.	2,320	2,163	1,069	1,286	1,799	0,976	0,721	0,205
	x	1,547	2,647	1,085	0,811	0,822	-----	0,448	0,066
	s.d.	1,869a	2,276a	0,885b	1,035b	1,453a	0,761ab	0,595b	0,164ab
	s.d.	0,402	0,329	0,332	0,239	0,547	0,304	0,138	0,085

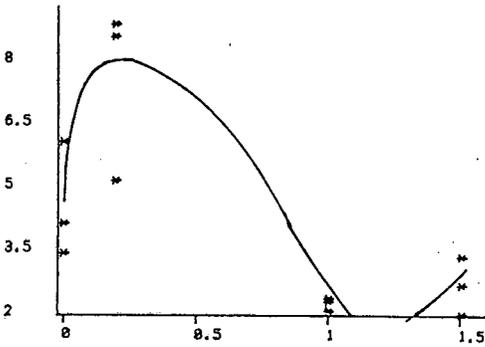
Tabla 43 (Continuación)

Concentración de cromo en el medio (ppm)

	SEGUNDA HOJA TRIFOLIADA			TERCERA Y CUARTA HOJAS TRIFOLIADAS				
	0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
	2,350	1,333	0,168	0,220	1,478	0,367	-----	-----
	1,619	0,832	0,115	0,205	1,338	0,179	-----	-----
	1,797	1,484	0,071	0,066	-----	0,315	-----	-----
x	1,922a	1,261b	0,118c	0,164c	1,408a	0,287b	-----	-----
s.d.	0,381	0,341	0,049	0,085	0,099	0,097	-----	-----

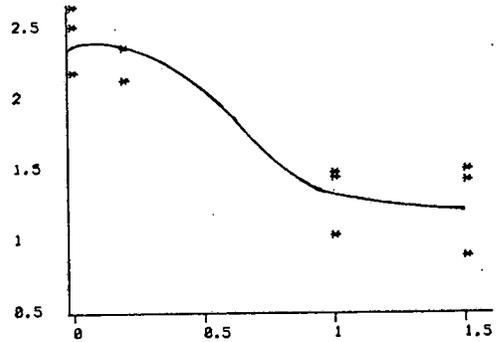
- . FIGURA 27 .-

Peso fresco en la experiencia III



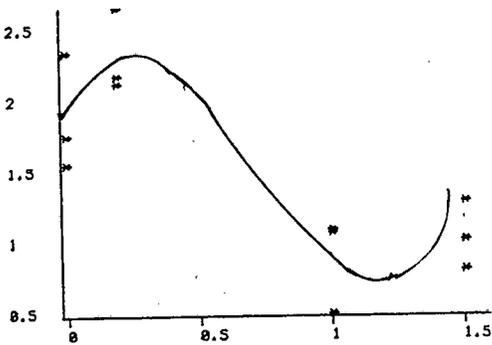
A: RAIZ

$$y = 4,47 + 22,5 x - 42,63 x^2 + 17,87 x^3$$
$$r^2 = 0,797$$



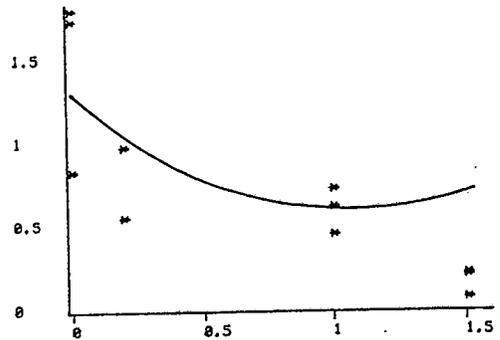
B: TALLO

$$y = 2,422 + 1,21 x - 4,34 x^2 + 2,01 x^3$$
$$r^2 = 0,814$$



C: HOJAS INFERIORES

$$y = 1,87 + 3,50 x - 8,05 x^2 + 3,56 x^3$$
$$r^2 = 0,820$$



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

$$y = 1,34 - 1,80 x + 0,97 x^2$$
$$r^2 = 0,500$$

Ordenadas: Peso (g)

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 44: Peso seco, expresado en g. de las diferentes partes de las plantas sometidas a los distintos tratamientos

		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		RAIZ		TALLO					
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
x		0,239	0,306	0,118	0,156	0,347	0,210	0,154	0,166
		0,120	0,217	0,121	0,133	0,257	0,187	0,180	0,175
		0,176	0,357	0,122	0,130	0,210	0,222	0,212	0,112
x		0,181a	0,294a	0,120b	0,140a	0,271a	0,620a	0,182ab	0,151b
s.d.		0,055	0,071	0,002	0,015	0,070	0,018	0,029	0,034
PRIMERA HOJA TRIFOLIADA									
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
		0,154	0,183	0,048	0,130	0,171	0,249	0,075	-----
		0,150	-----	0,116	0,137	0,129	-----	0,079	0,105
		0,114	0,202	0,104	0,079	0,084	0,236	0,079	0,043
x		0,140a	0,192b	0,089a	0,113a	0,128a	0,242b	0,078a	0,074a
s.d.		0,022	0,014	0,036	0,036	0,044	0,010	0,002	0,044

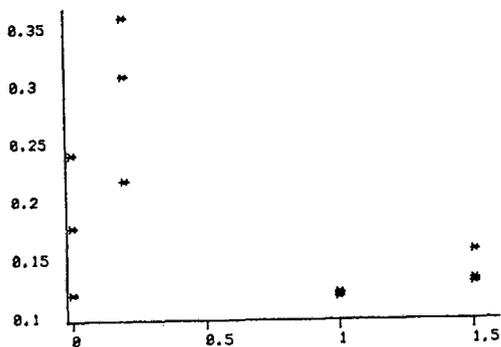
Tabla 44: (Continuación)

Concentración de cromo en el medio (ppm)

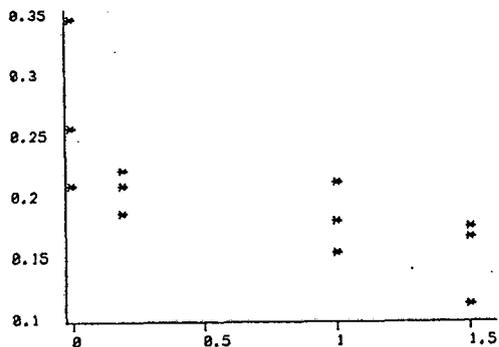
	SEGUNDA HOJA TRIFOLIADA			TERCERA Y CUARTA HOJAS TRIFOLIADAS				
	0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
	0,258	0,118	0,023	0,199	0,175	0,046	---	---
	0,133	0,314	---	0,072	0,139	---	---	---
	0,150	0,153	0,203	---	---	0,041	---	---
x	0,180a	0,195a	0,113a	0,136a	0,157a	0,043b	---	---
s.d.	0,068	0,105	0,127	0,090	0,026	0,004	---	---

-. FIGURA 28 .-

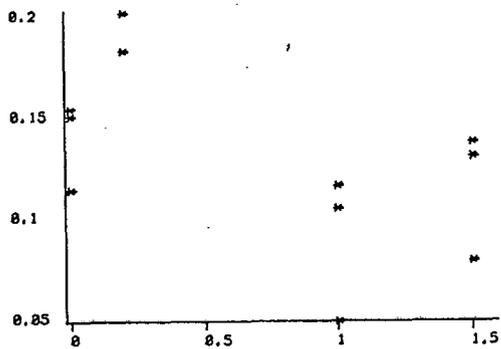
Peso seco en la experiencia III



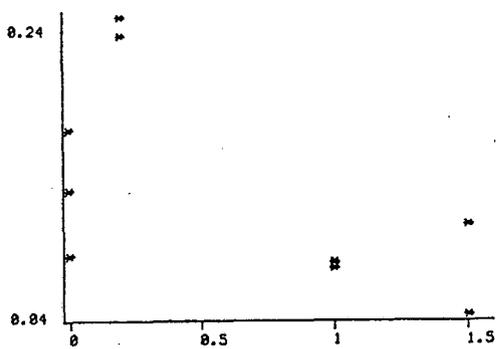
A: RAIZ



B: TALLO



C: HOJAS INFERIORES



D: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Peso (g)

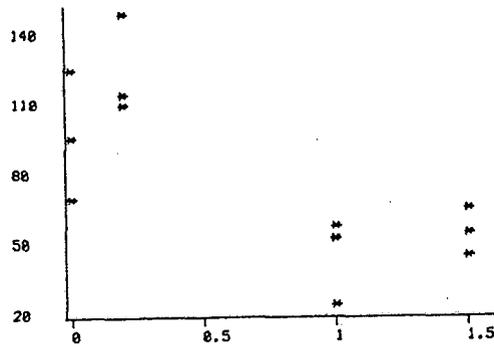
Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 45: Area foliar, expresada en cm<sup>2</sup>, de las plantas sometidas a los diferentes tratamien-  
tos

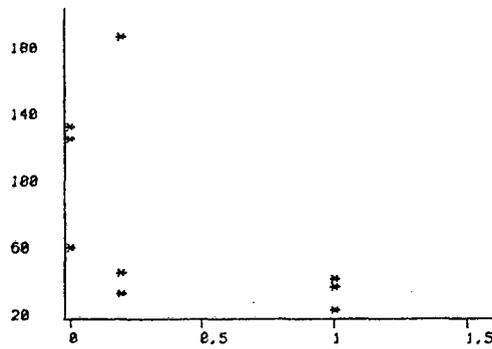
		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		HOJAS INFERIORES		PRIMERA HOJA TRIFOLIADA		TERCERA HOJA TRIFOLIADA			
		0	<u>0,2</u>	<u>1</u>	<u>1,5</u>	0	<u>0,2</u>	<u>1</u>	<u>1,5</u>
		95,38	114,04	24,08	54,57	125,31	34,21	42,66	---
		124,78	109,82	57,36	64,83	133,34	46,74	37,93	---
		69,82	148,95	52,29	44,72	60,82	186,38	24,14	---
x		96,66a	124,27a	45,58b	54,71b	107,16a	89,11a	34,91b	---
s.d.		27,50	21,48	18,65	10,06	40,44	84,87	9,62	---
		126,66	---	---	---	97,94	---	---	---
		131,36	---	---	---	106,59	---	---	---
		118,08	---	---	---	---	---	---	---
x		125,37	---	---	---	102,26	---	---	---
s.d.		6,73	---	---	---	6,12	---	---	---

-. FIGURA 29 .-

Area foliar en la experiencia III



A: HOJAS INFERIORES



B: PRIMERA HOJA TRIFOLIADA

Ordenadas: Area foliar (cm<sup>2</sup>)

Abcisas: Concentración de cromo en el medio (ppm)

Tabla 46: Parámetros hídricos en las hojas inferiores de las plantas sometidas a los distintos tratamientos bajo suministro hídrico óptimo

