

~~T. Proo. 23/104~~
T 8-8

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



**Influencia del régimen térmico sobre
fitoacumulación de micronutrientes
esenciales y otros elementos en plantas
de col china (*Brassica pekinensis* (Lour) Rupr.)**

REPOSICIÓN DE TEXTO
C. A. - Y. A. 3.3.3.
N.º de Expediente: 61338207X
N.º de Registro: 11593018X

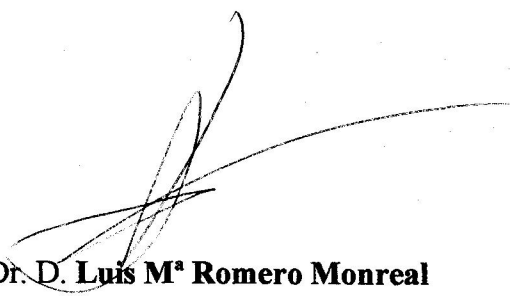
Diego Ángel Moreno Fernández

TESIS DOCTORAL

GRANADA, JULIO 2000


El presente trabajo de investigación titulado: “**Influencia del régimen térmico sobre fitoacumulación de micronutrientes esenciales y otros elementos en plantas de col china (*Brassica pekinensis* (Lour) Rupr.)**”, que presenta el *Licenciado D. Diego Ángel Moreno Fernández*, para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, se ha realizado en el Departamento de Biología Vegetal en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo la dirección del Profesor Dr. D. *Luis María Romero Monreal*.

UNIVERSIDAD DE GRANADA Facultad de Ciencias
Fecha <u>11/7/00</u>
ENTRADA NUM. <u>2230</u>



Prof. Dr. D. Luis Mª Romero Monreal
Director de la Tesis Doctoral
Profesor Titular de la Universidad de Granada.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
03 JUL. 2000
COMISION DE DOCTORADO



D. Diego Ángel Moreno Fernández
Aspirante al Grado de Doctor en
Ciencias Biológicas

Granada, Julio de 2000

A mis padres, por todo

A Marian, quien recogerá las sonrisas de mi alma

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento:

En primer lugar, al **Dr. Luis M^a Romero Monreal**, como Director y Tutor, por sus consejos y orientaciones, tanto en el ámbito de la formación académica, como en mi propio desarrollo personal, y lo más importante, su sinceridad y apoyo para que este trabajo se llevara a cabo. Espero que tras esta etapa inicial en la investigación, mantengamos esta relación tanto profesional como personal, pues ha sido y siempre será maestro y amigo.

A la Dra. **Inmaculada López-Cantarero Ballesteros** y al Dr. **Juan Luis Valenzuela Manjón-Cabeza**, por su confianza y apoyo en mi trabajo. Muchas gracias.

A la Dra. **M^a Gemma Villora Gómez**, por su amistad, y por su disposición y ayuda constantes durante la realización de este trabajo, tanto en el laboratorio, como en el escritorio. Muchas gracias de todo corazón.

A **Gregoria Pulgar López**, amiga y compañera, por iniciarme y ayudarme en las técnicas analíticas y por su apoyo. Muchas gracias.

Al Dr. **Juan Manuel Ruiz Sáez**, compañero del grupo de investigación, y amigo desde mucho tiempo antes, por su disposición y por que su ayuda y conocimientos siempre han sido un gran apoyo. Muchas gracias.

A mis compañeros, **Rosa Rivero, Mourad Baghour, Luis Ramón López-Lefebre, Pablo García y Esteban Sánchez**, pertenecientes al grupo de investigación de Nutrición Vegetal, del que formo parte, por sus muestras de apoyo, muchas gracias.

A **Bendición Funes**, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por su labor con las técnicas de análisis y por su trabajo. Gracias.

A **Marian Sánchez**, por estar conmigo en todos los momentos, los buenos y los no tan buenos, por su apoyo y por la confianza e ilusión que siempre ha tenido en mi trabajo. Gracias por todos estos años y por darme esperanza en el futuro.

A mis padres, **Diego y Sacramento**, por su cariño y por su gran esfuerzo para que yo llegue hasta aquí. Mi eterno agradecimiento de todo corazón.

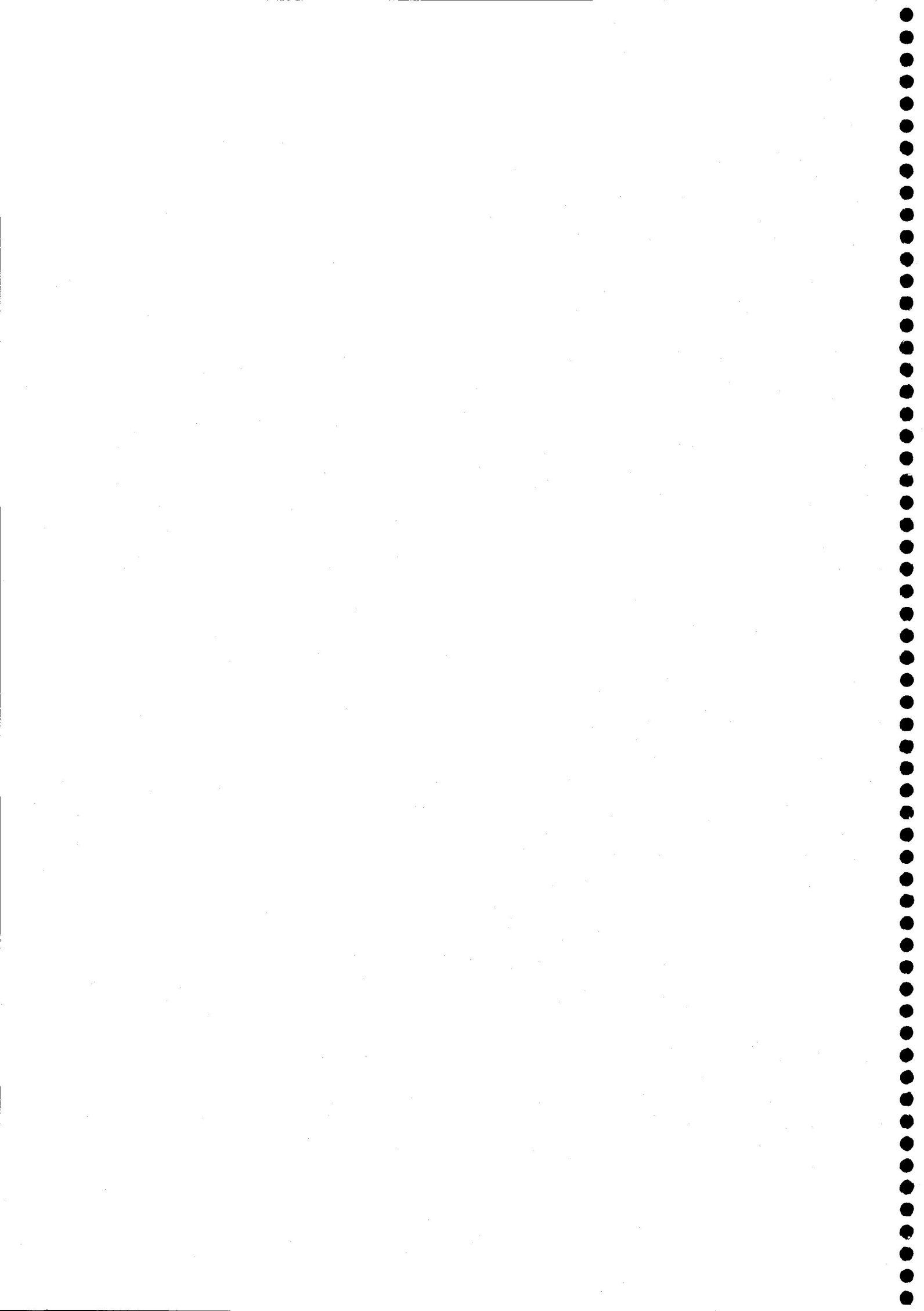
Al resto de mi familia y a mis amigos, por su interés, gracias a todos.

*La verdadera medida de nuestra valía
se compone de todos los beneficios
que los demás han obtenido de
nuestro éxito.*

Cullen Hightower



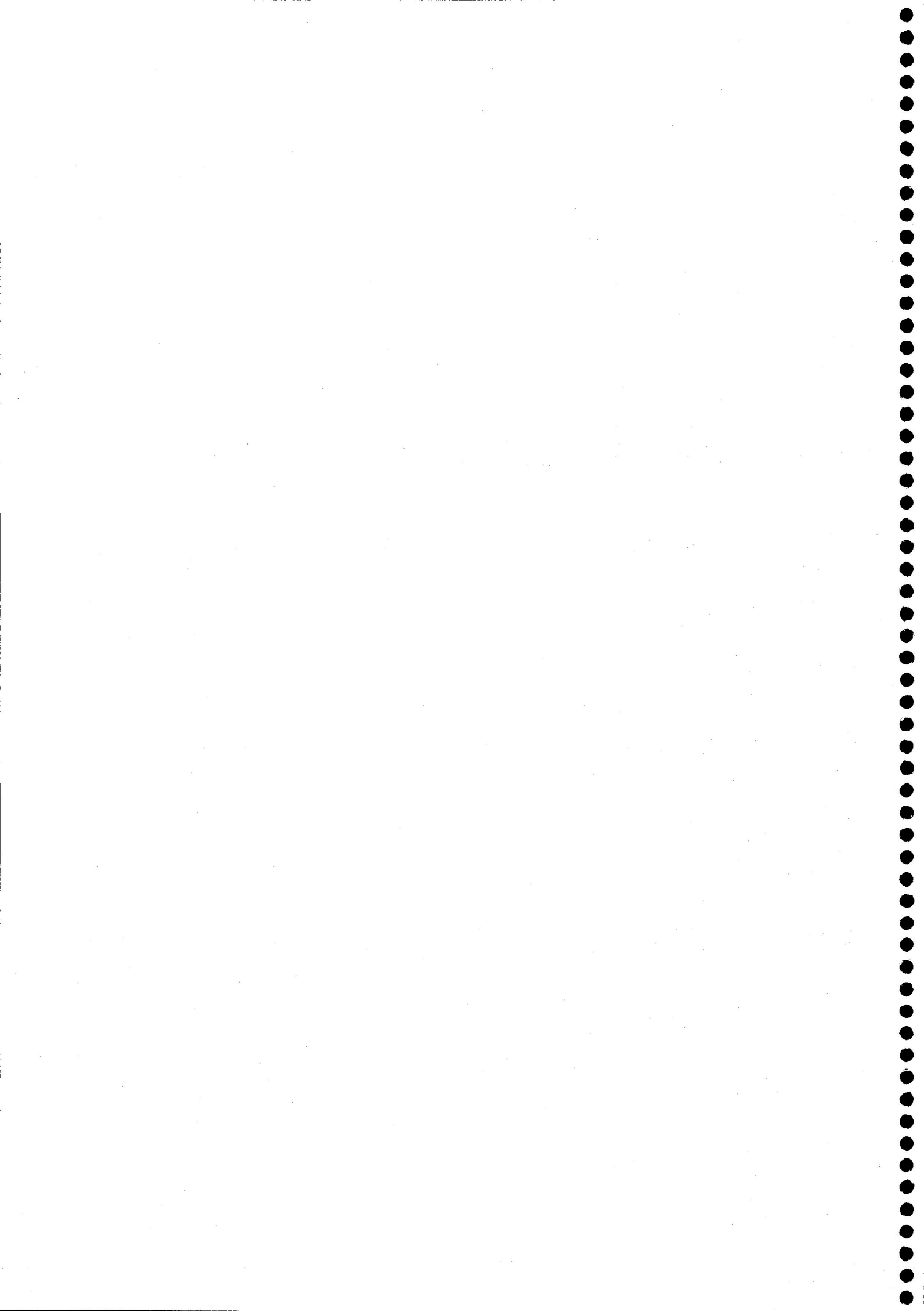
ÍNDICE



	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. TÉCNICA DE CULTIVO SEMIFORZADO “CUBIERTAS FLOTANTES”.....	9
1.1.1. Características y usos de las “cubiertas flotantes”.....	9
1.1.2. Influencia del régimen térmico bajo “cubiertas flotantes” sobre la producción de los cultivos.....	12
1.2. EFECTOS DE LOS FACTORES MEDIOAMBIENTALES SOBRE LA ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE MICRONUTRIENTES Y OTROS ELEMENTOS.....	22
1.3. METALES PESADOS Y INTENTOS DE CLASIFICACIÓN.....	36
1.4. TOXICIDAD POR METALES Y ELEMENTOS CONTAMINANTES.....	37
1.4.1. Aspectos ecológicos de la tolerancia a elementos tóxicos.....	42
1.4.2. Estrategias para la tolerancia y acumulación de elementos tóxicos.....	45
1.5. FITORREMEDIACIÓN.....	48
1.5.1. Introducción: <i>Biorremediación</i>	48
1.5.2. Biorremediación con plantas superiores: <i>Fitorremediación</i>	51
1.5.2.1. Fitoextracción de metales.....	54
1.5.2.1.1. Fitoextracción inducida.....	54
1.5.2.1.2. Fitoextracción continua.....	57
1.5.2.1.3. Mecanismos de resistencia a metales de interés en fitoextracción.....	62
1.5.2.1.3.1. Quelación.....	62
1.5.2.1.3.2. Compartimentación.....	64
1.5.2.1.3.3. Biotransformación.....	66
1.5.2.1.3.4. Mecanismos reparadores celulares.....	67
1.5.2.1.4. Biodisponibilidad de un metal, absorción radical y acumulación en parte aérea.....	67
1.5.2.2. Fitovolatilización de elementos.....	70
1.5.2.3. Fitorremediación de contaminantes orgánicos.....	71
1.5.2.3.1. Absorción directa y metabolismo de los contaminantes orgánicos.....	74
1.5.2.3.2. Fitorremediación <i>ex planta</i>	77
1.5.3. Conclusiones: del laboratorio al campo.....	78
2. OBJETIVOS.....	81
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	85
3.1. ESPECIE VEGETAL UTILIZADA.....	87
3.2. SIEMBRA Y TRANSPLANTE.....	88
3.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS PARCELAS EXPERIMENTALES.....	88

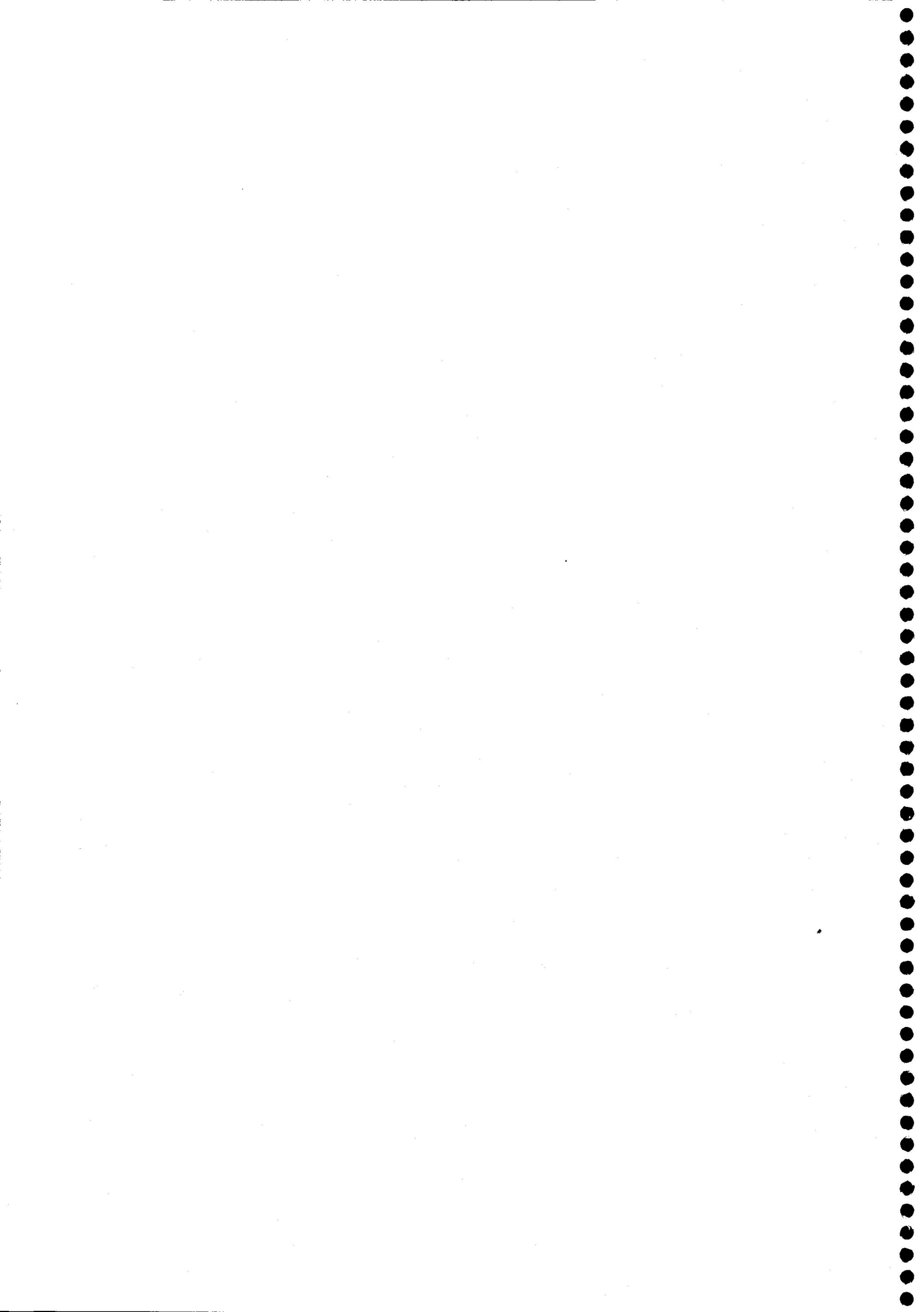
3.4. TRATAMIENTOS.....	88
3.5. FERTILIZACIÓN E IRRIGACIÓN.....	89
3.6. PARÁMETROS CLIMÁTICOS.....	90
3.7. ANÁLISIS DEL SUELO.....	90
3.7.1. Análisis físico granulométrico de las muestras de suelo.....	91
3.7.2. Análisis químico de las muestras de suelo.....	91
3.8. ANÁLISIS DEL AGUA DE RIEGO.....	93
3.9. MUESTREO, PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS VEGETALES.....	94
3.9.1. Análisis del material vegetal fresco.....	95
3.9.1.1. Pigmentos foliares.....	95
3.9.1.2. Fenoles.....	97
3.9.1.3. Acidez iónica.....	97
3.9.1.4. Ácido cítrico.....	97
3.9.1.5. Ácido ascórbico.....	98
3.9.1.6. Actividades enzimáticas.....	98
3.9.1.6.1. Ácido ascórbico oxidasa.....	98
3.9.1.6.1.1. Ácido ascórbico oxidasa inicial.....	98
3.9.1.6.1.2. Ácido ascórbico oxidasa inducida con Cu.....	98
3.9.1.6.2. Catalasa.....	99
3.9.1.6.3. Nitrato reductasa <i>in vivo</i>	99
3.9.1.6.3.1. Nitrato reductasa basal.....	99
3.9.1.6.3.2. Nitrato reductasa inducida con NO ₃	100
3.9.1.6.3.3. Nitrato reductasa inducida con Mo.....	100
3.9.1.6.3.4. Nitrato reductasa inducida con NO ₃ y Mo.....	100
3.9.1.6.4. Peroxidasa.....	100
3.9.1.6.5. Polifenol oxidasa.....	101
3.9.1.6.6. Ribonucleasa.....	101
3.9.1.6.6.1. Ribonucleasa basal.....	101
3.9.1.6.6.2. Ribonucleasa inducida con Zn.....	102
3.9.1.6.7. Ureasa.....	102
3.9.2. Análisis del material vegetal seco.....	103
3.9.2.1. Mineralización por vía húmeda con ácido nítrico.....	103
3.9.2.1.1. Determinación de la forma total de los elementos.....	103
3.9.2.2. Determinación de la forma soluble de los elementos.....	105

3.9.2.2.1. Extracción en medio ácido.....	105
3.9.2.2.2. Extracción en medio acuoso.....	105
3.9.2.3. Hidratos de carbono no estructurales.....	105
3.9.2.4. Fracciones de pectinas.....	106
3.9.2.5. Fracciones de paredes celulares.....	108
3.9.2.6. Aminoácidos totales.....	111
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	112
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
4.1. PARÁMETROS AMBIENTALES.....	115
4.1.1. Temperatura.....	115
4.1.2. Humedad relativa.....	121
4.1.3. Radiación solar.....	123
4.1.4. Análisis del suelo.....	126
4.1.4.1. Análisis físico.....	126
4.1.4.2. Análisis químico.....	127
4.1.5. Agua de Riego.....	132
4.2. BIOMASA Y CALIDAD DEL CULTIVO.....	137
4.2.1. Biomasa y cosecha.....	137
4.2.2. Acidez iónica, ácido cítrico y ácido ascórbico.....	141
4.2.3. Hidratos de carbono.....	144
4.3. MICRONUTRIENTES Y OTROS ELEMENTOS, SU CONCENTRACIÓN Y ACUMULACIÓN Y RELACIONES CON ALGUNOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS.....	152
4.3.1. Fe y Mn.....	152
4.3.2. Mo.....	164
4.3.3. Ni y Co.....	175
4.3.4. B, Ag, Al, Si y Ca.....	186
4.3.5. Cr, As, Sb y Se.....	201
4.3.6. Cd, Cu, Pb y Zn.....	215
4.3.7. Ba, Cl, Rb y Sn.....	233
5. CONCLUSIONES.....	245
6. BIBLIOGRAFÍA.....	249



1.

