

LA TÉCNICA DE "EL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA)" EN  
*Crambe abyssinica*, Hochst

José Luis Chan Castañeda<sup>1</sup> y James L. Fowler<sup>2</sup>

RESUMEN

Se examinó la técnica del contenido relativo de agua (CRA) con el fin de determinar su utilidad en discos de hojas de crambi (*Crambe abyssinica* Hochst). Se investigaron las relaciones entre niveles de sequía en el suelo, edad fisiológica de las hojas y etapas fenológicas en las plantas. La evaluación de esta técnica incluyó tres partes: tiempo de rehidratación de las muestras, sus cambios de peso seco debido al período de flotación, y la propia estimación del CRA.

La rehidratación de discos foliares de crambi se completó en 4 horas de flotación en los diferentes niveles de sequía, etapas fenológicas y edades fisiológicas de las hojas. También se describe un procedimiento estadístico para estudiar la cinética de rehidratación. No se detectaron diferencias significativas en los cambios de peso seco debidos al período de flotación en las muestras, bajo las condiciones experimentales utilizadas. Finalmente, se concluye que la técnica del CRA es apropiada para estudiar relaciones agua-planta en crambi.

SUMMARY

The relative water content (RWC) technique was examined to determine its suitability when leaf discs of *Crambe abyssinica* (Hochst) are used. Four experiments were conducted to investigate the relationships between levels of water stress (soil water potential), leaf age, and stages of development of crambe plants. The evaluation of this technique involved three aspects: rehydration time of samples, changes in leaf discs dry weight during the flotation period, and the RWC estimate by itself.

It was found that leaf discs of crambe completed the phase of rehydration in four hours at the different levels of water stress, stages of development and leaf ages. A statistical procedure to study the rehydration kinetics is also described. Non significant differences in dry weight were observed among leaf discs due to the flotation period, under the experimental conditions used. Finally, it was concluded that the RWC technique is suitable for studying water relations in crambe.

<sup>1</sup> Investigador del INIFAP, becado por el CONACYT en el período 1980-1982. New Mexico State University. Las Cruces, N.M., E.U.A.

<sup>2</sup> Profesor asociado. Department of Crop and Soil Sciences, New Mexico State University. Las Cruces, N.M., E.U.A.

## INTRODUCCION

El déficit de agua en las plantas con frecuencia es un factor limitante para la producción agrícola. Desde 1928, las bases para cuantificar el déficit de agua en las plantas fueron propuestas por O. Stocker (Barrs, 1968). En la actualidad, esas bases ya modificadas y redefinidas, son ampliamente usadas para estimar el déficit hídrico en las plantas (Weatherley, 1950a, b; Barrs y Weatherley, 1962). Se han desarrollado diversas metodologías para medir el déficit hídrico, tales como: déficit hídrico relativo, turgencia relativa y déficit de saturación de agua; estas técnicas tienen las mismas bases y han demostrado ser satisfactorias (El-Sharkawai, 1975). La más empleada es la de turgencia relativa, también denominada contenido relativo de agua, la cual cuantifica el contenido de agua de un órgano o tejido en función del contenido máximo posible (turgencia completa); ésta se obtiene sumergiendo o flotando las muestras en agua pura por un período determinado.

La absorción de agua (rehidratación) por discos foliares durante la flotación es un factor determinante para definir el tiempo en que las muestras llegan a turgencia completa. El proceso de rehidratación se compone de dos fases. La fase I, en la cual el agua es absorbida rápida y pasivamente, debido al gradiente de potencial que existe entre las muestras y el agua destilada en la que están flotando, por lo que tiende a establecerse el equilibrio de difusión (Barrs y Weatherley, 1962; Slatyer, 1962). El potencial de agua en los discos foliares depende principalmente de los cambios en la concentración de solutos debidos a rehidratación (potencial osmótico), y de las propiedades de las membranas y paredes celulares (Kramer, 1955; Slatyer, 1962; Cruiziat y Tyree, 1980). La fase II se relaciona con la absorción continua de agua (absorción lenta y activa), la cual se debe a los cambios bioquímicos que ocurren durante la rehidratación de los tejidos, cambios que se dan en las membranas y paredes celulares, y en el ajuste osmótico; estos cambios son diferentes entre especies (Salim *et al.*, 1969; Frederick y Lakso, 1979).

