

**MANUAL DE PRÁCTICAS DE
FISIOLOGÍA VEGETAL**

Víctor Hugo Lallana

María del Carmen Lallana

570	Lallana, Víctor Hugo
CDD	Manual de prácticas de fisiología vegetal / Víctor Hugo Lallana ; María del Carmen Lallana. - 1a ed. 1a reimp. - Paraná : Universidad Nacional de Entre Ríos. UNER, 2017. 226 p. ; 27 x 19 cm. - (Serie Cátedra ; 3)
	ISBN 978-950-698-329-1
	1. Fisiología Vegetal. I. Lallana, María del Carmen II. Título

Primera edición, 300 ejemplares, 2014.

Directora de EDUNER: María Elena Lothringer

Coordinación de la edición: Gustavo Esteban Martínez

Corrección: Ana Lía Pujato

Diseño gráfico: Gabriela Resett

Foto de tapa: *Bletilla striata* en cultivo *in vitro*. Víctor Hugo Lallana, 2012

© LALLANA, Víctor Hugo; LALLANA, María del Carmen

© EDUNER. Editorial de la Universidad Nacional de Entre Ríos

Entre Ríos, Argentina, 2017.

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Resolución C.D. N° 6.794/12

Queda hecho el depósito que marca la ley 11 723.

No se permite la reproducción parcial o total, el almacenamiento, el alquiler, la transmisión o la transformación de este libro, en cualquier forma o por cualquier medio, sea electrónico o mecánico, mediante fotocopias, digitalización u otros métodos, sin el permiso previo y escrito del editor.

Su infracción está penada por las leyes 11 723 y 25 446.

Eva Perón 24, E3260FIB

Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina

eduner@uner.edu.ar

Editado e impreso en Argentina

Colección Cátedra

ISBN 978-950-698-329-1

Hormonas vegetales

Auxinas

- A. Dominancia apical
- B. Abscisión
- C. Enraizamiento de estacas
- D. Efectos de la aplicación de un herbicida hormonal sobre plantas latifoliadas

Giberelinas

- E. Acción del ácido giberélico sobre los vegetales
 - E.1. Acción del ácido giberélico sobre los vegetales
 - E.2. Bioensayo de crecimiento de arroz enano

Citocininas

- F. Efecto de las citocininas sobre el desarrollo y la senescencia de hojas de haba
- G. Efecto de las citocininas sobre la senescencia de hojas de avena

Etileno

- H. Maduración de frutos
-
-

HORMONAS VEGETALES

INTRODUCCIÓN

Normalmente las plantas crecen y se desarrollan de manera ordenada y organizada. Los distintos órganos deben coordinar entre sí sus acciones bioquímicas únicas, de manera que se mantengan integradas en un todo, estructural y funcional. A las influencias mutuas entre los distintos órganos se las llama «correlaciones».

Son numerosos y complejos los mecanismos por los que se lleva a cabo el control interno del crecimiento en las plantas. Uno de los más importantes sistemas de control del crecimiento lo proporcionan las llamadas «hormonas reguladoras del crecimiento vegetal» u «hormonas vegetales».

Un ejemplo aclarará mejor lo expuesto: la formación de raíces en la base de una estaca es una manifestación de crecimiento por morfogénesis, regulada fundamentalmente por sustancias de tipo hormonal que, producidas en las yemas se trasladan hacia la base fisiológica de aquéllas. En dicha región y en asociación con otros factores de crecimiento (nutricionales, metabólicos) se producen procesos de desdiferenciación y rediferenciación celular que conducen a la formación del meristema primario precursor del primordio.

Las fitohormonas son sustancias que en la práctica actúan como transmisores químicos de señales que llevan información a distancia, sea que ésta provenga de una señal ambiental o directamente del genoma.

Las hormonas vegetales son un grupo de sustancias orgánicas sintetizadas por las plantas que tienen la capacidad de afectar procesos fisiológicos en concentraciones mucho menores que los nutrientes y las vitaminas (<1 mM y aún < a 1 μ M). El control de la respuesta se lleva a cabo tanto a través de cambios en la concentración de la hormona como en la sensibilidad de los tejidos a las hormonas.

Los factores ambientales pueden afectar los niveles hormonales y la sensibilidad de los tejidos a las hormonas, lo que se traduce en cambios en los programas de desarrollo de las plantas.

En general todas las partes de la planta en activo crecimiento son centros de producción hormonal, como los ápices meristemáticos radicales y caulinares, los

meristemas secundarios, las hojas, las flores y los frutos en crecimiento; también las zonas de regeneración inducidas por heridas o lesiones, los tumores, etc.

Las plantas además sintetizan inhibidores: sustancias que inhiben o retardan el crecimiento, oponiéndose directa o indirectamente, y en forma total o parcial, a la acción de las hormonas. Por otra parte también se incluyen como factores de crecimiento y diferenciación las vitaminas y otras sustancias denominadas cofactores (actúan como coenzimas), como por ej. tiamina, ácido nicotínico, piridoxina.

Desde el punto de vista hormonal se pueden definir crecimiento y desarrollo como fenómenos fundamentales integrados por múltiples procesos vitales ordenados en cierta secuencia y regidos por un complejo hormonal.

Las hormonas mejor conocidas por sus efectos y acción fisiológica pertenecen a cinco grupos: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno.

Otras hormonas de aparición más contemporánea son el ácido jasmónico, ácido salicílico, poliaminas (espermina, cadaverina, putrescina, espermidina), brasinoesteroides.

Por último existen otros reguladores que poseen acción hormonal y que se utilizan en la agricultura: hidrazida maleica; cloruro de cloromequat (Cycocel), cloruro de clorofonio (Fosfón-D); los derivados del ácido picolínico (Picloram), carbamatos, tiocarbamatos que poseen acción herbicida; las sales cuaternarias del dipiridilo (Diquat, Paraquat); el ácido naftitalámico (TIBA).

AUXINAS (A-D)

Es un grupo de reguladores caracterizado esencialmente por provocar la elongación de las células. Por ello se las denominó «hormonas de crecimiento». Hasta 1964 se consideraba que el ácido indolacético (AIA) era la única auxina natural y que las demás eran producto de la síntesis del hombre, como por ejemplo el ácido indolbutírico (IBA). Hoy se considera que éste existe naturalmente en las plantas por conversión del ácido indolacético (AIA).