INTRODUCCIÓN



1.- INTRODUCCIÓN

1.1. - TÉCNICA DE CULTIVO SEMIFORZADO “CUBIERTAS FLOTANTES”.

1.1.1. – Características y usos de las “cubiertas flotantes”.

El término “forzado” o “protegido” implica la producción mediante técnicas distintas a las naturales, dentro de las cuales se incluyen los cultivos sin suelo e hidropónicos, la aplicación de fitoreguladores, etc. Sin embargo, éste término suele restringirse a aquellas técnicas de protección climática que posibilitan una cosecha más precoz o más tardía (Maroto, 1993). Habitualmente, el cultivo es protegido en sus primeros estadios de desarrollo, cuando se pretende adelantar su ciclo natural, pero también puede utilizarse en etapas más adelantadas cuando lo que se pretende es alargar o retrasar dicho ciclo. Cuando este sistema de protección se aplica solamente en algunas fases del cultivo, se habla de “semiforzado” (Hernández et al., 1996).

La técnica de protección consiste en la colocación de una pantalla o cubierta que altera los intercambios energéticos entre las plantas y el medio que las rodea. Según la posición de ésta respecto al cultivo pueden diferenciarse cuatro tipos de semiforzados (Wittwer y Castilla, 1995): acolchado de suelos (cubierta sobre el suelo, bajo las partes aéreas de las plantas), cortavientos (pantalla lateral al cultivo), pequeño túnel (cubierta sobre el cultivo, sin entrar en contacto con él), cubierta flotante (cubierta sobre el cultivo, entrando en contacto con él) (Lamont, 1996; Wang et al., 1998). Según Wells y Loy (1985), una “cubierta flotante” es “una cubierta flexible y transmisiva a la radiación, instalada sobre una o múltiples líneas de cultivo, soportada o no por arcos, para mejorar el crecimiento y rendimiento de las plantas”. Esta definición incluiría a las cubiertas flotantes (del inglés *floating mulch*) y al pequeño túnel (*row cover* o *low tunnel*) en función de la ausencia o presencia de elementos de soporte. En un sentido más amplio, las cubiertas flotantes pueden definirse como la colocación sobre un cultivo de una lámina flexible de plástico perforado, velo permeable o malla, que altera las condiciones microclimáticas del entorno protegido, al generar un efecto de túnel y cortavientos. La lámina puede estar apoyada en el cultivo, que la eleva con su crecimiento o bien puede adoptar una disposición plana, fijándola en caballones y dejando una pequeña cámara de cultivo (Grierson, 1995; Wurr y Fellows, 1998).

El uso de esta técnica en los países del área mediterránea está poco extendido, salvo en el caso de Francia, donde alcanza unas 8.000 ha (Castilla y Hernández, 1994), precisamente lejos del litoral mediterráneo, siendo su uso más común en países del centro y este de Europa así como en Inglaterra, donde la superficie cubierta con esta técnica se cifró en más de 8.000 ha en 1.988 (Greenfield, 1989). Gerst (1993), estimó para 1990, una superficie europea de 40.500 hectáreas. En España su utilización es muy escasa en el cultivo al aire libre, siendo utilizada fundamentalmente en semilleros e invernaderos para limitar los ataques de insectos, especialmente de los vectores de virosis como áfidos, trips y otros (Avilla et al., 1997).

Los principales materiales de cubierta utilizados se agrupan en 4 familias: poliolefinas (polietileno y polipropileno fundamentalmente); y copolímeros de etileno-acetato de vinilo (EVA); poliamidas; y poliésteres saturados o lineales (tereftalato de polietilenglicol o PET). La síntesis de los dos primeros tipos de material plástico se realiza por un proceso de polimerización por unión de monómeros sin eliminar ningún residuo de síntesis. Todos los materiales pertenecientes a esta familia de las poliolefinas son menos densos que el agua y pueden constituirse en 3 tipos de materiales: láminas de polietileno de alta y baja densidad, velos de polipropileno y mallas o copolímeros de acetato de vinilo (Robledo y Martín, 1988). Los componentes de las dos siguientes familias sufren un proceso de policondensación o poliadición, mediante el cual se unen grupos funcionales diferentes, que generan como residuos agua, amoníaco, ácido clorhídrico, etc. (Macca, 1992; Adrianova y Pakhomov, 1997).

El polietileno es un material incoloro, flexible y muy resistente a la corrosión. Se oxida fácilmente con el oxígeno del aire y se degrada por la acción de los rayos ultravioleta de la luz solar, por cuya razón se le añaden antioxidantes y absorbentes de la radiación ultravioleta. El mejor absorbente de esta radiación es el negro de humo. Arde con llama luminosa y desprende olor a cera. Se fabrican para comercialización dos tipos de polietileno: de baja densidad (0.91 - 0.93) y de alta densidad (0.94 - 0.96). A mayor densidad se corresponden mejores cualidades mecánicas, mientras que la flexibilidad crece en razón inversa de la densidad (Nerin et al., 1996). El polietileno de baja densidad se utiliza preferentemente en la fabricación de láminas o filmes (cubiertas flotantes, recubrimiento de túneles, invernaderos, etc.) y tuberías. Existen distintos tipos comercializados de filmes de polietileno (transparente, negro, normal, especial térmico, extrabaja densidad, térmico de larga duración, etc.) que difieren en su aspecto y características. El polietileno de alta densidad es más frágil a temperaturas inferiores a 0 °C y se utiliza preferentemente para la fabricación de tuberías para conducir el agua (Fuentes, 1992).

Las láminas de polietileno deben perforarse para que puedan ser permeables y permitir la ventilación, el intercambio gaseoso, así como los riegos. Puede considerarse como lámina estándar aquella de 50 μ de espesor con 500 perforaciones de 1 cm de diámetro por metro cuadrado (lo que supone un 4% de superficie perforada). En lugares de fuertes vientos se suele duplicar el número de perforaciones (Hernández et al., 1996).

Los velos de polipropileno son materiales no tejidos, constituidos mediante un proceso industrial denominado termosoldado, del inglés "*spunbonded*", el cual se divide en 4 fases (Gregoire, 1989): i) homogeneización y mezclado del polímero con sus posibles aditivos; ii) extrusión y enfriado. Se obtienen filamentos de diámetro inferior a 20-25 μ ; iii) distribución de filamentos en láminas de la forma más isotrópica posible; y iv) termosoldado de los filamentos.

Una lámina de 1 m² de polipropileno de 17 g·m⁻² de peso, contiene hasta 1500 filamentos, que alineados alcanzarían unos 50 kilómetros de longitud. Debido a su configuración espacial ordenada, el polipropileno es muy cristalino y por tanto su punto de fusión es muy elevado (164 – 170 °C), además de poseer gran rigidez y dureza superficial. La resistencia intrínseca de los filamentos, unida a la que suministra la termosoldadura, explica el aceptable comportamiento de un velo de escaso espesor ante el desgarro. Como estándar para uso en cubiertas flotantes puede considerarse un velo de 17 g·m⁻², con una porosidad (superficie libre:superficie total) de un 90 % (Jenni et al., 1998).

Pueden utilizarse combinaciones de distintas técnicas de semiforzado, como por ejemplo acolchado de suelo-cubierta flotante (frecuente en EE.UU. para el cultivo de melón), túnel-cubierta flotante, e incluso acolchado-cubierta-túnel. También puede utilizarse esta técnica y las asociaciones anteriores dentro de un invernadero (Hanna et al., 1997; Baker et al., 1998). En el caso de climas o periodos de cultivo fríos, puede utilizarse una doble cubierta. Lo normal es que se utilice una lámina de polietileno asociada a un velo de polipropileno ya que cuando se utilizan dos cubiertas de polietileno puede producirse adherencia entre ellas por atracción electrostática (Benoit y Ceustermans, 1992), desapareciendo la cámara de aire que debe existir para proporcionar un mejor aislamiento térmico. A pesar del incremento de coste y la gran disminución que se da en la transmisividad, casi un 50% en condiciones de campo (Benoit y Ceustermans, 1987), se considera rentable en algunos cultivos del norte de Europa (Wurr et al., 1996).

Las cubiertas flotantes pueden emplearse durante todo el ciclo cultural en plantas de bajo porte, en especies autopolinizantes (Natwick y Laemmlen, 1989) o cuando se utilizan como protección fitosanitaria, aunque lo normal es su utilización solamente durante parte del ciclo. En este caso, determinar el tiempo óptimo de protección y retirada de cubiertas es un paso crítico para maximizar los efectos beneficiosos de la técnica (Gerst, 1985; Gracia, 1993). La retirada del material de cubierta puede también ser mecanizada. La vida media de estos materiales es de 2 - 3 campañas de cultivo en el caso de láminas de polietileno y de 2 años con velo de polipropileno (Hernández et al., 1996). Hay que tener un especial cuidado en el control fitosanitario ya que el microclima creado, al igual que en los cultivos protegidos, no sólo es beneficioso para los cultivos, sino que en ocasiones también favorece la incidencia de enfermedades, plagas y malas hierbas (Wells, 1994; Reece et al., 1997), siendo necesaria la aplicación de tratamientos sanitarios. Asimismo, la cubierta altera el ambiente en que actúan los herbicidas, pudiendo reducir su eficacia (Hemphill y Crabtree, 1988), al afectar a su movimiento, permanencia, volatilidad y actividad (Greenfield, 1989).

1.1.2.- Influencia del régimen térmico bajo "cubiertas flotantes" sobre la producción de los cultivos.

El ambiente de un cultivo puede definirse como la suma de todas las fuerzas y sustancias externas que afectan al crecimiento, estructura y reproducción de la planta (Billings, 1952; Ingestad y Ågren, 1995). El medio ambiente del cultivo se compone por tanto de los factores climáticos y edáficos, los cuales ejercen una gran influencia en el crecimiento vegetal y, consecuentemente en la producción (Fageria et al., 1997). Muchos factores se reconocen como condicionantes de la producción de los cultivos. Algunos de estos factores como el agua, el cultivar empleado, los nutrientes, las plagas y enfermedades, son susceptibles de ser controlados y la mayoría de las prácticas agrícolas y de protección de cultivos están dirigidas a controlar dichos factores para obtener un máximo aprovechamiento de la cosecha. Cuando dichos factores se encuentran en condiciones idóneas y no limitan el crecimiento vegetal, es necesario que existan unas condiciones climáticas adecuadas, para obtener una máxima productividad (Jeuffroy y Ney, 1997).

La productividad o el rendimiento de un cultivo, es una función de los factores medio ambientales, vegetales, agrícolas y socioeconómicos y de sus interacciones (Zadoks y Schein, 1979), por lo que la producción máxima de un cultivo en un medio ambiente dado es posible

solamente cuando todos esos factores están en sus valores óptimos. Si por el motivo que fuera, uno de estos factores es limitante, el rendimiento del cultivo decrecerá. La producción de un cultivo es un fenómeno muy complejo y no es una labor fácil mejorarla y/o mantenerla estable (Fageria et al., 1997). Factores climáticos como la temperatura, radiación solar, y el aporte de humedad juegan un importante papel en la producción de los cultivos y con frecuencia, factores críticos para el crecimiento, la calidad y la producción de los cultivos (Atkinson y Porter, 1996; Tijskens et al., 1996).

En las regiones templadas, la temperatura determina la duración de la estación de crecimiento, mientras que en las regiones tropicales la temperatura es más importante para la respiración y la fotosíntesis. En el clima tropical, la temperatura juega un importante papel en el aporte de agua y nutrientes y la temperatura del entorno de la raíz es crítica en cuanto a la supervivencia de la planta y normalmente es menor que la temperatura aérea durante el periodo de crecimiento. La variación de este factor en la zona radical es menor que la del ambiente, a la cual están sujetas las partes aéreas de las plantas (Nielsen, 1974).

La temperatura óptima del suelo, para una producción máxima para varias especies cultivadas de importancia económica (Tabla 1.1.), está entre los 20 y los 30 °C (Voorhees et al., 1981). La temperatura edáfica está influenciada por la intensidad, calidad y duración de la radiación solar, además de la temperatura del aire, la cubierta vegetal, y el color y conductividad térmica del suelo (Schwarz et al., 1997). Todos los procesos fisiológicos están fuertemente influenciados por la temperatura y desde una perspectiva práctica, la producción se ve beneficiada por el régimen térmico del suelo, que estimula la germinación y el crecimiento temprano (Fageria et al., 1997).

Un parámetro de medida del crecimiento en relación con la temperatura es el coeficiente de temperaturas " Q_{10} ". Este coeficiente puede definirse como la relación existente entre la intensidad de un determinado proceso a una temperatura determinada y ese mismo proceso a una temperatura de 10 °C menos. Se puede expresar como:

$$Q_{10} = \left(\frac{V_2}{V_1} \right)^{10/(T_2 - T_1)}$$

donde V_2 y V_1 son los valores de la reacción dada a las temperaturas T_2 y T_1 , respectivamente. El coeficiente Q_{10} puede tener distintos valores, desde 1, para las reacciones fotoquímicas independientes de la temperatura, hasta 6, en el caso de la desnaturalización de enzimas a altas temperaturas (Voorhees et al., 1981).

Tabla 1.1.- Temperaturas edáficas óptimas para una producción máxima en diferentes cultivos*.

<i>Cultivo</i>	<i>Temperatura Óptima (°C)</i>	<i>Referencias</i>
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	18	Power et al. (1970)
Avena (<i>Avena sativa</i> L.)	15 – 20	Case et al. (1964)
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	25	Whitfield y Smika (1971)
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	25	Briggle (1980)
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	25 – 30	Dormaar y Ketcheson (1960)
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	28 – 30	Pearson et al. (1970)
Patata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	20 – 23	Epstein (1966)
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	25 – 30	Owen (1971)
Judía (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	28	Mack et al. (1964)
Soja (<i>Glycine max</i> L. Merr.)	30	Voorhees et al. (1981)
Remolacha (<i>Beta vulgaris</i> L.)	24	Radke y Bauer (1969)
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	25 – 30	Hartt (1965)
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	28	Heinrichs y Nielsen (1966)

* Datos para la confección de la tabla extraídos de Fageria et al. (1997)

La mayoría de los cultivos para consumo están sujetos a un tipo particular de clima, como el tropical o el templado, y no toleran temperaturas extremas, además de poseer un estrecho rango de temperaturas para un crecimiento máximo (Tabla 1.2.). A pesar de todo esto, existen excepciones, como las plantas C_4 (caña de azúcar, sorgo, maíz), que son generalmente más tolerantes a las altas temperaturas y más sensibles a las bajas temperaturas que las plantas C_3 (arroz, trigo, avena, cebada, soja, algodón, judía). Muchas plantas C_4 , como la caña de azúcar y el maíz, están mejor preparadas para crecer a temperaturas más altas que las C_3 tales como el trigo y la cebada. La tolerancia de las plantas C_3 a las bajas temperaturas y por tanto su mejor eficiencia fotosintética bajo tales condiciones, en comparación con las C_4 , puede deberse, en parte, a

diferencias en los niveles de ciertas enzimas fotosintéticas o a la debilidad de algunas enzimas clave de la ruta C₄, o incluso a diferencias en la fase de transición de los lípidos en las membranas (Edwards et al., 1983; Zamski y Schaffer, 1996).

Tabla 1.2.- Temperatura ambiental óptima fisiológica para una producción máxima en diferentes cultivos*.

<i>Cultivo</i>	<i>Temperatura óptima (°C)</i>
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	25
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	25
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	25 – 30
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	21 – 30
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench)	30 – 36
Soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	30
Judía (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	21
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	30 – 35
Tapioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	20
Patata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	16 – 28
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	28

*(Fageria et al., 1997)

La comprensión de las respuestas del desarrollo vegetal a los efectos de la temperatura puede conducir a predicciones más fiables de la producción de los cultivos y puede ayudar en el diseño de cultivos más adaptados a su medio ambiente. Los factores del medio ambiente físico que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas ya se nombraron con anterioridad (radiación, temperatura, agua y nutrientes), y cuantificar sus efectos en las plantas forma la base de modelos de simulación de la producción de cultivos (Loik y Harte, 1996).

La temperatura tiene un claro efecto sobre la respiración y transporte de asimilados (Morcuende et al., 1997), así como sobre la fotosíntesis (Méthy et al., 1997; Vu et al., 1997). Por otra parte, el desarrollo vegetal es fuertemente dependiente de ambas, altas y bajas temperaturas, para el control del desarrollo y el paso del estado vegetativo al reproductivo (Landsberg, 1975), y la senescencia (Rosenthal y Camm, 1996). La influencia de los factores medio ambientales difiere marcadamente entre los procesos de crecimiento y desarrollo. El crecimiento es un incremento irreversible en materia seca, resultante del mantenimiento de un desequilibrio entre la acumulación

y la pérdida de recursos medio ambientales. De esta forma, se ve mucho más afectado por la cantidad total de radiación recibida que, por ejemplo, por la temperatura (Porter y Delécolle, 1988). La temperatura provoca más cambios en un sistema vegetal (por influencia en la actividad enzimática o en el comportamiento de las membranas) en mayor medida que sobre el crecimiento (Landsberg, 1975). De forma similar, la composición espectral de la luz afecta más a los procesos de desarrollo que a los de crecimiento (Atkinson y Porter, 1996).

Con cualquier planta, en la germinación y longevidad de semillas (Bonis et al., 1996; Passam et al., 1997), desarrollo de enfermedades (Semb, 1996a, 1996b), anthesis, cuajado de frutos, cosecha, post-recolección y consumo (Poulsen et al., 1994), la temperatura juega un importante y a veces insospechado papel. Sin embargo, la temperatura *per se* no es frecuentemente el único factor determinante. Los efectos de las temperaturas extremas normalmente están asociados con otros factores tales como la disponibilidad de agua, vientos fuertes, y la dirección e intensidad de la insolación (Semenov y Porter, 1995).

Un aspecto importante son las limitaciones impuestas por los límites de las temperaturas, que varían marcadamente entre cultivos anuales y perennes. El efecto limitante de las altas temperaturas en la producción de los cultivos tiene dos formas principales: la limitación del crecimiento vegetativo y los efectos adversos en el cuajado de los frutos. Los cultivos vegetales sujetos a altas pérdidas por transpiración, tales como el espárrago, la lechuga, y todas las Brassicáceas (col, col china, coliflor, brécol, coles de Bruselas, etc.), están obviamente afectados por la exposición a temperaturas muy altas (Loik y Harte, 1996). Son numerosos los trabajos que relatan como la alteración de los parámetros climáticos influyen sobre la producción, calidad y precocidad de diversos cultivos hortícolas como calabacín (Reyd et al., 1993), cebolla (Mansour y Hemphill, 1987), escarola (Benoit y Ceustermans, 1987), lechuga y zanahoria (Borosic et al., 1994), maíz dulce (Bonanno y Sanders, 1989), melón (Hemphill, 1989), patata (Begin et al., 1989), pepino y tomate (Hemphill, 1989).

La técnica de cubiertas flotantes con mantas textiles (agrotexiles) o velos de polipropileno, para la producción de cultivos es intermedia entre el cultivo al aire libre y el semiforzado bajo túneles o invernaderos, aproximándose los resultados a los obtenidos con el empleo de túneles. El éxito de los agrotexiles se debe, entre otros factores, a los buenos resultados económicos: inversión mínima y ahorro en mano de obra, lo que permite reducir los costes de producción (Robledo y Martín, 1988). La colocación de una cubierta flotante, que actúa como una barrera, más o menos

permeable, y que separa el cultivo del ambiente exterior, va a generar una serie de modificaciones microclimáticas sobre el entorno que protege, alterando temperatura, radiación, humedad, etc. (Wolf et al., 1989; Baker et al., 1998). Además, como barrera física, impiden los daños por lluvias de gran intensidad o por granizo (Gerst, 1993), tanto sobre el cultivo como sobre el suelo, el cual mantiene así su estructura agregada (Hemphill y Crabtree, 1988).

Evidentemente, los efectos del microclima sobre el cultivo van a ser alterados cuando se utilice un material que cubra el cultivo. Las cubiertas flotantes generan un efecto túnel o invernadero (Choukr-Allah et al., 1994; Wittwer, 1994), que puede definirse como la ganancia térmica impuesta por un material de cubierta que transmite la radiación de corta longitud de onda (que aportan los rayos solares) y absorbe o limita la emisión de radiación de longitud de onda larga (radiación calorífica que emiten las plantas y suelo ubicadas bajo la cubierta). De este modo, el recinto protegido se comporta como una trampa de calor (Seemann, 1979; Hernández et al., 1996).