Las principales fuentes de error asociadas con la técnica del contenido relativo de agua, según Barrs y Weatherley (1962), son: 1) Cambios de peso seco que ocurren en la muestra durante el período de flotación; 2) La continuidad en la absorción de agua después de que la muestra alcanzó turgencia completa, y 3) La inyección de los espacios intercelulares en el borde de los discos, indicado por la acumulación de agua en tejido maltratado.

Las relaciones internas del agua en la planta son influenciadas tanto por las condiciones ambientales (suelo y clima), como por las propias características de la planta (genotipo) y su etapa de desarrollo. En general, el déficit hídrico en la planta causa una reducción en la apertura estomatal, la cual a su vez disminuye el intercambio gaseoso entre la planta y su ambiente, resultando una reducción neta en la tasa fotosintética. Esta cadena de eventos involucra modificaciones en muchas reacciones biofísicas y bioquímicas, que finalmente provocan cambios morfológicos y fisiológicos en la planta (Bunce, 1978; Cruiziat y Tyree, 1980).

Esta investigación se enmarcó en la calibración de la técnica del contenido relativo de agua, con el fin de obtener información básica que fuese aplicable a otros estudios con *Crambe* o especies similares.

#### MATERIALES Y METODOS

Se condujeron cuatro experimentos en condiciones de invernadero, en las instalaciones de la Universidad Estatal de Nuevo México, Las Cruces, N.M. El período experimental fue de cuatro meses, a partir del 20 de junio de 1980, en el que las temperaturas máximas y mínimas fueron de 33 y 22°C, respectivamente; con períodos diarios de 8 horas en donde la temperatura fue de 27°C o mayor. La humedad relativa varió de 50 a 90%.

En los cuatro experimentos se utilizó el cultivar 'Meyer' de *Crambe abyssinica* (Hochst), sembrado en macetas estándar de 17.8 cm de diámetro, con una planta por maceta. El suelo utilizado fue una mezcla (1:1:1) de arcilla 'glendale', arena y musgo de pantano (peat moss). En el transcurso de los experimentos se agregó agua suficiente para mantener la humedad del suelo a capacidad de campo, excepto cuando se aplicaron los tratamientos de sequía. El potencial del agua en el suelo se midió con termopares psicrométricos y un microvoltímetro (HR-33 Dew Point Microvoltmeter, de Wescor, Inc.).

El procedimiento para examinar la técnica del contenido relativo de agua se fundamentó en el trabajo de Barrs y Weatherley (1962). Se usaron muestras de 10 discos foliares de 8 mm de diámetro en tres experimentos y de 12 mm en el cuarto experimento; las muestras fueron llevadas al laboratorio en donde se les midió su peso fresco (PF), y enseguida se pusieron a flotar en platos de Petri que contenían agua destilada. Para su rehidratación las muestras se mantuvieron en platos de Petri cubiertos, por 1.75, 3.5, 7.0, 14.0 y 28.0 horas en el experimento 1; por 1, 2, 3, 4 y 5 horas en el

experimento 2; y por 2, 4 y 8 horas en los experimentos 3 y 4. La temperatura en el laboratorio fue de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  durante el tiempo de flotación, con la iluminación usual (lámparas fluorescentes) de laboratorio. El peso turgente (PT) de los discos se obtuvo después de eliminarles el exceso de agua con papel absorbente. Después de esta última lectura, la muestra se secó en una estufa de aire forzado a  $85^\circ\text{C}$  por 48 horas, y se midió su peso seco (PS). Tanto el PS como el PF y PT se expresaron en gramos.

El contenido relativo de agua (CRA) se calculó para los experimentos 3 y 4, con un tiempo de flotación de cuatro horas, con la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PT} - \text{PS}} \times 100$$

En los experimentos 2 y 3 se tomaron muestras apareadas de cada mitad longitudinal de la hoja; una muestra se utilizó para seguir el procedimiento descrito con anterioridad (muestra de flotación); mientras que de la otra (muestra apareada), se obtuvo el PS inmediatamente después de obtener su PF.