Las auxinas regulan una gran cantidad de funciones fisiológicas, como: mitosis (cariocinesis), alargamiento celular, formación de raíces adventicias, dominancia apical, gravitropismo, abscisión, diferenciación de xilema, regeneración de tejido vascular en tejidos dañados.

Se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas, con mayores concentraciones en los meristemas caulinares, laterales, yemas en actividad, órganos en activo crecimiento.

Se debe tener en cuenta que la aplicación de una auxina sobre una planta normal no estimula su elongación, dado que el nivel interno existente es óptimo.

GIBERELINAS (E)

La giberelina, sustancia con la propiedad de producir el alargamiento de los tallos de manera notable fue encontrada en Japón, en extractos del hongo *Gibberella fujikuroi*, parásito del arroz. Posteriormente en Inglaterra y Estados Unidos se descubrió que eran de ocurrencia natural en los vegetales superiores y se la consideró una hormona.

Estructuralmente es un terpenoide, con cuatro unidades de isopreno, que forman el ciclo del kaureno. Hoy se conocen más de 121 giberelinas ($AG_1, AG_2, AG_3, \dots, AG_n$), todas derivadas del kaureno; una misma especie de planta puede contener varias con distinta actividad fisiológica, pero se cree que le bastaría con una sola.

Posee marcadas propiedades como promotor de crecimiento. La más conspicua respuesta del vegetal al tratamiento con ácido giberélico (AG_3) es el alargamiento del eje caular. Provocan la elongación celular al estimular las mitosis, incrementar la plasticidad de la pared y aumentar el contenido de glucosa y fructosa –producto de la hidrólisis de glucanos y fructosanos– lo que disminuye el potencial agua. Así penetra agua a la célula y provoca su expansión.

En general este alargamiento está muy relacionado con las especies jóvenes en activo crecimiento y varía ampliamente de acuerdo con las especies, influencia de los factores externos y edad de la planta principalmente. Las plantas bienales arrosadas y los mutantes enanos son los de respuesta más notoria a la aplicación de pocos mg de AG_3 .

Los tratamientos con giberélico producen, en general, una reducción en el número, longitud y peso de las raíces.

Otros efectos importantes son: inducción de partenocarpia, acortamiento del período hasta floración: en especies que requieren días largos para florecer las AG_s los reemplazan e igualmente lo hacen con el período de vernalización en algunas de ellas, favorecen el cuajado de frutos. Rompen la dormición de semillas, en el proceso de germinación desempeñan un papel importante en la solubilización de las reservas, en los cariopses de cereales, las AG_n sintetizadas en el embrión desreprimen en la capa de aleurona el gen que codifica la síntesis de la α -amilasa, enzima que hidroliza el almidón del endosperma y produce glucosa soluble. Además de la α -amilasa promueven la síntesis de otras enzimas hidrolíticas.

Algunos retardantes del crecimiento tales como el CCC (Cicocel), Fosfón, etc. inhiben la síntesis de las AG_n .

CITOCININAS (F-G)

Este regulador del crecimiento fue descubierto en 1954 a partir de ADN, como una sustancia que promovía la división celular en los tejidos cultivados *in vitro*.

Sin su agregado al medio de cultivo las células producían la cariocinesis pero no la citocinesis. El compuesto químico, que se llamó cinetina (del griego cinesis = movimiento) no está presente en la planta pero diversos compuestos con estructura química similar fueron aislados de endosperma de maíz y del coco y luego de otros órganos. Estas hormonas de la división celular se denominan citocininas.

Las citocininas naturales son derivados de la base púrica adenina (6-amino purina), pero naturales sólo son la zeatina, el ribósido de zeatina, la isopenteniladenina y la hidrozeatina. La cinetina y la benciladenina son sintéticas.

Se sintetizan en los ápices radicales y de allí se trasladan a toda la planta por el xilema. También son sintetizadas por microorganismos (bacterias y hongos), la mayoría de los cuales son fitopatógenos (ej: *Agrobacterium tumefaciens*, entre otros).

Los principales efectos fisiológicos son: promover la división celular (citocinesis), inducir la formación de yemas caulinares en tejidos indiferenciados (ruptura de la dominancia apical), neoformación de órganos *in vitro*, retraso de la senescencia de las hojas al activar el metabolismo en la zona donde son aplicadas, desarrollo de los cloroplastos y floración. En la mayoría de estos procesos las citocininas actúan en concordancia con otros estímulos, en especial hormonales y ambientales. Particularmente importantes son las interacciones entre las citocininas con las auxinas y con la luz. En otros casos actúan junto con las auxinas, o el balance o relación entre ambas determina la manifestación de determinados efectos como el crecimiento de tejidos callosos, la formación de yemas y la dominancia apical.

ETILENO (H)

El etileno es una sustancia natural en las plantas y a pesar de que se conocía su acción fisiológica en varios procesos no fue reconocida como hormona hasta 1962. Interviene en la regulación de numerosos procesos como: abscisión, maduración de frutos, senescencia de órganos, epinastia, inhibición del crecimiento longitudinal, incremento del diámetro caulinar, promoción de la floración en algunas especies, etc. La llamada «triple» respuesta del etileno sobre las raíces es la inhibición de la elongación, el crecimiento de su diámetro y la perturbación del gravitropismo.

El etileno es una molécula simple ($\text{CH}_2 = \text{CH}_2$) que a temperatura ambiente es un gas inflamable, poco soluble en agua y con actividad biológica a bajísimas concentraciones. Actúa por simple difusión, por lo que no requiere un transporte dirigido o activado a través de la célula o del sistema vascular. Posee además acción autocatalítica: una pequeña cantidad aumenta enormemente su síntesis.

Todos los órganos de las plantas liberan etileno a la atmósfera pero los frutos en maduración lo hacen en mayor cantidad. En ellos la producción precede o coincide con la respiración climatérica. Los frutos se clasifican en dos tipos: climatéricos y no climatéricos. Los primeros maduran cuando son tratados con etileno y los

segundos no. Los climatéricos aumentan en forma abrupta la respiración cuando se inicia la maduración y es seguida por el incremento del etileno. Esto se observa también en otros órganos senescentes. El aumento de la respiración suministra energía a un proceso catabólico como la maduración. Los frutos no climatéricos por lo general se consumen antes de la maduración (pepinos, cítricos, pimientos), o la parte comestible son tejidos accesorios como en el ananá o la frutilla.