La temperatura del aire bajo el recinto protegido, es mayor que la del aire libre, salvo en el caso en que se dé el fenómeno de "inversión térmica", el cual se produce cuando se utilizan materiales de cubierta transparentes a la radiación infrarroja larga y en condiciones de gran emisión hacia la atmósfera, lo cual ocurre en las noches claras con escasa turbulencia del aire. La ventilación que proporcionan las perforaciones de la cubierta de polietileno es suficiente para reducir este efecto. En el caso de utilizar velos permeables, la alta ventilación que proporcionan, evitaría el fenómeno. Este efecto de inversión térmica es muy escaso ya que además de la ventilación, la condensación de agua bajo la cubierta impide la salida de los rayos del infrarrojo largo (Benoit y Ceustermans, 1987).

Las temperaturas diurnas del aire son las más afectadas por la utilización de esta técnica, especialmente las máximas. Bajo polietileno han sido descritos incrementos de temperaturas máximas de hasta 14°C (Hemphill y Mansour, 1986), siendo ligeramente inferiores en el caso del uso de polipropileno (Wolf et al., 1989). Estas temperaturas máximas pueden ser lesivas (Rumpel y Grudzien, 1990), en el caso de plantas sensibles o recién trasplantadas. En cuanto a las temperaturas mínimas del aire, la técnica solamente proporciona ligeros aumentos, en torno a 1 – 2 °C (Hemphill y Crabtree, 1988), los cuales en algunas ocasiones suelen ser suficientes para permitir la supervivencia del cultivo (Hemphill y Mansour, 1986).

El régimen de las temperaturas del suelo máximas y mínimas, también se modifica bajo las cubiertas flotantes, aunque las diferencias son menores que las ya citadas para las temperaturas aéreas. Los aumentos obtenidos pueden cifrarse entre 2 – 3 °C como media, siendo los velos de polipropileno los que menos aumentos consiguen (Hemphill, 1989; Wolf et al., 1989). Obviamente, todas estas diferencias dependen de las condiciones climáticas exteriores. La reducción de la evapotranspiración inducida por las cubiertas, provoca que el suelo tenga unos mayores niveles de humedad que, junto con el incremento térmico, favorece los procesos de nitrificación (Benoit y Ceustermans, 1992), lo que redundará en el aumento de fertilidad de los suelos. Esta mejora de las condiciones edáficas se traduce en la optimización de las condiciones de germinación (Wells y Loy, 1985) reduciéndose el gasto de semillas hasta un 10 % (Gerst, 1985). Gerst (1993) y Lamont (1996), dan un amplio catálogo de cultivos en los cuales la técnica de cubiertas flotantes ha mostrado su eficacia, tanto en un aumento de la producción, como en un uso más eficiente de fertilizantes y recursos hídricos, reduciendo la lixiviación de nutrientes, y controlando los problemas de malas hierbas e incidencia de enfermedades.

Un factor que se pasa por alto frecuentemente en la determinación de la temperatura óptima para una respuesta dada es la luz, la cual puede jugar un papel positivo o negativo (Grierson, 1995), según la especie (Van Dam et al., 1996), existiendo una estrecha relación entre la cantidad de radiación solar que recibe la planta y su producción de biomasa (Okogun y Mulongoy, 1999). La respuesta de parámetros de calidad y nutrición en hojas y frutos de cultivos económicamente útiles, a cambios en la irradiación y en condiciones de escasa iluminación, también se ha estudiado, poniéndose de manifiesto el efecto negativo de bajas intensidades luminosas en el crecimiento y maduración de frutos, además de una alta correlación positiva entre el contenido en nutrientes y los parámetros de calidad de los cultivos, con los niveles de irradiación (Garriz et al., 1997) y las condiciones climáticas del cultivo (Loik y Harte, 1996). La radiación que llega a un cultivo bajo cubierta flotante va a depender de la intensidad de la radiación solar, de la posición del sol (ángulo de incidencia) y de la disposición y características ópticas del material de cubierta. Son estos dos últimos factores los que van a establecer las diferencias microclimáticas que genera esta técnica con respecto al aire libre (Hernández et al., 1996; Healey y Rickert, 1998).

En un cultivo al aire libre, la intensidad radiante que llega a la superficie varía con la intensidad de la radiación y el ángulo formado por la dirección de los rayos de luz y la perpendicular a la superficie, según la ley del coseno de Lambert (Jones, 1987). Este ángulo va a depender de la declinación solar, la latitud y la hora. Cuando el cultivo presenta una cubierta, sin

embargo, la intensidad radiante puede calcularse fácilmente si ésta es plana, pero no cuando está apoyada sobre el cultivo y por tanto su forma es irregular. En ambos casos, cultivo al aire libre y bajo cubierta, la intensidad de la radiación será mayor cuanto más cerca esté el solsticio de verano, con la proximidad al ecuador y en las horas cercanas al mediodía (Wittwer y Castilla, 1995).

Una vez llegada la radiación a la cubierta, las distintas fracciones del espectro serán reflejadas, absorbidas o transmitidas al interior de la cámara en función de la naturaleza del material de cubierta. El porcentaje de radiación transmitida va a depender también del ángulo de incidencia (ángulo que forman los rayos solares con la perpendicular a la cubierta) con el que lleguen los rayos solares (Mastalerz, 1977).

La mayoría de los materiales utilizados son bastante transmisivos a la radiación global (suma de radiación directa y difusa). La transmisividad (porcentaje de radiación que traspasa la cubierta) en condiciones de laboratorio (con ángulos de incidencia de cero grados), es de un 88-89 % en láminas de polietileno de 50 μ de espesor (Gerst, 1985). Sin embargo, cuando la transmisividad es medida en condiciones de campo, estos valores son bastante inferiores. Así por ejemplo, los valores medios son del 62 y 59 % en polietileno y polipropileno, respectivamente (Benoit y Ceustermans, 1992; Hernández et al., 1996). Esta atenuación de la transmisividad en campo es debida al citado ángulo de incidencia de los rayos solares, a la acumulación de partículas de polvo y a la condensación de vapor de agua en la cara interna de la cubierta. Solamente por esta última causa, una lámina plana puede perder hasta un 30 % de transmisividad en el rango de la radiación global (Pieters y Balemans, 1992). En cualquier caso, las pérdidas de transmisividad se deben, fundamentalmente, a la reflexión del material, que puede variar en las distintas regiones del espectro. Un polietileno que presenta un poder de reflexión del 5 % en la región de 300 nm, puede presentar una reflexión de hasta el 14 % con una radiación de 1200 nm de longitud de onda (Robledo y Martín, 1988). La mayoría de los materiales plásticos no presentan patrones de transmisividad distintivos en el rango de la radiación fotosintéticamente activa (entre 400 – 700 nm), con lo que su valor no difiere mucho de los citados para la radiación total. Wells y Loy (1985), la cifran en 90 y 80 % para polietileno y polipropileno, respectivamente (similares a los citados para la radiación global).

Los materiales usados para cobertura flotante deben ser lo más transparentes posible a la radiación visible y la radiación fotosintéticamente activa, pero para asegurar un buen comportamiento térmico, deben tener cierta opacidad a las radiaciones infrarrojas emitidas por el

suelo y las plantas durante la noche. Gerst (1985), cifró la transmisividad para el infrarrojo (a 10 μm de longitud de onda), en condiciones de laboratorio, en un 55-63% para láminas de polietileno de 50 μ de espesor y 30 % para un velo de polipropileno de 15.6 g m^{-2} . Según estos datos, el polietileno es el que peores prestaciones ofrece en cuanto a aislamiento térmico por radiación. Sin embargo, existen en el mercado láminas de polietileno térmico, con aditivos especiales, que reducen esta transmisividad para el infrarrojo hasta un 10 %.

En campo, la transparencia al infrarrojo de estos materiales se modifica al condensarse vapor de agua, lo que ocurre durante la noche cuando la temperatura de la cámara desciende del punto de rocío, provocando la aparición de una película de agua en la cara interna de la lámina (Wells y Loy, 1985). El agua absorbe fuertemente la radiación infrarroja (Rosenberg et al., 1983), de tal modo que constituye una barrera opaca a esta radiación (sobre todo en longitudes de onda superiores a 10 μ) limitando pérdidas térmicas. Es de vital importancia que el agua de condensación forme una lámina uniforme para evitar goteos sobre la planta que favorezcan el desarrollo de enfermedades criptogámicas. En días nublados y húmedos, este agua de condensación nocturna puede no evaporarse al inicio del día, con lo que la transmisividad global del plástico se ve muy mermada (Loy y Wells, 1982).

Los valores de humedad relativa del aire dependen de la cantidad de vapor de agua que el aire contiene y de su temperatura, de modo que a igual contenido de vapor de agua, la humedad aumentará al bajar la temperatura y disminuirá al subir esta. Cuando la temperatura baja hasta el punto de rocío, se alcanza la saturación y se produce la condensación del agua, que constituye un fenómeno de gran importancia en la técnica de cubiertas flotantes (Hernández et al., 1996). La humedad relativa bajo las cubiertas es superior a la del aire libre. Mermier y colaboradores (1994), bajo velo de polipropileno, midieron incrementos de un 15 a un 20 % durante el día y entre un 5 y 10 % durante la noche, similares a los obtenidos por Choukr-Allah et al. (1994), que cifran estos incrementos en una media entre 5 -15 % durante todo el ciclo. Este ambiente húmedo se crea gracias a que la cubierta supone un cierto freno a la renovación de aire y a que las altas temperaturas, generadas bajo la cubierta, permiten que la atmósfera interior pueda contener mayor cantidad de agua. Este efecto es mayor bajo una lámina de polietileno que bajo un velo de polipropileno, debido a la menor ventilación del primero (Benoit y Ceustermans, 1987). Los altos valores de humedad y la reducción de la radiación impuesta por el material de cubierta, provocan una reducción en la evapotranspiración del cultivo. Como consecuencia, la humedad del suelo se ve

también favorecida, habiéndose detectado incrementos de hasta un 20 % respecto a un cultivo sin protección tras un período de desecación entre riegos (Benoit y Ceustermans, 1992).

Existe escasa información sobre la incidencia del viento sobre las cubiertas flotantes. Mermier et al. (1994), indicaron que el viento bajo un velo de polipropileno es 10 veces menor que en el exterior. Si tenemos en cuenta que la permeabilidad del polietileno perforado es menor, cabe pensar que bajo estas láminas, la velocidad del viento será aún más reducida, por tanto, las cubiertas favorecen un efecto cortavientos (Odet y Jay, 1987). Jones (1992), analizó la influencia de este efecto sobre el microclima, indicando que sus principales consecuencias son el aumento de la temperatura durante el día (debido a que la reducción de la turbulencia limita la renovación por aire frío de capas altas, del aire calentado junto al suelo durante las horas diurnas) y la reducción de la evapotranspiración (al disminuir la renovación del aire saturado de vapor de agua junto a las hojas, procedente de la transpiración). Gerst (1985), analizó el efecto del viento sobre la renovación del aire bajo la cubierta. En cámaras con velos de polipropileno, la renovación es tres veces superior a la medida bajo lámina de polietileno. Un viento de 1 m s^{-1} duplica, en ambos casos, la renovación sin viento. No existen datos concluyentes de cómo afecta la técnica a la composición del aire bajo cubierta, especialmente sobre los contenidos de CO_2 , que deben ser bajos cuando las condiciones son óptimas para la fotosíntesis, debido a la limitación en la renovación del aire (Hernández et al., 1996; Lamont, 1996).

Una aplicación especial de los velos permeables es su utilización como protección fitosanitaria. Según Gregoire (1992), el proceso de fabricación del velo de polipropileno consolida un material con "efecto barrera", ya que los filamentos forman un entramado, en el cual el 50 % de los espacios libres tienen una dimensión inferior a 50μ y a través de los cuales no puede pasar ningún insecto. Además, este mismo autor indica que este material tiene un efecto repulsivo para los insectos, similar al encontrado en otros materiales plásticos, y la exclusión de insectos limita la incidencia de las virosis (Avilla et al., 1997; Csizinsky et al., 1997). Por ejemplo, en calabacín, el ataque del virus del mosaico de la sandía se retrasa un mes (Reyd et al., 1993) y se reducen su infección al final del ciclo (Faouzi et al., 1993). El control realizado sobre las plagas, en algunas ocasiones, ha demostrado que su utilización es una alternativa económica a los tratamientos fitosanitarios convencionales que pueden no asegurar un control uniforme de las virosis (Brown et al., 1989; Hemphill, 1989).

En ocasiones, por problemas de sobreexplotación o monocultivo, no es difícil encontrar ambientes culturales donde resulta muy problemático el cultivo de una determinada especie, debido a la gran cantidad de vectores de virosis que en él se encuentran (Reyd et al., 1993). En estos casos, las cubiertas flotantes pueden mostrar una gran eficacia, posibilitando el cultivo (Khan et al., 1997). En contra de su utilización, hay que indicar que las especies a cultivar están restringidas a aquellas de bajo porte, no siendo de interés práctico, en general, su uso en plantas entutoradas, a pesar de haberse empleado en algunos casos (Robledo y Martín, 1988). Además, como anteriormente se indicó, en plantas sensibles o pequeños trasplantes, la elevación de las temperaturas máximas puede ser lesiva. Gent (1989), comprobó como el contacto con la cubierta provocó abrasamientos en los ápices de crecimiento de plantas de tomate que condujeron al desarrollo de tallos laterales que cambiaron la arquitectura de la planta, reduciendo la producción. Lo mismo ocurrió en pimiento (Rumpel y Grudzien, 1990), con crecimientos arbustivos multilaterales que retrasaron el cuajado de los frutos y la cosecha, así como la producción precoz, hasta en un 80 % (Call y Courter, 1989). En ocasiones no se ve alterada la producción y sí la calidad, como ocurrió en melón (Donley y Hochtmuth, 1989). Para evitar estos efectos indeseables es necesario la realización de ensayos de adaptación local para cultivos de interés, optimizando los ciclos de protección, fundamentalmente el momento de retirada de las cubiertas (Vangpetersen, 1998).

1.2.- EFECTOS DE LOS FACTORES MEDIOAMBIENTALES SOBRE LA ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE MICRONUTRIENTES Y OTROS ELEMENTOS.

Los cambios en los factores medio ambientales como la temperatura, el estado hídrico, la luminosidad, etc., determinan cambios en la dinámica de absorción de nutrientes y de crecimiento de las plantas (Lambers et al., 1998). Así, por ejemplo, las plantas que se desarrollan en medio ambientes secos se caracterizan por un crecimiento relativo reducido y una menor capacidad de absorción de nutrientes. Las bajas temperaturas reducen directamente la absorción de nutrientes, en la misma medida en que se afectan ciertos procesos fisiológicos dependientes de la energía de la respiración. Por otra parte, el efecto de la irradiación en la absorción de nutrientes depende de una adecuada nutrición, así condiciones de escasa iluminación reducen la absorción de nutrientes, y por el contrario, plantas con aporte limitado de nutrientes, no se afectan significativamente por la disponibilidad de luz (Barbour et al., 1999).

Las plantas compensan, por mecanismos de aclimatación y adaptación, los efectos de las temperaturas desfavorables, a través de incrementar su capacidad de absorber nutrientes. En condiciones de bajas temperaturas edáficas con plantones de *Pinus sylvestris*, se inhibía el crecimiento radical y ocurrían cambios en la composición lipídica de las membranas plasmáticas, que eran necesarios para una absorción de agua y nutrientes más eficiente para tales condiciones de frío, sin embargo, se limitaba la fotosíntesis y la disponibilidad de fotoasimilados para el crecimiento radical. Por otra parte, un leve incremento en la temperatura radical, inducía cambios funcionales y estructurales en las membranas plasmáticas de las células radicales que se necesitaban para un intercambio gaseoso eficiente, acompañado de un mayor crecimiento (Ryppö et al., 1998).

En condiciones de bajas temperaturas en el suelo, la capacidad de las plantas para adquirir los nutrientes se ve influenciada negativamente por varios factores, incluidos la disponibilidad química de los nutrientes en el suelo (Schaff y Skogley, 1982), el crecimiento radical (Pritchard et al., 1990), y la capacidad fisiológica de las raíces para la absorción de nutrientes (Bravo-F y Uribe, 1981). En dichas condiciones, también disminuye el crecimiento de la parte aérea y la demanda de nutrientes. Sin embargo, tras la exposición durante largos periodos de tiempo a bajas temperaturas, la capacidad fisiológica de las raíces para absorber macronutrientes como el K (White et al., 1987), y el N (Bigot y Boucaud, 1994), puede incrementarse. Para maíz y trigo, este incremento en la capacidad radical para la absorción de nutrientes se relaciona con la demanda de la parte aérea para crecer (Engels, 1993). Así, cuando se da una elevada disponibilidad química de nutrientes y la adquisición de nutrientes es primariamente dependiente de la capacidad fisiológica de las raíces para su absorción, la concentración interna de K y N no se afecta de forma importante por bajas temperaturas edáficas (Engels y Marschner, 1992).

La temperatura de la zona radical altera el crecimiento vegetal y la absorción de nutrientes por las raíces (Mozafar y Oertli, 1992; Engels y Marschner, 1996). Puesto que el fotoperiodo puede cambiar la concentración de ciertos reguladores de crecimiento (Railton y Wareing, 1973) y ciertos reguladores de crecimiento pueden afectar la absorción radical de nutrientes (Torrey, 1976), es posible la existencia de un mecanismo de interacción entre fotoperiodo y temperatura radical que altere la absorción de nutrientes por las raíces (Mozafar et al., 1993). La temperatura de la zona radical es un factor climático importante que afecta la acumulación de nutrientes minerales en forrajes particularmente en primavera, con temperaturas edáficas más bajas y que cambian con retardo, con respecto a las temperaturas aéreas, por lo que se espera una disminución en los

procesos de acumulación iónica por la planta en condiciones de temperatura radicular subóptima, ya que la absorción es una reacción bioquímica (Bowen, 1991). Otros factores, incluyendo el elemento nutriente en cuestión, su disponibilidad, la especie vegetal, la edad de la planta, y las condiciones experimentales, también afectan la respuesta de la absorción de iones a cambios en la temperatura de la zona radical (Kochian, 1991).

El crecimiento vegetal se incrementa con fotoperiodos largos (18 h), especialmente con temperaturas radicales cálidas (21 °C), en las que el mayor crecimiento es concomitante con una concentración menor de elementos, lo que puede interpretarse por un efecto de dilución en los tejidos vegetales (Mozafar et al., 1993). La temperatura de la zona radical es un factor medio ambiental clave que puede alterar la acumulación de nutrientes en plantas de trigo de invierno, crecido a 8 °C de temperatura radical, que tenían significativamente menor concentración de P, S, Cu, Mn y Zn, en la parte aérea y en las raíces que plantas crecidas a 16 °C. En estas plantas de trigo, que crecían a 8 °C, cuando se transferían a 16 °C de temperatura edáfica, después de una semana se incrementaba la concentración de P, S, Cu y Mn a niveles similares a los de plantas que habían crecido constantemente a 16 °C. Por otra parte, la absorción de Zn se triplicaba a la semana de poner las plantas de 8 a 16 °C, aunque los niveles eran inferiores a los de las plantas que habían estado constantemente a 16 °C. Como conclusión del experimento, Miyasaka y Grunes (1997), establecieron que la concentración de P, S, Cu, Zn y Mn se incrementaba en la parte aérea y en la raíz de trigo de invierno cuando las plantas llevaban una semana transferidas de 8 a 16 °C de temperatura radical.

En condiciones de bajas temperaturas edáficas, la absorción y particularmente el transporte de Zn desde la raíz a la parte aérea se ve con frecuencia más reducido que el crecimiento, resultando en una concentración baja de Zn en la parte aérea, mientras que la concentración en las raíces puede aumentar (Schwartz et al., 1987). La deficiencia de Zn inducida por bajas temperaturas edáficas puede incrementarse con el aporte de P (Martin et al., 1965). En cultivos de primavera en las regiones occidentales de USA, como el lino, el maíz, la judía y la patata, aparecían síntomas de deficiencia de Zn en las plantas que crecían precozmente, mientras que no se manifestaban dichos síntomas en las que se desarrollaban con la estación de crecimiento más avanzada (Viets, 1967; Moraghan, 1978). Moore (1972) y Mengel y Kirkby (1987), concluyeron que la absorción de Zn estaba controlada metabólicamente. Consecuentemente, la absorción de Zn deberá aumentar con temperaturas edáficas más altas. El error en la separación del Zn adsorbido a la superficie radical, del Zn verdaderamente absorbido, puede afectar los estudios de absorción de

Zn (Schmid et al., 1965; Chaudhry y Loneragan, 1972). La investigación en condiciones controladas de temperatura, mostró que la deficiencia de Zn en cultivos como el maíz (Giordano y Mortvedt, 1978), tomate (Martin et al., 1965), y lino (Moraghan, 1980), es más severa en condiciones de bajas temperaturas del suelo.

Martín et al. (1965), ilustraron los siguientes hechos:

- i) Los síntomas de deficiencia de Zn son más severos a más bajas temperaturas edáficas.
- ii) Las plantas están menos preparadas para responder a la fertilización con Zn a altas temperaturas de suelo, aunque el potencial para crecer sea mayor.
- iii) El P añadido induce mayor deficiencia de Zn a bajas temperaturas de suelo.
- iv) La concentración y la absorción de Zn aumentan con temperaturas edáficas más altas.

