

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Fisiología Vegetal



TESIS DOCTORAL

**Aspectos fisiológicos de la fitotoxicidad por manganeso en
phaeseolus vulgaris**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Charlotte Poschenrieder

DIRECTOR:

Juan Barceló Coll

Madrid, 2015

Charlotte Poschenrieder

TP
1981
033



* 5 3 0 9 8 5 4 8 3 6 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-223659-8

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA FITOTOXICIDAD POR MANGANESO
EN PHASEOLUS VULGARIS

Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© Charlotte Poschenrieder
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-1216-1981

I

CHARLOTTE POSCHENRIEDER

"ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA FITOTOXICIDAD POR MANGANESO EN
PHASEOLUS VULGARIS"

Dirigida por: Prof. Dr. Juan Barceló Coll.

Departamento de Fisiología Vegetal

Facultad de Farmacia

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Junio, 1980

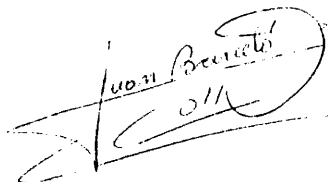
II

DON JUAN BARCELO COLL, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISILOGIA VEGETAL DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD - COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA : Que la Licenciada Oña Charlotte Poschenrieder ha realizado bajo su dirección y en el Laboratorio de la -- Cátedra el trabajo que, para optar al Grado de Doctor en Farmacia, presenta con el título:

" ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA FITOTOXICIDAD POR MANGANESO EN PHASEOLUS VULGARIS "

Considerando concluida la presente memoria autorizo -- su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente. Y para que así conste firmo el presente certificado en Madrid a treinta de mayo -- de mil novecientos ochenta.



Juan Barcelo Coll

III

Agradezco profundamente al Prof. Dr. D. Juan Barceló Coll, Director del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense y de esta tesis, su gran ayuda y continuo estímulo que hicieron posible la realización de la misma.

También mi sincero agradecimiento a Esperanza Torija Isasa, Prof. Ayudante de la Cátedra de Bromatología y Toxicología, por su ayuda prestada en las determinaciones de absorción atómica.

Asimismo quiero expresar mi gratitud al Dr. Gregorio Fraile Ramos del Instituto Jaime Ferran del C.S.I.C. de Madrid por el suministro de diferentes cepas de Rhizobium y sus consejos respecto a la técnica más adecuada de inoculación.

Finalmente doy las gracias a todos los colaboradores del Departamento de Fisiología Vegetal.

Gran parte del trabajo de esta tesis ha sido posible por la ayuda económica recibida con una Beca de Formación de Personal Investigador concedida por el Ministerio de Universidades e Investigación, a quién hago también extensivo mi reconocimiento.

IV

A mi marido,
mis hijos y
mi madre, --
agradeciéndoles la paciencia
conmigo y con mi trabajo.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1) <u>I N T R O D U C C I O N</u>	
1.1. ESENCIALIDAD DEL MANGANESO PARA LAS PLANTAS	2
1.2. ABSORCION Y TRANSPORTE DEL MANGANESO POR LAS — PLANTAS	4
1.3. FUNCIONES DEL MANGANESO EN LAS PLANTAS	7
1.3.1. Participación del manganeso en la foto— síntesis	8
1.3.2. Participación del manganeso en la reduc— ción del nitrato por las plantas	13
1.3.3. Otras acciones del manganeso sobre el — metabolismo vegetal	15
1.3.4. Acciones del manganeso sobre el desarro— llo mediadas por fitohormonas	19
1.4. TOXICIDAD PARA LAS PLANTAS DEL EXCESO DE MANGA— NESO	20

.../...

VI

	<u>Página</u>
1.4.1. Efectos tóxicos generales sobre el crecimiento y el metabolismo de las plantas	21
1.4.2. Efectos sobre la simbiosis planta — <u>Rhizobium</u>	23
1.4.3. Sensibilidad y tolerancia de las plantas al exceso de manganeso	24
2) OBJETO DEL TRABAJO	28
3) MATERIAL Y METODOS	30
3.1. CONDICIONES DEL CULTIVO	31
3.2. TOMA DE MUESTRAS	36
3.3. CAPACIDAD GERMINATIVA	39
3.4. DETERMINACIONES ANALITICAS	39
3.4.1. Determinación del crecimiento	40
3.4.2. Determinación del manganeso en planta .	40
3.4.2.1. Micrométodo de la formaldo— xima	40
3.4.2.2. Determinación del Mn y Fe por espectroscopía de absorción — atómica	44
..../...	

VII

	<u>Página</u>
3.4.3. Determinación espectrofotométrica de las - proteínas	45
3.4.4. Determinación espectrofotométrica de las - clorofilas <u>a</u> y <u>b</u>	48
3.4.5. Determinación espectrofotométrica de los - carotenoides	49
 4) <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	
4.1. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS	51
4.1.1. Síntomas generales externos	51
4.1.2. Crecimiento longitudinal	78
4.1.3. Peso fresco y peso seco	90
4.2. CONTENIDO DE MANGANESO E HIERRO EN LAS PLANTAS ..	113
4.3. CONTENIDO DE PROTEINAS EN LAS PLANTAS	140
4.4. CONTENIDO DE CLOROFILA TOTAL, CLOROFILA <u>a</u> Y CLO- ROFILA <u>b</u> EN LAS PLANTAS	152
4.5. CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN LAS PLANTAS	192
4.6. DISCUSION GENERAL	199
	.../...

VIII

	<u>Página</u>
5. <u>CONCLUSIONES</u>	201
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	207

1. I N T R O D U C C I O N

=====

1. INTRODUCCION

1.1. ESENCIALIDAD DEL MANGANESO PARA LAS PLANTAS

De acuerdo con los criterios de Arnon y Stout (12 y 13) se considera que un elemento es "esencial" para las plantas si cumple los siguientes requisitos:

- a) El elemento debe ser específico para la planta. Así no podrá ser sustituido por otro en sus acciones fisiológicas.
- b) El elemento debe ser necesario para todo el ciclo biológico del desarrollo de la planta.
- c) El elemento debe actuar directamente sobre la nutrición y no por corrección de alguna condición, microbiológica o química, - desfavorable del suelo u otro medio de cultivo.

Basado en esta definición parece haber un acuerdo bastante unánime (73 y 118) por el que las plantas superiores requieren 19 elementos:

C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Me, Cu, Zn, Mo, B, Cl, Na, Si, y Co.

No obstante, no se ha establecido la esenciabilidad de todos ellos para las plantas inferiores y el sodio, silicio y cobalto no han sido demostrados como elementos esenciales para todas las plantas superiores.

De una forma algo arbitraria, según los niveles en planta de cada elemento, se distingue entre macronutriente (C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, (Na, y Si) y micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B y Cl).

.../...

Esta clasificación ha sido objeto de algunas críticas pues algún mi cronutriente, como es el caso del manganeso, puede presentarse en concentraciones de plantas tan elevadas como la de algún macronutriente (S ó Mg). Mengel y Kyrkby (118) han aportado una clasificación más racional fundada en el comportamiento bioquímico y en las funciones fisiológicas del elemento — (Tabla 1)

Tabla 1.— Clasificación de los nutrientes de las plantas (118)

<u>Elemento</u>	<u>Forma de absorción</u>	<u>Funciones bioquímicas</u>
1 ^{er} grupo C,H,O,N,S	en forma de $\text{CO}_2, \text{HCO}_3^-$, $\text{H}_2\text{O}, \text{O}_2, \text{NO}_3^-, \text{NH}_4^+, \text{N}_2$, SO_4, SO_2 . Los iones de la solución del suelo, los gases de la atmosfera.	Constituyentes mayores de la materia orgánica. Elementos esenciales de grupos atómicos que están implicados en procesos enzimáticos. Asimilación por reacciones de óxido-reducción.
2 ^o grupo P,B,Si	en forma de fosfatos, ác. bórico ó borato, silicato de la solución del suelo.	Esterificación con grupos alcohólicos - nativos en planta. Los ésteres fosfato están implicados en reacciones de transferencia de energía.
3 ^{er} grupo K,Na,Mg,Ca Mn, Cl	en forma de iones de - la solución del suelo.	Funciones no específicas en el potencial osmótico. Reacciones más específicas por las que la conformación de la proteína enzimática logra su estado óptimo (activación enzimática). Puente entre sustancias reaccionantes. Balance de los aniones difusibles y no difusibles.

... /...

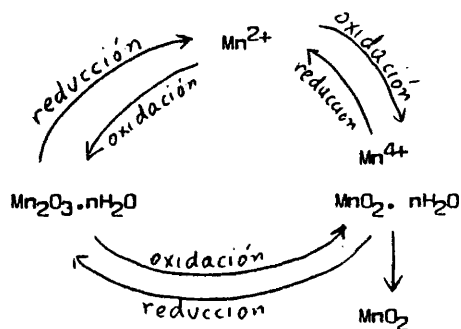
4º grupo	en forma de iones ó	Presente predominantemente en forma -
Fe,Cu,Zn,	quelatos de la solu	de quelato incorporado al grupo prosté
Mo	ción del suelo.	tico. Capacidad de transporte electró-
		nico por cambio de valencia.

De acuerdo con los anteriores criterios el manganeso es un micronutriente esencial para las plantas que éstas captan en forma de iones de la solución del suelo y que por su mecanismo de acción es adscribible al grupo 3º de la clasificación de la Tabla 1.

1.2. ABSORCION Y TRANSPORTE DEL MANGANESO POR LAS PLANTAS

La disponibilidad de manganeso de un suelo viene influida por diversos factores que inciden en el equilibrio entre las varias formas de manganeso del suelo. La fracción más importante, desde el punto de vista de la nutrición vegetal, es la correspondiente al Mn^{2+} . Entre los factores más importantes que, por su influencia en los procesos de oxidación-reducción del suelo, participan en la regulación de la disponibilidad de manganeso para las plantas están: el p^H del suelo, contenido de materia orgánica, actividad microbiana y humedad del suelo. De acuerdo con ello los suelos ácidos presentan una mayor disponibilidad de manganeso por su mayor solubilidad y el encharcamiento favorece los procesos reductores y, por ello, una mayor disponibilidad de manganeso para la planta.

.../...



Esquema de Dion y Marin (48) del ciclo de oxidación-reducción del manganeso en el suelo.

Se considera que la absorción por las plantas del manganeso viene regulada metabólicamente (126) pudiéndose presentar fenómenos de competición con otros cationes (111). A efectos fisiológicos un caso especialmente interesante son las interacciones del Mn y Fe en la absorción de ambos nutrientes. En general, el exceso de manganeso induce deficiencia de hierro, como se ha comprobado para la patata (101) ó en soja (160), sobre todo para suministros altos de hierro. Por esta razón se explica que se hayan corregido toxicidades por manganeso en eucaliptos con pulverizaciones con hierro (136) Leach et al (100 a) han encontrado valores óptimos de la relación Fe/Mn que oscilan de 1,5 a 3 para las judías y de 0,5 a 5 para el tomate. Efectos parecidos se han publicado para otras especies vegetales, así con el algodón (138), abeto Douglas (19), lino (123) y garbanzo (2). Kirsch et al (98) han estudiado las interacciones del manganeso, hierro y molibdeno en el tomate -

.../...

y comprobaron que la máxima efectividad de la adicción de hierro para compensar los efectos depresivos de los incrementos de manganeso se corrigen con aumento del molibdeno. Osawa et al (140) han descrito efectos del exceso de manganeso atribuible también a la interacción con hierro (síntomas de deficiencia de hierro) en espinaca, tomate, judía y pimiento. Somers y Shive (150) establecieron que el manganeso por su alto potencial redox es capaz de oxidar el $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$, por lo que una alta absorción de manganeso convertiría al hierro divalente, fisiológicamente activo, a la forma inactiva. Sobre todo en presencia de elevado contenido en fósforo precipitaría como fosfato férrico que podría ser responsable de la aparición de las deficiencias en hierro.

Ya en 1948 Hewitt (81) estableció que el manganeso, tal como era de esperar por sus propiedades químicas, muestra interacciones en la absorción y transporte por las plantas, tanto con metales alcalinotérreos (Mg^{++} y Ca^{++}) como metales pesados (Zn y Fe). Posteriores investigaciones (35, 78, 153 y 156) han confirmado estos primeros hallazgos.

Otra influencia reseñada en la absorción del manganeso se relaciona con el tipo de nutrición nitrogenada. En general, el suministro de nitrógeno como NO_3^- da unos niveles superiores de Mn^{2+} que en forma de NH_4^+ (157). Este hecho se ha interpretado más que por una competición específica entre Mn^{2+} y NH_4^+ como un proceso más general de la influencia de la nutrición nitrogenada en el balance catión-anión de la planta (97).

Se considera que el manganeso es un elemento poco móvil en la planta (187). En observaciones realizadas con exudados de tomate (172 y 173) y en extractos de "rye grass" (30) se ha comprobado un comportamiento electroforético dirigido hacia el cátodo, lo que puede hacer pensar que el

.../...

manganeso es transportado en la planta en forma de Mn^{2+} y no en forma de complejo orgánico. No obstante, Hofner (86) ha deducido una estrecha asociación entre el manganeso y la fracción de los aminoácidos e hidratos de carbono en el exudado de Helianthus annuus. En este mismo sentido, el análisis de la savia del floema en el ricino (176 y 177) presenta sólo uniones limitadas del manganeso a los constituyentes orgánicos de la savia, encontrándose se de un 60 al 70 % del manganeso en forma de catión simple. Un aspecto interesante es la sugerencia de Sutcliffe (167) de que los complejos orgánicos pueden reducir el transporte del manganeso a las extremidades superiores de la planta. Entre las escasas aportaciones en este área hay que citar la caracterización por Dieckert et al (46) en semillas de cacahuete de la manganina, una manganoproteína cuya función para la planta se desconoce.

Una interacción prometedora sobre todo para los casos que por exceso de manganeso se producen efectos de toxicidad es la establecida entre el manganeso y el silicio. En 1957 Williams y Vlamis (185) hallaron que la adición de silicio mejoraba la distribución del manganeso en plantas de cebada. Desde entonces toda una serie de aportaciones hablan en favor de que el silicio decrece la absorción excesiva del manganeso. Así Lewin y Reimann (103) han encontrado valores superiores de manganeso en plantas deficientes en silicio sobre las normales. Resultados parecidos fueron obtenidos en tomate por Peaslee et al. (144). Okuda et al. (136) han comprobado que las plantas de arroz con buen aporte de silicio muestran mayor oxidación del manganeso.

1.3. FUNCIONES DEL MANGANESO EN LAS PLANTAS

A pesar de que la mayoría de indicios que se poseen hablan en favor

.../...

de una escasa movilidad del manganeso en la planta, la deficiencia de manganeso conduce a una clorosis que aparece generalmente en el mesófilo de las hojas viejas inferiores, indicando una cierta movilidad del elemento en la planta. Las clorosis que aparecen en los tejidos meristemáticos de plantas deficientes en manganeso han sido interpretadas por Doby (51) en el sentido que en el curso de la síntesis de clorofila el hierro sea sustituido en el precursor hierro- δ -protoporfirina y transformado luego en la magnesio- δ -protoporfirina. La deficiencia en manganeso conduciría a una interrupción de la síntesis de clorofilas y, por el contrario, su suministro a las hojas establecería una elevación del contenido de clorofilas.

Se considera que el elevado potencial redox del manganeso ($+0,8\text{ V}$) y su capacidad de cambio de valencia $\text{Mn}^{++} \rightleftharpoons \text{Mn}^{+++}$ juegan un papel central en las funciones del manganeso en la planta (4). De aquí que sea un regulador esencial de muchos procesos de óxido-reducción de la planta. Para la mayoría de especies los niveles críticos de deficiencia suelen oscilar entre 15 y 25 ppm de manganeso referido a peso seco en las partes superiores de la planta.

1.3.1. Participación del manganeso en la fotosíntesis

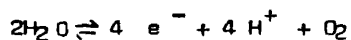
El orgánulo mayormente afectado en una deficiencia por manganeso es el cloroplasto. Además de la participación, ya citada anteriormente (51) en la biosíntesis de la clorofila, el manganeso interviene directamente sobre todo en los procesos de la fotólisis del agua (reacción de Hill) ligados al fotosistema II. Ya diversos investigadores (4) en los años 50 descubrieron que la deficiencia en manganeso disminuía sensiblemente la intensi

.../...

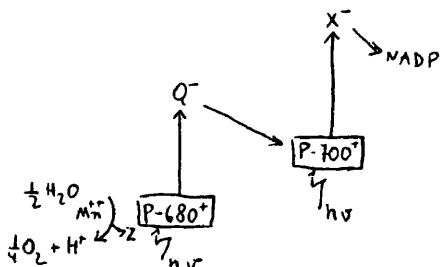
dad fotosintética y, por el contrario, no alteraba la respiración, medida como intercambio de gases. También se han descrito pruebas de la necesidad de manganeso para el mantenimiento de la estructura del cloroplasto (14, 148 y 170).

Por el momento la fotólisis del agua es uno de los procesos menos conocidos de la operación de las reacciones lumínicas de la fotosíntesis. No obstante, se dispone ya de un cuerpo suficiente de evidencias por las que el manganeso se sitúa en un lugar clave de este proceso.

De un modo formal la fotólisis del agua puede representarse en forma de una reacción de oxidación-reducción, cuyo potencial a pH 7 es de 0,81 V, para lo cual para formar una molécula de oxígeno se requiere separar cuatro electrones de dos moléculas de agua:



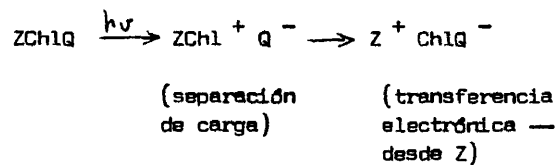
Se sabe con seguridad (47, 76 y 150) que para el desprendimiento fotosintético de O_2 se precisa de manganeso y cloro y que probablemente participan en el sitio de desprendimiento de O_2 .



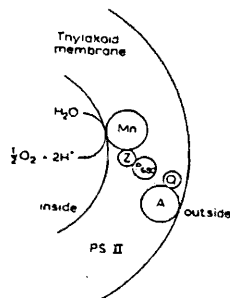
Esquema de la participación del Mn^{++} en la fotólisis del H_2O y de su situación en la operación de los fotosistemas.

.../...

El desprendimiento de O_2 va asociado al fotosistema II (PSII). La energía de un cuanto de luz roja (1,8 eV) es suficiente para inducir la — separación de cargas en el centro de reacción del PSII, por lo que se origina un oxidante fuerte Z^+ y un reductor débil Q^- (76):



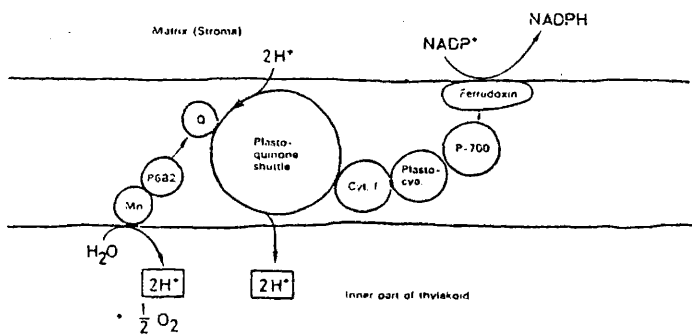
El estado redox de Z^+ debe ser más positivo que + 0,8 V, ya que — es el potencial medio necesario para oxidar el agua y hay evidencia de que Z^+ no interacciona directamente con el agua. Se desconoce, por el momento, la naturaleza de Z, que actúa como dador eficiente de electrones para — $P 680^+$ (centro activo del PSII), pero si se sabe que la separación de cargas de PSII ocurre en la membrana del tilacoide:



Dicho esquema puede ser integrado en el modelo de estructura molecular (174) que explica el aprovechamiento de la energía lumínica en la ope

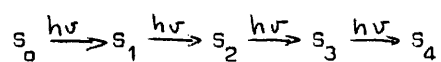
.../...

ración de los fotosistemas en forma de la energía de un gradiente electroquímico producido por la separación de cargas y la concentración de H^+ en el interior del tilacoide, proceso que está en la base de la teoría de Mitchell para la fotofosforilación. Fundamentalmente por técnicas biofísicas de medición del desprendimiento de O_2 por aplicación de destellos de luz se ha generalizado la interpretación de Kok (150) por la que el enzima del desprendimiento de



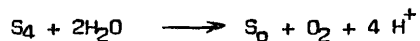
Esquema del modelo molecular de la estructura y operación de los fotosistemas en el tilacoide (174).

O_2 puede hallarse en cuatro estados cargados fotoactivos, S (modelo del estado-S):



.../...

En cada reacción se almacena una carga adicional en el lado oxidante del PSII hasta alcanzar el estado S_4 en el que se han acumulado cuatro cargas positivas. Le sigue un proceso de reacción oscura:



Hay evidencias indirectas (76) de que el "acumulador de carga" puede implicar al manganeso, debido a que el manganeso puede presentarse en diferentes estados de oxidación. No obstante, se desconoce la naturaleza química de este colector de carga. Se considera que se requieren 4 átomos de Mn por centro de reacción del PSII. Por acumulación de cuatro cargas se descompondrían rápidamente dos moléculas de agua para dar una molécula de O_2 .

En concordancia con este papel del manganeso en el PSII está la observación de que la eliminación de manganeso en el cloroplasto determina la incapacidad de desprendimiento de O_2 pero no afecta a las reacciones del fotosistema I (PSI). Precisamente los argumentos más convincentes en favor de la asociación del manganeso con el sitio de desprendimiento de O_2 proviene de experimentos de fotorreactivación con algas y cloroplastos, por los que la actividad de desprendimiento de O_2 en algas crecidas en medios deficientes en Mn puede ser restablecida por una fijación de Mn inducida por la luz al sitio de desprendimiento del O_2 (47).

De acuerdo con ello la influencia del manganeso en el complejo global de la fotosíntesis abarca fundamentalmente los siguientes aspectos en el caso de la deficiencia de este elemento en las plantas (4) :

- a) formación deficiente de clorofila por interrupción de los pasos intermedios de la síntesis de clorofila y de los impedimentos del metabolismo lipídico necesario para la formación de los ti-

.../...

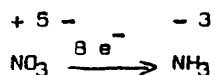
lucoides del cloroplasto.

- b) inhibición de la fotólisis del agua y, como consecuencia, del desprendimiento de O_2 a nivel del fotosistema II.
- c) dificulta la reducción del CO_2 por deficiencia en coenzimas — reducidos (NADPH₂) y de fosfato rico en energía (ATP).

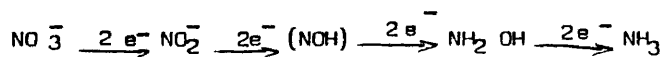
1.3.2. Participación del manganeso en la reducción del nitrato por las plantas

El proceso de reducción de los nitratos (106, 107, 108 y 134) está acoplado a una necesidad de aporte de poder reductor que puede enlazar directamente con la fotosíntesis en los tejidos verdes de la planta o estar — acoplado al suministro energético de las mitocondrias en los tejidos donde aquella no es operativa, como es el caso, por ejemplo, de las raíces.

En efecto, el proceso reductor de los nitratos requiere de 8 — electrones:



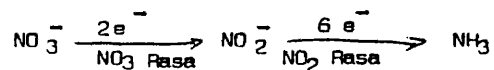
En un principio se consideró que esta reducción ocurría en una serie de pasos parciales, deducidos más bien bajo un criterio puramente químico, que transcurrían con reducciones parciales con $2e^-$. La primitiva — hipótesis de Meyer y Schultze, en 1894 (120), estableció cuatro pasos parciales con la participación de 2 electrones en cada uno de ellos:



Aunque el tema es aun muy controvertido, los estudios de la carac-

.../...

terización de los sistemas enzimáticos responsables de estos pasos intermedios, los resultados contradictorios obtenidos muchas veces y un planteamiento más crítico del problema ha permitido deducir (107 y 180) que, en realidad, la secuencia de pasos se reduce a dos, una primera reducción que requiere dos electrones y cataliza la reducción del nitrato a nitrito mediante la nitrato reductasa y un segundo proceso de reducción directa del nitrito a amonio catalizado por la nitrito reductasa y que requiere del aporte de seis electrones:



En la primera interpretación, con varios pasos enzimáticos de reducción del nitrato a amonio se han aportado diversos hallazgos experimentales (4) de presencia y necesidad del manganeso para la actividad de la nitrito reductasa de soja por el grupo de Nason y de la hidroxilaminoreductasa de Neurospora (20 y 84). Planteamientos más recientes (107) de acuerdo con la segunda versión del proceso reductor y la caracterización de la nitrito reductasa (sirohemo) han quitado importancia al hecho y, en todo caso, de ser cierta esta falta de acción directa sobre la reducción de los nitritos, no obstante, el descenso de la reducción y asimilación de los nitratos en las plantas deficientes en Mn podría deberse a un efecto indirecto, ya que la reducción de los nitritos depende de la ferredoxina reducida como dador de electrones, la cual es suministrada por la cadena fotosintética de transporte de electrones que se ve perjudicada por la deficiencia de Mn, tal como hemos visto en el apartado 1.3.1. La necesidad de aporte energético (ATP) en la asimilación del amoníaco a aminoácidos (34) se ve frenada, por la misma razón, en déficit de manganeso lo que coadyuva aun más a la

.../...

explicación de este efecto indirecto de la deficiencia de manganeso.

1.3.3. Otras acciones del manganeso sobre el metabolismo vegetal

Numerosos procesos enzimáticos están regidos por la intervención de elementos nutrientes de forma que, bien sea como sustratos, como componentes de metabolitos o activadores o inhibidores pueden afectar las proporciones de gran número de reacciones catalizadas enzimáticamente. En los seres vivos estas reacciones no operan aisladamente sino que, más bien, una reacción enzimática forma parte de una compleja red de reacciones interdependientes, cada una influenciada e influenciando a las otras. Esta secuencia altamente integrada de reacciones enzimáticas es lo que caracteriza a los procesos metabólicos o fisiológicos.

El papel clave que pueden llegar a jugar los nutrientes minerales en la planta se debe precisamente a su intervención en reacciones enzimáticas específicas (175), en la regulación de las secuencias y cadenas de reacciones en numerosos puntos de control y en la influencia sobre las funciones fisiológicas complejas.

El manganeso pertenece al 3^{er} grupo de la clasificación fisiológica de los nutrientes vegetales (K, Na, Mg, Ca, Mn y Cl) (ver apartado 1.1) En muchos casos el manganeso ejerce funciones celulares iónicas no específicas de regulación del potencial osmótico en los orgánulos celulares o en el mantenimiento del balance iónico.

Se conocen también muchas acciones específicas sobre numerosos sistemas enzimáticos (151). En la Tabla 2 se indican algunos de los enzimas

.../...

que son activados por el Mn. Como se deduce del análisis de dicha tabla, el manganeso afecta a procesos metabólicos muy variados (149), entre los que - cabe destacar la activación de los procesos de la fosforilación celular y - muchas reacciones de oxidación y descarboxilación del ciclo de Krebs (26 y 163), aparte las ya descritas para los procesos fotosintéticos (1.3.1. y - 1.3.2.)

Tabla 2 Enzimas activados por iones manganosos (133a)

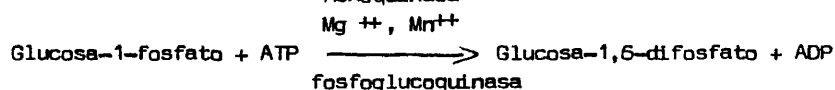
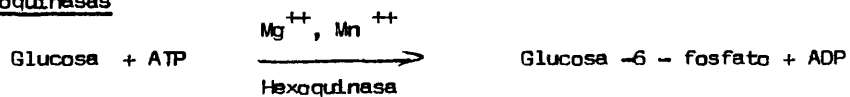
Enzimas	Metal
Glucoquinasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Hexoquinasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Fosfoglucoquinasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Fosfoglucomutasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Cr ⁺⁺
Ac. fosfoglicéricoquinasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Zn ⁺⁺
Adenosinquinasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Argininquinasa	Ca ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Mg ⁺⁺
NAD quinasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Levadura apirasa	Mn ⁺⁺
Glutamil transferasa	Mn ⁺⁺
Glutamin sintetasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Defosfo-CoA quinasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Pirúvico carboxilasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Pirúvico oxidasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Oxalacético descarboxilasa	Mg ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Isocítrico deshidrogenasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Oxalsuccínico descarboxilasa	Mn ⁺⁺
-cetoglutarato oxidasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Enzima málico	Mn ⁺⁺ , Co ⁺⁺
Enzima condensante	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Levadura fosfatasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Fe ⁺⁺ , Ni ⁺⁺
Fosfatasa ácida y alcalina	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ y otros
Arginasa	Mn ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Ni ⁺⁺ , Fe ⁺⁺
Lecitinasa	Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
Cisteína desulfidrasa	Zn ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺
DNasa	Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Fe ⁺⁺
Nitrito reductasa	Mn ⁺⁺
Hidroxilamina reductasa	Mn ⁺⁺

En la Tabla 3 (5) se resumen los principales enzimas que participan en reacciones de fosforilación y que se sabe que son activados por Mn^{++} . Se supone que en estos enzimas la función del manganeso es parecida a la del Mg^{++} , al que en muchos casos pueden sustituir, por formación de puentes entre el pirofosfato y el enzima o el sustrato.

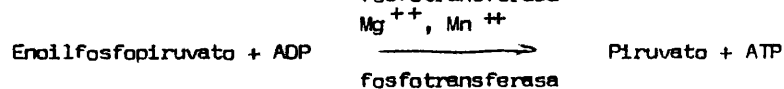
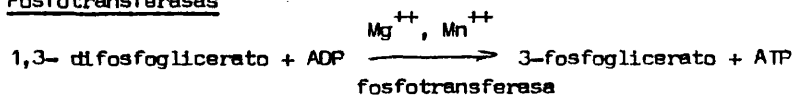
Tabla 3

Activación de reacciones de fosforilación por el Mn^{++} (5)

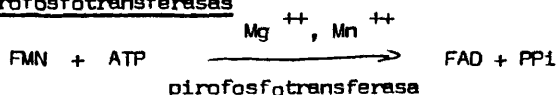
Fosfoquinasas



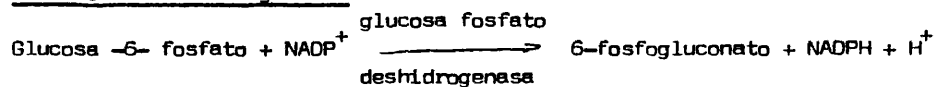
Fosfotransferasas



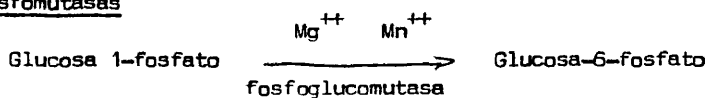
Pirofosfotransferasas

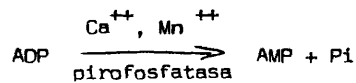
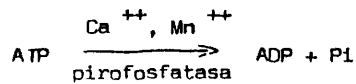
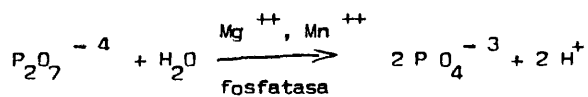


Fosfoesterdeshidrogenasas



Fosfomutatas



Fosfatasa y pirofosfatasa

Entre los enzimas del ciclo de Krebs que son activados por el manganeso cabe citar (26 y 190) la isocitrato deshidrogenasa, cetoglutarato oxidasa, malato deshidrogenasa y el enzima condensante. La descarboxilación del oxalacetato a piruvato, catalizada por la oxalacetato descarboxilasa, es activada también por el manganeso.

Otros enzimas en los que se reconoce la participación del manganeso son las aminotransferasas (55), peptidasas y arginasa (65). Para el caso de la arginasa se supone que la activación de la hidrolisis de la arginina se logra por formación de un complejo entre el manganeso, el enzima y el sustrato, por el que el metal pesado causa un cambio de resonancia del ion guanidinium y un aflojamiento de la molécula del sustrato por rotura de la unión C-N, lo que facilita el ataque hidrolítico por el enzima (5).

En experiencias con girasol (192) se ha comprobado que el hierro y el manganeso influyen en la actividad de la catalasa y de la citocromo oxidasa. Ultimamente se tienen evidencias de que el Mn^{++} afecta marcadamente

.../...

la actividad de la glutamina-sintetasa (117, 121, 122 y 139). Se conocen regulaciones de las RNA polimerasas I y II dependientes de DNA (52) y de la - fosfoenolpirúvico carboxilasa (42 y 131).

En otro orden de ideas se ha comprobado (58) que el Mn^{++} y Mg^{++} y a veces el Ca^{++} son cofactores de la acción del fitocromo (18) sobre el potencial de membrana y puede explicar porque la planta de día corto Lemna — perpusilla puede florecer en día largo en presencia de cobre. La actividad de las lectinas de guisante se ha comprobado que tienen un requerimiento — de Mn^{++} y Ca^{++} (104). En las plantas C_4 del tipo esportato, el enzima máli— co dependiente de NAD requiere de Mn (151).

En resumen, el manganeso puede actuar como un activador de una amplia variedad de enzimas que incluyen los que catalizan reacciones de oxi— dación-reducción, descarboxilaciones, hidrólisis y transferencias de gru— pos.

1.3.4. Acciones del manganeso sobre el desarrollo mediadas por fitohormonas

En los apartados anteriores (1.3.1, 1.3.2, y 1.3.3.) hemos consi— derado la participación del manganeso, directamente ó como activador, en — muchos procesos enzimáticos del metabolismo de la planta. De este modo el — manganeso juega un papel en la regulación del metabolismo intracelular. Pe— ro estas acciones se supone que pueden tener también un alcance en la regu— lación intercelular de las plantas, por una serie de evidencias de que se — dispone sobre la acción del manganeso sobre algunas fitohormonas.

De entre ellas la más estudiada y la que se supone que puede me—

.../...

diar mas acciones, en las deficiencias ó en el exceso de manganeso en planta, son las auxinas. Morgan et al (127 y 128) han comprobado que el exceso o la deficiencia aumenta la destrucción in vitro de la auxina por incremento de la AIA-oxidasa en algodón. Otras veces se ha señalado (119) que el manganeso estimula la reacción inducida por sulfito en la autooxidación - enzimática del AIA, actuando los iones manganeso en la transferencia electrónica entre el sulfito y los radicales libres del AIA. Para Steward (164) la peroxidasa es la responsable de la oxidación del Mn^{++} a Mn^{+++} , el cual permite el ataque a la auxina. Según Maclachlan et al (113) y Munford et al (133) en presencia de Mn^{+++} libre se consigue por descarboxilación y oxidación del AIA un radical metilindol que por influjo del oxígeno atmosférico se convierte en el radical indolperóxido que es oxidado por la ácido - indol acético oxidasa. Por el radical fenólico que se forma el Mn^{++} sería reoxidado a Mn^{+++} (4). La reversión por el manganeso del efecto inhibitorio ejercido por las giberelinas sobre el crecimiento de las raíces de sorgo (25) ha sido interpretado en el sentido de que el exceso de manganeso favorece la oxidación de la auxina por cuya mediación se cree que, en este caso, actúan las giberelinas sobre el crecimiento.

Aunque es muy difícil adjudicar el papel exacto que juega el manganeso en la regulación de la actividad de la AIA-oxidasa y si esta regulación de los niveles de AIA es un proceso clave de los posibles efectos del manganeso sobre el crecimiento, un hecho que debe destacarse es que el Mn^{++} y los monofenoles son cofactores de la activación de la AIA-oxidasa.

1.4. TOXICIDAD PARA LAS PLANTAS DEL EXCESO DE MANGANESO

Además de su carácter de micronutriente esencial para las plantas,

.../...

a mayores concentraciones (consumo de lujo), se han descrito muchas acciones tóxicas del manganeso (30, 32, 33, 36 y 37).

Según Labanauskas (100), los suelos en los que con mayor frecuencia se encuentra exceso de manganeso o las prácticas de cultivo que pueden contribuir a ello son:

- 1) suelos fuertemente ácidos
- 2) falta de aireación del suelo que reduce la forma mangánica (Mn ⁺⁺⁺) a manganosa (Mn ⁺⁺)
- 3) empleo de fertilizantes ácidos
- 4) aplicación al suelo de compuestos de manganeso durante muchos años lo que ha ocurrido en los suelos arenosos y ácidos de Florida. En efecto una amplia gama de trabajos concuerdan con estas conclusiones. (39, 49, 60, 62, 64, 66, 71, 75, 77, 83, 89, 93, 141, 153, 168 y 184).

1.4.1. Efectos tóxicos generales sobre el crecimiento y el metabolismo de las plantas.

Se ha descrito una gran diversidad de acciones provocadas por el exceso de manganeso sobre el crecimiento de las distintas especies de plantas (9, 10, 11, 36, 85, 138 y 141). En general, se presentan una serie de síntomas a concentraciones críticas en las que todavía no se ve afectado el crecimiento. Otra característica suele ser que es más afectado el crecimiento de las partes aéreas que el de las raíces. Entre los síntomas de carácter general producidos por el exceso de manganeso se citan clorosis inter-

.../...

venales o en los bordes de las hojas, necrosis de hojas, disminución de su tamaño y manchas necróticas de las mismas (36, 68 y 69). Entre los daños — específicos causados por el exceso de manganeso en plantas se han descrito el "crinkle leaf" en el algodón (189), la "stem streak necrosis" de la pa—tata (152) y la "internal bark necrosis" del manzano (54 y 61).

De la especie *Phaseolus vulgaris* se disponen ya de una serie de re—sultados referidos fundamentalmente a los síntomas y características del — crecimiento (7, 17, 36, 77, 99, 130, 143 y 147) que guardan un gran pareci—do con los ya descritos con carácter general. En muchos casos se ha observa—do la presencia de puntos o manchas pardo-negruczas en los tallos y pecio—los e incluso en las hojas, junto con síntomas de "crinkle leaf" (7, 17, 36, 37, 89, 130 y 147). Según Bussler (36 y 37) estas manchas o puntos serían — precipitaciones de MnO_2 por las que la planta se defiende así de las altas concentraciones de Mn^{++} (7, 95 y 96). Según Horst et al (89) estas precipi—taciones se localizan preferentemente en las paredes celulares de células — cercanas al sistema de los vasos y la intensidad de precipitación de manga—neso no sólo depende del contenido de manganeso sino también de la edad de la hoja, siendo mayor con el tiempo. Junto a estas precipitaciones de man—ganeso son también síntomas característicos del exceso de manganeso la pre—sencia de clorosis (35, 91 y 130).

Las altas concentraciones de manganeso que reducen el crecimiento — de la planta han sido atribuidas al efecto activante del Mn^{++} sobre la — AIA-oxidasa y por tanto mediadas por su efecto sobre los niveles de AIA, — como ya hemos considerado en el apartado correspondiente (1.3.4.)

Algunos efectos del exceso de manganeso se supone que vienen con—dicionados por las interacciones del manganeso con otros elementos. Así se —

.../...

ha comprobado que el manganeso a altas concentraciones puede inducir la deficiencia de hierro en las plantas (3, 33, 39, 44, 101, 109, 123, 132, 135, 158, 160 y 168). Osawa et al (140) distinguen dos tipos de daños causados a la planta por el exceso de manganeso, caracterizados por clorosis interve—nal de las hojas superiores, en un caso, y por clorosis del borde de las ho—jas inferiores, con manchas necróticas. El primer caso lo atribuyen a una —deficiencia de hierro, mientras que el segundo mas bien se debería a una —acumulación de manganeso en exceso. Relacionado con ello está el hecho que el suministro de hierro puede mejorar los efectos perjudiciales del exceso de manganeso, tal como ya hemos comentado anteriormente (1.3.1.). Ligado a esta interrelación Mn-Fe, en ciertos casos, (98) se ha comprobado que tam—bien puede venir condicionado por los niveles de molibdeno. La inducción —por altas concentraciones de manganeso de deficiencias de hierro en las —plantas ha recibido distintas interpretaciones. En unos casos, se considera que depende de efectos competitivos en el proceso de la absorción y trans—porte del hierro (172) o, en otros, de una competición por el metal pesado inhibitorio para los sitios funcionales de unión del hierro (84).

Entre las distintas acciones metabólicas causadas por el exceso —de manganeso cabe citar la acción mutagénica sobre el DNA de levadura (15), el incremento en la síntesis de ácido ascórbico y carotenos, en la germina—ción del maíz (114), el aumento de los niveles de α -cetoácidos en Avena —sativa y Triticum sativum, disminución del peso seco en la remolacha azuca—rera (171) y una multiplicidad de acciones sobre los enzimas que ya han si—do reseñadas en los correspondientes apartados (1.3.2. y 1.3.3.).

1.4.2. Efectos sobre la simbiosis planta-Rhizobium

.../...

Se disponen de varias evidencias de efectos perjudiciales del exceso de manganeso sobre la simbiosis de las leguminosas con las bacterias del género Rhizobium en el proceso de la fijación biológica del N_2 atmosférico. Dobersiner (50) ha estudiado la toxicidad del manganeso sobre la nodulación de Phaseolus vulgaris en suelos ácidos con alta disponibilidad de manganeso para las plantas. A partir de 25 ppm de manganeso en el medio nutritivo en cultivo de arena halló descenso del 30 al 60% en el porcentaje de N total de la planta. Este mismo autor interpreta que los resultados obtenidos con distintas variedades de plantas y de Rhizobium se deben a las condiciones de solubilidad del manganeso en el medio y a la diferente tolerancia para el manganeso de las diferentes variedades. Otras aportaciones en este área dan resultados semejantes y parecen indicar la existencia de interrelaciones entre Ca y Mn y Mg y Mn en los efectos sobre la nodulación (70 y 88).

1.4.3. Sensibilidad y tolerancia de las plantas al exceso de manganeso

Un hecho distintivo a destacar es la gran diversidad de tolerancia que muestran las distintas especies frente a la toxicidad por incremento en los niveles de manganeso (23, 24, 63, 67, 68, 69, 78, 89 y 169). Dessureaux (45) ha atribuido la tolerancia al manganeso de la alfalfa a genes aditivos de escasa o nula dominancia.

Los genes responsables de la tolerancia al manganeso para distintos genotipos de Lactuca sativa han sido localizados en un mapa cromosómico (53.)

Se ha dado diversas interpretaciones sobre las causas de esta to—
.../...

tolerancia al manganeso. Así se ha atribuido a una reducción de la absorción, a un descenso del transporte del exceso de manganeso a las partes superiores, a un mecanismo de exclusión del manganeso por las raíces e incluso a una mayor tolerancia a altos niveles de manganeso en los tejidos de la planta (67, 68, 69, y 169).

En el maíz se requiere del orden de 20 veces más de manganeso en la solución nutritiva para producir toxicidad que en el caso del cacahuete (23). Parece ser que la sensibilidad al manganeso del cacahuete va asociada con la acumulación de manganeso en las hojas, mientras que la reducción del transporte de éste en el maíz se debe a la reducción del transporte del mismo desde las raíces a los tallos y hojas.