A. DOMINANCIA APICAL

INTRODUCCIÓN

Es uno de los fenómenos de correlación, en el que la yema apical ejerce la dominancia sobre el crecimiento de las yemas axilares subyacentes. Es la inhibición o control del crecimiento que ejerce la yema apical sobre las yemas axilares o ramificaciones laterales.

Según las diferentes especies se pueden observar las siguientes manifestaciones de la dominancia apical:

- inhibición del crecimiento de las yemas axilares (dominancia total);
- influencia del crecimiento de la yema apical sobre las yemas laterales (dominancia parcial) y
- control angular de las ramificaciones.

El efecto inhibitorio de la yema apical sobre las yemas laterales se puede demostrar fácilmente si se procede a su remoción o eliminación; al poco tiempo de eliminada se observará que las yemas laterales comienzan a brotar y a producir la ramificación del vegetal.

El fenómeno de dominancia apical se debe fundamentalmente a la acción de dos hormonas: auxinas y citocininas, responsables ambas de la división celular. Mientras existe la yema apical se concentran en ésta para producir el alargamiento del eje caular.

En tanto las auxinas se sintetizan fundamentalmente en el meristema apical y hojas en crecimiento, las citocininas se sintetizan en los ápices radicales. Así, las auxinas tienen un traslado polar basípeta y las citocininas se transportan por vía xilema hacia los ápices en forma acrópeta.

Cuando existe el ápice vegetativo, las auxinas sintetizadas en él, en su transporte ejercerían un efecto orientativo (efecto sumidero) en el traslado de las citocininas sintetizadas en la raíz, dirigiéndolas hacia el ápice, y alcanzan allí una **relación de concentración auxina/citocinina óptima** para la división y diferenciación celular.

Esto puede comprobarse, ya que si se remueve el ápice y en su lugar se coloca un bloque de agar con AIA se mantiene la dominancia apical.

Una característica de las citocininas es que se transportan al lugar de acción y, una vez en él quedan inmovilizadas. Si se aplican citocininas exógenamente sobre una yema en la inserción con el tallo, queda inmovilizada en él y junto con las auxinas provenientes del ápice y las hojas se alcanza el nivel óptimo de concentración para la brotación. Así las yemas laterales brotan sin necesidad de remover la yema apical.

En algunas especies que exhiben dominancia apical no existen conexiones vasculares entre las yemas laterales y el xilema. Cuando se remueve la yema apical se redistribuyen las auxinas y citocininas y se produce la conexión vascular a nivel de yema, lo que permite que lleguen el agua y los nutrientes necesarios para la brotación.

Las auxinas sintetizadas en el ápice vegetativo también ejercerían un efecto sumidero en el traslado de los nutrientes, determinando así la llegada de un flujo limitado o nulo de nutrientes a los brotes laterales.

En algunas especies al remover el ápice brotan las yemas de la base del tallo; esto se debe a que son las de edad cronológica mayor, las más cercanas al ápice aún no han completado su desarrollo. En cambio en las plantas leñosas, en general esto no ocurre: al remover los ápices brotará la yema siguiente, que en la mayoría de los casos retoma la dominancia ejercida por la primera.

La dominancia apical constituye la base fisiológica de la poda de árboles frutales (sea de formación o de fructificación) y el desbrote de tubérculos y rizomas.



A. DOMINANCIA APICAL

El objetivo del trabajo será comprobar el efecto que ejerce la yema apical sobre el crecimiento de las yemas laterales.

TÉCNICA OPERATORIA

Se trabajará con plantas de arveja crecidas en macetas (tutoradas si es necesario). Se realizarán los siguientes tratamientos:

- Maceta nº 1: testigo;
- Maceta nº 2: cortar el tallo por debajo del primer nudo que lleve una hoja;
- Maceta nº 3: cortar el tallo por debajo del primer nudo que lleve una hoja y aplicar lanolina sola;

B. ABSCISIÓN

INTRODUCCIÓN

La abscisión es la separación natural de flores, frutos, hojas u otras partes de la planta. Es un proceso fisiológico influenciado por factores internos y externos, en muchos casos asociado con un fenómeno de senescencia (envejecimiento) coincidente con cambios degenerativos ocurridos al acercarse el final de la vida de un órgano.

Por otra parte, la abscisión puede ser considerada como un fenómeno de correlación ya que es afectada por otros órganos de la planta, donde se sintetizan los reguladores.

Cambios anatómicos que acompañan la abscisión: formación de una **capa o zona de abscisión** en la base del órgano o del pecíolo, que en muchas plantas precede a la abscisión de hojas o frutos. Esta zona consiste en un grupo de células de paredes finas formadas por divisiones anticlinales (transversales al eje del órgano), que a menudo ocurren mucho antes de que la hoja haya completado su crecimiento. En el momento de la abscisión se produce, a nivel de dicha zona alguno de los siguientes procesos:

- disolución de la laminilla media,
- disolución de la laminilla media y pared celular,
- disolución total de la célula.

Las hojas quedan un tiempo más retenidas por los haces fibrovasculares, pero éstos se rompen por la acción del viento o la gravedad y se produce su caída.

Precediendo la abscisión o inmediatamente de ocurrida se producen nuevas subdivisiones celulares en la zona, a la par que se depositan suberinas y otras sustancias en las paredes y espacios intercelulares que protegen la planta de una pérdida excesiva de agua y de la entrada de microorganismos patógenos.

El mecanismo de la abscisión está regulado fundamentalmente por la formación de un gradiente de concentración de auxinas a lo largo de la zona de abscisión.

Cuando la hoja es joven y produce auxinas, la relación entre la concentración de auxinas en la región distal (zona del pecíolo más alejada del tallo) y la concentración de auxinas en la región proximal (zona del pecíolo más cercana al tallo) es alta, el órgano permanece adherido a la planta.