Todas las muestras se tomaron cuidadosamente, evitando dañar el borde de los discos y sin incluir en ellas porción alguna de las nervaduras principales de las hojas.

#### Experimento 1

En este experimento se estudió la relación entre el tiempo de rehidratación (tiempo de flotación) y la edad fisiológica de la hoja. La siembra se realizó el 20 de junio y el muestreo el 17 de agosto, cuando las plantas estaban en floración. La segunda, quinta y octava hojas de posición acrópeta del tallo principal fueron muestreadas en dos tratamientos de humedad edáfica: con sequía (potencial del agua en el suelo, PAS = -10 bares) y sin sequía (PAS = -0.3 bares). Al momento del muestreo, la segunda hoja (hoja vieja, V) mostraba síntomas de senescencia, mientras que la quinta hoja (hoja madura, M) había alcanzado su expansión completa y la octava hoja (hoja joven, J) estaba aún en expansión.

Para comparar los tratamientos de humedad en el suelo en relación al proceso de rehidratación, previamente se evaluaron diferentes modelos de regresión; resultó más apropiado el modelo exponencial, el cual fue ajustado para incluir los niveles de

edad de la hoja, y los tiempos de rehidratación (Neter y Wasserman, 1974). En cada régimen de humedad se aplicó el modelo completo linearizado que fue de la siguiente forma:

$$\ln Y = \ln a + b D_1 + c D_2 + d \ln T + e (D_1 \ln T) + f (D_2 \ln T) + E$$

donde:

Y = Peso fresco de la muestra (g)

$\ln$  = Logaritmo natural

a...f = Coeficientes parciales de regresión

D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> = Juego de variables indicadoras para identificar la edad fisiológica de la hoja en la matriz de X del modelo de regresión, de acuerdo a la siguiente estructura:

D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	
(0)	(0)	= Hoja joven (referencia)
(1)	(0)	= Hoja madura
(0)	(1)	= Hoja vieja

T = Tiempo de flotación (hr)

E = Error

#### Experimento 2

En éste se evaluó el efecto del tiempo de flotación (T) sobre la pérdida o ganancia de peso seco en la muestra. Se utilizó el diseño experimental de parcelas divididas, en donde las parcelas grandes fueron las combinaciones factoriales de T por S (niveles de sequía; PAS=-2 bares y PAS=-5 bares). La parcela chica se constituyó con las muestras apareadas (M). Se utilizaron tres repeticiones. Se muestreó la tercera hoja en posición acrópeta, durante la etapa vegetativa de la planta. La siembra se efectuó el 10 de agosto y las muestras se tomaron el 5 de septiembre.

#### Experimento 3

En este experimento también se estudió el efecto de dos niveles de sequía (PAS=-3 bares y PAS=-10 bares) sobre la pérdida o ganancia de peso seco de las muestras.

Las muestras se tomaron de la cuarta hoja cuando las plantas iniciaron la floración, estando maduras dichas hojas y completamente expandidas. La siembra de este experimento se realizó el 10 de agosto y las muestras se tomaron el 23 de septiembre. Los tratamientos de sequía tuvieron cuatro repeticiones y ocuparon la parcela grande en un diseño experimental de parcelas divididas; la parcela chica fue asignada a las muestras apareadas, como en el experimento 2.

#### Experimento 4

En éste se estudiaron cuatro tratamientos que resultaron de las combinaciones de dos etapas fenológicas de la planta, vegetativa (V) y floración (F), y dos niveles de humedad edáfica (PAS=-9 bares y PAS=-0.3 bares). Los tratamientos se acomodaron en un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. Se muestrearon la cuarta y quinta hoja en las etapas vegetativa y floración, respectivamente, en ambos casos cuando las hojas estaban maduras y completamente expandidas. Este experimento se sembró el 11 y 29 de agosto para que las dos etapas de desarrollo ocurrieran al mismo tiempo; el muestreo se realizó el 2 de octubre.