El efecto negativo de las temperaturas bajas en la acumulación de Zn en maíz desarrollado en solución nutritiva se debía en parte, a un menor transporte desde la raíz a la parte aérea (Edwards y Kamprath, 1974). Esta acumulación de Zn adsorbido o absorbido en el sistema radical a bajas temperaturas también se encontró en cebada (Schwartz et al., 1987). Bauer y Lindsay (1965), encontraron que la disponibilidad de Zn era menor a temperaturas más bajas, y el crecimiento radical se veía reducido a bajas temperaturas, lo que podía restringir su absorción (Burlleson et al., 1961; Sutcliffe, 1971).

Los cambios y la calidad de la intensidad luminosa, así como el fotoperiodo pueden asociarse con la naturaleza estacional de ciertos problemas de deficiencia de Zn, en trébol subterráneo (Ozanne, 1955). El contenido total de Zn de las semillas de maíz, era especialmente importante para la germinación en condiciones de bajas intensidades luminosas (Edwards y Kamprath, 1974). Esta dependencia importante del Zn, por parte de la semilla se creía debida al escaso crecimiento de la raíz y a la reducida absorción de Zn en condiciones de escasa luminosidad (Hoagland, 1944). Las condiciones de días cortos y temperaturas bajas aumentaban la deficiencia de Zn en cultivos de trébol en invierno en Australia (Trumble y Ferres, 1946). El trébol subterráneo crecido en condiciones de días largos (11.8 h) respondió mucho más al Zn añadido, con una mayor absorción, pero transportó relativamente menos proporción de Zn radical a la parte aérea, que plantas tratadas con días cortos (7.5 h) (Ozanne, 1955). De acuerdo con Hewitt (1984b), el fotoperiodo y la intensidad de luz deben considerarse en los estudios de deficiencia de Zn.

El efecto de las bajas temperaturas edáficas en la nutrición de Fe está menos claro. En tomate, la absorción y transporte de Fe, disminuían con bajas temperaturas edáficas en experimentos de dos días de duración (Riekels y Lingle, 1966). En experimentos de varias semanas con plantas de soja, la temperatura del suelo afectó mínimamente la concentración de Fe en la parte aérea (Moraghan, 1987), y la clorosis por deficiencia de Fe en soja crecida en suelo calcáreo podía disminuir con temperaturas edáficas bajas (Clark y Reinhard, 1991), por un menor potencial de crecimiento y un menor requerimiento de Fe (Moraghan, 1987).

Los factores climáticos afectan de forma importante la deficiencia de Fe en condiciones de campo (Moraghan y Mascagni, 1991). La clasificación de plantas en cuanto a susceptibilidad a la deficiencia de Fe se llevaba a cabo en condiciones controladas en cámaras de cultivo, pues las condiciones medio ambientales variables del campo, dificultaban la precisión de la clasificación (Byron y Lambert, 1983). La complejidad del efecto climático se ilustra en trabajos en los que la severidad de la clorosis por deficiencia de Fe (en adelante, clorosis férrica), se incrementa por combinaciones de elevada humedad edáfica y temperaturas bajas (Burtch et al., 1984), y veranos secos y calurosos (Little, 1971).

Diferentes especies, e incluso cultivares de la misma especie, varían en su susceptibilidad a deficiencia de Fe. La diferencia entre plantas resistentes y susceptibles a clorosis férrica, cuando crecen en suelos alcalinos, se suele referir a plantas eficientes e ineficientes en la absorción de Fe y la mayoría de las variaciones en la actividad radical generalmente provenían de diferencias genéticas en la eficiencia para la absorción de Fe (Marschner et al., 1986). Marschner (1995), dividió las plantas en dos categorías basándose en la respuesta a los efectos inducidos en la raíz: plantas con respuesta de tipo Estrategia I, en su mayoría especies dicotiledóneas, en las que la resistencia a la deficiencia de Fe está caracterizada por la elevada liberación de protones y compuestos fenólicos y un incremento en la capacidad de reducción de Fe^{3+} en la membrana plasmática (Mori, 1999). Por otra parte, estarían las especies con Estrategia II, en su mayoría gramíneas, en las que la resistencia a la deficiencia de Fe se caracteriza por el aumento en la liberación desde las raíces de aminoácidos no-proteinogénicos (fitosideróforos), que acomplejan Fe^{3+} (Schmidt, 1999; Zhang et al., 1999).

Puesto que la absorción de Fe es un proceso activo y requiere energía metabólica para el transporte de Fe desde las raíces hacia los tallos (Branton y Jacobson, 1962), los cambios de temperatura pueden favorecer o suprimir la deficiencia de Fe, dependiendo de sus efectos asociados

con el crecimiento, metabolismo y estado nutricional de otros elementos (Brown, 1956). En general, la temperatura del suelo tiene menor efecto en la clorosis férrica en las plantas de Estrategia II que en las especies de Estrategia I (Römheld y Marschner, 1986). La clorosis férrica en viña (*Vitis* spp.) de diferentes plantaciones europeas, se acentuó por causa del frío y de la humedad en las fases iniciales de la estación de crecimiento. El factor causal fue la inhibición del crecimiento y de la actividad radical a bajas temperaturas edáficas (Römheld, 1985). La acumulación de CO₂ en suelos húmedos aparentemente intensifica los efectos de la temperatura (Engels y Marschner, 1996). El efecto de la temperatura del suelo en la clorosis férrica en soja [*Glycine max* (L.) Merr.] depende de la porosidad; afectándose la interacción entre ambas por el tipo de suelo, no relacionándose las diferencias observadas con los niveles de HCO₃ (Inskeep y Bloom, 1986). La clorosis era menos severa a 19 °C que a 12 ó 26 °C. La mayor incidencia de clorosis férrica a altas temperaturas puede resultar del incremento en la respiración, y por el aporte restringido de fotoasimilados a los procesos fisiológicos de la raíz (Bennett et al., 1988).

La severidad de la clorosis férrica en plantas crecidas en suelo se ve afectada por:

- i) Las bajas temperaturas del suelo, que disminuyen el crecimiento y la actividad metabólica radical en las especies no-gramíneas (Marschner et al., 1986).
- ii) Las bajas temperaturas del suelo, que pueden reducir la producción de fitosideróforos y la movilización y absorción de Fe en gramíneas (Moraghan y Mascagni, 1991).
- iii) Elevadas temperaturas edáficas, que pueden hacer disminuir la absorción de Fe en gramíneas por favorecer la descomposición de los fitosideróforos (Awad et al., 1988).
- iv) Las bajas temperaturas del suelo, que pueden incrementar los niveles de HCO₃ en la solución del suelo favoreciendo con ello la solubilidad del CO₂ en la solución edáfica e incrementando la severidad de la deficiencia de Fe (Inskeep y Bloom, 1986).
- v) Las altas temperaturas del suelo, que pueden incrementar los niveles de HCO₃ y la deficiencia de Fe por estimulación de la actividad microbiana y de la producción de CO₂ (Inskeep y Bloom, 1986).
- vi) Las altas temperaturas edáficas, que pueden favorecer la absorción de P y la severidad de la deficiencia de Fe inducida por P (Moraghan, 1987).
- vii) Las altas temperaturas aéreas y radicales, que pueden estimular el crecimiento e inducir a deficiencia de Fe (Brown, 1956; Inskeep y Bloom, 1986).

Burtch et al. (1948), encontraron que el efecto de la variabilidad de la intensidad luminosa en la severidad de la clorosis férrica en cultivos encalados, fue menor que el del contenido hídrico o el de la temperatura. El tipo de luz utilizado en estudios de clorosis férrica, en condiciones controladas, es significativo para ciertas especies de Estrategia I (Moraghan y Mascagni, 1991). Brown et al. (1979), concluyeron que, una mayor concentración de clorofilas en algodón y lechuga crecidas en cámaras de cultivo con lámparas fluorescentes de luz blanca, en comparación con las crecidas en cámaras con lámparas de sodio de baja presión, era debida a una mayor reducción del Fe^{3+} , asociada con la menor longitud de onda en la fuente fluorescente. Las plantas de un cultivar de algodón deficientes de Fe, liberaron protones en las raíces con ambos tipos de lámparas, sin embargo, en las plantas deficientes de Fe crecidas bajo lámparas de sodio de baja presión, se liberó menor cantidad de agentes reductores y se redujo menos Fe^{3+} a Fe^{2+} , que en las plantas crecidas bajo lámparas fluorescentes (Jolley et al., 1987).

Como excepción, en plantas crecidas en soluciones nutritivas a 12 °C en la zona radical y con altas temperaturas aéreas, las concentraciones de Fe al final del periodo experimental fueron más bajas que a 24 °C. En estas plantas, la clorosis férrica también ocurrió. Estos resultados indicaron que en largos periodos de tiempo, el aporte de Fe a la parte aérea puede ser limitante para el crecimiento cuando la capacidad de absorción se ve reducida por bajas temperaturas edáficas y la demanda de Fe asociada al crecimiento es alta. La deficiencia inducida de Fe favorece la biosíntesis y liberación de fitosideróforos por las raíces en especies de gramíneas, y presumiblemente, también puede verse alterada por bajas temperaturas edáficas, la actividad de los sistemas de absorción de complejos Fe-fitosideróforo unidos a membranas plasmáticas (Römheld, 1991). El transporte de Fe, al contrario que el de Cu, Mn y Zn, fue más alto en las plantas de maíz crecidas en suelos que en las que crecieron en solución nutritiva. La mayor eficiencia de las plantas crecidas en suelo respecto a la absorción de Fe podía tener varias razones, incluido un mayor aporte de Fe acoplado a las raíces y de concentración de fitosideróforos, que no se da en las plantas crecidas en la solución nutritiva (Von Wirén et al., 1993).

La temperatura, el estado hídrico del suelo y la luz, afectan a la incidencia y severidad de la deficiencia y la toxicidad de Mn, así como los demás factores implicados en su disponibilidad y que afectan a sus estados de valencia en el suelo (Moraghan y Mascagni, 1991). La absorción de Mn se considera generalmente controlada metabólicamente (Moore, 1972; Moraghan et al., 1986), pues se ve reducida a bajas temperaturas edáficas. Sin embargo, la temperatura puede afectar la solubilidad del Mn en el suelo e indirectamente su absorción (Marsh et al., 1989), como se puso de

manifiesto en soja "Anoka" crecida en suelos calcáreos tratados con 0.2 mg/Kg de Fe-EDDHA, en la que la concentración de Mn aumentó de 59 a 126 mg/Kg con la elevación de 15 a 24 °C (Moraghan, 1985; Marschner et al., 1986). La concentración de Mn correspondiente a soja tratada con 2 mg/Kg de Fe quelado, fue de 8 a 20 mg/Kg, en las plantas crecidas a 15 °C y 24 °C respectivamente. Las plantas a 15 °C eran deficientes de Mn. Sin embargo, el cultivar también puede afectar de forma importante este tipo de respuesta a la temperatura (Moraghan, 1987).

La deficiencia de Mn en cultivos de campo con frecuencia es más severa en primavera que en verano, agravando el problema los climas húmedos y fríos (Batey, 1971). La disponibilidad de Mn es menor en suelos fríos, pero aumenta rápidamente cuando se eleva la temperatura edáfica y se dan ciclos de humidificación-secado (Graham et al., 1985). Mederski y Wilson (1955) demostraron que la deficiencia de Mn en soja es más severa y se da una menor absorción de Mn con bajas temperaturas edáficas y altos niveles de humedad en el suelo. Cuando se incrementó la temperatura edáfica de 10 a 25 °C, se triplicó la acumulación de Mn en cebada crecida en suelo orgánico (Reid y Racz, 1985). El hecho de que el nivel de Mn extraíble con DTPA (ácido dietileno-triamino-pentaacético) y la acumulación de Mn se correlacione de forma significativa con la temperatura del suelo es de particular importancia (Bromfield, 1958a). El efecto de la temperatura sobre los niveles de Mn del suelo es complejo. La actividad microbiana, que se afecta de forma importante por la temperatura, se sabe que puede tanto movilizar como inmovilizar Mn del suelo (Marschner, 1988). Además, la solubilización de MnO_2 por exudados radicales, probablemente es dependiente de la temperatura (Bromfield, 1958b). Ghazali y Cox (1981), encontraron que la combinación de bajas temperaturas radicales y aéreas favorecían la severidad de la deficiencia de Mn en soja, aunque la concentración de Mn se incrementaba a bajas temperaturas, aparentemente como resultado de una situación en la que el crecimiento se veía más favorecido que la acumulación de Mn conforme se elevaba la temperatura, por lo que concluyeron que los requerimientos funcionales de Mn disminuían conforme se elevaban las temperaturas.

La temperatura afecta también a la toxicidad de Mn. Un aumento de la concentración de Mn, en cultivo hidropónico con dos cultivares de soja, a los que se administraron de 0.1 a 15 mg/L de Mn, implicó pérdidas en la producción de peso seco, en un régimen de temperaturas día/noche de 22/18 °C, pero no a 33/28 °C (Heenan y Carter, 1977). El aumento de las temperaturas inducía también una mayor severidad en los síntomas de toxicidad de Mn en *Nicotiana tabacum* L. (Ruffy et al., 1979). En otros experimentos con altas temperaturas, éstas agravaban o no tenían efecto en la toxicidad de Mn en alfalfa (Sutton y Hallsworth, 1958) y cebada (Williams y Vlamis, 1957a).

Epstein (1971), especuló que la patata estaba relativamente libre de toxicidad de Mn, porque las bajas temperaturas edáficas retardaban la absorción de éste. La toxicidad de Mn en patata en experimentos en condiciones controladas era más severa a 30 que a 20 °C, donde el crecimiento era más rápido, por lo que el crecimiento vegetal tenía que considerarse en el estudio de toxicidad de Mn (Marsh et al., 1989). En el cultivar "Bragg" de soja, crecida en suelo calcáreo, se desarrolló una toxicidad severa de Mn a 16 °C pero no a 24 °C (Moraghan et al., 1986). La acumulación excesiva de Mn se asociaba aparentemente con la respuesta a bajos niveles de Fe disponible en especies de Estrategia I (Marschner et al., 1986). Plantas de soja crecidas a 16 °C contenían una concentración de Mn más alta, pero la absorción total de Mn era menor a 16 °C que a 24 °C. En estudios de toxicidad, es importante la diferencia entre los efectos de la temperatura en el crecimiento y en la absorción de Mn. La consideración solamente de la concentración de Mn puede dar lugar a conclusiones incorrectas (Moraghan y Mascagni, 1991; Mozafar y Oertli, 1992).

La influencia de la radiación sobre la nutrición de Mn ha recibido relativamente escasa atención. Ciertos datos indican que la toxicidad y la deficiencia de Mn se intensifican con altas y bajas intensidades luminosas, respectivamente (Hewitt, 1966). El sombreado reducía la concentración de Mn y hacía disminuir la incidencia de la toxicidad de Mn en judía (McCool, 1935). Horiguchi (1988), confirmó que en condiciones de sombra, disminuía la concentración de Mn en maíz y judía. Sin embargo, los síntomas de toxicidad de Mn en ambas especies eran más severos con altas intensidades luminosas incluso a concentraciones de Mn en hoja similares a las de plantas crecidas en condiciones de baja intensidad luminosa, pero con elevados niveles de Mn en la solución nutritiva. En contraste, el arroz acumuló más Mn en plantas con sombra que en condiciones de luz (Fujiwara e Ishida, 1964).

La función del Mn en la nutrición vegetal está asociada con la evolución fotosintética del O₂, con el metabolismo fenólico y del superóxido y con la oxidación de las auxinas, particularmente a través de sus efectos en actividades como la catalasa, la polifenol oxidasa, la peroxidasa, la ácido indolacético oxidasa (AIA-oxidasa) y otras (El-jaoual y Cox, 1998). Consecuentemente, la interacción de la luz y del Mn en la nutrición es compleja. Hewitt (1984a y 1984b), sugirió que la aparición de pigmentación marrón oscura y el daño celular asociado con niveles excesivos de Mn podía estar causado por la oxidación fotoquímica del Mn²⁺ a Mn⁴⁺, y la producción de un potencial oxidante muy positivo. Kriedemann et al. (1985), especularon que la reducción de la razón de clorofilas a/b en hojas deficientes de Mn podía predisponer a las hojas deficientes de Mn a daños por fotoinhibición.

En condiciones de bajas temperaturas aéreas, que suelen ocurrir en condiciones de campo en primavera, disminuye el transporte de Mn y Zn, acompañado por un descenso en la demanda para crecimiento, no afectándose o incluso viéndose favorecidas las concentraciones de Mn y Zn en las raíces. Sin embargo, el transporte de Mn y Zn a la parte aérea disminuía con bajas temperaturas edáficas, independientemente de las temperaturas aéreas y de que las plantas se desarrollaran en suelo o en cultivo hidropónico. Obviamente, el descenso en el transporte no se debía a un efecto del descenso de temperaturas sobre la disponibilidad en el sustrato, pero sí sobre los mecanismos de absorción y/o transporte a la parte aérea (Engels y Marschner, 1996). En melón "Goldstar", el crecimiento y la concentración de Mn y Zn se veían favorecidos con incrementos de la temperatura radical de 25 a 35 °C, mientras que con temperaturas superiores a 35 °C disminuían tanto crecimiento como absorción y transporte a la parte aérea de dichos elementos (Stolzfus et al., 1998). La temperatura radical óptima para el crecimiento y la adquisición de P, Mn y Zn en tomate está entre 25 y 30 °C, mientras que las exposiciones continuas a 36 °C hacían disminuir tanto el crecimiento como la absorción de nutrientes (Klock et al., 1996). En cebada sometida a bajas temperaturas del suelo, disminuía el transporte de Zn de la raíz a la parte aérea, mientras que la absorción neta y la concentración en las raíces eran incluso superiores a 10 °C que a 20 °C de temperatura del suelo, y puesto que no acumulaba mayores niveles de Zn y Mn en las raíces, se sugirió que las bajas temperaturas, hacían disminuir la absorción de Zn y Mn (Schwartz et al., 1987).

Mn y Zn se absorben presumiblemente por las raíces principalmente como iones libres, Mn^{2+} y Zn^{2+} , a través de un potencial electroquímico, entre el apoplasto y el citoplasma (Kochian, 1991). Sin embargo, ha de gastarse energía metabólica para el mantenimiento del potencial electroquímico transmembrana con la acción de una ATPasa unida a membrana plasmática. Así, la absorción de Mn y Zn se bloquea por los inhibidores metabólicos (Clarkson y Lüttge, 1989). Sin embargo, la absorción de K y N, que está acoplada indirectamente a la actividad de ATPasas unidas a membrana plasmática, a largo plazo no se veía disminuida con bajas temperaturas radicales, al menos en plantas con elevadas temperaturas aérea, el mecanismo de inhibición de la absorción de Mn y Zn a bajas temperaturas del suelo queda aún como cuestión por resolver (Engels y Marschner, 1992).

Las concentraciones de Fe y Cu en peso fresco de parte aérea, no se afectaron por las temperaturas edáficas, independientemente de las temperaturas de la parte aérea. Obviamente, la absorción y transporte de estos nutrientes hacia la parte aérea estaba influenciada por la temperatura

edáfica, en la misma medida que el crecimiento (Engels y Marschner, 1996). La absorción de Cu está probablemente controlada metabólicamente (Mengel y Kirkby, 1987). Graham (1981), consideró relevante la dificultad de interpretar estudios de absorción de Cu debido a los errores que se comenten si no se separa el Cu adsorbido al espacio libre radical, del Cu realmente absorbido. La temperatura del suelo afecta la absorción de Cu, alterando la disponibilidad de la fracción de Cu unido a partículas orgánicas, presente en formas solubles e insolubles (Stevenson y Fitch, 1981). Las reacciones de movilización-inmovilización son dependientes de la temperatura indudablemente, y afectan a la solubilidad del Cu del suelo, pero aún no se conoce el proceso al completo (Moraghan y Mascagni, 1991). La absorción de Cu, presente de forma natural en el suelo y aplicado a un cultivo de zanahoria (*Daucus carota* L.) en suelo ácido orgánico en invernadero, aumentó con la elevación de la temperatura del suelo de 8 a 20 °C. Los cambios de temperatura tuvieron un efecto muy reducido en la acumulación de Cu en lechuga (*Lactuca sativa* L.), crecida en suelos tratados con lodos residuales a dosis de 60 Tm/Ha, que contenían 572 mg/Kg de Cu (Siriratpiriya et al., 1985). Dowdy y Larson (1975) mostraron con la aplicación de lodos residuales a cultivos de cebada en invernaderos, en suelos tanto ácidos como calcáreos, inducía una mayor absorción de Cu. En experimentos de campo con maíz, la concentración de Cu no se afectó significativamente por el incremento de la temperatura del suelo de 16 a 35 °C (Sheaffer et al., 1979). Los niveles de Cu extraíble del suelo se afectaron significativamente por la temperatura de incubación y el efecto fue complejo y difirió de acuerdo con el tipo de suelo y el tratamiento de Cu (Alston et al., 1981).