		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		$\psi_w$ (MPa)			$\psi_n$ (MPa)				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
x		-0,36	-0,24	-0,20	-0,30	-0,60	-0,72	-0,85	-0,80
s.d.		0,20	0,24	0,30	0,24	0,55	0,76	0,83	0,67
		-0,22	-0,18	-0,24	-0,28	-0,69	-0,58	-0,59	-0,69
<hr/>									
x		-0,26a	-0,22a	-0,25a	-0,27a	-0,61a	-0,69a	-0,76a	-0,72a
s.d.		0,09	0,04	0,05	0,03	0,07	0,10	0,15	0,07
<hr/>									
		$\psi_p$ (MPa)			CHR (%)				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
		0,24	0,48	0,65	0,50	100,00	92,54	95,18	82,003
		0,35	0,52	0,53	0,43	100,00	98,07	96,12	93,46
		0,47	0,40	0,35	0,41	92,92	95,70	85,71	91,72
<hr/>									
x		0,353a	0,467a	0,510a	0,447a	97,64a	95,44a	92,34	89,06a
s.d.		0,115	0,061	0,151	0,047	4,09	2,77	92,34a	89,06a

Tabla 47: Parámetros hídricos en la primera hoja trifoliada de las plantas sometidas a los distintos tratamientos bajo suministro hídrico óptimo

		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		$\Psi_w$ (MPa)			$\Psi_n$ (MPa)				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
		-0,22	-0,20	-0,22	-0,26	-0,72	-0,50	-0,52	-0,89
		-0,22	-0,22	-0,26	-0,32	-0,74	-0,53	-0,70	-0,96
x		-0,22a	-0,21a	-0,24a	-0,29b	-0,73a	-0,515b	-0,61b	-0,93c
s.d.		0,00	0,014	0,03	0,04	0,014	0,021	0,13	0,05
		$\Psi_p$ (MPa)			CHR (%)				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
		0,50	0,30	0,30	0,63	98,57	96,09	86,26	82,61
		0,52	0,31	0,44	0,64	95,49	93,26	100,00	88,21
x		0,51a	0,31b	0,37b	0,64c	98,02a	93,93a	92,39ab	86,87b
s.d.		0,014	0,007	0,099	0,007	2,30	1,91	6,99	3,77

Tabla 48: Parámetros hídricos en las hojas inferiores de las plantas sometidas a los distintos tratamientos, bajo stress osmótico

		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		$\psi_w$ (MPa)			$\psi_n$ (MPa)				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
		-0,32	-0,36	-0,28	-0,28	-0,94	-0,80	-0,94	----
		-0,28	-0,30	-0,28	-0,30	-0,51	-0,45	-0,89	-0,74
		-0,26	-0,38	-0,30	-0,32	-0,34	-0,54	-----	-0,51
x		-0,29a	-0,35a	-0,29a	-0,30a	-0,60ab	-0,60b	-0,75a	-0,63b
s.d.		0,03	0,04	0,012	0,02	0,31	0,18	0,29	0,16
		$\psi_p$ (MPa)			CHR (%)				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
		0,62	0,44	0,66	-----	95,09	88,76	95,80	87,71
		0,23	0,15	0,61	0,44	100,00	98,23	97,56	93,07
		-----	0,16	-----	0,19	96,47	100,00	99,04	88,42
x		0,43ab	0,25b	0,56a	0,44b	97,19ab	95,66ab	97,47a	93,07b
s.d.		0,276	0,17	0,13	-----	2,53	6,04	1,62	4,65

Tabla 49: Parámetros hídrico en la primera hoja trifoliada de las plantas sometidas a los distintos tratamientos, bajo stress osmótico

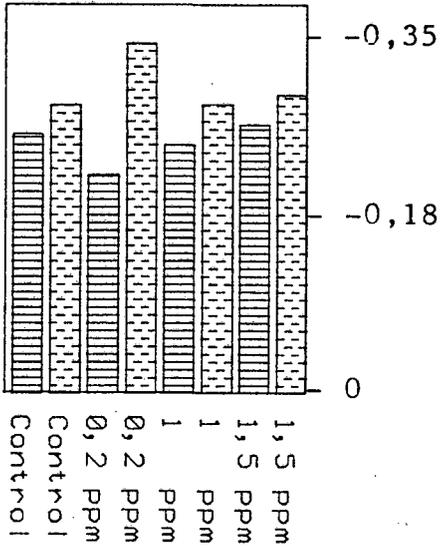
Concentración de cromo en el medio (ppm)

	$\Psi_w$ (MPa)			$\Psi_\pi$ (MPa)				
	0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
x	-0,38	-0,24	-0,30	-0,18	-----	-0,53	-0,92	-0,77
	-0,26	-0,34	-0,38	-0,18	-0,63	-0,70	-0,98	-0,85
	-0,32a	-0,30a	-0,34a	-0,18b	-0,63a	-0,62b	-0,95c	-0,81d
s.d.	0,09	0,07	0,06	0,00	0,00	0,12	0,04	0,06

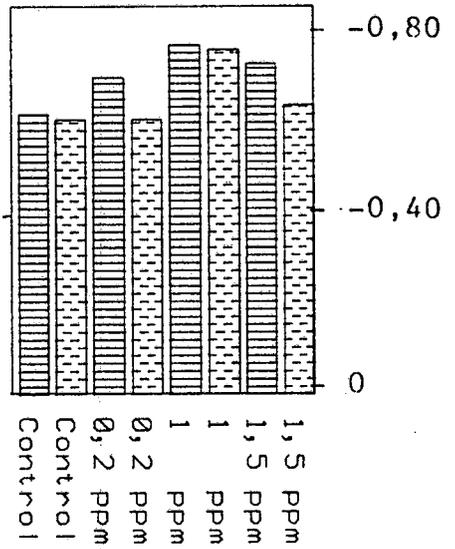
	$\Psi_p$ (MPa)			CHR (%)				
	0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
	-----	0,29	0,62	0,59	86,09	95,47	91,10	93,76
	0,37	0,36	0,60	0,67	85,63	98,26	95,83	90,87
	-----	-----	-----	-----	96,29	100,00	93,96	93,79
x	0,37a	0,33b	0,61c	0,63d	89,34a	97,91a	93,63a	92,81a
s.d.	-----	0,05	0,014	0,057	6,03	2,29	2,38	1,68

-. FIGURA 30 .-

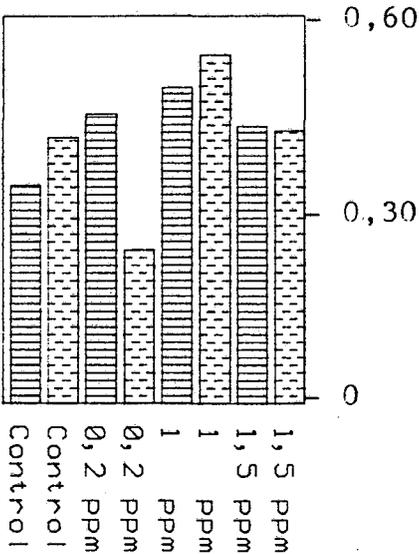
Parámetros hídricos en la experiencia III  
(Hojas inferiores)



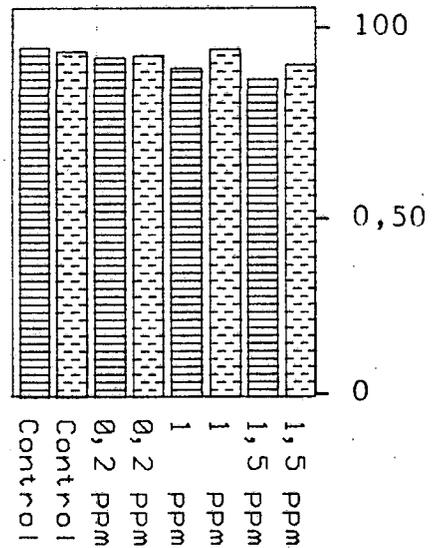
A: POTENCIAL HIDRICO (MPa)



B: POTENCIAL OSMOTICO (MPa)



C: POTENCIAL DE PRESION (MPa)

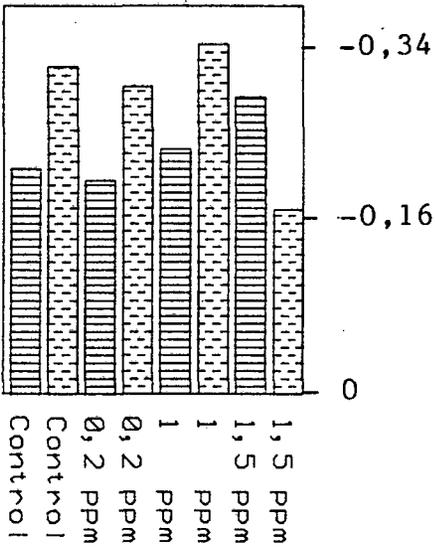


D: CONTENIDO HIDRICO RELATIVO (%)

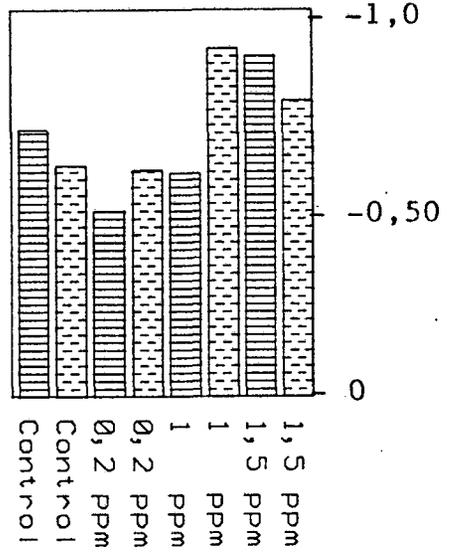
 Sin stress  
 Bajo stress

-. FIGURA 31 .-

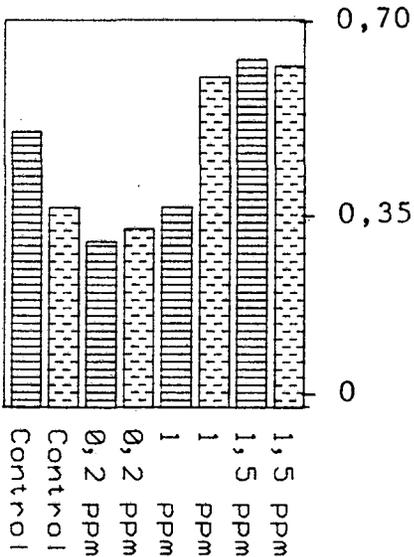
Parámetros hídricos en la experiencia III  
(Primera hoja trifoliada)