El modelo general utilizado en este análisis, para sequía y sin sequía separadamente, fue:

$$\ln Y = \ln a + b D + c \ln T + d (D \ln T) + E$$

donde: Y es Peso de la muestra (g); ln significa logaritmo natural; a,b,c y d son coeficientes parciales de regresión; D es una variable indicadora (0=etapa vegetativa; 1=etapa de floración); T es tiempo de flotación (hr), y E es el error.

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### Experimento 1

Se encontró que las hojas viejas tuvieron mayor peso fresco (PF) que las hojas maduras y jóvenes, en ambos tratamientos de humedad (Figura 1). Las hojas maduras y jóvenes mantuvieron una respuesta similar en el tratamiento de sequía, pero en ausencia de sequía todas las hojas (V, M y J) mostraron diferencias significativas. Este efecto se atribuye a que el cierre estomatal avanza acropetalmente conforme la sequía

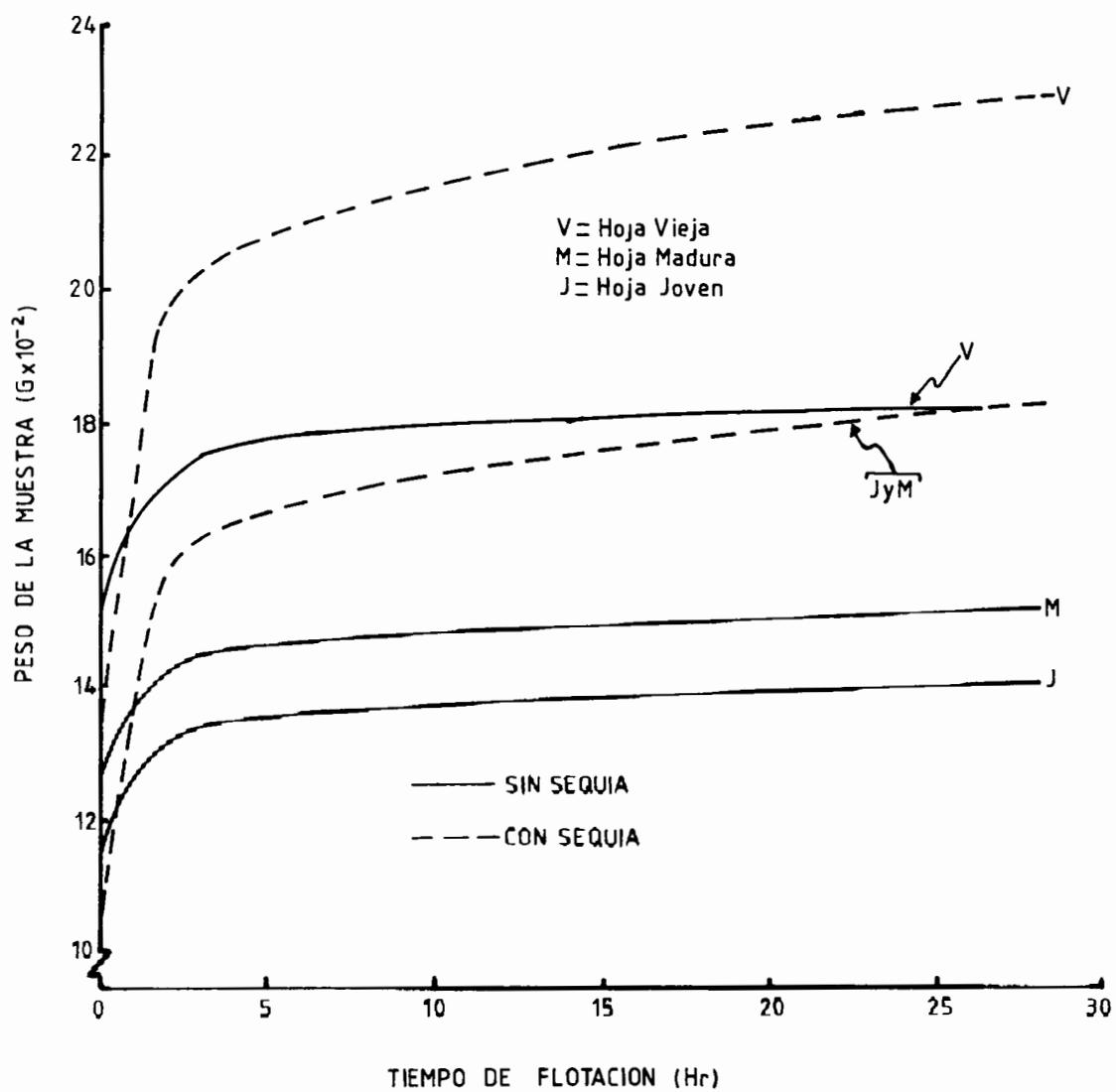


Figura 1. RELACION ENTRE LA EDAD FISIOLÓGICA DE LAS HOJAS DE CRAMBI Y LA SEQUIA EN EL PROCESO DE REHIDRATACION. EXPERIMENTO 1.

es más severa (Jordan *et al.*, 1975), y también al cambio de las propiedades químicas y físicas de los tejidos, debidas al envejecimiento (Kassam y Elston, 1976; Davis *et al.*, 1977).

La Figura 1 también muestra las tendencias estimadas en la cinética de rehidratación. Nótese que el peso fresco de las muestras del tratamiento con deficiencia de agua fue mayor que el del testigo sin deficiencia, indicando que los discos foliares provenientes de plantas con sequía acumularon mayor cantidad de agua por muestra. Este efecto de la sequía parece estar asociado con el fenómeno de ajuste osmótico y en los cambios de elasticidad de las membranas y paredes celulares.

#### Experimento 2

En este experimento se estudió el comportamiento del peso seco de los discos foliares durante el período de flotación, considerando que los discos se tomaron de hojas sanas que podrían presentar cambios en el peso seco de acuerdo con las condiciones ambientales.