Cuando sobreviene la senescencia del órgano decae su producción de auxinas, la relación decrece y el órgano cae.

$$\frac{[\text{Aux.}] \text{ R. distal}}{[\text{Aux.}] \text{ R. proximal}} \geq 1 \text{ No abscisión} \qquad \frac{[\text{Aux.}] \text{ R. distal}}{[\text{Aux.}] \text{ R. proximal}} \leq 1 \text{ Abscisión}$$

Aun cuando la existencia del gradiente de auxinas es un fenómeno importante para la abscisión, hay otros compuestos hormonales que intervienen en menor medida en dicho proceso: el etileno y las abscisinas.

Se pueden citar las auxinas sintéticas: 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y ANA (ácido naftalenacético), que actúan de acuerdo con lo explicado para el AIA (ácido indolacético). El etileno y el ácido abscísico (ABA) promueven la abscisión; las citocininas la retardan, junto con las giberelinas por un efecto indirecto, al actuar aumentando el nivel de auxinas.

APLICACIÓN E IMPORTANCIA

El conocimiento de este fenómeno posibilitó regular la caída de hojas, flores y frutos por medio de pulverizaciones con hormonas sintéticas; esto implica tanto evitar la caída (en general con concentraciones de auxinas relativamente altas) como provocarla (raleo), fenómenos importantes sobre todo en frutales.

En ciertos cultivos se puede provocar la defoliación previa a la cosecha para facilitar la operación, principio que se aplica a la recolección de fibras de algodón, semillas de alfalfa, etc. En estos casos se utilizan entre otros, productos como la cianamida cálcica, clorato de magnesio, amitrol, etc., que en principio aceleran el proceso de senescencia de las hojas.

La efectividad de un determinado regulador depende de la especie, momento de aplicación, naturaleza del compuesto y de su concentración. Por consiguiente no pueden establecerse reglas generales, y es necesario experimentar previamente en cada caso.

C. ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS

INTRODUCCIÓN

Partes aisladas de muchos vegetales (tallos, hojas, raíces) tienen la capacidad de producir una nueva planta al encontrarse en condiciones adecuadas. Esta propiedad regenerativa es utilizada por viveristas, horticultores y floricultores como práctica corriente de multiplicación asexual, contando con los beneficios de la estabilidad genética y mayor rapidez en la obtención de nuevas plantas.

El proceso de formación de raíces adventicias implica tres pasos:

1. diferenciación de células iniciales de raíces,
2. formación de primordios y
3. crecimiento macroscópico.

Desde el punto de vista fisiológico este proceso es resultado de la presencia o ausencia de un conjunto de factores determinantes (hormonas e inhibidores) y de «cofactores» de variada naturaleza química (vitaminas, aminoácidos, purinas, sales minerales, etc.) que, actuando en una determinada relación de concentración, dirigen la morfogénesis radical.

El comportamiento de las estacas es diferente según la época en que se obtienen. Tiene importancia:

- a. Edad y crecimiento de las ramas que se toman para estacas (herbáceas, semileñosas, leñosas).
- b. Estado de desarrollo de la planta madre (en floración es cuando menor capacidad de enraizamiento muestran).
- c. Su ubicación en la rama (topósis).
- d. Presencia de yemas u hojas.
- e. Estado de nutrición de la planta madre.
- f. Longitud del día en el momento de la obtención de las mismas (fotoperíodo), etc.

La presencia de inhibidores sería responsable de contradicciones observadas en el comportamiento de estacas de diversas especies. Muchos son solubles en agua y los buenos resultados obtenidos cuando se lava por un determinado número de horas (12-24-48 h) la base de las estacas con agua corriente pueden atribuirse a la eliminación de tales sustancias.

El tratamiento de los diversos tipos de estacas con sustancias reguladoras de carácter hormonal (ácido indol 3 butírico, ácido naftalen acético, ácido indol propiónico, ácido indol 3 acético) es de amplia difusión en la actualidad para asegurar y acelerar la formación y desarrollo de raíces en las mismas.



C. ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS

El objetivo del trabajo será verificar la eficacia de distintas dosis de ANA en el enraizamiento de estacas de *Dianthus* sp. (clavel). También se puede usar *Hibiscus rosa-sinensis* (rosa china).

TÉCNICA OPERATORIA

Estas sustancias se pueden preparar y aplicar en forma de:

- Solución:

a. Método lento: se sumergen las bases de las estacas durante 24-48 h en una solución de concentración variable entre 10-200 ppm.

b. Método rápido: se mojan las bases de las estacas en una solución de concentración variable entre 4.000-10.000 ppm durante no más de 5 minutos.

- **Pasta:** se prepara una solución como en el caso anterior y se emulsiona con lanolina mezclándola de manera uniforme. La concentración puede variar entre 4.000-6.000 ppm.

- **Polvo:** la sustancia hormonal se solubiliza en alcohol, luego se mezcla con un polvo inerte (talco) hasta que la distribución sea uniforme. Se deja secar a la sombra. Se deshacen los terrones formados. La concentración final debe oscilar entre 4.000-6.000 ppm.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES HORMONALES

Se utilizará el método de solución lento. Para preparar la solución hormonal disolver el ANA en alcohol etílico al 50 % en la proporción de 4 a 10 mg de

droga por mL de alcohol; las disoluciones se hacen en alcohol para que las hormonas no precipiten.

Preparar una solución madre de ANA pesando 20 mg. Diluir la droga en 4 mL de etanol al 50 %, llevándolo luego a volumen de 1 litro (proporcionalmente puede usar menos droga). Esta solución le permitirá obtener concentraciones crecientes de ANA, por ejemplo:

Concentración 5 ppm. Preparar 50 mL a partir de una solución madre de 20 ppm. En caso de trabajar con rosa china se aumentarán las concentraciones.

Se necesitarán para una solución de 5 ppm:

1.000 mL 5 mg

50 mL $50 \times 5 / 1.000 = 0,250$ mg de ácido

Si la solución madre tiene:

20 mg 1.000 mL

0,250 mg $0,250 \times 1.000 / 20 = 12,5$ mL

Luego se toman 12,5 mL, de solución madre y se completa a un volumen de 50 mL con agua destilada. Preparar las restantes diluciones.