La radiación no parece tener efectos importantes sobre la deficiencia de Cu bajo condiciones de campo. Sin embargo, Graves y Sutcliffe (1974), mostraron que la deficiencia de Cu disminuía la tasa de desarrollo y de inicio de la floración en crisantemo (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) que requería fotoperiodos cortos para la formación del botón floral. Las plantas deficientes de Cu crecidas en condiciones de fotoperiodo corto, mostraban una iniciación de botón floral similar a las que se desarrollaban en situaciones de fotoperiodo largo. La deficiencia de Cu en trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum* L.), no se vio afectada por la reducción de luminosidad en invernadero (Millikan, 1953).

Si bien la teoría está en controversia, existen considerables evidencias de que la absorción de B es un proceso principalmente físico que implica (Mengel y Kirkby, 1987), en la mayoría de los sistemas suelo-planta, la absorción de H_3BO_3 no-ionizado y el subsecuente movimiento pasivo del B en la corriente de transpiración (Lovatt, 1985). Consecuentemente, la relación entre

temperatura y absorción de B es compleja y está influenciada por el efecto de las temperaturas edáficas y aéreas y por el nivel de transpiración (Moraghan y Mascagni, 1991). La deficiencia de B en clima seco y caluroso se atribuyó a la interacción entre la temperatura y humedad del suelo, y la adsorción de B (Singh, 1971). El incremento de temperatura de la solución nutritiva no resultó en un incremento en la concentración de B en raíces de cebada (*Hordeum vulgare* L.), pero sí resultó en una mayor concentración de B en la parte aérea (Vlamis y Williams, 1970). Dicha respuesta se asoció con el efecto de la temperatura sobre la transpiración. En cultivos de cebada en solución nutritiva, la absorción de B se afectó más por la temperatura aérea (Oertli, 1963), que por la temperatura radical (Nable et al., 1990). No hubo efecto de la temperatura del suelo, con temperaturas de 5, 10 y 15 °C, ni en el contenido ni en la concentración de B en cebada (Mahalaksmi et al., 1995).

La absorción de B en maíz cambió muy poco con el incremento de temperatura del suelo de 12 a 20 °C, independientemente del incremento casi siete veces superior en peso seco, y nueve veces superior en evapotranspiración, en dichas condiciones. Sin embargo, la absorción de B se elevó casi diez veces, mientras que el incremento de peso seco y la evaporación se duplicaron, con la elevación de la temperatura de 20 a 31 °C (Walker, 1969), lo que hace difícil explicar estos resultados desde una teoría simple de absorción pasiva de B asociada a la corriente de transpiración. Además, la disponibilidad del B unido a compuestos orgánicos del suelo se veía limitada cuando la temperatura se elevaba de 12 a 20 °C. En dicho experimento, Walker (1969), sólo encontró significación en la relación temperatura de suelo-absorción de B, si bien el estudio analizaba otros dieciséis elementos incluidos Fe, Mn, Cu y Zn.

En cuanto a la influencia de la radiación en la nutrición de B, en general, elevadas intensidades luminosas en condiciones de días largos, acentuaban la deficiencia de B (Hewitt, 1966). La absorción total de B en cebada se estimuló con la ampliación del fotoperiodo y por elevadas intensidades luminosas, debido presumiblemente al incremento en la transpiración (Oertli, 1963). La calidad de la luz afecta a la actividad auxínica (Skoog, 1940), y por un posible efecto en la actividad AIA-oxidasa, una disminución en el aporte de B puede causar una "hiperauxinia", cuyos síntomas son similares a los de la deficiencia de B (Lovatt, 1985).

Los factores medio ambientales, aparentemente, tienen un relativamente escaso papel en la incidencia de la deficiencia de Mo, aunque existen evidencias de que la absorción de Mo está controlada metabólicamente (Moore, 1972). Las elevadas temperaturas acentúan la fijación de

MoO₄ en suelos ácidos y afectan a la efectividad a largo plazo de la fertilización con Mo (Barrow y Shaw, 1974; Johansen et al., 1977), mientras que las bajas temperaturas inhiben la fijación de nitrógeno atmosférico y disminuyen los requerimientos de Mo, con lo que la aplicación de fertilizante de Mo a leguminosas en condiciones de campo, tiene un efecto beneficioso que se asocia con una mayor fijación de N₂ en los nódulos radicales (Anderson, 1956). Plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) crecidas en suelo, requieren más Mo cuando los niveles de NO₃ son excesivos (Freney y Lipsett, 1965), puesto que la absorción de NO₃ se suprime a bajas temperaturas, lo que podría influenciar esta interacción (Williams y Vlamis, 1962; Moraghan y Mascagni, 1991).

La cantidad y calidad de luz, así como la duración del fotoperiodo, son factores que afectan a la fijación de nitrógeno atmosférico por las leguminosas (Gibson, 1987). Por tanto, la variabilidad de la luz es importante en los estudios de leguminosas en los que esté implicado el Mo (Moraghan y Mascagni, 1991).

Existe una gran variedad de procesos en la vida de las plantas que muestran variaciones estacionales, el más importante es la actividad fisiológica, que depende de la estación, y muestra comúnmente un máximo crecimiento en primavera y principios de verano y como consecuencia, una alta demanda de agua y nutrientes en este periodo (Kirchner y Ehlken, 1997). En zonas de clima templado, la actividad fisiológica de las plantas y la disponibilidad de agua y nutrientes del suelo muestran variaciones estacionales (temporales) marcadas, que están estrechamente interrelacionadas y dirigidas tanto por cambios anuales como por cambios en periodos cortos de tiempo en las variables climáticas (Ohmomo y Sakurai, 1997).

Por otra parte, la humedad del suelo en un clima templado y de forma más marcada en un clima mediterráneo, se caracteriza por un máximo en invierno y a principios de primavera y un mínimo en verano. Las variaciones de disponibilidad de macro y micronutrientes en el suelo se ha observado que es similar a esos cambios (Vaughn et al., 1986; Grieve, 1990).

La influencia potencial de los factores ambientales en las concentraciones de los elementos contaminantes como metales pesados y elementos radiactivos, como Sr y Cs, se ha estudiado escasamente, y con resultados, en la mayoría de las veces, conflictivos (Ohmomo y Sakurai, 1997). Nordijk et al. (1992), reportaron resultados experimentales de lisímetros en los que se encontró una correlación positiva entre la concentración de elemento metálico en la parte aérea y la

concentración de dicho elemento en el suelo, pero no se encontraba relación alguna con los cambios de la temperatura ambiente. Sin embargo, Salt y Mayers (1991), si encontraron correlaciones positivas entre la concentraciones de Cs en los pastos y la temperatura aérea durante un primer año de experimentación, pero no en el segundo año. Los resultados de experimentos en campo con cambios estacionales en la absorción de Sr y Cs muestran que el conocimiento de los datos de precipitación y de temperaturas ambientales no son suficientes para describir la influencia del clima en la absorción de estos elementos por las plantas, pues además es necesario conocer las propiedades hidrológicas del suelo, que son muy importantes al respecto, pues explican la influencia climática en los cambios entre distintas localidades y entre diferentes años en la absorción de elementos (Kirchner y Ehlken, 1997).

En la evaluación de los factores de transferencia suelo-planta de elementos contaminantes como U, ^{226}Ra , ^{90}Sr y ^{137}Cs , en diferentes cultivos experimentales entre otros, arroz, trigo, maíz, sorgo, col china, espinaca, rábano, lechuga, patata, boniato, etc., los tipos de clima considerados (sub-tropical y templado) de diferentes regiones de China daban resultados diferentes en cuanto a la absorción de dichos elementos, pues los valores obtenidos en las zonas sub-tropicales eran menores que los de regiones templadas, lo que demostraba la influencia significativa del clima y del tipo de suelo en la transferencia de estos elementos (Li et al., 1997).

En cuanto al transporte dentro de la planta de elementos contaminantes como el Sr y el Rb, los contenidos de Sr en los tallos de trigo se correlacionaban con la transpiración, y la acumulación de Rb dependía de la temperatura con una actividad máxima en el rango de 30 – 35 °C. Sin embargo, a 0 °C y a 40 °C los niveles de Rb eran más bajos en los tallos y aumentaban en las espigas. La savia del xilema llega a todas las zonas de la espiga y el flujo depende de la transpiración. Puesto que la temperatura afecta de forma importante la descarga de Rb desde el xilema, este factor externo puede influenciar considerablemente el flujo de solutos. A 0 °C la transpiración y la velocidad de flujo de solutos en el xilema fueron menores que a 24 – 35 °C, sin embargo, pasó mayor cantidad de Rb a la espiga vía xilema y se acumuló mucha menor cantidad en el tallo a 0 °C en relación a 24 – 35 °C (Kuppelwieser y Feller, 1991).

1.3.- METALES PESADOS Y SUS INTENTOS DE CLASIFICACIÓN.

Los elementos minerales pueden agruparse en tres categorías: los macronutrientes minerales (N, S, P, Ca, K, Mg) que las plantas necesitan a concentraciones más altas (en el rango de mg/g de peso seco), los elementos micronutrientes minerales (Fe, Mn, B, Cl, Zn, Cu, Mo, Ni) que se necesitan en cantidades menores (rango de $\mu\text{g/g}$ peso seco) y varios minerales generalmente no esenciales (F, Se, Cr, I) que se encuentran en los tejidos en concentraciones variables (Kabata-Pendias y Pendias, 1992; Grusak y Dellapena, 1999), y que en ocasiones son "beneficiosos" (Al, Co, Na, Si, V), que en la actualidad se estudian intensamente por su potencial esencialidad (Le Bot et al., 1994; Jones, 1997).

El afán clasificador del ser humano hizo que aquellos elementos requeridos, solamente en muy pequeñas cantidades por los seres vivos, se identificaban en la literatura como microelementos, oligoelementos, o elementos traza esenciales requeridos por las plantas e incluían B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo y Zn, y el término más apropiado a considerar sería el de "micronutrientes" (Marschner, 1995; Welch, 1995). Por consiguiente, el término "elemento traza" podría referirse a los elementos encontrados en las plantas a bajas concentraciones pero no identificados aún como esenciales (Pais y Jones, 1997).

Basadas en la aceptación por la comunidad científica, existen distintas clasificaciones de los elementos y un sistema de clasificación considerando la esencialidad de los elementos y su distribución en la tabla periódica es el utilizado por Pais y Jones (1997), que consideran las siguientes categorías: "elementos traza clásicamente esenciales" en los que se incluye B, Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo y Zn, "elementos traza probablemente esenciales" en los que agrupan Cr, F, Ni, Se y V, y por último "elementos traza con papel promotor fisiológico" en los que estarían Br, Li, Si, Sn y Ti.

El término "metal pesado" suele definirse como metal cuyo peso específico supera los $5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, o que tiene un número atómico por encima de 20 (Barceló y Poschenrieder, 1990; Breckle, 1991). No obstante, dicha definición es algo convencional y, sobre todo, poco uniforme cuando se consideran sus propiedades físico-químicas y sus funciones biológicas. Así, desde el punto de vista de los sistemas vivos, entre los metales pesados hay nutrientes esenciales como el Cobre (Cu), el Hierro (Fe), el Manganeseo (Mn), el Zinc (Zn), el Boro (B) y el Molibdeno (Mo), elementos beneficiosos bajo ciertas circunstancias como el Cobalto (Co), el Niquel (Ni), el Cromo (Cr), El

Silicio (Si), el Vanadio (V) y el Titanio (Ti), etc. (Barceló y Poschenrieder, 1992), y elementos como el Cadmio (Cd), Arsénico (As), Uranio (U), Plomo (Pb), Talio (Tl), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Plata (Ag) y Oro (Au), etc., elementos metálicos y no metálicos que no son biológicamente esenciales, radicando su toxicidad en ello (Page y Chang, 1994; Wang y Evangelou, 1995).

Todo esto explica el valor crítico de dicha definición y las razones y amplitud de discordancia a la hora de interpretarla, que van desde la no-aceptación del término "metal pesado" (Nieboer y Richardson, 1980) y su sustitución por otros como "elementos traza" o "metal traza" (Phipps, 1981), y al establecimiento de una clasificación que relaciona los mecanismos de toxicidad con la tendencia química de estos metales a formar complejos con diversos ligandos (Nieboer y Richardson, 1980). No obstante, tal como puntualiza Tiller (1989), "metal pesado" puede ser un término globalizador, útil para los metales clasificados como contaminantes ambientales y tóxicos para los mamíferos (Domingo, 1994).

La heterogeneidad química de los metales pesados y los distintos grados de afinidad en relación con los ligandos con oxígeno, nitrógeno o azufre o con ambos (Nieboer y Richardson, 1980) explica las funciones y acciones biológicas tan dispares de estos elementos, e incluso la diversificación entre elementos esenciales y no esenciales (Barceló y Poschenrieder, 1990, 1992).

Con el fin de utilizar una terminología que pueda hacernos dividir en grupos los distintos elementos, en adelante denotamos como micronutrientes esenciales a los elementos B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn (Marschner, 1995; Welch, 1995) y el resto de elementos metálicos y metaloides los nombraremos como "no esenciales": Al, Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Pb, Rb, Sb, Se, Si y Sn.

1.4.- TOXICIDAD POR METALES Y ELEMENTOS CONTAMINANTES EN LAS PLANTAS.

La toxicidad por metales pesados en plantas se ha documentado desde hace más de un siglo. Sin embargo, los trabajos se centraban más en la expresión de la toxicidad del metal que en el mecanismo causal de dicha toxicidad (Baker, 1987; Baker et al., 1990). Sólo en las últimas décadas, se han estudiado las causas de la toxicidad por metales pesados en plantas, desde la perspectiva de las propiedades del suelo y la reacción de las plantas (Tabla 1.3.) ante la

Tabla 1.3.- Efectos de la toxicidad por algunos metales pesados en el crecimiento y morfología de las raíces.

<i>Metal</i>	<i>Cultivos</i>	<i>Efectos en las raíces</i>	<i>Niveles fitotóxicos</i> ($\mu\text{g/g}$ suelo)	<i>Concentración en hojas</i> ($\mu\text{g/g}$)	
				<i>Suficiente</i>	<i>Tóxico</i>
Mn	Cereales, legumbres, patata, col	Mal desarrollo de las raíces principales. Incremento de raíces laterales; sistema radical denso y compacto.	150 – 3000	30 – 300	400 – 1000
Pb	Cebolla, judía, haya	Raíces pardas y cortas, reducida extensión radical y la densidad de pelos radicales. No hay efecto en radículas y en emergencia de raíz seminal. Se incrementa la longitud de las radículas de 2º y 3º orden. Estructura radical compacta y ramificada	100 – 400	5 – 10	30 – 300
Zn	Cereales, espinacas, legumbres	Raíces dañadas y se hacen muy finas y ramificadas. Incremento número de raíces laterales. Sistema radical más denso y compacto.	70 – 300	17 – 150	100 – 400
Cu	Cereales, legumbres, espinacas, cítricos, gladiolos	Incremento o disminución de las raíces laterales. Raíces más cortas y más finas. Sistema radical más denso y compacto	60 – 125	5 – 30	20 – 100
Ni	Cereales, centeno, maíz, trébol	Empardecimiento y mal desarrollo. Disminución de la masa y longitud radicales y de la razón raíz:tallo	100	0.1 – 5.0	10 – 100
Cd	Avena, cebada, trigo, judía, soja, rábano, zanahoria	Empardecimiento y mal desarrollo de raíces. Sistema radical con ramificaciones compactadas.	3 – 8	0.05 – 0.2	5 – 30

* Elaborada a partir de Adriano (1986), Breckle (1991), Kabata-Pendias y Pendias (1992) y Baligar et al. (1998)

El enriquecimiento de los suelos provoca efectos de toxicidad por metales en plantas, se produce de forma natural por anomalías geoquímicas, o bien por la actividad del hombre en la explotación de fuentes minerales y desechos industriales. Los efectos de toxicidad por metales han sido estudiados ampliamente, en diferentes especies de plantas y en diferentes genotipos de una misma especie (Voutsas et al., 1996; Pinamonti et al., 1997). Además, cada planta presenta distintos efectos de toxicidad a iguales concentraciones de un mismo metal. Sin embargo, metales considerados esenciales como el Mn, Fe, Cu, Zn y Mo, y otros más específicos como son el Ni, Co y V, pueden llegar a ser tóxicos a concentraciones anormalmente altas (Gupta y Gupta, 1998).

La toxicidad por metales pesados en cultivos agrícolas, presenta un desafío para los investigadores de fisiología vegetal concerniente a la calidad y producción de cultivos. Por otra parte, el potencial de acumulación de metales pesados puede incluso proveer la oportunidad de remediar biológicamente suelos contaminados con metales pesados con el uso de especies acumuladoras y variedades de cultivos tolerantes a metales que pueden ser producidas bien por técnicas de mejora convencional o por técnicas de ingeniería genética. En cualquier caso, el éxito en una o las dos tendencias de investigación requiere la comprensión de los mecanismos de acumulación de metales pesados, toxicidad y tolerancia en plantas (Wang y Evangelou, 1995).

La acidez, salinidad y alcalinidad del suelo, las adiciones antropogénicas de elementos tóxicos y las deficiencias de nutrientes inducen efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (von Uexkull y Mutert, 1995). La escasa productividad en suelos ácidos se debe a la combinación de niveles tóxicos de Al, Mn, y protones, y a la deficiencia de N, P, K, Ca, Mg y algunos micronutrientes como el Fe y el Zn. Los suelos salinos contienen predominantemente cloruros y sulfatos de Na, Ca y Mg, y los suelos alcalinos contienen niveles excesivos de NaHCO_3 y de Na intercambiable (Szaboles, 1979; Baligar et al., 1998).

Elementos que comúnmente aparecen en concentraciones tóxicas en suelos alcalinos son el Na, Mo, B, Se y bicarbonatos (Gupta y Abrol, 1990). La deficiencia (N, P, K, Ca, Mg, B, Fe, Cu, Mn, Mo, Si, Zn) y toxicidad (Al, Mn, Fe, S, B, Co, Mo, Cr, Cl, Na) en los suelos de todo el mundo está ampliamente documentada (Clark, 1982; Baligar y Duncan, 1990). Los metales pesados en los suelos (Cd, Cr, N, Pb, Cu, Zn) se derivan frecuentemente de la alteración de materiales de la roca madre, de aluviones glaciares, de sedimentos fluviales u otros sedimentos (Tabla 1.4.). Procesos naturales (gases de erupciones volcánicas, lluvia y nieve, bruma marina, tormentas de arena, incendios forestales) son los mayores contribuyentes al aporte atmosférico de metales pesados

(Alloway, 1995a; Alfani et al., 1996; Reimann et al., 1997). En las décadas recientes, con numerosas actividades antropogénicas, tales como la combustión de hidrocarburos fósiles, actividades industriales, minería y siderurgia, escapes de automoción y suministros agrícolas (fertilizantes, estiércoles, encalados, escorias, lodos de aguas residuales, pesticidas), han contribuido a la deposición atmosférica de metales pesados al ecosistema edáfico (Hoffman et al., 1995; Chronopoulos et al., 1997).

Tabla 1.4.- Origen de diferentes elementos contaminantes en los suelos*.

<i>Origen</i>	<i>Elementos</i>
<i>Natural</i>	
Pedogénesis	Mayoría de los metales pesados
Alteración de materiales parentales subyacentes	Cd, Cr, Ni, Pb, Cu, Zn
Sedimentos fluviales	
Gases de erupciones volcánicas	Cd, Hg, Zn, Cr, Cu, Mn, Ni
Lluvia y nieve	Pb, Cd, Cu, Zn
Aerosoles marinos (espuma, bruma)	Cu, Mn, Ni, As, Cd
Polvo continental	Mn, Ni, Cr, Fe
Incendios forestales	As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg
<i>Antropogénico</i>	
Combustiones de derivados del petróleo	Zn, Cd, Cu, Co, As, Ni, Pb
Combustiones de aceites	Ni, Cu, Pb
Chimeneas domésticas e industriales	Cu, Ni, Pb, Zn
Emisiones y desechos de automoción	Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn
Minería y siderurgia	
Industria del Pb	Cd, Cu, Pb, Zn
Industria del Zn	Cd, Cu, Pb, Zn
Industria de Cu/Ni	Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn
Fertilizantes	Cd, Cr, Ni, Zn
Fitosanitarios	Cu, Hg
Encalados	Cu, Mn, Zn
Escorias básicas	Cd, Ni, Pb
Estiércoles	Co, Cu, Zn
Lodos de aguas residuales	Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, Cu, Mn

*Extraída de Baligar et al. (1998).

Las plantas industriales que utilizan la energía de la combustión del carbón generan grandes cantidades de ceniza y residuos, los cuales contienen niveles variables de metales pesados (Co, Cr, Cu, Mn, Zn, Cd, As, Pb, Ni). Actualmente estas industrias en Estados Unidos generan más de 84 millones de toneladas de residuos (Brendel et al., 1997). En los últimos cien años, la utilización a nivel mundial de fertilizantes, cal, pesticidas, estiércoles, lodos y compost, todos ellos

con altas concentraciones de metales pesados, se han ido incrementando. La deposición de lodos de aguas residuales en suelos agrícolas (Tabla 1.5.), es actualmente una alternativa a su acumulación y enterramiento y el interés de su aplicación a tierras de cultivo y en la descontaminación de áreas de minería se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas (Merrington et al., 1997). Dichos lodos son una fuente valiosa de nutrientes vegetales (N, P, Cu, Fe, Mn, Zn) y materia orgánica, pero también contienen metales pesados (Cd, Cr, Ni, Pb, etc.; ver Tabla 1.5.) que son potencialmente dañinos para plantas y animales (Henry y Harrison, 1992; Juste y Mench, 1992; Alloway, 1995b).