En otros casos, la tolerancia se debe también en parte a una retención del exceso de manganeso en las raíces (3). La tolerancia de muchas especies a los suelos ácidos (disponibles en manganeso divalente) suele coincidir con la tolerancia al exceso de manganeso en las soluciones nutritivas (74 y 153).

Otra variación a destacar son los niveles críticos que en las diferentes especies provocan la toxicidad por manganeso. Para el caso de la judía, guisante y cebada se han dado valores de 1000, 500 y 200 ppm, respectivamente (193). Andrew et al (3) indican valores de 300 ppm de manganeso en Medicago sativa y de 1600 ppm en Centrosema pubescens.

Para ciertos casos de clorosis del borde de la hoja, en la "internal bark necrosis" la toxicidad se relaciona con la acumulación de manganeso más que con la concentración global, del manganeso en las partes superiores.

Diversos factores climáticos inciden también en la regulación de -
.../...

las plantas al exceso de manganeso. Este es el caso sobre todo de la temperatura y de la intensidad de luz. Por elevación de la temperatura en cultivos de soja, a pesar de ocurrir una mayor absorción de manganeso, se presentan menos síntomas de toxicidad. (78).

2. OBJETO DEL TRABAJO

2. OBJETO DEL TRABAJO

De la anterior revisión bibliográfica se deduce la esencialidad - del manganeso para las plantas y su participación en una gran diversidad - de procesos metabólicos. Por sus concentraciones y funciones en la planta - se suele incluir al manganeso entre los micronutrientes. En la planta por - debajo de las concentraciones críticas se presentan típicos efectos de defi - ciencia y por encima, con distinta tolerancia para las diferentes especies, fenómenos de toxicidad. Entre las interacciones del manganeso con otros me - tales, respecto a la absorción o a sus efectos fisiológicos, hemos visto que se ha citado frecuentemente al hierro como uno de los más decisivos.

En nuestro trabajo hemos continuado la línea de investigación que ya habíamos iniciado anteriormente (16, 17 y 147) y a fin de poder observar los efectos sobre la especie Phaseolus vulgaris del exceso de manganeso se han considerado tres tipos de experimentos distintos.

En la experiencia I se han considerado los efectos sobre las plan - tas de distintas concentraciones de manganeso (cercasas al umbral crítico - de fitotoxicidad) en solución nutritiva con suministros altos de hierro en forma de Fe-EDDHA (Sequestrene) e inoculación con Rhizobium phaseolii para la fijación simbiótica del N₂ atmosférico, en ausencia de otra fuente de nitrógeno a la solución.

En la experiencia II, para un estudio comparativo con la variante anterior y a fin de observar la interrelación Fe/Mn, se descendieron los - niveles de Fe-EDDHA, manteniéndose el resto de condiciones iguales.

En la experiencia III se amplió el margen de concentraciones en -

.../...

exceso de manganeso, incluso muy por encima de las concentraciones críticas que provocaban los síntomas iniciales de fitotoxicidad, a la par que se sus-tituyó la nutrición nitrogenada de fijación simbiótica del N_2 por el sumi-nistro directo a la solución nutritiva de N en forma de nitratos, como otro de los posibles factores que interaccionan con la absorción y efectos del -manganeso en las plantas.

Las tres series de experiencias abarcaron todo el ciclo biológico de las plantas, desde la germinación de las semillas hasta la fructifica--ción y senescencia, con muestreos repetitivos de periodicidad como mínimo -semanal que correspondían a las distintas fases del desarrollo de Phaseolus vulgaris (semilla, plántula, estado vegetativo, prefloración, floración, -fructificación y senescencia).

Por la incidencia del exceso de manganeso sobre el desarrollo de -las plantas han sido consideradas las características del crecimiento en -cada fase. La participación del manganeso en la fotosíntesis (biosíntesis -de pigmentos y fotólisis del agua, entre otros) y el papel central que ésta juega en el metabolismo vegetal nos ha inducido a seguir el curso de los ni-veles de los pigmentos fotosintéticos.

En las experiencias I y II han sido estudiadas las interrelaciones del Fe/Mn y seguido sus niveles internos, especialmente en la serie de expe-riencias II. También en ambas series de experiencias se ha considerado el -contenido de proteínas solubles a fin de poder detectar el posible efecto -del manganeso sobre la nutrición simbiótica del N_2 en Phaseolus vulgaris. -En todas las experiencias se ha estudiado por separado, en parte aérea y en raíz, cada una de las fracciones analizadas.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

3. M A T E R I A L Y M E T O O S

P A R T E E X P E R I M E N T A L

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. CONDICIONES DEL CULTIVO

Como material de experimentación se ha utilizado la judía — (Phaseolus vulgaris L.) Contender de mata baja, cuyas semillas fueron suministradas por la casa Vilmorin.

Para conseguir un medio nutritivo óptimo controlado las experiencias se han realizado en cultivo en jardineras de plástico de 30 x 30 cm con solución nutritiva y perlita como sustrato inerte.

Como fuente de manganeso se usó en todos los experimentos — $\text{SO}_4\text{Mn.H}_2\text{O}$ (Merck).

Se han realizado tres tipos diferentes de experiencias.

Experiencia I: no se suministraron en la solución nutritiva ni nitratos ni amonio, en su lugar los cultivos fueron sembrados con semillas inoculadas con Rhizobium phaseolii; el hierro, en estas experiencias fue suministrado en dosis altas con — Fe-EDDHA (Sequestrene).

Experiencia II: igual que I pero dosis inferiores de Fe-EDDHA

Experiencia III: el N fue suministrado a las plantas con la solución nutritiva en forma de nitratos y se mantuvieron niveles bajos de hierro como Fe-EDDHA en las mismas dosis que en II.

.../...

Para las experiencias I y II se utilizó la fórmula nutritiva de -
Evans modificada (59):

$\text{SO}_4\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1'033 g/l
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0'493 g/l
SO_4K_2	0'279 g/l
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0'023 g/l
PO_4HK_2	0'145 g/l
Cl_2Ca	0'056 g/l
Fe-EDDHA	16'67 mg/l
BO_3H_3	1'43 mg/l
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot \text{H}_2\text{O}$	1'02 mg/l
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0'22 mg/l
$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0'09 mg/l
$\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0'10 mg/l
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0'05 mg/l

Las experiencias I recibieron 16'67 mg/l de Fe-EDDHA (Sequestre-
ne), mientras que las II 3'33 mg/l de Fe-EDDHA.

En el caso de los experimentos de la serie III fue utilizada la -
fórmula nutritiva de Long Ashton (32) modificada por nosotros:

NO_3K	0'505 g/l
$(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$	0'320 g/l
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0'209 g/l
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0'369 g/l
EDDHA -Fe	3'334 mg/l

.../...

BO_3H_3	1'430 mg/l
$\text{SO}_4\text{Mn. H}_2\text{O}$	1'020 mg/l
$\text{SO}_4\text{Zn. 7H}_2\text{O}$	0'220 mg/l
$\text{SO}_4\text{Ca. 5H}_2\text{O}$	0'080 mg/l
$\text{Cl}_2\text{Co. 4H}_2\text{O}$	0'100 mg/l
ClNa	5'950 mg/l

En la Tabla 4 se indican las distintas concentraciones de manganeso que fueron suministradas a los diferentes lotes de plantas para cada una de las tres experiencias planteadas. Para las experiencias I (con alto nivel de Fe-EDDHA e inoculadas con Rhizobium phaseolii) se dispusieron de cuatro lotes de plantas, de cuatro jardineras cada uno (total por lote, 120 plantas): el lote control recibió únicamente solución nutritiva, a los tres lotes restantes se les suministró cantidades adicionales de manganeso para alcanzar concentraciones del orden de 10 ppm, 40 ppm y 90 ppm de Mn, respectivamente. Las experiencias II (bajo nivel de Fe-EDDHA e inoculadas con Rhizobium phaseolii) se distribuyeron también en cuatro lotes de plantas, de cuatro jardineras cada uno (total por lote, 120 plantas): el lote de plantas control recibió únicamente solución nutritiva, a los tres lotes restantes además se les suministró manganeso para alcanzar concentraciones del orden de 10 ppm, 40 ppm y 30 ppm de Mn, respectivamente. La única variante entre las experiencias I y II era, pues, los niveles de hierro. Por último, las experiencias III, (bajo nivel de Fe-EDDHA y nitratos en la solución nutritiva en lugar de la inoculación por Rhizobiums) se dispusieron en ocho lotes de plantas de cuatro jardineras cada uno (total por lote, 120 plantas): el lote de plantas control recibió únicamente solución nutri-

.../...

tiva, a los siete lotes restantes se les suministró además manganeso hasta alcanzar concentraciones de 10 ppm, 40 ppm, 80 ppm, 160 ppm, 300 ppm — 500 ppm y 1000 ppm de Mn en la solución nutritiva, respectivamente.

Tabla 4

Distintos tipos de tratamientos, con concentraciones tóxicas de manganeso, a que fueron sometidas las plantas de Phaseolus vulgaris L. Las plantas — control recibieron el mismo volumen de solución nutritiva normal.

Experiencia	Tipo de tratamiento			
I	Sol. nutrit. de Evans modificada (Control)			
Fe-EDDHA: 16'67 mg/l	"	"	"	+ SO ₄ Mn (10 ppm)
<u>Rhizobium phaseolii</u> 403-2	"	"	"	+ SO ₄ Mn (40 ppm)
	"	"	"	+ SO ₄ Mn (80 ppm)

II	Sol. nutrit. de Evans modificada (Control)			
Fe-EDDHA: 3'33 mg/l	"	"	"	+ SO ₄ Mn (10 ppm)
<u>Rhizobium phaseolii</u> 403-2	"	"	"	+ SO ₄ Mn (40 ppm)
	"	"	"	+ SO ₄ Mn (80 ppm)

III	Sol. nutrit. de Long Ashton modif. (Control)			
Fe-EDDHA: 3'33 mg/l	"	"	"	" +SO ₄ Mn (10 ppm)
Nitratos	"	"	"	" +SO ₄ Mn (40 ppm)
	"	"	"	" + SO ₄ Mn(80 ppm)
				.../...

Nitratos	Sol. nutrit. de Long Ashton modif. (Control)				
	"	"	"	"	" +SO ₄ Mn(160 ppm)
	"	"	"	"	" +SO ₄ Mn(300ppm)
	"	"	"	"	" +SO ₄ Mn(500ppm)
	"	"	"	"	" +SO ₄ Mn(1000ppm)

La solución nutritiva correspondiente a cada tratamiento se renovó dos veces por semana a fin de mantener estable el contenido y las proporciones iónicas de la solución y el valor de su pH. El pH de la solución era 6,4.

Para el cultivo de las plantas se adecuó una habitación del Laboratorio fuertemente iluminada por luz natural. Las variaciones de humedad y temperatura oscilaron dentro de unos márgenes estrechos. En la Tabla 5 se indican las temperaturas máxima y mínima y la humedad relativa, medias, correspondientes a los meses que duró el cultivo de las experiencias.

En cada serie de experiencias previamente a la siembra las semillas se esterilizaron con Cl₂ Hg 0,5 % durante cinco minutos y después se lavaron varias veces con agua destilada.

En la serie de experiencias I y II las semillas, una vez esterilizadas con Cl₂Hg y lavadas con agua, se inocularon con Rhizobium phaseolii - 403-2 suministrado por el Instituto Jaime Ferran del C.S.I.C. de Madrid. — Para ello se suspendieron los gérmenes en un tubo de ensayo con aproximadamente 20 mililitros de agua destilada y en esta solución se sumergieron las semillas.

.../...

Tabla 5

Valores medios, expresados en grados centígrados, de las temperaturas máxima y mínima y de la humedad relativa durante los meses que duraron las experiencias.

Mes	Temperatura máxima	Temperatura mínima	Humedad relativa
Octubre	21 °C	15 °C	84%
Noviembre	23 °C	21 °C	60%
Diciembre	23 °C	19 °C	60%
Enero	23 °C	17 °C	57%
Febrero	24 °C	20 °C	59%
Marzo	25 °C	20 °C	60%
Abril	21 °C	17 °C	73%
Mayo	22 °C	18 °C	75%

3.2. TOMA DE MUESTRAS

Las experiencias abarcaron todo el ciclo vegetativo de Phaseolus vulgaris L. desde la germinación de las semillas hasta la fructificación y senescencia de las plantas. Para cada muestra varió el número de plantas —elegido, según las características del crecimiento en cada estado fisiológico de la planta. En todos los casos se procedió previamente a la elección —de las plantas más representativas de cada uno de los lotes.

Las características del crecimiento y desarrollo de las plantas —

.../...

fueron seguidas por medición del crecimiento longitudinal de las plantas y de los valores de peso fresco. El peso seco se determinó a partir de las — plantas destinadas al análisis interno de manganeso.

En las Tablas 6, 7 y 8 se detallan, respectivamente, las fechas de toma de muestra y la edad de las plantas para cada una de las muestras tomadas con las variantes experimentales I, II y III.

Tabla 6

Fecha de toma de muestra y edad de las plantas correspondiente a los experimentos de la serie I con Ph. vulgaris.

Muestra	Fecha de toma de muestra	Edad plantas
0	24 octubre	0 días
1	5 noviembre	12 días
2	9 noviembre	15 días
3	12 noviembre	19 días
4	15 noviembre	21 días
5	20 noviembre	26 días
6	26 noviembre	32 días
7	29 noviembre	34 días
8	11 diciembre	47 días
9	15 diciembre	50 días
10	9 enero	76 días
11	14 enero	81 días

.../...

Tabla 7

Fecha de toma de muestra y edad de las plantas correspondiente a los experimentos de la serie II con Ph. vulgaris.

Muestra	Fecha de toma de muestra	Edad plantas
0	15 enero	0 días
1	26 enero	11 días
2	30 enero	25 días
3	4 febrero	30 días
4	11 febrero	37 días
5	18 febrero	44 días
6	25 febrero	51 días
7	3 marzo	58 días
8	10 marzo	65 días

Tabla 8

Fecha de toma de muestra y edad de las plantas correspondiente a los experimentos de la serie III con Ph. vulgaris.

.../...

Muestra	Fecha de toma de muestra	Edad plantas
0	25 marzo	0 días
1	4 abril	10 días
2	7 abril	13 días
3	10 abril	16 días
4	14 abril	20 días
5	19 abril	25 días
6	26 abril	32 días
7	2 mayo	38 días
8	9 mayo	45 días
9	16 mayo	52 días
10	24 mayo	60 días

3.3. CAPACIDAD GERMINATIVA

Se determinó para cada lote y tipo de tratamiento el porcentaje de plántulas germinadas. El muestreo fue referido a 200 semillas exactamente contadas y seleccionadas.

3.4. DETERMINACIONES ANALITICAS

A fin de lograr una mejor localización de las acciones del manganeso

.../...

en las plantas se realizaron, por separado, las determinaciones analíticas de la parte aérea y de las raíces.

Los valores determinados, en cada una de las variantes consideradas (Experiencias I, II y III) fueron los siguientes: crecimiento longitudinal, peso fresco, peso seco y contenido de pigmentos liposolubles (clorofilas a y b y carotenoides). En las series de experiencias I y II adicionalmente se determinaron los valores internos de manganeso y proteínas en parte ~~—~~ aérea y raíces, separadamente. La serie de experiencias II incluyó, además, el análisis de los niveles internos de hierro en parte aérea y raíz.

3.4.1. Determinación del crecimiento

Como ya se expresó anteriormente, el número de plantas que se usaron en cada muestra varió conforme fue aumentando el crecimiento de las plantas y el estado en que se encontraron después de cada tipo de tratamiento.

Para cada muestra, antes de proceder a obtener el homogeneizado, se midió el crecimiento en longitud de la parte aérea y de las raíces. El peso fresco se determinó por pesada inmediata después de recogidas y seccionadas las partes de las plantas.

Para la determinación del peso seco se procedió con un número representativo de plantas que se desecaron a 105 °C hasta peso constante.

3.4.2. Determinación del manganeso en plantas

3.4.2.1. Micrométodo de la formaloxima de Van Schouwenburg y Walinga (173)

.../...

Para la extracción y valoración del manganeso en plantas hemos estandarizado el micrométodo de la formaldoxima de Van Schouwenburg y Walinga (178) que ha resultado adecuado y sensible para detectar cuantitativamente las diferencias en el contenido de manganeso de las plantas en las distintas variantes experimentales a que han sido sometidas en nuestro trabajo.

3.4.2.1.1. Reactivos

- a) Solución de metol-sulfito-ácido sulfúrico: mezclar antes del uso volúmenes iguales de a.1 y a.2.
 - a.1) Disolver 34 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 2,5 g de $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,25 g de metol (p-metilaminofenolsulfato) y completar hasta un volumen de 500 ml.
 - a.2) Acido sulfúrico diluido: diluir 14 ml de H_2SO_4 (1,34) hasta el volumen final de un litro.
- b) Solución buffer: disolver 50 g de KNa tartrato. $4\text{H}_2\text{O}$, 125 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 10 ml de NH_4OH (0,91) y completar hasta un volumen final de un litro.
- c) Solución de TTA: disolver 3,3 g de 2-tenoiltrifluoroacetona en 1 litro de una mezcla de 1 + 1 de n-dibutiliter y 4-metil-2-pentanona. Esta solución puede guardarse por lo menos un mes.
- d) Solución alcalina de KCN: disolver 1,7 g de KCN y 22,4 ml de NH_4OH (0,91) y llevar a un volumen final de 100 ml.
- e) Reactivo de formaldoxima: disolver 5 g de hidroxilamina HCl y 5 g de formaldehído 40 % y completar hasta un volumen final de 100 ml.

.../...

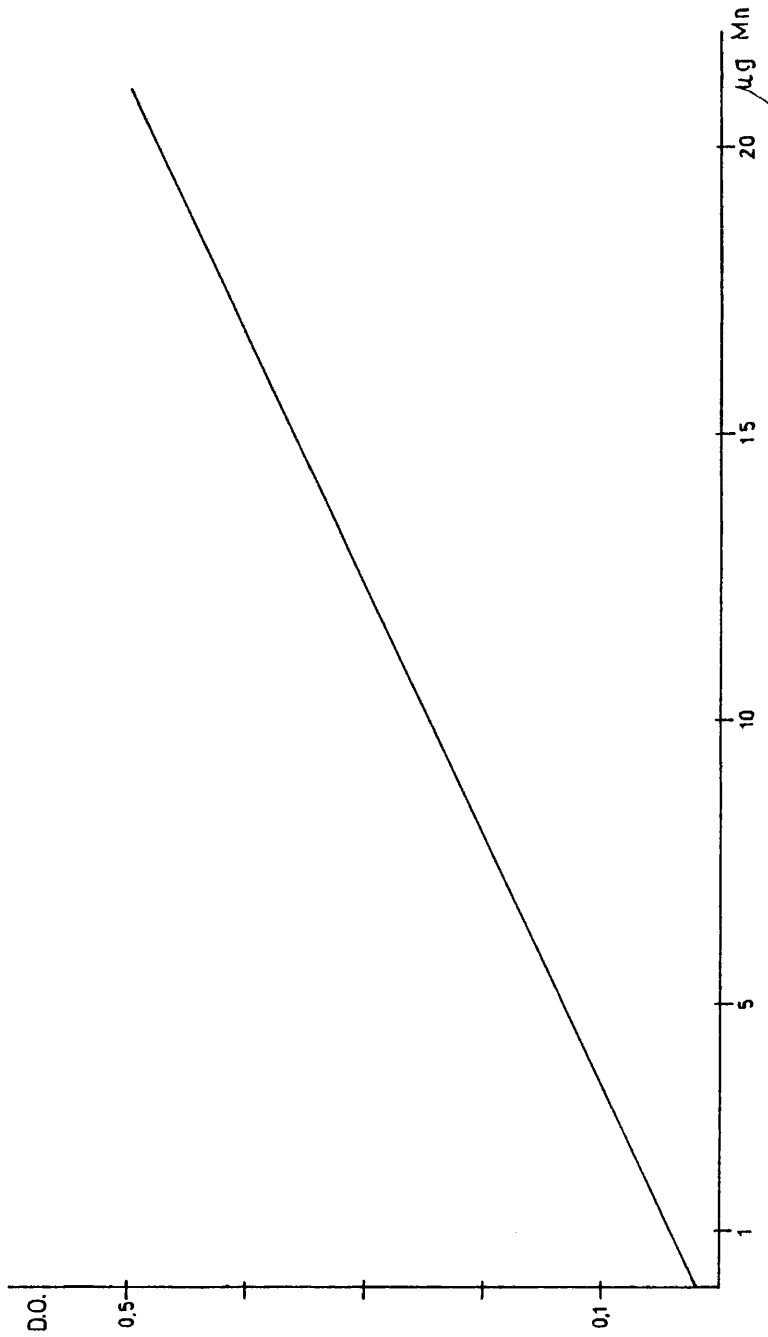
- f) Amonio 1,6 N: diluir 12 ml de NH_4OH (0,91) y completar un volumen final de 100 ml.
- g) Solución estandar de 10 ppm de Mn: disolver en un vaso de precipitados de 600 ml 0,288 g de KMnO_4 en aproximadamente 200 ml de — agua destilada a la que se le había añadido 45 ml de H_2SO_4 (1,84). Reducir el KMnO_4 con unas pocas gotas de H_2O_2 30 %. Se hierve para expulsar el exceso de H_2O_2 . Se transfiere la solución enfriada a un matraz aforado de 1 litro y se completa el volumen. Se pipetea 100 ml de esta solución a un matraz aforado de 1 litro y se completa de nuevo el volumen.

3.4.2.1.2. Procedimiento

Digestión de la materia orgánica (Schaumlöffel) (154): Se lleva a un matraz aforado de 50 ml 1 g de material vegetal desecado al aire. Luego se añaden 10 ml de una mezcla de ácidos (HNO_3 : HClO_4 : H_2SO_4 = 10 : 1 : 1 - partes expresadas en volumen) y si es posible se deja durante una noche — para evitar la formación excesiva de humos. Se calienta moderadamente sobre una placa caliente. Debe tardar 40 minutos o más para que se evapore el HNO_3 . Después se incrementa al máximo el calor. La destrucción es completa sólo si queda ácido sulfúrico. Si permanece algún color se debe enfriar el frasco y añadir algunas gotas de HClO_4 60 %. Se calienta de nuevo el frasco hasta que todo el HClO_4 esté evaporado. Se añaden de 10 a 20 ml de agua destilada y algunas gotas de H_2O_2 30 % para reducir los óxidos de Mn que se podrían haber formado y se hierve durante 10 minutos. Se deja enfriar el frasco y se completa hasta el enrase con agua destilada.

.../...

Fig -1 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION CLORIMETRICA DE Mn



Determinación del manganeso:

Pipetear 5 - 10 - 20 ó 35 ml del digerido (que contenga menos de 20 µg de Mn) a un embudo de decantación. Añadir luego 10 ml de solución buffer y ajustar a pH 7,8-8,8 con amonio 1,6 N (1 ml de amonio 1,6 N por cada 10 ml de muestra digerida aproximadamente). Añadir agua destilada hasta un volumen total de 50 ml. Añadir 20 ml de solución TTA y agitar mecánicamente durante dos minutos (9 cm recorrido agitación, 150 oscilaciones/minuto). Esperar hasta que las fases se hayan separado y eliminar la fase acuosa. Luego añadir a la fase orgánica 4 ml de la mezcla de metol-sulfito-ácido sulfúrico y agitar durante 3 minutos con un agitador mecánico. Esperar hasta que las fases se hayan separado y eliminar la fase acuosa. Luego añadir a la fase orgánica 4 ml de la mezcla de metol-sulfito-ácido sulfúrico y agitar durante 3 minutos con un agitador mecánico. Esperar hasta que se separen las fases y transferir cuantitativamente la fase acuosa a tubos de ensayo: Añadir a los tubos de ensayo 1 ml de la solución alcalina de KCN y 3 gotas del reactivo de la formaldoxima. Esperar 30 minutos y filtrar la solución antes de medirlo en cuvetas de 1 cm a 450 nm.

3.4.2.2. Determinación del manganeso y del hierro por espectroscopia de absorción atómica

Llevando a la dilución adecuada una parte alícuota de la fracción sometida a digestión ácida, según se ha consignado en el apartado anterior, se determinó el manganeso y el hierro de la planta por espectroscopia de absorción atómica (29 y 41). Las determinaciones se realizaron en un aparato Perkin Elmer, modelo 300 de haz simple con llama de aire-acetileno. Se utilizó una lámpara de cátodo hueco múltiple de seis elementos y
.../...

se trabajó a 30 mA, con apertura de rendija 2 y tiempo de integración de 1 minuto.

El manganeso se leyó a una longitud de onda de 279 nm y el hierro a 248 nm.

En las Figuras 1 y 2 se muestran las curvas de calibración para - concentraciones estandar de manganeso e hierro, respectivamente.

3.4.3. Determinación espectrofotométrica de las proteínas

3.4.3.1. Extracción de las proteínas

Para la extracción de las proteínas se siguieron las indicaciones de Belhanefti et al. (21), Ingle et al. (90) y Pilet et al. (145).

Se parte de una fracción conocida del homogenizado o del material vegetal. El sedimento resultante de la centrifugación del homogenizado se trata con 6 ml de ácido tricloroacético-acetona (5 g de ácido tricloroacético en una mezcla de 47,5 ml de acetona + 47,5 ml de agua). Se deja 17 horas en nevera de 0 °C. Transcurrido este tiempo se centrifuga durante 15 minutos a 1.000 g. Se elimina el sobrenadante. La ventaja del ácido tricloroacético-acetona (145) comparado con el tratamiento usual con ácido tricloroacético reside en la capacidad para separar los pigmentos y lípidos, lo que evita extracciones sucesivas con alcohol y éter. El precipitado se lava otra vez con 6 ml de ácido tricloroacético-acetona. Se centrifuga nuevamente a 1.000 g. durante quince minutos. Las proteínas del residuo se solubilizan de nuevo con dos ml de NaOH 1 N y se valoran por el método de Lowry.

.../...

3.4.3.2. Método de Lowry (110)

3.4.3.2.1. Reactivos

Reactivo A: 2 % CO_3Na_2 en NaOH 0,1 N.

Reactivo B: 0,5 % $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en tartrato sódico al 1 %.

Reactivo C: solución alcalina de cobre. Mezclar 50 ml de reactivo A con 1 ml de reactivo B.

Reactivo D: la solución de carbonato de cobre es la misma del reactivo C, pero sin NaOH.

Reactivo E: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido a la mitad con agua destilada.

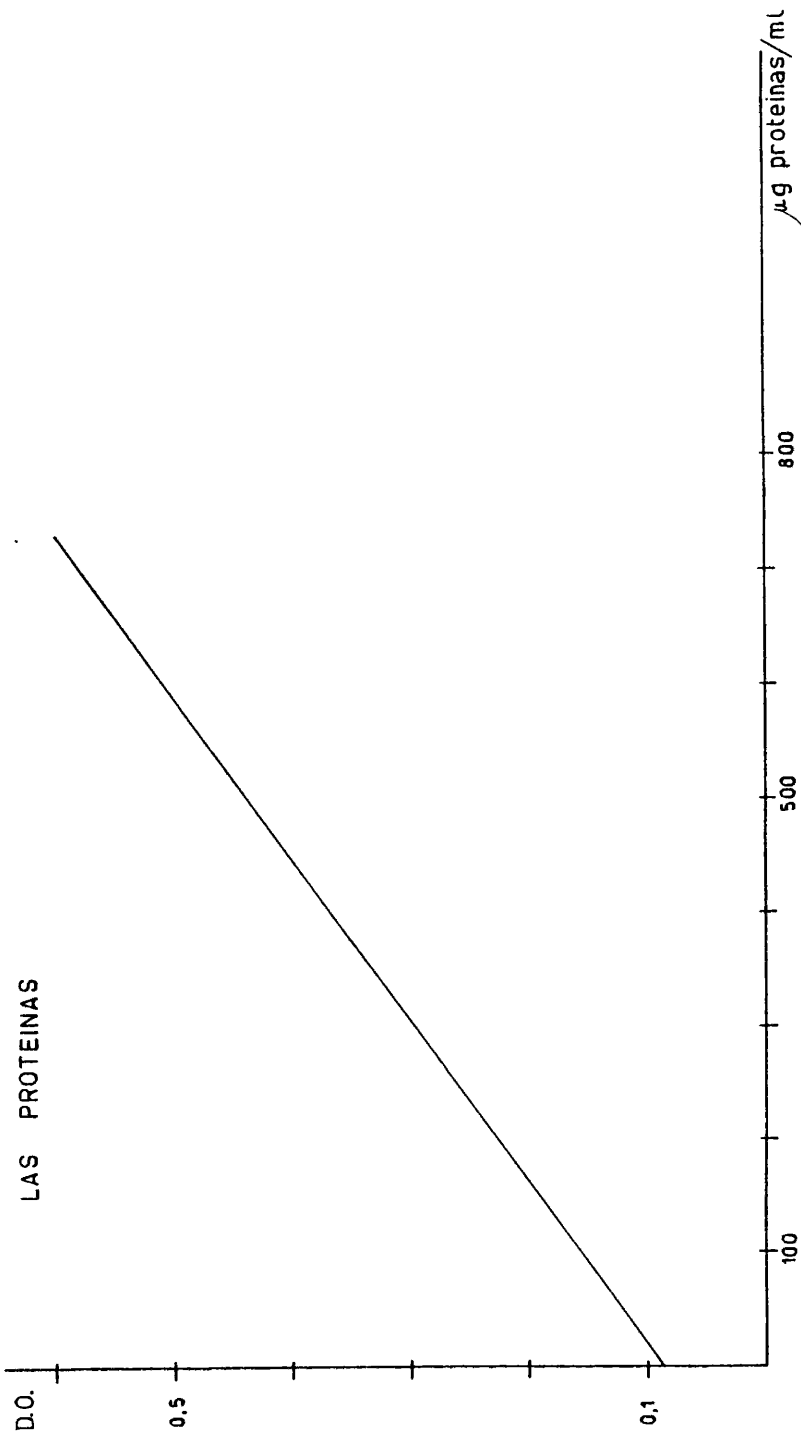
3.4.3.2.2. Procedimiento

La muestra debe contener de cinco a cien microgramos de proteína en 0,2 ml. En un tubo de ensayo se adiciona a la muestra 1 ml de reactivo D. Se mezcla bien y se deja durante diez minutos a temperatura ambiente. - Se adiciona 0,1 ml de reactivo E y se mezcla con rapidez. Después de transcurridos treinta minutos se lee en espectrofotómetro a 500 nm. Para concentraciones de proteínas de cinco a veinticinco microgramos por ml de volumen final es aconsejable la lectura a 750 nm y para concentraciones mayores, a 500 nm.

Los volúmenes críticos del ensayo son los del reactivo alcalino-cúprico y del reactivo de Folin.

.../...

Fig-2 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION COLORIMETRICA DE LAS PROTEINAS



3.4.3.2.3. Curva patrón

Las concentraciones de proteína de las muestras analizadas se dedujeron a partir de una curva patrón obtenida a partir de albúmina de suero bovino (Merck). La Figura 3 muestra la curva estandar obtenida con el método de Lowry para concentraciones de proteína entre 100 y 900 microgramos por ml.

3.4.4. Determinación espectrofotométrica de las clorofilas a y b

De las diversas posibilidades para el análisis de las clorofilas hemos escogido el método espectrofotométrico de Arnon (13) y MacKinney (112).

La extracción se realizó homogeneizando la planta en acetona de 90 %. Se repite la operación hasta decoloración total de la planta, se lleva el extracto a un volumen estandar y se efectúan las lecturas a las longitudes de onda de 645 y 663 nm en cubetas de 1 cm, en un espectrofotómetro Beckman DBG7. Todas estas operaciones deben efectuarse lo más rápidamente posible para evitar oxidaciones de los pigmentos. Por las mismas razones debe trabajarse con el mínimo posible de luz.

Para el cálculo de las cantidades de clorofila, se aplicaron las fórmulas dadas por Arnon (13) basadas en los trabajos de MacKinney (112):

$$C_a = 12,7 A_{663} - 2,7 A_{645} \text{ mg/l.}$$

$$C_b = 22,9 A_{645} - 4,7 A_{663} \text{ mg/l}$$

.../...

siendo: A_{663} = absorbancia a 663 nm en acetona 30 %
 A_{645} = absorbancia a 645 nm en acetona 30 %

Estas fórmulas son válidas cuando el disolvente es acetona. Se han realizado estudios en los que se ha llegado a fórmulas distintas para otros disolventes (97 y 159).

3.4.5. Determinación espectrofotométrica de los carotenoides totales

La extracción y valoración de los carotenoides puede obtenerse por diversos procedimientos que se basan fundamentalmente en la solubilidad de dichos pigmentos en distintos disolventes orgánicos y en las características de sus espectros de absorción (159).

Nosotros para la determinación de este tipo de pigmentos hemos seguido el método de Jaspars (92). En este método los carotenoides totales se deducen a partir de las densidades ópticas a 450 nm del extracto acetónico 90 % y de los valores para las concentraciones de la clorofila a y b :

$$C_c = 4,07 A_{450} - 0,0435 C_a - 0,367 C_b$$

en donde, C_a , C_b y C_c son mg/l de clorofila a, clorofila b y carotenoides, respectivamente, y D_{450} la densidad óptica a 450 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4 . RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS

4.1.1. Síntomas generales externos

Antes de manifestarse los efectos del exceso de manganeso sobre el crecimiento, en todos los tipos de variantes consideradas (Experiencias I, II y III), aparecieron una serie de síntomas externos que permiten un diagnóstico visual de las plantas con toxicidad por exceso de manganeso. Estos síntomas generales mostraron diferente intensidad, incrementándose proporcionalmente con el aumento de la concentración de manganeso suministrado a las plantas. A igualdad de concentración de manganeso, presentaron menos síntomas las plantas con mayor aporte de hierro (Experiencia I) sobre las que habían recibido cantidades más bajas de hierro (Experiencias II y III). Las plantas crecidas en 10 ppm de manganeso no presentaron una sintomatología clara, en las de 40 y 80 ppm los efectos externos aparecieron en la segunda mitad del ciclo vegetativo de las plantas, lo que concuerda con los resultados obtenidos para los contenidos internos de manganeso en planta (ver sección 4.2.) y es un indicio de la escasa movilidad del manganeso en concordancia con otras observaciones ya reseñadas en la bibliografía (173). De un modo más claro la toxicidad se manifiesta temprano en las plantas suministradas con concentraciones de 160, 300, 500 y 1000 ppm de manganeso (Experiencia III).

El primer síntoma visible muy característico de toxicidad por exceso de manganeso fue la aparición de puntos pardo-negruzcos, que con el

.../...

tiempo tomaron tonos rojizos, en los tallos y las hojas viejas inferiores, muy visibles al principio en las hojas al trasluz y luego ya directamente en el envés y en el haz, en la parte inferior del tallo y en los peciolo de las mismas hojas (Fotogr. 1,2,3,4,5,6,21,22,23 y 25). Estas manchas o puntuaciones se fueron incrementando a lo largo del ciclo de desarrollo de las plantas con una progresión de las mismas hacia las partes superiores — de la planta conforme se incrementan los niveles de manganeso en planta y — se moviliza en sentido ascendente. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (7, 17, 36, 37, 99, 130, 143 y — 147) y han sido atribuidos por Bussler (36 y 37) a un acúmulo local de precipitaciones de MnO_2 , mecanismo por el cual la planta se protegería del exceso de concentración del manganeso. En estas mismas hojas, y con un desarrollo más tardío, aparecen clorosis que rodean a los puntos parduzcos y — verdaderas necrosis (Fotogr. 6 y 3).

A nivel de las hojas jóvenes se presentó una inhibición del crecimiento en extensión del limbo foliar que muchas veces se ha atribuido, como se ha considerado en la introducción bibliográfica (127 y 123) al efecto — del manganeso sobre los niveles de AIA, por medio de su acción sobre el enzima AIA-oxidasa. En estas mismas hojas se pudo observar un típico arrugamiento de la superficie adaxial de las hojas que resulta de áreas intervenales elevadas entre las nerviaciones mayores ("crinkle leaf") (Fotogr. 2) — juntamente con una típica clorosis intervenal de las hojas jóvenes (Fotogr. 24). En las plantas con mayores suministros de manganeso pudieron incluso — observarse malformaciones en el desarrollo de las hojas jóvenes (Fotogr. 7) Estos síntomas han sido descritos, con alguna variante, como una manifestación visual del exceso de manganeso en plantas de distintas especies — (152 y 199).

.. / ...

En las plantas que estuvieron sometidas a los suministros mayores, especialmente las concentraciones de 160, 300, 500 y 1000 ppm de manganeso de la Experiencia III, se produjo con facilidad la pérdida rápida de las — hojas por el extremo proximal del peciolo y, sobre todo en las suministra— das con 1000 ppm de manganeso, la muerte prácticamente total de todas las — plantas a los 50 días de edad de las plantas, con una letalidad de la mitad a los 28 días de edad (Fotogr. 15).

En las tres series distintas (Experiencias I, II, y III), la mayo— ría de todas las plantas alcanzaron normalmente la floración con pequeñas — diferencias en el tiempo y algo mayores en la intensidad de la floración, — que decrecía sobre todo a partir de 160 ppm de manganeso en la solución nu— tritiva, con la excepción, ya citada, de las plantas suministradas con 1000 ppm de manganeso que no pasaron de las primeras fases del crecimiento vege— tativo, el cual tuvo un sentido regresivo hasta provocar la muerte del — 100 % de las plantas en el momento en que el resto de tratamientos y las — plantas control habían llegado ya a la floración (Fotogr. 14 y 15).

Un síntoma muy característico de la toxicidad del manganeso sobre las raíces de Phaseolus vulgaris es su efecto de inhibición del crecimiento y un típico ennegrecimiento progresivo de las mismas al aumentar la concen— tración de manganeso (Fotogr. 13). En la serie de experiencias I y II que — habían sido cultivadas en ausencia de fuente de nitrógeno e inoculadas con Rhizobium phaseolii se ha observado una cierta acción de detrimento de la — formación y del tamaño de los nódulos radiculares, sobre todo para las con— centraciones de 90 ppm de manganeso en el medio de cultivo.

FOTOGRAFIA 1 : Visión comparativa del efecto del exceso de manganeso sobre los tallos. Obsérvese el incremento de los puntos parduzcos al aumen—tar la concentración de manganeso.

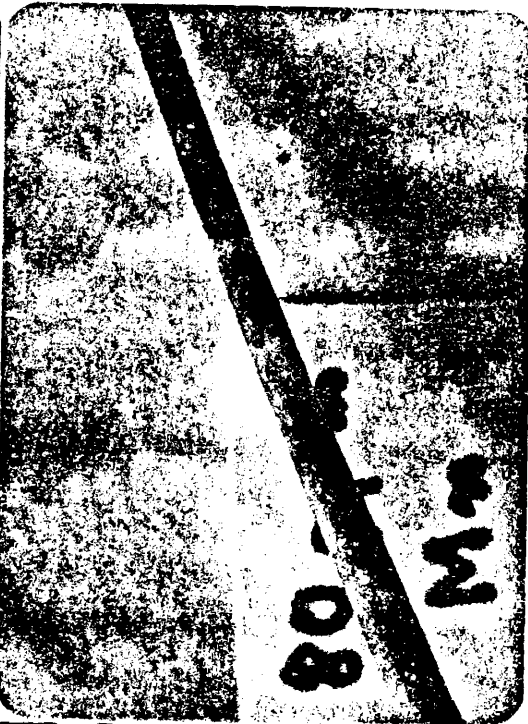
FOTOGRAFIA 2 : Detalle de tallo de 30 ppm.

FOTOGRAFIA 3 : Detalle de tallo de 500 ppm con multitud de puntos pardos de tinte rojizo.

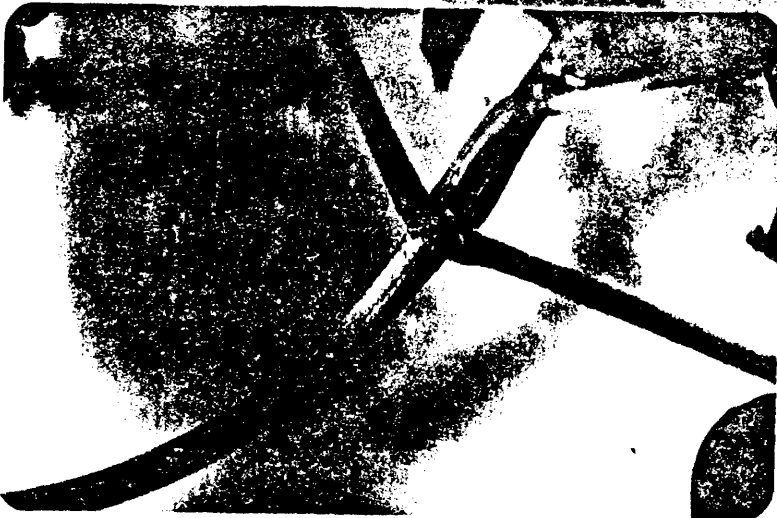
1



2



3



FOTOGRAFIAS 4 y 5 : Fase inicial (plantas de 90 ppm) y fase avanzada (plantas de 300 ppm) del empardecimiento de las nerviaciones por efecto de la acumulación de manganeso.

57



4



5

FOTOGRAFIA 6: Progresión del empardecimiento de las nerviaciones y manchas necróticas en hojas de plantas cultivadas en 40 ppm de manganeso.

FOTOGRAFIA 7: Clorosis intervenal, malformación y arrugamiento de las hojas jóvenes por efecto del manganeso (plantas de 500 ppm).



6



7

FOTOGRAFIA 3: Necrosis en hojas de plantas cultivadas en
40 ppm de manganeso.

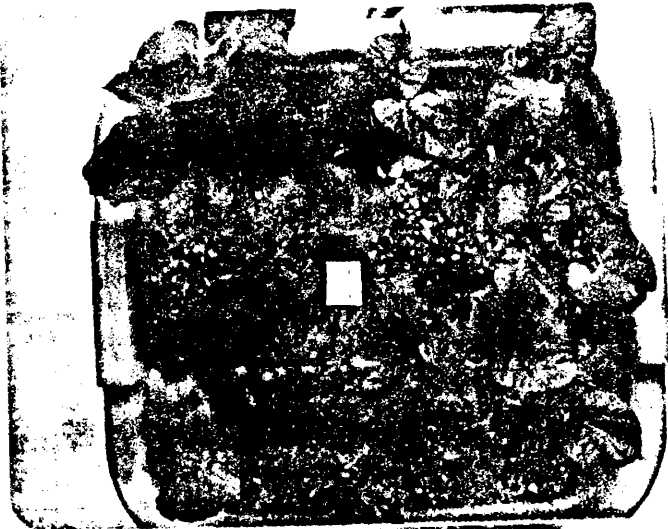
61



8

FOTOGRAFÍAS 9, 10 y 11 : Visión comparativa de las plantas control y las cultivadas en 500 y 1000 ppm de manganeso en la muestra 1 de la Experiencia III (plantas de 10 días de edad).

