

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL



**Respuesta fisiológica y metabólica a la
toxicidad por boro en plantas de tomate.
Estrategias de tolerancia**

LUIS MIGUEL CERVILLA MEDINA

TESIS DOCTORAL

GRANADA, MAYO 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Luis Miguel Cervilla Medina
D.L.: GR. 2593-2009
ISBN: 978-84-692-3856-1



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias



Respuesta fisiológica y metabólica a la toxicidad por boro en plantas de tomate. Estrategias de tolerancia

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el licenciado en Biología
Luis Miguel Cervilla Medina para aspirar al grado de Doctor.

Fdo. Luis Miguel Cervilla Medina

Con el V^o B^o del director del trabajo:

Fdo. Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez
Profesor Titular – Universidad de Granada

Granada, Mayo 2009

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Investigación “Diagnóstico Nutricional de las Plantas Cultivadas en Condiciones Adversas” (AGR-161, Plan Andaluz de Investigación, Junta de Andalucía), del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (España). Además, este trabajo ha sido cofinanciado por dicho grupo y por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i AGL2006-03164/AGR “*Análisis de las diferentes estrategias de resistencia a la toxicidad de boro en plantas*” (Ministerio de Ciencia e Innovación). Parte de los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en revistas internacionales:

- Annals of Botany 100 (2007) 747-756.
- Plant Science 176 (2009) 545-552.
- Plant Biology (*in press*) doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00167.x

Asimismo, algunos de los resultados de esta Tesis Doctoral también han sido presentados en los siguientes congresos:

- XI Simposio Ibérico de Nutrición Mineral de las Plantas. Pamplona (España). Julio 2006.
- XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Alcalá de Henares (España). Septiembre 2007.
- XII Simposio Ibérico de Nutrición Mineral de las Plantas. Granada (España). Octubre 2008.

A lo largo de los años que he pasado en el laboratorio ha habido muchas personas cuyo apoyo ha sido imprescindible para la realización de esta tesis doctoral, tanto dentro como fuera de la facultad. Ahora que llega el momento de escribir unas palabras de agradecimiento me resulta difícil expresar de forma breve lo que siento, pues ha sido mucho tiempo y muchos los momentos que tengo en mi memoria.

Mi primer contacto con el laboratorio fue después de una clase de fitorremediación, tras la cuál me decidí a llamar al despacho del Dr. Juan Manuel Ruiz (Juanma) y preguntarle si podía colaborar como alumno interno. Desde entonces, él no sólo me brindó la posibilidad de utilizar tubos de ensayo y caros reactivos sino también la de investigar, discutiendo resultados y desarrollando ideas. Sus consejos y su confianza en mí han hecho posible que hoy yo esté escribiendo estas líneas. Por todo, gracias Juanma.

También ha sido fundamental para mí el apoyo incondicional del Dr. Luis Romero que ha sabido trasmitirme su experiencia dentro de la nutrición mineral, y cuya amabilidad y buen humor ha sido siempre una ventaja durante la realización de esta tesis.

Estos años en el laboratorio han pasado muy rápido, en parte gracias a mis compañeros de trabajo. He tenido la suerte de compartir muchísimos momentos, incluyendo entusiasmo, desánimo y alegría, con los mejores compañeros que uno podría desear: Ana, Bego, Cristian, Eva, Juanjo, Maria del Mar, Migue y Rosa. Nunca podré olvidar algunos momentos como el descubrimiento de la "partícula de Higgs" o los chocolates de después de comer.

Quiero dar las gracias al Dr. Phil A. Jackson por enseñarme personalmente todo lo que sé sobre proteómica y al Dr. Luis Goulão por su ayuda durante mi estancia en Portugal, una experiencia que nunca olvidaré.

También quiero agradecer a Raquel Rosales el trasmitirme su entusiasmo e interés por la ciencia, además de su amistad; a Fran Palma y a los demás compañeros y profesores del Departamento de Fisiología Vegetal por su simpatía y ayuda; a la Dra. Carmen Pérez del Departamento de Ecología por su amabilidad; e igualmente al resto de compañeros del Instituto del Agua (Laura, Emilio, Jesús y Javi) por soportarme todos los días durante estos últimos meses.

Tengo que dar las gracias a mis amigos por su gran apoyo y por compartir conmigo aquellos momentos que han contribuido a mi desarrollo personal. A Melchor y Manolo por ser dos amigos como dos montañas, y en este sentido por subir conmigo a las cumbres más altas de Sierra Nevada. A Ezequiel por ser ese gran amigo de toda la vida y estar ahí en todo momento, así como por compartir los planetas y las galaxias más lejanas a través del

telescopio. Por supuesto, no quiero olvidarme de Nieves, Miriam, Isa, Nadia y Alfredo, gracias por vuestra simpatía, apoyo y amistad.

Quiero dar especialmente las gracias a mis padres, que han sido los que me han enseñado los valores fundamentales de esta vida, valores sin los cuales no hubiera llegado hasta aquí. Esta tesis es el resultado de su fe en mí y de su apoyo constante. De la misma forma quiero agradecer a mi hermano su confianza y su entusiasmo, y por ser ese otro amigo que uno siempre tiene en casa. Gracias también al resto de mi familia por su cariño e interés en mi trabajo.

Por último, quiero dar las gracias a Nuria por ser la compañera perfecta, por su confianza, por su sonrisa tanto en los momentos buenos como malos, por compartir la ciencia conmigo, y por supuesto, por su paciencia. Tú has hecho más fácil e interesante este viaje.

A mis padres y hermano

A Nuria

“El más bello sentimiento que uno puede experimentar es sentir misterio. Esta es la fuente de todo arte verdadero, de toda verdadera ciencia. Aquel que nunca ha conocido esta emoción, que no posee el don de maravillarse ni encantarse... sus ojos están cerrados...”

ALBERT EINSTEIN (1879-1955)

PADRE DE LA TEORÍA DE LA RELATIVIDAD

ÍNDICE

Índice de tablas y figuras.....	VII
Abreviaturas y formulaciones químicas más frecuentes en el texto.....	XVII

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS..... 1

1.1. Consideraciones generales sobre el boro.....	3
1.1.1. Propiedades químicas.....	3
1.1.2. Un nutriente esencial.....	4
1.2. Exceso de boro en el medio ambiente: problemática.....	8
1.2.1. Fuentes naturales de boro y su distribución.....	8
1.2.2. Influencia de la actividad humana.....	9
1.2.3. Remediación de agua y suelos con exceso de boro.....	11
1.3. Toxicidad de boro en las plantas.....	13
1.3.1. Síntomas visibles.....	13
1.3.2. Estrés oxidativo y metabolismo antioxidante.....	14
1.3.3. Asimilación del nitrógeno.....	16
1.3.4. Cambios a nivel radicular: el papel de la raíz.....	18
1.3.4.1. Implicación de la pared celular.....	19
1.3.4.2. Permeabilidad de membrana y eflujo de boro.....	20
1.3.5. Influencia de otros elementos minerales: calcio, cinc y silicio.....	22
1.3.6. Estrés salino y toxicidad por boro.....	23
1.3.7. Variabilidad genética.....	24
1.4. Interés del tomate: cultivo y objeto de estudio.....	26
1.5. Objetivos.....	29

II. MATERIAL Y MÉTODOS.....33

2.1. Diseño experimental, material vegetal y medio de cultivo.....	35
2.1.1. Bloque experimental I.....	35
2.1.2. Bloque experimental II.....	37
2.1.3. Bloque experimental III.....	39

2.2. Análisis del material vegetal	40
2.2.1. Parámetros de crecimiento.....	40
2.2.1.1. Tasa de crecimiento relativo.....	40
2.2.1.1. Área foliar.....	40
2.2.2. Determinaciones analíticas.....	41
2.2.2.1. Concentración de boro total y libre.....	41
2.2.2.2. Nitrógeno orgánico, nitratos y amonio.....	41
2.2.2.3. Especies reactivas de oxígeno: O_2^- , H_2O_2	42
2.2.2.4. Malondialdehído.....	42
2.2.2.5. Actividad antioxidante total: FRAP y TEAC.....	43
2.2.2.6. Ascorbato y glutatión.....	44
2.2.2.7. Azúcares solubles: sacarosa, glucosa y fructosa.....	45
2.2.2.8. Fenoles y flavonoides.....	45
2.2.2.9. Lignina.....	46
2.2.2.10. Aminoácidos y proteínas.....	46
2.2.2.11. Prolina.....	47
2.2.2.12. Antocianinas.....	47
2.2.2.13. Clorofilas y carotenoides.....	48
2.2.3. Actividad enzimática.....	49
2.2.3.1. Lipoxigenasa.....	49
2.2.3.2. Superóxido dismutasa.....	49
2.2.3.3. Catalasa.....	49
2.2.3.4. Ascorbato peroxidasa.....	50
2.2.3.5. Monodehidroascorbato y dehidroascorbato reductasa.....	50
2.2.3.6. Glutatión reductasa.....	50
2.2.3.7. Ascorbato oxidasa.....	50
2.2.3.8. L-Galactosa deshidrogenasa.....	51
2.2.3.9. Nitrato y nitrito reductasa.....	51
2.2.3.10. Glutamina sintetasa y glutamato sintasa.....	51
2.2.3.11. Glutamato deshidrogenasa.....	52
2.2.3.12. Fenilalanina amonioliasa.....	52
2.2.3.13. Polifenol oxidasa.....	52
2.2.3.14. Guaiacol peroxidasa.....	53
2.2.3.15. Siringaldazina peroxidasa.....	53
2.2.3.16. Proteínas de extractos enzimáticos.....	53

2.2.4. Eficiencia en el uso del nitrógeno.....	54
2.2.5. Geles bidimensionales.....	55
2.2.5.1. Extracción y procesado de proteínas de la pared celular.....	55
2.2.5.2. Separación en dos dimensiones.....	55
2.2.5.3. Revelado y análisis de geles	56
2.2.6. Permeabilidad de membrana y eflujo de boro.....	56
2.3. Análisis estadístico.....	57
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
3.1. Bloque experimental I.....	61
3.1.1. Síntomas visibles, crecimiento y acumulación de boro.....	63
3.1.2. Estrés oxidativo y respuesta antioxidante.....	65
3.1.3. Asimilación del nitrato y eficiencia en el uso del nitrógeno.....	76
3.1.4. Interpretación del bloque experimental I.....	82
3.2. Bloque experimental II.....	85
3.2.1. Crecimiento y acumulación de boro.....	87
3.2.2. Estrés oxidativo y lignificación.....	88
3.2.3. Expresión de proteínas de la pared celular.....	93
3.2.4. Permeabilidad de membrana y eflujo de boro.....	95
3.2.5. Interpretación del bloque experimental II.....	98
3.3. Bloque experimental III.....	101
3.3.1. Crecimiento y acumulación de boro.....	103
3.3.2. Indicadores de estrés.....	105
3.3.3. Interpretación del bloque experimental III.....	118
IV. CONCLUSIONES.....	121
V. BIBLIOGRAFÍA.....	127
APÉNDICE.....	153
Tablas.....	157
Publicaciones.....	163

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

TABLAS

Tabla 1.1. Minerales de interés comercial que contienen B (Lyday, 2000).	9
Tabla 1.2. Tolerancia relativa de diferentes cultivos a elevadas concentraciones de B en el agua de riego. Los datos presentados son aproximados, de modo que pueden variar dependiendo del tipo de suelo, clima y variedad del cultivo (basado en Moss y Nagpal, 2003).	24
Tabla 1.3. Colecciones de germoplasma procedentes de cultivos australianos en los que se analizó la respuesta a la toxicidad por B entre los años 1988 y 1996 (basado en Nable <i>et al.</i> , 1997).	25

FIGURAS

Figura 1.1. Ester monoborato <i>cis</i> -diol (a), complejo monoborato (b) y complejo bis(diols) (c) (tomado de Bolaños <i>et al.</i> , 2004).	4
Figura 1.2. Dos moléculas de ramnogalacturonano-II se unen a través de un complejo borato bis(diols) formado entre los residuos de apiosa (a). Representación de dos residuos de apiosa unidos a través de un enlace borato éster donde puede observarse como el átomo de B es quiral (b) (tomado de O'Neill <i>et al.</i> , 2004).	5
Figura 1.3. Modelo del transporte radial de B a través de la raíz (basado en Takano <i>et al.</i> , 2008).	6
Figura 1.4. Extracción mundial de B en las últimas décadas (Parks y Edwards, 2005).	10
Figura 1.5. Síntomas de toxicidad por B en hojas de trigo (a) y en cítricos (b).	13
Figura 1.6. Eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APOX); y regeneración del ascorbato reducido (ASA) en el ciclo de Halliwell-Asada.	15
Figura 1.7. Reducción del nitrato (NO_3^-) y asimilación del amonio (NH_4^+) en las plantas.	17
Figura 1.8. Árbol filogenético que muestra la cercanía del gen <i>BOT1</i> de cebada con otros <i>BORs</i> de arroz (verde) y <i>Arabidopsis</i> (azul) (Sutton <i>et al.</i> , 2007).	21
Figura 1.9. Detalles de a) tallo, b) flor, c) fruto y d) hoja característicos de plantas de tomate doméstico (<i>Solanum lycopersicum</i>).	26
Figura 1.10. Plantas de tomate cultivadas bajo invernadero.	27

II. MATERIAL Y MÉTODOS.

TABLAS

Tabla 2.1. Parámetros analizados en hojas de plantas de tomate sometidas a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días (BE1). 37

Tabla 2.2. Parámetros analizados en raíces de plantas de tomate sometidas a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 16 días (BE2). 38

Tabla 2.3. Parámetros analizados en hojas de plantas de tomate sometidas a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 0, 5, 10 o 15 días (BE3). 39

FIGURAS

Figura 2.1. Plantas en invernadero (a) y en la cámara de cultivo (b). 35

Figura 2.2. Esquema del primer diseño experimental (BE1). 36

Figura 2.3. Esquema del segundo diseño experimental (BE2). 38

Tabla 2.3. Parámetros analizados en hojas de plantas de tomate sometidas a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 0, 5, 10 o 15 días (BE3). 39

Figura 2.5. Análisis de área foliar. 40

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

TABLAS

Tabla 3.1. Biomasa, RGR_F y concentración foliar de B (total y libre) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. 64

Tabla 3.2. Resultados de tests de actividad antioxidante total (FRAP y TEAC) realizados en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. 66

Tabla 3.3. Concentración foliar de ASA, DHA y ASA total, así como relación ASA/ASA total en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. 67

Tabla 3.4. Concentración foliar de GSH, GSSG y GSH total, así como relación GSH/GSH total en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. 68

73

Tabla 3.5. Actividad AO en la fracción soluble y unida iónicamente a la pared celular de hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	
Tabla 3.6. Concentración foliar de glucosa, fructosa y sacarosa en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	74
Tabla 3.7. Actividad NR y NiR de hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	77
Tabla 3.8. Concentración foliar de aminoácidos y proteínas solubles de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	79
Tabla 3.9. Biomasa, RGRr, relación parte aérea / raíz y concentración de B (total y libre) de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 16 días.	87
Tabla 3.10. Lignina, actividad PAL y concentración de fenoles en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 16 días.	90
Tabla 3.11. Permeabilidad de membrana de diferentes solutos (aminoácidos, fenoles, sacarosa y K ⁺) en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 16 días.	96
FIGURAS	
Figura 3.1. Síntomas visibles de toxicidad en hojas de plantas de tomate sometidas a 0.5 y 2 mM de B durante 14 días comparadas con hojas de plantas control (0.05 mM).	63
Figura 3.2. Estado de los cultivares de tomate, Kosaco (a) y Josefina (b), después de 14 días sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B.	64
Figura 3.3. Concentración de MDA (a) y H ₂ O ₂ (b) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	65
Figura 3.4. Actividad SOD (a), CAT (b) y APOX (c) en hojas de cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	70
Figura 3.5. Actividad MDHAR (a), DHAR (b) y GR (c) en hojas de cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	72
Figura 3.6. Actividad L-GalDH en hojas de cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	75

Figura 3.7. Concentración foliar de NO_3^- (a), NH_4^+ (b) y N orgánico (c) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	
Figura 3.8. Actividad GS (a), GOGAT (b) y GDH (c) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	79
Figura 3.9. Concentración total de nitrógeno (TNC) (a) y acumulación total de nitrógeno (TNA) (b) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	80
Figura 3.10. Eficiencia en la absorción de nitrógeno (NUpE) (a) y eficiencia en la utilización del nitrógeno (NUtE) (b) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.	81
Figura 3.11. Raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) después de 16 días bajo 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B.	88
Figura 3.12. Nivel de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (a, b), H_2O_2 (c, d), actividad LOX (e, f) y concentración de MDA (g, h) en raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos durante 4, 8 y 16 días a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B.	89
Figura 3.13. Actividad PPO (a, b), GPOX (c, d), SPOX (e, f) y SPOX-CW (g, h) en raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos durante 4, 8 y 16 días a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B	92
Figura 3.14. Geles bidimensionales teñidos con nitrato de plata. Patrón de proteínas iónicamente unidas a la pared celular en raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos durante 16 días a 0.05 (control) y 2 mM de B.	93
Figura 3.15. Detalle de diferentes zonas de geles bidimensionales teñidos con nitrato de plata. Comparación de patrones de expresión de proteínas iónicamente unidas a la pared celular en raíces de dos cultivares de tomate, Kosaco (a) y Josefina (b), sometidos durante 16 días a 0.05 (control) y 2 mM de B.	94
Figura 3.16. Eflujo de B ensayado en ausencia (ddH_2O) y en presencia de un inhibidor metabólico (NaN_3) en raíces de dos cultivares de tomate, Kosaco (a) y Josefina (b), sometidos durante 16 días a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B.	97
Figura 3.17. Cambios de biomasa (a) y área foliar (b) a lo largo de 15 días en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B.	103
Figura 3.18. Cambios en la concentración foliar de B a lo largo de 15 días en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B.	104

Figura 3.19. Cambios en la concentración foliar de $O_2^{\cdot-}$ (a), H_2O_2 (b) y MDA (c) a lo largo de 15 días en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B.	106
Figura 3.20. Análisis de regresión lineal (n = 20) dónde se enfrentan la biomasa (eje x, izquierda) y la concentración foliar de B (eje x, derecha) con la concentración de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y MDA (eje y) en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina).	107
Figura 3.21. Cambios en la concentración foliar de prolina a lo largo de 15 días en de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B.	109
Figura 3.22. Análisis de regresión lineal (n = 20) dónde se enfrentan la biomasa (eje x, izquierda) y la concentración foliar de B (eje x, derecha) con la concentración de prolina (eje y) en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina).	109
Figura 3.23. Cambios en la concentración foliar de clorofila a (a), clorofila b (b) y clorofila a+b (c) a lo largo de 15 días en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B.	111
Figura 3.24. Cambios en la concentración foliar de carotenoides (a) y antocianinas (b) a lo largo de 15 días en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B.	112
Figura 3.25. Análisis de regresión lineal (n = 20) dónde se enfrentan la biomasa (eje x, izquierda) y la concentración foliar de B (eje x, derecha) con la concentración de clorofila a, clorofila b, carotenoides y antocianinas (eje y) en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina).	114
Figura 3.26. Cambios en la concentración foliar de flavonoides (a) y fenoles totales (b) a lo largo de 15 días en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B.	115
Figura 3.27. Cambios en la actividad GPOX (a) y PPO (b) a lo largo de 15 días en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B.	116
Figura 3.28. Análisis de regresión lineal (n = 20) dónde se enfrentan la biomasa (eje x, izquierda) y la concentración foliar de B (eje x, derecha) con la concentración de fenoles y flavonoides, así como con la actividad GPOX y PPO (eje y) de hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina).	117

APÉNDICE.

TABLAS

Tabla A1. ANOVA factorial dónde se analiza el efecto independiente del tipo de cultivar (CV) y tratamiento de boro (B) empleado sobre diversos parámetros analizados en el bloque experimental I.	157
Tabla A2. ANOVA factorial dónde se analiza el efecto independiente del tipo de cultivar (CV) y tratamiento de boro (B) empleado sobre diversos parámetros analizados en el bloque experimental I.	158
Tabla A3. ANOVA factorial dónde se analiza el efecto independiente del tipo de cultivar (CV) y tratamiento de boro (B) empleado, así como del día de muestreo (T), sobre diversos parámetros analizados en el bloque experimental II.	159
Tabla A4. ANOVA factorial dónde se analiza el efecto independiente del tipo de cultivar (CV) y tratamiento de boro (B) empleado, así como del día de muestreo (T), sobre diversos parámetros analizados en el bloque experimental III.	160
Tabla A5. Volumen (%) de 'spots' obtenidos a partir de geles bidimensionales realizados con proteínas unidas iónicamente a la pared celular de raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 mM (control) y 2 mM de B durante 16 días.	161

ABREVIATURAS Y FORMULACIONES QUÍMICAS

Abreviaturas

ANOVA	Análisis de la varianza
AO	Ascorbato oxidasa
APOX	Ascorbato peroxidasa
ASA	Ascorbato
BE	Bloque experimental (1-3)
BSA	Seroalbúmina bovina
CAT	Catalasa
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
DTT	'Dithiothreitol'
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FRAP	'Ferric Reducing Ability of Plasma'
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GPOX	Guaiacol peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutation
GSSG	Glutation oxidado
ha	Hectárea
IEF	Isoelectroenfoque
L-GalDH	L-Galactosa deshidrogenasa
LOX	Lipoxigenasa
LSD	Test de las menores diferencias significativas de Fisher
MDA	Malondialdehido
MDH	Malato deshidrogenasa
MDHA	Monodehidroascorbato
MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa
MW	Peso molecular
NBT	'Nitroblue tetrazolium'
NIH	'National Institute of Health'
NiR	Nitrito reductasa
NL	no linear

ns	no significativo
NR	Nitrato reductasa
NUE	Eficiencia en el uso del nitrógeno
NU _p E	Eficiencia en la absorción de nitrógeno
NU _t E	Eficiencia en la utilización de nitrógeno
PAL	Fenilalanina amonioliasa
pf	peso fresco
pl	Punto isoeléctrico
PPFD	'Photosynthetic photon-flux density'
PPO	Polifenol oxidasa
ps	peso seco
PUFA	Ácidos grasos poli-insaturados
r	Coefficiente de correlación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RG-II	Rhamnogalacturonano II
RG-II-B	Complejo rhamnogalacturonano-II-boro
RGR _F	Tasa de crecimiento relativo de hojas
RGR _R	Tasa de crecimiento relativo de raíces
SE	Error Estándar
SGN	'SOL Genomics Networks'
SOD	Superóxido dismutasa
SOL	Proyecto Internacional de Genómica de Solanáceas
SPOX	Siringaldazina peroxidasa (fracción soluble)
SPOX-CW	Siringaldazina peroxidasa (fracción iónicamente unida a pared celular)
TEAC	'Trolox Equivalent Antioxidant Activity'
TNA	Acumulación total de nitrógeno
TNC	Concentración total de nitrógeno
TGRC	Centro de Recursos Genéticos de Tomate de California
WANA	Región Oeste de Asia/Norte de África

Formulaciones químicas más frecuentes en el texto.

B(OH)_4^-	Borato
ddH ₂ O	Agua doblemente destilada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
NaN ₃	Azida de sodio
NH ₄ ⁺	Amonio
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
¹ O ₂	Oxígeno singlete
O ₂ ^{•-}	Ión superóxido
OH ^{•-}	Radical hidroxilo

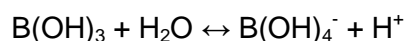
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Consideraciones generales sobre el boro.

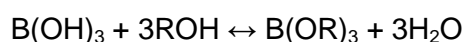
1.1.1. Propiedades químicas.

El boro (B) fue identificado como elemento químico en 1824 por Jöns Jakob Berzelius. Presenta dos isótopos estables en la naturaleza con una masa atómica de 10 a 11. Éstos se encuentran aproximadamente en una proporción de 20:80, lo que lleva a que el B presente una masa atómica media de 10.81 g mol^{-1} (Power y Woods, 1997). Es un elemento trivalente, metaloide y semiconductor que se localiza en el grupo IIIA de la tabla periódica y que presenta un pequeño átomo de número atómico 5. De acuerdo con su configuración electrónica ($1s^2 2s^2 2p^1$) posee tan sólo tres electrones de valencia, por tanto, aunque establezca tres enlaces covalentes simples van a seguir faltando dos electrones para que llegue a alcanzar la estructura estable de gas noble. Esta característica hace que el B sea a menudo definido como un elemento “deficiente en electrones”. A diferencia de su vecino químico el aluminio (Al), su pequeño tamaño y su elevado potencial iónico tan sólo le permiten formar enlaces covalentes, fundamentalmente con átomos de oxígeno (Brady y Humiston, 1978). El número de coordinación del B (número de átomos dadores enlazados al átomo central) suele ser de 3 o 4 (Holleman y Wiberg, 2001).