Tomar cuatro (4) vasos de precipitado, de 150 mL y coloque en cada uno de ellos 50 mL de las siguientes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA), que se anotarán en el rótulo correspondiente:

1. Testigo. Agua destilada 150 mL
2. Solución de 5 ppm de ANA
3. Solución de 10 ppm de ANA
4. Solución de 20 ppm de ANA

Colocar en cada vaso lotes uniformes de estacas de clavel unidas por una banda de goma, de manera que las bases (1-2 cm) desprovistas de hojas permanezcan sumergidas en la solución durante un lapso de 24-48 h. Cada lote constará de 10 estacas. Una estaca de clavel se puede preparar de brotes jóvenes de 5-15 cm de largo.

Colocar los vasos en un lugar del laboratorio protegidos de la luz directa del sol. Transcurrido el lapso indicado sacar las estacas de los vasos, lavarlas con agua corriente para remover cualquier solución que pueda quedar en la base de la estaca e inmediatamente plantarlas en «terrinas» con vermiculita o perlita, convenientemente humedecidas pero no empapadas, porque los

esquejes necesitan oxígeno para desarrollar las raíces y la excesiva cantidad de agua impide al aire penetrar en el medio.

Colocar las «terrinas» en el invernáculo y exponerlas a la luz solar difusa o a la luz artificial, de manera de facilitarles suficiente intensidad de luz para que las hojas se conserven. Durante el lapso de la experiencia controlar la humedad de las «terrinas» y agregar agua si fuera necesario.

A fin de discernir la eficacia del tratamiento, transcurrido el lapso de 3 a 4 semanas será necesario hacer observaciones y registrar los datos en la planilla que se adjunta al final del protocolo, sobre:

a. Aspecto del sistema radicular determinado por:

1. número de raíces (de más de 1 mm) por planta;
2. número de primordios de raíces (menores de 1 mm) por planta;
3. largo de las raíces en mm.

Promediar los resultados en cada categoría.

b. La ausencia de reacciones anormales tales como: excesivas hendiduras y engrosamiento del tallo, necrosis de la base de las estacas, detención del crecimiento de las yemas y pérdida del follaje.



**Planilla para toma de datos
de enraizamiento de estacas**

TRATAMIENTOS	Nº DE ESTACAS ENRAIZADAS	Nº PRIMORDIOS RADICALES	LONGITUD DE RAÍCES (mm)	OBSERVACIONES
Testigo (agua destilada)				
ppm ANA				
ppm ANA				
ppm ANA				

D. EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE UN HERBICIDA HORMONAL SOBRE PLANTAS LATIFOLIADAS

INTRODUCCIÓN

Uno de los grupos de herbicidas más importantes es el de los hormonales. Con este nombre se conoce una serie de herbicidas cuyo efecto se asemeja al tipo de respuestas inducidas por las auxinas. Los fitorreguladores auxínicos sintéticos fueron utilizados al principio como herbicidas debido a su estabilidad, ya que son muy resistentes a la oxidación por la luz, enzimas u otros agentes.

El hecho de que algunos ácidos fenoxiacéticos tuvieran actividad auxínica llevó al descubrimiento del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D), con gran actividad y a partir del cual se desarrolló una amplia gama de moléculas con actividad auxínica como el 2-metil, 4-clorofenoxiacético (MCPA) y el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5 T), también con propiedades herbicidas cuando se emplean en concentraciones elevadas. Los dos últimos se utilizaron como armas químicas en la guerra de Vietnam.

Si bien se trata de moléculas distintas se descubrió que para que existiera actividad era necesaria la presencia de una carga fraccional positiva en el anillo situada a una distancia de 0,50 nm de la carga negativa del grupo carboxilo. Esta distancia se da siempre entre los compuestos con actividad auxínica sean indólicos, fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos, incluso en la auxina sin anillo carboximetildimetil-ditiocarbamato.

Dada esta configuración las auxinas se unirán al receptor en la célula vegetal que presentará una distribución de cargas situadas a la misma distancia. Esto ha sugerido que se trata de una proteína.

Los herbicidas hormonales se traslocan a través del simplasto (floema) y exhiben características similares a los reguladores de crecimiento de tipo auxínico. Afectan el crecimiento de las plantas de manera similar y en los mismos órganos que las auxinas. El hecho de que la acción de los fenoxi sea sistémica, es decir que ocurre una vez que el producto se ha traslocado explica que sean efectivos aun cuando el herbicida alcance sólo una pequeña parte de las hojas (García Torres y Fernández Quintanilla, 1991).

Los herbicidas fenoxi se traslocan con facilidad por xilema y floema y su mecanismo de acción incide primariamente en los ácidos nucleicos. Se emplean en forma extensiva en el control selectivo de malezas latifoliadas en cultivos de gramíneas como trigo, cebada, arroz, maíz, sorgo, avena, caña de azúcar y otros.

Los síntomas iniciales típicos de estos herbicidas son epinastia (encorvamiento) del pecíolo de las hojas y de los tallos, hipercrecimientos o engrosamiento de zonas de las hojas y malformaciones de las nervaduras (García Torres y Fernández Quintanilla, 1991).

Algunos autores han propuesto la existencia de tres fases en la respuesta de las plantas a los herbicidas hormonales:

- Fase 1 (estimulación: 0-2 días): incremento en la fotosíntesis, la absorción de iones, la síntesis de ARN, el peso, la movilización de reservas.
- Fase 2 (distribución: 2-7 días): elongación del tallo, hinchamiento de tejidos, muerte de las hojas, torcimiento.
- Fase 3 (colapso: 7-10 días): colapso, muerte de tejidos.

Todo esto se debe a un desbalance hormonal en los tejidos. Si bien la síntesis de ácidos nucleicos se incrementa y muchos procesos bioquímicos se estimulan (fase 1), con el tiempo el hinchamiento de tejidos (fase 2) conduce a morfologías aberrantes; el transporte de sustancias se ve severamente afectado y la cooperación entre tejidos se interrumpe por completo, lo que conduce a la muerte de la planta (fase 3) (Valverde, 1985).

La resistencia al glifosato observada recientemente en muchas malezas ha llevado a que se busquen otras alternativas de control, por lo que la utilización de los herbicidas hormonales surge como una interesante opción, al menos para malezas latifoliadas. Las plantas de mayor tamaño por lo general requieren de dosis mayores que las plantas más chicas (Klingaman *et al.*, 1991). La eficiencia de control de los herbicidas también varía según la dosis (Devlin *et al.*, 1991) y conocer la adecuada para controlar una maleza permite reducir costos y disminuir el efecto de los agroquímicos sobre el ambiente (Vangessel y Westra, 1997).