El uso de compost procedente de residuos urbanos, debido a la elevada aplicación (más de 30 Tm/Ha/año) y alto contenido en metales pesados, lleva a una mayor acumulación de estos en suelos que el uso de lodos residuales (menos de 2.5 Tm/Ha). Bajo tales condiciones, los metales pesados Cd, Zn, Cu, Ni y Cr se consideran de interés primordial como contaminantes potenciales.

Tabla 1.5.- Intervalos encontrados de distintos elementos en lodos contaminados aplicados a diferentes suelos agrícolas^a.

	<i>Mínimo</i> ^b	<i>Medio</i> ^c	<i>Máximo</i> ^b
Hierro (Fe)	1.000	17.000	154.000
Cinc (Zn)	101	1.700	49.000
Cobre (Cu)	84	800	17.000
Flúor (F)	80	260	33.500
Manganeso (Mn)	32	260	9.870
Plomo (Pb)	13	500	26.000
Cobalto (Co)	11.3	30	2.490
Cromo (Cr)	10	500	99.000
Estaño (Sn)	2.6	14	329
Niquel (Ni)	2	80	5.300
Selenio (Se)	1.7	5	17.2
Arsénico (As)	1.1	10	230
Cadmio (Cd)	1.0	10	3.400
Mercurio (Hg)	0.6	6	56
Molibdeno (Mo)	0.1	4	214

^a (Chaney, 1983; Pais y Jones, 1997); ^b valor descrito (mg kg^{-1}); ^c valor establecido (mg kg^{-1})

El grado de movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados en los suelos se ve afectado por el pH, la temperatura, los potenciales de oxidorreducción, la capacidad de intercambio catiónico, la formación de ligandos con aniones y la composición y riqueza de la solución edáfica (Alloway, 1995b y 1995c). En determinadas condiciones de pH, la movilidad relativa de los

metales pesados en suelos ácidos decrece en el orden: Cd > Ni > Zn > Mn > Cu > Pb > Hg. Mundialmente, la acidificación edáfica tiende a incrementarse como resultado de la lluvia ácida, el uso creciente de fertilizantes nitrogenados y orgánicos, la pérdida de bases por incremento de la producción de los cultivos y la lixiviación de las bases por el NO₃⁻ de la superficie del suelo (Ma y Rao, 1997). Cuando se incrementa la acidez del suelo, la movilidad y la biodisponibilidad de metales es mayor. Los metales pesados de origen antropogénico son frecuentemente más solubles que los presentes en el suelo de forma natural. Elementos como el Pb, Cr, As y Hg, forman complejos estables con la materia orgánica, acumulándose en la capa superficial del suelo. Así, la movilidad de los metales pesados especialmente Co, Cd y Zn, se ve favorecida por la acidificación del suelo (Lambers et al., 1998).

Tanto el exceso como la deficiencia de un mineral afectan al crecimiento (peso seco, razón raíz:tallo) y a la morfología (longitud, espesor, área superficial, densidad) de raíces y pelos radicales. La deficiencia de nutrientes induce la formación de raíces más finas y la toxicidad por metales pesados estimula la iniciación y el crecimiento de raíces laterales secundarias y terciarias, mientras que la raíz principal y las raíces laterales de primer orden (seminal/basal) quedan suprimidas (Breckle, 1991).

1.4.1.- Aspectos ecológicos de la tolerancia a elementos tóxicos.

La observación, en los últimos treinta años, de diferentes especies de plantas crecidas en suelos, con y sin contaminación, ha atraído la atención sobre los aspectos evolutivos de las plantas a la tolerancia de metales pesados (Baker et al., 1990).

La evolución de las plantas a la tolerancia a metales pesados, es similar a la de la tolerancia a otros tipos de estrés medio ambiental. Sin embargo, parece ser que mientras que la adaptación de las plantas a tipos de estrés medio ambiental, que ocurren de forma natural, se desarrolla en periodos largos en el tiempo, la evolución de las plantas en cuanto a la tolerancia a metales pesados puede aparecer en muy pocos años. Además, esta evolución está gobernada por la disponibilidad de genes para la adaptación apropiada. Un ejemplo de la tolerancia al Zn, se puso de manifiesto cuando se encontraron diferentes grados de adaptación en cinco especies distintas crecidas bajo torres eléctricas, pero sólo una de ellas mostró una resistencia a niveles de Zn similares a plantas

encontradas en minas de dicho nutriente (Bradshaw y McNeilly, 1991). Como indicaba Bradshaw (1984), la restricción en el aporte de variabilidad genética puede limitar directamente el proceso evolutivo y el alcance de la adaptación.

Los términos “sensibilidad” y “resistencia” se han utilizado con frecuencia para describir las consecuencias y las reacciones de plantas expuestas a tratamientos con metales pesados en el medio de crecimiento (Levitt, 1980). La “sensibilidad” se refiere a los efectos de estrés por metales pesados con resultado de daño o muerte de la planta y la “resistencia” es la reacción de la planta manteniendo su supervivencia y su reproducción (Wang y Evangelou, 1995). De acuerdo con Baker (1987), la resistencia de plantas a metales pesados puede lograrse con dos tipos de estrategias: *Anulación*, o como una planta se protege externamente de la influencia del estrés, y *Tolerancia*, o como una planta sobrevive a los efectos del estrés interno. Esta última es conferida por la posesión de mecanismos fisiológicos específicos que, colectivamente, permiten a la planta funcionar normalmente, aunque sea en presencia de altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos. Por tanto, está implicada una base genética para la tolerancia a metales pesados. La distinción entre anulación y tolerancia puede ser arbitraria, porque la tolerancia se puede entender como un mecanismo de anulación que opera a niveles subcelulares (Verkleij y Schat, 1990; Lambers et al., 1998).

Las evidencias indican que las distintas especies vegetales difieren substancialmente en su sensibilidad a metales pesados. Hay especies con un alto umbral de resistencia y otras que tienen un umbral extremadamente bajo (Tabla 1.6.).

Otros estudios señalan que la tolerancia a estos iones ocurre sin la evolución de razas de plantas tolerantes (Baker et al. 1990). Poblaciones que crecen en suelos normales rara vez presentan individuos tolerantes a metales pesados. La ventaja de los individuos tolerantes crecidos en condiciones de toxicidad del suelo está generalmente asociada con desventajas cuando ese mismo individuo crece en condiciones normales de suelo (Bradshaw y McNeilly, 1991). En otras palabras, hay un coste implícito en el desarrollo evolutivo de la tolerancia a metales pesados. En una población normal, creciendo en un suelo normal, cualquier individuo que presente tolerancia es portador de una desventaja selectiva. Aún cuando las diferencias en poblaciones entre especies sensibles y tolerantes sugieren un proceso evolutivo en la tolerancia a metales pesados, las investigaciones indican que una tolerancia constitutiva al estrés por metales también existe (Baker, 1987).

Tabla 1.6.- Concentraciones de elementos¹ generalizadas en hojas maduras de varias especies².

<i>Elemento</i>	<i>Deficiente a Normal</i>	<i>Suficiente a Tóxico</i>	<i>Excesivo</i>
Mn	15 – 25	20 – 300	300 – 500
B	5 – 30	10 – 200	50 – 200
Zn	10 – 20	27 – 150	100 – 400
Sb	–	7 – 50	150
Cu	2 – 5	5 – 30	20 – 100
F	–	5 – 30	50 – 500
Pb	–	5 – 10	30 – 300
Be	–	<1 – 7	10 – 50
Ni	–	0.1 – 5	10 – 100
Li	–	3	5 – 50
Ti	0.2 – 0.5	0.5 – 2.0	50 – 200
Se	–	0.001 – 2	5 – 30
Zr	0.2 – 0.5	0.5 – 2.0	15
As	–	1 – 1.7	5 – 20
V	–	0.2 – 1.5	5 – 10
Co	–	0.02 – 1	15 – 50
Mo	0.1 – 0.3	0.2 – 1	10 – 50
Ag	–	0.5	5 – 10
Cr	–	0.1 – 0.5	5 – 30
Cd	–	0.05 – 0.2	5 – 30
Ba	–	–	500
Sn	–	–	60
Tl	–	–	20
Hg	–	–	1 – 3

¹mg kg⁻¹ peso seco; ²Fuente: Kabata-Pendias y Pendias (1992) y Pais y Jones (1997)

El concepto de tolerancia constitutiva indica que la tolerancia a metales no es sólo plástica sino también funcional (Verkleij et al., 1991). De todas formas, en la mayoría de los casos, la tolerancia a metales pesados parece estar determinada genéticamente (Wang y Evangelou, 1995). Estudios recientes con cultivos celulares muestran una tolerancia inducible, debido principalmente a la producción de compuestos complejo-metálicos (Howden et al., 1995), con ácidos orgánicos (Wang et al., 1991) y fitoquelatinas (Zenk, 1996; Vacchina et al., 1999), tras la exposición de los cultivos a metales pesados. De esta forma, la tolerancia al Cd de un cultivo se pudo incrementar por la exposición previa de ese cultivo celular a dicho metal (Jackson et al. 1984). Estos estudios sugieren que la tolerancia a los metales está controlada parcialmente por cambios inducidos por dichos iones en los procesos fisiológicos de las plantas. Sin embargo, hay que tener presente que la

tolerancia en plantas intactas, adquirida a través de la evolución, no es comparable a la tolerancia que se desarrolla en cultivos celulares y que la tolerancia a metales pesados es altamente específica al metal e implica, ante todo, niveles de metales en condiciones de toxicidad (Scheller et al., 1987; Keltjens y Van Beusichem, 1998).

La resistencia múltiple a metales se asocia a menudo con casos de niveles altos de estos iones en los suelos. Sin embargo, hay casos de resistencia cruzada o cotolerancia, donde la resistencia a uno o más metales, confiere resistencia a otros metales presentes a niveles bajos o no tóxicos (Baker, 1987; Verkleij y Schat, 1990). Además, la tolerancia a metales pesados presentes en bajos niveles también se ha observado y claramente la tolerancia a metales en plantas superiores es un fenómeno complejo (Schat y Vooijs, 1997).

1.4.2.- Estrategias para la tolerancia y acumulación de elementos tóxicos.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la tolerancia de los vegetales a metales pesados, basados en estudios obtenidos en plantas enteras, tejidos, células y observaciones subcelulares (Neumann et al., 1997). Existen plantas y variedades que se han adaptado genéticamente a resistir niveles tóxicos de determinados nutrientes presentes en su medio (plantas "eficientes") en condiciones de toxicidad. Los mecanismos de adaptación que intervienen en algunos casos son similares a los que se dan en condiciones de deficiencia y en otros casos son específicos. En general estos mecanismos incluyen: a) disminución de la absorción del elemento, por cambios en los transportadores del mismo en el plasmalema de las células de la raíz; b) expulsión mediante bombas de extrusión y bombeo del elemento hacia fuera de las células de la raíz; c) almacenamiento del elemento en las vacuolas u otras estructuras; d) excreción, del exceso, por glándulas secretoras (hidatodos) en las hojas (Álvarez-Tinaut, 1995; Ye et al., 1997). Ejemplos de estas adaptaciones son también la acumulación de los metales en tricomas, los incrementos de la exudación de sustancias quelantes de metales, la unión de metales a la pared celular, la restricción del transporte desde la raíz a la parte aérea, la alteración de la permeabilidad y estructura de las membranas, la alteración del metabolismo celular, la producción de componentes intracelulares secuestradores de metales y bombeo activo al interior de las vacuolas, entre otros (Álvarez-Tinaut, 1995; Lasat et al., 1998). Las evidencias sugieren que la tolerancia a metales puede ser conseguida por la simultaneidad de más de uno de estos mecanismos (Baker, 1987; Parker y Pedler, 1997).

Una amplia teoría que puede unificar la mayoría de los mecanismos de tolerancia a metales pesados es la Teoría de la Compartimentación (Cunningham y Berti, 1993; Cunningham et al., 1997), que se basa en la habilidad de la planta para almacenar el exceso de metales en órganos o compartimentos subcelulares, en donde la actividad metabólica que tiene lugar es insensible o escasa e incluso se ha observado que algunas plantas pueden llegar a transportar el exceso de metal a hojas viejas justo antes de su caída (Wang y Evangelou, 1995).

En suma, un gran número de especies vegetales, puede llegar a mantener relativamente baja la concentración foliar de metales pesados, a pesar de existir un alto rango de concentraciones de estos en el exterior. Una fracción significativa del metal pesado almacenado en la raíz se localiza en el espacio libre apoplásmico, probablemente asociada con la fracción de pectinas y glicoproteínas de la pared celular (Peterson, 1969; Verkleij y Schat, 1990). De hecho, se ha sugerido que la correlación positiva observada entre la resistencia a metales y la razón entre la concentración de metal pesado entre la raíz y el tallo, puede ser causada por cambios en la capacidad de unión del metal en la pared celular en plantas resistentes (Fitter y Hay, 1987). La restricción del transporte de metales pesados de la raíz al tallo en algunas plantas, no quiere decir que los procesos metabólicos sensibles al metal puedan tener lugar primariamente en los tallos. Las plantas tolerantes pueden acumular metales pesados en la pared celular (Wang et al., 1990). En muchos casos, especies o genotipos tolerantes acumulan mayor cantidad de metales pesados en la parte aérea que en la raíz, dependiendo del tipo de metal pesado al que se expone (Wang et al., 1992a). Evidencias más recientes, obtenidas a partir de estudios a nivel subcelular, por técnicas de análisis de flujo compartimental y del flujo vacuola/extravacuola, revelan que en las especies o genotipos tolerantes, el exceso de metales pesados es almacenado en vacuolas metabólicamente menos activas (Vögeli-Lange y Wagner, 1990). Estos metales pueden estar de diferentes formas dependiendo de su potencial de acomplejación con ligandos orgánicos o inorgánicos y la disponibilidad de éstos (Wang et al., 1992b).

Ciertas propiedades de las paredes celulares, particularmente las características de la superficie de la pared de las células de la raíz, pueden influir en la disponibilidad del metal para su captación, que puede llevarse a cabo por afectación de las condiciones electroquímicas de las membranas plasmáticas y la función específica de enzimas de la pared celular, las cuales pueden afectar a la tolerancia a metales pesados (Allan y Jarrell, 1989; O'Shea et al., 1990). Es importante el fenómeno de almacenamiento de metales pesados en los compartimentos de la planta menos activos metabólicamente, como son la pared celular, como compartimento extracelular, y la

vacuola, como intracelular. El papel de la pared celular en la tolerancia a metales pesados puede ser primariamente la reducción de la actividad del metal por su captación y unión a la misma. Además, en ella actuarían enzimas específicas. Esta capacidad de unir metales está determinada por la estructura porosa y las cargas de superficie de los grupos funcionales de pectinas y glicoproteínas. La diferencia en las propiedades químicas de la superficie de la pared celular con respecto a la selectividad a iones metálicos entre varias especies o genotipos tolerantes y no tolerantes, puede atribuirse a diferencias endógenas de las plantas en cuanto a cantidad, composición y disposición estructural en el espacio de los componentes de la pared celular, particularmente pectinas y glicoproteínas (Wang y Evangelou, 1995).

El papel de la vacuola en la detoxificación de metales pesados se basa en la capacidad de almacenamiento de iones en forma de complejos solubles y/o de precipitados insolubles. Los ligandos que participan en la formación de complejos pueden ser ácidos orgánicos (sobre todo citrato), fitoquelatinas y fitatos. Todos ellos se producen extravacuolarmente y deben ser transportados con o sin metal al interior vacuolar (Gawel et al., 1996). Los ligandos que participan en la formación de precipitados son, sobre todo, los sulfuros. La compartimentación vacuolar parece jugar un importante papel en mantener los metales pesados lejos del citoplasma, que es donde se llevan a cabo importantes funciones metabólicas (Jemal et al., 1998). Además, la formación de estos complejos organometálicos y precipitados juega un importante papel en la salvaguarda de la célula frente a metales pesados por una gran disminución de la actividad de los mismos. Los ácidos orgánicos (citrato, malato, etc.) intervienen en la tolerancia a bajas concentraciones de metales, mientras que fitatos, fitoquelatinas y sulfuros son importantes en la tolerancia a moderadas y altas concentraciones de metales (Zenk, 1996). Ambas, la formación de compuestos solubles y sólidos, son importantes en la tolerancia a los metales (Bae y Mehra, 1997; Sagner et al., 1998).

En la literatura se hace hincapié en los mecanismos de tolerancia interna, particularmente la compartimentación vacuolar, el secuestro por fitoquelatinas e incluso péptidos de unión al Cd, parecen ser que son sólo los ejemplos disponibles por ahora. Es evolutivamente concebible que las plantas posean ambos mecanismos, externos e internos ya que podría ser una selección evolutiva imprudente para las plantas superiores el poseer sólo mecanismos de tolerancia interna. La ejecución de mecanismos de tolerancia interna es costosa energéticamente, porque el proceso permite a los metales pesados atravesar la membrana plasmática, luego produce y transporta necesariamente compuestos acomplejantes y finalmente complejos de metales pesados a las

vacuolas. Por tanto, la resistencia de las plantas a los metales se puede producir, primero con un mecanismo no consumidor de energía, de compartimentación extracelular (unión a pared celular), en función de la magnitud de las cargas negativas de la pared celular, y segundo, con inactivación de esos metales, pasándolos al plasmalema mediante el empleo de mecanismos internos, tales como la producción de componentes secuestradores y de la compartimentación vacuolar del metal (Wang y Evangelou, 1995). Éstas presunciones en forma alguna implican el que las características inherentes de unión a metales de las paredes celulares se consideren como uno de los posibles mecanismos de la resistencia vegetal a los metales. Se necesitan más estudios para dilucidar entre las hipótesis de mecanismos de resistencia en el interior y el exterior celular que se han nombrado anteriormente. Además, se han propuesto mecanismos distintos para una misma especie vegetal tolerante a un mismo metal (Verkleij y Schat, 1990).

Para finalizar, puede sugerirse que la tolerancia a metales pesados no es simplemente la ejecución de un mecanismo simple. De hecho, la expresión de la tolerancia puede ser la integración de todos los mecanismos posibles que una planta posee y opera en un estado específico de crecimiento y con unas condiciones específicas de medio interno. Esta conclusión, parece estar respaldada por la evolución de los mecanismos basados en ligandos en la vacuola. Es además concebible que el papel de la compartimentación de la pared celular puede ser importante en plantas que acumulan cantidades mucho mayores de metales pesados en raíces que en las partes aéreas, con la mayoría de los metales unidos en la pared celular. Por otra parte, el papel de la compartimentación vacuolar puede dominar en plantas que acumulan niveles mucho más altos de metales pesados en las partes aéreas que en las raíces, con la mayoría de los metales localizados en las vacuolas (Wang y Evangelou, 1995).

1.5.- FITORREMEDIACIÓN.

1.5.1.- Introducción: Biorremediación.

La sociedad genera una enorme cantidad de residuos o desechos anualmente. De hecho, en EE.UU. se producen $300 \cdot 10^6$ Tm por año, aproximadamente 1.3 Tm *per capita*. Estos residuos provienen de todos los sectores de la sociedad: las familias generan aproximadamente 9 Kg por persona y día; con respecto a la industria, las empresas de alimentación, textiles, petrolíferas,

químicas, transportes, etc., producen millones de kilogramos más, sin contar con el hecho de que las industrias invierten billones de dólares al año en la reducción de dichos residuos. La industria química solamente, genera aproximadamente $5500 \cdot 10^6$ Kg de residuos anuales y la cantidad de productos químicos vertidos a aguas superficiales, inyectadas en suelos o depositadas sobre el terreno, superan los $2.2 \cdot 10^{12}$ Kg por año (Bollag y Bollag, 1995). La industria agrícola también produce toneladas de productos químicos peligrosos en forma de pesticidas. En 1992, alrededor de 900 millones de kilogramos de estos productos químicos, incluyendo fungicidas, insecticidas y herbicidas, se emplearon para mejorar la producción de cultivos. Aunque los pesticidas y los fertilizantes contribuyen a conseguir mejores producciones agrarias, también contribuyen a crear problemas de contaminación en suelos y aguas. De hecho, este fenómeno proveniente de la agricultura, significa el 40% de la contaminación total en los ríos de EE.UU. (Cunningham y Lee, 1995). Las industrias químicas actualmente presentan en nuestro medio ambiente un riesgo para la salud. Son muchos los productos y residuos de empresas químicas que tienen efectos sospechados o conocidos de carácter carcinogénico, mutagénico, sobre el desarrollo y la reproducción, o neurotóxicos. Más de 20.000 Kg de productos carcinogénicos, agentes conocidos que incrementan los riesgos de cáncer, se han depositado en los suelos procedentes de deposiciones de residuos (Bollag y Bollag, 1995). Además, la media de ingestión en adultos es aproximadamente de 0.02 $\mu\text{g/g}$ peso de cuerpo/día de pesticidas como el (diclorodifeniltricloroetano) DDT, dieldrín, y toxafeno, en muchas zonas agrícolas de EE.UU. Obviamente, exposiciones a estos y otros residuos químicos liberados al ambiente pueden tener efectos agudos y acumulativos sobre la salud (Frankenberger y Losi, 1995).