Debido a su elevado punto de fusión ($MP \approx 3400 \text{ K}$) y a sus propiedades corrosivas como líquido es muy difícil obtener B con un elevado grado de pureza. En la naturaleza se va a encontrar en forma de ácido bórico (H_3BO_3), borato [$\text{B}(\text{OH})_4^-$] o como mineral borosilicato. El ácido bórico se comporta como un ácido débil de Lewis en solución acuosa, de manera que acepta iones hidróxido y libera protones de acuerdo con la siguiente ecuación de equilibrio ($pK_a = 9.24$ a 25°C) (Power y Woods, 1997):



La disociación del ácido bórico está por tanto determinada por el pH, de manera que por encima de un pH de 9.24 el B se encuentra fundamentalmente en forma de anión [$\text{B}(\text{OH})_4^-$], mientras que a pH ácido o bien cerca de un pH neutro como ocurre en la mayoría de los fluidos biológicos, predomina en forma de ácido bórico. El ácido bórico también se caracteriza por reaccionar con alcoholes formando ésteres de B:



Asimismo tanto el ácido bórico como el borato se caracterizan por formar complejos con una gran variedad de azúcares y otros compuestos que contienen grupos *cis*-hidroxilo (Figura 1.1). Esta capacidad para estabilizar moléculas a través de dichos complejos se considera la base principal para la comprensión del papel del B en los sistemas biológicos, independientemente de su función en ellos (Bolaños *et al.*, 2004).

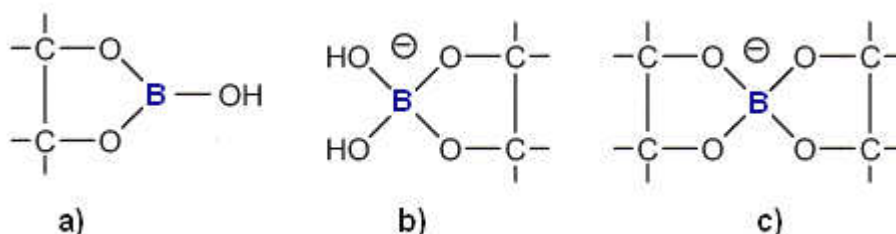


Figura 1.1. Ester monoborato *cis*-diol (a), complejo monoborato (b) y complejo bis(diol) (c) (tomado de Bolaños *et al.*, 2004).

1.1.2. Un nutriente esencial.

Los biólogos despertaron su interés por el B en 1923 cuando fue definido como un elemento esencial para el desarrollo de las plantas (Warington, 1923). Desde entonces se le han atribuido funciones en una amplia variedad de organismos como diatomeas (Smyth y Dugger, 1981), cianobacterias (Bonilla *et al.*, 1990; García-Gonzalez *et al.*, 1991; Bonilla *et al.*, 1997), levaduras (Bennett *et al.*, 1999), e incluso en animales como el caso del pez cebra (*Danio rerio*) (Eckhert y Rowe, 1999).

Aunque el B fue descrito como un nutriente esencial en las plantas superiores hace más de 80 años, no se le había asignado un papel concreto en éstas hasta ahora. Recientemente se ha aceptado por primera vez que el B está implicado en el mantenimiento de la estructura y la funcionalidad de la pared celular. Esto ha sido posible gracias al aislamiento y caracterización de los complejos rhamnogalacturonano-II-boro (RG-II-B) que ponen de manifiesto la presencia de enlaces entre el B y residuos de apiosa unidos a pectinas (Figura 1.2), lo que permite estabilizar la compleja red péctica y ayuda a regular el tamaño de los poros de la pared celular (Kobayashi *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 2004). Sin embargo, este fenómeno no explica todos los efectos de la deficiencia de B en las plantas, lo que hace pensar que podría desempeñar otras funciones. En este sentido, se ha propuesto que el B podría establecer enlaces con constituyentes de la membrana que presentan grupos *cis*-hidroxilo, como por ejemplo fosfoinositoles, glicoproteínas y glicolípidos

(Bolaños *et al.*, 2004). Esto explicaría el porqué las plantas deficientes en B presentan una alteración en la composición de la membrana y en el transporte a través de ella. Sin embargo, aun no existen evidencias directas ni pruebas bioquímicas que corroboren esta hipótesis. También se relaciona al B con otras muchas funciones implicadas en diversos mecanismos fisiológicos de la planta tales como la reproducción; el transporte de azúcares; el metabolismo fenólico; el metabolismo del nitrógeno, del ácido indolacético, del ARN o de los carbohidratos (Blevins y Lukaszewski, 1998; Brown *et al.*, 2002; Goldbach y Wimmer, 2007).

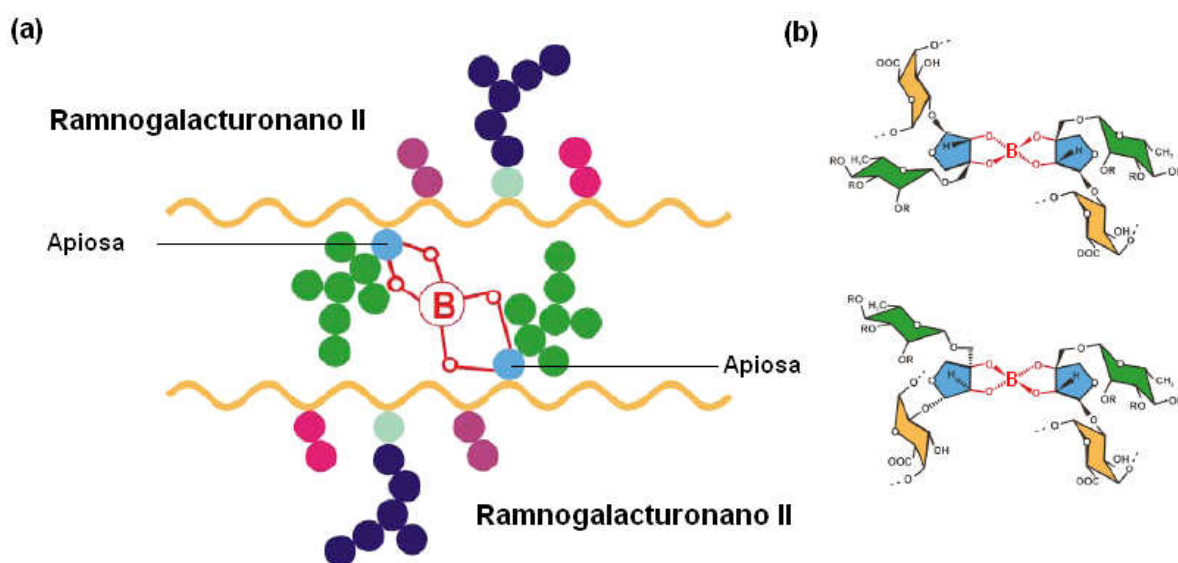


Figura 1.2. Dos moléculas de ramnogalacturonano-II se unen a través de un complejo borato bis(diol) formado entre los residuos de apiosa (a). Representación de dos residuos de apiosa unidos a través de un enlace borato éster dónde puede observarse como el átomo de B es quiral (b) (tomado de O'Neill *et al.*, 2004).

Probablemente, en relación con algunas de las funciones anteriores, el B tiene un papel a nivel transcripcional. En los últimos años varios estudios han mostrado que la deficiencia de B afecta a la expresión de genes implicados en diversos aspectos del metabolismo del nitrógeno (Redondo-Nieto *et al.*, 2001; Camacho-Cristóbal y González-Fontes, 2007), del estrés oxidativo (Kobayashi *et al.*, 2004), de la absorción de B (Takano *et al.*, 2006; Kasajima y Fujiwara, 2007) y de la pared celular (Camacho-Cristóbal *et al.*, 2008). También se ha encontrado que elevados niveles de B inducen la expresión de varios genes en raíces y hojas de *Arabidopsis*, uno de los cuales se ha identificado como un factor de transcripción de la familia de los dedos de cinc (Kasajima y Fujiwara, 2007). González-Fontes *et al.* (2008) han sugerido que el B presenta un papel en la señalización celular y que éste es capaz de interactuar con factores de transcripción. Esto podría explicar porqué varios genes de diferentes

procesos fisiológicos son afectados tan rápidamente cuando las plantas son sometidas a deficiencia de B (González-Fontes *et al.*, 2008).

En cuanto a la captación de B, éste es absorbido por las raíces a través de la solución del suelo principalmente en forma de ácido bórico. En base a las características químicas del B, se calcula que el coeficiente teórico de permeabilidad del ácido bórico a través de una bicapa lipídica es de $8 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ (Hu y Brown, 1997). Este valor relativamente alto ha sido la causa de que durante mucho tiempo se pensara que el principal o único mecanismo de absorción de B fuese a través de difusión pasiva. Sin embargo, estudios recientes con *Arabidopsis thaliana* han puesto de manifiesto que el ácido bórico también utiliza canales y transportadores durante su paso por la raíz (Takano *et al.*, 2008). Se ha observado que bajo condiciones de deficiencia de B, una proteína integral de membrana denominada NIP5;1 facilita la entrada de B al interior de las células de la epidermis, el cortex y la endodermis (Figura 1.3). Por otro lado, un transportador denominado BOR1 se encarga de exportar ácido bórico/borato hacia el xilema (Figura 1.3). De este modo, mientras que la capacidad del B para atravesar las membranas podría hacer innecesaria la presencia de un transporte activo, bajo condiciones de deficiencia éste resulta esencial y por tanto va a ser inducido (Takano *et al.*, 2008).

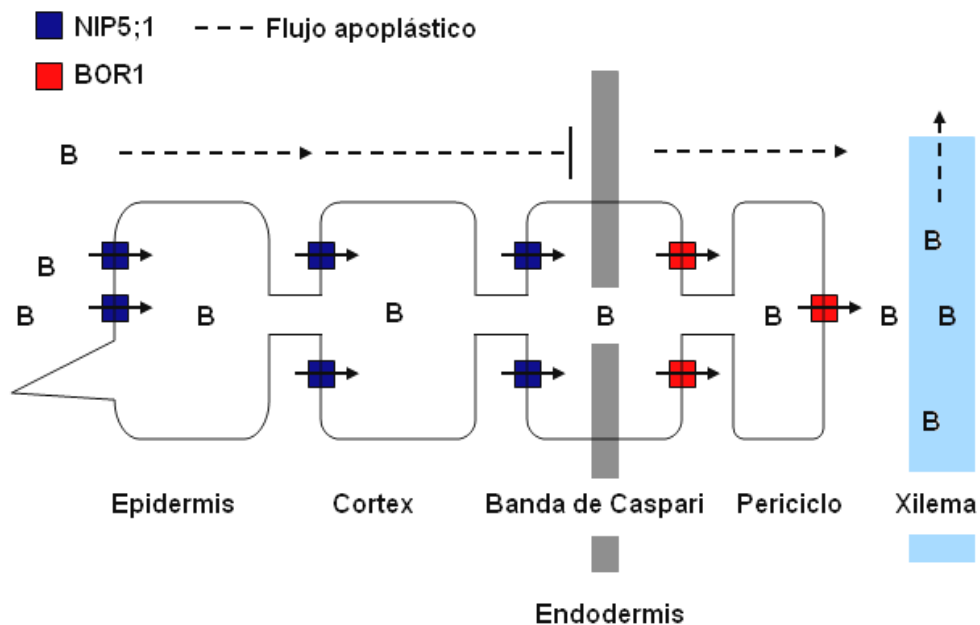


Figura 1.3. Modelo del transporte radial de B a través de la raíz (basado en Takano *et al.*, 2008).

El índice de transpiración es un factor importante que influye en la capacidad de la planta para absorber B y por tanto en su estado nutricional. En consecuencia, un incremento de la temperatura y de la intensidad lumínica va a afectar de manera positiva a la absorción de B, mientras que un incremento de la humedad relativa va a hacer que disminuya (Hu y Brown, 1997). La disponibilidad de B en el suelo también afecta al crecimiento y a la productividad de las plantas. Ésta va a depender de varios factores como la textura, el pH, la temperatura, así como del contenido en materia orgánica, cationes y aniones del suelo (Tisdale *et al.*, 1985). De ellos, el más importante es el pH, considerándose en general que la disponibilidad de B disminuye con el incremento de pH del suelo (Gupta, 1979). Cuando el pH incrementa, la proporción de borato respecto al ácido bórico también lo hace y como consecuencia de la fuerte afinidad del borato por los minerales arcillosos, la cantidad de B adsorbido por el suelo es mayor (Keren y Bingham, 1985).

Generalmente se considera al B como un elemento poco móvil en el floema de la mayoría de las plantas, acumulándose al final de la corriente de transpiración. No obstante, cada vez hay más evidencias de que la movilidad del B en el floema varía drásticamente de unas especies a otras. En los últimos años se ha descubierto que las plantas que transportan azúcares del tipo manitol o sorbitol presentan una importante retranslocación floemática de B (Brown y Shelp, 1997). Esto se produce como consecuencia de la formación de complejos bis(diol) entre el B y dichos azúcares. Por ejemplo, se ha conseguido aislar complejos manitol-B-manitol en savia de apio (*Apium graveolens*) así como complejos sorbitol-B-sorbitol, fructosa-B-fructosa y sorbitol-B-fructosa en néctar floral de melocotón (*Prunus persica*) (Hu *et al.*, 1997).

1.2. Exceso de boro en el medio ambiente: problemática.

Aunque menos frecuentes que los suelos deficientes, los suelos ricos en B son importantes porque en diferentes regiones del mundo causan grandes pérdidas de producción agrícola (Nable *et al.*, 1997). En algunas de estas regiones el B se encuentra en elevadas concentraciones de forma natural. Sin embargo, en otras aparece como consecuencia de actividades antropogénicas tales como la industria o la desalinización del agua (Parks y Edwards, 2005), una situación que se ve agravada por la presión urbanística y el turismo (Vouthckow, 2005).

1.2.1. Fuentes naturales de boro y su distribución.

La concentración media de B en la corteza terrestre es de 10 microgramos por gramo de suelo (Parks y Edwards, 2005). En general, los suelos de las zonas tropicales, templadas y boreales contienen bajas concentraciones de B ($1-2 \mu\text{g g}^{-1}$), mientras que los de las regiones áridas y semiáridas contienen elevadas concentraciones de este elemento ($10-40 \mu\text{g g}^{-1}$) (Tariq y Mott, 2007). Entre las regiones que destacan por presentar elevados niveles de B se encuentran: el sur de Australia, Oriente Medio, el norte de África, la costa sur de Perú, las regiones andinas del norte de Chile, así como otras regiones pertenecientes a California (EEUU), Rusia, Malasia y la India (Nable *et al.*, 1997; Tariq y Mott, 2007).

Las principales fuentes de B en la mayoría de los suelos son la turmalina y las emanaciones volcánicas (Chesworth, 1991). La turmalina procede de rocas formadas a altas temperaturas y es muy resistente a la erosión química por lo que se acumula en la fracción clástica de los sedimentos y en las rocas sedimentarias. En éstas últimas, así como en las rocas ígneas y metamórficas, el B se va a encontrar en forma de borosilicatos, no disponible para las plantas. Finalmente, en la pedosfera (capa más externa de la tierra), la movilización del B a partir de sus formas no disponibles ocurre como consecuencia de la actuación de numerosos procesos erosivos que incluyen reacciones del tipo ácido-base, oxidación-reducción y disolución-precipitación, siendo el principal compuesto resultante el ácido bórico (Nable *et al.*, 1997).

Otra fuente importante de B son los océanos, que contienen una media de 4.6 mg L^{-1} de B y un rango que va desde los 0.52 mg L^{-1} en el Mar Báltico hasta los 9.57 mg L^{-1} en el Mar Mediterráneo (Argust, 1998). Varios estudios demuestran que la concentración de B en el suelo y en las aguas continentales incrementa con la

proximidad al mar. Por un lado contribuyen las filtraciones de agua salada, y por otro lo hace la coevaporación de ácido bórico junto a la humedad del agua del mar, lo que da lugar a la formación de aerosoles de borato en la atmósfera que posteriormente se condensan en agua de lluvia (Parks y Edwards, 2005). Aunque también contribuyen los gases emitidos por los volcanes y las fuentes geotermales, se estima que los océanos son responsables del 65-85% de todo el B atmosférico (Anderson *et al.*, 1994; Coughlin, 1998). De forma similar, algunas zonas con elevadas concentraciones de B se van a encontrar asociadas a las aguas salobres y a los propios suelos salinos (Dhankhar y Dahiga, 1980), dónde el pobre drenaje va ser responsable de la excesiva y permanente acumulación de B en la solución del suelo (Goldberg, 1997).

1.2.2. Influencia de la actividad humana.

Aunque existen unos 200 tipos de minerales que contienen B solo unos pocos son de importancia comercial, destacando el borax, la kernita, colemanita y ulexita que son extraídos de manera extensiva (Tabla 1.1). De ellos se suele utilizar como fertilizante el borax y el ácido bórico, siendo este último aplicado directamente tanto al suelo como a las hojas (Parks y Edwards, 2005).

Tabla 1.1. Minerales de interés comercial que contienen B (Lyday, 2000).

Mineral	Composición química	Boro (%)
Boracita	$Mg_6B_{14}O_{26}Cl_2$	19.30
Colemanita	$Ca_2B_6O_{11}.5H_2O$	15.78
Datolita	$CaBSiO_4.OH$	6.76
Hydroboacita	$CaMgB_6O_{11}.6H_2O$	15.69
Kernita	$Na_2B_4O_7.4H_2O$	14.90
Priceita	$Ca_4B_{10}O_{19}.7H_2O$	15.48
Proberita	$NaCaB_5O_9.5H_2O$	15.39
Sassolita	H_3BO_3	17.48
Szaibelyita	$MgBO_2.OH$	12.85
Borax (Tincal)	$Na_2B_4O_7.10H_2O$	11.34
Tincalconita	$Na_2B_4O_7.5H_2O$	15.16
Ulexita	$NaCaB_5O_9.8H_2O$	13.34

Los usos de los compuestos del B son muy diversos: manufacturación de vidrio, cerámicas, retardantes de fuego, jabones, detergentes, cosméticos, compuestos farmacéuticos y pesticidas entre otros (Argust, 1998; Malina, 2004). En las últimas décadas se ha incrementado la extracción de B con fines industriales (Figura 1.4.) Tanto en el proceso de extracción de B en las minas como durante la

fabricación de los productos derivados se producen fugas y se libera una gran cantidad de B al medio ambiente (Argust, 1998). El vertido de compuestos con alto contenido en B durante la producción y uso de detergentes, como por ejemplo el perborato sódico, ha dado lugar a su acumulación en ambientes acuáticos. Estos compuestos suelen ser solubles en agua y tienden a acumularse en este tipo de ecosistemas (USEPA, 1975), fundamentalmente en aquellos dónde han sido movilizados por la actividad humana (Maier y Knight, 1992). Por esta razón, en el agua subterránea los niveles de B pueden incluso superar los 5 mg L^{-1} (Parks y Edwards, 2005).

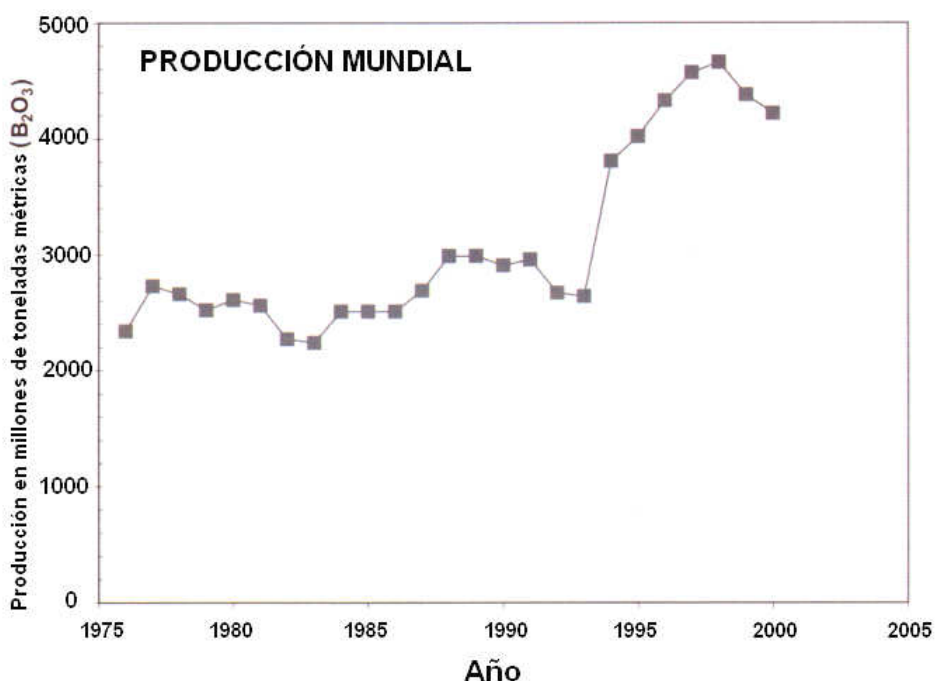


Figura 1.4. Extracción mundial de B en las últimas décadas (Parks y Edwards, 2005).

Otro aspecto de suma importancia que puede contribuir a la toxicidad de B en las plantas es la utilización de agua desalinizada, ya que uno de los principales reservorios de B son los océanos (Parks y Edwards, 2005). Éstos contienen una media de 4.6 mg L^{-1} de B (Argust, 1998), mientras que la concentración máxima que toleran las plantas más sensibles en el agua de riego es de 0.3 mg L^{-1} (Keren y Bingham, 1985). En general, el agua desalinizada no presenta una concentración de B que afecte de forma negativa a la salud humana, pero sí para la mayoría de las plantas, a menos que el B sea retirado de forma eficiente durante el proceso de desalinización (Parks y Edwards, 2005). En un ambiente ácido o neutro el B pasa fácilmente a través de las membranas de ósmosis inversa de las plantas desalinizadoras. Sin un tratamiento especial adicional, el agua desalinizada obtenida a partir del Mar Mediterráneo puede alcanzar una concentración de 2 mg L^{-1} de B, niveles que son

tóxicos incluso para un gran número de cultivos considerados tolerantes (Nable *et al.*, 1997). Un ejemplo de ello ocurrió en Eliat (Israel), dónde se observó que aguas procedentes de una planta desalinizadora municipal provocaban síntomas de toxicidad en los cultivos de árboles frutales (Yermiyahu *et al.*, 2007).

En los últimos años la desalinización ha sido reconocida como una de las principales vías para obtener recursos hídricos suficientes que abastezcan a todos los factores derivados del incremento de la población, (At-Kinson, 2005) como por ejemplo el creciente turismo en las áreas de costa o la agricultura intensiva, cuya demanda de agua se ha visto impulsada por las sequías severas en muchas zonas áridas tales como la región Mediterránea (Vouthckow, 2005). Actualmente, 15000 plantas desalinizadoras operan en más de 120 países, dónde en algunos como España, Arabia Saudi y los Emiratos Árabes Unidos el agua desalinizada puede llegar a suponer un suplemento de más del 70% (Vouthckow, 2005). Además, el uso de esta fuente de agua para la agricultura podría incrementarse de forma significativa, ya que su uso directo es factible para altos valores de producción agrícola, con técnicas de riego eficaces y costes de desalinización subvencionados, como es el caso de España (Schiffler, 2004), dónde aproximadamente el 22% del agua desalinizada ya es utilizada con fines agrícolas (Martínez Beltrán y Koo-Oshima, 2006). Un problema aun mayor ocurre en otros países dónde la demanda de agua es tan elevada que los agricultores incluso se ven obligados a utilizar agua salobre, de peor calidad aunque un tercio más barata que el agua desalinizada (Yermiyahu *et al.*, 2007).

1.2.3. Remediación de agua y suelos con exceso de boro.

Para eliminar el exceso de B del agua se han propuesto una gran variedad de técnicas que emplean diversos procesos tales como precipitación, absorción/adsorción a compuestos inorgánicos, intercambio iónico o filtración (Parks y Edwards, 2005). Sin embargo, muchas de ellas, como por ejemplo la nanofiltración o la diálisis reversa, resultan excesivamente caras, de manera que no suelen utilizarse para obtener agua potable y tan solo se emplean en determinados procesos industriales. Además, estas tecnologías aun deben ser mejoradas porque no son totalmente eficientes extrayendo el B del agua (Parks y Edwards, 2005).

En el caso del suelo se han propuesto tres formas diferentes para evitar y/o reducir los niveles de B: lavado con agua, aplicación de enmiendas y fitorremediación

(Nable *et al.*, 1997). El lavado del suelo presenta varios inconvenientes. Por un lado se requieren grandes cantidades de agua con baja concentración de B, algo que es difícil de encontrar en las zonas asociadas a toxicidad por B, donde ya de por sí el agua constituye un bien escaso. Por otro lado, un lavado con abundante agua puede acarrear la pérdida de otros nutrientes esenciales y afectar a la productividad del suelo. En cuanto al empleo de enmiendas que permiten disminuir la disponibilidad del B destaca la aplicación de yeso, que convierte fácilmente el metaborato de sodio en metaborato de calcio, este último menos soluble (Bhumbla y Ckhabra, 1982). Aunque pueden parecer una solución rápida, se ha demostrado que las enmiendas solamente son útiles a corto plazo y no tienen la misma eficacia en todos los tipos de suelo (Nable *et al.*, 1997). Por último, aunque existen pocos estudios al respecto, también se ha propuesto el uso de fitorremediación como una estrategia alternativa para reducir los niveles de B en el suelo. Bañuelos *et al.* (2003) encontraron que plantas de mostaza india (*Brassica juncea*), festuca alta (*Festuca arundinacea*), cuernecillo (*Lotus corniculatus*) y kenaf (*Hibiscus cannabinus*) reducían el B extraíble del suelo en un 52%. Otro ejemplo se ha llevado a cabo en Nueva Zelanda, donde se han empleado álamos (género *Populus*) para reducir los niveles de B en áreas contaminadas con aguas residuales (Robinson *et al.*, 2003).