Para la aplicación de estos herbicidas se deben tener en cuenta las condiciones climáticas. En general, con tiempo cálido y húmedo se intensifica su acción, mientras que el frío y la sequía la retrasan. Normalmente, se requiere un período exento de lluvias de 4 a 6 horas después de la aplicación, para ser absorbidos (García Torres y Fernández Quintanilla, 1991).



D. EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE UN HERBICIDA HORMONAL SOBRE PLANTAS LATIFOLIADAS

El objetivo de este trabajo es comprobar el efecto de distintas dosis del herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en malezas de hoja ancha.

TÉCNICA OPERATORIA

Se trabajará con tres dosis de 2,4-D (formulado como sal amina) y con malezas de hoja ancha de distintos tamaños, considerando un volumen de aplicación de 60 L/ha y se calcularán los valores de acuerdo con la superficie a tratar:

Tratamiento I: 1500 cm³/ha (0,15 cm³ de 2,4-D + 25-30 cm³ de agua/m²)

Tratamiento II: 2000 cm³/ha (0,20 cm³ de 2,4-D + 25-30 cm³ de agua/m²)

Tratamiento III: 2500 cm³/ha (0,25 cm³ de 2,4-D + 25-30 cm³ de agua/m²)

Se observarán y describirán los síntomas a los 2, 7 y 14 días después de la aplicación, registrando los datos en la planilla adjunta al final del protocolo. Además se calculará el porcentaje de control de cada tratamiento a los 14 días: (plantas muertas/plantas tratadas) × 100.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

- AZCÓN-BIETO, J. y M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Cap. XIX. McGraw-Hill Interamericana, 522 p.
- BARCELÓ COLL y otros (1992). *Fisiología vegetal*. Cap. 23, pp. 376-389. Pirámide, 662 p.
- DEVLIN, D.L.; J. H. LONG and L. D. MADDUX (1991). Using reduced rates of postemergence herbicides in soybeans (*Glycine max*). *Weed Technology* 5: 843-840. Citado en: FACCINI, D. and E. PURICELLI, 2007. Eficacia de herbicidas según la dosis y el estado de crecimiento de malezas presentes en un suelo en barbecho. *Agriscientia* XXIV (1): 29-35.
- GARCÍA TORRES, L. y C. FERNÁNDEZ QUINTANILLA (1991). *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. Madrid: Mundi-Prensa, 348 p.
- KLINGAMAN, T. E., C. A. KING y R. L. OLIVER (1991). Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazetaphyr activity. *Weed Science*, 40:227-232. Citado en: FACCINI, D. y otros. Control de *Carduus acanthoides* y *Cirsium vulgare* con distintas dosis de herbicidas postemergentes. Cátedra de Malezas, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.
- VALVERDE, B. E. (1985). *Apuntes sobre el modo de acción de los herbicidas*. IPCC Paper - A/11. International Plant Protection Center. Oregon State University, 19 p.
- VANGESSEL M. J. y P. WESTRA (1997). Economics and efficacy of postemergence spurred anoda (*Anoda cristata*) control in pinto beans (*Phaseolus vulgaris*). *Weed Technology*, 11: 329-334.

E. ACCIÓN DEL ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE LOS VEGETALES

INTRODUCCIÓN

Los mutantes enanos carecen del gen que codifica una enzima necesaria para la síntesis de la AG₁ y AG₁₉, promotoras del alargamiento de la mayoría de ellos y de muchas otras especies normales.

Altas concentraciones de este regulador son inhibitorias pero no siempre resultan tóxicas. El rango efectivo de concentración es extraordinariamente amplio. Su traslado es sistémico y no polar, por lo tanto no tiende a acumularse en ningún órgano determinado, es decir que aplicado a cualquier parte de la planta aparentemente afecta todas las zonas de crecimiento. Sin embargo no altera mayormente el número de internodios ni el crecimiento es anormal; éste es rápido y extenso pero no incontrolado. Anatómicamente, el incremento de crecimiento se debe a un alargamiento celular. El proceso de alargamiento por división celular es de muy poca importancia y sólo se manifiesta en algunos tejidos.



E.1. ACCIÓN DEL ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE LOS VEGETALES

El objetivo del trabajo será demostrar el efecto del ácido giberélico sobre plantas enanas y plantas normales.

TÉCNICA OPERATORIA

Cada comisión dispondrá de dos macetas conteniendo cada una 4 plántulas de poroto o arveja (una maceta contendrá plántulas de una variedad enana), con la primera hoja o el primer par de hojas en crecimiento.

Preparar una solución acuosa de ácido giberélico (AG) que contenga 100 microgramos por mililitro de solución de AG, adicionada con Tween 20 al 0,1 por mil (detergente, utilizado como tensioactivo).

Preparar una solución testigo (agua + Tween 20 al 0,1 por mil).

De las cuatro plantas de la maceta n° 1 (variedad normal): marcar dos, con una cinta o hilo y dejarlas como tratamiento testigo. Aplicar a las otras dos plantas la solución de AG. En la maceta n° 2 (variedad enana): marcar dos plantas y dejarlas como tratamiento testigo. Aplicar a las otras dos la solución de AG. En las plantas dejadas como testigo aplicar la solución testigo (agua destilada).

Para la aplicación de las respectivas soluciones (de AG y testigo) se utilizará el método de microgotas, depositando 0,1 cc de las mismas sobre la lámina de la primera hoja verdadera; luego esparcir uniformemente frotando la lámina foliar con una varilla de vidrio.

Anotar y rotular fecha y tipo de tratamiento. Repetir los tratamientos dos veces más con intervalos de 5 días entre ellos. A los 5 - 10 - 15 - 20 - 25 y 30 días posteriores al primer tratamiento registrar en todos los tratamientos el número de internodios y medir la altura a partir de la primera hoja verdadera, calculando el promedio.

Registrar en la planilla adjunta al final del protocolo las observaciones del número de internodios y longitud de la parte aérea y un gráfico que compare los distintos tratamientos considerando altura y tiempo. Interprete, saque conclusiones y redacte el informe correspondiente.



E.2. BIOENSAYO DE CRECIMIENTO DE ARROZ ENANO

En este trabajo se estudiará el efecto del ácido giberélico sobre una variedad de arroz enano y su utilización como bioensayo de giberelinas.