Una tecnología que se presenta prometedora en términos de costes y efectividad en cuanto a la eliminación de contaminación es la biorremediación (Cunningham et al., 1997; Adriano et al., 1999), que consiste en el uso de microorganismos o plantas para descontaminar o detoxificar un ambiente, la mayoría de las veces por transformación o degradación de los contaminantes (Matsumoto, 1999). Cuatro técnicas básicas se usan en biorremediación:

- 1) Estimulación de la actividad de microorganismos indígenas o autóctonos por la adición de nutrientes, regulación de condiciones de oxidorreducción, optimización de pH, etc. (Adriano et al., 1999).
- 2) Inoculación en los lugares contaminados con microorganismos con una específica y extraordinaria capacidad biotransformante (Bosecker, 1997).

- 3) Aplicación de “enzimas inmovilizadas”. El proceso de inmovilización confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente (Arroyo, 1998). Ejemplos de su utilización se tienen en el tratamiento de benceno por *Pseudomonas putrida* incluidas en geles de poliacrilamida (Chibata y Tosa, 1980) y la reducción de nitratos a nitritos en aguas residuales (Mellor et al., 1992).
- 4) Uso de plantas (fitorremediación) para eliminar, contener, o transformar los contaminantes (Salt et al., 1998; Burken, 1999; Meagher, 2000).

Hasta la fecha se han “biorremediado” de una forma eficaz relativamente pocos compuestos contaminantes. Las investigaciones continúan identificando organismos y métodos capaces de degradar una gran variedad de compuestos y sustancias contaminantes, y la biorremediación constituye una innovadora y atractiva técnica para la reducción de la contaminación, ya que muchas ventajas de su aplicación se obtienen por técnicas convencionales. Por ejemplo, las técnicas de biorremediación son generalmente más económicas que algunas técnicas tradicionales de eliminación de contaminantes. Se estima que el coste de la biorremediación podría ser de un tercio a la mitad del costo de incineración (Skipper y Turko, 1995). Además, los contaminantes pueden tratarse en el lugar contaminado, por lo que no hay necesidad de exponer personal para su recogida y transporte y se evitan también accidentes de transporte. Junto con esto, las técnicas utilizadas puede esperarse que tengan un mínimo impacto ambiental, puesto que la biorremediación es un proceso natural y con frecuencia, como resultado de su acción, se produce la completa degradación de los contaminantes (Rulkens et al., 1998).

Existen una serie de problemas o inconvenientes cuando se pretenden llevar a cabo técnicas de biorremediación. En primer lugar, para que los organismos reduzcan eficazmente los niveles de contaminantes, su población debe crecer. Para esto, sus condiciones de crecimiento han de ser determinadas y mantenidas en el lugar contaminado. El control de estas condiciones puede ser dificultoso, particularmente si las condiciones son muy cambiantes como sucede en determinados ecosistemas como pueden ser los mediterráneos. Incluso en un medio ambiente ideal, un organismo puede preferir metabolizar una sustancia o compuesto determinado, más asequible o disponible como nutriente, que se encuentre en el área contaminada, en lugar de coger el contaminante, o el

contaminante puede ser completa o parcialmente inaccesible para el organismo que lo va a degradar (Frankenberger y Losi, 1995). Además, el ambiente natural puede contener sustancias (por ejemplo, metales pesados) u otros organismos que inhiban el crecimiento de la población descontaminante (Bollag y Bollag, 1995; Zhu et al., 1999).

1.5.2.- Biorremediación con plantas superiores: *Fitorremediación*.

La capacidad de las plantas para transpirar grandes cantidades de agua es significativa y ha sido explotada en la deshidratación de lodos y cienos (Sassaman y Kauffman, 1992), en la prevención de escorrentía de agua a través de capas de arena, así como en la contención de agua contaminada (Licht, 1993). Las plantas se han integrado en las tecnologías para el control de la erosión y se han usado comúnmente para mantener la integridad de los taludes, cunetas, zanjas, fosos, etc. En numerosos planes contra la erosión, se especifica la necesidad de la cubierta vegetal (Cunningham y Lee, 1995), y su utilización para estabilizar la matriz edáfica contaminada por metales y para la descontaminación de suelos y sedimentos (Oyler, 1988; Wenzel et al., 1992; Yang et al., 1997).

Las plantas absorben contaminantes orgánicos e inorgánicos del suelo, y las transformaciones metabólicas posteriores de estos contaminantes absorbidos hacen potencialmente explotable su uso para descontaminar suelos, pero no todos los casos son posibles (Cunningham et al. 1996). Debido a las limitaciones que implican la profundidad de las raíces y la disponibilidad de los nutrientes necesarios, la mayoría de los investigadores en este campo se han centrado en contaminantes relativamente no lavables, que posean un bajo riesgo para la salud o el medioambiente. Estas restricciones no son tan formidables ni tan exclusivas como podría parecer a primera vista, sin embargo, deben recordarse cuando consideramos la utilidad de un sistema dado para la aplicación en campo (Cunningham et al., 1997).

Las plantas tienen una larga historia de uso para descontaminación (Tchobanoglous, 1991; Green y Upton, 1992). Su uso en remediación de suelos es más reciente. Sin embargo, datos reportados sobre eliminación de vertidos de pesticidas (Finklea y Fontenot, 1993), degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Banks y Schwab, 1993), disolventes clorados (Anderson y Walton, 1992), DDT (McMullin, 1993), dioxanos (Bell, 1992) y fenoles (Boyle y Shann, 1992), están proliferando (Banks et al., 1999). Los datos disponibles de remediación de metales pesados

sugieren que es un tema que va en progresivo avance (Utsunomiya, 1980; Baker y McGrath, 1991; Burken, 1999), y se está llevando a cabo en un número importante de laboratorios (Beil et al., 1998; Pilon-Smits y Pilon, 2000).

“Fitorremediación” se define como el uso de plantas superiores para eliminar, contener, o hacer inofensivos, contaminantes medio ambientales (Raskin y Kumar, 1994; Salt et al., 1998). Esta definición se aplica a todo proceso biológico, químico y físico, realizado o influenciado por vegetales, que ayude en la remediación de sustratos contaminados. El concepto en sí mismo no es nuevo. El uso de plantas en esquemas de tratamiento de aguas residuales data de 300 años atrás (Hartman, 1975). La “biorremediación” basada en el uso de vegetales superiores está también implicada en el control de la contaminación aérea (Raloff, 1989), y en la ambiental urbana (Wire Service Story, 1992). Este papel, sin embargo, confirmaría los objetivos de los métodos de “fitorremediación” a su medio último: suelos contaminados, lodos, cienos, y sedimentos (Beil et al., 1998; Huang et al., 1998; Collins, 1999; Meagher, 2000).

La capacidad de las plantas para sobrevivir en suelos declarados legalmente “arriesgados” se ha probado que es impresionante. Muchas personas no familiarizadas con lugares “arriesgados” o peligrosos, imaginan estos lugares áridos. Esto es verdad, cuando están desprovistos de vegetación, tras haber sufrido activas técnicas de mantenimiento (aplicación de herbicidas, empedrados, etc.) para controlar una vegetación digamos “anómala”. Muchos suelos, legalmente clasificados como “arriesgados”, revegetan rápidamente cuando se eliminan estas técnicas de mantenimiento (Cunningham y Ow, 1996). No en todos los lugares se revegeta el suelo con igual rapidez. Ciertos sitios con limitaciones de pH, textura, concentración iónica y condiciones de disponibilidad de nutrientes, necesitan alteraciones en esas condiciones para que se pueda establecer una cubierta vegetal. En la mayoría de los casos se pueden utilizar las prácticas comunes se pueden utilizar (Frankenberger y Losi, 1995).

Una planta superior en términos de ingeniería se podría definir como un “sistema alimentado por energía solar, de bombeo y filtrado, que posee capacidad mensurable de carga, degradación y extrusión o vertido”. Siguiendo con esta idea, las raíces son “extractores exploradores de fase líquida que pueden buscar, alterar y/o transportar elementos y compuestos contra grandes gradientes químicos” (Cunningham y Berti, 1993). La superficie interna y externa de muchas partes de la planta alberga además comunidades microbianas que pueden ser explotadas. Las superficies radicales mantienen finas películas microbianas activas (“biofilms”) que, con ayuda

de las extensiones de las raíces micorrizadas en el suelo, aumentan significativamente la superficie de contacto con el suelo e incrementan la propia, en algunos casos pobre, capacidad metabólica de la planta. La explotación de estas comunidades rizosféricas para remediar contaminantes edáficos es un área activa de investigación de numerosos laboratorios, pues los paralelismos entre la rizosfera y las prácticas de ingeniería son numerosos y cuando las plantas se redefinen en estos términos, ambas, biología e ingeniería, pueden contribuir a la investigación en biorremediación (Cunningham et al., 1997).

Se han escrito varias revisiones sobre "fitorremediación" resumiendo muchos de los aspectos importantes de esta novedosa tecnología basada en el uso de plantas (Skipper y Turko, 1995; Chaney et al., 1997; Raskin et al., 1997; Salt et al., 1998). La idea basada en que las plantas puedan usarse para la remediación ambiental es muy antigua y no puede explicarse desde un punto de vista particular. Sin embargo, una serie de fascinantes descubrimientos científicos en combinación con un enfoque de investigación interdisciplinar han permitido el desarrollo de esta idea en una prometedora, económica y ecológica tecnología (Brooks et al., 1998; Salt et al., 1998).

La fitorremediación puede aplicarse a contaminantes orgánicos e inorgánicos, presentes en los substratos sólidos (p. ej. suelo), líquidos (p.ej. agua) y el aire. Según Salt et al. (1998), Collins (1999) y Pilon-Smits y Pilon (2000), actualmente la fitorremediación se divide en las siguientes áreas:

- *Fitoextracción*. El uso de plantas acumuladoras de contaminantes para eliminar metales o compuestos orgánicos del suelo, concentrándolos en la biomasa cosechable.
- *Fitodegradación y fitoestimulación*. El uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos.
- *Rizofiltración*. El uso de las raíces de las plantas para absorber y adsorber contaminantes, principalmente metales, de aguas y lodos contaminados.
- *Fitoestabilización*. El uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de contaminantes en el medio ambiente.
- *Fitovolatilización*. El uso de plantas para volatilizar contaminantes, y
- El uso de plantas para eliminar contaminantes del aire.

El área de mayor progreso en los últimos años es la fitoextracción (Salt et al., 1998; Salt y Baker, 2000), lo que se explica, en parte, por la relativa facilidad para detectar metales en

diferentes materiales. La fitorremediación de metales se está desarrollando como una solución económica en remediación en miles de lugares contaminados del mundo. Su desarrollo viene dirigido por el prohibitivo coste de los métodos tradicionales de remediación de suelos (Rulkens et al., 1998).

1.5.2.1.- Fitoextracción de metales.

Una revisión de la literatura existente sobre fitorremediación revela que, actualmente, hay dos técnicas básicas de fitoextracción en desarrollo: la fitoextracción asistida por quelatos o “fitoextracción inducida” y la “fitoextracción continua” o a largo plazo. De ambos procesos, la fitoextracción asistida por quelatos es la más desarrollada y en la actualidad comercialmente en desarrollo. La fitoextracción continua también se está estudiando para la eliminación de metales como Zn, Cd y Ni y metales oxianiónicos como Se, As y Cr. Se han llevado a cabo numerosos experimentos de campo con ambas estrategias de fitorremediación y los resultados sugieren el necesario desarrollo de estas tecnologías (Boisson et al., 1999; Brennan y Shelley, 1999; Gleba et al., 1999).

1.5.2.1.1.- Fitoextracción inducida.

No hay información lo suficientemente exacta sobre plantas capaces de acumular de forma natural la mayoría de los metales medio ambientalmente tóxicos como Pb, Cd, As, y radionucléidos como U, Sr, Cs y Pu (Entry et al., 1997). Por ejemplo, la vegetación que crece en un suelo o en una solución altamente contaminada de Pb se vio que contenía sólo 0.01 – 0.06% de Pb en el peso seco de la biomasa de parte aérea (Huang et al., 1997), niveles muy por debajo de los que se requieren para una fitoextracción eficiente.

Estudios de Jørgensen (1993) mostraron que la aplicación de quelatos a los suelos como el EDTA (ácido etilen-diamino-tetracético) favorecía la acumulación de Pb en las plantas. Más tarde, Blaylock et al. (1997), consiguieron una rápida acumulación de Pb en tallos, superior a un 1% en peso seco. Estos descubrimientos cimientan el camino para una plena fitoextracción de Pb y para la definición de estrategias para el desarrollo de la fitoextracción de otros metales tóxicos utilizando el quelato adecuado (Huang et al., 1997). La cantidad total de metal bioacumulado o eliminado de

un lugar, es el producto de la concentración del metal en el material vegetal recolectado y la biomasa recolectada total (Carini y Lombi, 1997; Otabbong et al., 1997). La observación de plantas productoras de grandes cantidades de biomasa como la mostaza, el maíz, girasol, etc., que pueden ser "inducidas" para acumular altas concentraciones de Pb, es otro avance en el desarrollo de la fitoextracción asistida por quelatos (Huang y Cunningham, 1996).

El concepto de la fitoextracción mediada por quelatos es aplicable a otros metales además del Pb, pues se ha demostrado la acumulación simultánea de Pb, Cd, Cu, Ni y Zn en mostaza, tras la aplicación de EDTA a suelos contaminados con varios metales pesados (Blaylock et al., 1997). La eficiencia en la acumulación de metales pesados en estos experimentos estaba relacionada directamente con la afinidad por el quelato aplicado por parte del metal, lo que sugiere que para una eficiente fitoextracción, pueden ser utilizados los quelatos sintéticos con mayor afinidad por el metal de interés, por ejemplo, EDTA para el Pb (Wu et al., 1999), EGTA (ácido etilenbis-oxietilen trinitrilo tetraacético) para el Cd (Ibekwe et al., 1998), y probablemente citrato para el U (Salt et al., 1998).

Basado en la información anterior, un hipotético protocolo para llevar a cabo la fitoextracción asistida por quelatos de un lugar contaminado puede ser como sigue: 1) El lugar se evalúa y se determina la apropiada combinación quelato/cultivo. 2) El lugar se prepara y tras la plantación, se desarrolla el cultivo. 3) Una vez se alcanza un nivel de crecimiento o de producción de biomasa que se considere adecuado, se aplica el quelato apropiado. 4) Por último, después de una fase de acumulación de metal (días o semanas), se cosecha el cultivo. Dependiendo del cultivo y la estación, el lugar puede ser preparado para una posterior fitoextracción. Las estimaciones sugieren que las plantas pueden eliminar del orden de 180 – 530 Kg/Ha de Pb por año (Blaylock et al., 1997; Huang et al., 1997), llevando a cabo la remediación de un lugar contaminado con posibilidad de más de 2500 mg/Kg de Pb en 10 años. A continuación, el peso y volumen del material contaminado puede ser reducido posteriormente por incineración o compostaje. Los residuos vegetales enriquecidos en metales pueden depositarse como material peligroso o, si es económicamente posible, se pueden utilizar para la recuperación del metal (Cunningham et al., 1995b).

El descubrimiento de la captación de metales asistida por quelatos, es muy reciente, con pocas publicaciones en los últimos años y consiste en dos procesos básicos: liberación de metales a la solución edáfica y transporte de metales a la parte cosechable del vegetal. El papel de los

quelatos en la solución del suelo puede explicarse usando principios químicos de equilibrios bien establecidos, sin embargo, los mecanismos implicados en la absorción de metales en plantas inducida por quelatos, y el transporte de metales, no se conoce en su totalidad (Doong et al., 1998). Tras la aplicación de EDTA, sus altos niveles en los tejidos vegetales podrían incrementar la concentración de Pb soluble dentro de la planta, por la formación de Pb-EDTA soluble, favoreciendo su movimiento desde las raíces a los tallos, donde el Pb podría acumularse como Pb-EDTA. Parece claro que el transporte de complejos metal-quelato al interior de las plantas juega un papel importante en la acumulación de metales asistida por quelatos. ¿Cuáles serían los mecanismos implicados en el transporte de los complejos metal-quelato en las plantas?. Un buen lugar para buscar respuestas a estas cuestiones es la literatura de nutrición vegetal (Salt et al., 1998). En los años cincuenta, los quelatos de Fe^{3+} se introducían como una forma de corregir deficiencias de Fe. Desde entonces, el mecanismo por el cual las raíces usan dicho ion en formas quelatada y estable se ha estado debatiendo (Mori, 1999). Parece que las raíces de dicotiledóneas adquieren Fe desde complejos quelato- Fe^{3+} como Fe^{2+} , después de la ruptura en la raíz del complejo, por parte de la Fe^{3+} -quelato reductasa (Chaney et al., 1972), o como complejos quelato- Fe^{3+} intactos (Kochian, 1991). El mecanismo de captación depende del estado nutricional de dicho ion en la planta, con una absorción predominante de Fe^{2+} en plantas deficientes de éste (Chaney et al., 1972). Así, el complejo altamente estable Pb-EDTA, que no puede romperse por la Fe^{3+} -quelato reductasa de la raíz, puede ser asimilado de la misma forma que los quelatos de Fe^{3+} . Sin embargo, la inducción "óptima" de la absorción del metal ocurre a concentraciones de quelato de al menos dos órdenes de magnitud superiores a las que se usan en soluciones nutritivas de cultivos hidropónicos (Blaylock et al., 1997).

Entonces, ¿es distinto el mecanismo de absorción del quelato a concentraciones elevadas?. Un trabajo de Jeffreys y Wallace (1968), sugería que así era. Usando el quelato EDDHA-Fe [ácido etilendiamino-(*o*-hidroxifenil)-diacético], dichos autores mostraron que existe una concentración crítica de quelato por encima de la cual se induce la acumulación de quelato férrico en la parte aérea y por debajo de la misma, se acumulan muy bajos niveles de dicho quelato. Éste trabajo indicó la primera observación de la acumulación asistida por quelatos hace 30 años y sugiere que hay al menos dos mecanismos implicados en la absorción del complejo metal-quelato funcionando a bajas y altas concentraciones del complejo. La inducción de su captación se correlaciona con un estado severo de estrés vegetal y en último término con la muerte del organismo; sin embargo, no está claro si el estrés es necesario para la inducción o simplemente refleja la acumulación de altas concentraciones de quelato sintético en la planta. Más recientemente, la naturaleza bifásica de la

absorción de quelatos se ha confirmado por medidas directas del movimiento y distribución de EDTA-C¹⁴ y EDTA-Pb (Salt et al., 1998; Salt y Baker, 2000).

El transporte de metales hacia los tallos en la fitoextracción inducida, parece ocurrir vía xilema a través de la corriente de transpiración (Blaylock et al., 1997). El metal parece moverse hacia el tallo como complejo metal-quelato, donde el agua se evapora y se queda dicho complejo. De esta forma, después de la inducción asistida por quelato, en la planta comienza una corriente ascendente que dirige el metal quelado desde la solución del suelo hacia las hojas. Dicha corriente depende del sistema radical y sus características de absorción y área superficial, y de una eficiente capilaridad que mantenga la distribución dentro de la planta. Si bien es posible diseñar y construir un sistema similar utilizando los conocimientos de ingeniería, la naturaleza provee de un enfoque más económica y evolutivamente perfeccionado (Huang et al., 1997).

1.5.2.1.2.- Fitoextracción continua.

Un enfoque alternativo a la acumulación de metales mediada por quelatos, es la dependencia de procesos fisiológicamente especializados que permiten a las plantas acumular metales a lo largo de su ciclo de crecimiento. Este tipo de absorción la realizan las plantas hiperacumuladoras que crecen en suelos ricos en metales pesados (Salt y Krämer, 2000; Meagher, 2000). Estas plantas están preparadas para acumular niveles superiores a un 1% en peso seco de parte aérea de Zn, Ni, Mn o Se, de forma natural, o más de un 0.1% de Co o Cu (Baker y Brooks, 1989), valores un orden de magnitud mayor que los que se dan en plantas no acumuladoras, y que fue la característica que inspiró a Chaney (1983), para formular el concepto de fitoextracción (Brown et al., 1995a, 1995b). A diferencia de la absorción inducida, la fitoextracción continua se basa en la capacidad fisiológica y genética de plantas especializadas para acumular, transportar y resistir altas cantidades de metales (Tabla 1.7.). Las principales desventajas de usar hiperacumuladoras naturales para la fitoextracción continua son su relativamente escasa biomasa, su escaso crecimiento y la relativa ausencia de hiperacumuladoras para los contaminantes metálicos medio ambientalmente más importantes como Pb, Cd, As y U (Chaney et al., 1997; Salt y Baker, 2000).

En bosques de *Fagus sylvatica* L. en el noroeste de Alemania, se determinaron los contenidos de macronutrientes (Ca, Mg y K), micronutrientes (Fe, Mn, Zn y Cu) y elementos

potencialmente fitotóxicos (Pb, Cd, Ni y Al) en suelos y en raíces, rizomas, tallos y hojas de dos especies del estrato basal de dicho bosque: *Mercurialis perennis* L. y *Polygonatum multiflorum* L.; los datos disponibles indicaban una considerable absorción no sólo de los nutrientes, sino también de los metales desde la zona superficial del suelo (Luwe, 1995).