1.3. Toxicidad de boro en las plantas.

1.3.1. Síntomas visibles.

El síntoma visible más común en las plantas expuestas a un exceso de B es la presencia de quemaduras, que aparecen como parches cloróticos y/o necróticos a menudo en los márgenes y en las puntas de las hojas maduras (Figura 1.5) (Eaton, 1944; Benett, 1993). Por el contrario, no parecen desarrollarse señales visibles en las raíces, dónde la concentración de B es relativamente inferior incluso a altos niveles de aplicación al medio de dicho micronutriente (Nable, 1988). Todo esto refleja la escasa movilidad de este elemento a través del floema y su distribución en la mayoría de las especies, dónde su acumulación se relaciona de forma estrecha con la intensidad en la tasa de transpiración



Figura 1.5. Síntomas de toxicidad por B en hojas de trigo (a) y en cítricos (b).

No obstante, la sintomatología habitual no aparece en aquellas especies en las que existe una importante retranslocación floemática de B. En lugar de las típicas quemaduras en los márgenes y en las puntas de las hojas, diferentes especies del género *Prunus*, *Malus* o *Pyrus* presentan yemas apicales muertas, abscisión de brotes jóvenes y presencia de lesiones en forma de acorchamientos de color marrón junto a tallos y pecíolos (Brown y Shelp, 1997). De forma similar, en otras especies de plantas como el apio, el exceso de B produce malformación de tallos y hojas jóvenes (Francois, 1988). Todo esto demuestra que la movilidad del B a través del floema puede influir en el diagnóstico de este desorden nutricional, siendo fundamental la selección del tejido que va a ser empleado para dicho diagnóstico. En este sentido, se

ha sugerido que el análisis de fruto puede ser mejor indicador en las especies en las que el B es significativamente móvil a través del floema, puesto que éste se acumula aquí rápidamente (Brown y Shelp, 1997).

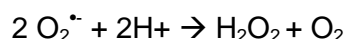
En definitiva, independientemente de la especie, el exceso de B va a producir un retraso del desarrollo y una reducción del crecimiento de la planta, así como del número, tamaño y peso de los frutos (Paull *et al.*, 1992; Nable *et al.*, 1997). Este fenómeno, que se traduce en una disminución del rendimiento de los cultivos, ocurre como consecuencia de la alteración que a nivel fisiológico o metabólico produce el exceso de B en las células vegetales. Aunque la información existente al respecto es escasa, en los siguientes apartados se detallan algunos de los aspectos más relevantes del efecto que niveles tóxicos de B tienen sobre diversos procesos en la planta, algunos de los cuales se han propuesto como una respuesta de tolerancia frente a este estrés nutricional.

1.3.2. Estrés oxidativo y metabolismo antioxidante.

Se ha sugerido que algunas plantas podrían desencadenar una respuesta antioxidante para evitar o reducir el daño oxidativo producido por exceso de B (Gunes *et al.*, 2006). Esta respuesta antioxidante se considera un proceso crítico en la protección frente al estrés oxidativo inducido por una amplia variedad de factores ambientales (Inzé y Van Montagu, 1995), incluyendo exceso de luz ultravioleta, salinidad, sequía, metales pesados, congelación, hipoxia y déficit nutricional (Mittler, 2002). En las plantas sometidas a estrés oxidativo, el exceso de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede causar daños en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando finalmente la muerte celular. Como ocurre bajo otros tipos de estrés, el exceso de B también causa la formación de ROS en los tejidos vegetales. En hojas de cebada (*Hordeum vulgare*) Karabal *et al.* (2003) observaron que niveles tóxicos de B producían daño oxidativo en membranas. Similarmente, en manzano (*Malus domestica*) y en vid (*Vitis vinifera*) se ha encontrado que el exceso de B induce la acumulación de H_2O_2 y de peroxidación de lípidos (Molassiotis *et al.*, 2006; Gunes *et al.*, 2006).

Para combatir el estrés oxidativo las plantas presentan un gran número de moléculas antioxidantes como el ascorbato (ASA) y el glutatión (GSH), así como un diverso grupo de enzimas entre las que destacan la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), la

superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) y varias enzimas implicadas en el metabolismo del ASA (Mittler, 2002). La enzima SOD constituye la primera línea de defensa ya que lleva a cabo la eliminación del radical $O_2^{\cdot-}$ que es muy reactivo:



Por otra parte, el H_2O_2 es eliminado a través de diferentes vías, que incluyen tanto la participación de enzimas como de moléculas antioxidantes, siendo las más importantes las mediadas por las enzimas CAT y ascorbato peroxidasa (APOX; EC 1.11.1.11) (Mittler, 2002). La reacción llevada a cabo por la CAT no requiere la presencia de un sustrato reducido adicional:



Sin embargo, la enzima APOX necesita ASA para poder eliminar el H_2O_2 (Figura 1.6). Este ASA es regenerado a partir de sus formas oxidadas (monodehidroascorbato, MDHA y dehidroascorbato, DHA) por las enzimas monodehidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4) y dehidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1) constituyendo el denominado ciclo de Halliwell-Asada o ciclo ascorbato-glutation (Smirnoff, 2000). En dicho ciclo es necesaria la presencia de GSH como fuente de electrones, el cuál es reciclado a partir de su forma oxidada (GSSG) gracias a la enzima glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.1) (Figura 1.6).

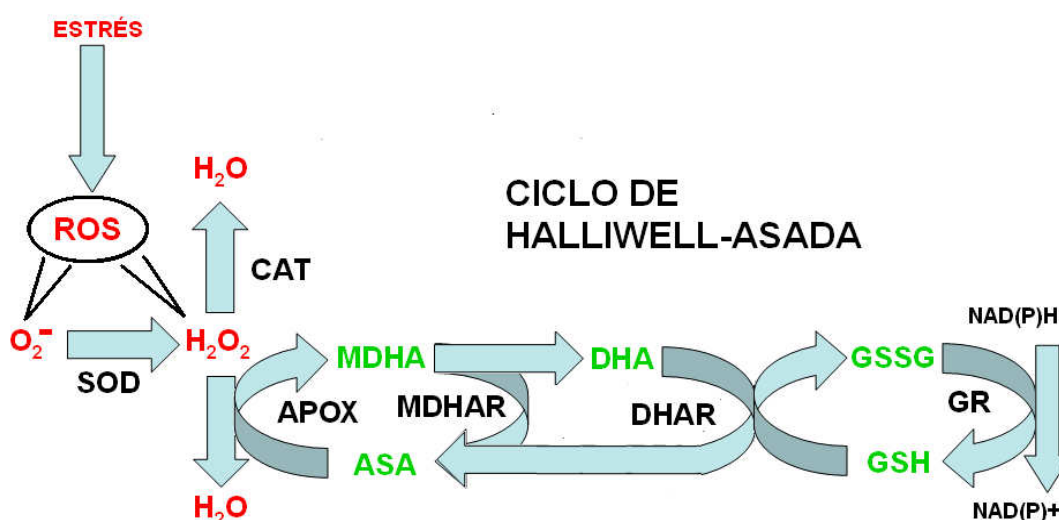


Figura 1.6. Eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APOX); y regeneración del ascorbato reducido (ASA) en el ciclo de Halliwell-Asada.

Los estudios existentes sobre la respuesta antioxidante de plantas sometidas a niveles tóxicos de B aun son muy escasos y poco concluyentes. En manzano, Molassiotis *et al.* (2006) y Sotiropoulos *et al.* (2006) observaron que la actividad antioxidante no enzimática se elevaba con el incremento de la concentración de B en el medio de cultivo. No obstante, en estudios previos se encontró que el exceso de B podía inhibir la formación de determinados antioxidantes, como el GSH en hojas de girasol (*Helianthus annuus*) (Ruiz *et al.*, 2003) o el tocoferol en naranjo (*Citrus cinensis*) (Keles *et al.*, 2004). Por otra parte, en los últimos años se ha observado una estrecha relación entre el B y el metabolismo del ASA (Blevins y Lukaszewski, 1998; Brown *et al.*, 2002). El ASA o vitamina C es el antioxidante más abundante en las plantas y se localiza en todos los compartimentos subcelulares incluyendo el apoplasto. Se ha sugerido que las plantas que presentan elevadas concentraciones de ASA en sus tejidos pueden mejorar su crecimiento y resistencia frente condiciones de estrés (Smirnoff, 2000), incluso bajo exceso de B (Keles *et al.*, 2004). Además, el ciclo de Halliwell-Asada en el que el ASA es regenerado constituye un mecanismo clave frente a la formación de ROS (Mittler, 2002). Sin embargo, a pesar de la importancia del ASA en la respuesta antioxidante, no existen a penas datos sobre el papel de éste en plantas sometidas a toxicidad de B.

1.3.3. Asimilación del nitrógeno.

El nitrógeno (N) es un elemento fundamental en todos los sistemas vivos y por tanto cambios en su disponibilidad y en su metabolismo van a ser de particular importancia para el mantenimiento de una alta productividad en los cultivos (Ulrich, 2002). Las plantas absorben el N de la solución del suelo fundamentalmente en forma de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+). La asimilación del NO_3^- en las plantas es el principal factor de integración de N en el metabolismo y requiere de varios pasos: la captación de NO_3^- , la reducción de NO_3^- a nitrito (NO_2^-), la conversión de NO_2^- a NH_4^+ , y finalmente la incorporación del NH_4^+ a esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos (Migge y Becker, 1996; Sivansankar y Oaks, 1996). Este proceso es complejo y esta regulado por varios factores fisiológicos y ambientales como la disponibilidad del NO_3^- , la temperatura o la intensidad lumínica.

La absorción de NO_3^- es un proceso dependiente de energía metabólica y está compuesto en la mayoría de las plantas por un sistema bifásico: uno de alta afinidad que se induce fácilmente en presencia de NO_3^- y que se satura a bajas concentraciones de éste en el medio, y otro de baja afinidad que interviene a mayores

concentraciones y que no muestra cinética de saturación (Miller y Cramer, 2004). Posteriormente, la reducción del NO_3^- en la planta es llevada a cabo de forma sucesiva por dos enzimas, la nitrato reductasa (NR; EC 1.6.6.1) y nitrito reductasa (NiR; EC 1.7.7.1), ambas inducibles fácilmente en presencia de NO_3^- y por la intensidad lumínica (Tischner, 2000) (Figura 1.7). Una vez reducido el NO_3^- a NH_4^+ , éste va a ser asimilado fundamentalmente a través del ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT; EC 6.3.1.2/EC 1.4.1.14) (Lea y Ireland, 1999). El NH_4^+ es incorporado a una forma orgánica por la GS, que cataliza la conversión del glutamato en glutamina (Figura 1.7). Entonces la enzima GOGAT cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina al 2-oxoglutarato produciendo dos moléculas de glutamato (Figura 1.7). Otra enzima a veces esencial en la asimilación del NH_4^+ es la glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.2) (Robinson *et al.*, 1991). Gran parte de los aminoácidos procedentes del catabolismo de proteínas son convertidos en glutamato que es desaminado por la GDH (Figura 1.7). Aunque la GDH también puede llevar acabo la reacción inversa, la asimilación del NH_4^+ por esta vía es escasa en la planta bajo condiciones normales. No obstante, se ha sugerido que la GDH podría jugar un papel importante en la reasimilación del NH_4^+ bajo condiciones de estrés (Barneix, 2007).

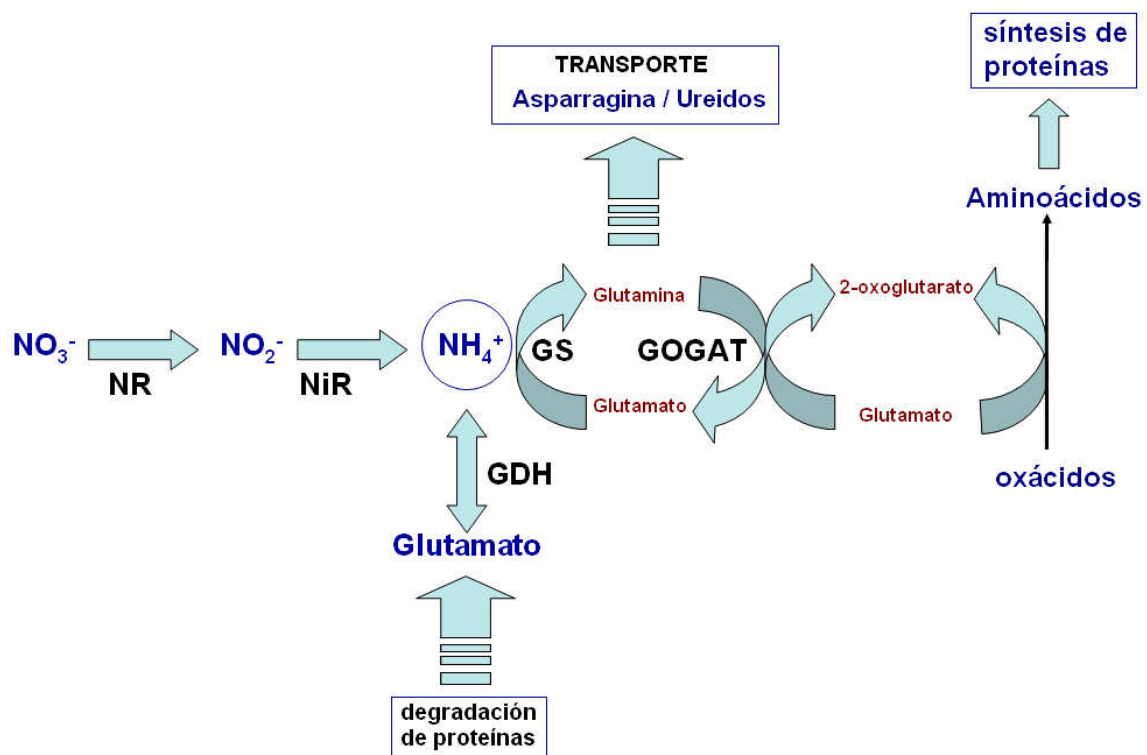


Figura 1.7. Reducción del nitrato (NO_3^-) y asimilación del amonio (NH_4^+) en las plantas.

Diferentes estudios han implicado al B en el metabolismo del N. En heterocistos de cianobacterias el B es esencial para la fijación del N (Bonilla *et al.*, 1990). Además, en plantas de remolacha (*Beta vulgaris*), tomate (*Solanum lycopersicum*), girasol, trigo (*Zea mays*) y colza (*Brassica napus*) deficientes en B se ha observado que la concentración de NO_3^- en las células incrementa como consecuencia de una reducida actividad NR (Bonilla *et al.*, 1988; Kastori y Petrovic, 1989; Ramon *et al.*, 1989; Shen *et al.*, 1993). Algunos autores sugieren que la elevada actividad NR y asimilación de NO_3^- bajo condiciones óptimas de B podría deberse, bien al incremento de la síntesis *de novo* de las proteínas implicadas en el proceso, o bien a la facilitación de la absorción de NO_3^- en la planta (Ruiz *et al.*, 1998). Por otro lado, López-Lefebvre *et al.* (2002) encontraron que un incremento 5 a 20 μM de B en la solución de cultivo estimulaba la asimilación del NH_4^+ en tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Aunque los estudios citados anteriormente relacionan al B con el metabolismo nitrogenado, especialmente bajo condiciones deficientes de este micronutriente, poco se sabe aún sobre lo que ocurre bajo condiciones de toxicidad por B. En girasol, trigo y cebada se ha encontrado que niveles tóxicos de B reducen la actividad NR (Mahboobi *et al.*, 2002), fenómeno que podría ser debido a un antagonismo entre el B y el molibdeno (Mo) (Bonilla *et al.*, 1980), ya que éste último forma parte esencial de la estructura de la NR. Por otro lado, mientras que los pocos datos existentes se centran en la relación entre el exceso de B y la reducción del NO_3^- , siguen quedando muchas preguntas sin resolver a cerca del efecto de este desorden nutricional sobre la asimilación del NH_4^+ .

1.3.4. Cambios a nivel radicular: el papel de la raíz frente al exceso de boro.

Aunque no parecen desarrollarse síntomas visibles en las raíces (Nable *et al.*, 1997), las plantas sometidas a elevados niveles de B muestran una reducción del crecimiento radicular (Nable, 1988; Kalayci *et al.*, 1998; Gunes *et al.*, 2006). Estudios recientes han puesto de manifiesto que la toxicidad por B está asociada a una alteración de la división celular a nivel del meristemo apical de la raíz (Liu *et al.*, 2000). En trigo, Reid *et al.* (2004) encontraron que al aplicar elevadas concentraciones de B sobre la zona apical de la raíz se producía una rápida inhibición del crecimiento radicular, algo que no ocurría cuando se realizaba el mismo procedimiento sobre secciones maduras. Por otra parte, en un estudio con plantas de soja (*Glycine max*) se observó que la inhibición del crecimiento radicular bajo condiciones de exceso de B podría ser resultado de la formación de hipodermis y de la progresiva deposición de

suberina en la endodermis (Ghanati *et al.*, 2005). Más recientemente, Choi *et al.* (2007) han sugerido que la tolerancia a la toxicidad por B en plantas de cebada podría estar relacionada con cambios morfológicos en la raíz a través de un complejo control de los niveles de sacarosa entre el ápice radicular y las hojas. A pesar de que la información al respecto es escasa, todas estas observaciones sugieren un papel de la raíz en la respuesta a la toxicidad por B.

1.3.4.1. Implicación de la pared celular.

Puesto que la mayoría del B se localiza fundamentalmente en la pared celular algunos autores han propuesto que ésta podría tener algún papel en la tolerancia a la toxicidad por B. En este sentido se ha sugerido que las pectinas de la pared celular podrían bloquear el exceso de B de tal manera que la planta eludiría los efectos tóxicos de su acumulación en el citoplasma (Hu *et al.*, 1996). Sin embargo, experimentos realizados con plantas de girasol mostraron que la pared celular de raíces no era capaz de unir B adicional bajo elevadas concentraciones de dicho elemento (Dannel *et al.*, 1999). Esta hipótesis fue también descartada en otro estudio con trigo y cebada, donde genotipos sensibles y tolerantes a la toxicidad por B no presentaban cambios significativos en la cantidad de ácido urónico, un importante componente estructural de las pectinas (Mahboobi *et al.*, 2001). Estos resultados podrían descartar la posibilidad de que una alteración de la cantidad de ácido urónico esté relacionada con la reducción del crecimiento radicular.

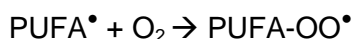
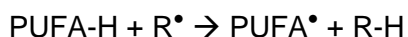
Por otra parte, algunos estudios sugieren que el exceso de B puede afectar el contenido de lignina de las células vegetales (Ghanati *et al.*, 2002), fundamentalmente de la raíz (Ghanati *et al.*, 2005). La lignina es un heteropolímero fenólico formado a partir del acoplamiento oxidativo de tres ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumárico, coniferílico y sinapílico) en una reacción mediada por peroxidasas (EC 1.11.1.7) (Barceló *et al.*, 2004). La incorporación de lignina a las paredes celulares proporciona rigidez estructural y durabilidad a los tejidos. El control espacial y temporal de su biosíntesis es extremadamente importante ya que la lignificación es un proceso metabólicamente costoso que requiere grandes cantidades de esqueletos carbonados y de equivalente reductores (Amthor, 2003). Un gran número de estreses tanto de tipo abiótico como biótico son responsables del incremento de lignina en la pared celular, lo que puede llegar a tener un efecto negativo sobre la elongación de la raíz (Shopfer *et al.*, 2001). Por ejemplo, una elevada deposición de lignina se ha considerado un síntoma dañino que disminuye el crecimiento radicular bajo condiciones de toxicidad

por Al (Tahara *et al.*, 2008). No obstante, otros autores consideran que la lignificación podría contribuir a la adaptación de las plantas frente algunos tipos de estrés. Así se ha sugerido que en ambientes enriquecidos con cobre (Cu) o cadmio (Cd) la deposición de lignina podría formar parte de una respuesta de defensa a través de la cual se reduciría la entrada de estos metales a los tejidos (Ederli *et al.*, 2004; Kováčik y Klejdus, 2008). En cuanto al papel de la lignificación en raíces de plantas sometidas a toxicidad por B, todavía hay un gran desconocimiento, requiriéndose nuevos estudios que aporten datos suficientes o hipótesis al respecto.

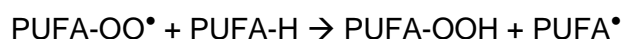
1.3.4.2. Permeabilidad de membrana y eflujo de boro.

Muchas de las plantas tolerantes a la toxicidad por B se caracterizan por mantener niveles reducidos de este elemento en sus tejidos, una característica que ha sido atribuida a la presencia de mecanismos de exclusión en la raíz (Nable *et al.*, 1997). Estos mecanismos se han relacionado por un lado con diferencias en la composición de las membranas y por otro con transportadores que exportan B hacia la solución externa (Hayes y Reid, 2004).

Una alteración de la composición lipídica de las membranas puede afectar a la permeabilidad y absorción de B en la planta (Dordas y Brown, 2000; Dordas *et al.*, 2000). Mutantes de *A. thaliana* con menor proporción de esteroides mostraron una absorción de B un 30% mayor que genotipos salvajes, mientras que mutantes de *A. thaliana* con una mayor proporción de ácidos grasos presentaron una absorción de B un 35% inferior (Dordas y Brown, 2000). Como ocurre bajo otros tipos de estrés, el exceso de B en el medio puede causar un daño oxidativo a las membranas. Recientemente, se ha sugerido que la aparición de peroxidación de lípidos en la raíz podría ser indicativo de una mayor sensibilidad de las plantas a elevadas concentraciones de B (Ardic *et al.*, 2009a). La peroxidación de lípidos es uno de los procesos más investigados que aparecen como consecuencia del efecto de los ROS sobre la integridad de las membranas. Los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), principales componentes de la membrana lipídica, son muy susceptibles de sufrir peroxidación (Smirnov, 1995). Este fenómeno se debe a que los ROS reaccionan con los grupos metilo de los PUFA formando radicales alquilperóxidos (PUFA-OO[•]):



Estos radicales alquilperóxidos son muy reactivos, produciendo reacciones en cadena en la que también se forman hidroperóxidos (PUFA-OOH):



Otra posible fuente de peroxidación de lípidos bajo condiciones de estrés se debe a la acción de la enzima lipoxigenasa (LOX; EC 1.13.11.12) que cataliza la hidroperoxidación de PUFA (Rosahl, 1996). Los hidroperóxidos derivados de la actividad LOX pueden sufrir autocatálisis y formar radicales que desaten una nueva lipoperoxidación en cadena.

Por otro lado, algunos genotipos tolerantes a la toxicidad por B mantienen bajas concentraciones de éste elemento en sus tejidos gracias a la presencia en la raíz de transportadores de membrana que exportan B hacia la solución externa (Takano *et al.*, 2008). Hayes y Reid (2004) hallaron por primera vez este mecanismo en plantas de cebada a través de la comparación fisiológica de dos genotipos que presentaban grandes diferencias en su nivel de tolerancia al exceso de B. Sin embargo, ha sido recientemente cuando se han identificado los genes y proteínas que intervienen en dicho proceso. BOR4, una de las seis proteínas parálogas de BOR1 (BOR2-BOR7) en *A. thaliana*, muestra actividad como exportador de B en células de levadura (Miwa *et al.*, 2007). Además, se ha encontrado que la sobreexpresión del gen *BOR4* en *A. thaliana* permite crecer a las plantas bajo concentraciones tóxicas de B (Miwa *et al.*, 2007). Por otro lado, se han determinado las regiones genómicas que confieren resistencia a la toxicidad de B en cebada, hallándose un gen al que se ha denominado *BOT1* (Sutton *et al.*, 2007). La función de este último sugiere que es un ortólogo de *BOR1* y que es muy similar a otros genes hallados en arroz (*Oryza sativa*) (Figura 1.8) (Reid, 2007), de modo que para evitar confusiones se ha propuesto denominar *BORs* a todo este conjunto de genes (Takano *et al.*, 2008).

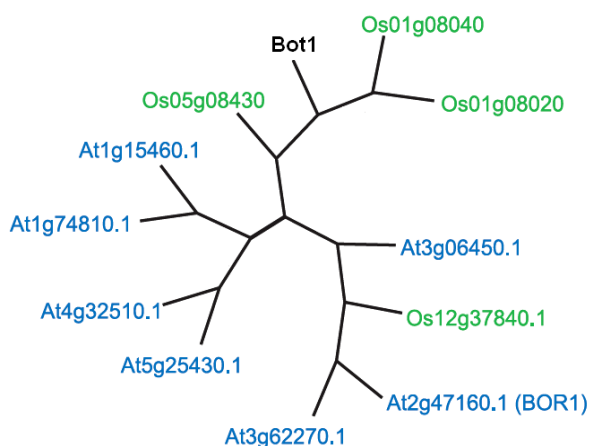


Figura 1.8. Árbol filogenético que muestra la cercanía del gen *BOT1* de cebada con otros *BORs* de arroz (verde) y *Arabidopsis* (azul) (Sutton *et al.*, 2007).

Sin embargo y aunque los programas australianos de mejora genética que son los más avanzados en relación al estrés por B, han utilizado marcadores moleculares para introducir el alelo *BOT1* del cultivar salvaje pero altamente tolerante 'Sahara' en variedades comerciales de cebada, las líneas resultantes son menos productivas desde el punto de vista comercial que las originales (Sutton *et al.*, 2007). Por lo tanto, aunque las herramientas biotecnológicas han permitido mejorar nuestro conocimiento sobre algunos de los mecanismos de tolerancia a la toxicidad de B, en este aspecto su aplicación práctica todavía no se ha alcanzado, por lo que aun se necesita una mayor investigación.