El análisis estadístico indicó ausencia de significancia ( $P=0.10$ ) de los efectos principales (tiempo de flotación y niveles de sequía) y de sus interacciones, sobre el peso seco de los discos. Sin embargo, el efecto de repeticiones fue significativo ( $P=0.01$ ), indicando que la variación del invernadero fue parcialmente controlada por el diseño experimental. Los pesos secos promedio se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Peso seco promedio de discos foliares de Crambi provenientes de plantas sujetas a sequía, sometidos a diversos tiempos de flotación en agua destilada. Experimento 2.

Tiempo de flotación (hr)	Nivel de Sequía (PAS)				Medias <sup>1/</sup>	
	-2 bares		-5 bares		CF	SF
	CF	SF	CF	SF		
	mg/muestra					
1	17.17	18.83	18.18	19.15	17.17	18.99
2	19.13	18.97	19.82	20.58	19.47	19.77
3	17.58	18.12	17.18	17.50	17.38	17.81
4	18.87	19.15	20.78	18.65	19.82	18.90
5	18.23	19.20	18.17	19.33	18.20	19.27
Medias	18.20	18.85	18.82	19.04		

<sup>1/</sup> Con flotación (CF) y sin flotación (SF).

### Experimento 3

En el experimento 3 tampoco se encontraron diferencias significativas de peso seco en las muestras durante el período de flotación, confirmándose así los resultados del experimento anterior.

### Experimento 4

La rehidratación de discos foliares muestreados en diferentes etapas de desarrollo manifestó una cinética similar a la observada en diferentes hojas de una misma etapa (Figura 2). En el experimento 4 se encontraron diferencias significativas entre etapas fenológicas, siendo la muestra proveniente de la etapa vegetativa la que presentó mayor contenido de agua. Por otra parte, la absorción de agua por las muestras mostró un claro paralelismo entre las dos etapas fenológicas de un mismo nivel de sequía, mientras que entre niveles de sequía se observó falta de paralelismo (Figura 2).