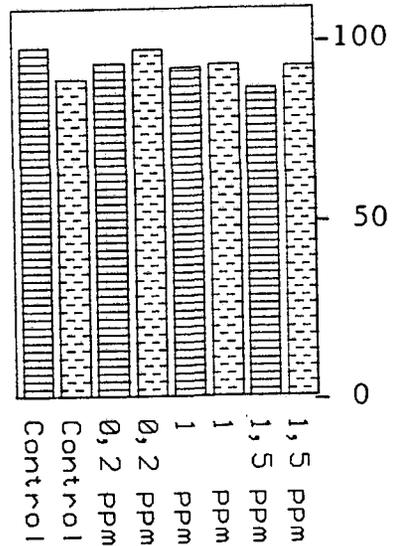
A: POTENCIAL HIDRICO (MPa)



B: POTENCIAL OSMOTICO (MPa)



C: POTENCIAL DE PRESION (MPa)



D: CONTENIDO HIDRICO RELATIVO (%)

 Sin stress  
 Bajo stress

Tabla 50: Apertura y densidad estomáticas en las hojas inferiores de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos bajo condiciones óptimas

		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		Densidad estomática (estomas /mm <sup>2</sup> )			Porcentaje de estomas abiertos				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
x		125,8	219,3	345,8	273,8	83,8	88,9	78,9	68,7
s.d.		135,8	217,2	326,2	283,9	97,2	88,8	92,7	64,8
		-----	217,2	326,2	283,9	-----	75,8	87,8	56,7
<hr/>									
x		130,8a	194,93b	326,9c	292,33c	90,50a	84,50a	86,47a	63,40b
s.d.		7,07	40,40	18,56	23,89	9,48	7,53	7,00	6,12
<hr/>									
		Porcentaje de estomas cerrados							
		0	0,2	1	1,5				
		16,1	11,0	21,0	20,6				
		2,7	11,1	7,2	24,1				
		-----	24,3	12,1	21,4				
<hr/>									
x		9,40a	15,47ab	13,43ab	22,03b				
s.d.		9,48	7,65	7,00	1,83				

Tabla 51: Apertura y densidad estomáticas en la primera hoja trifoliada de las plantas sometidas a diferentes tratamientos bajo condiciones óptimas

		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		Densidad estomática (estomas/mm <sup>2</sup> )			Porcentaje de estomas abiertos				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
x		197,4	---	---	397,4	48,6	---	---	68,3
s.d.		164,6	229,2	466,3	---	67,2	52,8	53,4	---
		162,3	233,1	---	---	74,8	59,1	---	---
<hr/>									
x		174,4a	231,2b	466,3c	397,4d	63,53a	55,95b	53,4b	63,3a
s.d.		19,63	2,76	---	---	13,48	4,45	---	---
<hr/>									
		Porcentaje de estomas cerrados							
		0	0,2	1	1,5				
		51,3	---	---	36,6				
		32,7	47,1	46,5	---				
		25,1	48,8	---	---				
<hr/>									
x		36,37a	47,95a	46,5a	36,6a				
s.d.		13,48	1,20	---	---				

Tabla 52: Apertura y densidad estomáticas en las hojas inferiores de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos bajo stress osmótico

		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		Densidad estomática (estomas/mm <sup>2</sup> )			Porcentaje de estomas abiertos				
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
x		166,9a	207,9b	186,8b	343,1c	66,6a	57,6a	58,9a	59,8a
s.d.		7,5	24,4	9,4	95,5	10,3	12,7	2,47	17,9

Porcentaje de estomas cerrados

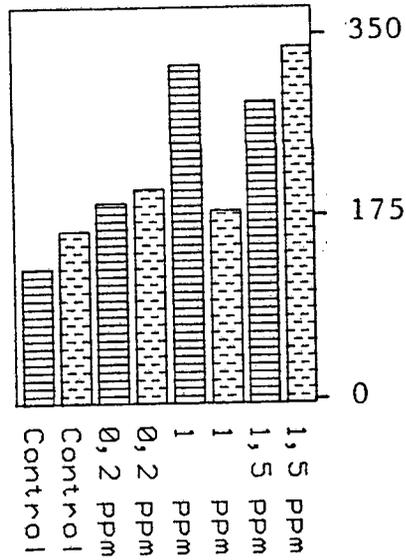
	0	0,2	1	1,5
x	33,3a	42,3a	41,1a	40,2a
s.d.	10,32	12,73	2,5	17,89

Tabla 53: Apertura y densidad estomáticas en la primera hoja trifoliada de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos bajo stress osmótico

		Concentración de cromo en el medio (ppm)							
		Densidad estomática (estomas/mm <sup>2</sup> )		Porcentaje de estomas abiertos					
		0	0,2	1	1,5	0	0,2	1	1,5
		211,9	211,9	222,5	-----	56,9	48,2	50,4	-----
		219,9	-----	264,9	381,5	28,0	-----	40,0	36,9
x		215,9a	221,9b	243,7b	381,5c	42,45ab	48,2a	45,2a	36,9b
s.d.		5,7	-----	29,9	-----	20,4	-----	7,4	-----

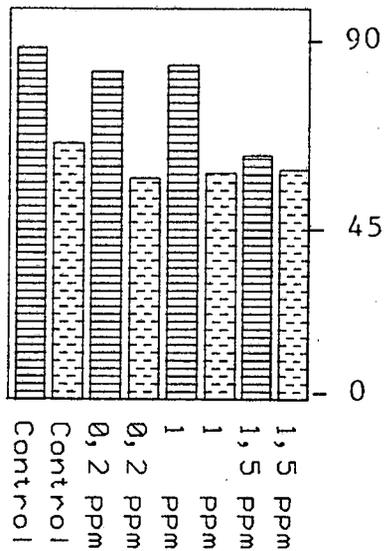
		Porcentaje de estomas cerrados			
		0	0,2	1	1,5
		43,0	51,7	49,5	-----
		71,9	-----	60,0	63,0
x		57,45a	51,70b	54,75ab	63,00a
s.d.		20,44	-----	7,42	-----

-. FIGURA 32.-  
Datos estomáticos (Hojas inferiores)



A: DENSIDAD ESTOMATICA (EST/mm<sup>2</sup>)

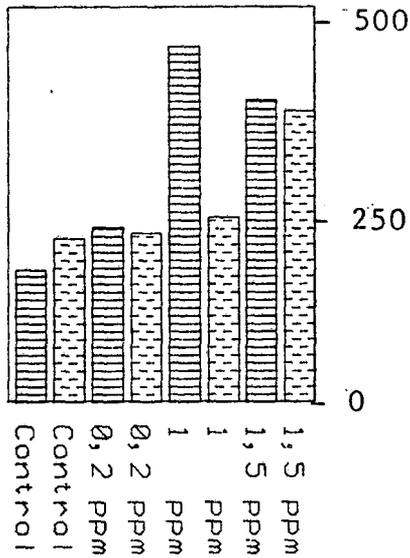
▨ Sin stress  
▩ Bajo stress



B: GRADO DE APERTURA ESTOMATICA (%)

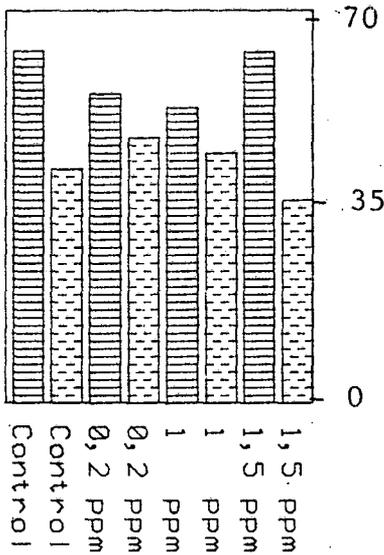
-. FIGURA 33 .-

Datos estomáticos (primera hoja trifoliada)



 Sin stress  
 Bajo stress

A: DENSIDAD ESTOMATICA (EST/mm²)



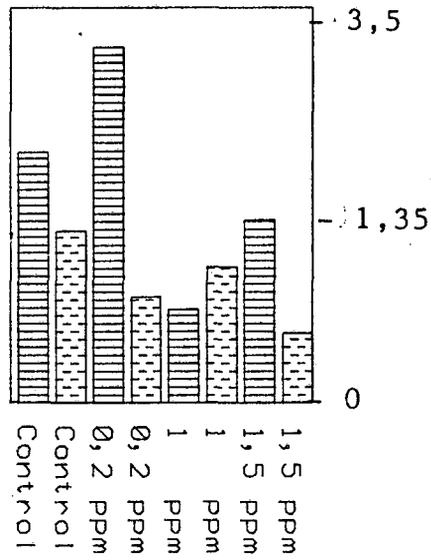
B: GRADO DE APERTURA ESTOMATICA (%)

Tabla 54: Valores de transpiración total, expresados en  $\text{mgH}_2\text{O/gPF} \times \text{min}$ , en las plantas sometidas a los distintos tratamientos

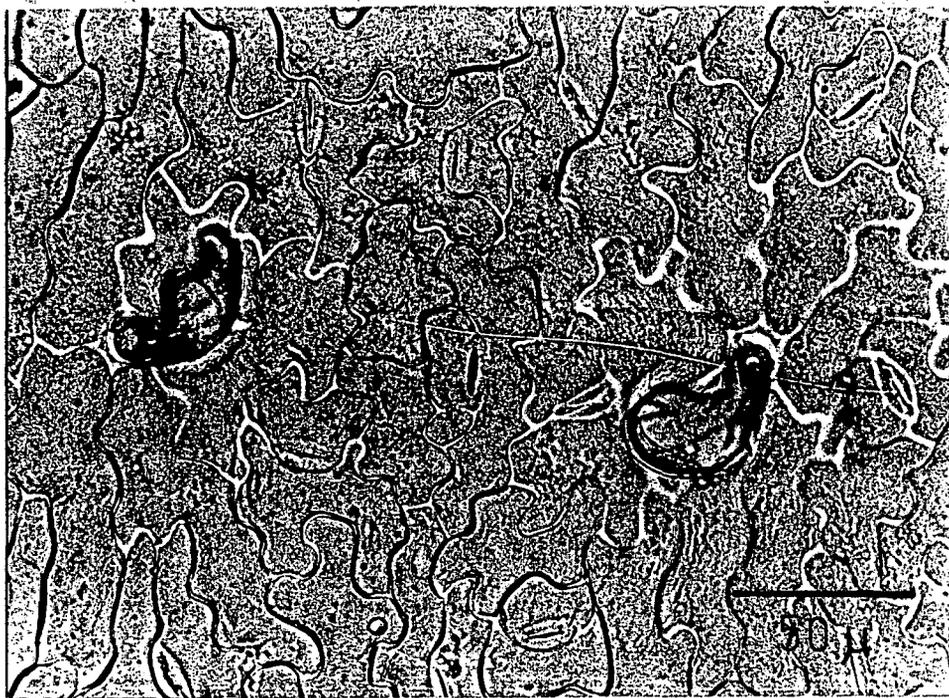
Concentración de cromo en el medio (ppm)				
CONDICIONES OPTIMAS				
	<u>0</u>	<u>0,2</u>	<u>1</u>	<u>1,5</u>
	3,195	3,782	0,521	1,936
	2,483	2,405	1,652	1,236
	1,483	3,921	0,515	2,047
x	2,387ac	3,369a	0,896b	1,740c
s.d.	0,860	0,838	0,655	0,440
BAJO STRESS OSMOTICO				
	<u>0</u>	<u>0,2</u>	<u>1</u>	<u>1,5</u>
	1,802	0,971	1,410	0,712
	1,622	1,038	1,253	0,617
	1,502	1,040	1,222	0,649
x	1,642a	1,014b	1,295c	0,659d
s.d.	0,151	0,036	0,101	0,048