1.3.5. Influencia de otros elementos minerales: calcio, cinc y silicio.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la aplicación exógena de ciertos elementos puede mejorar la tolerancia de las plantas frente a determinados tipos de estrés biótico o abiótico, incluyendo el exceso de B (Eraslan *et al.*, 2008). Concretamente, la aplicación de calcio (Ca), cinc (Zn) o silicio (Si) en el suelo o en la solución nutritiva parece tener un efecto positivo atenuando los síntomas de toxicidad por B. De estos tres elementos, tanto el Ca como el Zn se definen como nutrientes esenciales para las plantas, mientras que el Si se considera un elemento beneficioso (Marschner, 1995).

En el caso del Ca, se ha observado que el incremento de su concentración en el medio radicular puede reducir la absorción y acumulación de B en los tejidos vegetales (Tanaka, 1967). Por ejemplo, en kiwi (*Actinidia deliciosa*) se ha encontrado que la aplicación de Ca a la solución nutritiva reduce los niveles de B y atenúa notablemente los síntomas visibles de toxicidad en hojas (Sotiropoulos *et al.*, 1999). Este efecto beneficioso del Ca podría estar relacionado con el papel de dicho elemento en el mantenimiento de la integridad y funcionalidad de las membranas (Maschner, 1995) o con su cooperación con el B en la pared celular (Brown *et al.*, 2002). Aunque existe poca información al respecto, algunos estudios también sugieren un efecto positivo de la aplicación de Zn. Se ha encontrado que plántulas de *Citrus aurantium* deficientes en Zn son más sensibles a elevadas concentraciones de B que plántulas crecidas bajo condiciones óptimas de dicho elemento (Swietlik, 1995). Un aporte adecuado de Zn también parece ser fundamental para reducir los síntomas de toxicidad por B en tomate (Günes *et al.*, 1999) y maíz (*Zea mays*) (Hosseini *et al.*, 2007). Este efecto beneficioso del Zn podría estar relacionado con la prevención de

una excesiva acumulación de B en los tejidos o con un papel en la protección de las membranas frente a la peroxidación de lípidos (Günes *et al.*, 1999), posiblemente a través de la inducción de la enzima SOD por el Zn. De forma similar, otros estudios han encontrado que el Si ayuda a combatir los efectos tóxicos del B en la planta (Eraslan *et al.*, 2008). Al igual que con el Zn, se ha sugerido que este efecto del Si se debe a la prevención del daño oxidativo (Inal *et al.*, 2009).

1.3.6. Estrés salino y exceso de boro.

La simultaneidad entre salinidad y exceso de B es frecuente en regiones semiáridas, dónde las precipitaciones son escasas y el suelo presenta un pobre drenaje (Marschner, 1995; Nable *et al.*, 1997). Recientemente se ha observado que la aparición de ambos tipos de estrés al mismo tiempo presenta efectos menos tóxicos en la planta de lo que cabría esperar que tuvieran cada uno de ellos por separado, algo que se ha atribuido a la reducida captación de cloruro bajo exceso de B y viceversa (Yermiyahu *et al.*, 2008). Bajo estrés salino el ácido bórico podría interaccionar con componentes de la membrana que regularían la función de ciertas isoformas de acuaporinas y ATPasas como posibles componentes de un mecanismo de tolerancia a la salinidad (Martínez-Ballesta *et al.*, 2008).

Uno de los mecanismos de respuesta más estudiados ante situaciones de estrés osmótico, como la salinidad, es la acumulación de solutos osmoprotectores, entre los que destaca la prolina (Parvaiz y Styawati, 2008). Entre otras propiedades, la prolina protege la estructura de las proteínas frente a la desnaturalización, estabiliza las membranas celulares mediante interacción con fosfolípidos, actúa como detoxificador de radicales hidroxilo, y además es una fuente de energía y de nitrógeno en la planta (Hare *et al.*, 1999; Claussen, 2005). Algunos autores sostienen que la prolina puede detoxificar ROS a través de la formación de un complejo con ellos e inhibir la peroxidación de lípidos (Hong *et al.*, 2000). En este sentido, Molassiotis *et al.* (2006) sugirieron que una disminución del contenido de prolina en hojas podría contribuir al incremento de la peroxidación de lípidos bajo condiciones de exceso de B. Sin embargo, todavía son muy escasos los datos que relacionan la prolina con la toxicidad por B, de modo que aun no está claro el papel de esta molécula frente a este estrés nutricional.

1.3.7. Variabilidad genética.

En las plantas existe una gran diversidad genética en respuesta a elevadas concentraciones de B tanto a nivel interespecífico como intraespecífico (Nable *et al.*, 1997). Las características genéticas que distinguen a unos cultivos de otros van a delimitar que condiciones ambientales, como el tipo de clima o suelo, son las más propicias para su desarrollo y para obtener una elevada productividad (Sharma, 2006). De la misma forma unos cultivos van a ser más sensibles que otros frente a diferentes situaciones adversas como la sequía, la salinidad, el encharcamiento, o en el caso que nos concierne, el exceso de B en el suelo o en el agua de riego (Tabla 1.2). Así, a la hora de comparar el nivel de tolerancia al B que presentan diferentes especies de plantas ha de tenerse en cuenta, no sólo los niveles de B en el medio, sino también el contexto de factores ambientales y variedades genéticas empleadas (Nable *et al.*, 1997).

Tabla 1.2. Tolerancia relativa de diferentes cultivos a elevadas concentraciones de B en el agua de riego. Los datos presentados son aproximados, de modo que pueden variar dependiendo del tipo de suelo, clima y variedad del cultivo (basado en Moss y Nagpal, 2003).

Boro en el agua de riego (mg · L ⁻¹)	Cultivo
<1	Cerezo, ciruelo, vid, cebolla, ajo, trigo, cebada, girasol, sésamo, fresa, judía, lima, zarzamora, melocotonero
1 – 2	Pimiento rojo, guisante, zanahoria, rábano, patata, pepino
2 – 6	Lechuga, repollo, apio, nabo, avena, maíz, alcachofa, tabaco, mostaza, trébol, calabaza, melón, tomate, alfalfa, perejil, remolacha
6 – 15	Espárrago

Los genotipos tolerantes a la toxicidad por B suelen proceder de las mismas zonas o de regiones cercanas dónde se han encontrado concentraciones tóxicas de B en el suelo. Esto indica que el B puede ejercer una presión selectiva sobre los cultivos y que dichas zonas pueden actuar como centros de diversidad (Nable *et al.*, 1997). Un ejemplo de ello se ha observado con el trigo o el guisante originarios de regiones del Este Mediterráneo, Oeste de Asia/Norte de África (WANA) e India Subcontinental (Moody *et al.*, 1988; Bagheri *et al.*, 1994; Jamjob, 1996). En trigo, cebada, arroz, guisante, fresa (*Fragaria ananassa*) y en algunas especies del género *Citrus* existe

una amplia variación intraespecífica en respuesta a la toxicidad por B (Nable *et al.*, 1997), de tal modo que en algunas de estas plantas se han analizado un gran número de genotipos (Tabla 1.3). Esto convierte a la comparación de variedades de la misma especie o de líneas isogénicas cercanas en una herramienta útil en la búsqueda de características fisiológicas implicadas en la tolerancia al B, de manera que dichas características puedan ser incorporadas a los proyectos de mejora de los cultivos (Nable *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 2007).

Tabla 1.3. Colecciones de germoplasma procedentes de cultivos australianos en los que se analizó la respuesta a la toxicidad por B entre los años 1988 y 1996 (basado en Nable *et al.*, 1997).

Cultivo	Especie	Nº de genotipos analizados
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	1576
	<i>Triticum turgidum var. durum</i>	300
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i> *	>1500
		350
Guisante	<i>Pisum sativum</i> *	135
		617
Alfalfa	<i>Medicago spp.</i>	681

*Diferentes estimas según la fuente consultada.

1.4. Interés del tomate: cultivo y objeto de estudio.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Figura 1.9) pertenece a la familia Solanaceae. La clasificación filogenética de esta familia se revisó recientemente de manera que el género *Lycopersicon* se introdujo dentro del género *Solanum*, de ahí que el tomate fuese antes conocido como *Lycopersicon esculentum*. Es una planta herbácea y perenne originaria de la región Andina que incluye parte de Chile, Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú. Su domesticación comenzó antes de ser introducida en Europa en el siglo XV, intensificándose aquí durante los siglos XVIII, XIX y XX (Bai y Lindhout, 2007). En la actualidad, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el tomate es después de la patata la segunda hortaliza más cultivada en el mundo. En el año 2006 alcanzó unos valores de producción de aproximadamente 125.5 millones de toneladas y su cultivo llegó a ocupar un área global de 4.6 millones de hectáreas (ha). La región Mediterránea es una de las principales productoras de tomate, dónde destaca España con más de 60 t · ha⁻¹, lo que la sitúa junto a Estados Unidos en el primer puesto en cuanto a rendimiento se refiere.

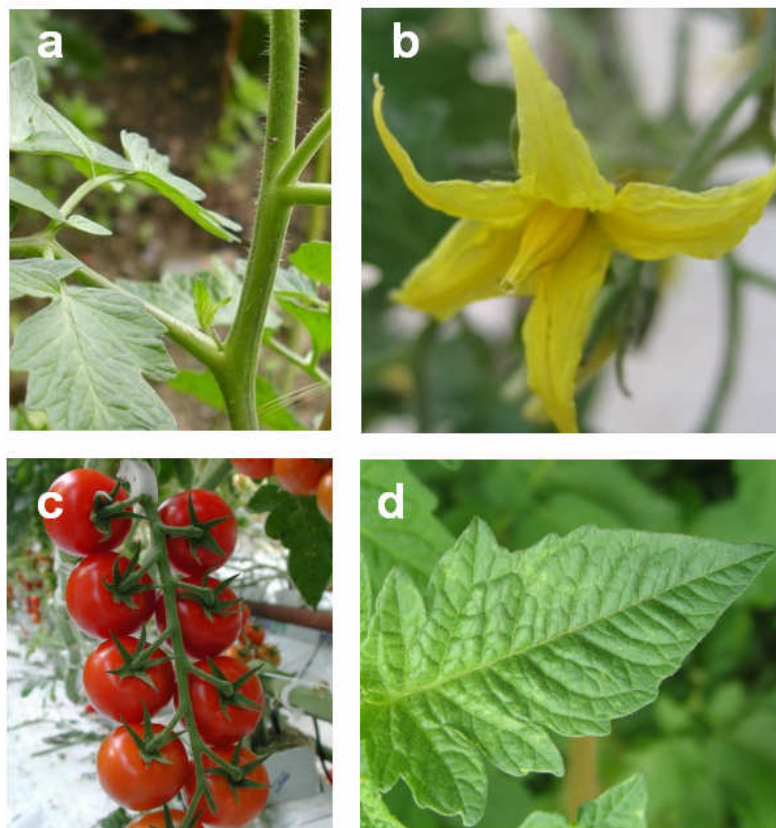


Figura 1.9. Detalles de a) tallo, b) flor, c) fruto y d) hoja característicos de plantas de tomate doméstico (*Solanum lycopersicum*).

El interés económico y la expansión del cultivo del tomate se deriva tanto de la gran aceptación del sabor como de las propiedades nutritivas de su fruto, que es rico en vitaminas y antioxidantes como licopeno, β -caroteno y ácido ascórbico (Rosales, 2008). Aunque es una planta de origen subtropical, el incremento de la demanda de tomate ha dado lugar a que se cultive en una serie de ambientes dónde las condiciones climatológicas o edáficas no son del todo adecuadas para su crecimiento (Bai y Lindhout, 2007). Por esta razón en muchas regiones del mundo el tomate se cultiva en invernadero (Figura 1.10). Esto permite alargar el ciclo productivo y controlar de manera más eficiente factores ambientales como la temperatura, la luz o la humedad (Rosales, 2008). No obstante, sigue habiendo un gran número de factores que limitan el cultivo del tomate y que son por tanto causantes de estrés en la planta. Así por ejemplo, en la región Mediterránea, dónde gran parte del tomate se cultiva bajo invernadero, existen problemas derivados de la salinidad y otros factores que se ven agravados por la limitación de los recursos hídricos (Martínez *et al.*, 1987).



Figura 1.10. Plantas de tomate cultivadas bajo invernadero.

De forma paralela a la expansión agrícola del tomate, se ha incrementado el interés científico por conocer y optimizar su cultivo. La gran diversidad genética que presenta las diferentes especies y variedades de esta planta ha facilitado la búsqueda de caracteres que pueden ser empleados en programas de mejora. Se han desarrollado numerosas bases de datos y colecciones genéticas entre las que destacan el banco de germoplasma de solanáceas del Jardín Botánico y Experimental de los Países Bajos (<http://www.bgard.science.ru.nl>) y el Centro de Recursos

Genéticos de Tomate de California (TGRC, <http://tgrc.ucdavis.edu/>), dónde existe una amplia colección de mutantes. Además, gracias a las nuevas tecnologías relacionadas con la secuenciación de ADN y proteínas, hoy día se está analizando el genoma del tomate y estudiando su expresión (Bai y Lindhout, 2007). En 2003 se inició el Proyecto Internacional de Genómica de Solanáceas (SOL) que engloba a diez países y que ha generado una gran cantidad de información que puede ser consultada en el SOL Genomics Network (SGN, <http://sgn.conell.edu>). Por otra parte, el tomate presenta una serie de características que ayudan a llevar a la práctica los estudios fisiológicos y moleculares, como por ejemplo la relativa facilidad con que puede ser transformado con *Agrobacterium tumefaciens* (Cortina y Culiáñez-Macià, 2005; Qiu *et al.*, 2007) o de ser injertado en diferentes combinaciones con otras plantas (Rivero *et al.*, 2003 a, b; Ruiz *et al.*, 2005).

1.5. Objetivos.

Como hemos descrito en los apartados anteriores, el B es un micronutriente esencial para las plantas superiores (Blevins y Lukaszewski, 1998), pero a elevadas concentraciones en el medio se convierte en un elemento tóxico, acarreado no sólo un problema medioambiental sino también un problema agrícola, puesto que reduce la calidad y el rendimiento de las cosechas (Nable *et al.*, 1997). Éste puede adquirir una mayor relevancia en las zonas semiáridas, como en la región suroeste de la costa Mediterránea española, dónde existe un gran desarrollo agrícola y el agua constituye cada año un factor más limitante. Aquí, el uso de agua desalinizada para el riego se ha convertido en una alternativa cada vez más demandada, a pesar de que ésta puede contener niveles de B demasiado elevados para el desarrollo de algunos cultivos (Parks y Edwards, 2005; Vouthckow, 2005). Por esta razón se requiere un estudio más profundo de que fenómenos y respuestas tienen lugar en las plantas cuando se encuentran sometidas a exceso de B.

Algunos de los procesos más importantes que permiten mantener el crecimiento y productividad de las plantas frente a condiciones de estrés todavía no se han estudiado a fondo y continúan siendo causa de debate en el caso de la toxicidad por B, como es el caso del metabolismo oxidativo y el metabolismo nitrogenado (Mahboobi *et al.*, 2002; Gunes *et al.*, 2006). De la misma forma, aunque recientemente se han empezado a caracterizar los mecanismos de exclusión que presentan ciertos genotipos de plantas tolerantes a la toxicidad por B, aun no se conocen bien los procesos que tienen lugar en la raíz bajo dicho estrés nutricional (Reid *et al.* 2004; Hayes y Reid, 2004). Por tanto, todavía es necesario una mayor caracterización y conocimiento de los parámetros fisiológicos inducidos por el exceso de B en la planta, los cuales nos permitan obtener herramientas aplicadas a la mejora de los cultivos, así como para prevenir a tiempo la aparición de los síntomas de toxicidad.

Puesto que el tomate es uno de los cultivos más abundantes en las regiones españolas que pueden ser propicias a presentar problemas de toxicidad por B, en el presente estudio hemos decido utilizar dos cultivares comerciales de dicha planta. El uso de dos cultivares puede ser una forma de comparar dos líneas genéticas cercanas, pero también de duplicar la fiabilidad de los resultados.

En vista de lo descrito anteriormente, en el presente trabajo hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1) Determinar el posible efecto de niveles tóxicos de B sobre el metabolismo oxidativo y antioxidante, así como sobre el metabolismo nitrogenado de plantas de tomate. (Bloque Experimental I)
- 2) Estudiar en la raíz el papel de la membrana así como de diversos aspectos de la pared celular, como la lignificación y la expresión de proteínas presentes en ésta, bajo condiciones de exceso de B. (Bloque Experimental II)
- 3) Determinar bajo condiciones de exceso de B el comportamiento temporal de diferentes indicadores de estrés abiótico en hojas de plantas de tomate, y en tal caso seleccionar aquellos parámetros más indicativos de la presencia de niveles tóxicos de B en la planta. (Bloque Experimental III)

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental, material vegetal y medio de cultivo.

2.1.1. Bloque experimental I.

Para la realización del primer bloque experimental (BE1) se utilizaron dos cultivares comerciales (Kosaco y Josefina) de plantas de tomate [*Solanum lycopersicum* L. (*Lycopersicon esculentum* Mill)] que se cultivan frecuentemente en invernaderos del suroeste de España. Las semillas de ambos cultivares germinaron y crecieron durante 30 días en una bandeja con celdas (tamaño de celda, 3 cm x 3 cm x 10 cm) emplazada en un invernadero experimental (Granada, Saliplant S.L.). Posteriormente, las plántulas de 30 días fueron transferidas a una cámara de cultivo bajo condiciones controladas (Figura 2.1.) con humedad relativa 60-80%, temperatura 25°C/15°C (día/noche), y 16h/8h de fotoperiodo con un PPF (photosynthetic photon flux density) de 350 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ (medido con un sensor SB quantum 190, LI - COR Inc., Lincoln, NE, EEUU).

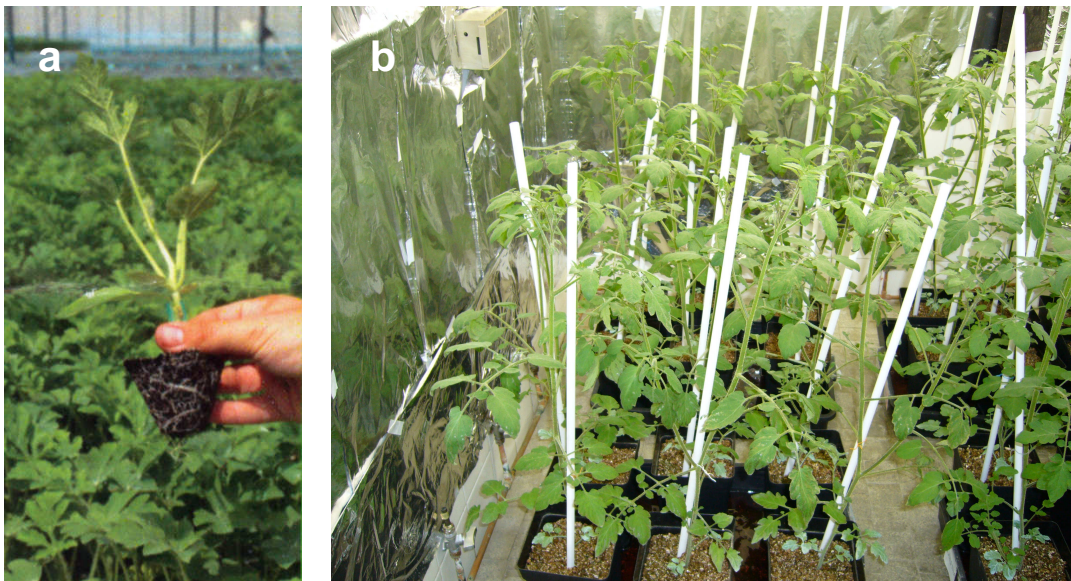


Figura 2.1. Plantas en invernadero (a) y en la cámara de cultivo (b).

Bajo estas condiciones las plantas crecieron en macetas individuales (25 cm de diámetro superior, 17 cm de diámetro inferior y 25 cm de altura) de 8 L de volumen y rellenas con vermiculita. Durante todo el experimento las plantas crecieron con una solución nutritiva consistente en: 4 mM KNO_3 , 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM MgSO_4 , 6 mM KH_2PO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 2 μM MnCl_2 , 1 μM ZnSO_4 , 0.25 μM CuSO_4 , 0.1 μM Na_2MoO_4 , 5 μM Fe-EDDHA y 50 μM H_3BO_3 . La solución nutritiva (pH 5.8) fue renovada cada 3 días.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Los tratamientos de B (0.5 mM y 2 mM) se iniciaron 42 días después de la germinación y fueron mantenidos durante 14 días. El tratamiento control recibió solamente la solución nutritiva completa con 0.05 mM de B. El diseño experimental consistió en un bloque aleatorio completo con tres tratamientos, seis plantas por tratamiento dispuestas en macetas individuales y con tres réplicas. Además el experimento fue repetido tres veces bajo las mismas condiciones (n=9).

El día 42 después de la germinación, inmediatamente antes de iniciar los tratamientos con B, se muestrearon hojas de tres plantas por cada cultivar. Dichas hojas se secaron en una estufa de aire forzado a 70°C durante 24 horas para posteriormente anotar el peso seco (ps) como g de ps por planta. El resto del material vegetal (hojas) se recolectó 56 días después de la germinación, es decir, transcurridos 14 días desde el inicio de los tratamientos. Una parte de este material fue secado para calcular el ps, de modo que se molió y almacenó en un desecador. La otra parte se enjuagó tres veces con agua destilada tras ser descontaminada con un detergente no iónico al 1%, se secó sobre papel de filtro e inmediatamente después se congeló con nitrógeno líquido para su almacenaje y posterior análisis. Además, algunas hojas recién cortadas y descontaminadas (material fresco) se utilizaron para analizar la concentración de B libre. La figura 2.2. muestra un esquema de este diseño experimental, y la tabla 2.1. los parámetros analizados en el material vegetal muestreado.

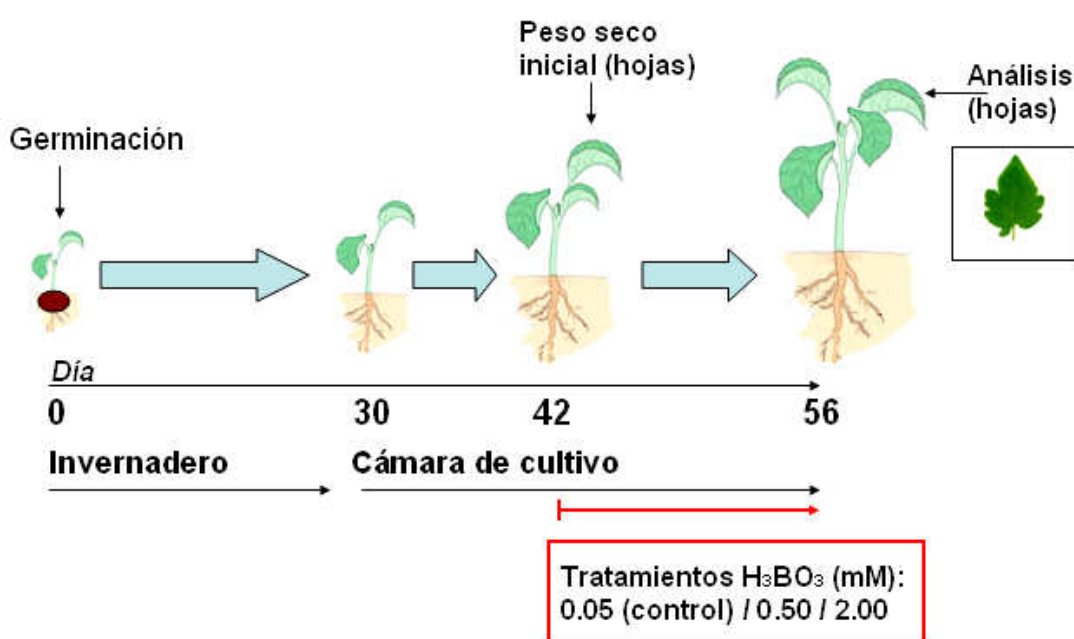


Figura 2.2. Esquema del primer diseño experimental (BE1).

Tabla 2.1. Parámetros analizados en hojas de plantas de tomate sometidas a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días (BE1).

Material seco		
<i>Parámetros de crecimiento</i>	Biomasa foliar	RGR _F
<i>Boro y formas de nitrógeno</i>	B total	NO ₃ ⁻
	N orgánico	NH ₄ ⁺
Material fresco		
	B libre	
Material congelado		
<i>Estrés oxidativo y metabolismo antioxidante (incluyendo metabolismo del ascorbato)</i>	MDA	SOD
	H ₂ O ₂	CAT
	FRAP	APOX
	TEAC	MDHAR
	ASA	DHAR
	GSH	GR
	Glucosa	AO
	Sacarosa	L-GalDH
<i>Metabolismo y eficiencia en el uso del nitrógeno</i>	NR	GS
	NiR	GOGAT
	Aminoácidos	GDH
	Proteínas	TNA
	TNC	NUpE
	NUtE	

2.1.2. Bloque experimental II.

Hasta el día 42 después de la germinación, el bloque experimental II (BE2) se llevó a cabo de la misma forma y en las mismas condiciones, incluido los tratamientos de B, que en el BE1 (véase pág. 35 y 36). Sin embargo, esta vez los tratamientos de B se aplicaron durante 16 días y el material vegetal muestreado fue la raíz de las plantas de tomate (Figura 2.3). Así, el día 42 se anotó el ps inicial de las raíces. En el BE2 los muestreos se llevaron a cabo a los 4, 8 y 16 días después del inicio de los tratamientos (Figura 2.3), siguiendo el mismo procedimiento que en el BE1. La tabla 2.2 muestra los parámetros que se analizaron en cada caso.