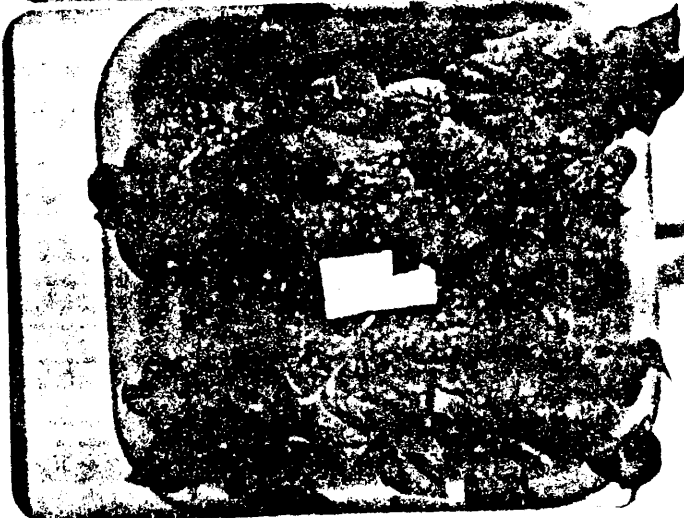
6.3



9



10

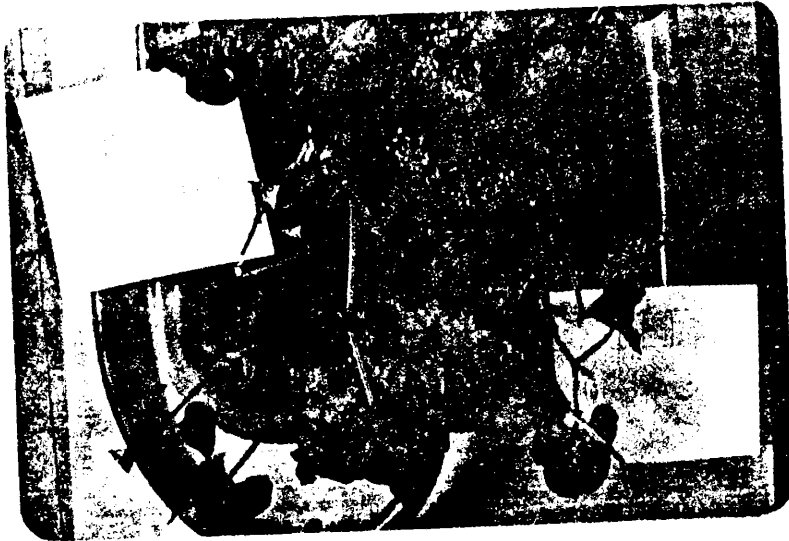


11

FOTOGRAFIA 12 : Visión general de las plantas cultivadas en 1000 ppm de manganeso en la muestra 3 de la Experiencia III - (plantas de 16 días de edad)

FOTOGRAFIA 13 : Visión comparativa de los efectos del manganeso sobre las raíces. Obsérvese la reducción del crecimiento y el ennegrecimiento de las raíces.

65



42



43

FOTOGRAFIAS 14 y 15 : Dos fases sucesivas diferentes del ciclo de desarrollo de las plantas control (izda.) y las suministradas con 500 ppm (centro) y 1000 ppm (dcha.). La fotografía 14 corresponde a la 6ª muestra (32 días de edad) y la fotografía 15 a la 9ª (52 días de edad) en la Experiencia III.

67

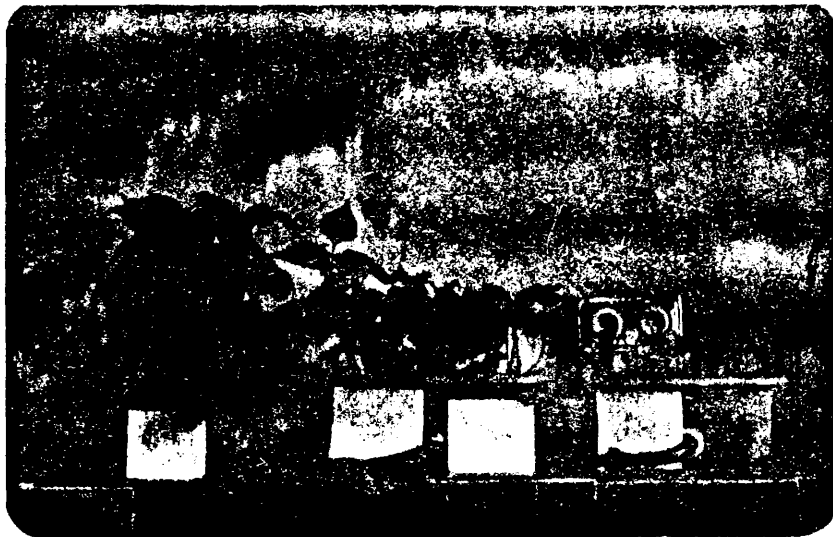


14

15



FOTOGRAFIAS 16 y 17 : Detalle de las plantas control y las cultivadas en 500 y 1000 ppm de manganeso en una fase vegetativa intermedia de la Experiencia - III.



16

17



FOTOGRAFIA 18 : Clorosis intervenal y necrosis de hojas por efecto de la toxicidad por exceso de manganeso.

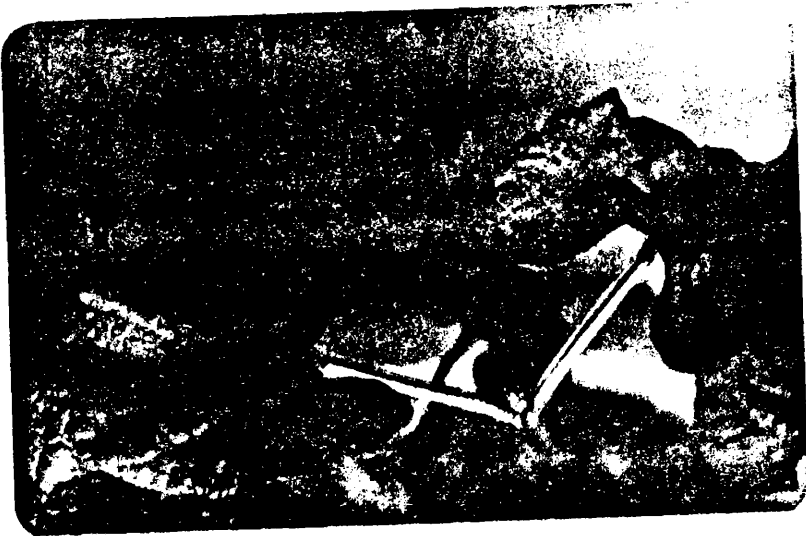
FOTOGRAFIA 19 : Clorosis intervenal y nerviaciones pardo-rojizas - por exceso de manganeso (500 ppm).

71



48

19



FOTOGRAFIA 20 : Clorosis intervenal y del borde por exceso de manganeso (300 ppm).

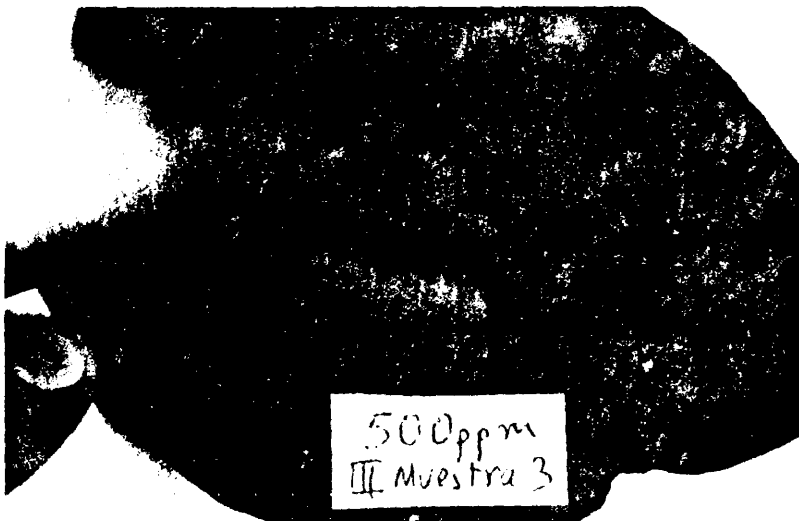
FOTOGRAFIA 21 : Nerviaciones pardo-rojizas y clorosis intervenal en hojas inferiores (500 ppm).

73



20

21



FOTOGRAFÍAS 22, 23 y 24: Visión comparativa de los efectos del exceso de manganeso en hojas inferiores de la fase vegetativa de plantas cultivadas en 300, 500 y 1000 ppm de manganeso. Obsérvese la progresión de los síntomas.

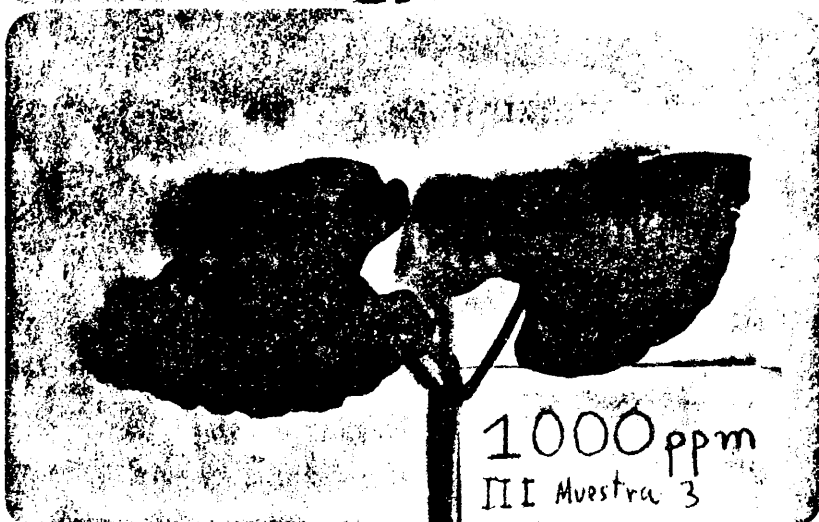
75



22



23



24

FOTOGRAFIA 25 : Detalle de intensa clorosis intervenal en hojas jóvenes de plantas cultivadas en 500 ppm de manganeso — (plantas de 45 días de edad).

FOTOGRAFIA 26 : Detalle de hojas inferiores con clorosis intervenal y nerviaciones parduzcas en plantas cultivadas en — 1000 ppm de manganeso.

77



25

26



4.1.2. Crecimiento longitudinal

En general, el crecimiento expresado por la longitud de la parte aérea de las plantas sigue un curso ascendente hasta la fase de floración, con escasas excepciones que luego reseñaremos (Figs. 3, 4, 5a y 5b y Tablas 9, 10 y 11).

A igualdad de concentración de manganeso suministrado, la respuesta del crecimiento varía algo según el aporte de hierro a la planta. Así en la serie de experiencias I (Fig. 3), en la primera mitad del ciclo vegetativo de las plantas, el suministro de manganeso estimula el crecimiento longitudinal de las plantas tratadas sobre las control. Por el contrario, en la serie de experiencias II (con iguales suministros de manganeso y más bajos de hierro) no se presenta este estímulo (Fig. 4), sino al contrario crecen mejor las plantas control. La inflexión, por la acción tóxica del manganeso, se presenta en ambas series de experiencias (I y II) a partir de la 6ª muestra, en donde se cumple siempre hasta el final del ciclo biológico:

$$C > 10 \text{ ppm} > 40 \text{ ppm} > 30 \text{ ppm}$$

Estos resultados parecen estar de acuerdo con los hallazgos de otros investigadores (2, 19, 101, 123, 136 y 160) de que el hierro disminuye o impide la toxicidad, o parte de la toxicidad, del manganeso. Sobre estas interacciones Mn-Fe volveremos en la sección 4.2, al considerar los contenidos de hierro y manganeso en planta.

Los resultados del crecimiento longitudinal de las plantas de la serie de Experiencias III (Fig. 5a) no muestran muchas diferencias entre las plantas control y las cultivadas con aporte de 10, 40 y 30 ppm de man-

.../...

ganeso. En este sentido el nitrato, que es la fuente diferencial de nitrógeno respecto a las Experiencias I y II, ha disminuido los efectos de inhibición del crecimiento longitudinal. Por el contrario, para concentraciones mayores de manganeso (Fig. 5b) se presentan diferencias con carácter marcado, sobre todo para 300, 500 y 1000 ppm de manganeso. Puede observarse que las plantas cultivadas en 1000 ppm alcanzan su máximo tamaño en la muestra 5 (25 días de edad), edad que en el resto de plantas correspondía en las fases vegetativas finales e inicio de la prefloración. A partir de entonces entran en franca regresión, seguido de senescencia y muerte (Fotogr. 14 y 15). En el resto de lotes puede observarse el sentido ascendente del crecimiento longitudinal hasta la fase de fructificación, a excepción de las plantas suministradas con 500 ppm de manganeso que se estabilizaron en su crecimiento en la muestra 7 (34 días de edad) que corresponde fisiológicamente con la fase de inicio de la floración.

En todas las series de experiencias los efectos tóxicos del manganeso sobre el crecimiento longitudinal de las raíces (Tablas 12, 13 y 14) se presentaron sobre todo a partir de las concentraciones de 30 ppm de manganeso en la solución nutritiva con efectos inhibitorios que se incrementaban al aumentar la concentración del manganeso.

Fig_3 CRECIMIENTO LONGITUDINAL DE LAS PLANTAS
(EXPERIENCIA I)

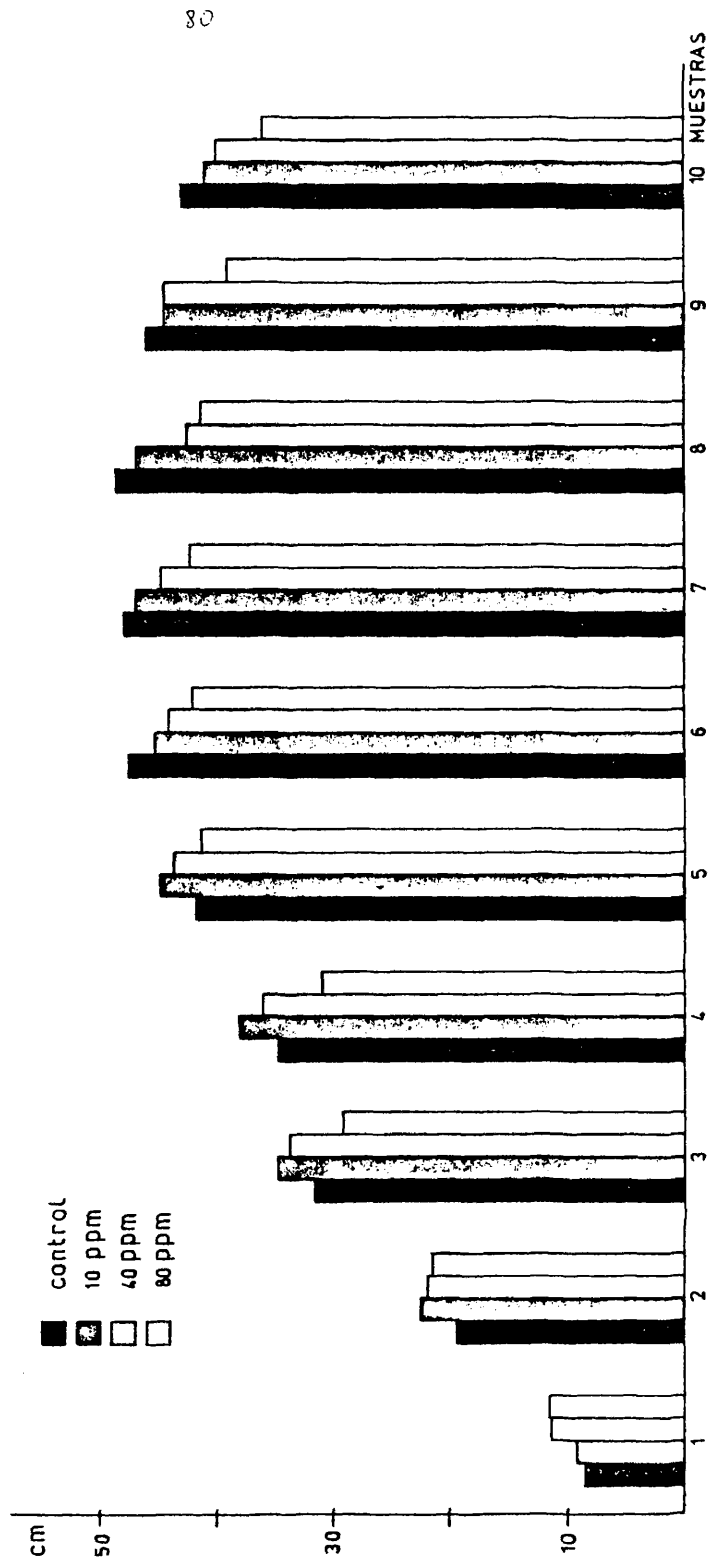
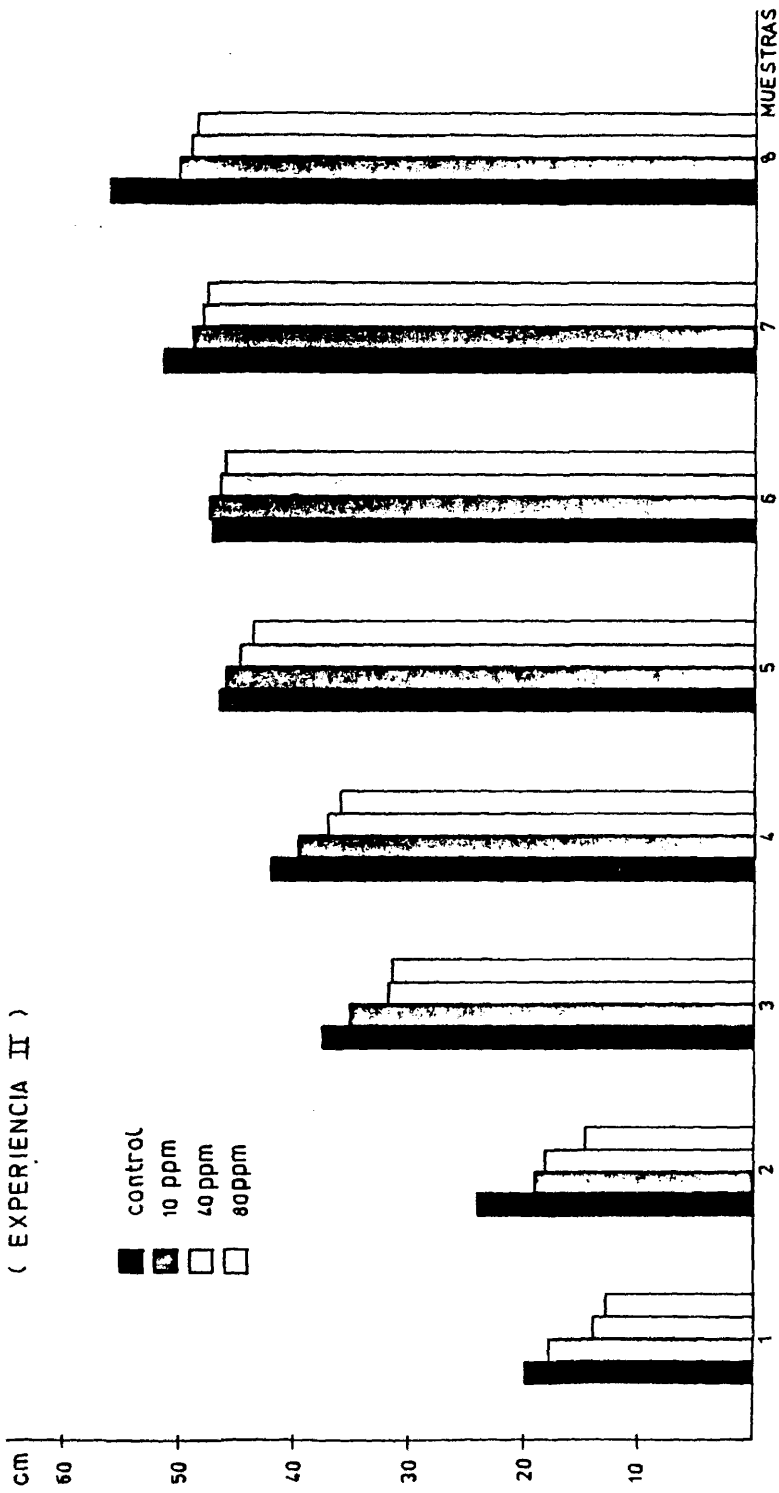


Fig - 4 CRECIMIENTO LONGITUDINAL DE LAS PLANTAS

(EXPERIENCIA II)



Fig_5a
CRECIMIENTO LONGITUDINAL DE LAS PLANTAS
(EXPERIENCIA III)

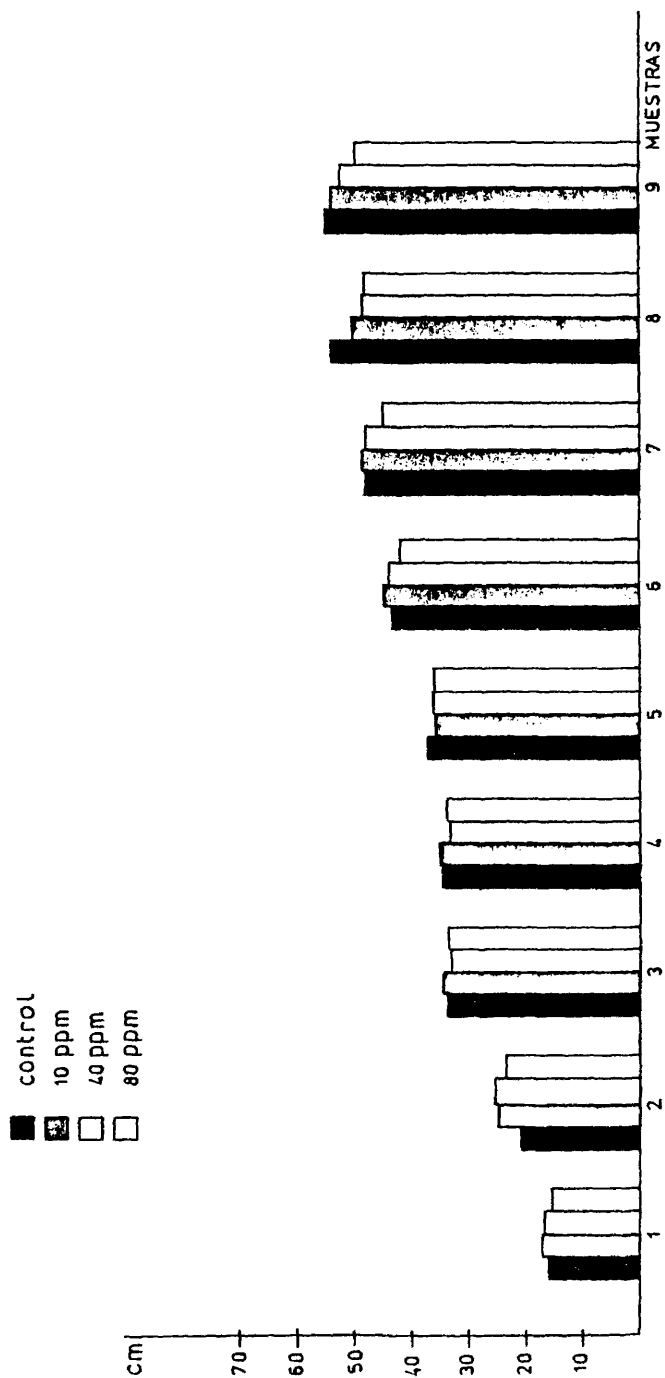


Fig-5b
 CRECIMIENTO LONGITUDINAL DE LAS PLANTAS
 (EXPERIENCIA III)

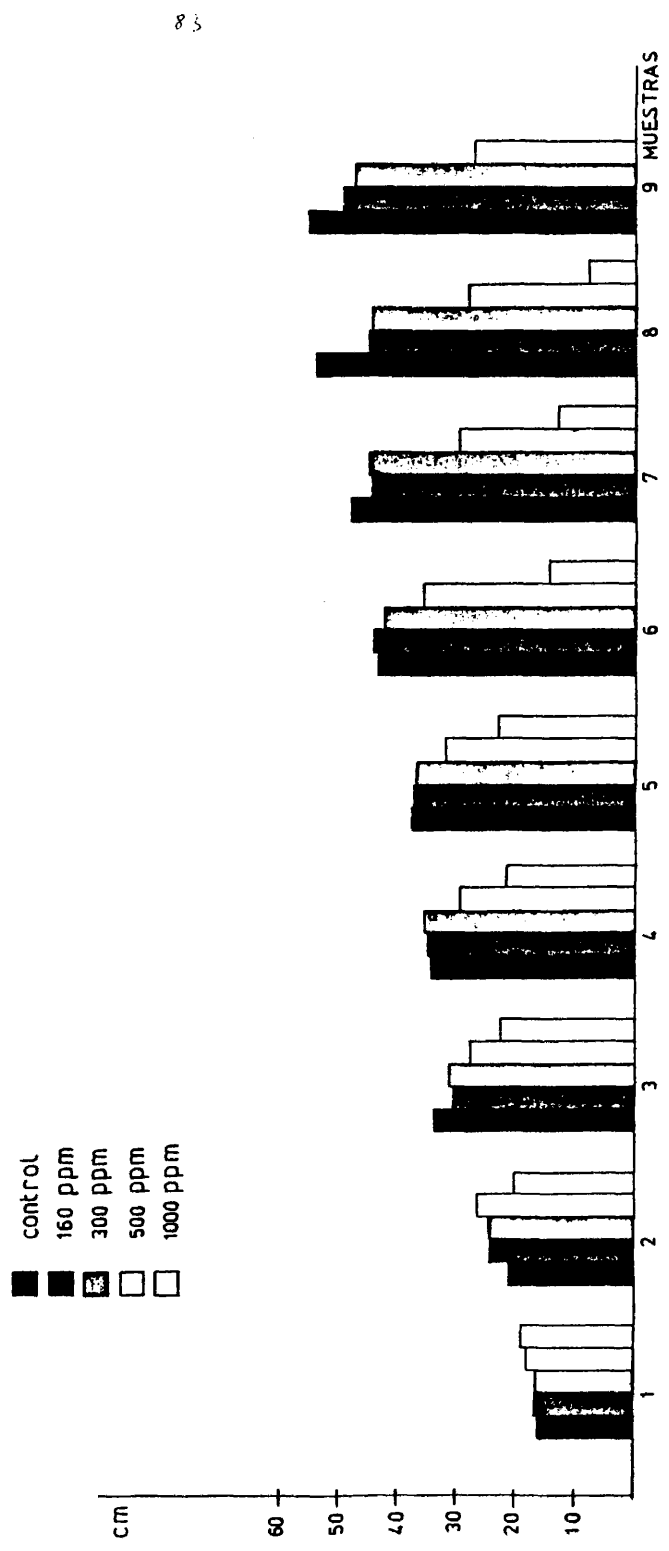


TABLA 9

Crecimiento longitudinal, expresado en cm, de la parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	8'8	9'4	11'6	11'7
2	19'4	22'6	22'2	21'5
3	31'7	34'9	33'7	29'3
4	34'6	38'2	36'1	31'0
5	41'9	45'1	43'7	41'3
6	47'5	45'3	44'1	42'1
7	47'9	46'9	44'8	42'2
8	48'5	46'7	42'5	41'3
9	46'2	44'5	44'5	39'2
10	43'2	41'2	40'1	36'5
Valor global	369'7	374'8	363'3	336'1

TABLA 10

Crecimiento longitudinal, expresado en cm. de la parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	19'8	17'8	14'0	12'8
2	24'1	19'2	17'7	14'6
3	37'6	35'2	31'9	31'5
4	41'9	39'5	37'1	35'8
5	46'4	45'9	44'7	43'5
6	47'1	47'4	46'4	46'2
7	51'3	48'9	48'1	47'8
8	56'1	50'0	49'2	48'6
Valor global	324'3	303'9	289'1	280'8

TABLA 11

Crecimiento longitudinal en cm. de la parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia III)

Muestra	Control	10ppm	40ppm	80ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	16'1	17'1	16'7	15'2	16'6	16'3	18'1	19'2
2	21'1	25'2	25'5	23'9	24'4	24'6	26'9	20'2
3	33'9	34'8	33'3	33'5	30'7	31'2	27'7	22'9
4	34'5	35'0	33'5	33'7	35'0	35'5	29'5	21'5
5	37'5	36'0	36'7	36'2	37'5	36'0	32'2	23'0
6	43'5	45'0	44'0	42'0	44'2	42'5	35'5	14'0
7	48'0	48'5	48'0	45'0	44'5	45'0	29'7	12'5
8	54'0	50'5	48'5	48'5	45'0	44'5	28'0	7'7
9	55'0	54'0	52'5	50'0	49'2	47'7	27'0	-
Valor global	343'6	346'1	338'7	328'0	327'1	323'3	254'6	141'0

TABLA 12

Crecimiento longitudinal, expresado en cm, de raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn. —
(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	12'7	14'7	12'6	11'2
2	17'0	19'1	14'0	12'6
3	18'0	20'0	15'0	14'0
4	19'3	20'5	17'6	17'5
5	20'2	21'7	20'1	20'0
6	19'4	18'3	17'7	17'2
7	19'5	18'5	17'9	17'5
8	22'2	19'7	20'2	18'9
9	18'7	17'5	17'1	16'9
10	19'2	29'9	19'1	15'0
Valor global	186'2	189'9	171'3	160'8

TABLA 13

Crecimiento longitudinal, expresado en cm, de las raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	15'5	15'7	13'1	12'4
2	16'6	16'5	12'8	13'2
3	17'7	17'3	17'0	14'3
4	17'9	17'8	17'8	15'0
5	18'0	18'1	18'3	16'6
6	18'8	18'3	18'5	17'2
7	19'5	18'9	19'7	18'2
8	19'8	21'3	24'6	20'1
Valor global	143'8	143'9	141'8	127'0

TABLA 14

Crecimiento longitudinal, expresado en cm. de las raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	8'6	9'7	8'8	9'6	11'3	11'4	13'4	9'0
2	14'7	14'5	14'2	14'0	14'5	14'5	14'3	11'0
3	15'7	15'4	15'6	15'6	15'4	14'9	13'8	12'1
4	16'5	16'2	16'0	15'9	15'7	13'9	13'0	11'0
5	17'3	16'5	16'5	16'5	15'9	14'0	11'5	12'2
6	18'5	18'0	17'7	17'5	16'5	14'5	13'7	8'2
7	20'2	19'5	19'5	18'8	16'5	15'8	14'0	10'0
8	21'0	20'5	20'0	20'0	17'0	15'5	14'0	11'0
9	24'5	24'3	24'0	24'0	23'0	23'0	19'0	-

Valor global 157'0 154'6 152'3 150'9 145'8 137'5 126'7 84'5

4.1.3. Peso fresco y peso seco

La curva de crecimiento expresado en peso, fresco o seco, sigue un curso muy parecido en todas las series de experiencias realizadas. No obstante, al comperar entre si las distintas variantes se aprecian diferencias atribuibles a las interacciones del manganeso con el hierro e, incluso, con los nitratos.

Si se consideran los valores de peso fresco de las partes aéreas, en la Experiencia I pueden observarse valores muy parecidos, e incluso algo inferiores, de las plantas control frente a las suministradas con 10 ppm de manganeso. Estos resultados inclinan a pensar en un efecto al principio beneficioso del mayor aporte de manganeso, mientras que después, por efecto de su acumulación en las plantas, determina ya acciones tóxicas y efectos de reducción sobre el crecimiento. En general, las plantas de la serie de experiencias I suministradas con 40 y 30 ppm de manganeso muestran pesos frescos menores que las control.

En la segunda mitad del ciclo vegetativo de las plantas se presentan efectos inhibitorios del crecimiento, tanto más marcados cuanto mayor sea la concentración del exceso de manganeso en la solución nutritiva.

El descenso de hierro y la mayor absorción de manganeso (Experiencia II) (Fig. 7 y Tabla 16) va unido a valores siempre superiores en el peso fresco de la parte aérea de las plantas control respecto al resto de los lotes suministrados con diferentes concentraciones de manganeso. Este hecho es fácilmente explicable por la mayor facilidad de absorción del manganeso y un mantenimiento más elevado del mismo desde el inicio en las plantas.

.../...

En la serie de experiencias III (Figs. 9a y 9b y Tabla 17), al igual que ocurre con el crecimiento longitudinal (Sección 4.1.2), la presencia de nitratos en el medio, a igualdad de concentración de manganeso, presenta unas diferencias menos marcadas entre las plantas control y las suministradas con distintas concentraciones de manganeso. Sólo al final del ciclo de desarrollo de las plantas se acumula suficiente manganeso para ejercer fuertes acciones de reducción del crecimiento (muestras 3 y 9 de la Fig. 8a). Para concentraciones mayores a 40 ppm de manganeso rápidamente, desde el inicio, se presentan claras reducciones del crecimiento en peso fresco (Fig. 8b) que, para las concentraciones mayores, al final del ciclo alcanzan reducciones superiores al 50 % y muerte anterior, como ya hemos indicado, de las plantas cultivadas con 1000 ppm de manganeso.

Si se consideran los valores de peso fresco de las raíces en las diferentes series de experiencias (Tablas 13, 19 y 20) se puede ver que sigue la tónica:

C >> 10 ppm > 40 ppm > 90 ppm > 160 ppm > 300 ppm > 500 ppm > 1000 ppm

Las diferencias más pronunciadas se manifiestan en la experiencia III, en la que al ampliarse más el margen de concentraciones se ha llegado, a partir de 160 ppm de manganeso, a reducciones de peso por encima del 50 % de los de las plantas control.

Resultados muy parecidos a los del peso fresco se pueden observar si se consideran los valores de peso seco. En la parte aérea de las plantas de la serie de experiencias I (Fig. 9 y Tabla 21) el peso seco de las fases finales del crecimiento ve más afectado su contenido en agua, quizá por el efecto acumulativo del manganeso en las hojas, con la típica sintomatología general (necrosis, senescencia de las hojas, etc.), ya

.../...

descrita en la sección 4.1.1.

En la serie de experiencias II (Fig. 10 y Tabla 22) los valores de peso seco de las plantas control y las suministradas con 10 ppm se igualan y únicamente reducen los valores del orden del 10%, reducción considerada como determinación del nivel crítico superior por diversos investigadores (139), las plantas cultivadas en 40 y 30 ppm de manganeso.

En la serie de experiencias III (Figs. 11a y 11b y Tabla 23) — los valores significativos de reducción del crecimiento por efecto del — exceso de manganeso se notan a partir de la concentración de 40 ppm de manganeso, siendo cada vez más creciente conforme aumenta la concentración de manganeso en el medio de cultivo. Es decir, sigue el orden:

C > 10 ppm > 40 ppm > 80 ppm > 160 ppm > 300 ppm > 500 ppm > 1000 ppm

en el que se alcanzan reducciones iguales o superiores al 50 % del crecimiento en peso seco, respecto de las plantas control, para las plantas suministradas con 300, 500 y 1000 ppm de manganeso.

El manganeso también ha ejercido un efecto inhibitorio del crecimiento en peso seco de las raíces de plantas con exceso de manganeso, las cuales, aunque en menor proporción, siguen un esquema muy parecido al comentado anteriormente para la parte aérea (Tablas 24, 25 y 26). Las reducciones críticas del crecimiento por encima del 10 % se alcanzan en las plantas con tratamientos con manganeso a partir de concentraciones iguales o superiores a 40 ppm y, de un modo muy ostensible, a 300, 500 y 1000 ppm, cuyas raíces llegan a alcanzar el 50 % o más de reducción del crecimiento, respecto a — las plantas control.

Fig-6 PESO FRESCO DE PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA I)

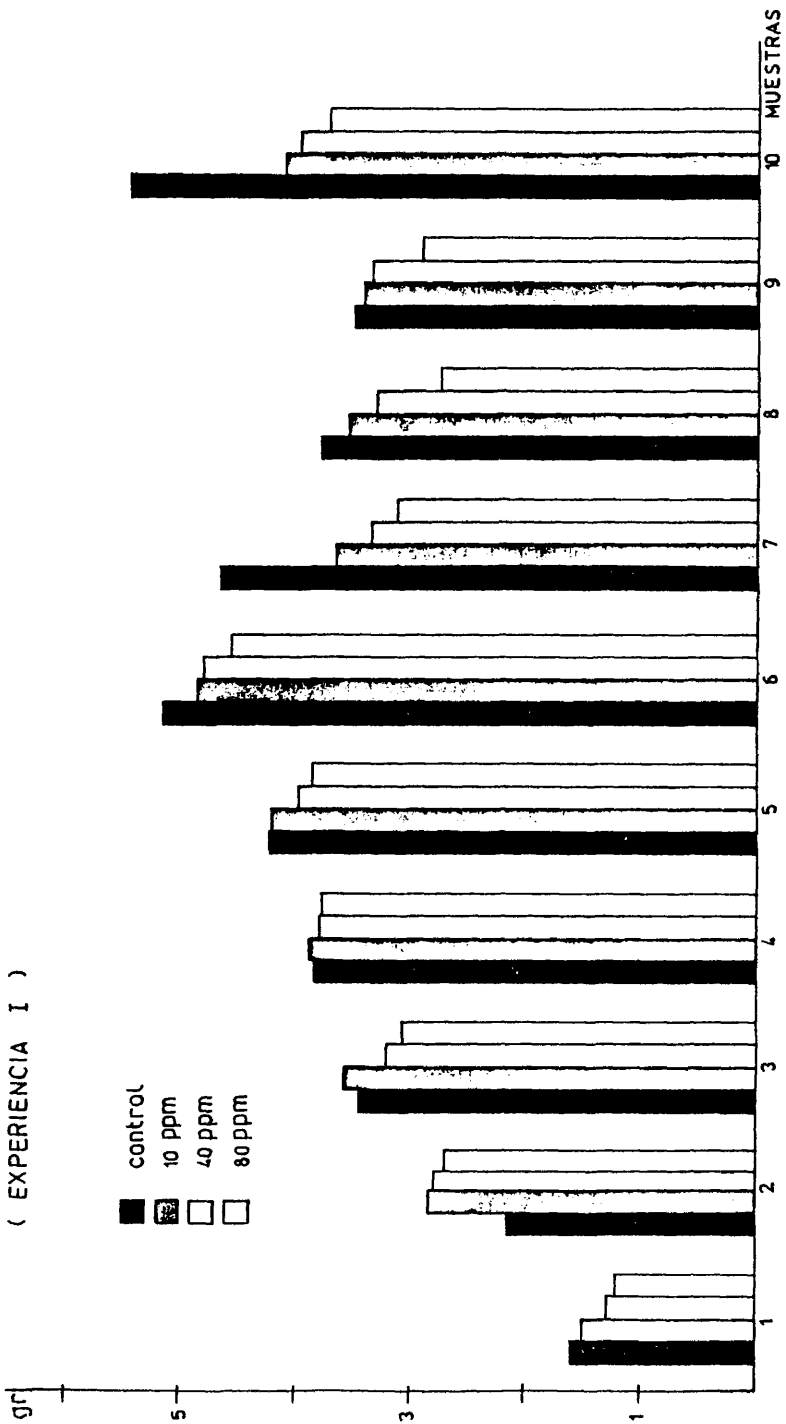
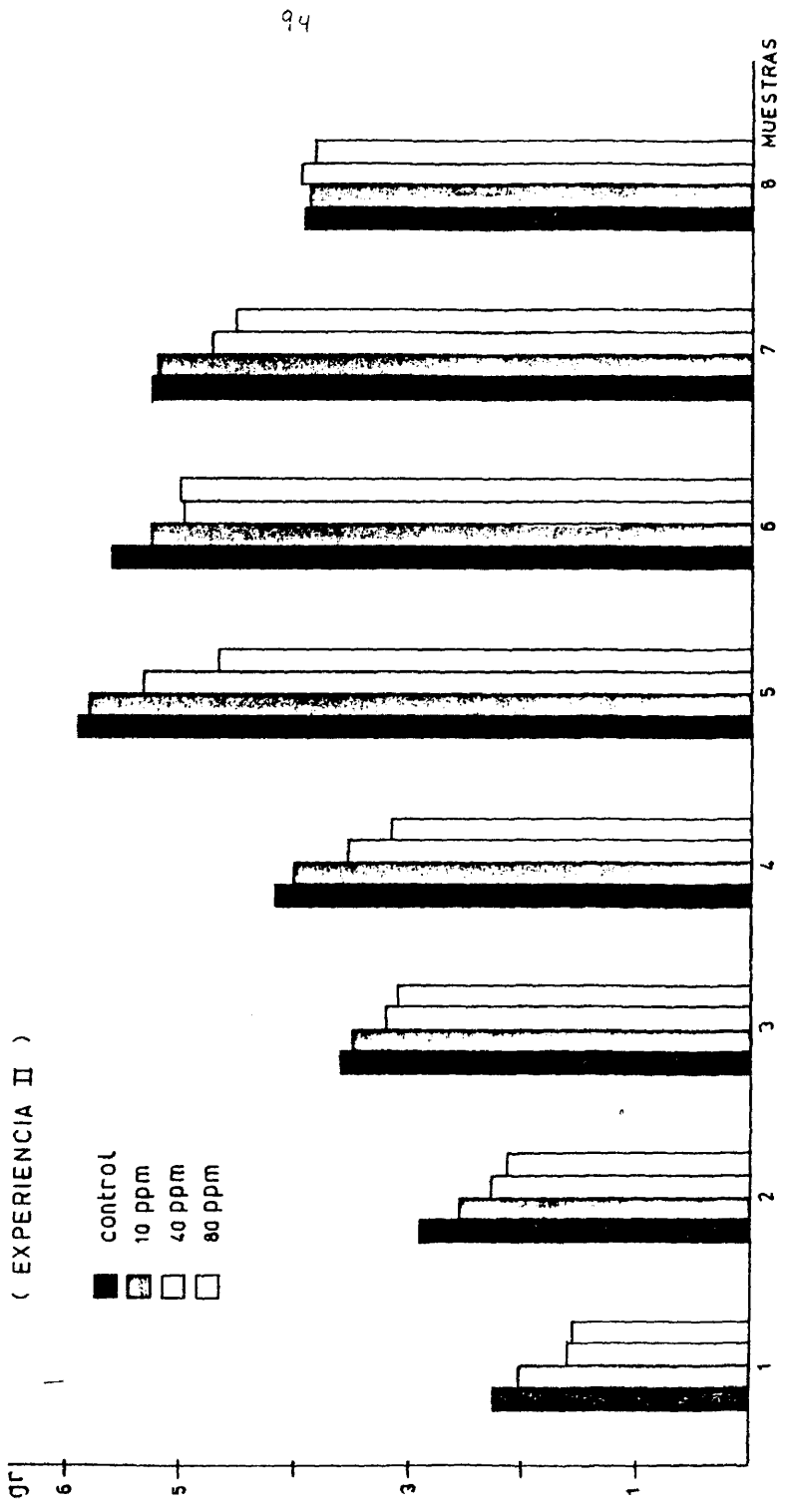