Diferencias en peso de la muestra asociadas con etapas fenológicas, también se han observado en otras especies como trigo, triticale y cacahuete (Bhagsari *et al.*, 1976; Johnson y Moss, 1976; Leal *et al.*, 1978), y se ha demostrado que esos cambios obedecen a la diferente distribución de carbohidratos entre la etapa vegetativa y la de floración.

Entre los niveles de humedad edáfica (S), las diferencias en peso de la muestra fueron grandes y significativas permitiendo así distinguir fácilmente el efecto de la sequía. La diferencia entre etapas fenológica (EF) también resultó ser estadísticamente significativa, mientras que la interacción EFXS no lo fue. En el experimento 3, el CRA para los tratamientos con sequía moderada y severa fue de 80 y 64% respectivamente. En el experimento 4 se observaron CRA's de 55 y 92% en tratamientos con y sin sequía, respectivamente. Las muestras provenientes de plantas en etapa vegetativa tuvieron un CRA de 74% y de 71% en las muestras de plantas en floración.

## CONCLUSIONES

### Cinética de rehidratación

Bajo las condiciones experimentales en que se realizaron estos estudios, se concluye que cuatro horas de flotación son suficientes para que discos foliares de cram-

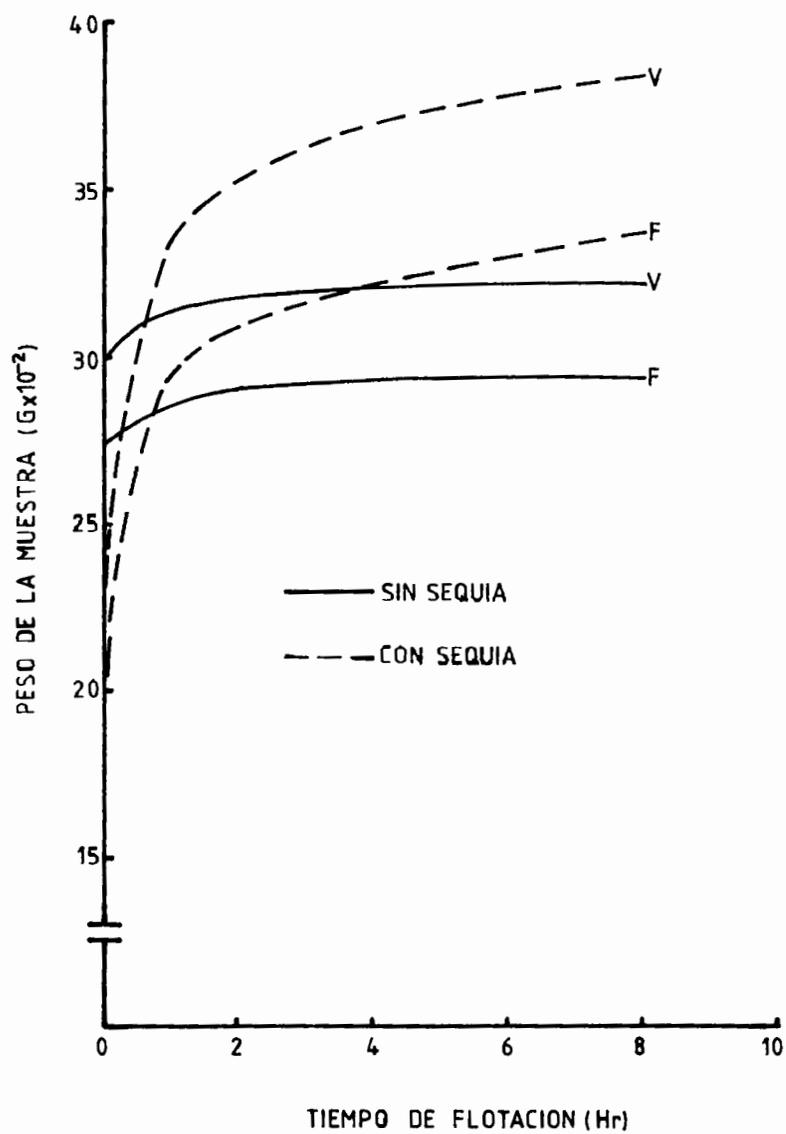


Figura 2. RELACION ENTRE ETAPAS FENOLOGICAS, LA SEQUIA Y EL TIEMPO DE FLOTACION EN EL PROCESO DE REHIDRATACION DE MUESTRAS DE CRAMBI. EXPERIMENTO 4.

bi completen la fase I de rehidratación y, por lo tanto, son suficientes para hacer la determinación del contenido relativo de agua en esta especie. No se observó el error por inyección en el borde de los discos.