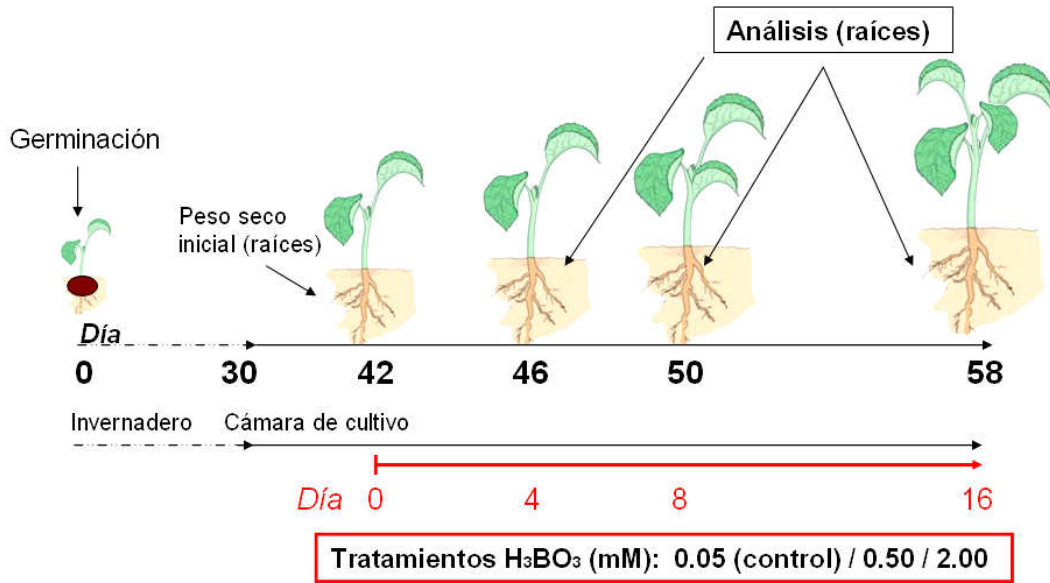


Figura 2.3. Esquema del segundo diseño experimental (BE2).

Tabla 2.2. Parámetros analizados en raíces de plantas de tomate sometidas a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 16 días (BE2).

Material seco		
<i>Parámetros de crecimiento</i>	Biomasa radicular	
	RGR _R	
	Relación parte aérea/raíz	
<i>Concentración de B</i>	B total	
Material fresco		
<i>Concentración de boro</i>	B libre	
<i>Membrana</i>	Permeabilidad de membrana	
	Eflujo de B	
<i>Estrés oxidativo</i>	O ₂ ^{••}	
Material congelado		
<i>Estrés oxidativo</i>	H ₂ O ₂ [*]	LOX [*]
	MDA [*]	
<i>Lignificación</i>	PPO [*]	Lignina
	GPOX [*]	Fenoles
	SPOX [*]	PAL
<i>Gel 2D</i>	Proteínas ionicamente unidas a la pared celular ^{**}	

Nota: (*) Parámetros analizados en raíces muestreadas a los 4, 8 y 16 días de tratamientos. El resto de parámetros solamente fueron analizados en raíces de 16 días. (**) Los gels bidimensionales (2D) se realizaron sólo con raíces sometidas a 0.05 (control) y 2 mM B.

2.1.3. Bloque experimental III.

Hasta el día 42 después de la germinación, el bloque experimental III (BE3) se realizó de la misma forma y en las mismas condiciones que en los dos bloques experimentales anteriores. Sin embargo, en este caso los tratamientos de B se aplicaron durante 15 días y el material vegetal muestreado fue hojas de plantas de tomate (Figura 2.4). Los muestreos se llevaron a cabo a los 0, 5, 10 y 15 días después del inicio de los tratamientos (Figura 2.4), siguiendo el mismo procedimiento que en los experimentos anteriores. La tabla 2.3 muestra los parámetros que se analizaron en cada caso.

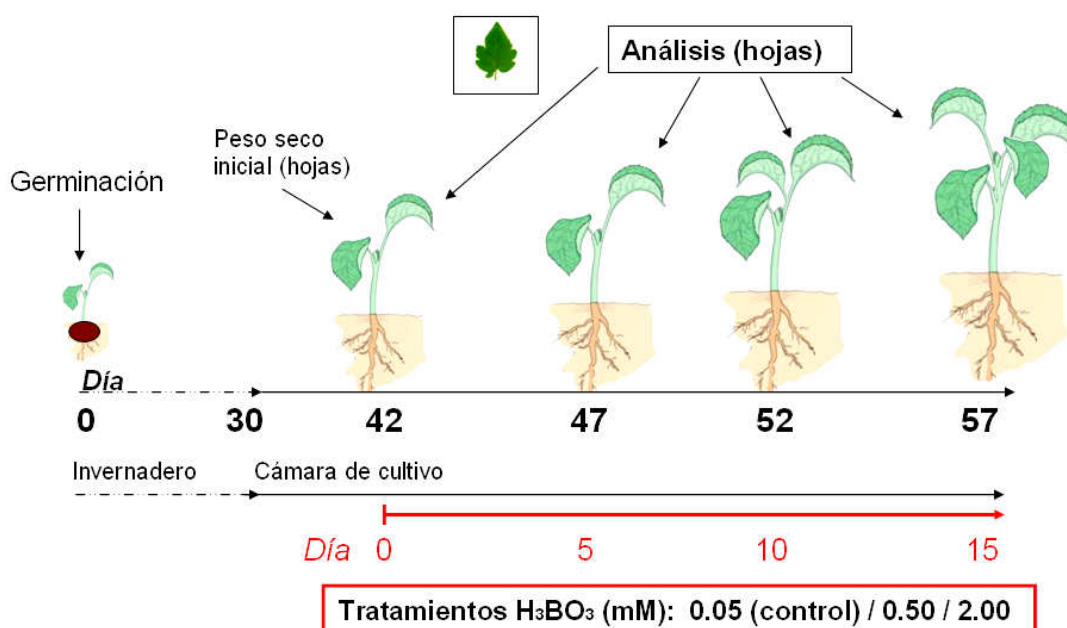


Figura 2.4. Esquema del tercer diseño experimental (BE3).

Tabla 2.3. Parámetros analizados en hojas de plantas de tomate sometidas a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 0, 5, 10 o 15 días (BE3).

Material seco	
<i>Parámetros de crecimiento</i>	Biomasa foliar Área foliar
<i>Nutrientes minerales</i>	B
Material fresco	
<i>Estrés oxidativo</i>	$O_2^{\bullet-}$
Material congelado	
<i>Estrés oxidativo</i>	H_2O_2 , MDA
<i>Estrés osmótico</i>	Prolina
<i>Metabolismo fenólico</i>	Fenoles totales PPO Flavonoides GPOX
<i>Pigmentos</i>	Clorofilas, Carotenoides, Antocianinas

2.2. Análisis del material vegetal.

2.2.1. Parámetros de crecimiento.

2.2.1.1. Tasa de crecimiento relativo.

La tasa de crecimiento relativo (RGR) fue calculada utilizando el incremento en ps de las plantas a lo largo del tiempo (T ; días después de la germinación), desde el principio hasta el final de la aplicación de los tratamientos. Para ello se empleó la siguiente ecuación (Bellaoui y Brown, 1998):

$$\text{Exp1 (hojas): } \text{RGR}_F = (\ln ps_f - \ln ps_i) / (T_f - T_i)$$

$$(T_i) = 42; (T_f) = 56$$

$$\text{Exp2 (raíces): } \text{RGR}_R = (\ln ps_f - \ln ps_i) / (T_f - T_i)$$

$$(T_i) = 42; (T_f) = 58$$

2.2.1.2. Área foliar.

Para analizar el área foliar, todas las hojas de cada planta con un tamaño superior a 2 cm de longitud fueron digitalizadas mediante un escáner (CanoScan 5000F, Canon) (Figura 2.5). Posteriormente la imagen digital original se procesó con Adobe Photoshop v.9.0 para obtener una imagen monocromática en blanco y negro (Figura 2.5). A partir de esta imagen se calculó el área foliar (cm^2 por planta) utilizando el programa ImageJ v.1.41 (National Institute of Health, EEUU).

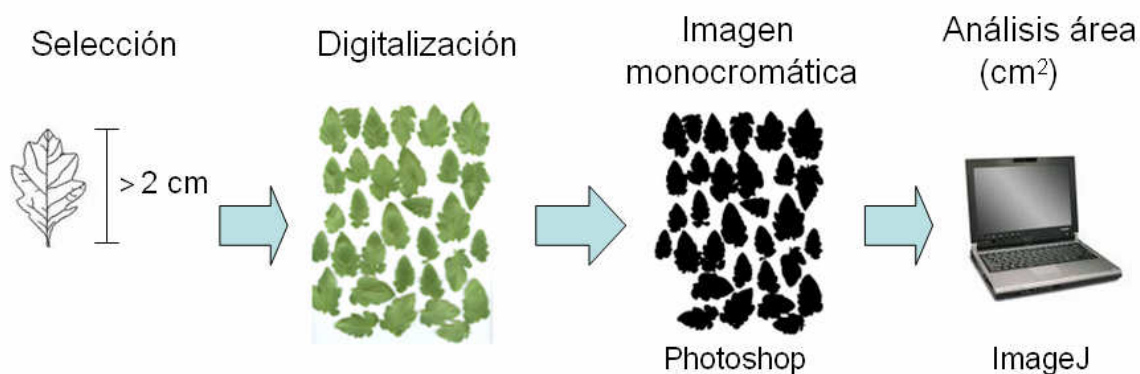


Figura 2.5. Análisis de área foliar.

2.2.2. Determinaciones analíticas.

2.2.2.1. Concentración de boro total y libre.

La concentración de B total se determinó después de la digestión con H_2SO_4 (5 mL al 98%) y H_2O_2 al 30% (v/v) de 0.15 g de material vegetal seco y molido. Para la extracción de B libre se cortaron 0.15 g de hojas frescas en discos de 7 mm de diámetro. Éstos se colocaron en tubos de ensayo junto con 5 mL de medio de infiltración (propanol 1%) y se sometieron al vacío durante 25 min. En el caso de las raíces, se cortó 1 g de pequeños segmentos de aproximadamente 1 mm, que fueron sometidos al vacío durante 35 min tras ser introducidos en tubos de ensayo junto con 5 mL de medio de infiltración. Posteriormente, el contenido de los tubos fue filtrado y el resultado fue utilizado para determinar la concentración de B libre. Para la cuantificación de la concentración de B, tanto libre como total, se siguió el método de la azometina-H, midiendo la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro (Wolf, 1974). La concentración de B total se expresó como $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de ps, mientras que la B libre como $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco (pf).

2.2.2.2. Nitrógeno orgánico, nitratos y amonio.

La concentración de N orgánico se determinó después de la digestión con H_2SO_4 (5mL al 98%) y H_2O_2 al 30% (v/v) de 0.15 g de material vegetal seco y molido. Posteriormente, 1 mL de muestra mineralizada y diluida con agua destilada se añadió a un medio de reacción que contenía buffer [5% (p/v) tartrato potásico, 100 mM fosfato sódico, 5.4 % (p/v) hidróxido sódico], 15 % (p/v) de salicilato sódico, 0.03 % (p/v) de nitroprusiato sódico y 5.35% (v/v) de hipoclorito sódico. Tras incubar la mezcla resultante a 37°C durante 15 min, se determinó el N orgánico por espectrofotometría (Baethgen y Alley, 1989). Los resultados obtenidos fueron expresados como $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ps.

NO_3^- y NH_4^+ fueron analizados a partir de un extracto acuoso realizado con 0.2 g de material seco y molido en 10 mL de agua destilada. A 100 μL de dicho extracto se adicionó una solución que contenía 10% (p/v) de ácido salicílico en H_2SO_4 al 96%. La mezcla resultante se utilizó para determinar por espectrofotometría la concentración de NO_3^- (Cataldo *et al.*, 1975). Por otro lado, el NH_4^+ se determinó siguiendo el método

colorimétrico descrito por Krom (1980). Los resultados obtenidos fueron expresados en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ps.

2.2.2.3. Especies reactivas de oxígeno: $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 .

La detección del $\text{O}_2^{\bullet-}$ se realizó en base a su habilidad para reducir el nitroblue tetrazolium (NBT) (Doke, 1983) y se determinó según el método descrito por Kubis (2008). Para ello, 0.1 g de material vegetal fresco se cortó en fragmentos de 1 mm e inmediatamente después se introdujo en tubos de ensayo junto con 4 mL de buffer fosfato potásico 10 mM (pH 7.8) que contenía 0.05% (p/v) de NBT y 10 mM de azida de sodio (NaN_3). Tras incubar 1 h a temperatura ambiente, las muestras fueron filtradas e introducidas en un baño a 85°C durante 15 min. Posteriormente, tras enfriar rápidamente las muestras con hielo, se midió su absorbancia a 580 nm y la cantidad detectada de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se expresó como $A_{580} \cdot \text{g}^{-1}$ pf.

La extracción y cuantificación del H_2O_2 se realizó siguiendo el método colorimétrico de Mukherjee y Choudhuri (1983), basado en el complejo que forma el H_2O_2 al reaccionar con el titanio (Ti^{4+}). Para extraer el H_2O_2 , 1 g de material vegetal se homogenizó en acetona muy fría. Después, una alícuota (1 mL) de este extracto se mezcló con 200 μL de dióxido de titanio al 0.1% en 20% (v/v) de H_2SO_4 . El resultado se agitó y centrifugó a $6000 \times g$ durante 15 min. La intensidad de color amarillo del sobrenadante fue medida a 415 nm, calculando la concentración de H_2O_2 de las muestras frente a una curva patrón. La concentración de H_2O_2 fue expresada en $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ pf.

2.2.2.4. Malondialdehído.

Para la extracción de malondialdehído (MDA) se homogenizaron hojas de material fresco con 5 mL de tampón 50 mM (0.07% de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1.6% de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) en un mortero y posteriormente se centrifugaron a $20000 \times g$ durante 25 min en una centrifuga refrigerada. Posteriormente, 1 mL de alícuota de sobrenadante se mezcló en tubos de ensayo con 4 mL de ácido tricloroacético al 20% que contenía 0.5% de ácido tiobarbitúrico. La mezcla resultante se calentó a 95°C durante 30 min para luego ser enfriada rápidamente en un baño con hielo. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a $10000 \times g$ durante 10 min y la absorbancia del sobrenadante se midió a 532 nm. Los valores de la absorción

inespecífica a 600 nm se extrajeron de la lectura a 532 nm. La concentración de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del mismo de $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Heath y Packer, 1968; Fu y Huang, 2001), y fue expresada en $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$.

2.2.2.5. Actividad antioxidante total: Tests FRAP y TEAC.

La actividad antioxidante no enzimática total se midió mediante los tests FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) y TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity). Para la realización del test FRAP se añadió una alícuota de 100 μL de extracto de hoja (0.5 g / 10 mL de metanol) a 2 mL de reactivo FRAP (1mM 2,4,6-tripiryridyl-2-triazine y 20 mM de cloruro férrico en 0.25 M de acetato de sodio pH 3.6). La mezcla se dejó a temperatura ambiente (20°C) durante 5 min y entonces se midió la absorbancia a 593 nm. Los datos fueron enfrentados con una curva patrón de 25 a 1600 μM de ión ferroso (Benzie y Strain, 1996; Rosales *et al.*, 2006). Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$.

El test TEAC fue cuantificado mediante una versión modificada del método de Re *et al.* (1999) y Cai *et al.* (2004). En primer lugar, se mezcló 7 mM de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) con 2.45 mM de persulfato potásico para producir el catión ABTS^+ , para lo cual la mezcla resultante fue incubada durante 16 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se diluyó con metanol la solución de ABTS^+ resultante y se ajustó su absorbancia (usando como blanco metanol) hasta que registró un valor de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Una alícuota de 100 μL de extracto de hoja (0.5 g / 10 mL de metanol) se mezcló vigorosamente con 3.9 mL de solución de ABTS^+ diluido, y se dejó en oscuridad a temperatura ambiente durante 6 min e inmediatamente después se registró la absorbancia a 734 nm. Las muestras fueron enfrentadas a una curva patrón de 0-15 μM de trolox que siguió el mismo procedimiento anterior. Finalmente los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$.

2.2.2.6. Ascorbato y glutation.

Para la extracción y cuantificación de ASA total (ASA reducido + DHA), ASA reducido y DHA se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Gossett *et al.* (1994). Dicho método está basado en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por el ASA en solución ácida. Se homogenizó 0.5 g de material vegetal fresco en 5 mL de ácido metafosfórico al 5% (p/v), se filtró y finalmente fue centrifugado a $10000 \times g$ (4°C) durante 15 min. Después 0.2 mL de sobrenadante se adicionaron a un tubo de ensayo junto con 0.5 mL de tampón fosfato sódico 150 mM (pH 7.5) y 0.1 mL de dithiothreitol (DTT) 10 mM. La mezcla se agitó e incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 min. A continuación se adicionó 0.1 mL de N-etilmaleimida al 0.5% (p/v), 0.4 mL de ácido trifluoroacético al 10% (v/v), 0.4 mL de ácido ortofosfórico al 44% (v/v), 0.4 mL de 2,2'-bipiridil al 4% (p/v) en etanol al 70% y 0.2 mL de FeCl_3 al 3% (p/v). Entonces los tubos de ensayo se agitaron e incubaron a 40°C y en oscuridad durante 40 min. Por último se midió la absorbancia a 525 nm frente a una curva patrón de ASA que siguió el mismo procedimiento anterior. Los resultados obtenidos se utilizaron para cuantificar la concentración de ASA total, mientras que la cuantificación de ASA reducido se realizó de igual forma que el procedimiento anterior sustituyendo 0.1 mL de DTT por 0.1 mL de H_2O_2 destilada. Finalmente, la concentración de DHA se dedujo de la diferencia entre ASA total y ASA reducido. Los resultados fueron expresados en $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$.

La determinación de la concentración de GSH total (GSH reducido + GSSG), GSH reducido y GSSG se realizó también de acuerdo con Gossett *et al.* (1994). Dicho método está basado en la especificidad de la enzima GR por el GSSG. En primer lugar, la extracción se llevó a cabo homogenizando 0.5 g de material fresco con 5 mL de ácido metafosfórico al 5% (v/v). El homogenizado se filtró y centrifugó a $20000 \times g$ durante 15 min a 0°C . Para la cuantificación del GSH total se realizó una mezcla de reacción que contenía 50 μL de extracto, 250 μL de tampón Heppes-HCl 50 mM (pH 7.6) que contenía 330 mM de betaína, y 150 μL de ácido sulfosalicílico al 10% (v/v). Posteriormente, en un tubo de ensayo se adicionaron 150 μL de la mezcla de reacción anterior, 700 μL de NADPH 0.3 mM y 100 μL de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 6 mM, la mezcla se agitó y tras 4 min de espera se añadieron 50 μL de GR (10 U/mL). Finalmente se procedió a la lectura de las muestras a 412 nm frente a una curva patrón de GSH. Por otra parte, para la cuantificación del GSSG se mezclaron en un tubo de ensayo 150 μL de extracto con 17 μL de ácido sulfosalicílico al 10% (v/v). De la mezcla resultante se tomó un volumen de 180 μL y se añadió a otro tubo de

ensayo junto con 12 μL de vinilpiridina y 20 μL de trietanolamina al 50 % (v/v). La solución resultante se agitó durante 30 segundos y se incubó a 25°C en oscuridad durante 25 min. Posteriormente de ésta se extrajo un volumen de 150 μL y se adicionó 700 μL de NADPH 0.3 mM y 100 μL de DTNB 6 mM. Esta mezcla se agitó y tras 4 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 50 μL de GR (10 U/mL). Entonces las muestras se midieron a 412 nm frente a una curva patrón de GSH. Por último la cuantificación de GSH reducido se obtuvo de la diferencia entre la concentración de GSH total y GSSG. Los resultados fueron expresados en $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$.

2.2.2.7. Azúcares solubles: sacarosa, glucosa y fructosa.

La extracción y cuantificación de sacarosa, D-glucosa y D-fructosa se llevó a cabo empleando un kit enzimático (Roche Biopharm, Francia) basado en la lectura de la formación de NADPH a 340 nm. La concentración de los diferentes azúcares se expresó en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$.

2.2.2.8. Fenoles y flavonoides.

Los fenoles totales fueron extraídos con metanol, cloroformo y solución salina al 1%, mediante homogenización. Posteriormente el homogeneizado fue filtrado y centrifugado a 3000 x g durante 10 min. De la fase metabólica se tomó una alícuota de 0.5 ml a la que se le añadió 1.5 ml de Na_2CO_3 al 2%, 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 % y 2.75 ml de agua destilada. La mezcla de reacción se incubó durante 60 min a temperatura ambiente (Singleton *et al.*, 1985). El contenido se cuantificó a una absorbancia de 765 nm. Los resultados obtenidos fueron expresados como μg de ácido cafeico $\cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$.

El contenido en flavonoides fue medido mediante el método colorimétrico de Kim *et al.* (2003). Tras una homogenización con el mismo extractante que el usado para los fenoles, se tomaron 0.5 ml de alícuota a la que se añadió 2 ml de agua destilada y 0.15 ml de NaNO_2 al 5%. A continuación se incubaron las muestras durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se añadió 0.15 ml de una solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ al 10% y 1 ml de una solución de 1 M NaOH. La mezcla de reacción fue bien agitada e incubada a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. La absorbancia se midió a 415 nm y el contenido de

flavonoides fue calculado usando una curva patrón de rutín. Los datos fueron expresados como $\mu\text{g rutín} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$.

2.2.2.9. Lignina.

La lignina fue extraída y cuantificada de acuerdo al método de Bruce y West (27). Dos gramos de raíces fueron homogenizados en 6 mL de etanol al 99.5% y el extracto resultante centrifugado a $10000 \times g$ durante 15 min. El pellet de las muestras se transfirió a placas de petri y se dejó secar durante al menos una noche. Entonces una cantidad de 10 mg de residuo seco fue transferida a tubos de vidrio junto con 1 mL de HCl 2 mM y 0.1 mL de ácido tioglicólico. Los tubos se sellaron y se incubaron a 100°C durante 12 h. Después de enfriarse, el contenido fue centrifugado a $14000 \times g$ durante 30 min a 4°C . El pellet se lavó una vez con 1 mL de agua destilada y se centrifugó de nuevo a $14000 \times g$ durante 30 min. Posteriormente el pellet fue resuspendido en 1 mL de 2.5 M NaOH y se agitó cuidadosamente durante 18 h a 25°C . La mezcla resultante se centrifugó a $14000 \times g$ durante 30 min. El sobrenadante fue transferido a tubos de plástico de 2 mL, junto con 1 mL de HCl concentrado y se incubó durante 6 h a 4°C para permitir la precipiación del complejo lignina tioglicolato. Finalmente, el precipitado se aisló mediante centrifugación a $14000 \times g$ durante 30 min y entonces el pellet se disolvió en 1 mL de NaOH 0.5 M. La absorbancia de la solución resultante fue medida frente a un blanco de NaOH a 280 nm y la cantidad de lignina fue calculada en base a una curva de calibración lineal (0-20 μg) realizada con lignina alcalina comercial (Sigma-Aldrich). Los resultados fueron expresados en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ps}$.

2.2.2.10. Aminoácidos y proteínas.

Para la extracción de aminoácidos y proteínas solubles se homogenizó 0.5 g de material vegetal en 50 mM de buffer fosfato potásico (pH 7.0) y se centrifugó a $12000 \times g$ durante 15 min. La concentración de aminoácidos del sobrenadante se determinó siguiendo el método de ninhidrina descrito por Yemm y Cocking (1995), utilizando glicina como patrón. Del mismo extracto, las proteínas se determinaron utilizando Comassie Blue G-250 (Bradford, 1976) y seroalbumina bovina (BSA) como estándar. Los resultados fueron expresados en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$.

2.2.2.11. Prolina.

La determinación de prolina se realizó siguiendo el método propuesto por Irigoyen *et al.* (1992), optimizado para nuestras condiciones. Para ello, 1 g de material vegetal fue homogenizado con 5 mL de etanol absoluto, y posteriormente se lavó dos veces con 2.5 mL de etanol al 70% (v/v), hasta alcanzar un volumen final de extracción de 10 mL. El homogenizado fue centrifugado a $3600 \times g$ durante 10 min y el sobrenadante resultante se utilizó para la determinación de la concentración de prolina. Para la cuantificación de este aminoácido, se realizó una mezcla de reacción compuesta por: 2 mL de extracto, 3 mL de agua desionizada, 2.5 mL de reactivo de ninhidrina (6.25 g ninhidrina + 100 mL ácido fosfórico 6 M + 150 mL ácido acético glacial) y 2.5 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, los tubos fueron agitados e introducidos en un baño a 100 °C durante 15 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se enfriaron con hielo y se le añadió a 5 mL de benceno. Cada tubo fue agitado vigorosamente durante 1 min y posteriormente se dejó en reposo 15 min. Entonces se procedió a la lectura de la absorbancia a 515 nm de la fase líquida presente en la parte superior de cada tubo. Finalmente los muestras fueron enfrentadas a una curva patrón de prolina y los resultados obtenidos expresados como $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ pf.