Fig -7 PESO FRESCO DE PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA II)



94

Fig-8a PESO FRESCO EN PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA III)



Fig-8 b PESO FRESCO DE PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA III)

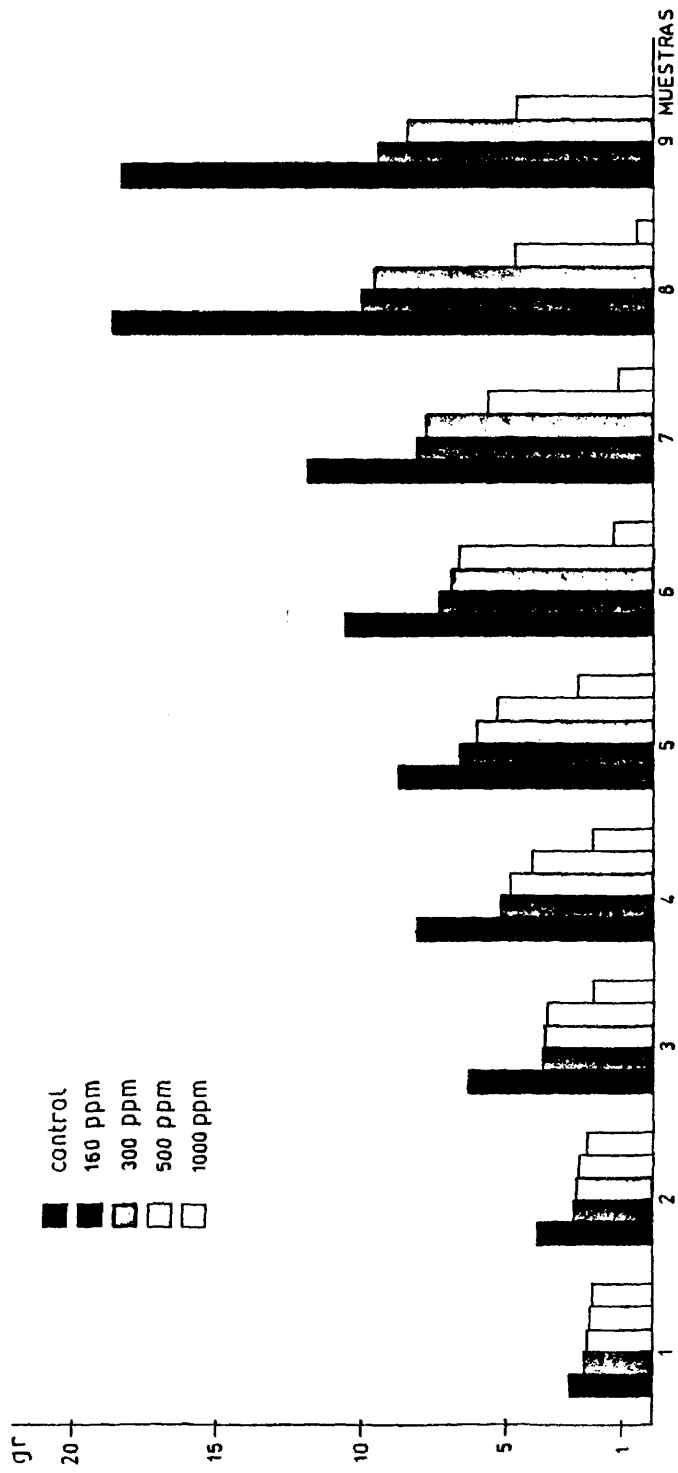


Fig-9 PESO SECO DE PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA I)

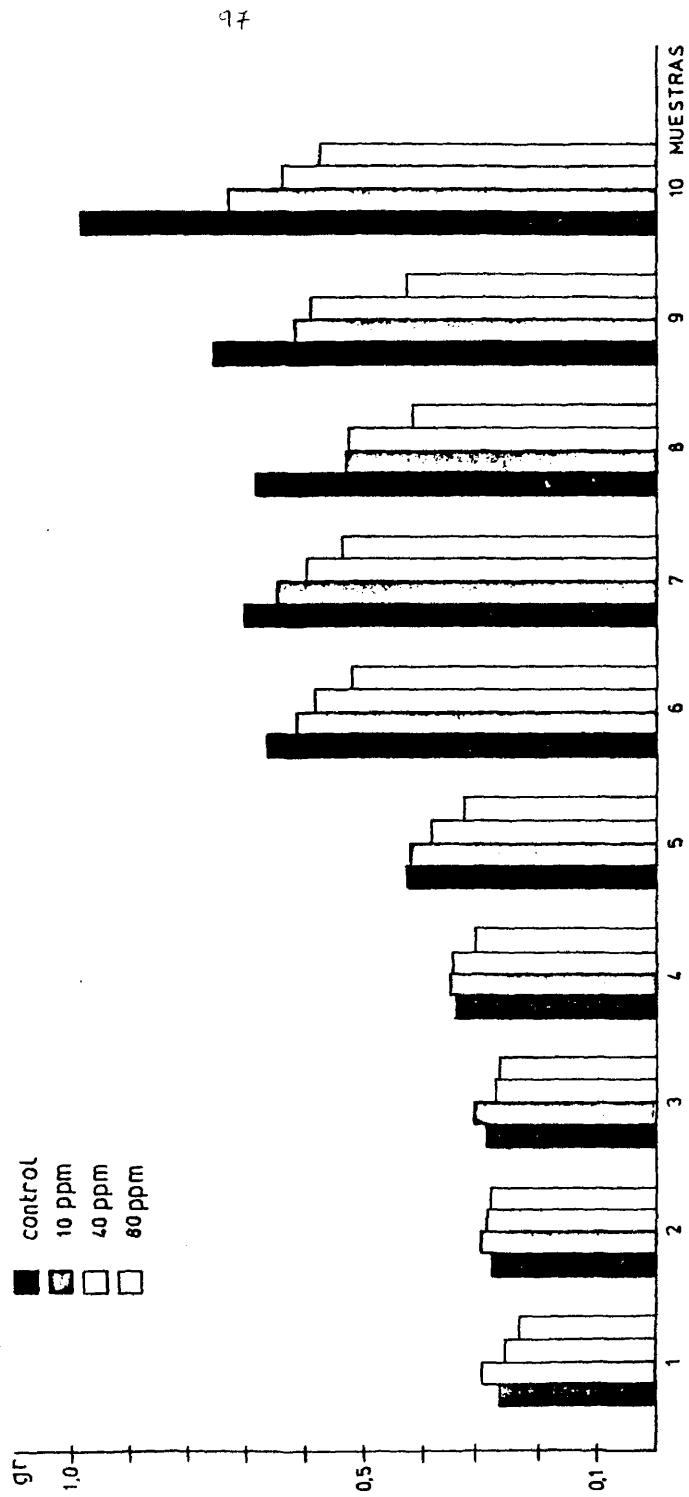


Fig -10 PESO SECO DE PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA II)

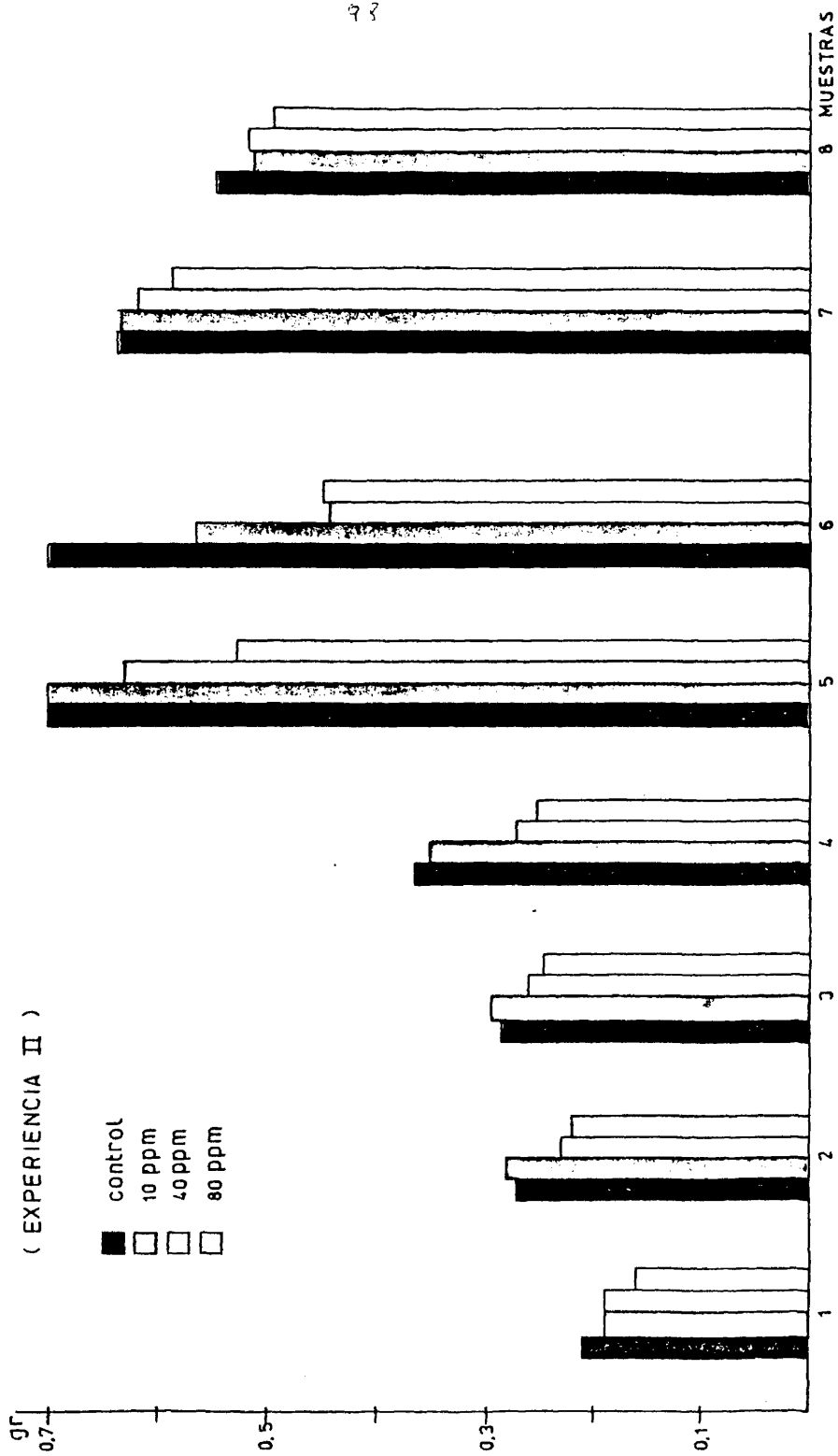


Fig -11a PESO SECO EN PARTE AEREA DE PLANTA (EXPERIENCIA III)

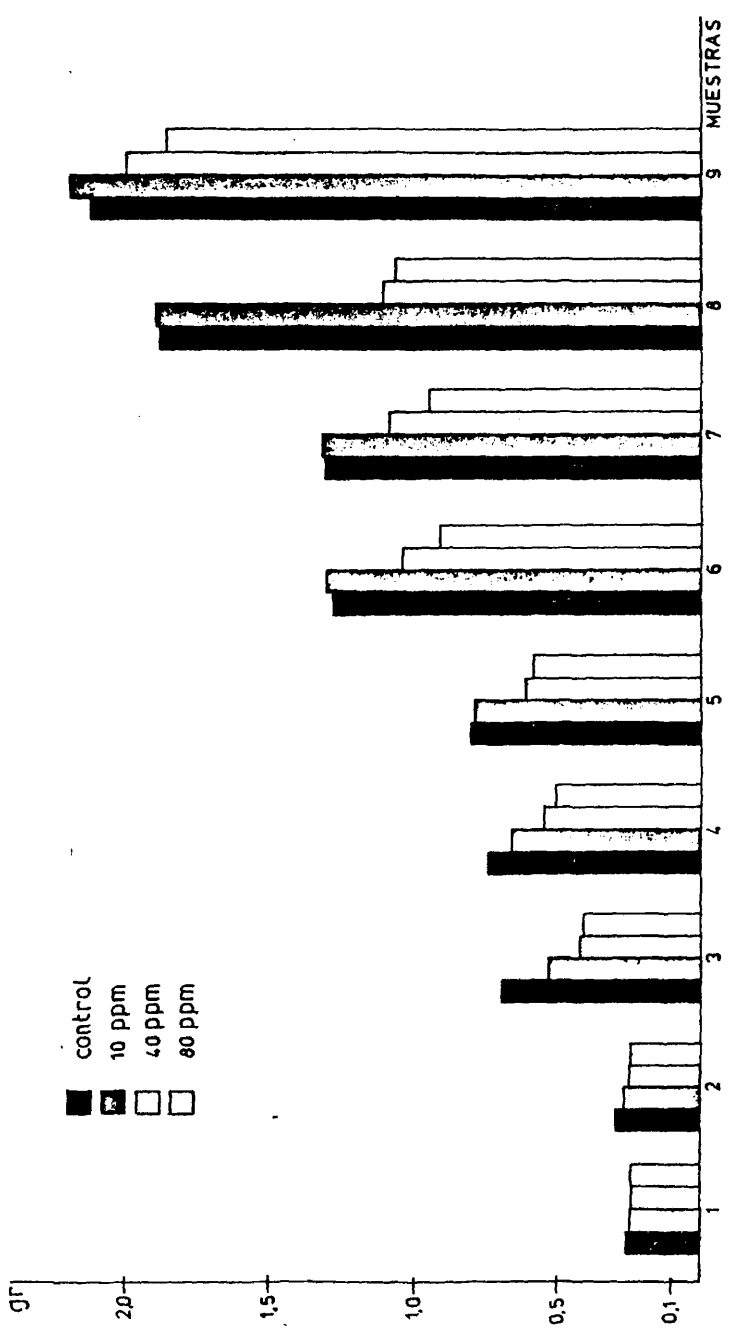


Fig-11 b PESO SECO EN PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA III)

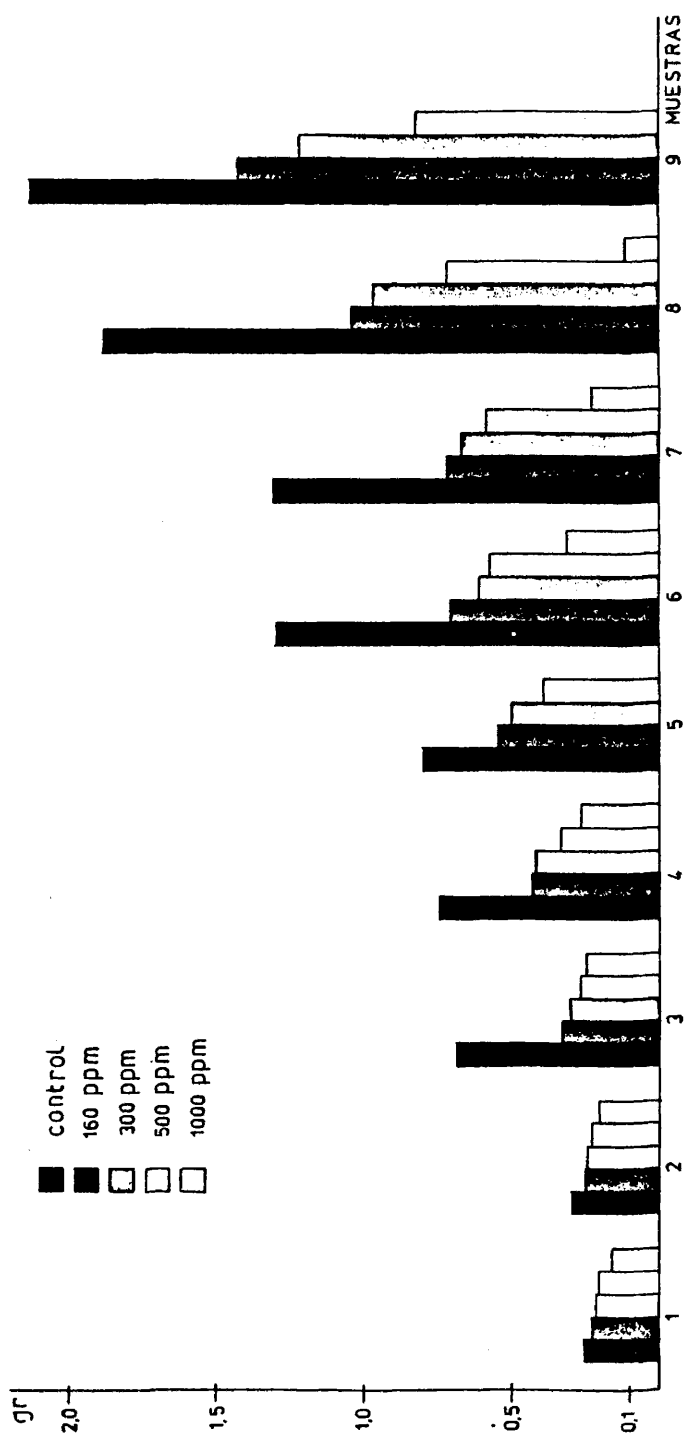


TABLA 15

Peso fresco, expresado en gr, de parte aérea de plantas de Phaseolus ———
vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
0	0'4330			
1	1'6162	1'6079	1'5546	1'4787
2	2'1536	2'8535	2'8086	2'7020
3	3'4441	3'5714	3'2280	3'0751
4	3'8600	3'8876	3'7940	3'7800
5	4'2355	4'2200	3'9790	3'8680
6	5'1522	4'8600	4'9045	4'5478
7	4'6537	3'6618	3'3573	3'1290
8	3'8291	3'5493	3'3306	2'7586
9	3'4949	3'4488	3'3410	2'9013
10	5'4717	4'1313	3'9742	3'7327
Valor global	37'9740	35'7916	34'1719	31'9732

TABLA 16

Peso fresco, expresado en gr, de la parte aérea de plantas de Phaseolus —
vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm
0	0'5094			
1	2'2675	2'0335	1'6224	1'5743
2	2'9169	2'5541	2'2749	2'1419
3	3'6025	3'5067	3'2064	3'1001
4	4'1797	4'0242	3'5258	3'1433
5	5'9115	5'8035	5'3357	4'6690
6	5'6101	5'2642	4'9720	5'0224
7	5'2472	5'2195	4'7266	4'5196
8	3'9304	3'8892	3'9687	3'8251
Valor global	33'6658	32'2949	29'6325	27'9957

TABLA 17

Peso fresco, expresado en gramos de la parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn. (Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	2'8032	2'7787	2'5892	2'3512	2'3014	2'2744	2'1576	2'0911
2	3'9779	3'7169	3'5703	2'9970	2'7045	2'6608	2'5479	2'2655
3	6'3038	5'6193	5'3706	5'1740	3'7996	3'7681	3'6320	2'0488
4	8'1734	7'5859	6'3638	5'5732	5'2017	4'9949	4'1073	2'0744
5	8'7684	8'6456	7'6178	7'4747	6'6241	6'0177	5'2926	2'5707
6	10'5908	10'6928	10'1760	7'6739	7'3474	6'9293	6'6612	1'3164
7	11'9591	11'4252	11'4857	8'7163	8'0095	7'9144	5'6069	1'1547
8	18'6863	17'4373	11'9131	10'1943	10'0839	9'5616	4'6933	0'5195
9	18'2919	14'3756	11'7323	10'0718	9'4357	8'3981	4'6356	-
Valor global	99'4548	82'2772	70'8293	60'1169	55'5078	52'3093	39'3343	14'0411

TABLA 18

Peso fresco, expresado en gr, de raices de plantas de Phaseolus vulgaris -
cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm
1	0'6104	0'5507	0'5087	0'3690
2	0'7053	0'5638	0'5144	0'5138
3	0'7261	0'5680	0'5177	0'5200
4	0'7817	0'7468	0'5633	0'5338
5	0'9043	0'7553	0'6386	0'6737
6	0'9200	0'8365	0'7250	0'6873
7	0'9084	0'8728	0'7609	0'7569
8	0'9369	0'9070	0'7640	0'9156
9	0'9824	0'9125	0'8907	0'9252
10	1'6743	1'1055	1'0769	1'0027
Valor global	8'9498	7'8189	6'9602	6'6980

TABLA 19

Peso fresco, expresado en gr, de raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'7803	0'5383	0'4551	0'4514
2	0'7859	0'7847	0'6853	0'5999
3	0'8470	0'8037	0'6995	0'6102
4	0'8515	0'8301	0'7040	0'6800
5	0'8787	0'9390	0'7326	0'7305
6	0'8878	0'8437	0'7800	0'7500
7	0'8974	0'8670	0'7815	0'7568
8	0'9104	0'8703	0'7841	0'7925
Valor global	6'8390	6'3768	5'6221	5'3713

TABLA 20

Peso fresco, expresado en gramos de las raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	0'6208	0'5894	0'5426	0'5041	0'3990	0'3236	0'3150	0'2495
2	0'7733	0'6466	0'6131	0'5869	0'4536	0'3517	0'3239	0'2679
3	0'9461	1'0644	0'8825	0'7661	0'4922	0'3602	0'3540	0'3071
4	2'5112	1'8193	1'3456	1'2480	1'0744	0'8664	0'6670	0'6396
5	2'7869	2'1467	1'8293	1'7250	1'1250	1'0296	0'9021	0'4938
6	2'9139	2'5563	2'3063	1'8213	1'5995	1'1282	0'9536	0'3998
7	3'2059	2'9742	2'7087	2'2842	1'6150	1'1548	0'7499	0'3562
8	3'7460	3'5021	2'9992	2'3787	1'9849	1'5046	0'7053	0'2846
9	3'9904	3'7309	3'0706	2'5263	2'0954	1'8718	1'1015	-
Valor global	21'4944	19'9299	16'2979	13'8406	10'9390	8'5905	6'0721	3'0032

TABLA 21

Peso seco, expresado en gr, de la parte aérea de plantas de Phaseolus —
vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
0	0'4230			
1	0'2721	0'2988	0'2594	0'2368
2	0'2850	0'3004	0'2928	0'2855
3	0'2935	0'3168	0'2786	0'2703
4	0'3463	0'3549	0'3523	0'3137
5	0'4301	0'4239	0'3881	0'3303
6	0'6696	0'6183	0'5863	0'5250
7	0'7048	0'6499	0'6003	0'5423
8	0'6774	0'5365	0'5304	0'4200
9	0'7639	0'6229	0'5950	0'4368
10	0'9904	0'7345	0'6430	0'5730
Valor global	5'4331	4'8570	4'5262	3'9337

TABLA 22

Peso seco, expresado en gr, de la parte aérea de plantas de Phaseolus —
vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
0	0'4067			
1	0'2127	0'1907	0'1903	0'1664
2	0'2736	0'2921	0'2310	0'2265
3	0'2960	0'2961	0'2629	0'2476
4	0'3661	0'3525	0'2734	0'2529
5	0'7030	0'7017	0'6320	0'5239
6	0'7021	0'5647	0'4434	0'4479
7	0'6377	0'6343	0'6169	0'5354
8	0'5451	0'5115	0'5140	0'4921
Valor global	3'7263	3'5336	3'1638	2'9477

TABLA 23

Peso seco, expresado en gr, de la parte aérea de las plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn. (Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	0'2564	0'2504	0'2455	0'2443	0'2361	0'2170	0'2001	0'1619
2	0'2977	0'2690	0'2569	0'2522	0'2503	0'2499	0'2309	0'2040
3	0'6959	0'5379	0'4226	0'4109	0'3340	0'2997	0'2692	0'2498
4	0'7478	0'6620	0'5553	0'5193	0'4355	0'4205	0'3350	0'2622
5	0'8023	0'7911	0'6109	0'5864	0'5414	0'5062	0'3952	0'2718
6	1'2987	1'3083	1'0451	0'9016	0'7090	0'6105	0'5791	0'3167
7	1'3063	1'3211	1'0965	0'9592	0'7212	0'6755	0'5895	0'2300
8	1'9821	1'9061	1'1198	1'0771	1'0402	0'9734	0'7265	0'1111
9	2'1292	2'2027	2'0014	1'8653	1'4372	1'2095	0'8192	-
Valor global	9'3953	9'2486	7'3516	6'8153	5'5049	5'1622	4'1437	1'8075

TABLA 24

Peso seco, expresado en gr, de raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm
1	0'0324	0'0353	0'0336	0'0229
2	0'0534	0'0437	0'0379	0'0379
3	0'0610	0'0470	0'0428	0'0426
4	0'0657	0'0552	0'0528	0'0437
5	0'0676	0'0635	0'0599	0'0552
6	0'0347	0'0638	0'0614	0'0599
7	0'1144	0'0890	0'0702	0'0660
8	0'1041	0'0833	0'0683	0'0603
9	0'1092	0'1014	0'0908	0'0817
10	0'1657	0'1351	0'1055	0'0997
Valor global	0'8582	0'7173	0'6231	0'5697

TABLA 25

Peso seco, expresado en gr. de raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'0522	0'0346	0'0325	0'0280
2	0'0526	0'0504	0'0490	0'0372
3	0'0739	0'0551	0'0501	0'0419
4	0'0884	0'0746	0'0516	0'0482
5	0'1083	0'1034	0'0903	0'0706
6	0'1094	0'1040	0'0962	0'0732
7	0'1106	0'1040	0'0977	0'0844
8	0'1138	0'1070	0'0984	0'0864
Valor global	0'7092	0'6331	0'5658	0'4699



TABLA 26

Peso sacco, expresado en gr, de las raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	0'0459	0'0456	0'0412	0'0395	0'0325	0'0319	0'0315	0'0298
2	0'0521	0'0467	0'0568	0'0393	0'0338	0'0387	0'0355	0'0232
3	0'0754	0'0769	0'0721	0'0578	0'0504	0'0502	0'0405	0'0265
4	0'1395	0'1050	0'0900	0'0774	0'0661	0'0574	0'0403	0'0304
5	0'1933	0'1544	0'1235	0'1242	0'0679	0'0632	0'0523	0'0301
6	0'2268	0'2095	0'1737	0'1444	0'0952	0'0819	0'0733	0'0216
7	0'2598	0'3326	0'3077	0'1972	0'1742	0'1700	0'0976	0'0506
8	0'3609	0'3961	0'2994	0'3094	0'2237	0'1909	0'0698	0'0351
9	0'4773	0'4250	0'3740	0'3633	0'2772	0'2813	0'1748	-
Valor global	1'8300	1'7918	1'5374	1'13515	1'0210	0'9555	0'6356	0'2473

4.2. CONTENIDO DE MANGANESO E HIERRO EN LAS PLANTAS

A lo largo del ciclo de desarrollo de las plantas, el curso del contenido de manganeso en las partes aéreas es ascendente, tanto en la serie de experiencias I (Fig. 12 y Tabla 27) como en la II (Fig. 13 y Tabla 28). Puede observarse, con carácter regular, la relación:

$$C > 10 \text{ ppm} > 40 \text{ ppm} > 80 \text{ ppm Mn}$$

con diferencias que se incrementan hasta las fases finales del ciclo biológico de las plantas.

Los contenidos de manganeso y las diferencias en los distintos tratamientos con exceso de manganeso son mucho mayores en la Experiencia II respecto a la I. Estos resultados parecen sugerir la idea de que un incremento en el aporte de hierro (Experiencia I) antagoniza la absorción del manganeso, sobre todo para aquellas plantas que han vivido en más exceso de manganeso (40 y 80 ppm).

Como era de esperar, en cambio, los valores de hierro en planta (Experiencia II) (Fig. 14 y Tabla 29) son muy parecidos en todas las variantes nutritivas consideradas, con a lo sumo valores algo inferiores, sobre todo en fases avanzadas del desarrollo de las plantas, para las crecidas en solución nutritiva con 80 ppm de manganeso.

De acuerdo con las observaciones anteriores resultan significativas las relaciones Mn/Fe (Fig. 15 y Tabla 30) en la parte aérea de las plantas. Mientras las plantas control oscilan de valores iniciales de 0'3 hasta finales de 1'4, las plantas que viven en exceso de manganeso van su-

.../...

cesivamente incrementando las relaciones hasta alcanzar progresivamente máximos de 6, 17'5 y 35'4 en las plantas cultivadas en 10, 40 y 80 ppm de manganeso, respectivamente. La aparición de los síntomas de toxicidad y de los efectos generales de reducción del crecimiento empiezan a observarse ya en las relaciones Mn/Fe superiores a 10 que corresponden aproximadamente a valores superiores a 500 ppm de manganeso en planta. En este sentido en la literatura científica se han reportado valores parecidos para diversas especies (8 y 183).

En las fases finales del crecimiento, coincidiendo con las manifestaciones de toxicidad más acusadas, hemos estudiado, por separado y con carácter comparativo, los niveles de hierro y manganeso en tallo (Fig. 16 y 31), hojas inferiores (Fig. 17 y Tabla 32) y hojas superiores (Fig. 18 y Tabla 33). En efecto, puede observarse como a lo largo de las muestras 6, 7 y 8 de la Experiencia II (estado de floración y fructificación de las plantas) el descenso del hierro y el ligero incremento de manganeso en las hojas inferiores (Fig. 17) se traduce en valores relativamente altos (1000-2000 ppm) de manganeso en las hojas jóvenes superiores y valores descendientes para el hierro. En este sentido se observa una típica inflexión en el contenido de hierro que coincide con el momento de la floración plena e inicio de la fructificación. Consecuentemente los valores de la relación Mn/Fe siguen el orden:

Hojas jóvenes > hojas viejas > tallo

Estos resultados indican el carácter acumulativo del manganeso para la planta y la función de transporte que juega el tallo, con una movilización lenta pero ascendente desde las hojas viejas inferiores a las jóvenes superiores. Estos resultados internos de los contenidos de manganeso son paralelos a los cambios en los síntomas generales externos, en

.../..

donde primero se localizan las puntuaciones parduzcas en los tallos, hojas y peciolo de la base, para luego ir sucesivamente ascendiendo, via peciolo y tallo, hacia las partes jóvenes superiores (Fotogr. 4, 5 y 6) en donde los incrementos de manganeso determinan sobre todo una típica clorosis intervenal, el oscurecimiento sucesivo de los tallos, peciolo y nerviaciones y la presencia de necrosis, arrugamiento característico del haz foliar e incluso malformaciones del crecimiento (Fotogr. 7).

Los valores de manganeso en raíces (Fig. 19 y 20 y Tablas 34 y - 35) alcanzan valores muy superiores a los obtenidos en la parte aérea, de forma que en las muestras finales (estado de fructificación) es de un orden superior a 8000 ppm de manganeso interno en las plantas cultivada en - 90 ppm. El curso de los niveles de manganeso es progresivo a lo largo del ciclo vegetativo de las distintas series de experiencias (I y II) y para las diferentes variantes muestra el orden regular:

$$80 \text{ ppm} > 40 \text{ ppm} > 10 \text{ ppm} > C$$

De la observación de los datos de la Fig. 19 y 20 se deduce el fuerte valor acumulativo del manganeso, muy superior al de la parte aérea, indicio que esta de acuerdo con la interpretación de la escasa movilidad del manganeso. No obstante, los síntomas del exceso de manganeso no son tan ostensibles sobre la raíz como en la parte aérea, aunque si va acompañado de la reducción del crecimiento y un típico ennegrecimiento progresivo de las raíces (sección 4.1.1.). Igualmente como en el caso de las partes aéreas, también las plantas que, a igualdad de manganeso, han recibido mayor aporte de hierro muestran niveles inferiores de manganeso por un posible efecto de antagonismo en la absorción (Fig. 19).

Las plantas crecidas en 10 ppm muestran siempre los valores más -

.../..

elevados de contenido de hierro en las raíces, seguido en general de las de 40 ppm, control y 80 ppm, ya claramente reducidas en su contenido.

Estos valores se traducen en relaciones Mn/Fe (Fig. 22 y Tabla — 37) que siguen el orden regular:

$$80 \text{ ppm} > 40 \text{ ppm} > 10 \text{ ppm} > C$$

pero que, a diferencia de la misma relación en parte aérea, muestra valores mucho más inferiores, debido fundamentalmente a los niveles comparativamente mucho mayores del contenido de hierro en las raíces respecto a la parte aérea. En este sentido, cabría correlacionarlo con la interpretación sugerida muchas veces por diversos investigadores (39, 123 y 160) de que muchas acciones del exceso de manganeso en realidad podrían ser debidas a un efecto de carencia de hierro.

En el caso concreto de nuestros resultados más bien hablan en favor de una acción directa del manganeso más que una modificación de los niveles de hierro. Pues éstos mientras oscilan poco entre los de las plantas control y las sometidas a las diferentes concentraciones de manganeso en exceso (Fig. 14 y 21), por el contrario los niveles de manganeso en planta muestran cada vez más diferencias entre las plantas control y las sometidas a cantidades crecientes de manganeso (Fig. 13 y 20).

En general, puede establecerse para Phaseolus vulgaris que los niveles críticos de exceso de manganeso que determinan claramente síntomas de toxicidad son del orden de 1000 ppm para la parte aérea y de unas 3000 ppm en la raíz. La elevación del suministro en hierro favorece una mejor tolerancia al exceso de manganeso, probablemente actuando ya a nivel de la absorción, aunque con pocas diferencias (Tablas 34 y 35) y más a un nivel —

.../...

posterior, con diferencias más marcadas en los contenidos de manganeso de -
las partes aéreas de las experiencias I y II (Tablas 27 y 28).

Fig_12 Mn EN ppm EN PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA I)

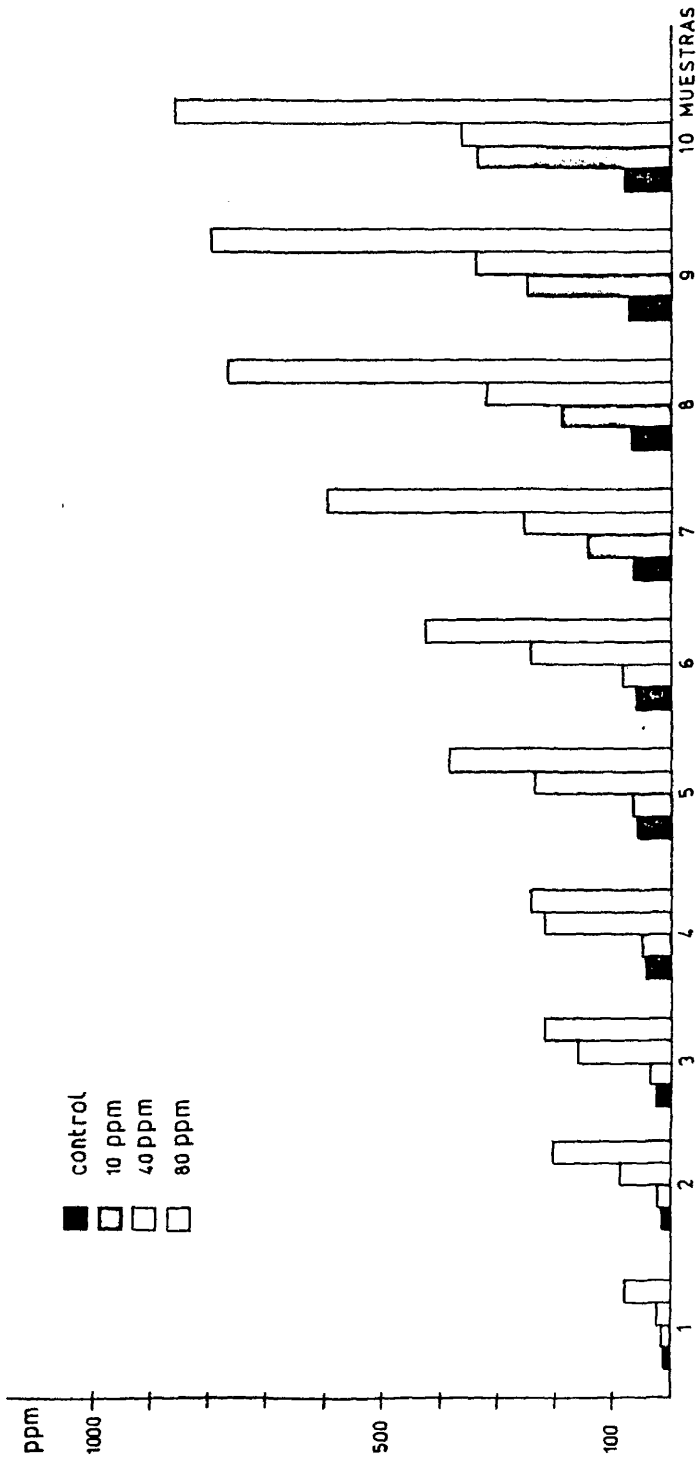


Fig -13 Mn EN ppm EN PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA II)

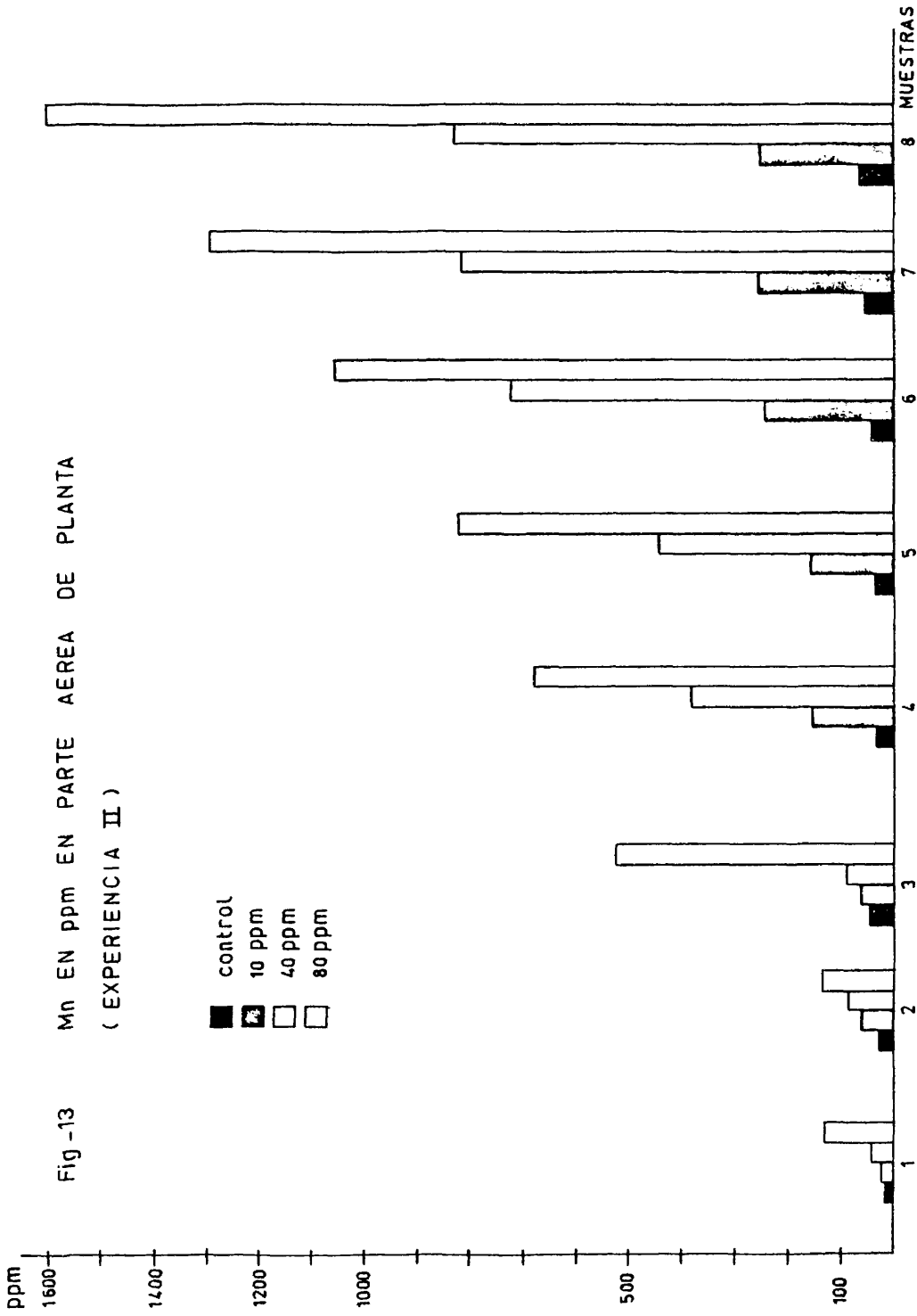
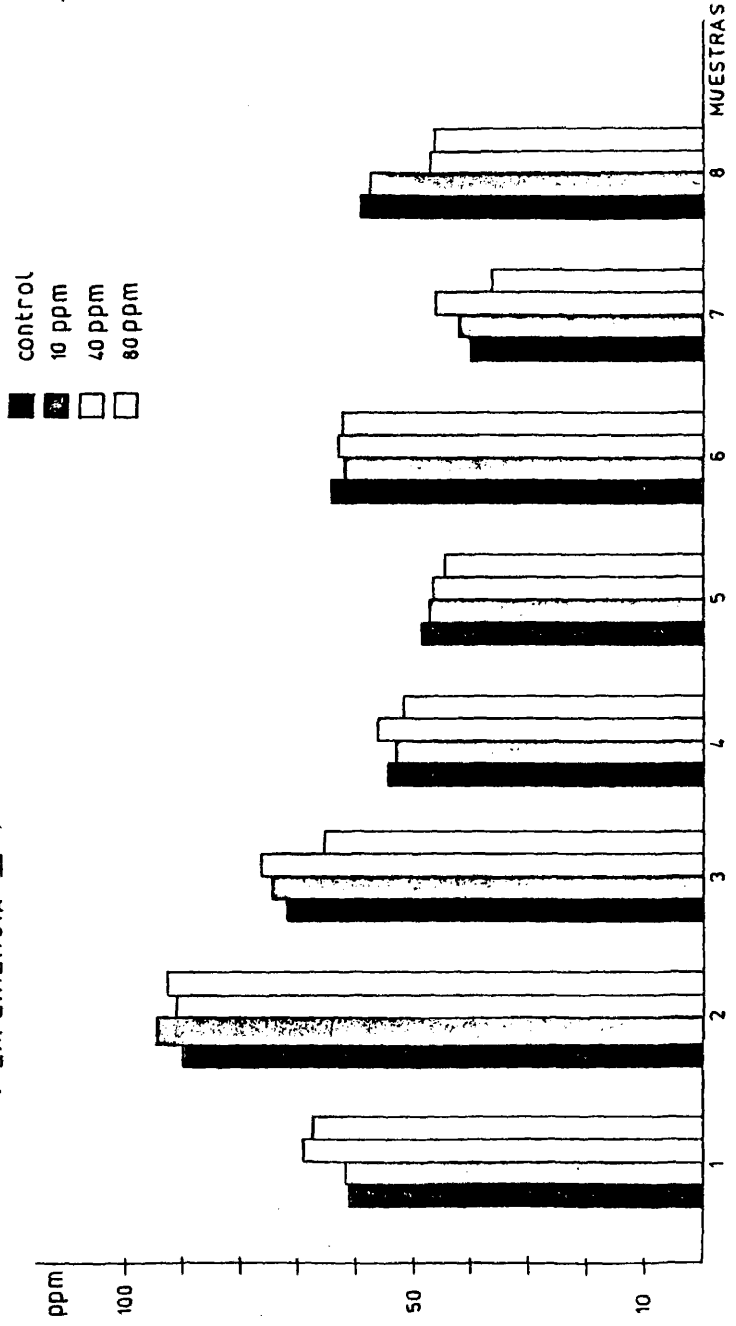
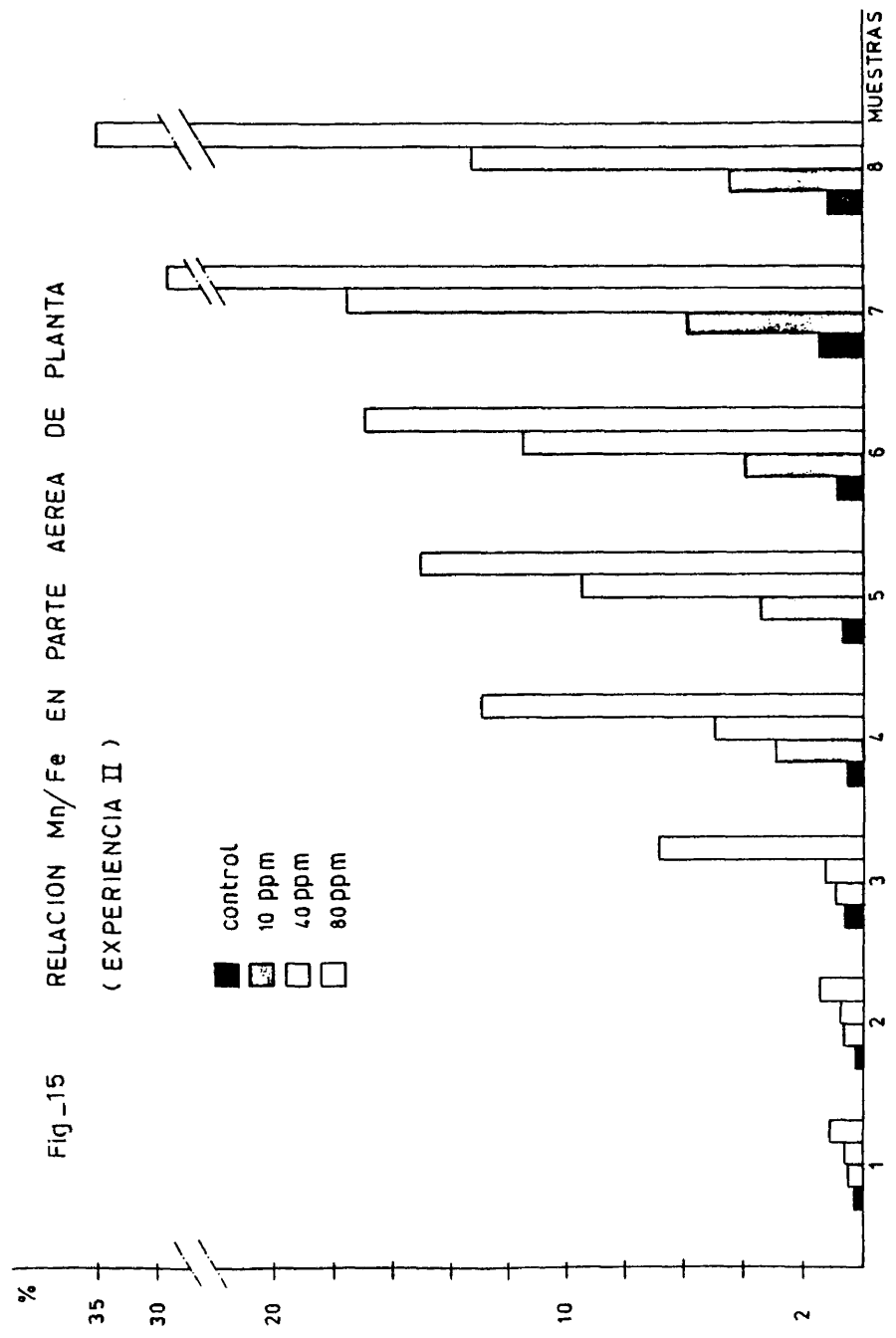