#### Cambios de Peso Seco

La evidencia obtenida en estos experimentos indica que no hubo cambios significativos de peso seco de la muestra durante los períodos de flotación estudiados (hasta 28 horas), con los cuales se cubre ampliamente el tiempo de flotación necesario para obtener el CRA en esta especie, sin importar la edad fisiológica de la hoja, la etapa fenológica o el grado de sequía de la planta.

#### Contenido Relativo de Agua

La técnica del contenido de agua es aplicable para la determinación del déficit hídrico en crambi.

#### BIBLIOGRAFIA

- Barrs, H.D. 1968. Determination of water deficits in plant tissues. In: T. Kozlowski (ed.). Water deficits and plant growth. Vol. 1. Academic Press. New York.
- Barrs, H.D. and P.E. Weatherley. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Aust. J. Biol. Sci. 15:413-428.
- Bhagsari, A.S., R.H. Brown and J.S. Schepers. 1976. Effects of moisture stress on photosynthesis and some related physiological characteristics in peanuts. Crop Sci. 16: 712-715.
- Bunce, J.A. 1978. Effects of water stress on leaf expansion, net photosynthesis and vegetative growth of soybean and cotton. Can. J. Bot. 56: 1492-1498.
- Cruziat, P. and M.T. Tyree. 1980. The kinetics of rehydration of detached sunflower leaves following substantial water loss. New Phytol. 84: 293-306.
- Davies, S.O., C.H.M. van Bavel and K.J. McCree. 1977. Effect of leaf aging upon stomatal resistance in bean plants. Crop Sci. 17: 640-645.
- El-Sharkawai, M.A. 1975. A note on methods for measuring the internal water status in leaves of sunflower plant (*Helianthus annuus* L.). The Libyan J. Agric. 4: 43-46.
- Frederick, S.D. and W.N. Lakso. 1979. Diurnal and seasonal changes in leaf water potential components and elastic properties in response to water stress in apple trees. Physiol. Plant. 46: 109-114.

- Johnson, R.R. and D.N. Moss. 1976. Effects of water stress on  $^{14}\text{C}$  fixation and translocation in wheat during grain filling. *Crop Sci.* 16: 697-701.
- Jordan, W.R., K.W. Brown and J.C. Thomas. 1975. Leaf age as a determinant in stomatal control of water loss from cotton during water stress. *Plant Physiol.* 56: 595-599.
- Kassam, A.H. and J.F. Elston. 1976. Changes with age in the status of water and tissue characteristics in individual leaves of *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* 40: 669-679.
- Kramer, P.J. 1955. Water relations of plant cells and tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 6: 253-272.
- Leal, P., G.G. Reddy and M.S. Modi. 1978. Accumulation and redistribution of dry matter and N in triticale and wheat varieties under water stress condition. *Agron. J.* 70: 623-626.
- Neter, J. and W. Wasserman. 1974. Applied linear statistical models. pp. 298-299. Richard D. Irwin, Inc. Illinois.
- Salim, M.H., G.W. Todd and C.A. Stutte. 1969. Evaluation of techniques for measuring drought avoidance in cereal seedlings. *Agron. J.* 61: 182-185.
- Slatyer, R.O. 1962. Internal water relations of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13: 351-378.
- Weatherley, P.E. 1950a. Studies in the water relations of the cotton plants. I. The field measurement of water deficit in leaves. *New Phytol.* 49: 81-97.
- \_\_\_\_\_. 1950b. Studies on the water relations of the cotton plants. II. Diurnal and seasonal variations in relative turgidity and environmental factors. *New Phytol.* 50:36-51.