-. FIGURA 34 .-

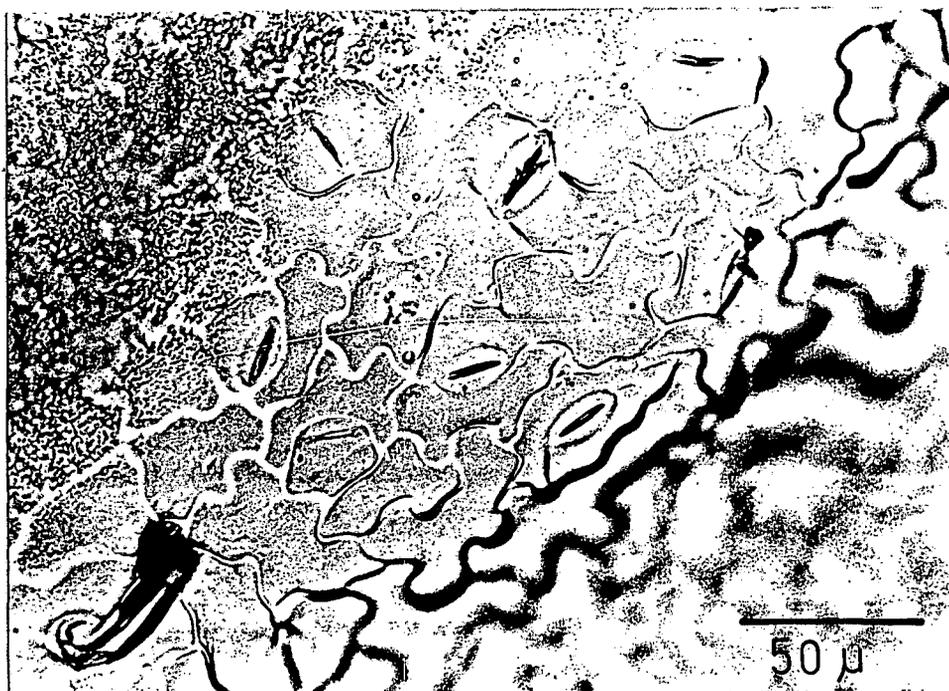
Transpiración total (mg H<sub>2</sub>O/g PF × min)



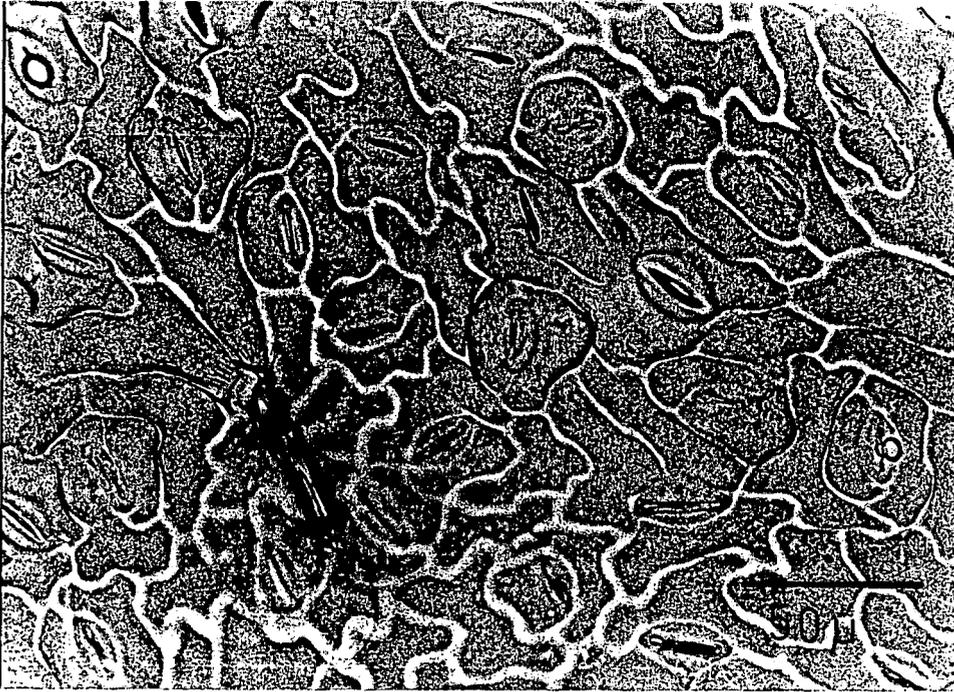
▨ Sin stress  
▩ Bajo stress



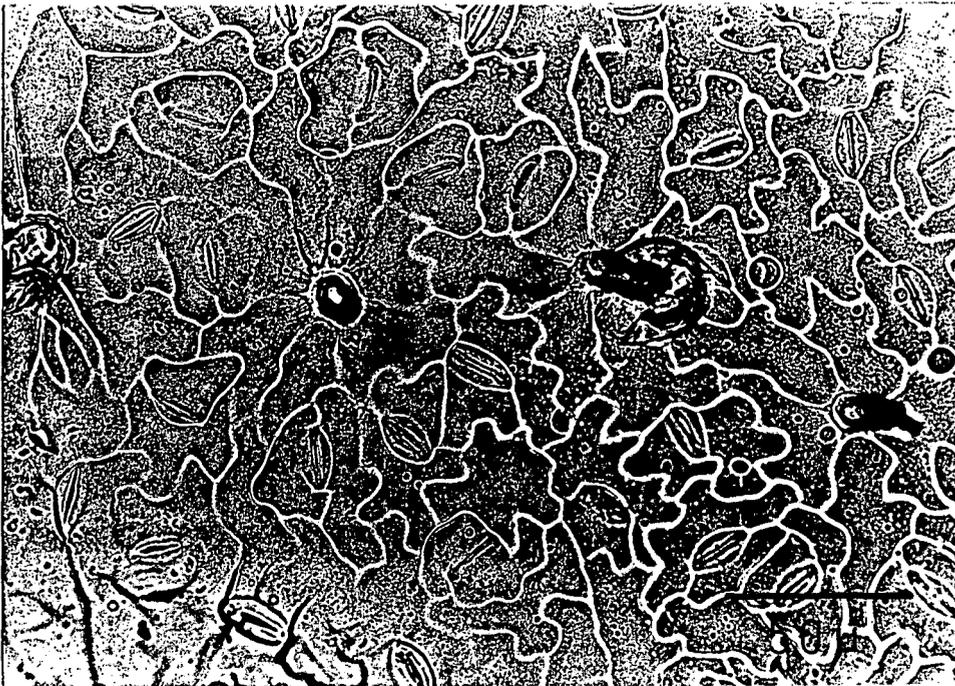
FOTOGRAFÍA 1.- Hoja inferior control bajo condiciones óptimas.



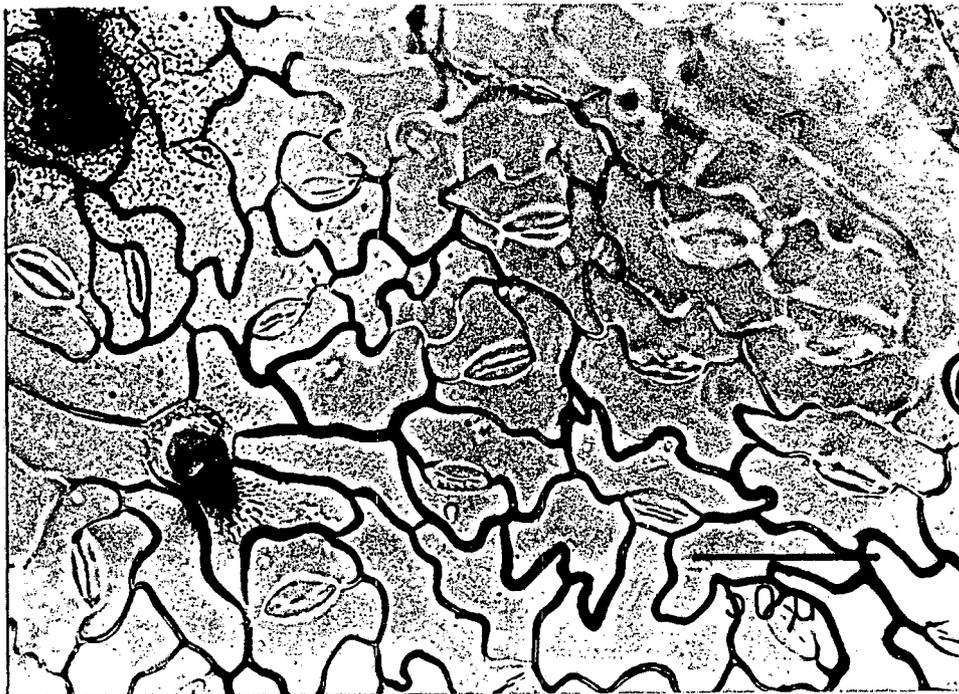
FOTOGRAFIA 2.- Hoja inferior del tratamiento con 0,2 ppm Cr VI, bajo condiciones hídricas óptimas.



FOTOGRAFIA 3.- Hoja inferior del tratamiento con 1 ppm Cr VI, bajo condiciones hídricas óptimas



FOTOGRAFIA 4.- Hoja inferior del tratamiento con 1,5 ppm Cr VI bajo condiciones hídricas óptimas.



FOTOGRAFIA 5.- Hoja trifoliada control bajo condiciones hídricas óptimas.