Fig -14 Fe EN ppm EN PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA II)



Fig_15 RELACION Mn/Fe EN PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA II)



Fig_16 CONTENIDO Y RELACION Mn/Fe EN EL TALLO (EXPERIENCIA II)

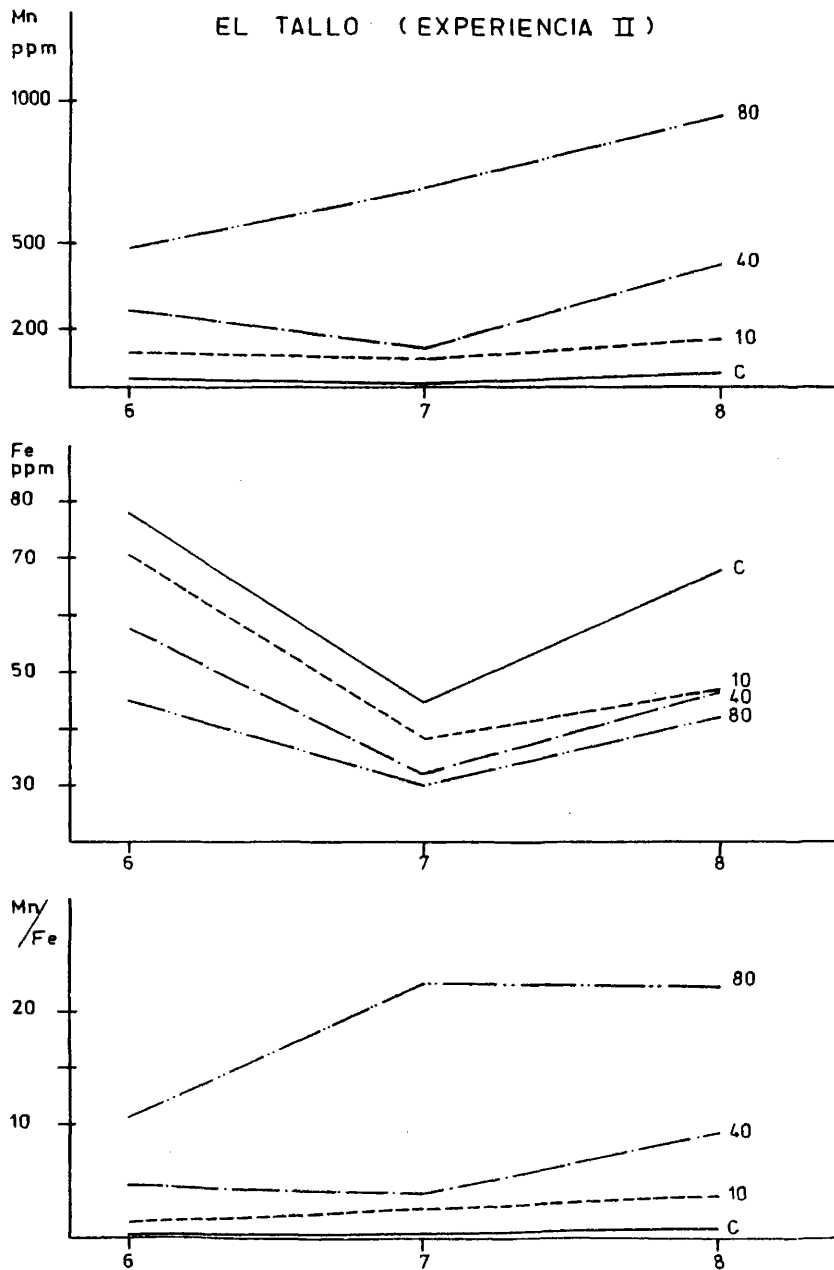
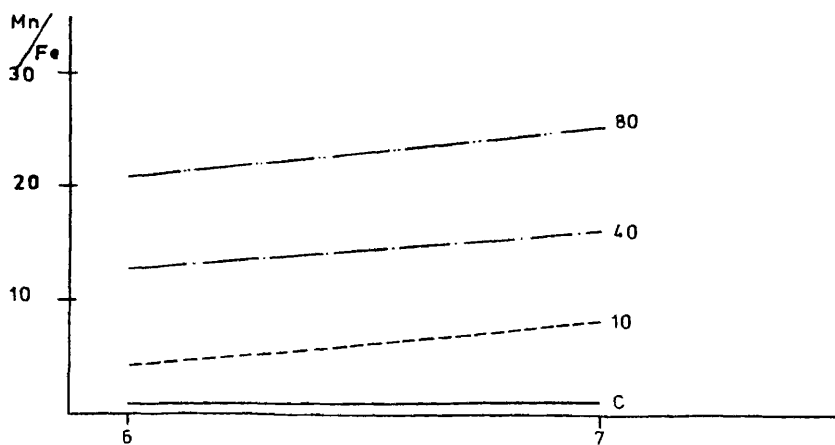
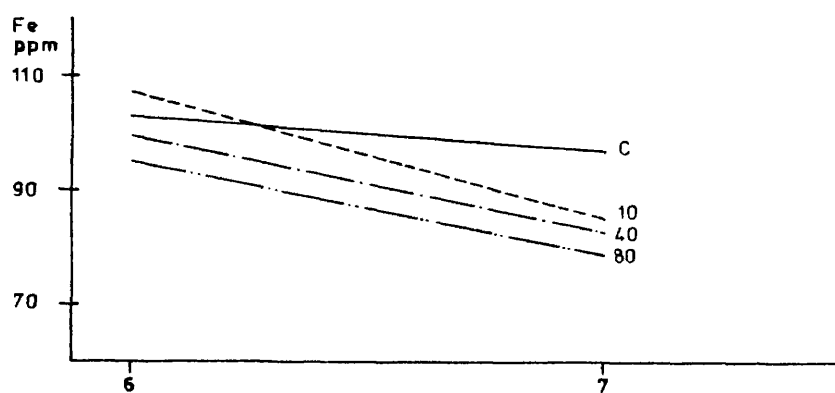
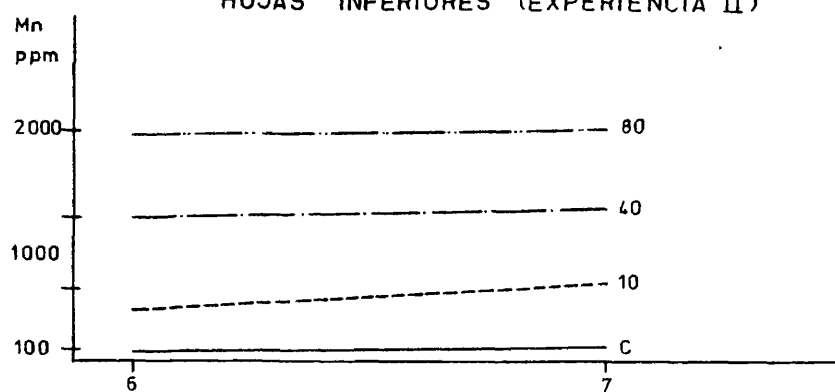
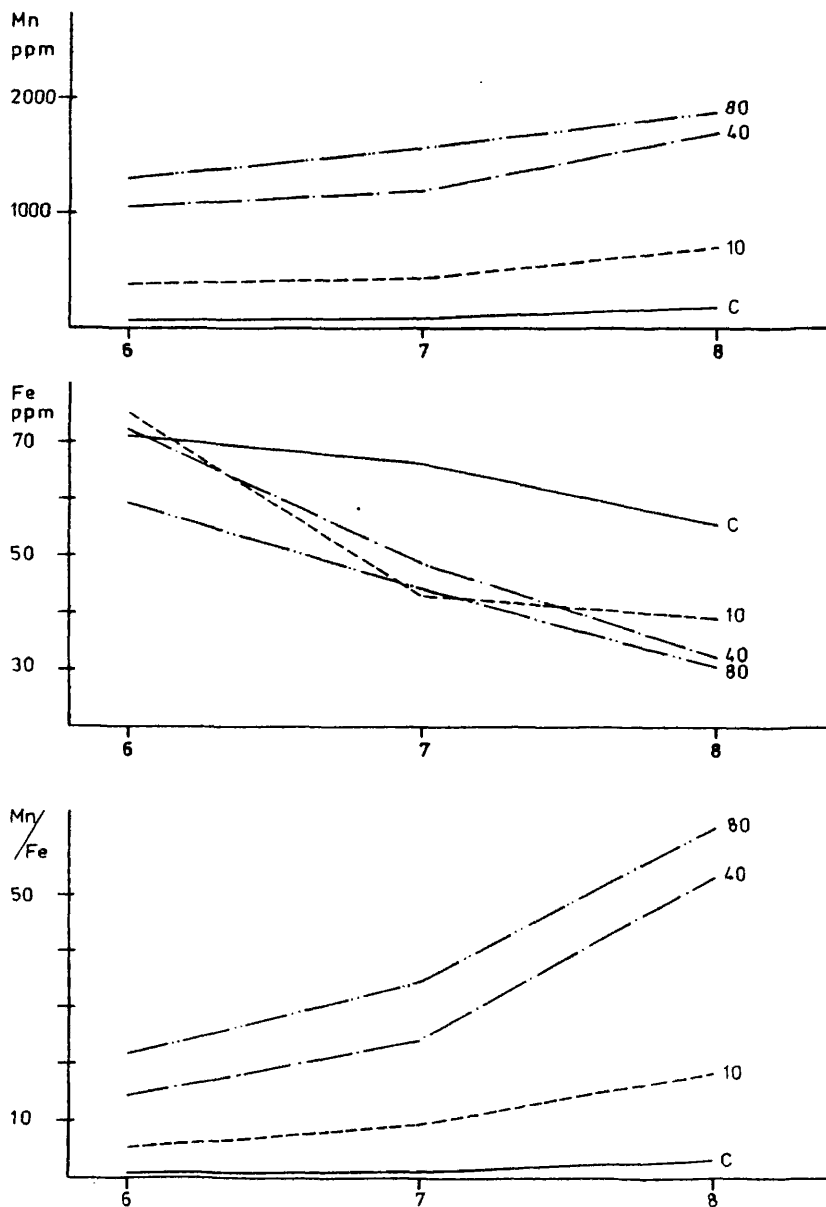


Fig 17 CONTENIDO Y RELACION Mn/Fe EN
HOJAS INFERIORES (EXPERIENCIA II)



Fig_18 CONTENIDO Y RELACION Mn/Fe EN ppm
EN HOJAS SUPERIORES (EXPERIENCIA II)



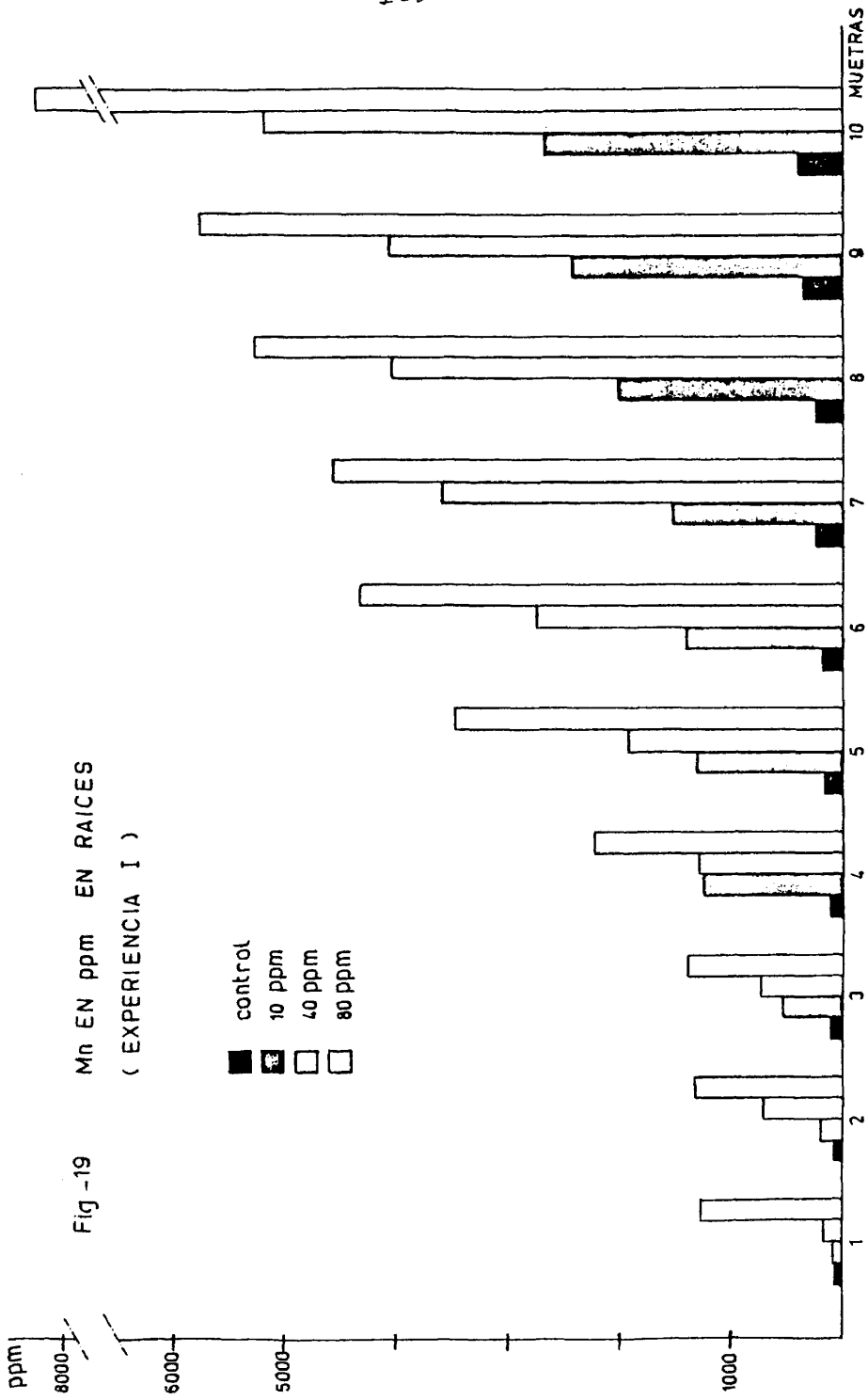


Fig -19 Mn EN ppm EN RAICES (EXPERIENCIA I)

Fig-20 Mn EN ppm EN RAICES
(EXPERIENCIA II)

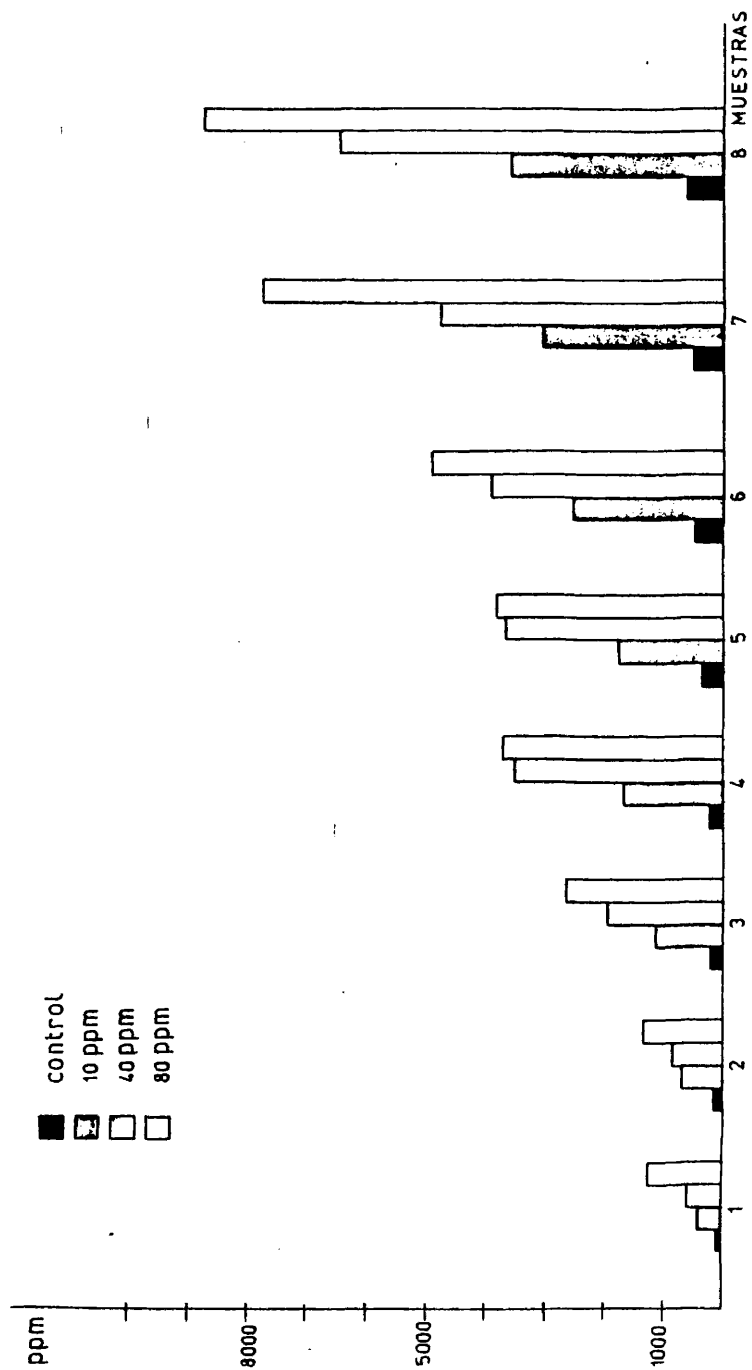


Fig-21 Fe EN ppm EN RAICES
(EXPERIENCIA II)

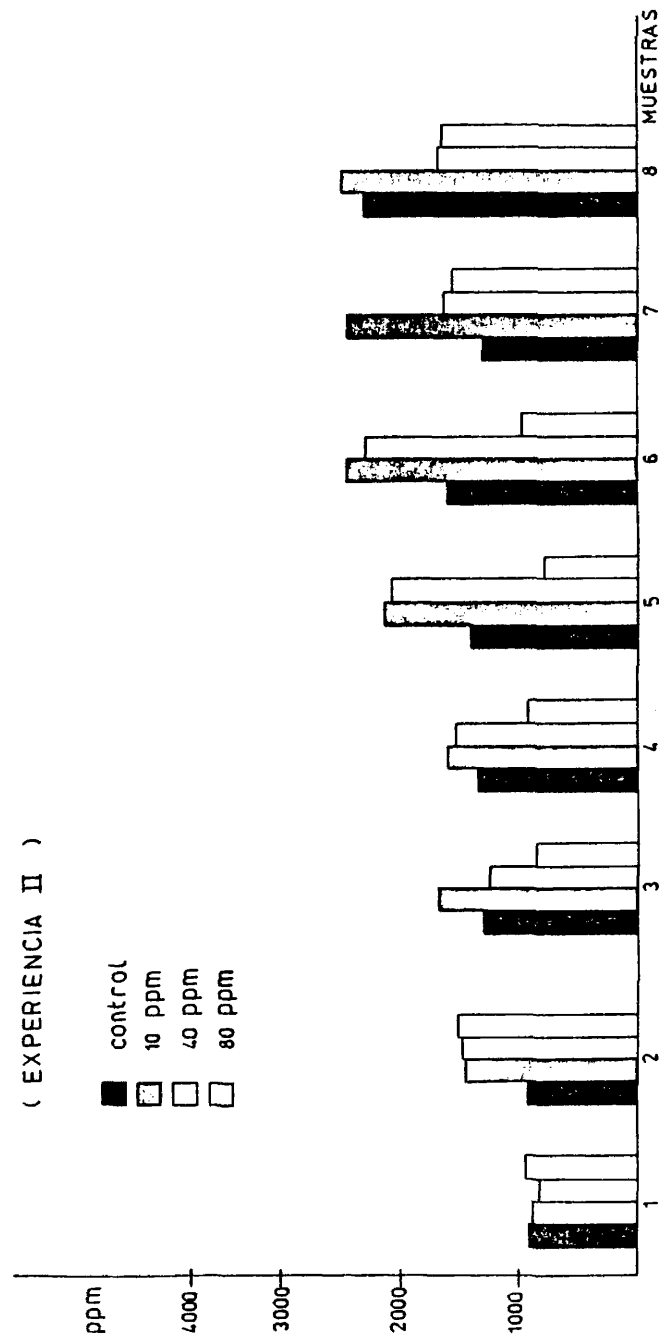


Fig-22 RELACION Mn/Fe EN RAICES
(EXPERIENCIA II)

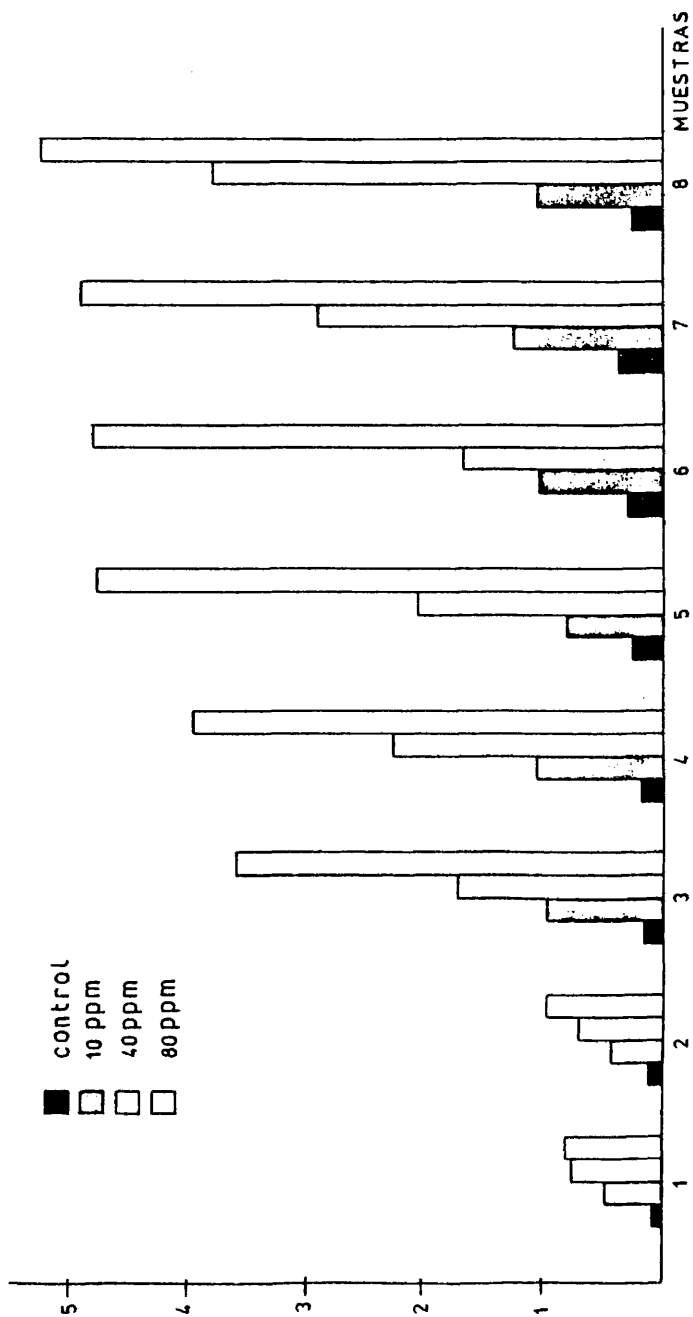


TABLA 27

Contenido de Mn en ppm en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	13	14	23	81
2	14	25	87	204
3	29	40	164	209
4	43	48	209	244
5	57	63	237	382
6	58	71	242	424
7	60	144	255	594
8	64	189	319	764
9	70	247	332	792
10	79	330	362	954
Valor global	487	1171	2229	4647

TABLA 28

Contenido de Mn en ppm en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	19	28	44	80
2	28	63	70	138
3	43	67	91	526
4	31	155	381	675
5	34	162	445	820
6	46	246	725	1058
7	57	254	814	1295
8	64	255	830	1602
Valor global	322	1230	3400	6194

TABLA 29

Contenido de Fe en ppm en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	61	62	69	67
2	90	95	91	93
3	72	75	76	65
4	54	53	56	52
5	48	47	47	44
6	64	62	63	62
7	40	42	46	36
8	59	57	47	57
Valor global	488	493	495	476

TABLA 30

Relación Mn / Fe en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'32	0'45	0'63	1'19
2	0'32	0'66	0'77	1'48
3	0'67	0'90	1'27	6'88
4	0'57	2'90	5'00	12'95
5	0'70	3'43	9'52	15'01
6	0'83	3'96	11'50	16'96
7	1'42	6'00	17'57	35'44
8	1'08	4'43	13'30	29'25
Valor global	5'91	22'73	59'50	118'16

TABLA 31

Contenido y relación Mn/Fe en tallo de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn

Mn en ppm en tallos

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
6	27	111	258	484
7	13	104	138	698
8	43	180	436	956

Fe en ppm en tallos

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
6	78	71	58	45
7	45	39	33	31
8	68	48	47	43

Relación Mn/Fe en tallos

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
6	0'35	1'57	4'64	10'71
7	0'30	2'68	4'23	22'64
8	0'63	3'77	9'23	22'46

TABLA 32

Contenido y relación Mn/Fe en hojas inferiores de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Mn en hojas inferiores en ppm

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
6	72	449	1257	1993
7	118	697	1356	2021

Fe en hojas inferiores en ppm

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
6	103	107	98	95
7	97	95	83	79

Relación Mn/Fe en hojas inferiores en ppm

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
6	0'70	4'19	12'75	20'96
7	1'21	8'18	16'33	25'57

TABLA 33

Contenido en relación Mn/Fe en hojas superiores de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

Mn en hojas superiores en ppm

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
6	66	384	1051	1316
7	68	405	1207	1588
8	183	706	1723	1916

Fe en hojas superiores en ppm

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
6	71	25	72	59
7	66	43	43	45
8	55	39	32	31

Relación Mn/Fe en hojas superiores

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
6	0'93	5'12	14'51	22'21
7	1'02	9'47	24'86	35'29
8	3'30	18'03	53'25	62'25

TABLA 34

Contenido de Mn en ppm en raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	62	85	188	1278
2	91	215	723	1314
3	119	545	740	1407
4	126	1254	1272	2243
5	156	1307	1922	3486
6	166	1417	2746	4327
7	241	1524	3608	4573
8	246	2025	4038	5280
9	341	2426	4094	5780
10	395	2676	5210	8268
Valor global	1945	13474	24531	37956

TABLA 35

Contenido de Mn en ppm en raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	84	438	620	1288
2	113	686	864	1377
3	204	1649	1992	2676
4	218	1704	3513	3690
5	380	1737	3688	3798
6	473	2550	3903	4757
7	482	3081	4780	7731
8	620	3575	6443	8730
Valor global	2574	15420	25803	34047

TABLA 36

Contenido de Fe en ppm en raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	918	996	829	958
2	912	1461	1490	1511
3	1303	1686	1268	864
4	1367	1621	1547	934
5	1420	2163	2094	794
6	1607	2470	2314	991
7	1333	2471	1637	1578
8	2330	2500	1694	1679
Valor global	11190	15268	12873	9309

TABLA 37

Relación Mn/Fe en raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con —
diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm
1	0'09	0'49	0'75	0'82
2	0'12	0'47	0'58	0'91
3	0'15	0'98	1'57	3'89
4	0'16	1'05	2'27	3'95
5	0'27	0'80	1'76	4'78
6	0'29	1'03	1'69	4'80
7	0'36	1'25	2'92	4'90
8	0'26	1'10	3'80	5'24
Valor global	0'91	7'17	15'34	28'99

4.3. CONTENIDO DE PROTEINAS EN LAS PLANTAS

El contenido en proteínas de la parte aérea de las plantas (Tablas 38, 39, 40 y 41) sigue un curso regular ascendente en todas las variantes experimentales consideradas hasta la mitad del ciclo vegetativo (prefloración). A partir de entonces, con la floración e inicio de la senescencia de las hojas, de nuevo descienden progresivamente todos los valores. En general, sigue el orden:

$$C > 10 \text{ ppm} > 40 \text{ ppm} > 80 \text{ ppm Mn}$$

sobre todo a medida que se va acumulando el exceso de manganeso en plantas y con concentraciones inversamente proporcionales a las del manganeso en planta. Paradójicamente a lo ocurrido con otros parámetros, las plantas con mayor aporte de hierro (Experiencia I) muestran diferencias más marcadas que las de suministro más moderado de hierro (Experiencia II) (Tablas 38 y 40).

Resultados muy parecidos se han obtenido en los valores de proteína en raíz (Tablas 42, 43, 44 y 45). Su curso es también ascendente hasta la prefloración y de nuevo entra en regresión en la floración y senescencia. Los resultados comparativos entre las experiencias I y II translucen los mismos hechos constatados en la parte aérea, influyendo el incremento en hierro en una diferencia más marcada en los descensos de contenido proteico en las plantas con exceso de manganeso.

Un hecho a destacar es que el efecto de la toxicidad sobre los niveles de manganeso no se debe exclusivamente a la reducción del crecimiento provocado por este exceso (4.1.2), sino que, como muestran los datos de proteína referidos a peso seco (Fig. 23 y 24 y Tablas 39, 41, 43 y 45),

.../...

tanto en raíces como en parte aérea hay un claro descenso de estos porcentajes, lo que es indicativo de una acción directa sobre las proteínas. Estos efectos son mucho más marcados sobre las raíces (Tablas 43 y 45) que en las partes aéreas. Una posible explicación, fácilmente correlacionable con los efectos de detrimento de la nodulación en las raíces por el exceso de manganeso, es la incidencia, por otra parte bastante ambigua en la literatura (50, 70 y 88), del exceso de manganeso sobre la fijación simbiótica del N_2 en la asociación leguminosa-Rhizobium. En efecto, el menor desarrollo de la nodulación se acompaña de niveles inferiores de proteína en planta y de porcentajes disminuidos de la misma respecto al crecimiento. Con la misma interpretación estaría de acuerdo los efectos más pronunciados sobre la proteogénesis en las raíces respecto a la parte aérea. Por último, un hecho a destacar, pero cuya explicación se nos hace difícil es la marcada diferencia que, a igualdad de concentración de manganeso, provoca el incremento en el suministro de hierro (Experiencia I), de forma que para las plantas crecidas en 80 ppm de manganeso la reducción del porcentaje de proteínas respecto a las control alcanza el 50 % (Fig. 23), mientras que en la experiencia II, más moderada en hierro, nunca alcanza estas elevadas reducciones (Fig. 24).

Fig-23 PORCENTAJE DE PROTEINAS EN PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA I)

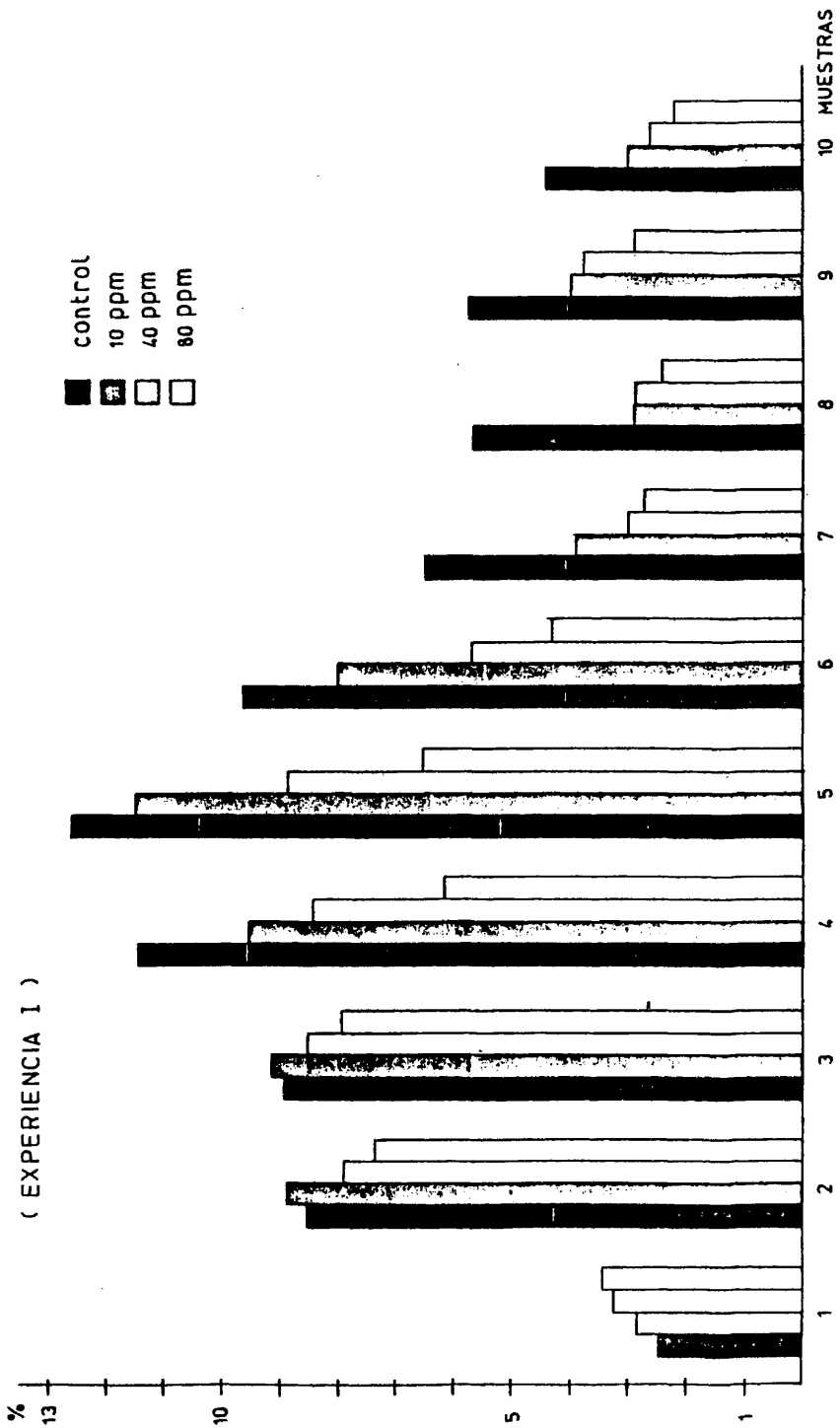


Fig - 24 PORCENTAJE DE PROTEINAS EN PARTE AEREA DE PLANTA
(EXPERIENCIA II)

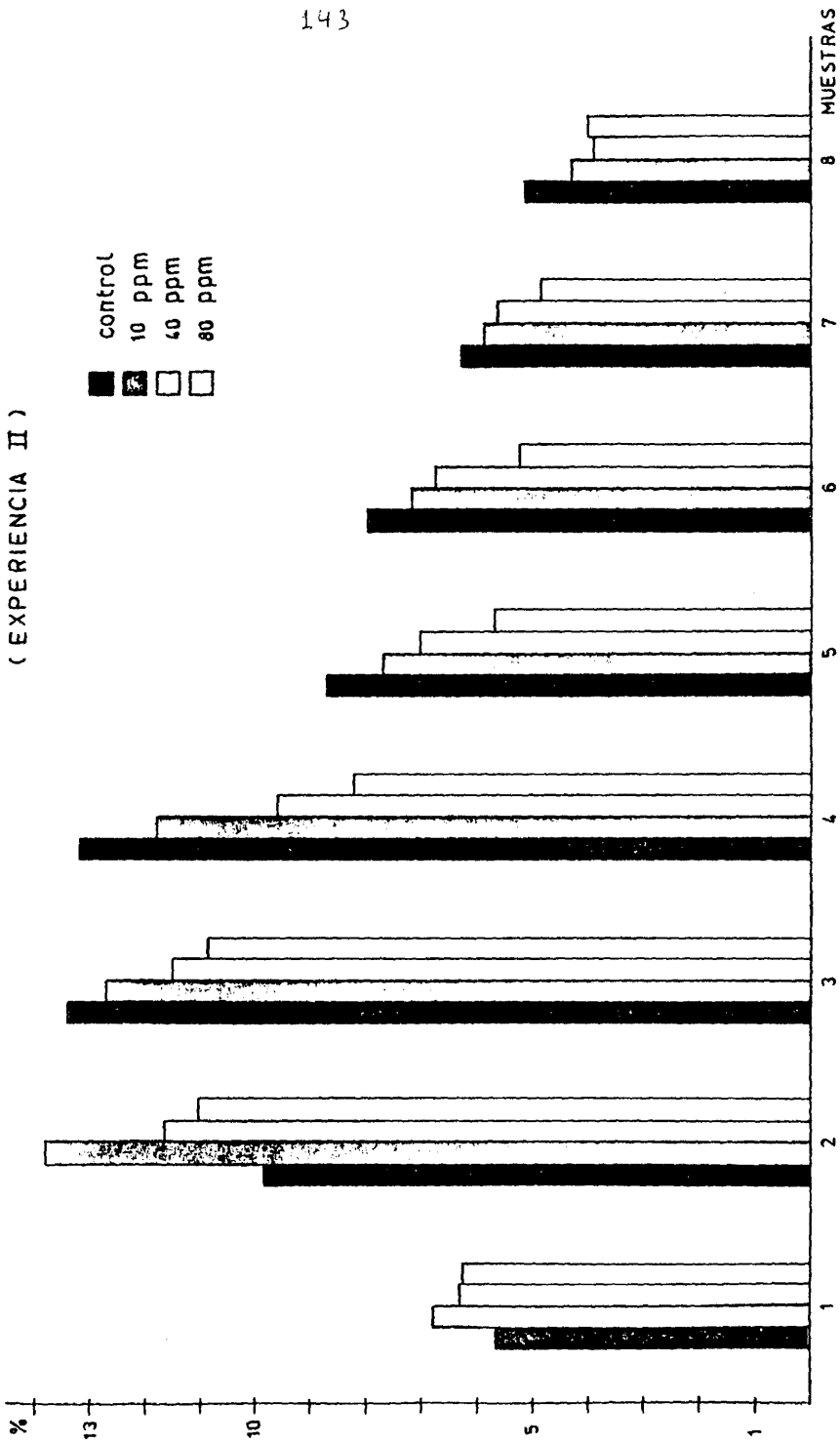


TABLA 38

Contenido de proteínas, expresado en mg, en parte aérea de plantas de —
Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
0	100'2510			
1	6'6666	8'5457	8'4824	8'1696
2	24'4245	26'7056	23'1312	21'0699
3	26'2976	29'0597	23'8203	21'4618
4	39'8245	34'3543	29'8750	19'3239
5	54'3646	48'7909	34'6573	21'6346
6	64'7503	49'5877	33'8888	22'5750
7	46'0234	25'2811	18'2491	14'9132
8	38'4763	15'1293	14'9042	10'2900
9	44'0006	25'0370	22'5505	12'7109
10	44'0728	21'2270	17'1681	12'8352
Valor global	388'8901	283'7183	226'7269	164'9841

TABLA 39

Porcentaje de proteínas, referido a peso seco en parte aérea de plantas de -
Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
0	23'7			
1	2'45	2'86	3'27	3'45
2	8'57	8'89	7'90	7'38
3	8'96	9'17	8'55	7'94
4	11'50	9'68	8'48	6'16
5	12'64	11'51	8'93	6'55
6	9'67	8'02	5'78	4'30
7	6'53	3'89	3'04	2'75
8	5'68	2'82	2'81	2'45
9	5'76	4'02	3'79	2'91
10	4'45	2'89	2'67	2'24
Valor global	76'21	63'75	55'22	46'13

TABLA 40

Contenido de proteínas, expresado en mg, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm
0	100'0492			
1	12'1711	13'0118	10'5346	10'4640
2	27'0002	38'9907	26'8939	24'9945
3	38'3958	37'6896	30'2399	26'8685
4	48'5998	42'2831	26'2230	20'5979
5	61'3592	54'1284	44'5673	30'1369
6	56'1434	40'6635	30'0971	23'4798
7	40'4295	40'9590	34'7746	29'6120
8	28'0797	22'0814	20'0923	19'7790
Valor global	312'1827	289'8065	223'4227	184'9716

TABLA 41

Porcentaje de proteínas referido a peso seco, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
0	24'6			
1	5'72	6'82	6'33	6'29
2	9'87	13'82	11'64	11'03
3	13'43	12'72	11'51	10'85
4	13'27	11'99	9'59	8'14
5	8'73	7'71	7'05	5'71
6	7'99	7'20	6'79	5'24
7	6'34	5'90	5'64	4'89
8	5'15	4'32	3'91	4'02
Valor global	70'50	64'48	62'46	56'17

TABLA 42

Contenido de proteínas, expresado en mg, en raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	3'3566	1'9344	1'6901	0'9183
2	6'5896	5'2178	4'2107	3'4889
3	9'7234	7'2521	4'8236	4'5412
4	14'0269	11'4154	9'3192	5'9388
5	12'1004	11'1887	8'8923	5'6414
6	13'6960	10'0485	8'6920	7'4272
7	18'6472	12'0684	6'0302	5'5176
8	9'0046	6'3724	4'8561	3'6481
9	9'1510	7'7064	6'1018	4'2157
10	12'0464	8'1465	5'3910	3'8384
Valor global	108'3421	81'4096	59'9970	45'1756

TABLA 43

Porcentaje de proteínas, referido a peso seco, en raíces de plantas de —
Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	10'36	5'48	5'03	4'01
2	12'34	11'94	11'11	9'23
3	15'94	15'43	11'27	10'60
4	21'35	20'68	17'65	13'59
5	17'90	17'62	14'87	10'22
6	16'17	15'75	14'14	12'42
7	16'30	13'56	8'59	8'36
8	8'65	7'65	7'11	6'05
9	8'38	7'60	6'72	5'16
10	7'27	6'03	5'11	3'85
Valor global	134'66	121'74	101'60	83'55

TABLA 44

Contenido de proteínas, expresado en mg, en raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	6'5615	3'5673	2'9835	2'1364
2	10'3463	8'8402	6'6689	4'2705
3	16'9970	10'9098	7'3747	5'5056
4	18'6118	14'0099	6'7338	5'8659
5	12'1513	9'9264	6'7544	4'9491
6	11'1588	9'3912	7'1188	5'0142
7	7'3770	5'6264	4'5333	3'7389
8	5'0755	4'7080	3'9852	2'8253
Valor global	88'2792	66'9792	46'1525	34'3059

TABLA 45

Porcentaje de proteínas, referido a peso seco, en raíces de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	12'57	10'31	9'18	7'63
2	19'67	17'54	13'61	11'48
3	23'00	19'80	14'72	13'14
4	21'19	18'78	13'05	12'17
5	11'22	9'60	7'43	7'01
6	10'20	9'03	7'40	6'85
7	6'67	5'41	4'64	4'43
8	4'46	4'40	4'05	3'27
Valor global	108'98	94'87	74'13	65'98

4.4. CONTENIDO DE CLOROFILA TOTAL, CLOROFILA a y CLOROFILA b EN LAS PLANTAS

Se ha podido observar diferencias en el contenido de clorofila a - en las distintas variantes experimentales consideradas. En general, el curso es ascendente hasta la época de la prefloración, pero luego la movilización y la senescencia determina una caída de valores (Fig. 26, 27, 29, 29,- 30a, 30b, 31a y 31b y Tablas 46, 47, 48, 49, 50 y 51).