Tabla 1.7.- Concentraciones¹ de metales y otros elementos en parte aérea de plantas hiperacumuladoras².

Elemento	Especie Vegetal	Concentración
Cd	<i>Thlaspi caerulescens</i>	3.000
Co	<i>Haumaniastrum robertii</i>	10.200
Cu	<i>Haumaniastrum katangense</i>	8.356
	<i>Ipomoea alpina</i>	12.300
Pb	<i>Thlaspi rotundifolium</i> subsp.	8.200
Mn	<i>Macadamia neurophylla</i>	55.000
Ni	<i>Alyssum bertolonii</i>	13.400
	<i>Berkheya coddii</i>	17.000
	<i>Psychotria douarrei</i>	47.500
Se	<i>Astragalus pattersoni</i>	6.000
Tl	<i>Iberis intermedia</i>	3.070
U	<i>Atriplex confertifolia</i>	100
Zn	<i>Thlaspi calaminare</i>	10.000

¹mg kg⁻¹ p.s.; ²Extraídos de Cunningham et al. (1995a, 1995b) y de Brooks et al. (1998).

El entendimiento de los mecanismos biológicos de la hiperacumulación puede ayudar en el desarrollo de plantas superiores para la fitorremediación de metales (Ebbs y Kochian, 1997; Shen et al., 1997; Zhao et al., 1998). En 1885, Baumann, un botánico alemán, trabajando cerca de la frontera germano-belga, observó que las hojas de ciertas especies de plantas que crecían en suelos enriquecidos en Zn de forma natural, contenían altísimos niveles de este elemento (Baumann, 1885). Particularmente dos especies, una violeta (*Viola calaminaria*) y una mostaza [*Thlaspi calaminare*, más recientemente clasificada como *Thlaspi caerulescens* por Ingrouille y Smirnoff (1986)], contenían aproximadamente entre un 1 % y un 1.7 % de Zn en peso seco de hoja, respectivamente. Esto contrasta con niveles de Zn de entre 0.001% y 0.02% en peso seco de hoja,

de plantas que crecieron en suelos sin tal grado de Zn. Cincuenta años más tarde, estudios llevados a cabo en Estados Unidos, implicaban al Se como el componente vegetal responsable de una enfermedad en el ganado de los pastos de Dakota del Sur. Esta observación llevó al descubrimiento de plantas del género *Astragalus*, capaces de acumular más de un 0.6% de Se en peso seco de la biomasa del tallo (Byers, 1935, 1936). Poco tiempo después, dos botánicos italianos (Minguzzi y Vergnano, 1948), descubrieron plantas que acumulaban Ni. Dichos autores observaron que las hojas secas de *Alyssum bertolonii*, crecidas en suelos ricos en serpentinita y Zn, cerca de Florencia (Italia), contenían aproximadamente un 1% de Ni, entre cien y mil veces más alta concentración que otras plantas que crecían en los alrededores. Desde estas primeras observaciones, plantas que acumulan altos niveles de Co, Cu, Mn, y posiblemente Pb, también se describieron (Baker y Brooks, 1989). Sin embargo, la existencia de hiperacumuladoras de elementos aparte de Ni, Zn y Se, se han cuestionado continuamente (Lombini et al., 1998). Las primeras hiperacumuladoras caracterizadas pertenecían a las familias *Brassicaceae* y *Fabaceae*. Actualmente, al menos 45 familias de plantas se conoce que contienen especies de hiperacumuladoras de distintos metales (Robinson et al., 1998; Brooks et al., 1998).

El número de taxones identificados de acumuladoras de distintos elementos contaminantes se acerca a los cuatrocientos y sigue aumentando (Salt et al., 1998). En la medida en que se investigue en medios enriquecidos en metales, se identificarán nuevas hiperacumuladoras, y plantas inicialmente clasificadas como hiperacumuladoras desde el herbario y especímenes de campo, deberán reclasificarse como no-acumuladoras. El papel ecológico de la hiperacumulación no está aún enteramente aclarado. Se ha sugerido que la acumulación de metales provee de protección contra el ataque de hongos e insectos (Boyd y Martens, 1992; Reeves et al., 1981). Evidencias recientes han confirmado la función protectora de la hiperacumulación de Ni contra patógenos fúngicos y bacterianos en *Streptanthus polygaloides* (Boyd et al., 1994), y contra insectos herbívoros en *S. polygaloides* y *T. montanum* (Boyd y Martens, 1994; Martens y Boyd, 1994). El efecto antiherbivoría del Zn se ha demostrado también en *T. caerulescens* (Pollard y Baker, 1997).

Otras plantas presentaban concentraciones que excedían el 1% de Cu y Co, y el 3% de Zn, Ni y Mn en peso seco y niveles de Pb tan altos como de 8200 µg por gramo de peso en planta (Shaw, 1989; Brown et al., 1995a, 1995b). Los hiperacumuladores se han examinado para usos en remediación potencial; sin embargo, debido a su generalmente bajo crecimiento y pequeña producción, son agrónomicamente desaconsejables. No obstante, son un valioso almacén de información genética y fisiológica (Cunningham y Berti, 1993; Cunningham et al., 1996).

Otro aspecto interesante de las hiperacumuladoras es que nos indican la prioridad de los metales más susceptibles de ser remediados con ésta técnica. Transfiriendo y extendiendo estas capacidades de acumulación, transporte y tolerancia a metales a otras plantas con mejores características agronómicas, podremos proporcionar la solución ideal para la descontaminación de suelos (Robinson et al., 1997). La acumulación de cantidades masivas de metales pesados dentro del tejido vegetal ha sido nombrada en ocasiones como "biominería" o "fitominería" (Brooks et al., 1998). En ciertas condiciones, si ha sido un éxito y puede eventualmente proporcionar no sólo soluciones a problemas de remediación, sino además nuevas dimensiones en la extracción de ciertos metales. El producto "bio-mineral", extraído por la planta, contiene ambos productos: el metal y el combustible para su propia fundición (Cunningham et al., 1997).

La capacidad única que ofrecen las hiperacumuladoras para contener altas concentraciones foliares de metales, hacen a estas plantas idóneas en el desarrollo de cultivos para fitorremediación mediante la fitoextracción continua. La idea fue introducida por Chaney (1983) y Baker et al. (1998). La planta "ideal" para fitoextracción continua debe crecer en suelos contaminados por metales, produciendo una elevada biomasa y acumulando y resistiendo altas concentraciones de metales pesados en su parte aérea. Experimentos para estudiar esta fitoextracción continua tuvieron un éxito moderado (Baker et al., 1991).

La mayoría de las plantas hiperacumuladoras conocidas tienen un escasa biomasa y/o lento crecimiento, mientras que los cultivos productores de grandes cantidades de biomasa y de crecimiento rápido sólo contienen bajas concentraciones de metales en los vástagos. Para superar estas limitaciones, se necesita desarrollar una estrategia con dos componentes para lograr una fitoextracción continua óptima a largo plazo. Primero, los intentos para mejorar las líneas existentes de plantas extractoras deben continuar (Kneen et al., 1990; Kumar et al., 1995; Delhaize, 1996), así como la búsqueda de nuevas hiperacumuladoras productoras de grandes cantidades de biomasa (Ebbs et al., 1997). La utilidad de esta búsqueda se demostró con la identificación de *Berkheya codii* (*Asteraceae*), una planta con una alta producción de biomasa, originaria de Sudáfrica, capaz de acumular más de un 3.7% de Ni en biomasa seca de parte aérea (Morrey et al., 1992). Esta especie y otras relacionadas, pueden tener un potencial significado en fitorremediación, debido a la hiperacumulación tan fuerte que realizan, su relativamente alta producción de biomasa y la posibilidad de crecer en plantaciones densas. Las aproximaciones biotecnológicas para la producción de hiperacumuladores de metales de alta producción de biomasa, deben también considerarse (Collins, 1999). La genética moderna puede utilizarse para transferir genes para

hiperacumulación a plantas no acumuladoras de forma natural (Salt et al., 1998; Salt y Krämer, 2000). Segundo, se necesita entender y explotar los procesos biológicos implicados en la absorción, transporte y acumulación de elementos, en plantas hiperacumuladoras y no acumuladoras. La literatura de nutrición vegetal es rica en información relacionada a la tolerancia, absorción, transporte y acumulación iónica, en la que podemos revisar aquellas áreas de relevancia para fitoextracción (Kochian, 1991; Marschner, 1995; Pais y Jones, 1997; Salt y Baker, 2000).

La remediación de suelos contaminados en los EE.UU. es una industria multibillonaria en dólares por año (Cunningham et al., 1995a). La mayoría de los lugares donde se lleva a cabo son descontaminados empleando una amplia variedad de técnicas basadas en la ingeniería, que se han desarrollado a lo largo de estas tres últimas décadas. Dichas tecnologías se pueden agrupar en dos categorías mayoritarias: a) Técnicas de aislamiento y contención, y b) Técnicas de descontaminación. Las técnicas de aislamiento y contención explotan barreras físicas, químicas e hidráulicas para aislar el contaminante y prevenir su escape incontrolado. Esta estrategia de remediación, actualmente ofrece una reducción en la cantidad de contaminante en un lugar localizado y particular, pero el riesgo de que dicho contaminante cause un posterior daño ambiental no se reduce. Ejemplos de técnicas de contención incluyen embovedados, enterramientos, y capas de aislamiento hidráulico, así como la absorción física o el aprisionamiento del contaminante dentro de una matriz estable, como por ejemplo, de cemento (Cunningham et al., 1995b). Por el contrario, las técnicas de descontaminación reducen la cantidad total de contaminante del sitio donde está y permiten la posibilidad de un uso futuro del suelo. Ejemplos de técnicas de descontaminación incluyen el lavado de suelos, extracción con vapor y la biorremediación microbiana (Bollag y Bollag, 1995). Una técnica común de descontaminación localizada es la excavación del material dañino o perjudicial y su depósito cubierto por una capa de tierra. Esto representa una transferencia del contaminante a una segunda localización, por lo que se trata ni más ni menos que de una simple cuestión de retraso en el efecto contaminante (Skipper y Turco, 1995)

El desarrollo de una estrategia de remediación localizada implica comparar y equilibrar consideraciones legales, físicas, químicas, biológicas y económicas. Los lugares o localidades son casi siempre complejos, con numerosos aspectos medio ambientales (Frankenberger y Losi, 1995). Además, las propiedades físicas y químicas de determinados desechos contaminantes, a veces excluyen toda técnica de descontaminación local, excepto la excavación y subsecuente enterramiento. Se están explorando tecnologías de ingeniería (p. ej. electroósmosis, fragmentación de suelos, descomposición térmica, etc.) pero en la mayoría de los casos serán costosas y difíciles

de llevar a cabo mientras que los sistemas basados en el uso de plantas superiores parecen una alternativa interesante y efectiva económicamente hablando, que plantea un excitante desafío técnico a la comunidad investigadora (Moolenaar et al., 1997).

1.5.2.1.3.- Mecanismos de resistencia a metales de interés en fitoextracción.

La fitoextracción continua se fundamenta en la capacidad de las plantas para acumular metales en su parte aérea en periodos largos de tiempo. Para conseguir esto, las plantas tienen que poseer mecanismos eficientes para la detoxificación del metal acumulado. La resistencia al Ni en *Thlaspi goesingense* es un determinante principal de la hiperacumulación de este ion cuando las plantas crecen en cultivo hidropónico (Krämer et al., 1997). No obstante, la capacidad de manipular la tolerancia de metales en plantas puede ser clave para el desarrollo de cultivos eficientes en fitorremediación. Una demostración de este principio la proporciona *Arabidopsis thaliana*, que es resistente al Hg²⁺ con una elevada expresión de una reductasa de Hg de origen bacteriano que le confiere la capacidad de eliminar Hg de la solución de crecimiento (Rugh et al., 1996).

Con el fin de desarrollar plantas hipertolerantes capaces de acumular altas concentraciones de metales, será vital la comprensión de las estrategias moleculares y bioquímicas existentes que las plantas adoptan para resistir la toxicidad. Los procesos implicados en la detoxificación intracelular de metales pesados se han revisado (Tomsett y Thurman, 1988; Jackson et al., 1990; Ernst et al., 1992; Salt y Krämer, 2000), y comentado en anteriores apartados. Así, en interés de la brevedad, sólo hablaremos de aquellos procesos que potencialmente podrían ser manipulados para mejorar la resistencia a metales en cultivos para fitoextracción. Estos mecanismos incluyen la quelación, compartimentación, biotransformación y los mecanismos reparadores a nivel celular.

1.5.2.1.3.1.- Quelación.

Dentro de los mecanismos y posibles complejos que ayudan al transporte y secuestro de contaminantes tóxicos existen diferentes grupos, que a continuación comentaremos de forma resumida. Entre estos mecanismos se estudian las familias de transportadores de membranas plasmáticas, que pueden llevar nutrientes y elementos tóxicos a través de la membrana vegetal en raíces y/o a través de la membrana tonoplástica, hacia el interior de las vacuolas. Mutaciones en

- Wu L. y Z.H. Huang. 1991. Selenium tolerance, salt tolerance, and selenium accumulation in tall fescue lines. *Ecotox. Environ. Safety* 21: 47-56.
- Wu P., B. Hu, C.Y. Liao, J.M. Zhu, Y.R. Wu, D. Senadhira y A.H. Paterson. 1998. Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. *Plant Soil* 203: 217-226.
- Wurr D.C.E. y J.R. Fellows. 1998. Leaf production and curd initiation of winter cauliflower in response to temperature. *J. Hort. Sci. & Biotech.* 73: 691-697
- Wurr D.C.E., A.J. Hambidge y G.P. Smith. 1996. Studies of the cause of blindness in brassicas. *J. Hort. Sci.* 71: 415-426.
- Xiong Z.-T. 1997. Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. *Environ. Pollut.* 97: 275-279.
- Xiong Z.-T. 1998. Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 285-291.
- Yaneva I., G. Mäck, R. Vunkova-Radeva y R. Tischner. 1996. Changes in nitrate reductase activity and the protective effect of molybdenum during cold stress in winter wheat grown on acid soil. *J. Plant Physiol.* 149: 211-216.
- Yang X., V.C. Baligar, D.C. Martens y R.B. Clark. 1996. Plant tolerance to nickel toxicity. II. Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. *J. Plant Nutr.* 19: 265-279.
- Yang X.E., V.C. Baligar, J.C. Foster y D.C. Martens. 1997. Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in ryegrass and maize grown with different nickel levels. *Plant Soil* 196: 271-276.
- Yang Y.-H., S.-M. Chen, Z. Chen, H.-Y. Zhang, H.-G. Shen, Z.-C. Hua y N. Li. 1999. Silicon effects on aluminium toxicity to mungbean seedling growth. *J. Plant Nutr.* 22: 693-700.
- Ye Z.H., A.J.M. Baker, M.H. Wong y A.J. Willis. 1997. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *typha latifolia*. *New Phytol.* 136: 469-480.
- Yi Y. y M.L. Guerinot. 1996. Genetic evidence that induction of root Fe(II) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J.* 10: 835-844.
- Zabotin A.L., T.S. Barisheva, O.A. Zabolina, L.A. Larskaya, V.V. Lozovaya, G. Beldman y A.G.J. Voragen. 1998. Alterations in cell walls of winter wheat roots during low temperature acclimation. *J. Plant Physiol.* 152: 473-479.
- Zadoks J.C. y R.D. Schein. 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford University Press, New York.
- Zamski E. y A.A. Schaffer. 1996 (Eds.) Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Zang W., M. Seki y S. Furusaki. 1997. Effect of temperature and its shift on growth and anthocyanin production in suspension cultures of strawberry cells. *Plant Sci.* 127: 207-214.
- Zarcinas B.A. 1995. Suppression of iron interference in the determination of boron using the azomethine-H procedure. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 26: 713-729.
- Zayed A.M. y N. Terry. 1994. Selenium volatilization in roots and shoots: effects of shoot removal and sulfate level. *J. Plant Physiol.* 143: 8-14.
- Zayed A., C.M. Lytle y N. Terry. 1998a. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206: 284-292.
- Zayed A., C.M. Lytle, J.H. Qian y N. Terry. 1998b. Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta* 206: 293-299.
- Zenk M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179: 21-30.
- Zhang W., M. Seki y S. Furusaki. 1997. Effect of temperature and its shift on growth and anthocyanin production in suspension cultures of strawberry cells. *Plant Sci.* 127: 207-214.
- Zhang X., C. Yi y F. Zhang. 1999. Iron accumulation in root apoplasm of dicotyledonous and graminaceous species grown on calcareous soil. *New phytol.* 141: 27-31.
- Zhao D. y D. Oosterhuis. 1998. Cotton responses to shade at different growth stages: nonstructural carbohydrate composition. *Crop Sci.* 38: 1196-1203.
- Zhao F.J., Z.G. Shen y S.P. McGrath. 1998. Solubility of zinc and interactions between zinc and phosphorus in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ.* 21: 108-114.
- Zhou J.M. y P.B. Goldsbrough. 1995. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol. Gen. Genet.* 248: 318-328.
- Zhu Y.L., A.M. Zayed, J.-H. Quian, M. de Souza y N. Terry. 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *J. Environ. Qual.* 28: 339-344.
- Zhu-Shimoni J.X., S. Lev-yadun, B. Matthews y G. Galili. 1997. Expression of an aspartate kinase homoserine dehydrogenase gene is subject to specific spatial and temporal regulation in vegetative tissues, flowers, and developing seeds. *Plant Physiol.* 113, 695-706.
- Zieve R. y P.J. Peterson. 1984. Volatilization of selenium from plants and soils. *Sci. Total Environ.* 32: 197-202.
- Zimmer W. y R. Mendel. 1999. Molybdenum metabolism in plants. *Plant Biol.* 1: 160-168.
- Zornoza P. y O. Carpena. 1996. Influence of potassium:rubidium ratios on the xylematic transport of solutes in cucumber plants grown with nitrate plus ammonium. *J. Plant Nutr.* 19: 469-480.

genes de *Arabidopsis* que codifican la quelato reductasa férrica y en otros genes afines, dan como resultado una deficiencia de Fe, y un incremento de la actividad de transportadores para la absorción del metal. Por otra parte, se estudia como el ácido cítrico secretado en la raíz puede formar complejos tetraédricos que bloqueen elementos (Al^{3+} y posiblemente Ni^{2+}) para transportarlo hacia las raíces (Salt et al., 2000).

La aplicación de EDTA, puede dar lugar a la formación de complejos hexaédricos con metales como Pb^{2+} y Fe^{2+} , que favorezcan su absorción radical y su transporte por la planta. Los ácidos orgánicos secretados de forma natural como muginéico y avénico pueden usar el mismo mecanismo para retirar metal desde el suelo (Meagher, 2000). El proceso de quelación de iones metálicos por ligandos específicos de alta afinidad reduce la concentración de iones metálicos libres, con la consiguiente reducción de su fitotoxicidad. Se conocen dos clases principales de péptidos quelantes de metales pesados en plantas: las metalotioneínas y las fitoquelatinas. Las metalotioneínas son polipéptidos codificados genéticamente, de bajo peso molecular y ricos en cisteína. Las metalotioneínas son inducidas por el Cu y tienen alta afinidad por este metal (Zhou y Goldsbrough, 1995; Murphy et al., 1997). Investigaciones sobre los niveles de expresión de las metalotioneínas en *Arabidopsis thaliana*, demostraron que los niveles del ARNm MT2, se correlacionaban significativamente con la resistencia al Cu (Murphy y Taiz, 1995), sugiriendo así que las metalotioneínas están implicadas en la resistencia al metal. Las fitoquelatinas son péptidos de bajo peso molecular, sintetizados enzimáticamente en las plantas, ricos en cisteína, y se sabe que se unen al Cd y al Cu, elementos metálicos que reaccionan con los grupos tiólicos (Rauser, 1990; Steffens, 1990), y son esenciales para la detoxificación del Cd en *A. thaliana* (Howden et al., 1995; Rauser, 1995). Estas estructuras pueden ayudar en el transporte y secuestro de metales en la vacuola a través de un bombeo en el que interviene S y glutatión y con metales como el Zn, los grupos alfa-carboxilo de las fitoquelatinas pueden participar en la formación de diferentes estructuras entre el ligando y el metal (Meagher, 2000). Aunque no se define estrictamente como quelación, la precipitación del Zn como complejo Zn-fitato, también se sugirió como un mecanismo de detoxificación del Zn (Van Steveninck, et al., 1992). La precipitación de Pb intra- y extracelular con carbonatos, sulfatos y fosfatos, juega un papel importante en la detoxificación de este metal en los tejidos vegetales (Salt et al., 1998). El transporte de SO_4^{2-} y SeO_4^{2-} a través de la membrana plasmática o plastidial se incrementa por la formación de adenosín fosfosulfato (ADP-S) y adenosín fosfoselenato (ADP-Se), que se cataliza por la adenosín trifosfato sulfurilasa (APS), y es otro sistema que permite la absorción de elementos como el Se, además, los metales tóxicos y compuestos orgánicos de gran tamaño, se pueden unir a glutatión y bombearse hacia la vacuola o