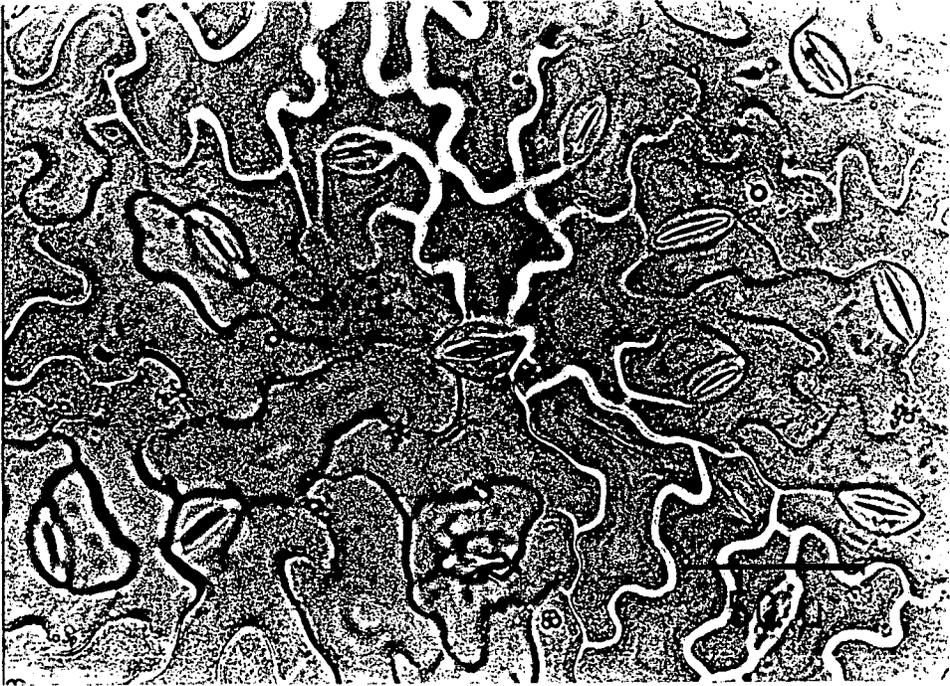
FOTOGRAFIA 6.- Hoja trifoliada del tratamiento con 0,2 ppm Cr VI bajo condiciones hídricas óptimas.



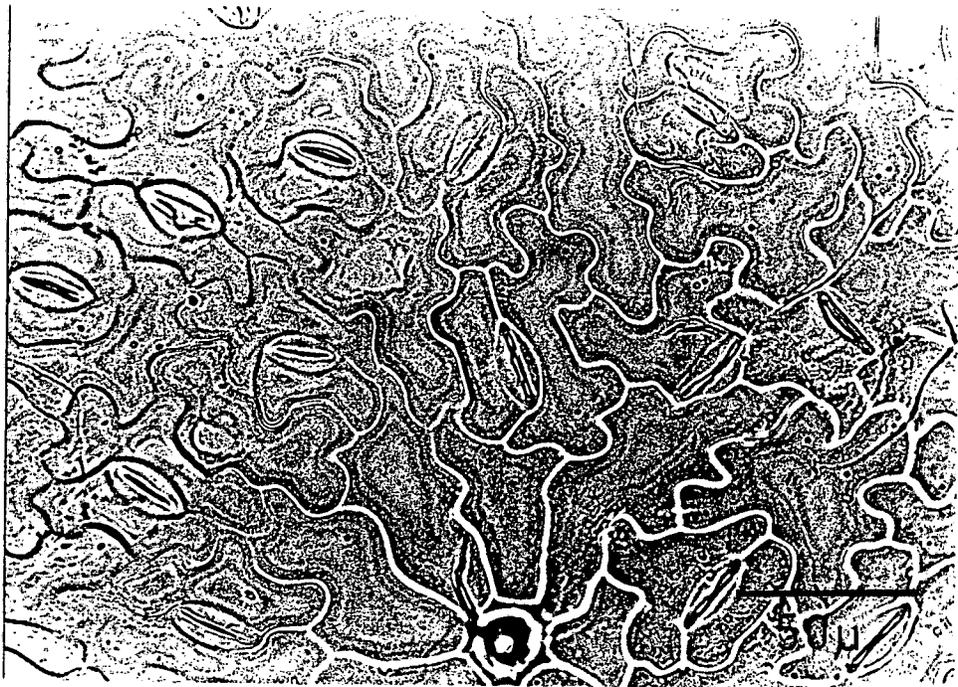
FOTOGRAFIA 7.- Hoja trifoliada del tratamiento con 1 ppm Cr VI bajo condiciones hídricas óptimas.



FOTOGRAFIA 8.- Hoja trifoliada del tratamiento con 1,5 ppm Cr VI bajo condiciones hídricas óptimas.



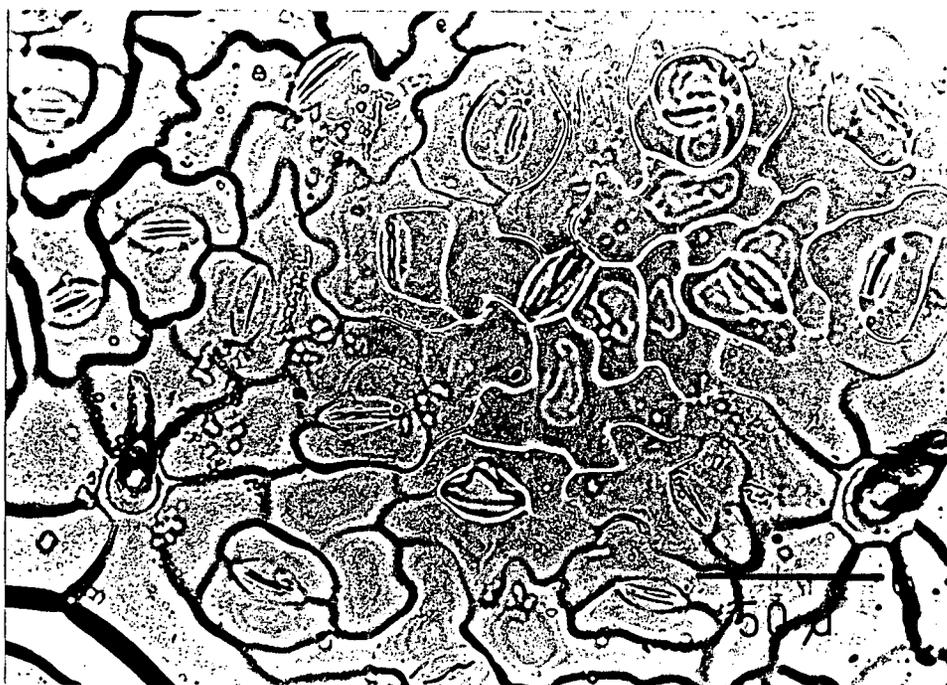
FOTOGRAFIA 9.- Hoja inferior control bajo moderado stress osmótico



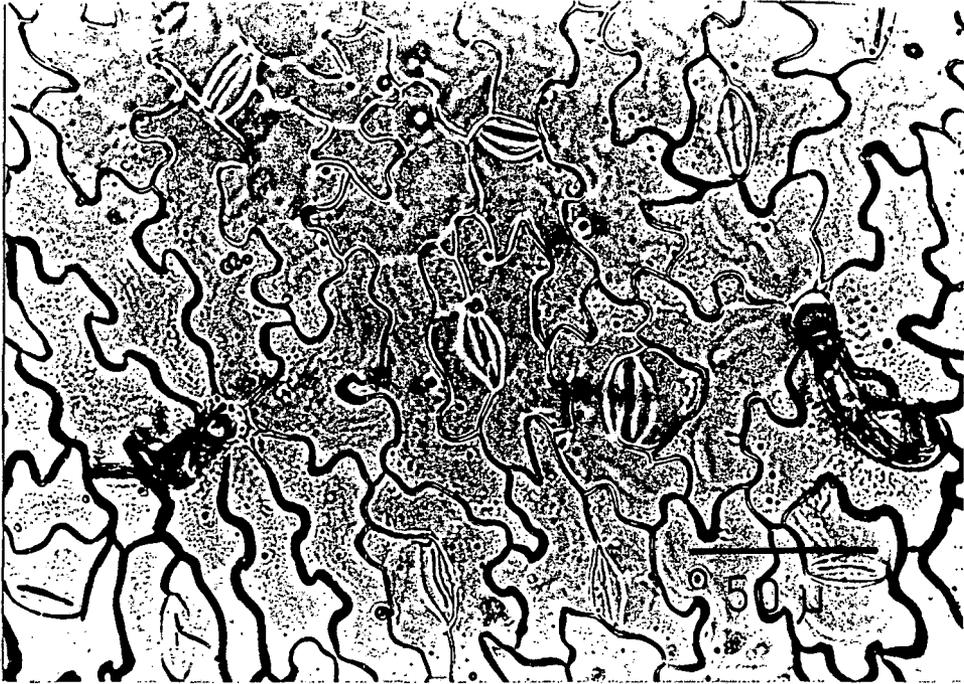
FOTOGRAFIA 10.- Hoja inferior del tratamiento con 0,2 ppm Cr VI bajo moderado stress osmótico.



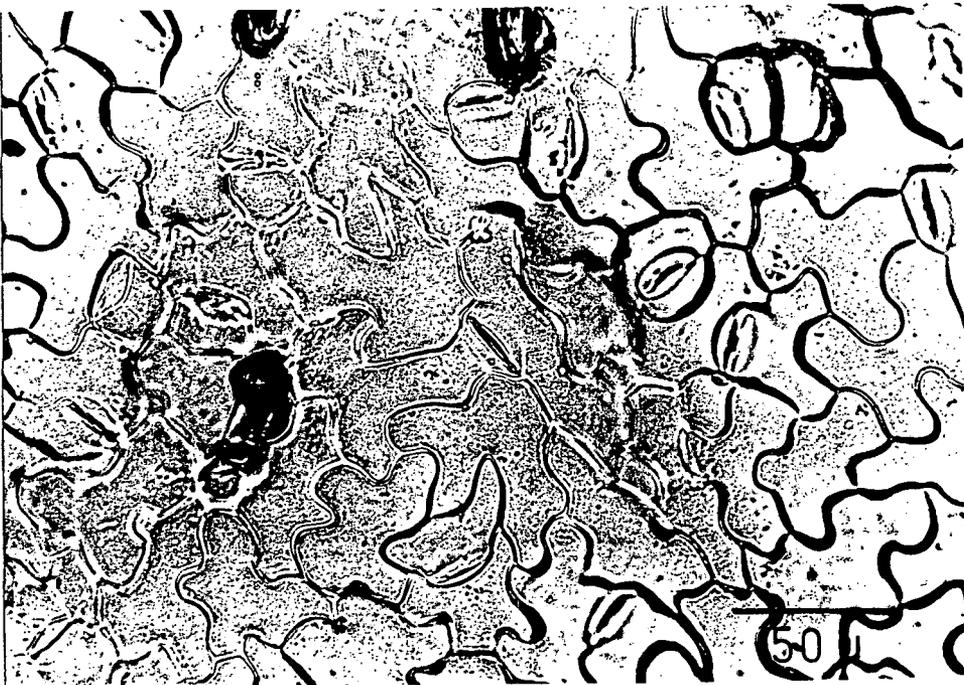
FOTOGRAFIA 11.-Hoja inferior del tratamiento con 1 ppm Cr VI bajo mode  
rado stress osmótico.