Las respuestas de la planta en los contenidos de clorofila a son - variables a igualdad de exceso de manganeso, según sea la dosis de hierro - suministrada a las plantas. Un buen aporte de éste último (Experiencia I) - (Fig. 26) muestra, en la primera mitad del ciclo vegetativo de las plantas, contenidos mayores de clorofila a para las plantas crecidas en 10 ppm de - manganeso e, incluso en las primeras muestras para las de 40 y 80 ppm res- - pecto a las control. Con la progresiva acumulación del manganeso en planta aparece ya una inversión de valores en el sentido:

$$C > 10 \text{ ppm} > 40 \text{ ppm} > 80 \text{ ppm}$$

Por el contrario, en la serie de experiencias II (suministro más - moderado de hierro) a lo largo de todo el ciclo vegetativo cualquier elevación del incremento de manganeso se traduce en un efecto detrimento sobre - la clorofila a de las plantas (Fig. 28), de forma que se cumple siempre:

$$C > 10 \text{ ppm} > 40 \text{ ppm} > 80 \text{ ppm Mn}$$

Las plantas que habían recibido como fuente de N nitratos muestran un comportamiento parecido a las de la Experiencia II siempre con valores - más altos de clorofila a en las plantas control y decreciendo proporcional- - mente conforme se suministró mayor concentración de manganeso a las plantas:

.../...

C > 10 ppm > 40 ppm > 90 ppm > 160 ppm > 300 ppm > 500 ppm > 1000 ppm

Los efectos más dramáticos son a partir de las plantas que recibieron 160 ppm de manganeso o concentraciones superiores. En estos casos rápidamente, ya en las primeras fases del ciclo de desarrollo, los valores se redujeron por debajo del 50 % del de las plantas control. Un caso sumamente extremo con valores que no alcanzan ni el 10 % del de las plantas control - lo representó el de las plantas cultivadas en 1000 ppm de manganeso (Fig. - 30b).

Si los contenidos de clorofila a en plantas se refiere a porcentaje de peso seco los resultados obtenidos indican un efecto negativo del exceso de manganeso en planta (Fig. 27, 29, 31a y 31b y Tablas 47, 49 y 51) que supera a la acción del manganeso sobre el propio crecimiento de las plantas (4.1.2). Estos efectos se pronuncian al final del ciclo de desarrollo por el efecto acumulativo del manganeso, con diferencias claramente significativas sobre todo para las plantas que recibieron mayor suministro de manganeso en la solución nutritiva.

Resultados muy parecidos se han obtenido para la clorofila b (Figs. 32, 33, 34, 35, 36a, 37b y Tablas 52, 53, 54, 55, 56, 57 y 58). Así es superior el efecto detrimento ejercido por el exceso de manganeso sobre los niveles de clorofila b que los indirectos debidos a la reducción del crecimiento. También un mayor aporte de hierro a la planta disminuye este efecto negativo del manganeso (Experiencia I) (Figs. 32, 33, 34 y 35). En este último caso se comprueba además un cierto estímulo inicial del exceso de manganeso en la síntesis o niveles de clorofila b, al igual que ocurre con la clorofila a. En la serie de experiencias III, con aporte de nitratos, el curso comparativo es siempre:

.../...

C > 10 ppm > 40 ppm > 80 ppm > 160 ppm > 300 ppm > 500 ppm > 1000 ppm

alcanzando valores críticos de reducción del 50 % del contenido de clorofila b respecto a las plantas control a partir del suministro de 160 ppm de manganeso en exceso.

Debido a estos efectos parecidos sobre ambos tipos de clorofilas - a y b, la relación clorofila a / clorofila b (Tablas 58, 59 y 60) es escasamente significativa en sus diferencias para las distintas variantes experimentales, sobre todo en la Experiencia I (alto contenido en hierro) (Tabla 58). En las plantas de las experiencias II y III ya se marcan ciertas diferencias respecto a esta relación entre las plantas control y las crecidas - en exceso de manganeso, con valores algo más altos para estas últimas, excepto para las muestras finales de las plantas más afectadas (500 y 1000 ppm de manganeso) de la experiencia III.

Lógicamente los valores de clorofila total en planta paralelizan - los resultados ya comentados para las clorofilas a y b (Tablas 61, 62, 63, 64, 65 y 66). En las Tablas 65 y 66 puede observarse sobre todo los resultados más extremos obtenidos para las plantas crecidas en 500 y 1000 ppm de manganeso.

De estos resultados se deduce que el manganeso a partir de ciertas concentraciones en exceso ejerce un efecto negativo, probablemente por impedimentos en la biosíntesis normal de las clorofilas, conforme ha sido señalado por ciertos investigadores (51) y que puede muy bien comprobarse por - el descenso de sus niveles internos y porcentuales respecto al crecimiento y que, incluso, puede reconocerse externamente por una serie de síntomas - que ya hemos descrito (clorosis intervenal o del borde, necrosis, etc) (ver sección 4.1.1.).

Fig -26 CONTENIDO DE CLOROFILA a POR PLANTA (EXPERIENCIA I)

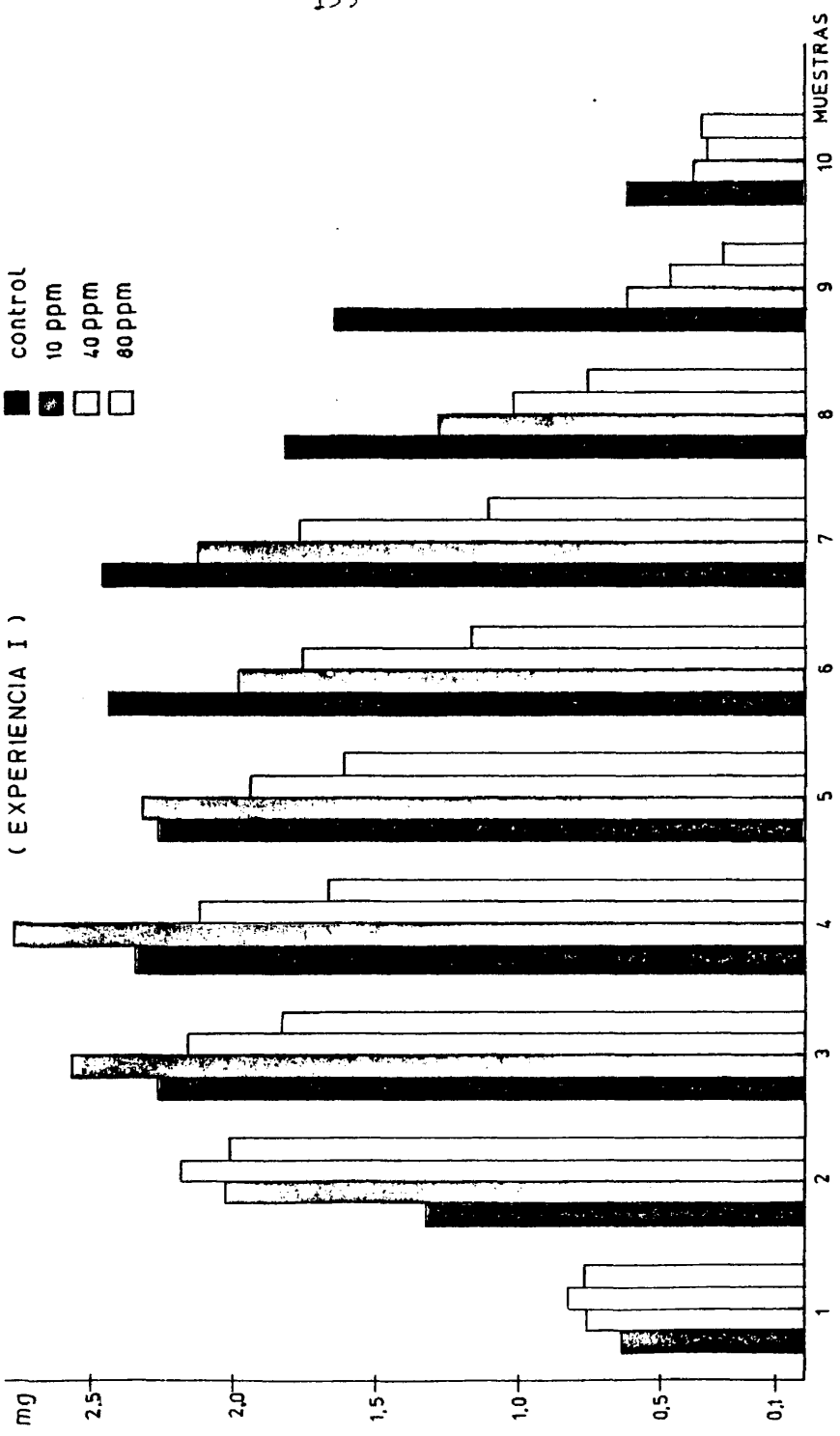


Fig-27 PORCENTAJE DE CLOROFILA a POR PLANTA
(EXPERIENCIA I)

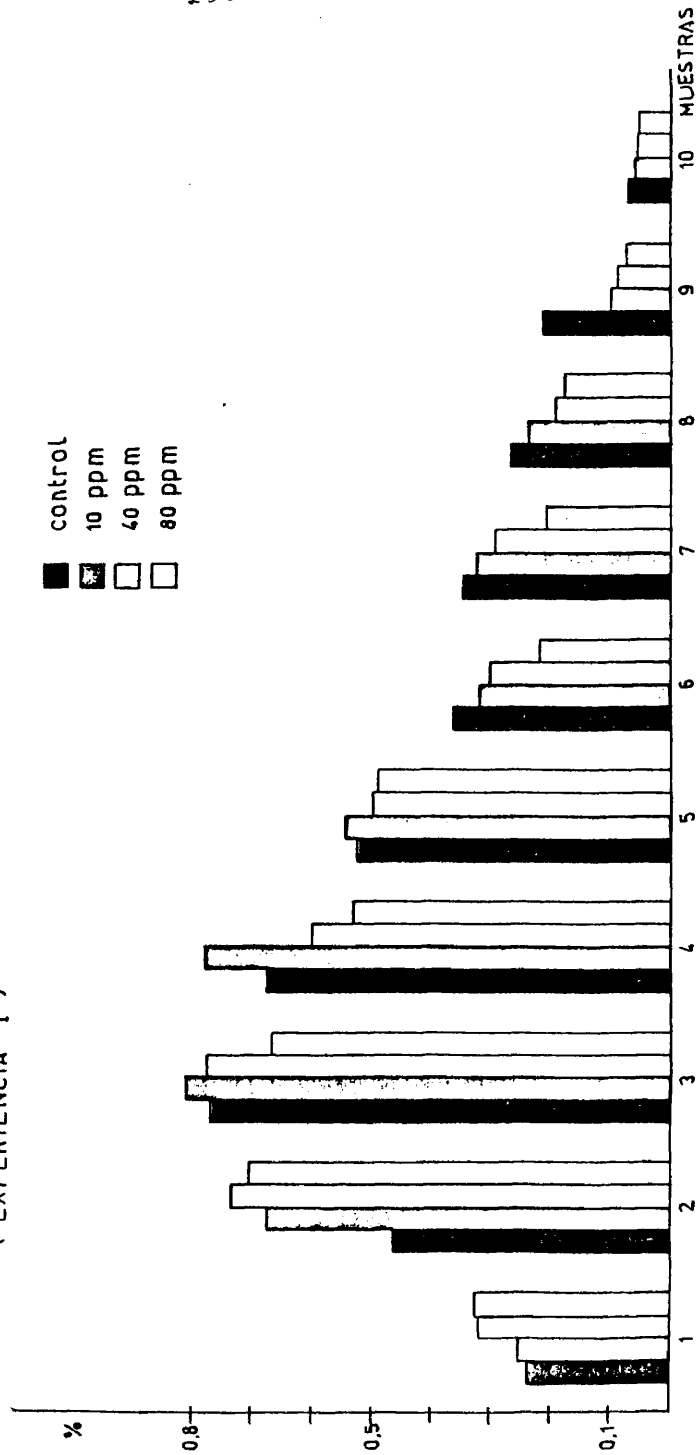


Fig - 28 CONTENIDO DE CLOROFILA a POR PLANTA
(EXPERIENCIA II)

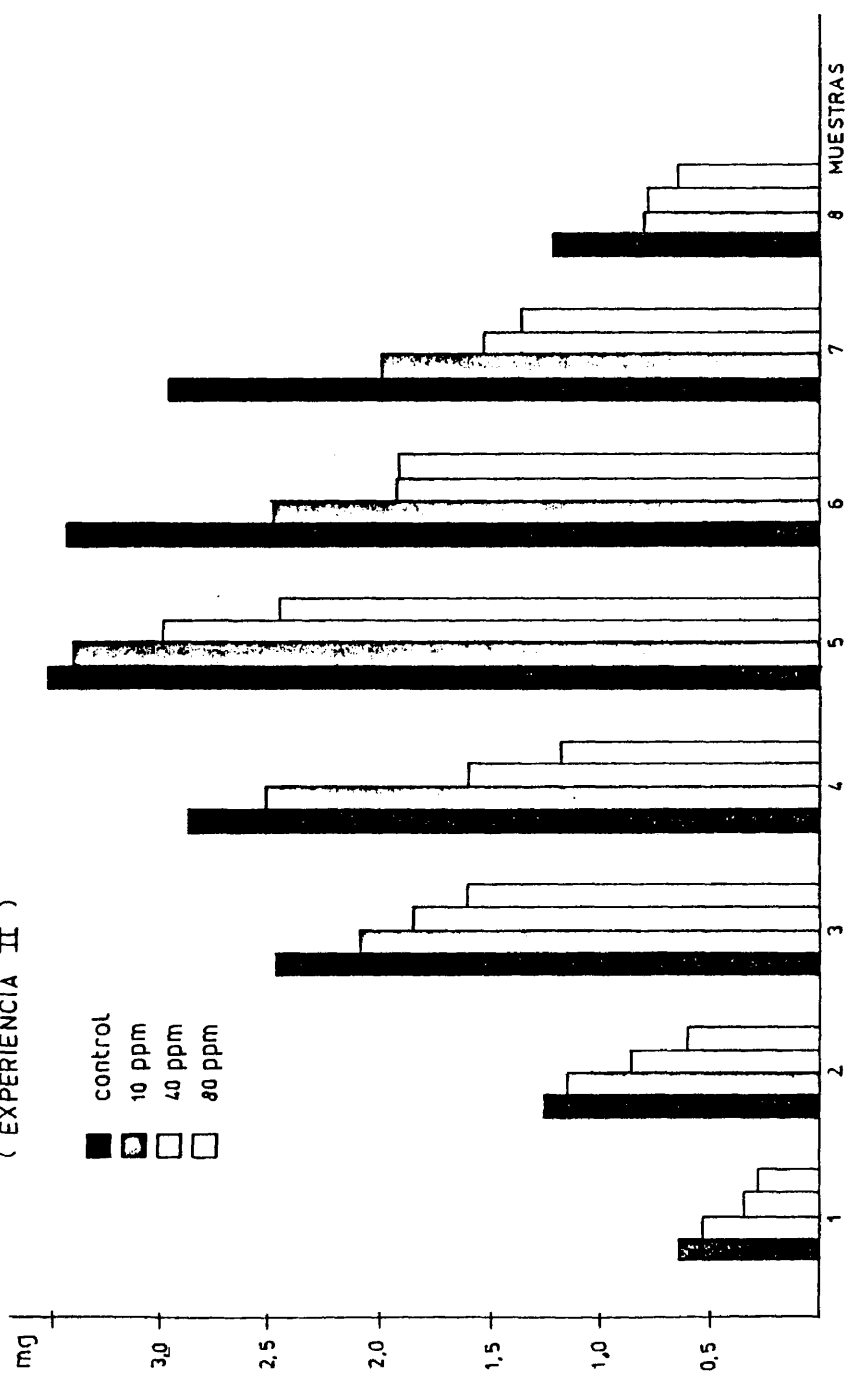


Fig -29 PORCENTAJE DE CLOROFILA a POR PLANTA

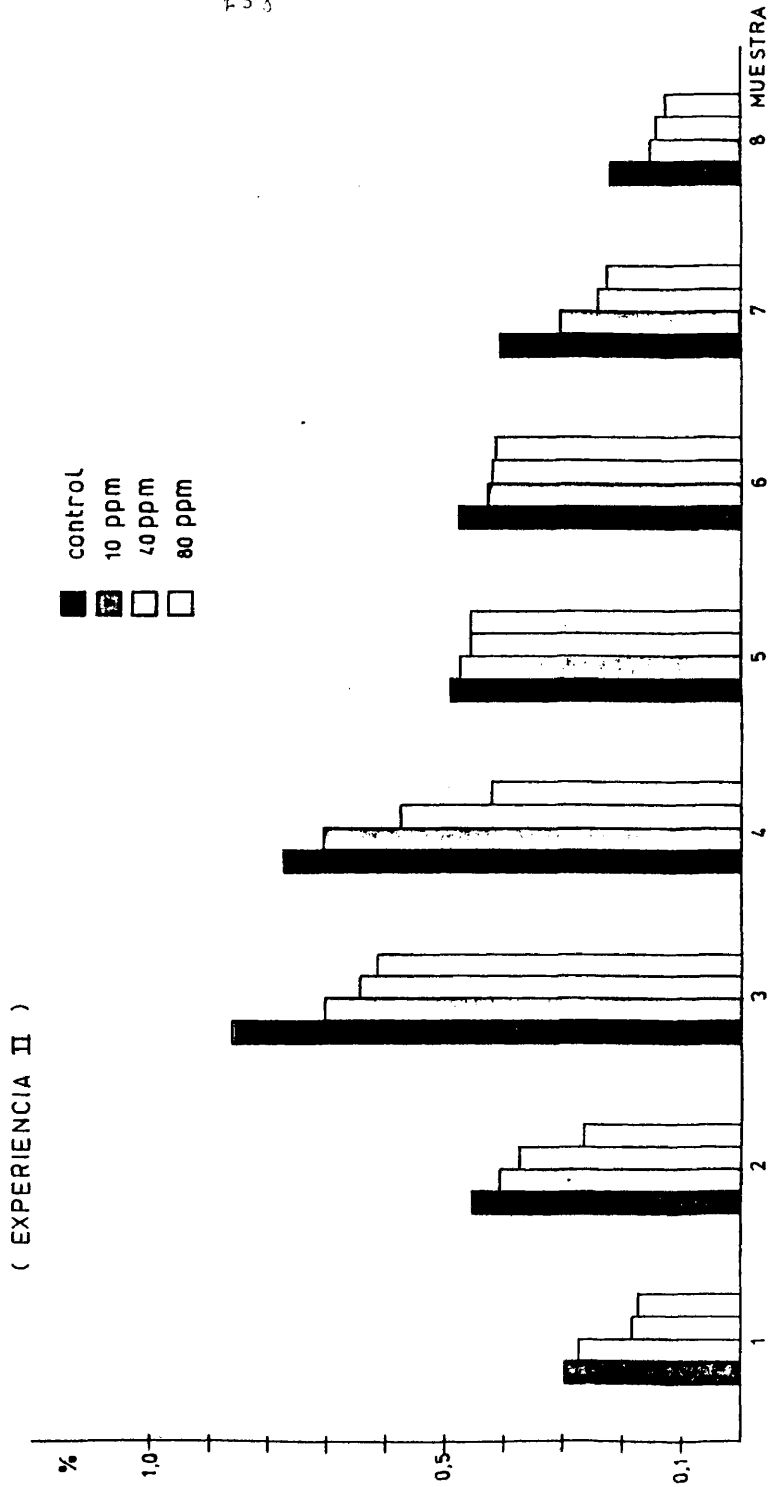


Fig-30 a
 CONTENIDO DE CLOROFILA a POR PLANTA
 (EXPERIENCIA III)

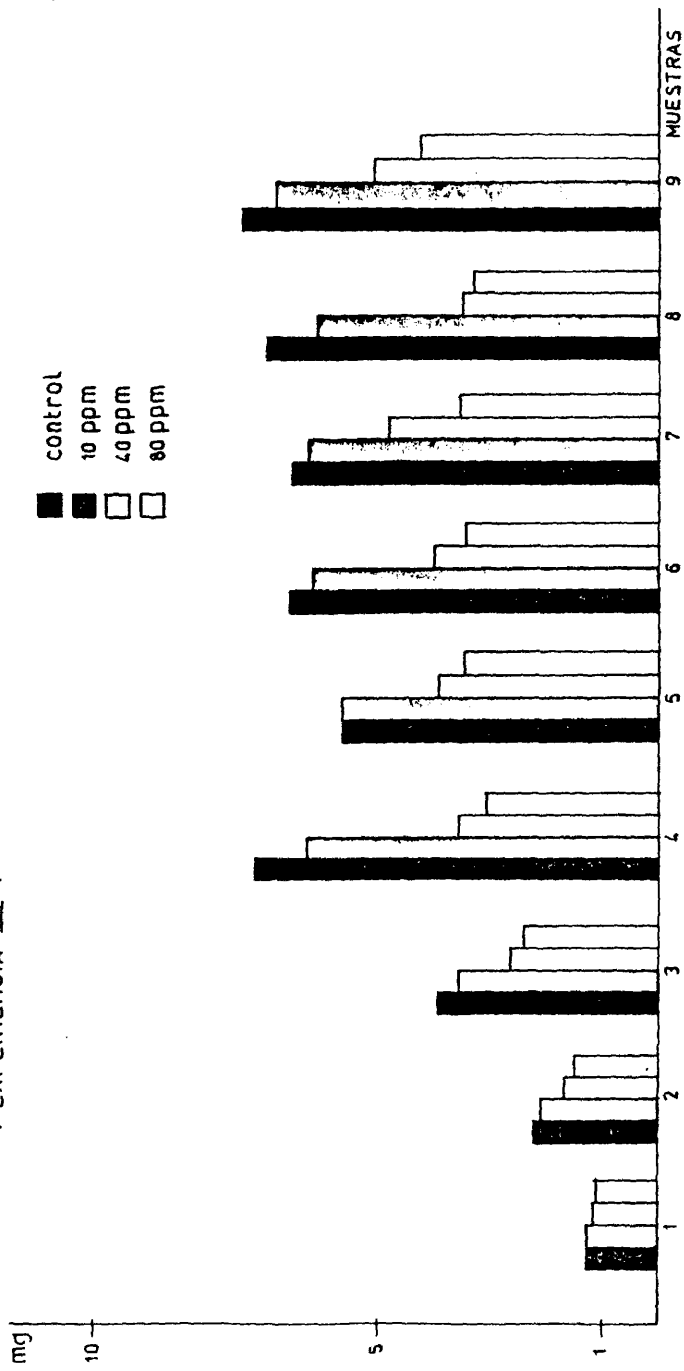


Fig-30 b
CONTENIDO DE CLOROFILA a POR PLANTA
(EXPERIENCIA III)

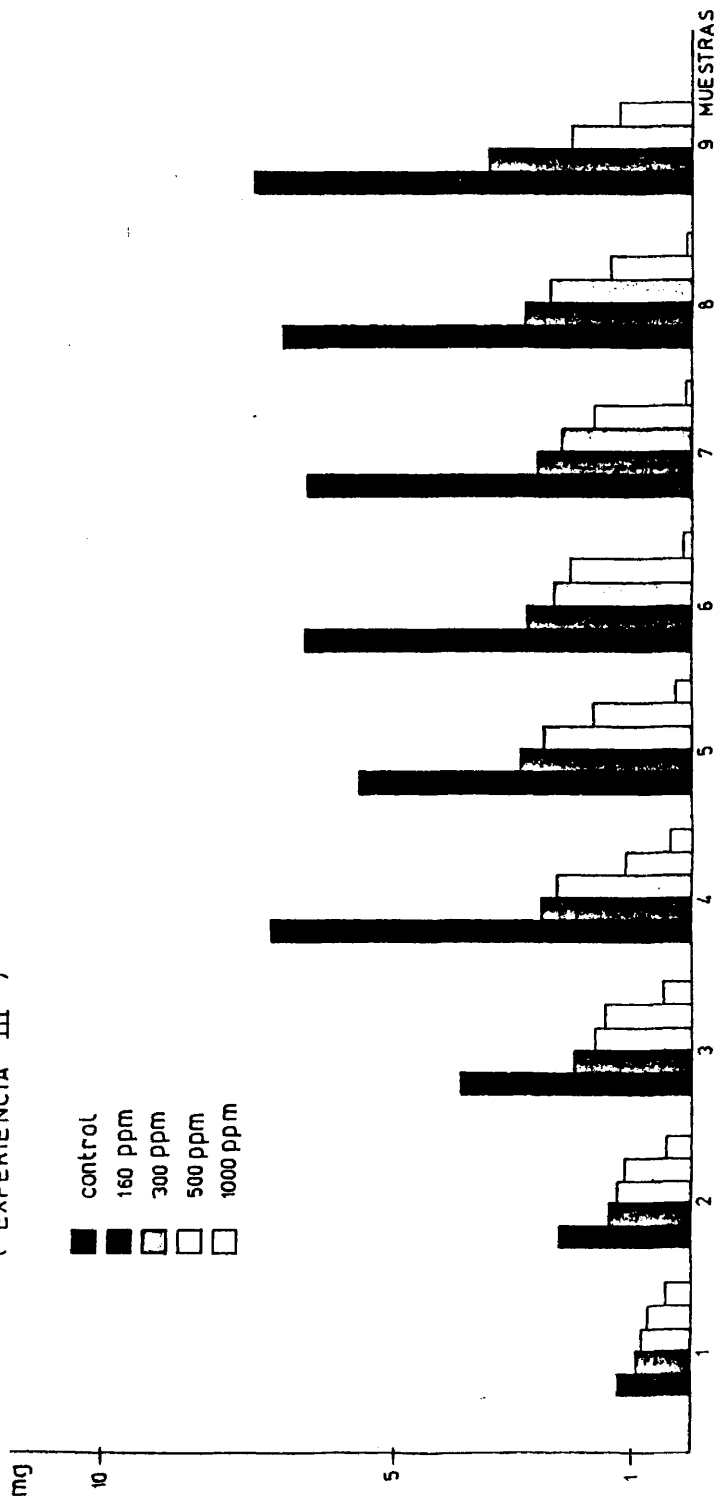


Fig - 31a
PORCENTAJE DE CLOROFILA a POR PLANTA
(EXPERIENCIA III)

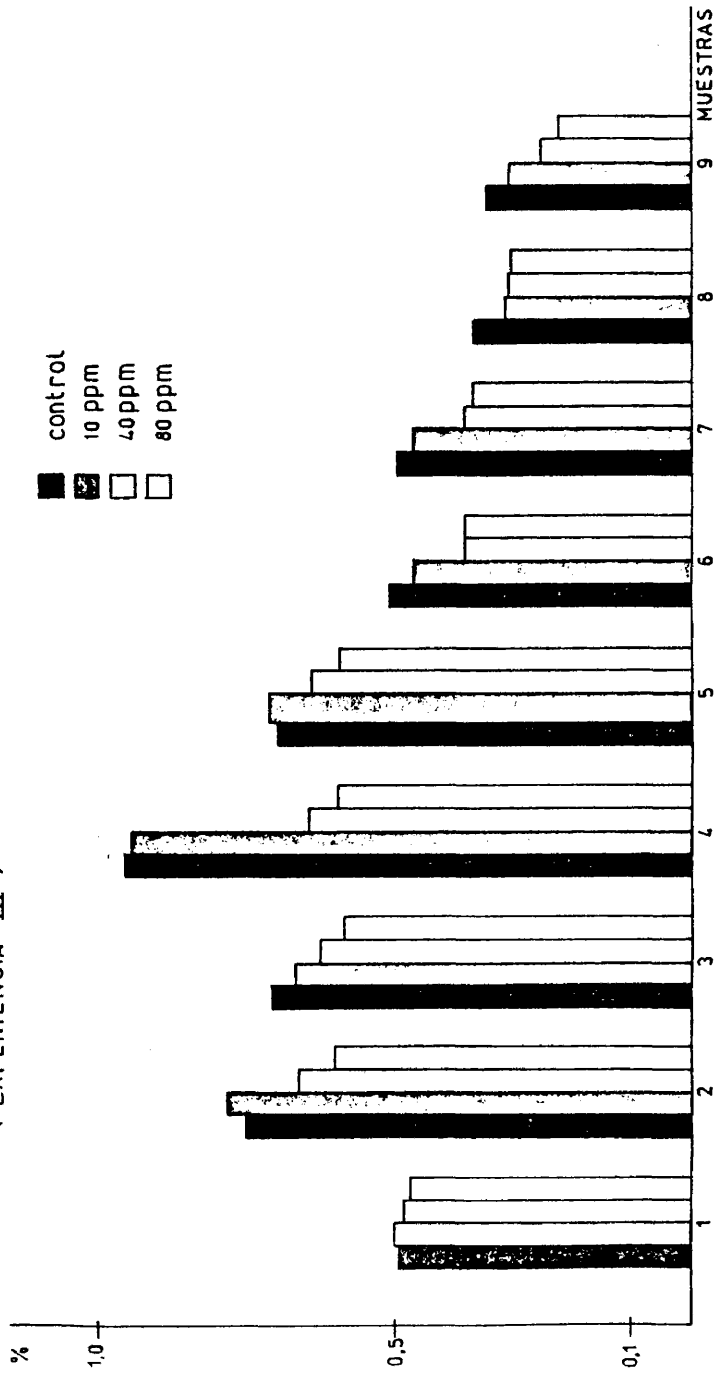


Fig-31b PORCENTAJE DE CLOROFILA a POR PLANTA

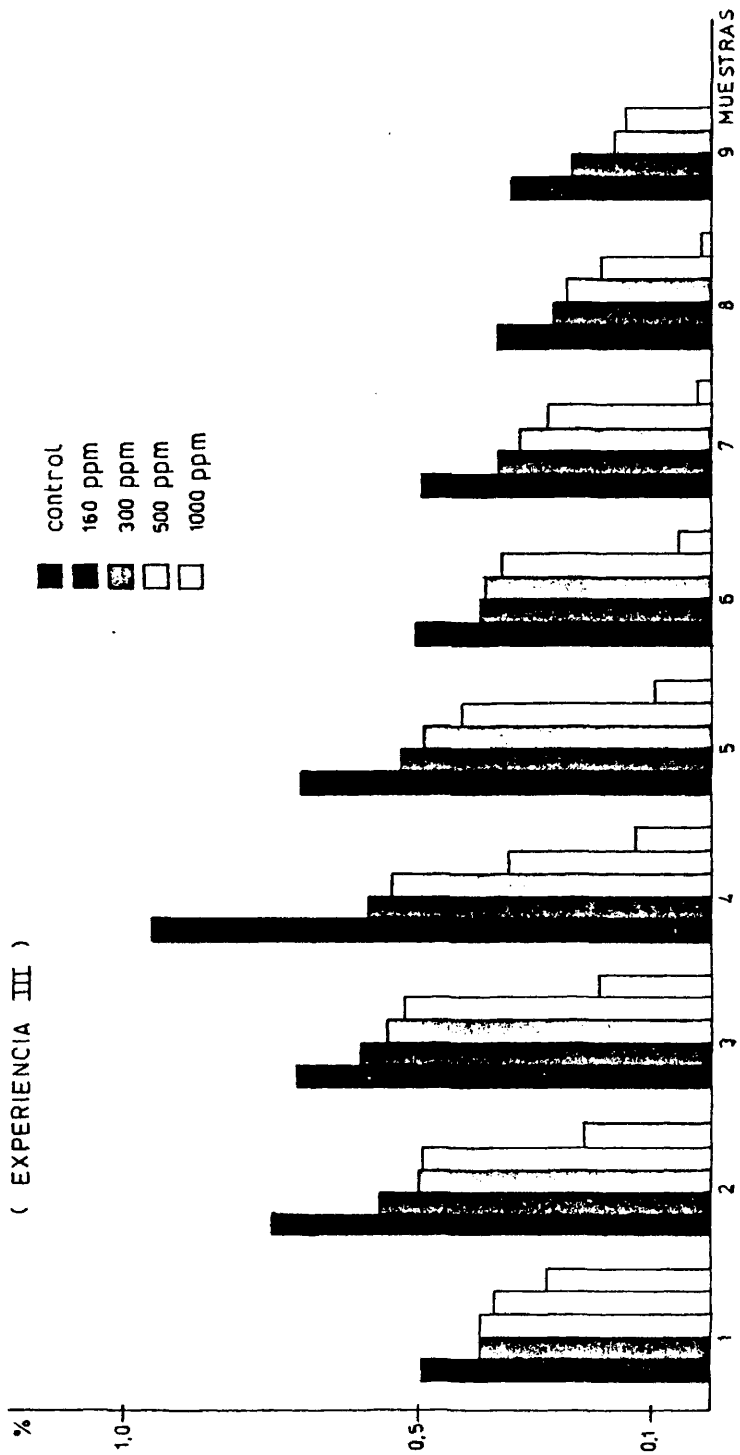


Fig -32 CONTENIDO DE CLOROFILA b POR PLANTA
(EXPERIENCIA I)

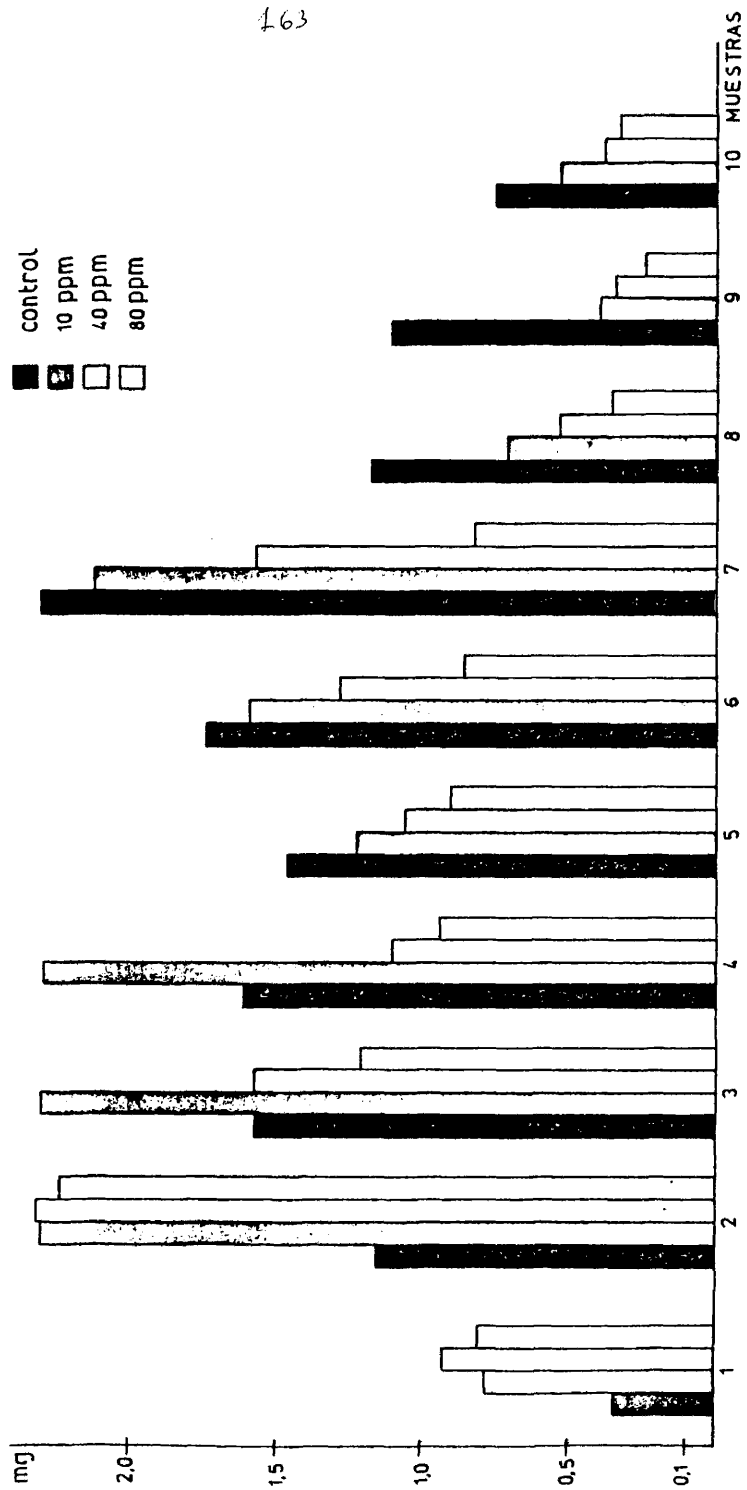


Fig -33 PORCENTAJE DE CLOROFILA b POR PLANTA
(EXPERIENCIA I)

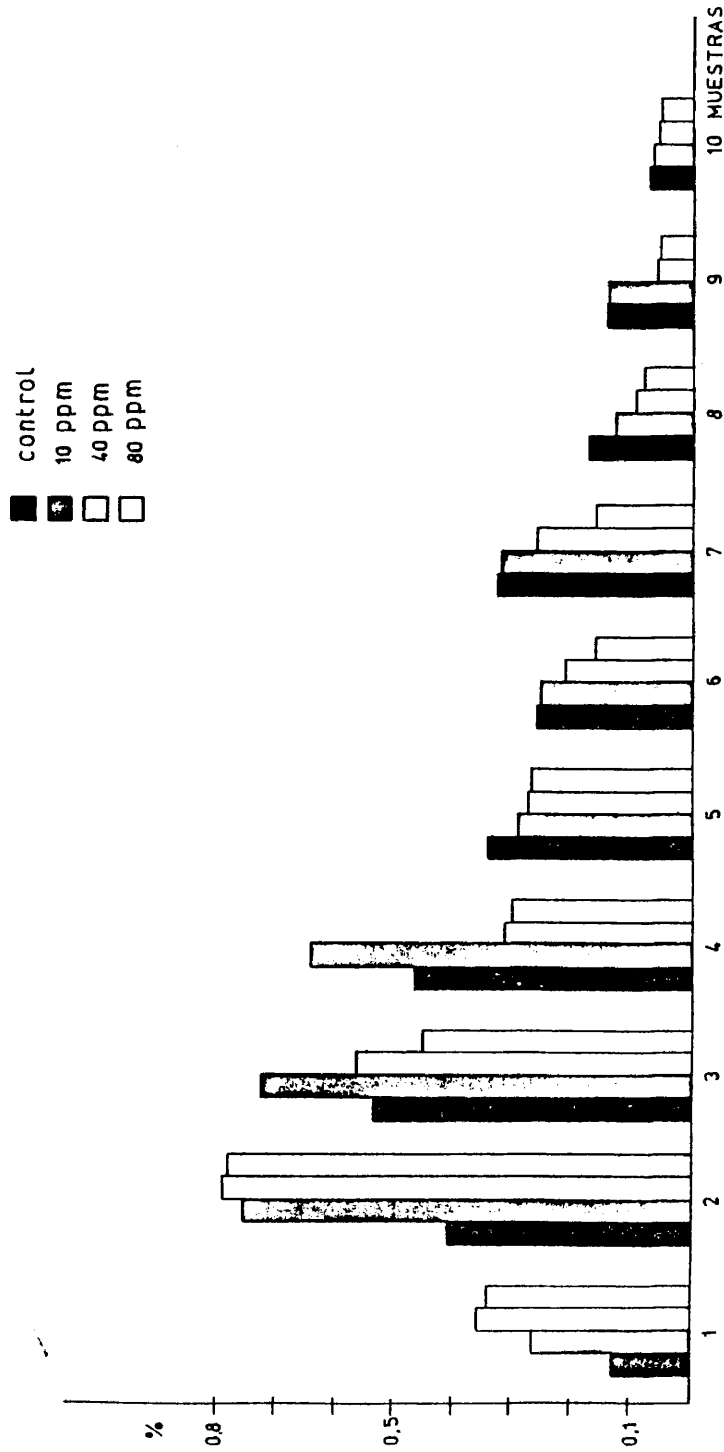


Fig - 34 CONTENIDO DE CLOROFILA b POR PLANTA
(EXPERIENCIA II)