TÉCNICA OPERATORIA

Seleccionar aproximadamente unos 400 granos de arroz. Desinfectarlos durante 20 minutos con hipoclorito cálcico al 2 %. Después de lavar varias veces con agua destilada estéril sembrar los granos en cápsulas de Petri con el fondo cubierto con papel de filtro empapado en agua. Depositar 30 granos por cápsula. Incubar en estufa a 30 - 32 °C durante 48 - 60 horas en completa oscuridad.

Partiendo de una solución que contiene 100 mg/L de ácido giberélico preparar una serie de soluciones que contengan 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005 y 0 µg de ácido giberélico por mL.

Preparar 14 tubos de cultivo (dos por tratamiento) con 4 mL de agar 1 % (p/v) y dejar solidificar. Añadir 2 mL de la solución correspondiente de ácido giberélico. Se obtendrá una serie de tubos conteniendo 0; 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1 y 2 µg de ácido giberélico por tubo.

Añadir 12 granos de arroz previamente germinado a cada uno de los tubos así preparados. Tapar los tubos e incubar en estufa a 32 - 37 °C con luz constante durante 5 - 7 días.

Transcurrido este tiempo medir la longitud de la vaina de la segunda hoja de las plántulas desarrolladas en cada una de las soluciones y registrar en la planilla adjunta al final del protocolo. Representar en un gráfico el valor medio de la longitud medida, frente al logaritmo de la concentración de ácido giberélico, sacar conclusiones y elaborar el informe correspondiente.

LECTURAS COMPLEMENTARIAS

AZCÓN-BIETO, J. y M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Cap. xx. McGraw-Hill Interamericana, 522 p.

BARCELÓ COLL y otros (1992). *Fisiología vegetal*. Cap. 23 p. 376-389. Pirámide, 662 p.

MONERRI, C. y J. L. GUARDIOLA (1992). *Manual de prácticas de Fisiología vegetal*. Dpto. Biología Vegetal, Univ. Politécnica de Valencia, 158 p.

MONTALDI, E. (1995). *Principios de Fisiología vegetal*. Cap. xi. Ediciones Sur, 298 p.

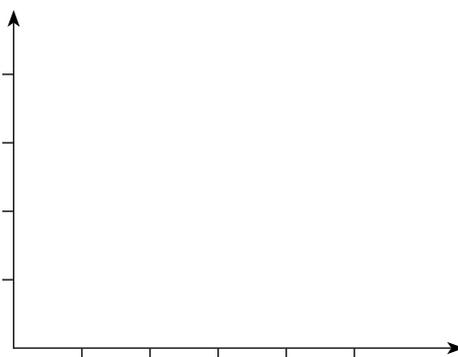
WEAVER, R. (1980). *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*. Cap. 2-3 y 4. México: Trillas, 622 p.



Planilla para toma de datos de acción del ácido giberélico (E.1)

FECHAS	PLANTAS ENANAS TESTIGO		PLANTAS ENANAS TRATADAS	
	Nº ENTRENUDOS	LONGITUD (cm)	Nº ENTRENUDOS	LONGITUD (cm)
Inicial				
10 d				
15 d				
20 d				
25 d				
30 d				

FECHAS	PLANTAS COMUNES TESTIGO		PLANTAS COMUNES TRATADAS	
	Nº ENTRENUDOS	LONGITUD (cm)	Nº ENTRENUDOS	LONGITUD (cm)
Inicial				
10 d				
15 d				
20 d				
25 d				
30 d				



Planilla para toma de datos de bioensayo de crecimiento de arroz enano (E.2)

TRATAMIENTOS	LONGITUD VAINA 2ª HOJA (mm)
0 testigo.	
0,01 µg ác. giberélico	
0,02 µg ác. giberélico	
0,1 µg ác. giberélico	
0,2 µg ác. giberélico	
1 µg ác. giberélico	
2 µg ác. giberélico	

F. EFECTO DE LAS CITOCININAS SOBRE EL DESARROLLO Y LA SENESCENCIA DE HOJAS DE HABA

INTRODUCCIÓN

Los principales cambios bioquímicos que ocurren en las hojas senescentes son el descenso en proteínas y ácidos nucleicos y amarillamiento irreversible debido a una disminución de la clorofila. El catabolismo excede al anabolismo y hay una masiva exportación de metabolitos solubles desde la hoja senescente a otras partes de la planta.

La cinetina, la benziladenina y otras citocininas sintéticas retrasan la senescencia tanto en hojas completas separadas como en secciones de las mismas, en numerosas especies. En hojas cortadas de dicotiledóneas y otras especies, como por ejemplo el poroto, a menudo se forman raíces adventicias en la base del pecíolo, demorando la senescencia de la hoja. Estas raíces sintetizan citocininas y las transportan por el xilema manteniendo fisiológicamente jóvenes a las hojas.

El efecto de la aplicación externa de citocininas se localiza en la hoja; la senescencia de partes no tratadas alrededor del lugar de aplicación puede acelerarse. En hojas jóvenes en el momento de su separación las citocininas pueden estimular en forma apreciable su desarrollo.



F. EFECTO DE LAS CITOCININAS SOBRE EL DESARROLLO Y LA SENESCENCIA DE HOJAS DE HABA

El objetivo de este trabajo práctico será estudiar el efecto de las citocininas sobre el desarrollo de las hojas, así como su efecto sobre la senescencia de las mismas.

TÉCNICA OPERATORIA EXPERIENCIA a)

Sembrar aproximadamente 70 a 100 semillas de habas en mezcla de perlita con tierra húmeda con fotoperíodo de 16 horas de luz, con intensidad luminosa moderada (15.000 a 20.000 luxes) y un ciclo de temperatura día-noche de 24/20 °C.

Cuando las plantas alcancen 20-25 cm de longitud del tallo (14 días aproximadamente) y tengan dos hojas (con dos folíolos cada una) estarán listas para su uso.

Obtener los segmentos de los tallos, cortándolos a ras de suelo. Colocarlos en contenedores llenos de agua destilada. Asegurarse de que la base de cada segmento esté sumergida en el agua. Tratar cada uno de los lotes de la siguiente forma:

Lote 1: Eliminar la segunda hoja, dejando el ápice del tallo intacto. Aplicar solución de benziladenina a uno de los folíolos de la primera hoja y dejar el otro sin tratar.