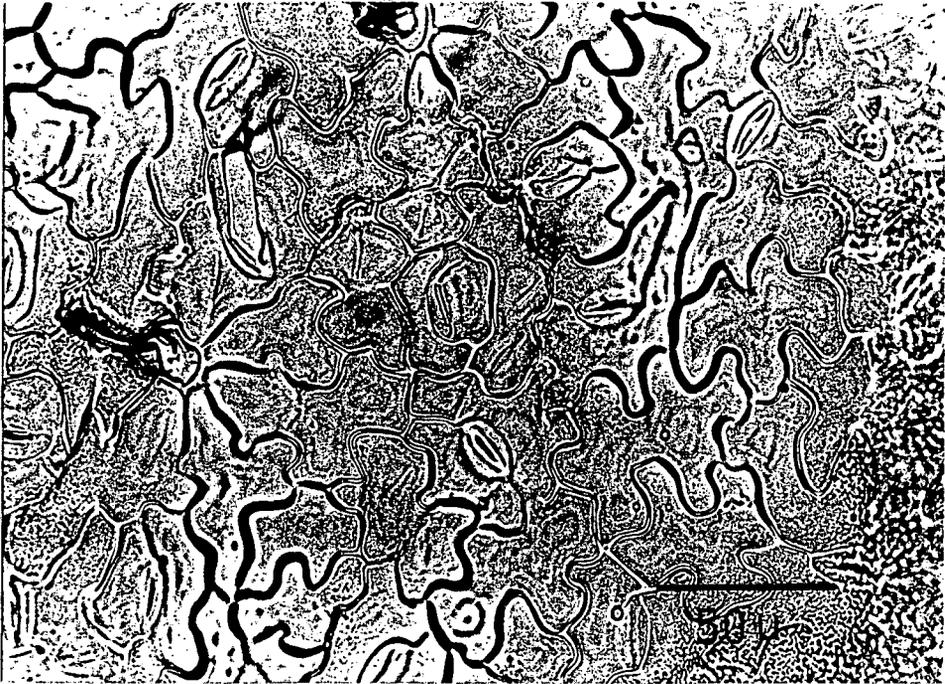
FOTOGRAFIA 12.- Hoja inferior del tratamiento con 1,5 ppm Cr VI bajo  
moderado stress osmótico.



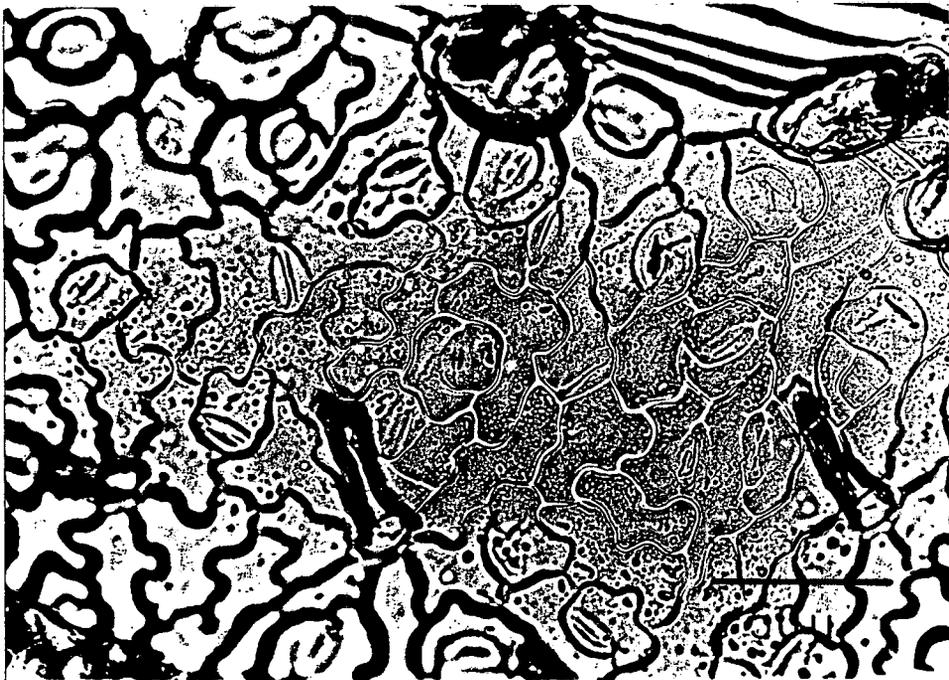
FOTOGRAFIA 13.- Hoja trifoliada control bajo moderado stress osmótico



FOTOGRAFIA 14.- Hoja trifoliada del tratamiento con 0,2 ppm Cr VI bajo moderado stress osmótico.



FOTOGRAFIA 15.- Hoja trifoliada del tratamiento con 1 ppm Cr VI bajo moderado stress osmótico.



FOTOGRAFIA 16.- Hoja trifoliada del tratamiento con 1,5 ppm Cr VI bajo moderado stress osmótico.

5.===== C O N C L U S I O N E S =====

- 1.- Se ha considerado con un carácter teórico general la toxicidad del cromo para los vegetales y su relación con el crecimiento y las relaciones hídricas.
- 2.- Se ha medido los niveles de nutrientes en diferentes órganos de Phaseolus vulgaris L. con la intención de relacionar los trastornos del crecimiento con los desórdenes en la nutrición de esta especie.
- 3.- El Cr provoca trastornos del crecimiento a elevadas concentraciones, reduciéndose la productividad de las plantas tratadas con este metal, tanto en las raíces como en la parte aérea.
- 4.- Existe una relación lineal positiva entre el suministro de Cr y el contenido en el mismo en las plantas tratadas con este metal. P. vulgaris, puede, por tanto, considerarse una especie acumuladora de cromo.
- 5.- Es posible observar la presencia de una especie de barrera de translocación del cromo desde la raíz hacia la parte aérea, manifestada por la elevada relación Cr raíz/Cr parte aérea.
- 6.- Las hojas inferiores de las plantas tratadas con cromo parecen actuar como sumideros del mismo, puesto que su contenido en el metal es mayor que en el tallo.
- 7.- Los efectos conjuntos del cromo sobre el P y el Fe, manifestados por una drástica reducción en el contenido en Fe en la primera hoja trifoliada y una disminución en la relación Fe/P están de acuerdo con la clorosis observada en la primera hoja trifoliada de las plantas tratadas con cromo.
- 8.- El cromo parece presentar efectos sobre la translocación de P, Na, Ca y Mn, sobre la absorción de K, Fe y Mo y no parece presentar efectos sobre el Mg, Zn y Cu.

- 9.- El cromo afecta tanto al  $\psi_w$ ,  $\psi_p$  y  $\psi_\eta$  como al CHR, produciéndose diferencias de comportamiento entre las hojas inferiores y la primera hoja trifoliada.
- 10.- Otro parámetro afectado por el cromo es la elasticidad de las paredes celulares, también de distinta forma en las hojas inferiores y la primera hoja trifoliada. Mientras que en las primeras se produce una disminución en la elasticidad, en la segunda se produce un incremento.
- 11.- En relación con los cambios de elasticidad, el punto de pérdida de turgencia se modifica de tal manera que llega a ser imposible de calcular en la primera hoja trifoliada con los métodos empleados en esta experiencia.
- 12.- Las diferencias observadas en los dos tipos de hojas estudiados podrían ser debidos a diferentes condiciones de exposición al cromo. Mientras que las hojas inferiores ya se hallan desarrolladas antes de ser expuestas al metal, la primera hoja trifoliada está expuesta al mismo desde el inicio de su desarrollo.
- 13.- El efecto del cromo es distinto según el tipo de cultivo empleado, debiéndose ello a la capacidad de adsorción de los distintos sustratos y siendo el efecto más fuerte en cultivo hidropónico líquido.
- 14.- El cromo, a bajas concentraciones, puede provocar un estímulo del crecimiento probablemente debido a un incremento en los solutos en la vacuola que incrementarían el  $\psi_p$ , relacionado con el crecimiento por elongación.
- 15.- También es afectada la transpiración por el cromo, disminuyendo al incrementarse la concentración de cromo en el medio. Relacionado con ello disminuye el grado de apertura estomática, que puede relacionarse con los efectos sobre el K y sobre la morfología y diferenciación estomáticas.

- 16.- El cromo provoca un retraso en la diferenciación de las células, tanto epidérmicas como estomáticas en las hojas trifoliadas de las plantas tratadas con este metal, el cual no es irreversible como pudo comprobarse por el reinicio del desarrollo acometido por plantas tratadas con elevadas concentraciones de cromo y pasadas a condiciones óptimas, sin el metal.
- 17.- Como consecuencia del punto anterior, creemos que sería revisable la afirmación de que P. vulgaris sea una especie sensible al cromo, puesto que a elevadas concentraciones del metal entra en un estado de no desarrollo reversible.

6 B I B L I O G R A F I A

- 1) ALLEN, S.E., GRIMSHAW, H.M., PARKINSON, J.A.: Chemical analysis of ecological materials. Blackwell, Oxford (1974)
- 2) ANDRZJEWSKI, M.: Effect of chromium application on yields of several plants species and on the chromium content of soil. *Roznik Nauk Rolniczych* 97 A, 75-97 (1971)
- 3) AUSTENFELD, F.A.: The effect of Ni, Co and Cr on net photosynthesis of primary and secondary leaves of Phaseolus vulgaris L. *Photosynthetica*, 13: 434-38 (1979)
- 4) BAETJER, A.M.: Chromium. National Academy of Sciences. Washington D. C., 155 pp. (1974)
- 5) BARANOWSKA, H., EJCHART, A., PUTRAMENT, A.: Manganese mutagenesis in yeast. V. On mutation an conversion induction in nuclear DNA. *Mutat. Res.* 42: 343-45 (1977)
- 6) BARBER, S.A.: Influence of the plant root on the ion movement in soil. In "The plant root and its environment". E.W. Carson (ed.), 525-64. Charlottesville Univ. Press. Virginia (1974).
- 7) BARCELO, J., POSCHENRIEDER, CH., GUNSE, B.: Effect of Cr VI on mineral element composition of bush beans. *J. Plant Nut.* 8 (3), 211-17 (1985)
- 8) BARRS, H.D., WEATHERLEY, P.E.: A reexamination of relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves, *Australian J. of Biol. Sci.* 15: 413-28 (1962)
- 9) BARTLETT, R.J., KIMBLE, J.M.: Behaviour of chromium in soils: I. Tri valent forms. *J. Environ. Qual.* 5 (4), 379-88 (1976)
- 10) BARTLETT, R.J., BRUCE, J.: Behaviour of cromium in soils: III. Oxidation. *J. Environ. Qual.* 8(1), 31-35 (1979)