2.2.2.12. Antocianinas.

Las antocianinas fueron extraídas siguiendo el procedimiento descrito por Ticconi *et al.* (2001). Para ello, se homogenizó 1 g de material vegetal en 5 mL de una solución compuesta por propanol:HCl:H₂O (18:1:81; v/v/v). Posteriormente, las muestras fueron hervidas en un baño de agua durante 3 min, dejando las muestras en oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 h. Pasado este tiempo, se centrifugaron a $5000 \times g$ durante 40 min a 4°C y el sobrenadante se midió mediante espectrofotometría a 535 y 650 nm. La absorbancia correspondiente a las antocianinas se calculó de acuerdo a Lange *et al.* (1971): $A = A_{535} - A_{650}$. Los resultados fueron expresados como $A_{535} \cdot \text{g}^{-1}$ pf.

2.2.2.13. Clorofilas y carotenoides.

Para la extracción de clorofilas y carotenoides, 0.15 g de hojas fueron molidos en condiciones de semioscuridad y resuspendidos en 10 mL de acetona fría al 80%. Inmediatamente después las muestras se centrifugaron a 3000 x g y la absorbancia del sobrenadante fue medida a 663, 646 y 470 nm. Tanto la concentración de clorofila a y b como la de carotenoides fue calculada de acuerdo a Wellburn (1994) y finalmente expresada como $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ pf.

$$Cl_a = (12.21 \cdot A_{663}) - (2.81 \cdot A_{646}) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$Cl_b = (20.13 \cdot A_{646}) - (5.03 \cdot A_{663}) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\text{Carot.} = [(1000 \cdot A_{470}) - (3.27 \cdot Cl_a) - (10.4 \cdot Cl_b)] / 198 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

2.2.3. Actividad enzimática.

2.2.3.1. Lipoxigenasa.

La actividad LOX se midió de acuerdo a Minguez-Mosquera *et al.* (1983), utilizando buffer 50 mM fosfato potásico (pH 6.0) para la extracción. La mezcla de reacción estaba compuesta por 25 μ L de extracto enzimático y 200 μ L de ácido linoleico 0.5 mM en buffer fosfato potásico (pH 6.0). Los cambios de absorbancia se registraron a una longitud de onda de 234 nm.

2.2.3.2. Superóxido dismutasa.

La actividad SOD se midió de acuerdo a Giannopolitis y Ries (1977) y Beyer y Fridovitch (1987), con algunas modificaciones (Yu *et al.*, 1998), mediante un ensayo basado en la inhibición de la reducción fotoquímica del NBT (nitroblue tetrazolium). Para ello se emplearon 5 mL de una mezcla de reacción que contenía 50 mM Na_2CO_3 (pH 10), 13 mM de metionina, 0.025% (v/v) de Triton X-100, 63 μ M de riboflavina y una alícuota de extracto enzimático. Esta mezcla fue iluminada con un PPFD de 380 $\mu\text{mol}^2\text{s}^{-1}$ durante 15 min. Una mezcla de reacción idéntica a la anterior que no fue iluminada se empleó para corregir la absorbancia. La absorbancia de las muestras fue medida a una longitud de onda de 560 nm y la actividad SOD fue expresada en unidades (U) $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, dónde una unidad es la cantidad de dicha enzima requerida para causar la inhibición del 50 % de la reducción del NBT.

2.2.3.3. Catalasa.

La actividad CAT se determinó midiendo el consumo de H_2O_2 a 240 nm durante 5 min a 25°C (Nakano y Asada, 1981; Rao *et al.*, 1997). La mezcla de reacción (3 mL) estaba compuesta por 25 mM de buffer Tris-acetato (pH 7.0), 0.8 mM EDTA-Na y 20 mM de H_2O_2 y extracto enzimático.

2.2.3.4. Ascorbato peroxidasa.

El ensayo de la enzima APOX se realizó de acuerdo a Rao *et al.* (1996). Para ello se midió el cambio en la absorbancia a 290 nm durante 3 min de una mezcla de reacción (3.75 mL) compuesta por 100 mM de tampón fosfato potásico (pH 7.5), 0.5 mM de ASA, 0.2 mM de H₂O₂ y 0.75 mL de extracto enzimático.

2.2.3.5. Monodehidroascorbato y dehidroascorbato reductasa.

El ensayo de la enzima MDHAR se realizó registrando el cambio de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 340 nm (Foyer *et al.*, 1989). La mezcla de reacción contenía 100 mM de tampón HEPES-HCl (pH 7.6), 2.5 mM de ASA, 25 μ M de NADPH y 300 μ L de extracto enzimático. Para el cálculo de la actividad MDHAR se empleó el coeficiente de extinción molar del NADPH de 6.22 mM⁻¹cm⁻¹. Por otro lado, la actividad DHAR fue medida a 265 nm durante 3 min siguiendo el cambio de absorbancia producido a consecuencia de la formación de ASA (Nakano y Asada, 1981). La mezcla de reacción (3.1 mL) contenía 25 mM de tampón fosfato sódico (pH 7), 2.5 mM de GSH, 0.4 mM de DHA y 0.1 ml de extracto enzimático. El coeficiente de extinción molar empleado para el cálculo de la actividad de dicha enzima fue de 7.0 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.2.3.6. Glutation reductasa.

El ensayo de la enzima GR se realizó de acuerdo a Rao *et al.* (1996). Para ello se midió la oxidación del NADPH a 340 nm durante 3 min en una mezcla de reacción (3.5 mL) que contenía 100 mM de Tris-HCl (pH 7.8), 2 mM de Na₂-EDTA, 0.2 mM de NADPH, 0.5 mM de GSSG y 0.75 mL de extracto enzimático.

2.2.3.7. Ascorbato oxidasa.

El ensayo de la actividad ascorbato oxidasa (AO; EC 1.10.3.3) se llevó a cabo de acuerdo a una versión modificada de García-Pineda *et al.* (2004). La mezcla de reacción (1 mL) estaba compuesta por 0.025 mM de tampón citrato/fosfato (pH 5.6), 0.08 mM de ASA, 0.02 mM de EDTA-Na, 0.15 g L⁻¹ de sero albúmina bovina y 200 μ L de extracto enzimático. La reacción se midió a una longitud de onda de 265 nm durante 3 min (coeficiente de extinción molar 9246 M⁻¹ cm⁻¹)

2.2.3.8. L-Galactosa deshidrogenasa.

La actividad L-galactosa deshidrogenasa (L-GalDH) se determinó siguiendo el método de Gatzek *et al.* (2002). Para ello se utilizó una mezcla de reacción (1.1 mL) que contenía 50 mM de tampón Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM de NAD, 5 mM de L-galactosa y 0.1 mL de extracto vegetal. La formación de NADH durante la reacción fue medida a 340 nm y la actividad L-GalDH se calculó mediante el coeficiente de extinción molar de $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2.3.9. Nitrato y nitrito reductasa.

La actividad NR se determinó de acuerdo a la metodología de Kaiser y Lewis (1984). La mezcla de reacción (2 mL) que se empleó estaba compuesta por buffer 100 mM fosfato potásico (pH 7.5), 100 mM nitrato potásico, 10 mM cisteína, 2 mM NADH y extracto enzimático. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 30 min y se detuvo mediante la adición de acetato de zinc 1000 mM. El NO_2^- formado fue determinado colorimétricamente a 540 nm después de combinarse con sulfanilamida y clorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina de acuerdo con el método de Hageman y Hucklesby (1971).

La actividad NiR se determinó cuantificando la desaparición del NO_2^- del medio de reacción (Lillo, 1984). La mezcla de reacción (2 mL) estaba compuesta por buffer 50 mM fosfato potásico (pH 7.5), 20 mM nitrito potásico, 5 mM metil viológeno, 300 mM carbonato sódico y extracto enzimático. Después de incubar las muestras a 30°C durante 30 min, el contenido de NO_2^- fue determinado por colorimetría (Hageman y Hucklesby, 1971).

2.2.3.10. Glutamina sintetasa y glutamato sintasa.

La actividad GS se determinó mediante el método de hidroxamato, basado en Kaiser y Lewis (1984). La mezcla de reacción (1.5 mL) utilizada en el ensayo estaba compuesta por buffer 100 mM fosfato potásico (pH 7.5), 4 mM EDTA, 1000 mM L-glutamato sódico, 450 mM sulfato de magnesio, 300 mM hidroxilamina, 100 mM ATP y extracto enzimático. Se prepararon dos controles diferentes, uno sin glutamina y otro sin hidroxilamina. La mezcla de reacción fue incubada a 28°C durante 20 min, y posteriormente, tras acomplejar con cloruro férrico, se midió la formación de glutamilhidroxamato por colorimetría a 540 nm (Wallsgrave *et al.*, 1979).

Por otro lado, la actividad GOGAT se determinó mediante espectrofotometría a 340 nm siguiendo la oxidación del NADH a 30°C (Groat y Vance, 1981; Singh y Srivastava, 1986). La mezcla de reacción (3.25 mL) estaba compuesta por buffer 50 mM fosfato potásico (pH 7.5) con 0.1% (v/v) de mercaptoetanol y 1 mM EDTA, 18.75 mM 2-oxoglutarato, 75 mM L-glutamina, 1.5 mM NADH y extracto enzimático. Se prepararon dos controles, uno sin ketoglutarato y otro sin glutamina, para corregir la oxidación endógena de NADH.

2.2.3.11. Glutamato deshidrogenasa.

La actividad GDH se cuantificó siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm (Groat y Vance, 1981; Singh y Srivastava, 1986). La mezcla de reacción (1.3 mL) estaba compuesta por buffer 50 mM fosfato potásico (pH 7.5), 200 mM sulfato amónico, 0.15 mM NADH, 2.5 mM 2-oxoglutarato y extracto enzimático. Se prepararon dos controles, uno sin ketoglutarato y otro sin sulfato amónico, para corregir la oxidación endógena de NADH.

2.2.3.12. Fenilalanina amonioliasa.

La actividad fenilalanina amonioliasa (PAL; EC 4.3.1.5) se analizó según Rivero *et al.* (2001), utilizando un buffer 50 mM fosfato potásico (pH 7.0) con 5% de polyvinylpyrrolidone (p/v), 50 mM ascorbato sódico, 18 mM mercaptoetanol y 0.1% (v/v) de Triton X-100. La mezcla de reacción (520 µL) estaba compuesta por 11 mM de L-fenilalanina, buffer borato sódico 0.06 M (pH 8.8) y extracto enzimático. La reacción se llevó a cabo en tubos eppendorf incubados a 30°C durante 60 min y se detuvo mediante la adición de ácido trifluoroacético al 35% (p/v). Finalmente la actividad PAL se determinó midiendo la producción de ácido cinámico a 290 nm.

2.2.3.13. Polifenol oxidasa

La enzima polifenol oxidasa (PPO; EC 1.14.18.1) se determinó siguiendo el método de Cara *et al.* (2002), utilizando buffer 100 mM fosfato potásico (pH 7.0) para la extracción. Para ello se midió el consumo de ácido cafeico a 370 nm en una mezcla de reacción compuesta por 560 µL de una solución 10 mM ácido cafeico en buffer 100 mM fosfato potásico (pH 7.0) y 30 µL extracto enzimático.

2.2.3.14. Guaiacol peroxidasa.

La enzima guaiacol peroxidasa (GPOX; EC 1.11.1.7) se cuantificó utilizando buffer 100 mM fosfato potásico (pH 7.0) para la extracción. La mezcla de reacción (550 μ L) empleada estaba compuesta por 0.02 % de guaiacol (v/v) y 2.5 mM de H₂O₂ en buffer 100 mM fosfato potásico (pH 7.0). La actividad GPOX se midió a 485 nm siguiendo el cambio de absorbancia producido por la oxidación del guaiacol (Cara *et al.*, 2002)

2.2.3.15. Siringaldazina peroxidasa.

La enzima siringaldazina peroxidasa (SPOX; EC 1.11.1.7) fue extraída y determinada en dos fracciones de acuerdo con una versión del método empleado por Ghanati *et al.* (2005). El material vegetal homogenizado con nitrógeno líquido fue resuspendido en buffer acetato sódico 100 mM (pH 6) y centrifugado a 18000 x *g* durante 15 min. El sobrenadante fue utilizado para medir la actividad SPOX soluble. Por otro lado el pellet se lavó utilizando buffer acetato sódico, se incubó con CaCl₂ 0.2 M durante 2 h a 4°C y finalmente se centrifugó a 18000 x *g* 15 min. En este caso el sobrenadante fue utilizado para determinar la actividad de la enzima unida iónicamente a la pared celular (SPOX-CW). La mezcla de reacción empleada (800 μ L) estaba compuesta por 5 μ M siringaldazine, 16 mM H₂O₂ y buffer acetato sódico 100 mM (pH 6). La actividad de la enzima en ambas fracciones se midió siguiendo los cambios de absorbancia a 530 nm

2.2.3.16. Proteínas de extractos enzimáticos.

La concentración de proteínas en los extractos enzimáticos se determinó según Bradford (1976) usando BSA como patrón.

2.2.4. Eficiencia en el uso del nitrógeno.

- Concentración total de N (TNC): El TNC se calculó sumando la concentración de N orgánico y la concentración de NO_3^- (Sorgona *et al.*, 2006). El resultado fue expresado en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ps.
- Acumulación total de N (TNA): El TNA se calculó usando el TNC y el peso seco total de las hojas, mediante la fórmula: $\text{TNA} = \text{TNC} \times \text{ps foliar}$ (Sorgona *et al.*, 2006). El resultado fue expresado en mg de N.
- Eficiencia en la absorción de N (NUpE): El NupE se calculó mediante la siguiente fórmula: $\text{NupE} = \text{TNA} / \text{ps radicular}$. El resultado fue expresado como $\text{mg N} \cdot \text{g}^{-1}$ ps (Siddiqui y Glass, 1981).
- Eficiencia en la utilización del N (NUtE): El NUtE se calculó mediante la siguiente ecuación: $\text{NUtE} = \text{ps foliar} / \text{TNA}$. El resultado fue expresado como $\text{g de ps} \cdot \text{mg}^{-1}$ N (Elliot y Läuchli, 1985).

2.2.5. Geles bidimensionales.

2.2.5.1. Extracción y procesado de proteínas de la pared celular.

Para la extracción y preparación de proteínas iónicamente unidas a la pared celular se siguió el procedimiento descrito por Soares *et al.* (2007) con algunas modificaciones. El material vegetal (raíces) fue homogenizado en 2 mL · g⁻¹ (pf) de buffer acetato sódico 15 mM (pH 4.5) que contenía 0.4 M de sacarosa. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4500 x g durante 5 min, descartando entonces el sobrenadante y lavando el pellet mediante centrifugación a 4500 x g durante 5 min utilizando 2 mL · g⁻¹ (pf) de 0.1 % de Triton X-100 (v/v) en buffer acetato sódico. De nuevo se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado mediante centrifugación a 4500 x g utilizando en este caso solamente buffer acetato sódico. Tras esta última centrifugación el pellet fue resuspendido en 1 mL · g⁻¹ (pf) de 0.2 M CaCl₂ durante un máximo de 5 min. El resultado fue centrifugado a 4500 x g obteniendo en el sobrenadante el extracto salino de proteínas. Este extracto se filtró a través de una membrana 0.45 µM (Schleicher & Schuell, Alemania) y se concentró mediante filtración asistida por presión a través de una membrana de 10 kDa (Diaflow, Amicon, EEUU). Finalmente el extracto se procesó utilizando un kit de prelavado de proteínas para geles bidimensionales (2-DE Cleanup Kit, Amersham, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas de los extractos fue cuantificada mediante colorimetría utilizando Bradford Biorad (Biorad, Alemania) y BSA como patrón. La actividad malato deshidrogenasa (MDH) (EC 1.1.1.37) fue medida como marcador de contaminación citosólica en los extractos salinos (López-Millán *et al.*, 2004).

2.2.5.2. Separación de proteínas en dos dimensiones.

Para la primera dimensión, isoelectroenfoque (IEF), se utilizó el sistema IPGphor con IPGstrips de gradiente de pH no lineal (NL) 3-10 (Amersham Biosciences, Suecia). Las proteínas, previamente en solución de rehidratación compuesta por urea 6 M, tiourea 2 M, 2% de CHAPS (p/v), 100 mM de DTT, y 0.5 % (v/v) de IPG buffer (Amersham Biosciences), se sometieron a un IEF programado con la siguiente secuencia a 20°C: 30 V durante 12 h, seguido de 250 V 1 h, 500 V 1.5 h, 1000 V 1.5 h, gradiente a 8000 V 1.5 h y finalmente 8000 V 4 h. Después, previamente a la segunda dimensión (SDS-PAGE), las IPGstrips se equilibraron en dos pasos (2 x 15 min) con

buffer 50 mM Tris-HCL (pH 8.8) que contenía 2% SDS, urea 6 M, 30% glicerol (v/v) y una traza de azul de bromofenol. En el primer paso se añadió DTT al 1% (p/v) y en el segundo 2.5% (p/v) de iodoacetamida. El SDS-PAGE se realizó en geles compuestos por 12% de poliacrilamida (Laemmli, 1970) y empleando 40 µg de proteína total. El experimento se realizó a partir de al menos tres réplicas de proteínas obtenidas de muestras biológicas separadas.

2.2.5.3. Revelado y análisis de geles.

Para el revelado de los geles se utilizó una tinción con nitrato de plata y el resultado fue entonces rápidamente digitalizado mediante un escáner ImageQuant v3.3 (Molecular Dynamics). El análisis de las imágenes se llevó a cabo a través del software Image Master Platinum v5.0 (Amersham Biosciences).

2.2.6. Permeabilidad de membrana y eflujo de boro.

Las medidas de permeabilidad de membrana se llevaron a cabo de acuerdo al método de Cakmak *et al.* (1995). Para ello, muestras de raíces frescas fueron enjuagadas y transferidas a vasos de vidrio de 50 mL con agua destilada (ddH₂O). De forma similar, para determinar el eflujo de B en presencia de un inhibidor metabólico, otras muestras de raíces se transfirieron a vasos de vidrio de 50 mL que contenían una solución 0.5 mM de NaN₃ (inhibidor metabólico) a pH 5.5. Ambos experimentos se llevaron a cabo en oscuridad y a temperatura ambiente. Después de 1h, se tomaron alícuotas de las diferentes soluciones de incubación para determinar la concentración de los siguientes parámetros: K⁺ mediante espectrometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977); sacarosa según el método de Irigoyen *et al.* (1992); aminoácidos mediante el empleo de ninhidrina (Yemm y Cocking, 1955); fenoles utilizando el reactivo de Folin (Singleton *et al.*, 1985); y B mediante el método de azometina-H (Wolf, 1974). Todas las medidas fueron expresadas en µmol · h⁻¹ · g⁻¹ pf.

2.3. Análisis estadístico.

Los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) simple y las diferencias entre las medias fueron comparadas mediante el test de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD; 'Lower Significant Difference') ($P = 0.05$). Para analizar los datos presentados en el BE3 se realizó un análisis de regresión lineal, presentando en cada caso el coeficiente de correlación (r) y la ecuación de la recta ($y = a + bx$). Por otro lado, para estudiar el efecto por separado del tipo de cultivar, tratamiento y día de muestreo se llevó a cabo una ANOVA factorial en el que el estadístico F fue anotado y representado en cada caso en tablas que pueden consultarse en el Apéndice. En todos los casos, los niveles de significación fueron representados como: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) y ns (no significativo, $P > 0.05$).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE EXPERIMENTAL I

Respuesta antioxidante, asimilación del nitrato
y eficiencia en el uso del nitrógeno.

3.1.1. Síntomas visibles, crecimiento y acumulación de boro.

Las hojas de las plantas sometidas a 0.5 y 2 mM de B, además de tener un menor tamaño, presentaron necrosis muy localizadas que tendían a extenderse desde los márgenes y las puntas hacia el interior (Figura 3.1). Los dos cultivares de tomate utilizados en el experimento mostraron una reducción de la biomasa foliar y de RGR_F cuando se aplicaron los tratamientos de exceso de B (Tabla 3.1; Figura 3.2). En el cv. Josefina la reducción de biomasa y de RGR_F ocurrió de forma paralela al incremento de la concentración de B en el medio, mientras que en el cv. Kosaco solamente se observó una reducción significativa bajo el tratamiento 2 mM (Tabla 3.1). El incremento de los niveles de B en la solución nutritiva también se tradujo en un incremento significativo de la concentración foliar de dicho elemento, tanto de la concentración total como libre (Tabla 3.1). Este último resultado fue más acusado en el cv. Josefina que en el cv. Kosaco (Tabla 3.1). La inhibición del crecimiento como consecuencia de niveles tóxicos de B en el medio radicular se ha caracterizado en diversos tipos de plantas como girasol o cebada (Karabal *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2003). De forma similar, los resultados de este experimento mostraron que la reducción de biomasa foliar y de RGR_F se debió a la excesiva acumulación de B en hojas, un fenómeno que también dependió del tipo de cultivar empleado en el experimento (Tabla A1, ver Apéndice) y que señaló al cv. Josefina como el más sensible a la toxicidad de B.

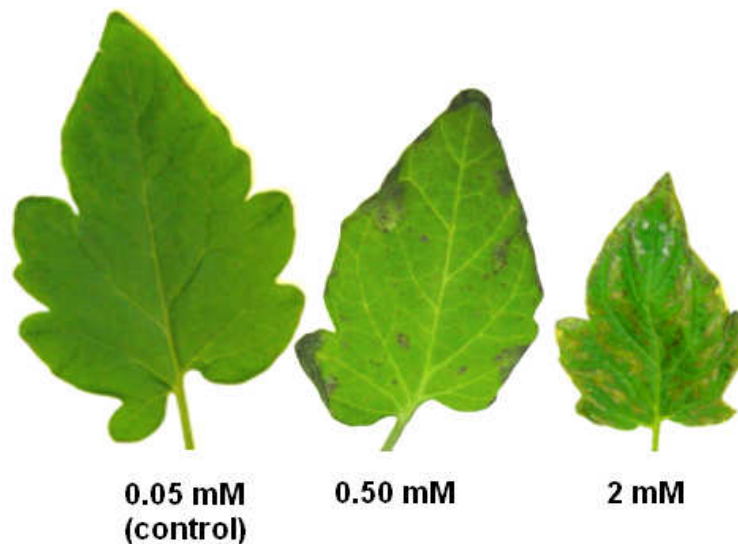


Figura 3.1. Síntomas visibles de toxicidad en hojas de plantas de tomate sometidas a 0.5 y 2 mM de B durante 14 días comparadas con hojas de plantas control (0.05 mM).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.1. Biomasa, RGR_F y concentración foliar de B (total y libre) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.

Cultivar/Boro	Biomasa foliar (g ps)	RGR _F (g · g ⁻¹ · día ⁻¹)	B total (μg · g ⁻¹ ps)	B libre (μg · g ⁻¹ pf)
cv. Kosaco				
0.05 mM	1.85 ± 0.06 a ¹	0.108 ± 0.002 a	87.71 ± 3.57 b	10.03 ± 0.81 b
0.50 mM	1.84 ± 0.05 a	0.108 ± 0.003 a	209.18 ± 43.37b	15.14 ± 1.38 b
2.00 mM	1.46 ± 0.05 b	0.092 ± 0.001 b	627.63 ± 43.61a	64.55 ± 4.70 a
<i>P</i>	** ²	**	***	***
LSD _{0.05}	0.19	0.007	123.08	9.91
cv. Josefina				
0.05 mM	2.16 ± 0.06 a	0.108 ± 0.002 a	94.92 ± 5.63 c	13.02 ± 3.63 b
0.50 mM	1.84 ± 0.06 b	0.097 ± 0.002 b	367.18 ± 3.61 b	22.45 ± 0.29 b
2.00 mM	1.62 ± 0.05 c	0.088 ± 0.001 c	1055.58 ± 18.25 a	103.85 ± 9.83 a
<i>P</i>	**	***	***	***
LSD _{0.05}	0.18	0.006	38.84	20.93

¹ Los valores son medias ± SE (*n* = 9). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD (*P* = 0.05). ² Los niveles de significación están representados por * (*P* < 0.05), ** (*P* < 0.01), *** (*P* < 0.001) y ns (no significativo; *P* > 0.05).