Lote 2: Como en el 1, pero tratar la mitad de cada uno de los folíolos de la primera hoja con benziladenina, dejando la otra mitad sin tratar.

Lote 3: Aplicar benziladenina a ambos folíolos de la primera hoja y dejar la segunda hoja sin tratar.

Lote 4: Aplicar benziladenina a los folíolos de la segunda hoja y dejar la primera hoja sin tratar.

Lote 5: Testigo. No eliminar hojas. No aplicar benziladenina.

Aplicar la solución de benziladenina (40 mg/L) con un pincel sobre la superficie adaxial de la hoja. Dejar los tallos en cámara de cultivo con una temperatura entre 22-24 °C y con luz continua blanca. Dos veces por semana cortar la base de los segmentos de tallo, cambiar el agua destilada y repetir el tratamiento con benziladenina.

Aproximadamente 14 días después del primer tratamiento terminar el experimento. Hacer un esquema de una planta de cada grupo. Medir la longitud de la lámina de los folíolos de la segunda hoja, de los segmentos de tallo, en los lotes 3, 4 y 5.

Interpretar, sacar conclusiones y redactar el correspondiente informe

TÉCNICA OPERATORIA EXPERIENCIA b)

Se utilizarán folíolos de haba, que se colocarán en dos cajas de Petri. En la base de cada caja se colocarán 2 a 3 discos de papel absorbente humedecido, sobre los cuales se colocarán los folíolos de haba.

G. EFECTO DE LAS CITOCININAS SOBRE LA SENESCENCIA DE HOJAS DE AVENA

INTRODUCCIÓN

Cuando se corta una hoja madura pero activa todavía, comienza a perder clorofila, ADN, proteínas y lípidos de las membranas de cloroplasto con mayor rapidez que si estuviera todavía unida a la planta, aun cuando se le suministren sales minerales y agua por el extremo cortado. Este envejecimiento prematuro o senescencia, evidente por el amarillamiento de la hoja, ocurre con especial rapidez si las hojas se mantienen en la oscuridad.

Muchas citocininas reemplazan parcialmente la necesidad de las raíces para demorar la senectud ya que el contenido de citocinina de la lámina foliar aumenta sustancialmente cuando se forman las raíces adventicias.

En girasol, el contenido de citocinina de la savia xilemática aumenta durante el período de crecimiento rápido y después disminuye cuando el crecimiento se detiene y comienza la floración, lo que sugiere que el decremento en el transporte de citocinina de las raíces al sistema aéreo podría permitir que la senescencia ocurriera con mayor rapidez (Skene, 1975 citado por Salisbury y Ross).

Thimann pionero en la investigación de las auxinas, estudió cómo las citocininas retardan la senescencia en hojas desprendidas de avena. Cuando las hojas de avena y de muchas otras especies se cortan y ponen a flotar en una solución nutritiva diluida comienzan a envejecer, lo que se caracteriza primero por la degradación de proteínas a aminoácidos y después por la pérdida de clorofila. Esta senescencia ocurre con mayor rapidez en la oscuridad que en la luz. Las citocininas que se agregan a la solución en que flotan las hojas reemplazan esencialmente el efecto de la luz, demorando la senescencia. Hay evidencia de que las citocininas protegen las membranas contra la degradación, evitando la oxidación de los lípidos (Salisbury y Ross, 2000).



G. EFECTO DE LAS CITOCININAS SOBRE LA SENESCENCIA DE HOJAS DE AVENA

El objetivo del trabajo práctico es evaluar el efecto de las citocininas sobre la senescencia de hojas de avena.

TÉCNICA OPERATORIA

Se cortarán hojas maduras de avena de edad similar, descartando las más viejas y las muy jóvenes y se colocarán bandejas plásticas debidamente rotuladas. En una de las bandejas se colocará una solución nutritiva con el agregado de 80 mg/L de benziladenina (tratada con citocinina) y en la otra solamente la solución nutritiva (testigo).

Los tratamientos serán:

- testigo: solución nutritiva (Tabla 1)
- tratada: solución nutritiva (Tabla 1) + 80 mg/L benziladenina

TABLA 1. Solución nutritiva de Hogland y Arnon (1938) a $\frac{1}{4}$ de la concentración

SOLUCIONES MADRE	mL / L
1M $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,125
1M $\text{NO}_3 \text{K}$	1,250
1M $\text{SO}_4 \text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,575
1M $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$	0,575
EDTA férrico	0,25
Micronutrientes	0,25

Una vez disuelta la hormona con unas gotas de hidróxido de potasio se enrasa a 300 mL con solución nutritiva (o a un volumen adecuado al tamaño de la bandeja). Esta solución es la que se utilizará en la bandeja del tratamiento con citocinina.

En la bandeja del testigo se colocarán solamente 300 mL de solución nutritiva.

Distribuir las hojas en las respectivas bandejas en contacto con la solución y llevarlas a oscuridad durante 7 días.

Interpretar, sacar conclusiones y redactar el correspondiente informe.

H. MADURACIÓN DE FRUTOS

INTRODUCCIÓN

La maduración de frutos puede definirse como la secuencia de color, sabor y textura que hacen que el fruto sea aceptable para el consumo.

Se considera que la función del etileno es la de aumentar la velocidad de maduración, senescencia y abscisión de los frutos y de otros órganos.



H. MADURACIÓN DE FRUTOS

En este trabajo se verificará el efecto del ethrel (ácido 2 cloroetilfosfónico) sobre la maduración de frutos de tomate (este compuesto en contacto con el vegetal libera etileno).

TÉCNICA OPERATORIA

Dividir el número total de frutos en cuatro lotes homogéneos en color y tamaño, para realizar los siguientes tratamientos:

Lote 1: testigo.

Lote 2: sumergir los frutos en una solución de 100 ppm de Ethrel.

Lote 3: sumergir los frutos en una solución de 200 ppm de Ethrel.

Lote 4: sumergir los frutos en una solución de 400 ppm de Ethrel.

Los frutos permanecerán sumergidos en las respectivas soluciones durante un mínimo de 6 a 8 horas. Transcurrido el mismo, retirar los frutos de las soluciones y una vez secos colocarlos con cuidado en frascos previamente rotulados.