- 11) BERTRAND, D., WOLF, DE A.: Nécessité de l'oligo-élément chrom pour la culture de la pomme de terre. Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences. Série D, Paris, 266: 1494-1495 (1968).
- 12) BLAS, L.: Química toxicológica moderna. Ed. Aguilar S.A. Madrid (1955)
- 13) BOYER, J.S.: Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean and sunflower at various leaf water potentials. Plant Physiol. 46: 233-35 (1970)
- 14) BRAMS, E.A., FISKELL, J.A.: Copper accumulation in citrus roots and desorption with acid. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 772-75 (1971)
- 15) BROWN; J.C., HOLMES, R.S., TIFFIN, L.O.: Hypothesis concerning iron chlorosis. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 23: 231-34 (1959)
- 16) CAPONE, W., MASCIA, C., PORCU, M., TAGLIASACCHI MASALA, L.: Uptake of lead and chromium by primary producers and consumers in a polluted lagoon. Marine Pollution Bulletin, 14, 97-102 (1983)
- 17) CARY, E.E., ALLAWAY, W.H.: Determination of chromium in plants and other biological materials. J. Agric. Food Chem. 19: 1159-61 (1971)
- 18) CARY, E.E., ALLAWAY, W.H., OLSON, O.E.: Control of chromium concentration in food plants, 1. Absorption and translocation of chromium by plants. J. Agric. Food Chem. 25: 300-304 (1977)
- 19) CLARKSON, D.T.: The effect of aluminium and some trivalent metal cationson cell division in the root apices of Allium cepa. Ann. Bot.: 29: 309-51 (1965)
- 20) DANIELS, R.R., STRUCKMEYER, B.E., PETERSON, L.A.: Copper toxicity in Phaseolus vulgaris L. as influenced by iron nutrition. I. An anatomical study. J. Ann. Soc. Hortic. Sci. 97: 249-54 (1972)
- 21) DARRIN, M.: Chromium chemicals—their industrial use. In: Chromium, Vol I, Chemistry of chromium and its compounds, pp. 251-261. Reinhold Publishing Corp., New York (1956)
- 22) DECOCK, D.C., HALL, A., Mac DONALD, M.: A relation between phosphorus to iron and potassium to calcium in mustard leaves. Plant and Soil 12: 128 (1960)

- 23) DOBROLYUBSKII, O.K., VIKTOROVA, G.M.: The effect of chromium on the chemical composition of the grape-vine. *Agrokhimiya* 10: 135-40 (1974)
- 24) EAMUS, D., FENTON, R., WILSON, J.M.: Stomatal behaviour and water relations of chilled Phaseolus vulgaris and Pisum sativum L. *Journal of Experimental Botany*, 34(141): 434-41 (1983)
- 25) EDWARDS, M., MEIDNER, H.: Direct measurements of turgor pressure potentials. IV. Naturally occurring pressures in guard cells and their relation to solute and matric potentials in the epidermis. *J. Exp. Bot.* 30: 829-37 (1979)
- 26) EENIK, A.H., GARRETSEN, G.: Inheritance of intensivity of lettuce to a surplus of exchangeable manganese in steam sterilized soils. *Euphitica* 26, 47-53 (1977)
- 27) ERNST, W.: *Schwermetallvegetation des Erde*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart (1974)
- 28) ESKEW, D.C., WELCH, R.M., CARY, E.E.: Nickel as an essential element for legumes and probably all higher plants. *Science* 222 (4624): 621-22 (1983)
- 29) FOROUGHI, M., HOFFMANN, G., TEICNER, K., VENTER, F.: The effect of increasing levels of cadmium, chromium or nickel in tomatoes in nutrient solution. In *Stand und Leistung Agriculturnchemischer und Agrobiologischer Forschung XXX* (Kangrressband, 1979)
- 30) FOY, C.D.: Manganese and plants. In *Manganese*, pp 51-76, Washington D. L. Natl. Acad Sci., Nat Res. Counc. 191 pp (1973)
- 31) FOY, C.D., CHANEY, R.L., WHITE, M.C.: The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 511-66 (1978)
- 32) FOY, C.D., FLEMING, A.L.: The physiology of plant tolerance to excess available aluminium and manganese in acid soils. Presented at Symp. on Crop Tolernace to Sub-Optimal Land Conditions. ASA Meet., Houston, 1976 (1978)

- 33) FOY, C.D., FLEMING, A.L., GERLOFF, G.C.: Differential aluminium tolerance in two snapbean varieties. *Agron. J.* 65: 123-26 (1973)
- 34) FREEDMAN, B., HUTCHINSON, T.C.: Sources of metal and elemental contamination of terrestrial environments. In: *Effect of heavy metal pollution on plants*. Vol. II: Metals in the environment, pp 35-94; N.W. Lepp (ed). Applied Science Publ., London, New Jersey (1981)
- 35) FUHRER, J.: Cadmium-induced change in water economy in leaf tissues of beans: Involment of ethylene formation. *Plant Physiol.* 67: 3-55 (1981)
- 36) GAUGLHOFFER, J.: *Chrom. En Metalle in der Umwelt*. E. Merian (ed), pp. 409-421. Verlag Chemie Weinheim (1984)
- 37) GLINSMANN, W.H., FELDMAN, F.J., MERTZ, W.: Plasma chromium after glucose administration. *Science* 152: 1243-1245 (1966)
- 38) GLOSER, J.: Some problems of the determination of stomatal aperture by the microrelief method. *Biologia Plantarum* 9: 28-33 (1967)
- 39) GUNSE, B.: *Estudi d'alguns efectes fitotòxics del crom en Phaseolus vulgaris*. Tesina de Licenciatura. 167 pp. Bellaterra (1984)
- 40) HAAS, A.R.C., BRUSKA, J.N.: Effects of chromium on citrus and avocado grown in nutrient solutions. *California Agriculture* 15: 10-11 (1961)
- 41) HALVORSEN, A.D., LINDSAY, W.L.: Equilibrium relationships of metal chelates in hydroponic solutions. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 36: 755-61 (1972)
- 42) HAMBIDGE, K.M., ROGERDSON, D.O.: Comparison of the hair chromium levels of nulliparous and parous women. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 103: 320-27 (1969)
- 43) HANŮS, J.: Following the effects of chromium III on young plants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Pol'nohospodárstvo* 26, 13-19 (1980)
- 44) HAPKE, H.J.: Metallobelastung von Futter-und lebensmitteln akkumulatio<sub>n</sub>en in der nahrungskatte. En: *Metalle in der Umwelt*, E. Merian (ed.) pp 35-43; Verlag Chemie Weinheim (1984)

- 45) HARA, T., SONADA, Y., IWAY, I.: Growth response of cabbage plants to transition elements under water culture conditions. I. Titanium, vanadium, chromium, manganese and iron. *Soil Sci. and Plant Nutr.* 22: 307-15 (1976)
- 46) HAUGHTON, P.M., SELLEN, D.B., PRESTON, R.D.: Dynamic mechanical properties of the cell wall of Nitella opaca. *J. Exp. Bot.* 19: 1-12 (1968)
- 47) HENSON, I.E., ALAGARSWAMY, G., MAHALAKSHMI, V., BIDINGER, F.R.: Stomatal response to water stress and its relationship to bulk leaf water status and osmotic adjustment in pearl millet (Penisetum americanum [L.] Leeke). *J. Exp. Bot.* 34 (141): 442-50 (1983)
- 48) HINCKLEY, T.M., DUHME, F., HINCKLEY, A.R., RICHTER, H.: Water relations of drought hardy shrubs: osmotic potential and stomatal reactivity. *Plant cell Environ.* 3: 131-40 (1980)
- 48) HOWELER; R.H., CADAVID, L.F.: Screening of rice cultivars for tolerance to Al-toxicity in nutrient solutions as compared with a field screening method. *Agron. J.* 68: 551-55 (1976)
- 49) HUFFMAN, E.W.D., Jr., ALLAWAY, W.H.: Chromium in plants: Distribution in tissues, organelles and extracts, and availability of bean leaf chromium to animals. *J. Agric. Food Chem.* 21: 982 (1973)
- 50) HUFFAMN, E.W.D., Jr., ALLAWAY, W.H.: Growth of plants in solution culture containing low levels of chromium. *Plant Physiol.* 52, 72-75 (1973)
- 51) JAMES, B.R., BARTLETT, R.J.: Behaviour of chromium in soils: V. Fate and organically complexed Cr (III) added to soil. *J. Environ. Qual.* 12 (2), 169-72 (1983)
- 52) JAMES, B.R., BARTLETT, R.J.: Behaviour of chromium in soils: VI. Interactions between oxidation-reduction and organic complexation. *J. Environ. Qual.* 12(2): 173-76 (1983)
- 53) JAMES, B.R., and BARTLETT, R.J.: Behaviour of chromium in soils: VII. Adsorption and reduction of hexavalent forms. *J. Environ. Qual.* 12 (2): 177-81 (1983)

- 54) JONES, H.G.: Plants and microclimate. Cambridge University Press, Cambridge (1983)
- 55) JONES, L.P.H.: The fate of heavy metals. In: The chemistry of soil processes. pp. 593-620. D.J. Greenland, M.B.H. Hayes, John Willey & Sons. Avon (1981)
- 56) JORMA KUMPULAINEN: Chromium in food and diets. Proceedings of a Nordic Symposium on Soil-Plant-Animal-Man Interrelationships and Implications to Human Health. Part I. 263-78 Helsinki (1981)
- 57) KASHIRAD, A., MARSCHNER, H.: Iron nutrition of sunflowers and corn plants in mono and mixed culture. Plant and Soil. 41, 91-101 (1974)
- 58) KIM, J.H., LEE-STADELMANN, O.Y.: Water relations and cell wall elasticity quantities in Phaseolus vulgaris leaves. J. Exp. Bot., 35, 841-58 (1984)
- 59) KIRKHAM, M.B.: Water relations of cadmium treated plants. J. of Environ. Qual. 7, 334-36 (1978)
- 60) KLEBS, G.: Beiträge zur physiologie der pflanzenzelle. Vinters. Botan. Inst. Tübingen (Pfeffer) 2: 558 (1988). Citado en
- 61) KLIMASHEVSKII, E.L., BEREZOVSKII, K.K.: Genetic resistance of plants to ionic toxicity in the root zone. Sov. Plant. Physiol. 20: 51-54 (1973)
- 62) KLIMASHEVSKII, E.L., BERNATSKAYA, M.L.: Activity of ATPase and acid phosphatase in growth zones of the roots of two varieties of peas having different sensitivity to Al-ion toxicity. Sov. Plant Physiol. 20: 201-4 (1973)
- 63) KOC, J., KREFFT, L., MAZUR, T.: Investigations into the fertilizing value of tannery sludges. I. Chemico-physical characteristics of sludges. Rozniki Gleboznawere 27: 107-22 (1976)
- 64) KOENIG, P.: Studien über die stimulierenden und toxischen wirkungen der verschiedenwertigen. Chromverbindungen auf die Pflanzen. Landwirtschaftl. Jahrb. 39: 775-916 (1910)