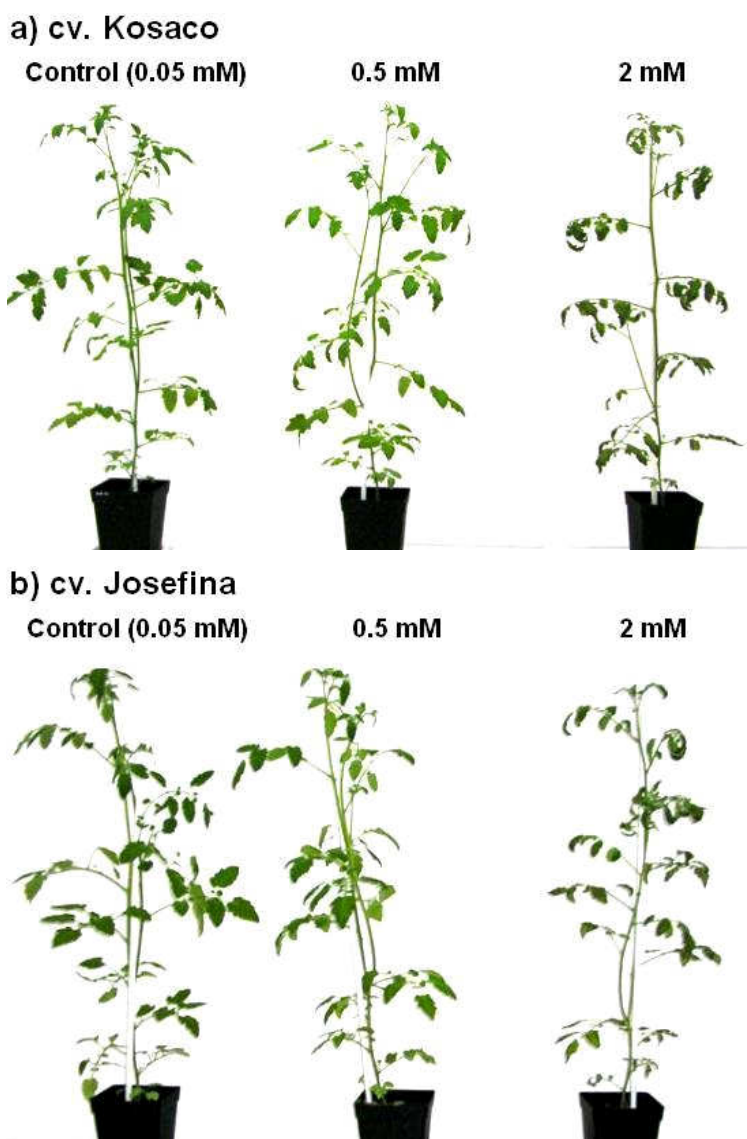


Figura 3.2. Estado de los cultivares de tomate, Kosaco (a) y Josefina (b), después de 14 días sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B.

3.1.2. Metabolismo oxidativo y respuesta antioxidante.

La concentración de MDA y de H_2O_2 se analizó en hojas como indicador del estrés oxidativo en la planta (Mittler, 2002). Ambos parámetros incrementaron de forma significativa respecto al control en hojas de plantas de tomate sometidas a exceso de B (Figura 3.3). Mittler (2002) propuso que bajo condiciones de estrés el daño a las membranas puede ser causado por elevados niveles de H_2O_2 , ya que estos aceleran la reacción de Haber-Weiss dando lugar a la formación de radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) y por tanto a la peroxidación de lípidos. Karabal *et al.* (2003) no encontraron ninguna relación entre la concentración de H_2O_2 y la peroxidación de lípidos de plantas de cebada sometidas a toxicidad por B. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, estudios en manzano y en vid han mostrado que el exceso de B incrementa tanto los niveles de H_2O_2 como de MDA (Molassiotis *et al.*, 2006; Gunes *et al.*, 2006). Por otra parte, en nuestro estudio, no sólo la concentración de B en el medio influyó sobre dichos parámetros sino también el tipo de cultivar empleado en el experimento (Tabla A1, ver Apéndice). En este sentido, como indican los niveles de MDA y H_2O_2 (Figura 3.3) el cv. Josefina presentó un mayor estrés oxidativo que el cv. Kosaco, hecho que podría estar relacionado con la mayor sensibilidad a la toxicidad por B del cv. Josefina.

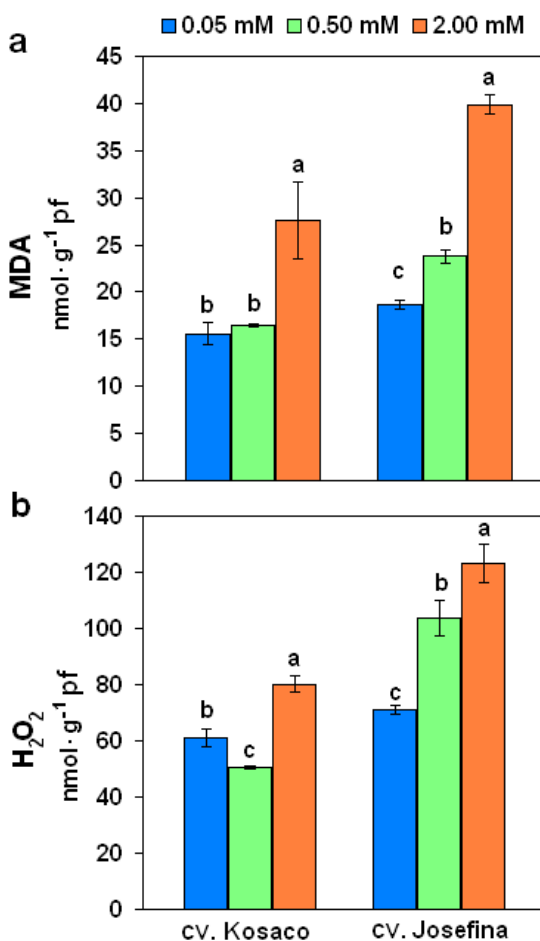


Figura 3.3. Concentración de MDA (a) y H_2O_2 (b) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. Los datos son medias \pm SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

La actividad antioxidante no enzimática está representada por una serie de moléculas que la planta utiliza frente a la formación de ROS (Mittler, 2002). Los tests FRAP y TEAC proporcionan información sobre la actividad antioxidante no enzimática total. Excepto el test FRAP realizado en hojas del cv. Josefina, ambos ensayos mostraron una mayor actividad antioxidante bajo el tratamiento 2 mM de B (Tabla 3.2). De forma similar, en manzano, Molassiotis *et al.* (2006) y Sotiropoulos *et al.* (2006) encontraron que elevados niveles de B inducían la actividad antioxidante no enzimática. Por otra parte, en nuestro estudio, los tests FRAP y TEAC indicaron que independientemente del tratamiento, el cv. Kosaco presentaba una mayor actividad antioxidante (Tabla 3.2), lo que podría haber influido sobre la respuesta al estrés oxidativo desencadenado por el exceso de B.

Tabla 3.2. Resultados de tests de actividad antioxidante total (FRAP y TEAC) realizados en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.

Cultivar/Boro	FRAP ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ pf)	TEAC ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ pf)
cv. Kosaco		
0.05 mM	1005.13 \pm 5.18 b ¹	6.20 \pm 0.07 b
0.50 mM	955.62 \pm 4.71 c	6.02 \pm 0.04 b
2.00 mM	1025.41 \pm 4.54 a	6.82 \pm 0.06 a
<i>P</i>	*** ²	***
LSD _{0.05}	16.67	0.17
cv. Josefina		
0.05 mM	729.62 \pm 0.90 b	5.01 \pm 0.09 b
0.50 mM	769.33 \pm 12.16 a	5.29 \pm 0.10 b
2.00 mM	721.28 \pm 8.94 b	6.66 \pm 0.06 a
<i>P</i>	*	***
LSD _{0.05}	30.20	0.27

¹ Los valores son medias \pm SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

² Los niveles de significación están representados por * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) y ns (no significativo; $P > 0.05$).

Para profundizar más en este último aspecto, también se determinó la concentración foliar de ASA y GSH. Estas moléculas antioxidantes que se encuentran en elevadas concentraciones en cloroplastos y otros compartimentos celulares, tienen una importante función de defensa frente al estrés oxidativo (Noctor y Foyer, 1998). En este sentido, se ha observado que la aplicación de B puede elevar la concentración de ASA en los tejidos vegetales en comparación con situaciones de deficiencia de dicho elemento (Blevins y Lukaszewski, 1998). La aplicación foliar de B incrementó la concentración de ASA en patata (*Solanum tuberosum*) (Mondy y Munshi, 1993). En un

estudio con naranjos, Keles *et al.* (2004) observaron un incremento significativo de este antioxidante bajo condiciones de exceso de B en el medio, y propusieron que este podría ser importante frente a la formación de ROS bajo tales condiciones de estrés. Por el contrario, recientemente se ha observado que elevadas concentraciones de B reducen los niveles de ASA por metro cuadrado en hojas de *Citrus grandis* (Han *et al.*, 2009). En el presente experimento, con 0.5 y 2 mM de B, la concentración foliar de ASA incrementó respectivamente un 64 y 91% en el cv. Kosaco y un 13 y 72% en el cv. Josefina (Tabla 3.3). Ya que el ASA puede directamente eliminar radicales $O^{\bullet -}$, $OH^{\bullet -}$ y oxígeno singlete (1O_2), así como reducir el H_2O_2 a H_2O vía APOX (Noctor y Foyer, 1998), el incremento de la concentración de ASA en plantas de tomate sugiere un importante papel de este antioxidante frente al estrés oxidativo desencadenado por exceso de B en el medio. Además, con 0.5 y 2 mM de B, la concentración DHA se elevó respectivamente un 230 y un 1561% en el cv. Kosaco, así como un 84 y 134% en el cv. Josefina, resultando en general en un pool de ASA más oxidado (Tabla 3.3). Por lo tanto, en hojas de tomate, el estrés oxidativo causado por toxicidad de B incrementó tanto el pool de ASA como su oxidación. Además del tratamiento de B, el tipo de cultivar empleado en el experimento también influyó sobre los niveles de ASA en hoja (Tabla A1, ver Apéndice), destacando el cv. Kosaco con una mayor acumulación de este antioxidante.

Tabla 3.3. Concentración foliar de ASA, DHA y ASA total, así como relación ASA/ASA total en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.

Cultivar/Boro	ASA (nmol · g ⁻¹ pf)	DHA (nmol · g ⁻¹ pf)	ASA total (nmol · g ⁻¹ pf)	ASA/ASA total (%)
cv. Kosaco				
0.05 mM	198.94 ± 0.33 c ¹	32.29 ± 0.35 c	231.23 ± 14.11 c	86.01 ± 0.57 a
0.50 mM	326.69 ± 16.40 b	106.53 ± 16.40 b	433.21 ± 18.45 b	75.33 ± 3.75 b
2.00 mM	379.95 ± 14.35 a	536.19 ± 14.35 a	916.14 ± 6.15 a	41.32 ± 1.45 c
<i>P</i>	*** ²	***	***	***
LSD _{0.05}	43.55	43.55	48.01	8.13
cv. Josefina				
0.05 mM	150.14 ± 3.13 c	47.03 ± 3.13 c	197.18 ± 9.40 c	76.10 ± 1.73 a
0.50 mM	169.63 ± 6.39 b	86.66 ± 6.38 b	256.28 ± 9.58 b	66.33 ± 2.60 b
2.00 mM	258.68 ± 1.06 a	112.16 ± 1.04 a	370.84 ± 9.40 a	69.66 ± 3.33 b
<i>P</i>	***	***	***	*
LSD _{0.05}	14.37	14.37	32.74	6.28

¹ Los valores son medias ± SE (*n* = 9). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD (*P* = 0.05).

² Los niveles de significación están representados por * (*P* < 0.05), ** (*P* < 0.01), *** (*P* < 0.001) y ns (no significativo; *P* > 0.05).

En cuanto a la concentración de GSH, solamente se produjo un incremento significativo respecto al control en el cv. Kosaco (Tabla 3.4). Además, a diferencia del ASA, el índice GSH/GSH total indica que el pool de GSH no presentó cambios significativos en su estado de oxidación (Tabla 3.4). Al igual que ocurre bajo condiciones de elevada salinidad en el medio (Ruiz y Blumwald, 2002), el GSH podría tener también un importante papel protector frente al estrés oxidativo inducido por exceso de B. En girasol, Ruiz *et al.* (2003) mostraron que niveles tóxicos de B inhibían la síntesis de GSH y que la aplicación externa de dicho antioxidante reducía la fitotoxicidad provocada por este desorden nutricional. De forma similar, recientemente se ha observado que el exceso de B reduce los niveles de GSH por m² en hojas de *Citrus grandis* (Han *et al.*, 2009). Independientemente del tratamiento, la concentración de GSH también fue afectada de forma significativa por el tipo de cultivar empleado en el experimento (Tabla A1, ver Apéndice), siendo de nuevo el cv. Kosaco el que presentó una mayor concentración de dicho antioxidante.

Tabla 3.4. Concentración foliar de GSH, GSSG y GSH total, así como relación GSH/GSH total en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.

Cultivar/Boro	GSH (nmol · g ⁻¹ pf)	GSSG (nmol · g ⁻¹ pf)	GSH total (nmol · g ⁻¹ pf)	GSH/GSH total (%)
cv. Kosaco				
0.05 mM	470.64 ± 4.84 c ¹	166.06 ± 4.83 b	636.03 ± 0.40 b	74.00 ± 0.57 a
0.50 mM	918.03 ± 4.51 a	105.82 ± 4.51 c	1023.85 ± 45.74 a	90.33 ± 4.33 a
2.00 mM	663.65 ± 2.76 b	195.80 ± 2.76 a	859.45 ± 88.28 a	78.67 ± 8.09 a
<i>P</i>	*** ²	***	**	ns
LSD _{0.05}	14.31	14.32	198.66	18.37
cv. Josefina				
0.05 mM	452.00 ± 2.61 a	174.75 ± 2.61 a	626.75 ± 11.49 a	71.01 ± 1.73 a
0.50 mM	460.72 ± 6.73 a	154.35 ± 6.73 b	615.07 ± 34.31 a	75.33 ± 5.21 a
2.00 mM	468.86 ± 0.71 a	177.93 ± 0.71 a	646.79 ± 13.77 a	72.32 ± 1.45 a
<i>P</i>	ns	*	ns	ns
LSD _{0.05}	14.50	14.50	77.34	11.34

¹ Los valores son medias ± SE (*n* = 9). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD (*P* = 0.05).

² Los niveles de significación están representados por * (*P* < 0.05), ** (*P* < 0.01), *** (*P* < 0.001) y ns (no significativo; *P* > 0.05).

Para estudiar el componente enzimático de la respuesta antioxidante de las plantas de tomate frente a la toxicidad de B se analizaron las actividades SOD, CAT y APOX, así como las actividades de otras enzimas que participan en la regeneración del ASA y que constituyen el ciclo de Halliwell-Asada. En ambos cultivares, bajo el tratamiento 2 mM de B las actividades CAT y APOX incrementaron de forma significativa respecto al tratamiento control (Figura 3.4 b, c), mientras que la actividad SOD incrementó bajo 2 mM de B solamente en el cv. Kosaco (Figura 3.4 a). Por otro lado, la actividad SOD incrementó de forma significativa en ambos cultivares bajo el tratamiento 0.5 mM de B (Figura 3.4 a). El efecto que la toxicidad de B tiene sobre la actividad antioxidante de estas enzimas varía ampliamente con la especie de planta. Así, en cebada, Karabal *et al.* (2003) encontraron que elevados niveles de B en el medio de cultivo incrementaban de forma significativa la actividad APOX pero no la actividad SOD. En otro experimento con injertos de manzano se encontró que el incremento de la concentración de B en el medio de 0.1 a 6 mM reducía la actividad CAT mientras que inducía la actividad SOD y peroxidasa en hojas (Molassiotis *et al.*, 2006). Sin embargo, en vid, Gunes *et al.* (2006) observaron que niveles tóxicos de B incrementaban las actividades CAT y SOD pero disminuía la actividad APOX.

En nuestro estudio con plantas de tomate, tanto el tratamiento de B como el tipo de cultivar empleado en el experimento afectó de forma significativa a la actividad SOD, CAT y APOX (Tabla A1, ver Apéndice), un hecho que junto con el incremento de los niveles de ASA y GSH indica un importante papel de la respuesta antioxidante frente a la toxicidad de B, fundamentalmente en relación al cv. Kosaco ya que éste mostró un menor estrés oxidativo que el cv. Josefina bajo dicho desorden nutricional. De acuerdo con nuestros datos, recientemente Ardic *et al.* (2009) han relacionado las diferencias de tolerancia a la toxicidad de B que presentan algunas variedades de garbanzo (*Cicer arietinum*) con una mayor actividad de estas enzimas antioxidantes.

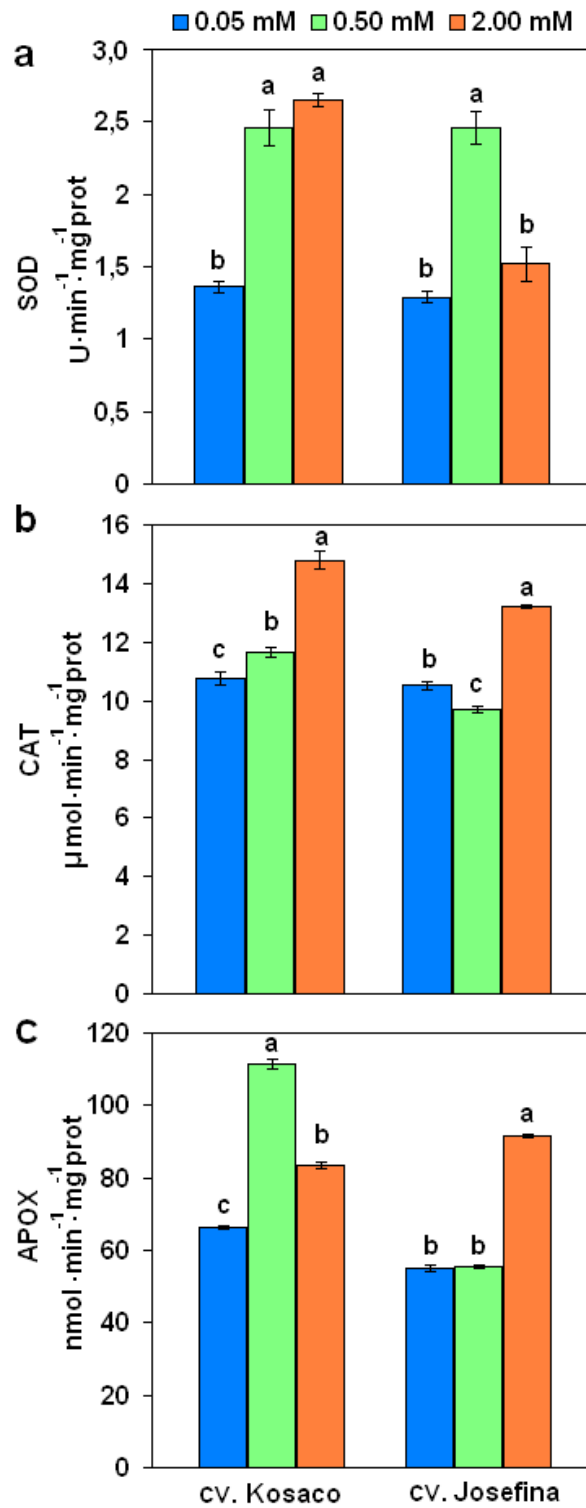


Figura 3.4. Actividad SOD (a), CAT (b) y APOX (c) en hojas de cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. Los datos son medias \pm SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

La regeneración del ASA es también un proceso de gran importancia en la respuesta antioxidante. En este proceso están implicadas las enzimas MDHAR, DHAR y GR, que se encuentran situadas en la mayoría de los compartimentos celulares (Ishikawa *et al.*, 2006). A penas existen estudios que describan el efecto de la toxicidad de B sobre las enzimas del ciclo de Halliwell-Asada. En nísperos (*Eriobotrya japonica*) sometidos a fuertes condiciones de salinidad, un incremento de la concentración de B de 0.01 a 0.2 mM inhibió de forma significativa la actividad MDHAR pero estimuló la actividad DHAR (López-Gómez *et al.*, 2007), indicando que el B puede afectar a la actividad de dichas enzimas bajo condiciones de estrés. Por otro lado, en hojas de *Citrus grandis* el exceso de B produjo una reducción de la actividad MDHAR y DHAR, mientras que indujo la actividad GR (Han *et al.*, 2009). En el presente estudio la actividad de estas enzimas incrementó de forma significativa en hojas de ambos cultivares cuando se aplicó 2 mM de B al medio de cultivo (Figura 3.5). Recientemente se ha sugerido que la sobreexpresión de la enzima MDHAR podría afectar a la acumulación de ASA y fomentar el estado reducido de su pool celular, puesto que la enzima MDHAR funciona un paso por delante de la DHAR en la vía de reciclaje del ASA (Ishikawa *et al.*, 2006). En este sentido, en nuestro experimento encontramos que bajo 0.5 y 2 mM de B la actividad MDHAR incrementaba más del 50% con respecto a los tratamientos control (Figura 3.5 a), lo que sugiere un importante papel de esta enzima en la regeneración del ASA bajo condiciones de toxicidad por B, fundamentalmente en el cv. Kosaco. No obstante, tanto MDHAR como DHAR podrían ser un factor limitante para la acumulación de ASA en hojas, ya que como nos indicó el coeficiente ASA/ASA total, el estatus redox de dicho antioxidante disminuyó con los tratamientos de toxicidad de B (Tabla 3.3). Por otro lado, independientemente del tratamiento, el tipo de cv. empleado en nuestro experimento afectó de forma significativa a la actividad MDHAR y DHAR pero no a la actividad GR (Tabla A1, ver Apéndice).

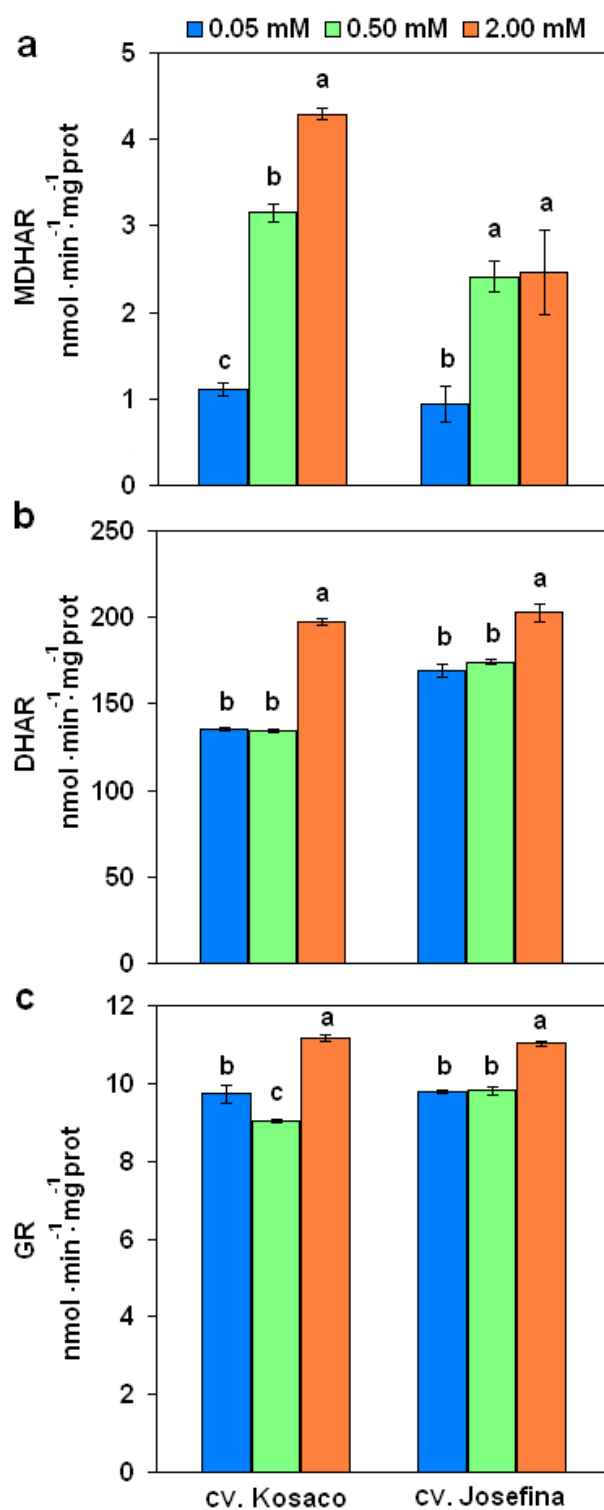


Figura 3.5. Actividad MDHAR (a), DHAR (b) y GR (c) en hojas de cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. Los datos son medias \pm SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

También se analizó la respuesta de la actividad AO a la toxicidad por B. Esta enzima es una glicoproteína que se encuentra situada libre en el apoplasto y también unida a la pared celular (Pignocchi *et al.*, 2003). Aunque su función todavía no ha sido bien definida, parece estar relacionada con la regulación del status redox del apoplasto y por tanto con la oxidación del ASA a MDHA (Pignocchi *et al.*, 2003). En el presente experimento, el comportamiento de la fracción soluble de la AO fue similar en ambos cultivares, alcanzando su máxima actividad bajo el tratamiento 0.5 mM (Tabla 3.5). Por el contrario, cuando se analizó la fracción de la enzima unida iónicamente a la pared celular se observó un incremento significativo bajo 2 mM de B sólo en el cv, Josefina (Tabla 3.5). Aunque no hay estudios recientes a cerca del efecto de la toxicidad de B sobre la actividad AO, se ha observado que la actividad de esta enzima se induce bajo otros tipos de estrés, como por ejemplo bajo elevadas temperatura y fuerte radiación solar (Rosales *et al.*, 2006). Por otro lado, algunos estudios en plantas transgénicas con la actividad AO sobreexpresada indican que esta enzima podría afectar la adaptación de las plantas a condiciones de estrés favoreciendo la acumulación de H₂O₂ en el apoplasto (Sanmartin *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2005). En nuestro estudio, aunque se detectó un cierto efecto de la toxicidad de B sobre la actividad AO, no parece que los niveles de H₂O₂ encontrados en hojas de tomate estén asociados con la conducta de esta enzima.