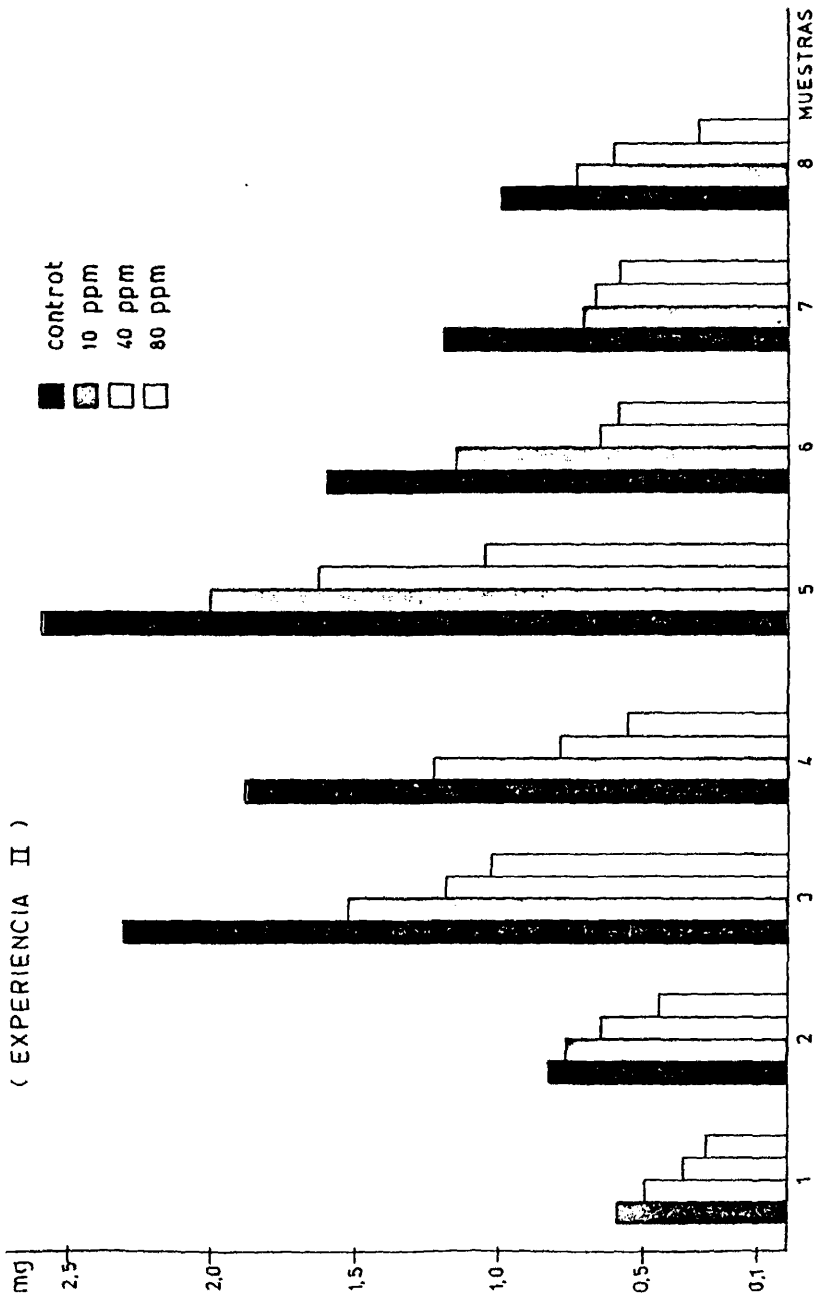


Fig -35 PORCENTAJE DE CLOROFILA b POR PLANTA
(EXPERIENCIA II)

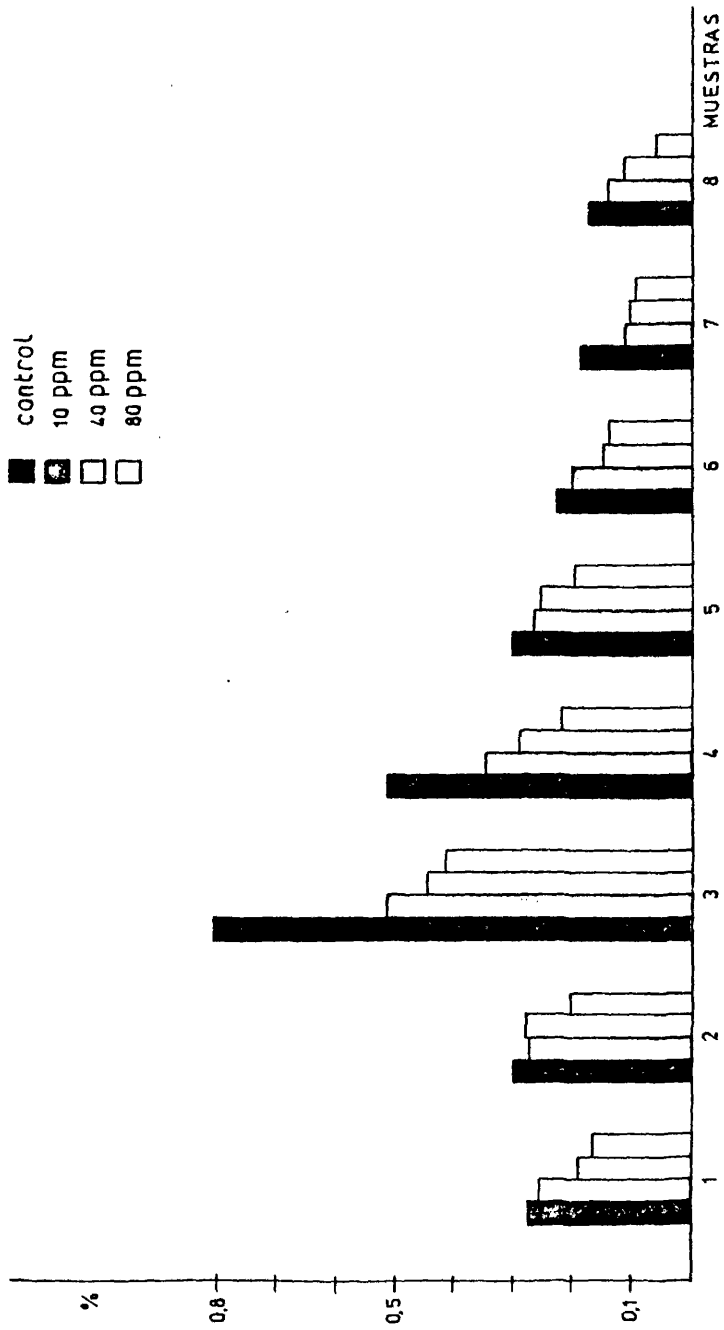
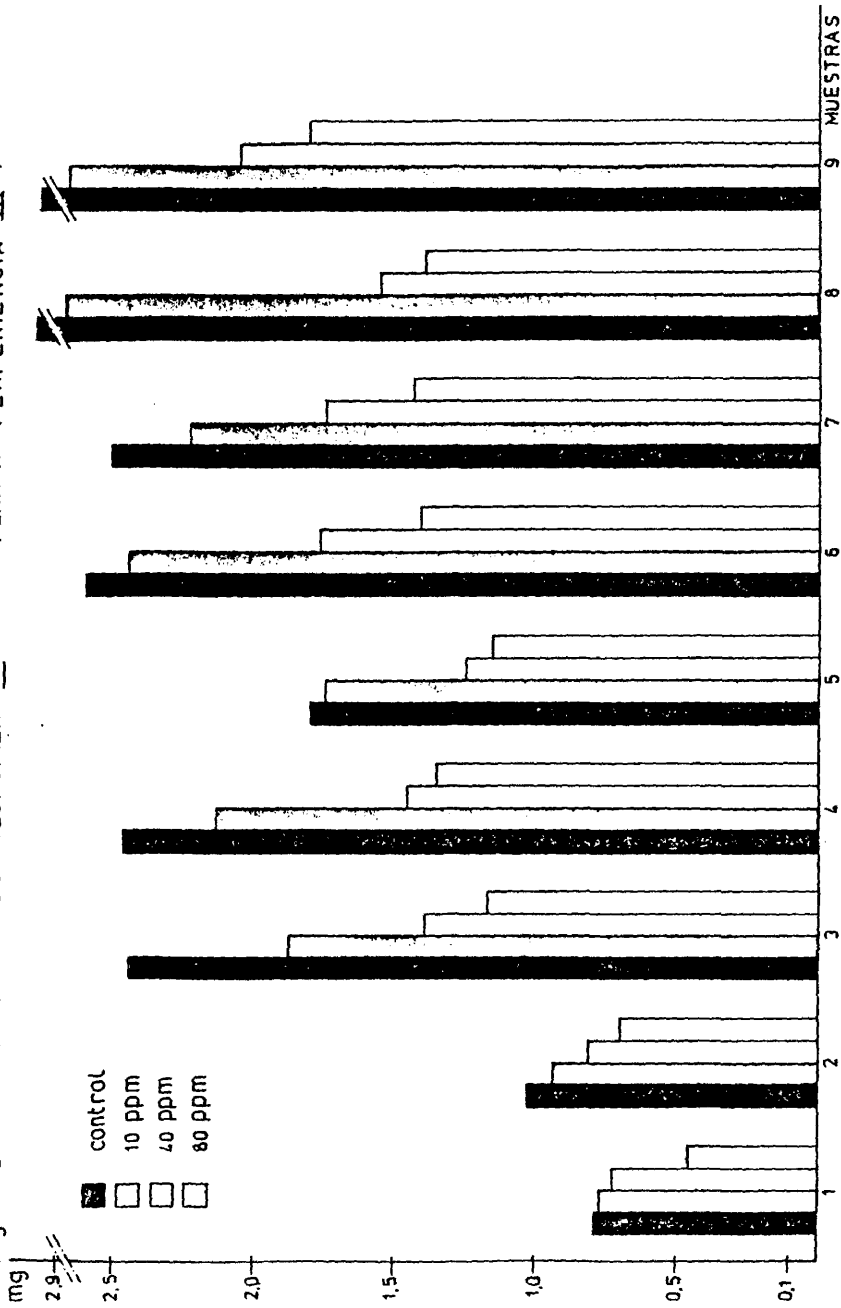


Fig-36a CONTENIDO DE CLOROFILA b POR PLANTA (EXPERIENCIA III)



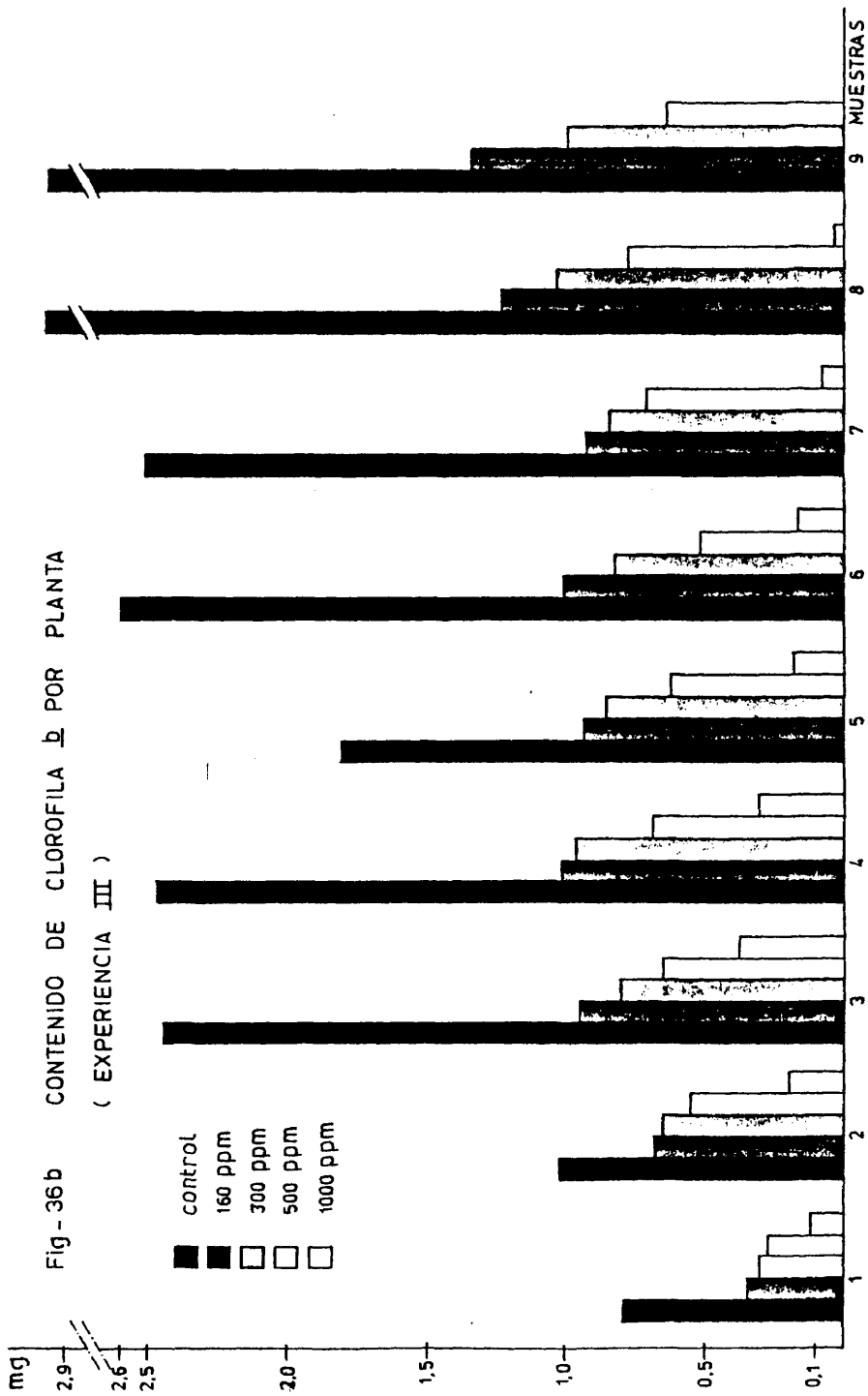


Fig-37 a PORCENTAJE DE CLOROFILA b POR PLANTA
(EXPERIENCIA III)

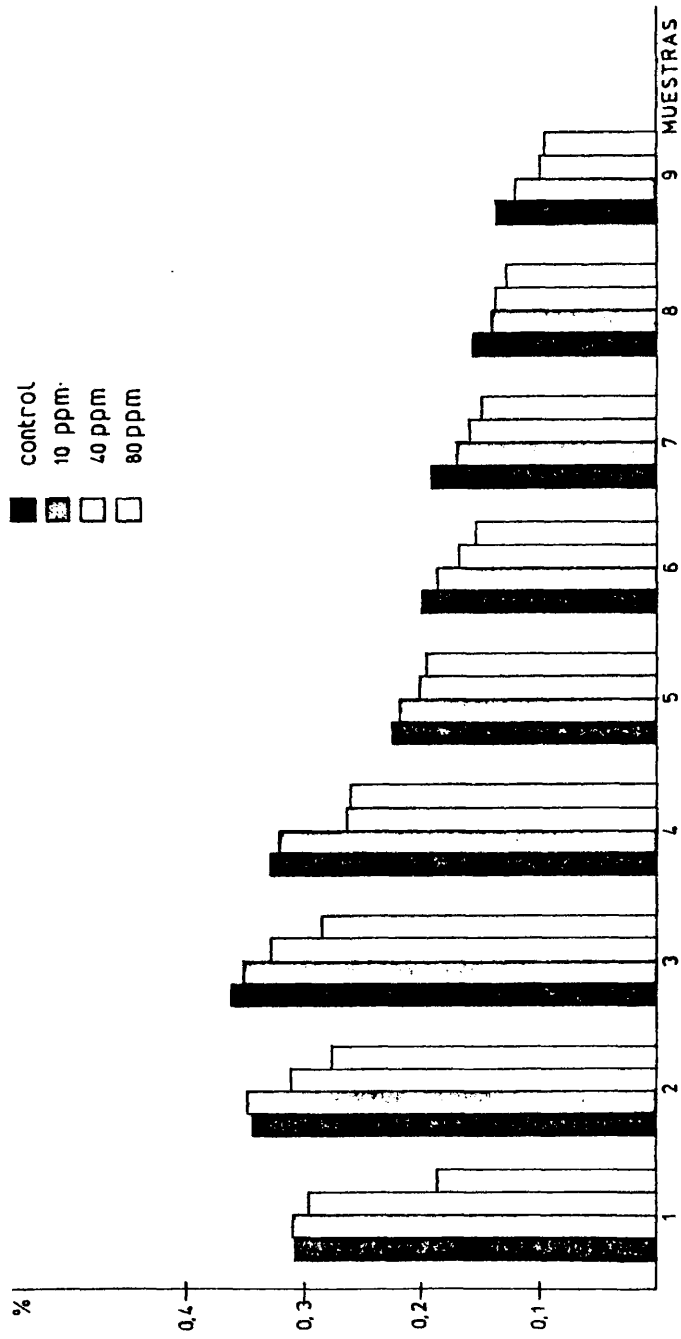


Fig-37 b PORCENTAJE DE CLOROFILA b POR PLANTA
(EXPERIENCIA III)

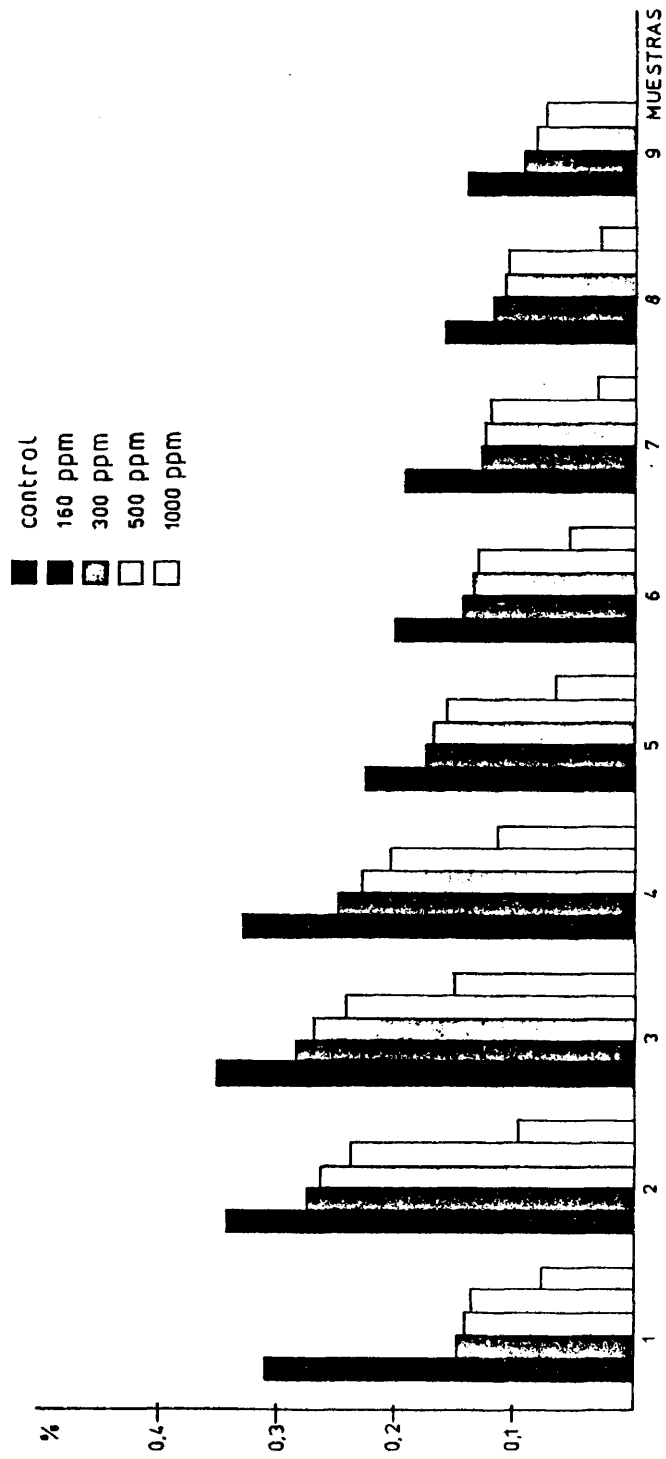


TABLA 46

Contenido de clorofila a, expresado en mg, en parte aérea de plantas de —
Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'6635	0'7638	0'9351	0'7716
2	1'3209	2'0361	2'1831	2'0196
3	2'2693	2'5786	2'1647	1'8061
4	2'3588	2'7718	2'1156	1'6702
5	2'2863	2'3200	1'9403	1'6185
6	2'4429	1'5849	1'7606	1'1702
7	2'4620	2'1336	1'7734	1'1346
8	1'8244	1'2828	1'0259	0'7607
9	1'6561	0'6235	0'4725	0'2821
10	0'6160	0'3907	0'3495	0'3606
Valor global	17'8802	16'8757	14'5907	11'5921

TABLA 47

Porcentaje de clorofila a, referido a peso seco, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'24	0'25	0'32	0'32
2	0'46	0'68	0'74	0'71
3	0'77	0'81	0'78	0'67
4	0'68	0'78	0'60	0'53
5	0'53	0'55	0'50	0'49
6	0'36	0'32	0'30	0'22
7	0'35	0'33	0'29	0'21
8	0'27	0'24	0'19	0'18
9	0'22	0'10	0'09	0'07
10	0'07	0'06	0'06	0'06
Valor global	3'95	4'12	3'87	3'46

TABLA 48

Contenido de clorofila a, expresado en mg, en parte aérea de plantas de —
Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'6353	0'5269	0'3488	0'2920
2	1'2492	1'1560	0'8616	0'6032
3	2'4636	2'0881	1'8532	1'6015
4	2'8347	2'5010	1'5846	1'1697
5	3'4883	3'3604	2'9230	2'4350
6	3'3904	2'4649	1'8999	1'9807
7	2'9462	1'9777	1'5293	1'3423
8	1'2177	0'8169	0'7941	0'6358
Valor global	18'2254	14'8913	11'7945	9'9602

TABLA 49

Porcentaje de clorofila a, referido a peso seco, en parte aérea de plantas -
de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm
1	0'30	0'28	0'18	0'17
2	0'45	0'41	0'37	0'27
3	0'86	0'70	0'65	0'62
4	0'77	0'71	0'58	0'42
5	0'50	0'48	0'46	0'46
6	0'48	0'44	0'43	0'42
7	0'46	0'31	0'25	0'23
8	0'22	0'16	0'15	0'13
Valor global	4'04	3'49	3'07	2'72

TABLA 50

Contenido de clorofila a , expresado en mg, de las plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con --
diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	1'2735	1'2613	1'1963	1'1609	0'9316	0'8586	0'7399	0'4561
2	2'2335	2'1172	1'7030	1'5275	1'4210	1'2620	1'1434	0'4410
3	3'9360	3'5907	2'6510	2'4225	2'10103	1'6698	1'4465	0'4832
4	7'1370	6'2640	3'5860	3'0970	2'5590	2'3105	1'1566	0'3410
5	5'6432	5'6512	3'9400	3'4731	2'9050	2'5232	1'6977	0'2729
6	6'5720	6'1550	4'0050	3'4607	2'8205	2'3947	2'0970	0'1344
7	6'5211	6'2481	4'9100	3'5890	2'6670	2'2360	1'6795	0'0983
8	6'9650	6'0937	3'5200	3'3150	2'9251	2'4497	1'3755	0'0246
9	7'4260	6'8130	5'1020	4'2590	3'4860	2'0700	1'2525	-
Valor global	47'7123	44'1952	30'5133	26'2746	21'6255	17'7635	12'5886	2'2415

TABLA 51
 Porcentaje de clorofila a, referido a peso seco de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con -
 diversas concentraciones de Mn.
 (Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	0'4967	0'5037	0'4373	0'4751	0'3946	0'3957	0'3699	0'2917
2	0'7502	0'7971	0'6630	0'6057	0'5677	0'5050	0'4952	0'2162
3	0'7094	0'6679	0'6273	0'5995	0'6019	0'5571	0'5373	0'1934
4	0'9544	0'9462	0'6479	0'5973	0'5876	0'5495	0'3452	0'1305
5	0'7040	0'7144	0'6449	0'5923	0'5366	0'4985	0'4296	0'1004
6	0'5100	0'4705	0'3932	0'3838	0'3978	0'3896	0'3621	0'0594
7	0'4996	0'4729	0'3367	0'3710	0'3698	0'3310	0'2854	0'0279
8	0'3701	0'3197	0'3143	0'3073	0'2716	0'2516	0'1993	0'0222
9	0'3488	0'3093	0'2549	0'2283	0'2425	0'1711	0'1565	-
Valor global	5'3432	5'1913	4'4094	4'1503	3'9701	3'6491	3'1704	1'0307

TABLA 52

Contenido de clorofila b, expresado en mg, en parte aérea de plantas de —
Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'3537	0'7895	0'9337	0'8065
2	1'1608	2'3065	2'3134	2'2377
3	1'5689	2'3044	1'5690	1'2167
4	1'6059	2'2970	1'1020	0'9413
5	1'4712	1'2335	1'0668	0'9057
6	1'7458	1'5910	1'2857	0'8594
7	2'3154	2'1258	1'5705	0'9227
8	1'1855	0'7109	0'5193	0'3663
9	1'1176	0'4011	0'3582	0'2529
10	0'7586	0'5105	0'3832	0'3312
Valor global	13'2834	14'2702	11'1023	9'7404

TABLA 53

Porcentaje de clorofila b, referido a peso seco, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'13	0'26	0'36	0'34
2	0'41	0'77	0'79	0'78
3	0'53	0'73	0'56	0'45
4	0'46	0'65	0'32	0'30
5	0'34	0'29	0'27	0'27
6	0'26	0'26	0'22	0'16
7	0'33	0'33	0'26	0'15
8	0'17	0'13	0'10	0'09
9	0'14	0'06	0'06	0'06
10	0'08	0'07	0'06	0'06
Valor global	2'85	3'55	3'00	2'66

TABLA 54

Contenido de clorofila b, expresado en mg, en parte aérea de plantas de —
Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm
1	0'5955	0'4958	0'3616	0'2925
2	0'8208	0'7617	0'6468	0'4530
3	2'3166	1'5397	1'1926	1'0399
4	1'8671	1'1985	0'7929	0'5564
5	2'1090	1'8946	1'5800	1'0578
6	1'6148	1'1294	0'6651	0'5923
7	1'2116	0'6977	0'6786	0'5854
8	0'9267	0'7161	0'5654	0'2953
Valor global	11'4621	8'4335	6'4730	4'8529

TABLA 55

Porcentaje de clorofila b, referido a peso seco, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm
1	0'28	0'26	0'19	0'17
2	0'30	0'27	0'28	0'20
3	0'81	0'52	0'45	0'42
4	0'51	0'34	0'29	0'22
5	0'30	0'27	0'25	0'20
6	0'23	0'20	0'15	0'13
7	0'19	0'11	0'11	0'10
8	0'17	0'14	0'11	0'06
Valor global	2'79	2'11	1'83	1'50

TABLA 56

Contenido de clorofila b, expresado en mg, de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	0'7512	0'7762	0'7316	0'4627	0'3485	0'3062	0'2725	0'1240
2	1'0250	0'9401	0'8094	0'6993	0'6961	0'6595	0'5454	0'1995
3	2'4443	1'9937	1'3908	1'1784	0'9516	0'9005	0'6463	0'3744
4	2'4617	2'1369	1'4554	1'3585	1'0826	0'9613	0'6837	0'3005
5	1'3036	1'7459	1'2462	1'1564	0'9393	8'9499	0'6173	0'1775
6	2'5929	2'4556	1'7662	1'4011	1'0117	0'9205	0'5139	0'1606
7	2'5062	2'2472	1'7467	1'4359	0'9210	0'3457	0'7063	0'0724
8	2'9662	2'6781	1'5565	1'3916	1'2326	1'0336	0'7715	0'0314
9	2'9460	2'6550	2'0540	1'9030	1'3380	0'9960	0'6030	-
Valor global	19'5371	17'5197	12'7563	10'9859	9'5114	7'2692	5'3603	1'4403

TABLA 57

Porcentaje de clorofila b, referido a peso seco de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con -
diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	0'3086	0'3100	0'2990	0'1394	0'1476	0'1411	0'1362	0'0766
2	0'3443	0'3495	0'3152	0'2769	0'2741	0'2639	0'2362	0'0978
3	0'3513	0'3502	0'3291	0'2968	0'2949	0'2671	0'2401	0'1499
4	0'3292	0'3228	0'2642	0'2621	0'2496	0'2296	0'2041	0'1146
5	0'2248	0'2207	0'2040	0'1972	0'1735	0'1679	0'1562	0'0653
6	0'2012	0'1877	0'1690	0'1554	0'1427	0'1344	0'1300	0'0507
7	0'1920	0'1701	0'1593	0'1497	0'1277	0'1252	0'1201	0'0315
8	0'1576	0'1405	0'1390	0'1292	0'1195	0'1067	0'1062	0'0283
9	0'1394	0'1205	0'1026	0'0966	0'0939	0'0815	0'0737	-
Valor global	2'2474	2'1720	1'9904	1'7433	1'6114	1'5164	1'4028	0'6147

TABLA 53

Relación clorofila a / clorofila b en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	1'88	0'56	0'89	0'95
2	1'13	0'88	0'94	0'90
3	1'44	1'12	1'37	1'43
4	1'47	1'20	1'92	1'78
5	1'55	1'89	1'91	1'73
6	0'71	1'24	1'37	1'36
7	1'06	1'00	1'13	1'38
8	1'63	1'80	1'96	2'05
9	1'49	1'55	1'30	1'12
10	0'81	0'76	0'92	1'09
Valor global	13'17	12'40	13'61	13'89

TABLA 59

Relación clorofila a, / clorofila b, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	1'0744	1'0705	0'9651	1'0366
2	1'5118	1'4912	1'3278	1'3222
3	1'0674	1'3666	1'5691	1'5579
4	1'5029	2'0369	2'0099	2'1110
5	1'3476	1'6655	1'7885	2'3043
6	2'1142	2'1419	2'8993	3'2077
7	2'4588	2'7586	2'2829	2'2953
8	1'2802	1'1207	1'3208	2'0576
Valor global	12'3573	13'6519	14'1634	15'8926

TABLA 60

Relación clorofila a/ clorofila b de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	1'6090	1'6250	1'6352	2'5087	2'6732	2'8040	2'7152	3'6782
2	2'1790	2'2521	2'1040	2'1874	2'0711	1'9136	2'0864	2'2105
3	1'6103	1'9062	1'9061	2'0557	2'1125	2'0859	2'2391	1'2906
4	2'8892	2'9313	2'4639	2'2797	2'3637	2'4035	1'6917	1'1347
5	3'1316	3'2368	3'1616	3'0034	3'0927	2'9688	2'7502	1'5375
6	2'5346	2'5069	2'2676	2'4700	2'7979	2'9064	2'2948	0'7572
7	2'6020	2'7904	2'7533	2'4796	2'8959	2'6439	2'3762	1'2196
8	2'3481	2'2754	2'2615	2'3821	2'2920	2'3577	1'7829	0'7834
9	2'5207	2'5561	2'4839	2'3622	2'6054	2'0994	2'0771	-
Valor global	21'4351	20'1740	21'0376	21'7273	22'8943	22'1832	20'0226	12'6117

TABLA 61

Contenido de clorofila total, expresado en mg, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	1'0172	1'5533	1'7698	1'5781
2	2'4817	4'3426	4'4965	4'2573
3	3'8382	4'8830	3'7337	3'0228
4	3'9647	5'0698	3'2176	2'6115
5	3'7575	3'5535	3'0071	2'5242
6	4'1887	3'5759	3'0463	2'0296
7	4'7774	4'2594	3'3439	1'9573
8	3'0099	1'9937	1'5457	1'1270
9	2'7737	1'0246	0'8307	0'5350
10	1'3746	0'9012	0'7327	0'6917
Valor global	31'1836	31'1560	25'7230	20'3345

TABLA 62

Porcentaje de clorofilas totales referido a peso seco, en parte aérea de —
plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn
(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'37	0'52	0'68	0'66
2	0'97	1'44	1'53	1'49
3	1'31	1'54	1'34	1'12
4	1'14	1'43	0'91	0'93
5	0'87	0'94	0'77	0'76
6	0'63	0'78	0'52	0'39
7	0'68	0'65	0'55	0'36
8	0'44	0'37	0'29	0'27
9	0'36	0'16	0'14	0'12
10	0'14	0'12	0'11	0'12
Valor global	6'81	7'95	6'84	6'12

TABLA 63

Contenido de clorofila total, expresado en mg, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	1'2308	1'0227	0'7104	0'5749
2	2'0700	1'9177	1'5094	1'0620
3	4'7802	3'6279	3'0358	2'6414
4	4'7018	3'6995	2'3775	1'7261
5	5'5973	5'2550	4'5030	3'4928
6	5'0052	3'5943	2'5650	2'4630
7	4'1578	2'6748	2'2079	1'9277
8	2'1444	1'5330	1'3595	0'9311
Valor global	29'6975	23'3248	18'2675	14'8190

TABLA 64

Porcentaje de clorofila total, referido a peso seco, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'57	0'53	0'37	0'34
2	0'76	0'68	0'65	0'47
3	1'67	1'22	1'15	1'06
4	1'29	1'06	0'87	0'69
5	0'72	0'76	0'72	0'66
6	0'71	0'64	0'57	0'55
7	0'65	0'42	0'36	0'33
8	0'40	0'30	0'27	0'19
Valor global	6'77	5'61	4'96	4'28

TABLA 65
 Contenido de clorofilas totales, expresado en mg, en plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con
 diversas concentraciones de Mn.
 (Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	90 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	2'0647	2'0375	1'9279	1'6235	1'2901	1'1643	1'0124	0'5901
2	3'2595	3'0573	2'5124	2'2258	2'1071	1'9215	1'6888	0'6405
3	6'3903	5'4744	4'0418	3'6009	2'9619	2'4703	2'0923	0'9576
4	9'5987	9'4009	5'0414	4'4555	3'6416	3'2713	1'8403	0'6415
5	7'4518	7'3971	5'1862	4'6295	3'8443	3'3731	2'3150	0'4504
6	9'1649	8'6116	5'7712	4'3618	3'8322	3'2052	2'6108	0'2950
7	9'0273	9'4953	6'5567	4'9949	3'5990	3'0817	2'3863	0'1607
8	9'9312	9'7719	5'0765	4'3066	4'0577	3'4873	2'1470	0'0560
9	10'3720	9'4690	7'1560	6'0620	4'9240	3'0560	1'9555	-
Valor global	67'2494	61'7139	43'2701	36'7605	30'1369	25'0317	17'9489	3'6918

TABLA 66

Porcentaje de clorofilas totales, referido a peso seco de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn. (Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	0'9053	0'9137	0'7853	0'6645	0'5422	0'5369	0'5059	0'3593
2	1'0945	1'1365	0'9783	0'8825	0'8418	0'7639	0'7314	0'3140
3	0'9170	1'0177	0'9564	0'9763	0'8869	0'8242	0'7774	0'3433
4	1'2936	1'2690	0'9079	0'9596	0'8362	0'7791	0'5493	0'2447
5	0'9298	0'9350	0'8489	0'7995	0'7101	0'6663	0'5959	0'1657
6	0'7112	0'6592	0'5522	0'5392	0'5405	0'5250	0'4509	0'0931
7	0'6916	0'6430	0'5990	0'5207	0'4975	0'4562	0'4055	0'0699
8	0'5277	0'4602	0'4533	0'3999	0'3901	0'3592	0'2955	0'0504
9	0'4971	0'4293	0'3575	0'3250	0'3356	0'2527	0'2650	-
Valor global	7'4463	7'3631	6'4379	5'9571	5'1508	5'1664	4'5666	1'6394

4.5. CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN LAS PLANTAS

La fracción global de los carotenoides muestra un curso más difícil de interpretar que la variación, comentada anteriormente, de las clorofilas. En el grupo de experiencias en que la fuente nitrogenada es la fijación simbiótica del N_2 (Experiencias I y II), las diferencias no parecen ser muy marcadas, incluso para las dos variantes de alto contenido en hierro (Tabla 67 y 68) o la de bajo contenido del mismo (Tabla 69 y 70).

En cambio, se han obtenido diferencias más claras en las plantas crecidas con nitrato como única fuente de nitrógeno (Tablas 71 y 72) que, paradójicamente, muestran valores incrementados de carotenoides, tanto en contenido total en planta como referido a peso seco de la misma, en las plantas crecidas en exceso de manganeso respecto a las control. Sólo en los casos extremos, como en las últimas muestras de las plantas suministradas con 1000 ppm de manganeso, que ya se hallaban en franca regresión, los valores descienden. Para la experiencia III, la respuesta en los niveles de carotenoides en planta frente al exceso de manganeso representa un mecanismo diferencial frente a la respuesta negativa de las clorofilas.

TABLA 67

Contenido de carotenoides expresado en mg, en parte aérea de plantas de -
Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'4081	0'5148	0'4493	0'3365
2	0'6270	0'6603	0'6169	0'6081
3	0'9392	1'0141	0'8637	0'7155
4	0'9038	1'0334	0'7398	0'6588
5	0'8602	0'7206	0'6206	0'4588
6	1'0714	0'9274	0'8343	0'5785
7	1'1453	0'8721	0'7204	0'4526
8	0'8345	0'5365	0'5304	0'3360
9	0'6867	0'3114	0'2374	0'1799
10	0'4477	0'2938	0'2572	0'1719
Valor global	7'9205	6'8844	5'868	4'4966

TABLA 68

Porcentaje de carotenoides, referido a peso seco, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia I)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'15	0'17	0'17	0'14
2	0'22	0'22	0'21	0'20
3	0'32	0'32	0'31	0'21
4	0'26	0'29	0'21	0'21
5	0'20	0'17	0'16	0'14
6	0'16	0'15	0'14	0'11
7	0'16	0'13	0'12	0'08
8	0'12	0'10	0'10	0'08
9	0'09	0'05	0'04	0'04
10	0'04	0'04	0'04	0'03
Valor global	1'72	1'64	1'50	1'29

TABLA 69

Contenido de carotenoides, expresado en mg, en parte aérea de plantas de —
Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'4669	0'3465	0'1923	0'1871
2	0'4333	0'3753	0'3419	0'3092
3	0'7269	0'7772	0'9248	0'6002
4	0'5732	0'7118	0'9001	0'4309
5	1'3048	1'2461	1'1599	0'9735
6	1'2635	0'9197	0'9561	0'7328
7	1'1134	0'7613	0'7081	0'6533
8	0'9231	0'7420	0'6152	0'6296
Valor global	6'9051	5'9799	5'4993	4'5165

TABLA 70

Porcentaje de carotenoides, referido a peso seco, en parte aérea de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con diversas concentraciones de Mn.

(Experiencia II)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm
1	0'22	0'18	0'10	0'11
2	0'16	0'13	0'15	0'13
3	0'25	0'26	0'31	0'24
4	0'16	0'20	0'29	0'17
5	0'18	0'18	0'18	0'18
6	0'18	0'16	0'19	0'14
7	0'17	0'12	0'11	0'11
8	0'17	0'11	0'12	0'12
Valor global	1'49	1'34	1'45	1'20

TABLA 71

Contenido de carotenoides, expresado en mg, de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas con ---
diversas concentraciones de Mn.
(Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 ppm	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	0'3433	0'3513	0'4065	0'4072	0'3943	0'3216	0'2299	0'1893
2	0'6639	0'6305	0'6086	0'6325	0'6508	0'5005	0'2655	0'2629
3	1'2037	0'9731	0'8025	0'8111	0'7679	0'3391	0'3010	0'2306
4	1'2630	1'1267	1'0678	1'0221	0'8797	0'5092	0'4204	0'2963
5	0'6025	0'7009	0'5663	0'7752	0'9121	0'9197	0'9556	0'6401
6	0'4394	0'8543	0'9852	1'0404	0'8614	1'0665	1'0499	0'0766
7	0'3759	0'4399	0'5432	0'5995	0'6224	0'6909	0'5979	0'0964
9	0'2992	0'3641	0'3007	0'5493	0'5471	0'5052	0'7737	0'0196
9	0'4253	0'4643	0'6384	1'2329	0'9931	0'7143	0'7201	-
Valor global	5'6167	5'9056	5'3942	7'0702	6'5298	5'5665	4'3574	1'5917

TABLA 72
 Porcentaje de carotenoides, referido a peso seco de plantas de Phaseolus vulgaris cultivadas -
 con diversas concentraciones de Mn.
 (Experiencia III)

Muestra	Control	10 ppm	40 ppm	80 pp.m	160 ppm	300 ppm	500 ppm	1000 ppm
1	0'1339	0'1403	0'1656	0'1667	0'1670	0'1482	0'1144	0'1169
2	0'2230	0'2344	0'2370	0'2509	0'2600	0'2003	0'1150	0'1289
3	0'1730	0'1809	0'1899	0'1974	0'2299	0'1129	0'1118	0'0923
4	0'1699	0'1702	0'1905	0'1972	0'2020	0'1211	0'1255	0'1132
5	0'0751	0'0886	0'0927	0'1322	0'1500	0'1817	0'2165	0'2355
6	0'0341	0'0653	0'0847	0'1154	0'1215	0'1747	0'1913	0'0242
7	0'0288	0'0333	0'0500	0'0625	0'0863	0'1008	0'1016	0'0419
8	0'0159	0'0191	0'0340	0'0510	0'0826	0'0519	0'1065	0'0177
9	0'0200	0'0211	0'0319	0'0661	0'0691	0'0591	0'0379	-
Valor global	0'9727	0'9532	1'0763	1'2393	1'3394	1'1506	1'1567	0'7682

4.6. DISCUSION GENERAL

De nuestros resultados aparecen una serie de hechos que son correlacionables entre si. El exceso de manganeso en la planta resulta tóxico a partir de cierto nivel crítico superior que se hace ostensible claramente y de una forma cada vez más acumulativa en la planta. Esta sintomatología incluye fundamentalmente la presencia de manchas o puntos parduzcos de tinte rojizo en hojas, tallos y peciolo inferiores inicialmente que va sucesivamente progresando hasta alcanzar las hojas jóvenes más superiores. En éstas aparece una típica clorosis intervenal tanto más intensa cuanto mayor sea el aporte de manganeso a la planta.