- 65) KREEB, K.: Hydrature and plant production. In: Whitehead F.W., Rütten, A.J. (eds.). The water relations of plants. Blackwell, Oxford, pp 272-88 (1963)
- 66) LAFEVER, H.M., CAMPBELL, L.G., FOY, C.D.: Differential response of wheat cultivars to Al. Agron. J. 69: 563-68 (1977)
- 67) LAHOUTI, M., and PETERSON, P.J.: Chromium accumulation and distribution in crop plants. J. of the Sci. of Food and Agric. 30: 136-42 (1979)
- 68) LAMOREAUX, R.J.: Growth and water movement in silver maple seedlings affected by cadmium. J. Environ. Qual. 6 (2): 201-5 (1977)
- 69) LANG, K.: Wasser, mineralstoffe, superenelemente. Dietrich Skinkopff Verlag, Darmstadt, UTB Serie 341, 138 pp. (1974)
- 70) LANGARD, S., NORSETH, T.: Chromium. En: L. Friberg, G.F. Nordberg y V. B. Vouk (eds). Handbook of the toxicology of metals. pp 283-397. Elsevier/North Holland, Biochemical Press, Amsterdam (1979)
- 71) LEWIS, R.J., TATKEN, R.L. (eds.): Registry of toxic effects of chemical substances 1979. Vol. 1. p. 426. Natl. Institute for Occupational Safety and Health. Washington D.C. (1980)
- 72) LIM, M.y.: Trace elements from coal combustion atmospheric emissions. Report n° ICTIS/TROS; Intern Energy Agency Coal Research, London (1979)
- 73) LOPEZ, A., METZGLER, R., KONZAK, W.E., MOORE, D.P.: Reactions of differential levels of aluminium concentrations in wheat, rye and their contributions to the tolerance in triticale. Crop Sci. Abstr. Wheat Soc. 11 (1976)
- 73) LUDLOW, H.M.: Adaptive significance of stomatal response to water stress. In: Turner, N.C., Kramer, P.J. (eds.). Adaptation of plants to water and high temperature stress. Wiley and Sons, New York, pp. 123-38 (1980)
- 74) MATSUMOTO, H., MORIMURA, S., TAKAHASHI, E.: Less involvement of pectin in the precipitation of aluminium in pea root. Plant Physiol. 18: 325-35 (1977)

- 75) MARSCHNER, H.: En Inorganic Plant Nutrition. Encyclopedia of Plant Physiology. Nero Series. Vol 15A, pp. 23-29 (1983)
- 76) MENGEL, k., KIRKBY, E.A.: Chromium. In: Principles of plant nutrition, ed. International Potash Institute, Berna, Suiza, 514-515 (1979)
- 77) MERTZ, W.: Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol. Rev.* 49: 163-239 (1969)
- 78) MERTZ, W: Biological role of chromium. *Fed. Proc.* 26: 186-193 (1967)
- 79) MERTZ, W., ROGINSKI, E.E.: Effects of chromium (III) supplementation on growth and survival under stress in rats fed low protein diets. *J. Nutr.* 97: 531-536 (1969)
- 80) MERTZ, W., SCHWARTZ, K.: Relation of glucose tolerance factor to impaired glucose tolerance factor in rats on stock diets. *Ann. J. Physiol.* 196: 614-18 (1959)
- 81) MISRA, S.G., JAISWAL, P.C.: Absorption of Fe by spinach on chromium (VI) treated soil. *J. Plant Nutrition* 5 (4-7): 755-60 (1982)
- 82) MOORE, J.W., RAMAMOORTHY, S.: Heavy metals in natural waters. Chromium, pp 58-76. Springer Verlag, Berlin, Heildelberg, New York (1984)
- 83) MUGWIRA, L.M., PATEL, S.Y.,: Root zone pH changes and ion uptake by triticale , wheat and ryce. *Agron. J.* 69: 719-22 (1977)
- 84) MUKHERJI, S., ROY, B.K.: Toxic effects of chromium on germinating seedlings and potato tuber slices. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 171, 235-238 (1977)
- 85) NIEBOER, E., RICHARDSON, D.H.S.: The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ion. *Environ. Pollut. Ser. B* 1: 3-26 (1980)
- 86) OMASA, K., ONOE, M.: Measurement of stomatal aperture by digital image processing. *Plant & Cell Physiol.* 25 (8): 1379-88 (1984)
- 87) PETIT, C.M., RUGOET, A., MITTENAERE, C.: Stimulation of Cd uptake in relation to the Cd content of plants. *Plant Physiol.* 62, 554-557 (1978)

- 88) PFEIFFER, W.C., FISZMAN, M., CARBONELL, N.: Fate of chromium in a tributary of the Irajá river, Rio de Janeiro. Environ. Pollut. Serie B 1: 117-126 (1980)
- 89) PICHI-SERMOLI, R.: Flora e vegetazione delle serpentine e delle altri ofioliti dell'alta valle del Tevere (Toscana)= Webbia, 6: 380 (1948)
- 90) POSCHENRIEDER, CH.: Aspectos fisiológicos de la fitotoxicidad por manganeso en Phaseolus vulgaris. Tesis doctoral. Servicio de reprografía de la Universidad Complutense de Madrid. Madrid (1981)
- 91) PRATT, P.F.: Chromium. In: Diagnostic criteria for plants and soils. Ed. H.D. Chapman. University of California, Riverside. pp. 136-41 (1966)
- 92) PROCTOR, J., WODELL, S.R.J.: The plant ecology of serpentine III. The influence of high magnesium/calcium ratio and high nickel and chromium levels in some British and Swedish serpentine soils. J. Ecol. 59: 827-42 (1971)
- 92) PUTRAMENI, H., BARANOWSKA, H., EJCHART, A., JACHYMCZYK, W.: Manganese mutagenesis in yeast. VI.  $Mn^{2+}$  uptake, mitochondrial DNA replication and  $E^F$  induction, comparison with other divalent cations. Mol. Gen. Genet. 151: 69-76 (1977)
- 93) ROHATGI, N.K., CHEN, K.Y.: Transport of trace metals by suspended particulates on mixing with seawater. J. Water Pollut. Control Fed. 47: 2298-2316 (1975)
- 94) SCHAUMLÖFFEL, E.: Über die colorimetrische Bestimmung der micronährstoffe Kupfer, Zink, Kobalt, Mangan, Eisen und Molybdän aus einer Aschenlösung durch fraktionierende Extraktion. Landw. Forsch. 13: 278 (1965)
- 95) SCHLATTER, C., KISSLING, U. Beiträge gerichtliche Medizin 30: 382-88 (1973)
- 96) SCHOLANDER, P.F., BRADSTREET, E.D., HAMMEL, H.T., HEMMINGTON, E.A.: Sap concentration in halophytes and other plants. Plant Physiol. 41: 529-32 (1966)
- 97) SCHOLANDER, P.F., HAMMEL, H.T., BRADSTREET, E.D., HEMMINGSEN, E.A.: Sap pressure in vascular plants. Science 148: 339-46 (1965)

- 98) SCHOLANDER, P.F., HAMMEL, H.T., HEMINGSSEN, E.A., BRADSTREET, E.D.: Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 52: 119-25 (1964)
- 99) SCHROEDER, H.A.: The role of chromium in mammalian nutrition. Amer. J. Clin. Nutr. 21: 230-44 (1968)
- 100) SCHROEDER, H.A.: The trace elements and nutrition. Faber & Faber. London (1976)
- 101) SCHROEDER, H.A., NANASON, A.P., TIPTON, I.H.: Chromium deficiency as a factor of arteriosclerosis. J. Chron. Dis. 23: 123-42 (1970)
- 102) SETO, P., DEANGELIS, P.: Concepts of sludge utilization on agricultural land. In Sludge utilization and disposal conference. Proceedings n° 6, Environment Canada, Ottawa. pp. 138-55 (1978)
- 103) SILVA, S., BEGHI, B.: Problems nutrient in the use of organic fertilizers containing chromium. Annali della Facolta de Agraria dell'Università Cattolica del Sacro Cuore 19 (1): 31-45 (1978)
- 104) SILVA, S. BEGHI, B.: The use of chromium containig organic manures in rice fields. RISO 28 (2): 105-13 (1979)
- 105) SHEWRY, P.R., PETERSON, P.J.: The uptake of chromium by barley seedlings (Hordeum vulgare L.). J. Exp. Bot. 25: 785-97 (1974)
- 106) SILLEN, L.G., MARTELL, A.E.: Stability of ion complexes. Supplement n° 1, Special publication n° 25. The chemical Society. London (1971)
- 107) SKEFFINGTON, R.A., SHEWRY, P.R., PETERSON, P.J.: Chromium uptake and transport in barley seedlings (Hordeum vulgare L.) Planta 132: 209-214 (1976)
- 107) STADELMANN, E.J.: The derivation of the cell wall elasticity function from the cell turgor potential. J. Exp. Bot. 35: 859-68 (1984)
- 108) SUTCLIFFE, J.F., BAKER, D.A.: Las plantas y las sales minerales. Ed. Omega S.A. Barcelona (1979)

- 109) TAYLOR, S.A., SLATYER, R.O.: Proposals for a unified terminology in studies of plant-soil water relationships. Proceedings of the Madrid Symposium on Plant-Water Relationships in Arid and Semiarid conditions. Arid Zone Res. 16: 339-49 (1961)
- 110) TIFFIN, L.O.: Translocation of micronutrients in plants. 199-229. In Micronutrients in agriculture. Soil Sci. America Inc. Madison (1972)
- 111) TIFFIN, L.O.: The form and distribution of metals in plants: An overview. In Biological implications of metals in the environment. pp. 315-34. Proc. 15th. Ann. Hanford Life Sci. Symp. ER-DA-TIC-Conf. No. 750929. Oak Ridge. Tenn. (1977)
- 112) TURNER, M.A., RUST, R.H.: Effects of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35: 755-58 (1971)
- 113) TYREE, M.T., JARVIS, P.G.: Water in tissues and cells. In Encyclopedia of Plant Physiology New Series. Volume 12B. O. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler Ed. Springer Verlag. Berlin, New York (1982) pp. 36-77
- 114) VANSELOW, A.P.: Nickel. In Diagnostic criteria for plants and soils. pp. 302-9. H.D. Chapman ed. Univ. of Calif. Div. of Agric. Sci., Riverside (1966)
- 115) VAZQUEZ, M.D., POSCHENRIEDER, Ch., BARCELO, J.: Chromium vinculated structural and ultrastructural changes in bush bean plants (Phaseolus vulgaris L.). Annals of Botany (En prensa)
- 116) VINTERS, H., DAINY, J., TYREE, M.T.: Cell wall elastic properties of Chara corallina. Can. J. Bot. 55: 1933-39 (1977)
- 117) WALTER, H.: Water economy and the hydrature of plants. Annu. Rev. Physiol. 6: 239-52 (1955)
- 118) WARING, R.H., CLEARY, B.D.: Plant moisture stress: evaluation by pressure bomb. Science 155: 1248-54 (1967)
- 119) WARREN WILSON, J.: The components of leaf water potential I. Osmotic and matric potentials. Aust. J. Biol. Sci. 20: 329-47 (1967)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BARCELONA **UAB**

BIBLIOTECA 862

REG. 13.452

SIG. ....