Los niveles de manganeso e hierro en planta dan a entender la posible presencia de un fenómeno de antagonismo de ambos iones, incluso ya a nivel de la absorción o, también, del transporte, como se deduce de los valores diferenciales del contenido de ambos elementos en raíz y parte aérea. Nuestros resultados indican más bien una escasa movilidad del manganeso y hacen difícil interpretar únicamente los síntomas de toxicidad como si fueran debidos a una deficiencia de hierro, pues, aunque con mayor retraso, también se presentan en las plantas crecidas con alto suministro de hierro. No obstante, el incremento de manganeso en planta disminuye los niveles de hierro en las distintas alturas de la planta.

La acción tóxica del manganeso en las proteínas de la planta puede relacionarse con su efecto detrimento sobre la nodulación, ya que este efecto específico sobre las proteínas es muy superior en la raíz que en la parte aérea y resulta ser proporcional al incremento de la concentración de manganeso en la planta y a la reducción de la nodulación.

.../...

Las acciones ejercidas sobre el crecimiento por dosis tóxicas de manganeso podrían muy bien actuar, en gran parte, por su efecto perricioso sobre los pigmentos fotosintéticos y, por ende, sobre el rendimiento del aparato fotosintético y la productividad de la planta. Este hecho es esencialmente ostensible en las clorofilas, tanto para la clorofila a como para la b y, en cambio, es menos claro, o al menos aparentemente más ambiguo, sobre los carotenoides. En todo caso es de destacar el hecho diferencial del incremento en los carotenoides por efecto del exceso de manganeso en las plantas crecidas en un medio cuyo aporte nitrogenado son los nitratos, en lugar de la fijación simbiótica del N_2 atmosférico. Este hecho se nos muestra por el momento difícilmente explicable.

La acción diferencial, en la primera mitad del ciclo vegetativo de algunas concentraciones en ligero exceso de manganeso en planta en el contenido de clorofilas, mayor que para las plantas control en altos valores de hierro frente a las crecidas en bajos valores, podría atribuirse, además de al posible mecanismo de antagonismo en la absorción o en el transporte, en la participación del hierro como cofactor de la biosíntesis de las clorofilas en la planta, lográndose así un mejor balance relativo entre cadena de biosíntesis.

Un hecho destacable es que el incremento de hierro, a pesar de su posible acción beneficiosa sobre la nitrogenasa y de su efecto antagónico para el manganeso, no sólo no mejora los niveles de proteína en planta, sino que incluso los perjudica ostensiblemente, sobre todo en la segunda mitad del ciclo de desarrollo de las plantas (estado de floración).

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

=====

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

- 1) El aporte suplementario de manganeso se traduce en un incremento acumulativo del mismo en las plantas. Estos incrementos internos del manganeso van unidos a un descenso de valores para el hierro en la planta, de forma que cada vez se alcanzan valores superiores en la relación — Mn/Fe.
- 2) Para un suministro dado de manganeso a la planta, los valores internos de manganeso difieren en los distintos órganos de ella. Las raíces presentan valores muy superiores a la parte aérea y en ésta los niveles — ascienden progresivamente desde las hojas viejas basales a las hojas — jóvenes superiores.
- 3) El nivel nutriente crítico para la aparición en las plantas de Phaseolus vulgaris de síntomas externos visibles de toxicidad por exceso de manganeso es aproximadamente de 3000 ppm en raíz y de 1000 ppm en la — parte aérea. Independientemente de la concentración de manganeso suministrado por la solución nutritiva, todas las plantas muestran síntomas externos claros de toxicidad cuando, por efecto acumulativo, se — llega a estos valores.
- 4) Los síntomas externos de toxicidad por manganeso que se han manifestado en nuestras experiencias con Phaseolus vulgaris son: puntos pardo—negruzcos de tinte rojizo en tallos, peciolo y hojas viejas inferiores. Puede seguirse la progresión del manganeso hacia arriba sucesivamente por los tallos, peciolo y nerviaciones de las hojas que se os—

.../...

carecen de una manera muy característica por la presencia de estas pun-
tuaciones. Otros síntomas engloban ya necrosis y en las hojas jóvenes,
en una fase posterior, clorosis intervenal que puede llegar a ser muy
intensa en las concentraciones mayores y un típico arrugamiento del —
haz foliar.

- 5) El estudio de los niveles sucesivos en planta del manganeso y en los —
distintos pisos de la parte aérea (hojas viejas-tallo-hojas jóvenes) —
indica una escasa movilidad en planta para el manganeso, lo que retra-
sa la aparición de los síntomas de toxicidad, sobre todo para las con-
centraciones no muy elevadas de manganeso.
- 6) Las distintas concentraciones en exceso de manganeso en la solución —
nutritiva no han alterado la capacidad germinativa de las semillas, —
pero si pronto se establecen diferencias en el crecimiento de las plan-
tas cultivadas a mayores concentraciones de manganeso. Esta reducción
del crecimiento en muchos casos es superior al 50 % y en las plantas —
cultivadas en 1000 ppm de manganeso resulta totalmente letal, de forma
que cuando las plantas control alcanzan la floración aquellas mueren —
en su totalidad.
- 7) A excepción de las plantas cultivadas en 1000 ppm, que murieron, el —
resto de variantes de 10, 40, 160, 300 y 500 ppm de manganeso en el —
medio nutritivo no modificó el tiempo de inicio de la floración, pero
si su intensidad que fué decreciendo cada vez más hasta apenas no ocu-
rrir para 500 ppm.
- 8) Igualmente significativas fueron las diferencias en la intensidad y —
tamaño de frutos, con valores muy parecidos para las plantas control y
las cultivadas en 10 y 40 ppm de manganeso y diferencias muy señaladas

.../...

cada vez mayores sobre todo a partir de 160 ppm de manganeso.

- 9) El exceso de manganeso en planta reduce los niveles de proteína, tanto más cuanto mayor sea el suministro de manganeso. Las raíces se ven más afectadas que la parte aérea. Igualmente se reduce la nodulación de la simbiosis Phaseolus vulgaris-Rhizobium phaseolii. Lógicamente ambos hechos están íntimamente relacionados.
- 10) El manganeso en exceso en planta muestra toxicidad en los niveles de pigmentos fotosintéticos, muy clara para las clorofilas a y b, tanto en valores en planta como en los porcentajes referidos a peso seco. No se trata, pues, de un efecto indirecto que al afectar al crecimiento disminuya correspondientemente a los niveles de clorofilas en planta, sino que incluso cabe pensar que el descenso de clorofilas afecte la productividad fotosintética y, por ende, al crecimiento de la planta.
- 11) La fracción global de los carotenoides no muestra resultados tan significativos. No obstante, las plantas crecidas con suministro de nitratos como fuente nitrogenada no sólo no presentan reducción en los niveles de carotenoides, sino incluso muestran un ligero incremento de los mismos respecto a las plantas control.
- 12) Los efectos de la toxicidad del exceso de manganeso en Phaseolus vulgaris son más tolerados, en general, si las plantas reciben un suministro más elevado de hierro. Cabe pensar más bien en una interrelación Mn-Fe a nivel de la absorción o del transporte, tal como sugieren los niveles en planta de algunas fracciones analizadas, más que en una sustitución de funciones entre ambos elementos.
- 13) El suministro de nitratos como fuente de nitrógeno para las plantas, -

.../...

comparado con la nutrición por fijación simbiótica del N_2 atmosférico, en general, disminuye la aparición de síntomas de toxicidad del manganeso y de reducción del crecimiento en las plantas de Phaseolus vulgaris. No obstante, otras fracciones, como los carotenoides, se ven incrementadas.

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

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

- 1) ADAMS, F. and WEAR, J.I.: Manganese toxicity and soil acidity in relation to crinkle leaf of cotton. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 21, 205-308 (1957).
- 2) AGARWALA, S.C.: Absorption, translocation and utilization of iron and molybdenum in plants. Final Rep. US P.L. Proj. A7-SWC-75 (1977).
- 3) AGARWALA, S.C., BISHT, S.S., SHARMA, C.P.: Relative effectiveness of certain heavy metals in producing toxicity and symptoms of iron deficiency in barley. Can. J. Bot. 55, 1299-1307 (1977).
- 4) AMBERGER, A.: Die Rolle des Mangans in Stoffwechsel der Pflanzen. IX Simposio Internazionale di Agrochimica su "La nutrizione oligominerale". Punta Ala di Castiglione della Pescaia 165-182, 2-6 oct. (1972).
- 5) AMBERGER, A.: The role of manganese in the metabolism of plants. Agrochimica 17, 69-83 (1973).
- 6) AMESZ, J. and DUYSSSENS, L.N.M.: Primary and Associated Reactions of System II 149-185. En: Primary Processes of Photosynthesis. J. Barber, edit. Elsevier, Amsterdam (1977).
- 7) ANDREES, K.: Auswirkung von Mn-Mangel und -Überschuss auf die Makro- und Mikromorphologie von Solanum tuberosum L.

- Arch. Acker- und Pflanzenb. und Bodenk. 15, 805-813 (1971).
- 8) ANDREW, C.S., HEGARTY, M.P.: Comparative responses to manganese excess of eight tropical and four temperate pasture legume species. Aust. J. Agric. Res. 20, 637-696 (1969).
- 9) ANDREW, C.S., PIETERS, W.H.J.: Manganese toxicity symptoms of one temperate and seven tropical pasture legumes. Tech. Pap. Div. Trop. Pastures 4, 2-8 (Trop. Abstr. 1971, No 377) (1970).
- 10) ANDREW, C.S., JOHNSON, A.D., SANDLAND, R.L.: Effect of aluminium on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. Aust. J. Agric. Res. 24, 325-339 (1973).
- 11) ANDREW, C.S., PIETERS, W.H.J.: Foliar symptoms of mineral disorders in Glycine wightii. CSIRO Aust. Div. Trop. Agron. Tech. Pap. 18, 1-12 (1976).
- 12) ARNON, D.I. and STOUT, P.R.: The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. Plant Physiol. 14, 371-375 (1939).
- 13) ARNON, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24, 1-15 (1949).
- 14) ARNTZEN, C.J. and BRIANTAIS, J.M. Eds: Bioenergetics of Photosynthesis. Edit. Govindjee 55-113. Academic Press, New York (1975).

- 15) BARANOWSKA, H., EJCHART, A. and PUTRAMENT, A.: Manganese mu tagenesis in yeast. V On mutation and conversion induction in nuclear DNA. Mutat. Res. 42, 343-345 (1977).
- 16) BARCELO, J., RUANO, A. y POSCHENRIEDER, CH.: Algunos efectos del Pb y Zn sobre el crecimiento y contenido de pigmentos liposolubles de Phaseolus vulgaris. III Reunión Nacional de la Soc. Esp. de Fisiología Vegetal. Granada 37-38 (1978).
- 17) BARCELO, J., POSCHENRIEDER, CH. y RUANO, A.: Algunos efectos del Cr y Mn sobre el crecimiento y contenido de pigmentos liposolubles de Pisum sativum, Phaseolus vulgaris y Solanum lycopersicum. III Reunión Nacional de la Soc. Esp. de Fisiología Vegetal. Granada 39-40 (1978).
- 18) BARCELO COLL, J.: Fotomorfogénesis, 397-444. En: Biología celular y molecular. C. Vicente (coord.) Blume. Madrid (1979)
- 19) BEATON, J.D.: Fertilizer methods and applications to forestry practice. Forest Fert. Symp. Proc., USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. NE-3, 55-71 (1973).
- 20) BEEVERS, L. and HAGEMAN, R.H.: Nitrate reduction in higher Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 495-522 (1969).
- 21) BELHANAFI, A. et COLLET, F.: Modalités de l'innibition de la croissance et de la synthèse des acides nucléiques des plantules de blé par l'acide abscissique. Physiol. Plant. 23, 859-870 (1970).

- 22) BENAC, R.: Response of a sensitive (Arachis hypogaea) and a tolerant (Zea mays) species to different concentrations of manganese in the environment. Cahiers Orstom. Biologie 11, 43-51 (1976).
- 23) BENAC, R.: Effect of manganese concentration in the nutrient solution on groundnuts (Arachis hypogaea). Oleagineux. 31, 539-543 (1976).
- 24) BERG, W.A., VOGEL, W.G.: Toxicity of acid coal-mine spoils to plants. En: Ecology and Reclamation of Disturbed Lands. Edit. R.J. Hutnik, G. Davis 1, 57-68. Gordon and Breach. New York (1973).
- 25) BEATT, K.C., VAISHNAV, P.P., SINGH, Y.D., CHINYOY, J.J.: Reversal of gibberelic acid-induced inhibition of root growth by manganese. Biochem. Physiol. Pflanz. 170, 453-455 (1976).
- 26) BONNER, J. and VARNER, J.E.: The path of carbon in respiratory metabolism. En: Plant Biochemistry. J. Bonner y J.E. Varner eds. Academic Press. New York, 213-230 (1965).
- 27) BORNER, C.: Manganese toxicity in tobacco. Soil Sci. 39, 15-33 (1935).
- 28) BOWEN, J.E.: Manganese silicon interaction and its effect on growth of sudan grass. Plant Soil 37, 577-588 (1972).
- 29) BRADFIELD, E.G.: Chemical Interferences in the Determination of Manganese in Plant Material by atomic-absorption Spectroscopy. Analyst. 99, 403-407 (1974).

- 30) BREMNER, J.M. and KNIGHT, A.H.: The complexes of zinc, copper and manganese present in ryegrass. *Brit. J. Nutr.* 24, 279-290 (1970).
- 31) BREMNER, I.: Heavy-metal toxicities. *Q. Rev. Biophys.* 7, 75-124 (1974).
- 32) BROWN, J.C. and JONES, W.E.: Heavy metal toxicity in plants. 1 A crisis in embryo. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6, 421-438 (1975).
- 33) BROWN, J.C. and JONES, W.E.: Manganese and iron toxicities dependent on soybean variety. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 8, 1-15 (1977).
- 34) BRYAN, J.K.: Amino Acid Biosynthesis and Its Regulation 525-560. In: *Plant Biochemistry*. Edit. J. Bonner and J.E. Varner. Academic Press. New York (1975).
- 35) BURGHARDT, H.: Beiträge zum Eisen-Mangan-Antagonismus der Pflanzen. *Flora* 143, 1-30 (1955).
- 36) BUSSLER, W.: Manganese toxicity in higher plants. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* 81, 225-241 (1958).
- 37) BUSSLER, W.: Manganvergiftung bei höheren Pflanzen. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* 81, 256-265 (1958).
- 38) CHAPMAN, H.D. and KELLEY, W.P.: The mineral nutrition of citrus. *The Citrus Industry*. Ed. H.J. Webber and Batchelor vol. 1, 719-756. Los Angeles (1943).

- 39) CHENG, B.T.: Dynacims of soil manganese. *Agrochimica* 17, 84-95 (1973).
- 40) DANIEL, J.W. and BALDWIN, H.H.: *Methods in Cell Physiology* (D.M. Prescott). Academic Press. New York 1, 9-41 (1964).
- 41) DAVID, D.J.: Atomic absorption spectrochemical analysis of plant materials with particular reference to manganese and iron. *Atomic Absorption Newsletter*, N° 9, 1-6 (1962).
- 42) DAVIES, D.D.: The central role of phosphoenolpyruvate in Plant Metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, 131-158 (1979)
- 43) DÉNARIÉ, J. et TRUCHET, G.: La symbiose Rhizobium Légumineuses: rôles respectifs des partenaires. *Physiol. Vég.* 17, 643-667 (1979).
- 44) DENNIS, D.: Manganese toxicity in tomatoes. *N.Z. J. Agric.* 117, 118-119 (1968).
- 45) Dessureaux, L.: Heritability of tolerance to manganese toxicity in lucerne. *Euphytica* 8, 260-265 (1959).
- 46) DIECKERT, J.W., ROZACKY, E.: Isolation and partial characterization of manganin, a new manganoprotein from peanut seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 473-477 (1969).
- 47) DINER, B.A. and JOLIOT, P.: Oxygen Evolution and Manganese 187-205. En: *Encyclopedia of Plant Physiol. New Series. Vol. 5. Photosynthesis I.* Edit. A. Trebst and M. Avron. Springer Verlag. Berlin (1977).

- 48) DION, H.G. and MANN, P.J.G.: Trivalent manganese in soils. *J. Agric. Sci.* 36, 239-245 (1946).
- 49) DIONNE, J.L. and PESANT, A.R.: Effects of pH and water regime on the yield and Mn content of lucerne and birdsfoot trefoil grown in the glasshouse. *Can. J. Plant Sci.* 56, 919-928 (1976).
- 50) DOBEREINER, J.: Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in acid soils. *Plant Soil* 24, 153-166 (1966).
- 51) DOBY, G.: *Plant Biochemistry* p: 49. Interscience Publishers. John Wiley and Sons. London (1965).
- 52) DUDA, C.T.: Plant RNA polymerases. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 119-132 (1976).
- 53) EEMINK, A.H. and GARRETSEN, G.: Inheritance of insensitivity of lettuce to a surplus of exchangeable manganese in steam sterilized soils. *Euphytica* 26, 47-53 (1977).
- 54) EGGERT, D.A. and HAYDEN, R.A.: Histochemical relationship of manganese to internal bark necrosis of apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 95, 715-719 (1970).
- 55) ELLIOT, W.H.: Isolation of glutamine synthetase and glutamate transferase from green peas. *J. Biol. Chem.* 201, 661-672 (1953):
- 56) EPSTEIN, E.: *Mineral nutrition of Plants: Principles and perspectives*. John Wiley and Sons. New York (1972).

- 57) ERNST, W.H.O.: Physiology of heavy metal resistance in plants. Proc. Int. Conf. Heavy Metals in Environ. 2 (1), 121-136 (1977).
- 58) EVANS, L.T.: Flower induction and the florigen concept. Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 365-394 (1971).
- 59) EVANS, H.J.: Research experiences in plant physiology. T.C. Moore Springer-Verlag 1974 (1975).
- 60) FERGUS, I.F.: Manganese Toxicity in an Acid Soil. Queensland J. Agr. Sc. 11, 15-27 (1954).
- 61) FERREE, D.C., THOMPSON, A.H.: Internal bark necrosis of the apple as influenced by calcium placement and soil manganese. Univ. Maryland Agric. Exp. Stn. Bull. A-166 (1970).
- 62) FINN, I.J., NIELSON, K.F., DOW, B.K.: Effects of different soil moisture tensions on grass legume species. Can. J. Soil. Sci. 41, 16-23 (1961).
- 63) FLEMING, A.L., SCHWARTZ, J.W. and FOY, C.D.: Chemical factors controlling the adaptation of weeping love grass tall fescue acid mine. Spoils. Agronomy Journal 66, 715-719 (1974).
- 64) FLEMMING, G.A., PARLE, P.J.: Heavy metals in soils, herbage and vegetables from an industrialised area west of Dublin City. Irish Journal of Agricultural Research 15, 35-43 (1977).
- 65) FOLLEY, S.J. and GREENBAUM, A.L.: Determination of the argi

nase activities of homogenates of liver and mammary gland: Effects of pH and substrate concentration and specially of activation of divalent metal ions. *Biochem. J.* 43, 537-549 (1948).

- 66) FÜRSTNER, U. and WITTMANN, G.T.W.: Metal Pollution in the Aquatic Environment. Springer-Verlag. Berlin (1979).
- 67) FOY, C.D., FLEMING, A.L., ARMIGER, W.H.: Differential tolerance cotton varieties to excess manganese. *Agron. J.* 61, 690-694 (1969).
- 68) FOY, C.D., FLEMING, A.L., SCHWARTZ, J.W.: Opposite aluminum and manganese tolerance in two wheat varieties. *Agron. J.* 65, 123-126 (1973).
- 69) FOY, C.D., FLEMING, A.L.: The physiology of plant tolerance to excess available aluminium and manganese in acid soils. *Symp. on Crop Tolerance to Sub-optimal Land Conditions. ASA Meet., Houston (1975).*
- 70) FREIRE, J.R.: Inoculation of soybeans p 335-380. In: *Exploiting the Legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture.* Edit. J.M. Vincent, A.S. Whitney, J. Bose. Coll. Trop. Agric. Misc. Publ. 145. Dep. Agron. Soil Sci. Univ. Hawaii, Kahului, Maui, Hawaii (1977).
- 71) GALLAGHER, P.A.: Manganese toxicity in celery. *Nature* 216, 391-392 (1967).

- 72) GAUCH, H.G.: Inorganic Plant Nutrition. Dowden, Hutchinson and Ross Stroudsburg (1972).
- 73) GERLOFF, G.C.: Comparative mineral nutrition of Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 14, 107-124 (1963).
- 74) GRAVEN, E.H., ATTOE, O.J., SMITH, D.: Effects of liming and flooding on manganese toxicity in alfalfa. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 29, 702-706 (1965).
- 75) HALE, J.B. and HUNTZE, S.G.: Manganese toxicity affecting crops in acid Soils. Nature 157, 554 (1946).
- 76) HARRIMAN, A. and BARBER, J.: Photosynthetic Water-Splitting Process and Artificial Chemical Systems., 243-280. En: Photosynthesis in relation to model systems. J. Barber, edit. Elsevier. Amsterdam (1979).
- 77) HEENAN, D.P., CARTER, O.G.: Response of soya bean cultivars to manganese toxicity as affected by pH and calcium levels. Austr. J. Agric. Res. 26, 967-974 (1975).
- 78) HEENAN, D.P., CARTER, O.G.: Tolerance of soybean cultivars to manganese toxicity. Crop Sci. 15, 389-391 (1976).
- 79) HEENAN, D.P., CARTER, O.G.: Influence of temperature on the expression of temperature toxicities by soybean varieties. Plant Soil 47, 219-227 (1977).
- 80) HEINTZE, J.G.: Manganese phosphate reactions in aqueous systems and the effects of application of monocalcium phosphate

on the availability of manganese to oats in alkaline fan Soil. Plant Soil 24, 407-423 (1968).

- 81) HEWITT, E.J.: Relation of manganese and other metal toxicities to the iron status of plants. Nature 161, 489-490 (1948).
- 82) HEWITT, E.J.: Sand and Water Culture Methods used in the study of Plant Nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux. London (1966).
- 83) HEWITT, E.J. and SMITH, T.A.: Plant Mineral Nutrition. The English Universities Press. London (1975).
- 84) HEWITT, E.J., HUCKLESBY, D.P. and NOTTON, B.A.: Nitrate Metabolism 633-682. En: Plant Biochemistry. Edit. J. Bonner and J.E. Varner. Academic Press. New York (1976).
- 85) HIATT, A.J. and RAGLAND, J.L.: Manganese Toxicity of Burley Tobacco. Agronomy Journal 55, 47-49 (1963).
- 86) HOFNER, W.: Eisen und manganhaltige Verbindungen in Blutensaft von Helianthus annuus. Physiol. Plant. 23, 673-677 (1970)
- 87) HOLDEN, M.: Chlorophylls, p. 1-37. En: Chemistry and biochemistry of plant pigments. Vol II. T.W. Goodwin, edit. Academic Press. New York (1976).
- 88) HOLDING, A.J., LOWE, J.F.: Some effects of acidity and heavy metals on the Rhizobium-leguminous plant association. Plant Soil, Spec. vol, 153-166 (1971).

- 89) HORST, W.J. und MARSCHNER, H.: Symptome von Mangan-überschuss bei Bohnen (Phaseolus vulgaris). Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 141, 129-142 (1978).
- 90) INGLE, J., BATZ, D. and HAGEMAN, R.H.: Changes in Composition During Development and Maturation of Maize Seeds. Plant Physiol. 40, 835-839 (1965).
- 91) ISERMANN, K.: Mögliche Ursachen der Mangan-Toleranz bestimmter Reis-Sorgen. Z. Pflanzenernährung und Boden 138, 235-247 (1975).
- 92) JASPARS, E.M.J.: Pigmentation of Tobacco Crown-Gall Tissues Cultured in vitro in Dependence of the Composition of the Medium. Physiol. Plant. 13, 933-940 (1965).
- 93) JHA, K.K. and SIDDIQUI, M.A.: Manganese toxicity - a cause of death of mango trees in the Kosi flood affected areas of Bihar. J. Indian Soc. Soil Sci. 13, 233-236 (1965).
- 94) JOLIOT, P. and KCK, B.: Oxygen Evolution in Photosynthesis 387-412. En: Bioenergetics of Photosynthesis. Edit. Govindjee. Academic Press. New York (1975).
- 95) KENTEN, R.H. and MANN, P.J.G.: The oxidation of manganese by peroxidase systems. Biochem. J. 46, 67 (1950).
- 96) KENTEN, R.H. and MANN, P.J.G.: Manganese oxidation in the pea plant (Pisum sativum L.) grown under conditions of manganese toxicity. Biochem. J. 65, 179-184 (1955).

- 97) KIRKBY, E.A.: Influence of ammonium and nitrate nutrition on the cation-anion balance and nitrogen and carbohydrate metabolism of white mustard plants grown in dilute nutrient solutions. *Soil Sc.* 105, 133-141 (1968).
- 98) KIZSCH, R.K., HOWARD, M.E., PETERSON, R.G.: Interrelationships among iron, manganese, and molybdenum in the growth and nutrition of tomato grown in nutrient solution. *Plant Soil* 12, 259-275 (1960).
- 99) KOK, B.: Photosynthesis: the Path of Energy 345-886. En: *Plant Biochemistry*. Edit. J. Bonner and J.E. Varner. Academic Press. New York (1976).
- 100) LABANAUSKAS, C.K.: Manganese, p 254-285. En: *Diagnostic criteria for plant and Soils*. Edit. H.D. Chapman. University of California (1966).
- 100a) LEACH, W., TAPER, C.D.: Studies in plant mineral nutrition II. the absorption of Fe and Mn by dwarf Kidney beans, tomato, and anion from culture solutions. *Can. J. Bot.* 32, 561-570 (1954).
- 101) LEE, C. R.: Interrelations of aluminium and manganese on the potato plant. *Agron. J.* 64, 546-549 (1972).
- 102) LEHRI, L.K., GANGWAR, B.R., MEHRTRA, C.L.: Bacterization experiments with Rhizobium. *Journal of the Indian Society of Soil Science.* 22, 66-69 (1974).

- 103) LEWIN, J., REIMANN, B.E.F.: Silicon and plant growth. Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 289-304 (1969).
- 104) LIENER, I.E.: Phytohemagglutinins (Phytolectins). Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 291-319 (1976).
- 105) LÖHNIS, M. P.: Effet of magnesium and calcium supply on the uptake of manganese by various crop plants. Plant Soil 12, 339-376 (1960).
- 106) LOSADA, M.: Photoproduction of Ammonia and Hydrogen Peroxide Bioclectrochemistry and Bioenergetics 6, 205-225 (1979).
- 107) LOSADA, M. and GUERERO, M.G.: The Photosynthetic Reduction of Nitrate and its Regulation, 365-408. En: Photosynthesis in relation to model systems. J. Barber, edit. Elgevier, Amsterdam (1979).
- 108) LOSADA, M.: Reflexiones en torno a la transducción biológica de la energia. Discurso de recepción. Real Academia de Medicina de Sevilla (1979).
- 109) LOVETT, W.J. and JOHNSON, A.D.: Manganese uptake by tobacco and bean plants grown on soils of the Mareeba-Dimbulah irrigation area, north Queensland. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 8, 466-469 (1968).
- 110) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem. 193, 265-275 (1951).

- 128) MORGAN, P.W., TAYLOR, D.M., JOHAM, H.E.: Manipulations of IAA-oxidase activity and auxin deficiency symptoms in intact cotton plants With manganese nutrition. *Physiol Plant.* 37, 149-156 (1976).
- 129) MORAGHAN, J.T., FREEMAN, T.J.: Influence of FeEDDHA on Growth and Manganese Accumulation in Flax. *Soil Sci. Society of America Journal* 42, 3, 455-459 (1978).
- 130) MORRIS, H.D. and PIERRE, W.H.: Minimum concentrations of manganese necessary for injury to various legumes in culture solutions. *Agron. J.* 41, 107-112 (1949).
- 131) MUKERJI, S.K.: Corn Leaf PEP carboxylases: the effect of divalent cations on activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 343-351 (1977).
- 132) MULDER, E.G. and GARRETSEN, F.C.: Soil manganese in relation to plant growth. En: *Advances in Agronomy Vol. IV*, 221-277 (1962).
- 133) MUNFORD, F.E., STARK, H.M. and SMITH, D.H.: Growth regulation I *Plant Physiol.* 37, Supl. XIV (1962).
- 133a) NASON, A. and McELROY, W.D.: Modes of Action of the Essential Mineral Elements. En: *Plant Physiology. A treatise.* Edit. F.C.Steward. Vol VIII 451-536. Academic Press. New York(1973)
- 134) NICOLAS, G., BARCELO, J., SANCHEZ TAMES, R. y SABATER, B.:

- tochemistry. 10, 2103-2109 (1971).—
- 120) MEYER, V. and SCHULTZE, E.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 17, 1554 (1894).
- 121) MIFLIN, B.J., LEA, P.J.: The pathway of nitrogen assimilations in plants. Phytochemistry. 15, 873-885 (1976).
- 122) MIFLIN, B.J. and LEA, P.J.: Amino Acid Metabolism. Ann. Rev. Plant. Physiol. 28, 299-329 (1977).
- 123) MILLIKAN, C.R.: Effects on flax of a toxic concentration of boron, iron, molybdenum, aluminum, copper, zinc, manganese, cobalt, or nickel in the nutrient solution. R. Soc. Victoria Proc. 61, 25-42 (1949).
- 124) MITCHELL, P.: Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. 41, 445-502 (1966).
- 125) MITCHELL, P.: Promotive chemiosmotic mechanism in oxidative and photosynthetic phosphorylation trends in Biochemical Sciences. 3, N58-N61 (1973).
- 126) MOORE, D.P.: Mechanism of micronutrient uptake by plants 171-198: En: Micronutrients in Agriculture. Soil Sci. Soc. Amer. Inc. Madison (1972).
- 127) MORGAN, P.W., JOHA; . H.E., AMIN, J.V.: *Effect of manganese toxicity on the indole-acetic acid oxidase system of cotton. Plant Physiol. 41, 713-724 (1966).

- 111) MAAS, E.V., MOORE, D.P. and MASON, B.J.: Influence of calcium and magnesium on manganese absorption. *Plant Physiol.* 44, 769-800 (1969).
- 112) MACKINNEY, G.: Absorption on light by chlorophyll solutions *J. Biol. Chem.* 140, 315-322 (1941).
- 113) MACLACHLAN, G.A. and WAYGOOD, E.R.: Auxins. *Plant Physiol.* 31, Supl XXVI (1956).
- 114) MANITASEVIT, J., HORGAS, D.: The influence of manganese (II, VII) and chromium (III,VI) on the synthesis of ascorbic acid, carotenes and nitrate during maize germination. *Poljoprivred na Znanstvena Smotra.* 35, 35-46 (1975).
- 115) MANSFIELD, T.A. (edit.): Effects of air pollutants on plants. Cambridge University Press. Cambridge (1976).
- 116) MARGALEF, R.: *Ecologia*, 2^a edi. Omega. Barcelona (1973).
- 117) McParland, R.H., GUEVARA, J.G., BECKER, R.R., EVANS, H.J.: The purification and properties of the glutamine synthetase from the cytosol of soybean root nodules. *Biochem. J.* 153, 597-606 (1976).
- 118) MENGEL, K. and KIRKBY, E.A.: Principles of Plant Nutrition. 2^a Edit. International Potash Institute, Berne, Switzerland (1979).
- 119) MEUDI, W.J.: Interactions of sulfite and manganese ion with peroxidase oxidation products of indole-3-acetic acid. *Phy-*

- Fisiología Vegetal. Pirámide. Madrid (1980) (en prensa).
- 135) NICHOLAS, D.J.D.: Some effects of metals in excess on crop plants grown in soil culture. I. Effects of copper, zinc, lead, cobalt, nickel and manganese on tomato grown in an acid soil. Long Ashton Research Sta. Ann. Rep. 1950, 96-108 (1951).
- 136) OKUDA, A., TAKAHASHI, E.: The role of silicon. Int. Grass. Res. Inst. Los Banos, P.I 123-146 (1965).
- 137) OHKI, K.: Mn and B effects on micronutrients and P in cotton. Agron. J. 67, 204-207 (1975).
- 138) OHKI, K.: Manganese Deficiency and Toxicity Levels for "Bragg" Soybeans. Agronomy Journal 68, 861-864 (1976).
- 139) O'NEAL, D., JOY, K.W.: Glutamine synthetase of pea leaves. Plant Physiol. 54, 773-779 (1974).
- 140) OSAWA, T., IKEDA, H.: Heavy metal toxicities in vegetable crops. I. The effect of iron concentrations in the nutrient solution on manganese toxicities in vegetable crops. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 45, 50-58 (1976).
- 141) OUELLETTE, G.J.: The Toxicity of Manganese in Strongly Acidic Soils. Agriculture (Quebec) 7, 319-322 (1950).
- 142) OUELLETTE, G.J. et GÉNÉREUX, H.: Influence de l'intoxication manganique sur six variétés de pomme de terre. Can. J. Soil. Sci. 45, 24-32 (1965).

- 143) PARKER, M.B., HARRIES, H.B., MORRIS, H.D. and PERKINS, H. P.: Manganese toxicity of soya beans as related to soil and fertility treatments. *Agron. J.* 61, 515-513 (1969).
- 144) PEASLEE, D.E., FRINK, G.R.: Influence of silicic acid on uptake on Mn, Al, Zn and Cu by tomato (*Lycopersicon esculentum*) grown on an acid soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 33, 569-571 (1969).
- 145) PILET, P.E. and BRAUN, R.: The interrelation of RNA, Auxin and Auxin-oxidases in Lentil Roots. *Physiol. Plant.* 20, 870-878 (1967).
- 146) PIPER, C.S.: *Soil and Plant Analysis*. Interscience Publishers Inc. New York 154-134 (1947).
- 147) POSCHENRIEDER, CH.: *Polución y fitotoxicidad por Cr y Mn. Tesisina*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid (1978).
- 148) POSSINGHAM, J.V., VESK, M. and MERCER, F.V.: The fine structure of leaf cells of manganese-deficient spinach. *J. Ultrastructure Res.* 11, 68-83 (1964).
- 149) PREISS, J. and KOSUGE, T.: Regulation of enzyme activity in Photosynthetic systems. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21, 433-466 (1970).
- 150) RADMER, R. and CHENIAE, G.: Mechanism of Oxygen Evolution, 303-348. En: *Primary Processes of Photosynthesis*. J. Barber, edit. Elsevier. Amsterdam (1977).

- 151) RAINS, D.W.: Mineral Metabolism, 561-598. En: Plant Biochemistry. Edit. J. Bonner and J.E. Varner. Academic Press. New York (1976).
- 152) ROBINSON, D.B., HODGSON, W.A.: The effect of some amino acids on manganese toxicity in potato. Can. J. Plant Sci. 41, 436-437 (1961).
- 153) ROBSON, A.D., LONERAGAN, J.F.: Sensitivity of annual Medicago species to manganese toxicity as affected by calcium and pH. Aust. J. Agric. Res. 21, 223-232 (1970).
- 154) SCAUMLÖFFEL, E.: Über die colorimetrische Bestimmung der Mikronährstoffe Kupfer, Zink, Kobalt, Mangan, Eisen und Molybdän aus einer Aschenlösung durch fraktionierte Extraktion. Landw. Forsch. 13, 278 (1960).
- 155) SCHEFFER, F., KICKUTH, R. and SOALAPURKAR, V.K.: Mineral nutrition and metabolic processes in young plant. I. Effects of manganese nutrition on the levels of α -keto acids in oats (Avena sativa) and wheat (Triticum sativum). J. Indian Soc. Soil Sci. 15, 209-215 (1967).
- 156) SHUMAN, L.M., ANDERSON, O.E.: Interactions of manganese with other ions in wheat and soybeans. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 7, 547-557 (1976).
- 157) SIDERIS, C.P. and YOUNG, H.J.: Growth and chemical composition of Ananas comosus in solution cultures with different iron-manganese ratios. Plant Physiol. 24, 415-440 (1949).

- 158) SIMAN, A., CRADOCK, F.W. and HUDSON, A.W.: The development of manganese toxicity in pasture legumes under extreme climatic conditions. *Plant and Soil* 41, 129-140 (1974).
- 159) SMITH, J. and BENITEZ, A.: Chlorophylls: Analysis in plant materials. En: *Modern Methods of Plant Analysis*. Vol IV. K. Paech and M.V. Tracey, eds. Springer-Verlag. Berlin (1955).
- 160) SOMERS, J.J. and SHIVE, J.W.: The iron-manganese relation in plant metabolism. *Plant Physiol.* 17, 582-602 (1942).
- 161) SOUTO, S.M. and DOBEREINER, J.: Manganese toxicity in tropical forage legumes. *Pesq. Agropec. Bras.* 4, 128-138. *Soils and Fertilizers* 34, 3, No 2546 (1971).
- 162) SPRENT, J.I.: *The Biology of Nitrogen-fixing organisms*. McGraw-Hill. London (1979).
- 163) STEWARD, F.C. and MARGOLIS, D.: The effects of manganese upon the free amino acids and amides of the tomato plant. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 21, 393-410 (1962).
- 164) STEARD, F.C.: Trends in the inorganic nutrition of plants 1-14. En: *Plant Physiology. A Treatise*, vol III. Academic Press. New York (1963).
- 165) STONIER, T., RODRIGUEZ-TORMES, F., YONEDA, Y.: Studies on auxin protectors. IV. The effect of manganese on auxin protector I of the Japanese morning glory. *Plant Physiol.* 43, 69-72 (1968).

- 166) STRAIN, H.H. and SVEC, W.A.: Extraction, separation, estimation and isolation of the chlorophylls 21-66. En: The chlorophylls. L.P. Vernon and G.R. Seely, eds. Academic Press. New York (1966).
- 167) SUTCLIFFE, J.F.: Mineral Salts. Absorption in Plants. Pergamon Mc Millan. New York (1962).
- 168) SUTTON, C.D. and HALLSWORTH, E.G.: Studies on the nutrition of forage legumes. I. The toxicity of low pH and high manganese supply to lucerne as affected by climatic factors and calcium supply. *Plant and Soil* 9, 305-317 (1958).
- 169) TANAKA, A., TADANO, T. and FUJIYAMA, H.: Comparison of adaptability of crops plants to heavy metals. 1. Adaptability to manganese-comparative plant nutrition. *Journal of Science of Soil and Manure, Japan* 46, 425-430 (1975).
- 170) TEICHLER-ZALLEN, D.: The effect of manganese on chloroplast structure and photosynthetic ability of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 44, 701-710 (1969).
- 171) TERRY, N., EVANS, P.S. and THOMAS, D.E.: Manganese toxicity effects on leaf multiplication and expansion and on dry matter yield of sugar beets. *Crop Science* 15, 205-208 (1975).
- 172) TIFFIN, L.O.: Translocation of manganese, iron, cobalt, and zinc in tomato. *Plant Physiol.* 42, 1427-1432 (1967).
- 173) TIFFIN, L.O.: Translocation of micronutrients in plants, 199-229. En: *Micronutrients in Agriculture*. Soil Sci. Soc.

- Soc. America Inc. Madison (1972).
- 174) TREBST, A.: Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 423-458 (1974).
- 175) VAHRENKAMPS, H.: Metalle in Lebenprozessen. *Chemie in unserer Zeit* 7, 97-105 (1973).
- 176) VAN GOOR, B.J., WIERSMA, D.: Redistribution of potassium, calcium, magnesium and manganese in the plant. *Physiol. Plant.* 31, 163-168 (1974).
- 177) VAN GOOR, B.J., WIERSMA, D.: Chemical forms of manganese and zinc in phloem exudates. *Physiol. Plant.* 36, 213-216 (1976).
- 178) VAN SCHOUWENBURG, J. CH. and WALINGA, I.: The determination of micro quantities of manganese in plant material. *Neth. J. Agric. Sci.* 14, 131-137 (1966).
- 179) VANDERKOOI, G.: Organization of proteins in membranes with special reference to the cytochrome oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta* 344, 307-345 (1974).
- 180) VERNESLAND, B. and GUERRERO, M.G.: Reduction of Nitrate and Nitrite 425-444. *En: Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 6.* Springer-Verlag. Berlin (1979).
- 181) VLAMIS, J. and WILLIAMS, D.E.: Ion competition in manganese uptake by barley plants. *Plant Physiol.* 37, 650-655 (1962).

- 131a) VLAMIS, J. and WILLIAMS, D.E.: Manganese and silicon interaction in the Gramineae. *Plant and Soil* 27, 131-140 (1967).
- 132) WEINSTEIN, L.H. and ROBBINS, W.R.: The effect of different iron and manganese nutrient levels on the catalase and cytochrome oxidase activities on green and albino sunflower leaf tissue. *Plant Physiol.* 30, 27-32 (1955).
- 133) WHITE, R.P.: Effects of lime upon soil and plant manganese levels in an acid soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34, 625-629 (1970).
- 134) WIKLANDER, L. and VAHTRAS, K.: Solubility and uptake of heavy metals from a Swedish soil. *Geodema* 19, 123-129 (1977).
- 135) WILLIAMS, D.E. and VLAMIS, J.: The effect of silicon on yield and Mn⁵⁴ uptake and distribution in the leaves of barley plants grown in culture solution. *Plant Physiol.* 32, 404-409 (1957).
- 136) WINTERHALDER, E.K.: Differential resistance of two species of *Eucalyptus* to toxic soil manganese levels. *Aust. J. Sci.* 25, 363-364 (1963).
- 137) WITWER, S.H. and TEUBNER, F.G.: Foliar absorption of mineral nutrients. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 10, 13-32 (1959).
- 138) YAÑEZ, J., DEL RIO, L.A., GOMEZ, M. y LACHIA, M.: Nutrición mineral de plantas de guisantes. IV Dinámica de Micronutrientes durante el ciclo fisiológico de la planta. III Reunión Nacional de Fisiología Vegetal de la S.E.F.V. Granada

49-50 (1978).

- 189) YOUNG, V.H. and BEACHER, R.L.: Crinkle leaf of cotton a result of manganese toxicity. *Arkansas Farm Research* 1, 2 (1952).
- 190) ZIEGLER, I.: Malate dehydrogenase in Zea mays: properties and inhibition by sulphite. *Biochim et Biophys. Acta* 354, 28-37 (1974).