Tabla 3.5. Actividad AO en la fracción soluble y unida iónicamente a la pared celular de hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.

Cultivar/Boro	Soluble AO (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹ prot)	Cell Wall AO (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹ prot)
cv. Kosaco		
0.05 mM	20.69 ± 0.06 b ¹	3.54 ± 0.19 a
0.50 mM	26.68 ± 0.48 a	2.97 ± 0.01 a
2.00 mM	14.46 ± 0.29 c	3.28 ± 0.39 a
<i>P</i>	*** ²	ns
LSD _{0.05}	1.12	0.85
cv. Josefina		
0.05 mM	17.28 ± 0.26 c	2.88 ± 0.01 b
0.50 mM	22.57 ± 0.06 a	3.40 ± 0.18 b
2.00 mM	19.00 ± 0.68 b	5.29 ± 0.43 a
<i>P</i>	***	**
LSD _{0.05}	1.47	0.93

¹ Los valores son medias ± SE (*n* = 9). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD (*P* = 0.05).

² Los niveles de significación están representados por * (*P* < 0.05), ** (*P* < 0.01), *** (*P* < 0.001) y ns (no significativo; *P* > 0.05).

El efecto de la toxicidad de B sobre la síntesis de ASA en plantas todavía no ha sido establecido. En la ruta manosa-galactosa el ASA es producido a partir de hexosas y mediante la oxidación de la L-galactosa, un proceso en el que está implicada la enzima L-GalDH (Ishikawa *et al.*, 2006). En nuestro experimento, el análisis de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa (los primeros precursores en la biosíntesis de ASA) reveló que la concentración de dichos azúcares incrementaba bajo condiciones de exceso de B (Tabla 3.6). Se ha sugerido que la acumulación de carbohidratos solubles en hojas es necesaria para aliviar los síntomas de toxicidad de toxicidad de B en hojas (Yolota y Konishi, 1990). Como ocurre bajo otros tipos de estrés, esta acumulación de azúcares parece ser debida a la limitación de su uso por algunos procesos metabólicos implicados en el crecimiento de la planta a favor de otros que ayuden a combatir el estrés oxidativo, como podría ser el caso de la síntesis de ASA. Al igual que nuestros resultados, Keles *et al.* (2004) informaron que en naranjos el exceso de B en el medio inducía la acumulación de ASA así como una mayor concentración de glucosa y fructosa. Respecto a la actividad L-GalDH, nuestros datos muestran una inducción de la actividad de dicha enzima con el incremento de la concentración de B en el medio (Figura 3.6). Este incremento de la actividad L-GalDH y de los azúcares precursores de ASA podría indicar una mayor capacidad para sintetizar este compuesto antioxidante bajo condiciones de exceso de B. Además, dicho resultado, junto con una mayor capacidad para reciclar el ASA a través del ciclo Halliwell-Asada, podría ayudar a estabilizar e incrementar el pool de ASA bajo condiciones de toxicidad por B.

Tabla 3.6. Concentración foliar de glucosa, fructosa y sacarosa en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.

Cultivar/Boro	Glucosa (mg · g ⁻¹ pf)	Fructosa (mg · g ⁻¹ pf)	Sacarosa (mg · g ⁻¹ pf)
cv. Kosaco			
0.05 mM	0.77 ± 0.05 b ¹	1.18 ± 0.04 c	0.81 ± 0.05 c
0.50 mM	0.69 ± 0.03 b	1.45 ± 0.01 b	1.06 ± 0.01 b
2.00 mM	2.58 ± 0.01 a	4.46 ± 0.04 a	1.61 ± 0.01 a
<i>P</i>	*** ²	***	***
LSD _{0.05}	0.12	0.11	0.09
cv. Josefina			
0.05 mM	0.27 ± 0.17 c	0.86 ± 0.17 c	0.82 ± 0.02 c
0.50 mM	0.68 ± 0.03 b	1.39 ± 0.03 b	1.14 ± 0.01 b
2.00 mM	2.75 ± 0.01 a	4.60 ± 0.10 a	1.33 ± 0.03 a
<i>P</i>	***	***	***
LSD _{0.05}	0.35	0.40	0.07

¹ Los valores son medias ± SE (*n* = 9). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD (*P* = 0.05).

² Los niveles de significación están representados por * (*P* < 0.05), ** (*P* < 0.01), *** (*P* < 0.001) y ns (no significativo; *P* > 0.05).

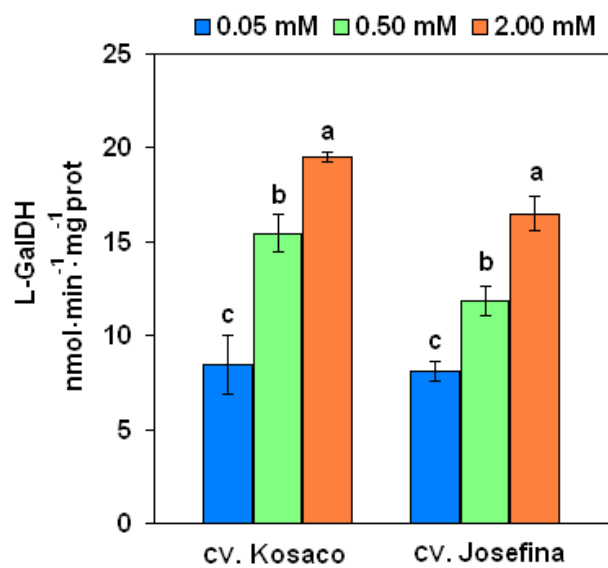


Figura 3.6. Actividad L-GaIDH en hojas de cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. Los datos son medias \pm SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

3.1.3. Asimilación del nitrato y eficiencia en el uso del nitrógeno.

El exceso de B en el medio afectó a la acumulación de las diferentes formas de N en la planta. Ambos cultivares mostraron una disminución de la concentración de NO_3^- , NH_4^+ y N orgánico cuando fueron sometidas a 2 mM de B (Figura 3.7). Además, el incremento de la concentración de B en el medio de cultivo redujo de forma significativa la actividad NR y NiR en hojas (Tabla 3.7). Estos datos confirman estudios previos dónde se muestra el efecto de niveles tóxicos de B sobre la reducción de NO_3^- en las plantas. Kastori y Petrovic (1989) encontraron que en la parte aérea de plantas de girasol la toxicidad por B disminuía el contenido de N y la actividad NR. Similarmente, en trigo y cebada también se ha observado que el exceso de B en el medio inhibe la actividad NR (Mahboobi *et al.*, 2002). Aunque el efecto de la toxicidad de B sobre la absorción de NO_3^- no ha sido analizado todavía, el decremento en la concentración de NO_3^- en plantas de tomate sometidas a 2 mM de B podría deberse a cambios electroquímicos en la membrana plasmática. De acuerdo con esta hipótesis, se ha observado que plantas deficientes en B pueden presentar una reducción de la absorción de NO_3^- como consecuencia de cambios en la expresión de una H^+ -ATPasa (Camacho-Cristóbal y Gonzáles-Fontes 2007). Además, diferentes estudios sugieren que el B podría tener algún papel relacionado con las membranas celulares, como por ejemplo en la formación y el mantenimiento del potencial o de la permeabilidad de membrana (Blevins y Lukaszewski, 1998; Brown *et al.*, 2002). En este sentido, se ha encontrado que niveles tóxicos de B pueden alterar la permeabilidad de membrana en plantas de cebada (Karabal *et al.*, 2003), tomate y pimiento (*Capsicum annuum*) (Eraslan *et al.*, 2007).

Además de los tratamientos de B, el tipo de cultivar también influyó de forma significativa sobre la concentración de N orgánico y sobre la actividad NR y NiR (Tabla A2, ver Apéndice). En este sentido, los tratamientos de B produjeron en el cv. Josefina una inhibición de la enzima NR mucho más acusada que en el cv. Kosaco (Tabla 3.7), lo que podría también reflejar la mayor sensibilidad de dicho cultivar al tratamiento 0.5 mM de B. El principal punto de control en la asimilación del NO_3^- es la reducción de éste a NH_4^+ debido a la compleja regulación tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional de la enzima NR (Lea y Azevedo, 2007). Nuestros datos indican que la actividad de dicha enzima es inhibida por el incremento de los niveles de B en el medio y que por tanto los niveles de N orgánico así como la disminución del crecimiento en las plantas de tomate estuvo fuertemente condicionada por su capacidad para reducir el NO_3^- a NH_4^+ bajo condiciones de exceso de B.

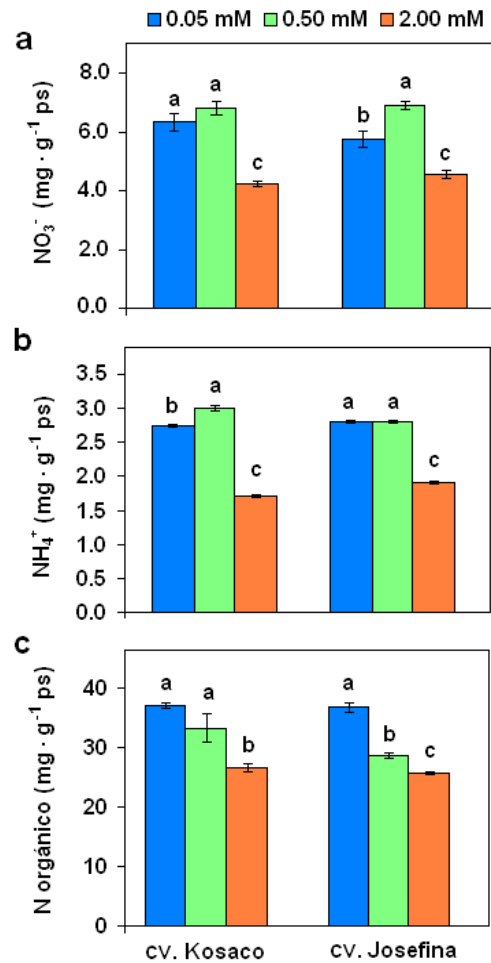


Figura 3.7. Concentración foliar de NO₃⁻ (a), NH₄⁺ (b) y N orgánico (c) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. Los datos son medias ± SE (*n* = 9). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD (*P* = 0.05).

Tabla 3.7. Actividad NR y NiR de hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.

Cultivar/Boro	NR (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹ prot)	NiR (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹ prot)
cv. Kosaco		
0.05 mM	5.15 ± 0.02 a ¹	22.60 ± 0.32 a
0.50 mM	4.50 ± 0.01 b	14.18 ± 0.23 b
2.00 mM	1.50 ± 0.04 c	14.88 ± 0.07 b
<i>P</i>	*** ²	***
LSD _{0.05}	0.08	0.87
cv. Josefina		
0.05 mM	5.34 ± 0.09 a	25.03 ± 0.13 a
0.50 mM	2.52 ± 0.02 b	19.99 ± 0.14 b
2.00 mM	0.44 ± 0.03 c	18.27 ± 0.18 c
<i>P</i>	***	***
LSD _{0.05}	0.18	0.52

¹ Los valores son medias ± SE (*n* = 9). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD (*P* = 0.05). ² Los niveles de significación están representados por * (*P* < 0.05), ** (*P* < 0.01), *** (*P* < 0.001) y ns (no significativo; *P* > 0.05).

La asimilación del NH_4^+ se realiza fundamentalmente por medio del ciclo GS/GOGAT (Lea y Ireland, 1999) y también, en menor medida, a través de la vía GDH (Robinson *et al.*, 1991). En nuestro experimento, las plantas de tomate sometidas a exceso de B mostraron un incremento significativo en la actividad de las principales enzimas implicadas en dicho proceso (Figura 3.8), solo encontrándose diferencias entre ambos cultivares en la actividad GS (Tabla A2, ver Apéndice). De forma similar a nuestros resultados, Mahboobi *et al.* (2002) registraron una mayor actividad GDH en plantas de trigo y cebada sometidas a toxicidad por B. En comparación con una situación de déficit de B, López-Lefebvre *et al.* (2002) también observaron un incremento de la asimilación del NH_4^+ en hojas de tabaco. Bajo otros tipos de estrés como sequía, salinidad, alteración del fotoperiodo, elevada temperatura o contaminación atmosférica también se ha encontrado un incremento de la actividad de las enzimas implicadas en la asimilación del NH_4^+ (Manssur 2000; Mahboobi *et al.*, 2002), considerándose un mecanismo esencial para evitar los niveles tóxicos de éste metabolito derivados de la fotorrespiración (Nguyen *et al.*, 2005). De forma parecida, los resultados del presente experimento podrían sugerir un papel protector de ciclo GS/GOGAT y de la actividad GDH durante el estrés producido por elevadas concentraciones de B en el medio. No obstante, ya que ambos cultivares presentaron reducidos niveles de NH_4^+ bajo el tratamiento 2 mM de B (Figura 3.7), podría ser posible que la activación de este proceso bajo condiciones de exceso de B fuese tan solo una forma de mantener la asimilación del N en buen funcionamiento.

Los tratamientos de toxicidad de B también produjeron un incremento de la concentración de aminoácidos en hojas de ambos cultivares de tomate (Tabla 3.8). Por el contrario, la concentración de proteínas solubles se redujo (Tabla 3.8). Esta disminución de la concentración de proteínas y N orgánico en hojas de tomate sometidas a exceso de B, junto con el incremento de la actividad GS y de la concentración de aminoácidos, podría indicar una removilización de N hacia los tejidos meristemáticos. Algunas plantas responden a extensos periodos de estrés activando la removilización de N en las hojas a través de la degradación de proteínas y de un rápido transporte de los aminoácidos y el NH_4^+ liberados hacia los órganos en desarrollo (Fukutoku y Yamada, 1984; Becker *et al.*, 1986). Por ejemplo, Bauer *et al.* (1997) encontraron que en hojas de tomate se estimulaba la actividad GS y la degradación de proteínas cuando las plantas eran sometidas a extensos periodos de sequía. De modo contrario a nuestros resultados, en otro estudio el exceso de B no causó cambios significativos en la concentración de proteínas de hojas de cebada (Karabal *et al.*, 2003).

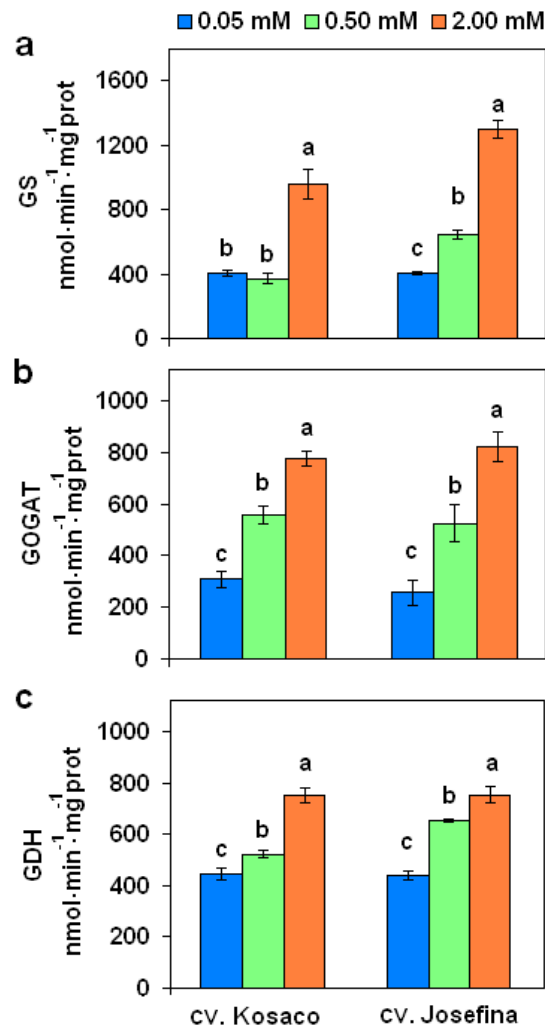


Figura 3.8. Actividad GS (a), GOGAT (b) y GDH (c) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. Los datos son medias \pm SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

Tabla 3.8. Concentración foliar de aminoácidos y proteínas solubles de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días.

Cultivar/Boro	Aminoácidos (mg · g ⁻¹ pf)	Proteínas solubles (mg · g ⁻¹ pf)
cv. Kosaco		
0.05 mM	0.77 \pm 0.02 c ¹	3.87 \pm 0.03a
0.50 mM	0.98 \pm 0.04 b	3.98 \pm 0.06a
2.00 mM	1.23 \pm 0.01 a	3.70 \pm 0.03b
<i>P</i>	*** ²	**
LSD _{0.05}	0.08	0.14
cv. Josefina		
0.05 mM	0.77 \pm 0.03 c	4.01 \pm 0.06 a
0.50 mM	0.87 \pm 0.01 b	3.61 \pm 0.06 b
2.00 mM	1.26 \pm 0.03 a	3.41 \pm 0.02 c
<i>P</i>	***	***
LSD _{0.05}	0.09	0.17

¹ Los valores son medias \pm SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

² Los niveles de significación están representados por * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) y ns (no significativo; $P > 0.05$).

Mejorar el NUE de los cultivos en ambientes Mediterráneos es uno de los principales objetivos de la investigación agraria (Raun y Jhonson, 1999). Puesto que el N es un factor determinante durante el desarrollo y crecimiento de la planta, un elevado NUE va a ser clave para mantener la producción de un cultivo cuando este se encuentra bajo condiciones de estrés. El NUE se define como la producción de biomasa por unidad de N disponible (Moll *et al.*, 1982), lo que engloba dos conceptos fundamentales: (1) la habilidad de la planta para extraer el N del suelo y (2) la capacidad para emplear dicho N en la producción de mayor biomasa (Lea y Azevedo, 2006; Ruiz *et al.*, 2006). Este es un fenómeno complejo que depende tanto de factores externos, tales como la cantidad de N disponible en el suelo o la luz; como de factores internos, incluyendo la capacidad de la planta para absorber y asimilar el N, la fotosíntesis o los niveles de hormonas entre otros (Pathak *et al.*, 2008). En nuestro experimento, cuando las plantas de tomate fueron sometidas a elevados niveles de B, tanto el TNC como el TNA disminuyó de forma significativa con respecto a los tratamientos control (Figura 3.9 a y b).

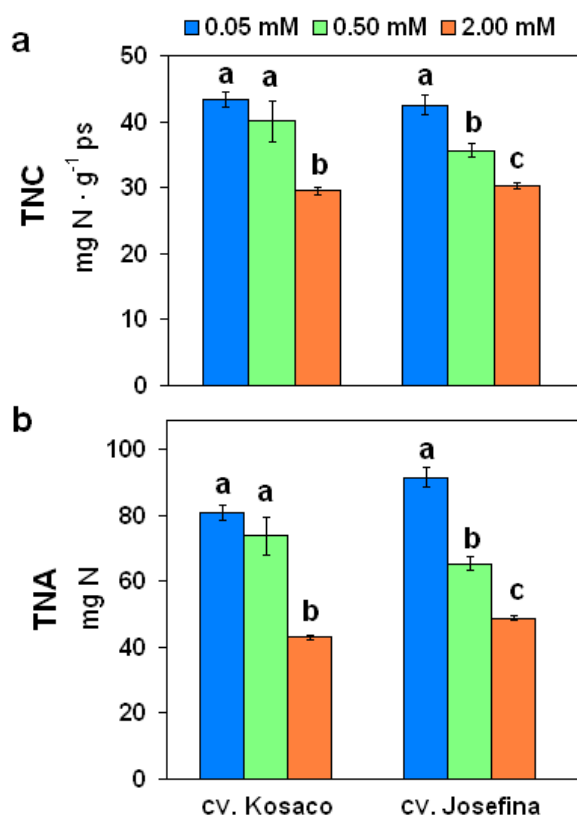


Figura 3.9. Concentración total de nitrógeno (TNC) (a) y acumulación total de nitrógeno (TNA) (b) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. Los datos son medias \pm SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

Por otra parte, el exceso de B causó una pérdida de eficiencia en la absorción de N con respecto a los tratamientos control, produciendo una disminución del NU_pE en ambos cultivares de tomate (Figura 3.10 a). Por el contrario, el NU_tE presentó una tendencia positiva, señalando una mayor capacidad de la planta para producir biomasa por unidad de N acumulado (Figura 3.10 b). Algunos autores han mostrado que en maíz, trigo y en cítricos aparece una reducción del NU_tE bajo estrés por salinidad o sequía (Lea-Cox y Syvertsen, 1993; Li *et al.*, 2003; Irshad *et al.*, 2008). También, en un estudio con plantas de cebolla (*Allium cepa*) crecidas bajo elevados niveles de B se observó una reducción en dicho parámetro (Inal y Tarakcioglu, 2003). No obstante, nuestros resultados muestran que mientras el exceso de B produce una disminución de la absorción y reducción del NO₃⁻, en hojas de tomate se induce una mayor asimilación del NH₄⁺ y un mayor NU_tE, lo que podría ser una respuesta de la planta para intentar mantener la producción de biomasa bajo condiciones de estrés por B. Independientemente del tratamiento de B, el tipo de cultivar no afectó de forma significativa a los diferentes parámetros relacionados con el NUE (Tabla A2, ver Apéndice), lo que sugiere que dicha respuesta fue similar en ambos cultivares de tomate.

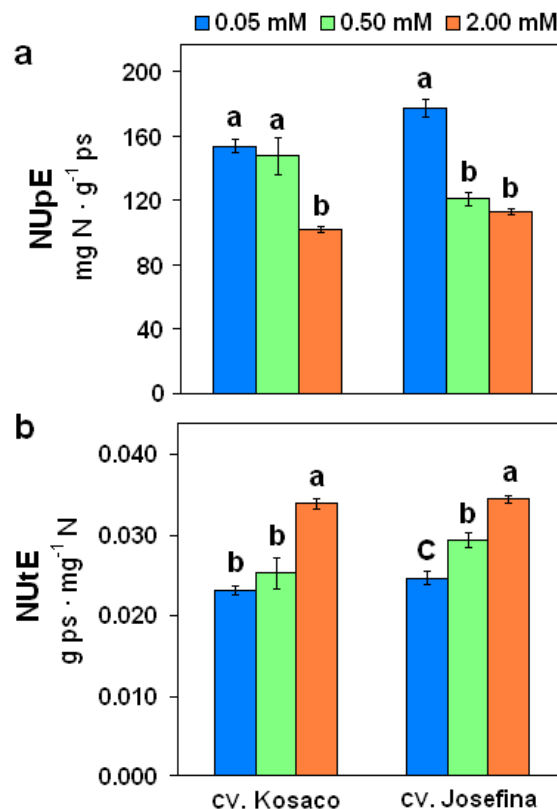


Figura 3.10. Eficiencia en la absorción de nitrógeno (NU_pE) (a) y eficiencia en la utilización del nitrógeno (NU_tE) (b) en cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 14 días. Los datos son medias \pm SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

3.1.4. Interpretación del bloque experimental I.

A pesar de que el B es un micronutriente esencial, cuando se encuentra a elevadas concentraciones constituye un elemento tóxico que afecta al crecimiento y al desarrollo normal de los cultivos (Nable *et al.*, 1997). Esto fue observado en nuestro estudio con plantas de tomate, donde la excesiva acumulación de B en hojas redujo la biomasa y el RGR_F , fundamentalmente en el cv. Josefina que se mostró más sensible a los tratamientos de B empleados en el experimento (Tabla 3.1; Figura 3.2). Bajo tales condiciones va a ser de vital importancia la regulación en los tejidos vegetales de uno de los procesos básicos que intervienen durante el desarrollo de cualquier estrés abiótico, el metabolismo oxidativo. Este concierne dos fenómenos opuestos: (1) la formación de ROS que pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y producir peroxidación de lípidos; y (2) la activación de compuestos y enzimas antioxidantes capaces de eliminar y/o transformar los ROS para evitar el daño oxidativo a membranas y a distintos orgánulos celulares (Mittler, 2002). En nuestro experimento encontramos que el incremento de la concentración de B en el medio indujo una mayor acumulación foliar de H_2O_2 y MDA (Figura 3.3), lo que indicó la presencia de estrés oxidativo en la planta. En respuesta a este estrés las plantas de tomate mostraron un incremento de los niveles de ASA y GSH en hoja (Tabla 3.3 y 3.4), así como una mayor actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y APOX; Figura 3.4). Dicha respuesta ocurrió de forma más importante en el cv. Kosaco, cuyos niveles de ASA y GSH fueron superiores a los del cv. Josefina (Tabla 3.3 y 3.4), un hecho que posiblemente contribuyó a que dicho cultivar presentara no solo una menor acumulación de H_2O_2 y MDA que este último (Figura 3.3), sino también un crecimiento más estable (Tabla 3.1). En cualquier caso, ambos cultivares de tomate mostraron un pool de ASA más oxidado (Tabla 3.3), a pesar de incrementar la actividad de las enzimas del ciclo de Halliwell-Asada (Figura 3.5) encargado de reciclar el ASA a partir de su forma oxidadas (MDHA y DHA). De forma paralela, el exceso de B también dio lugar a un incremento de la actividad L-GalDH (Figura 3.6) y de los niveles de azúcares precursores de ASA (Tabla 3.6), lo que podría ser indicativo de una mayor capacidad de las plantas para sintetizar este compuesto antioxidante.

El N es uno de los factores limitantes en el desarrollo de los cultivos, siendo la regulación de su asimilación uno de los procesos claves para mantener un óptimo estado nutricional en la planta, fundamentalmente bajo condiciones de estrés. En nuestro estudio observamos que los niveles en hoja de las distintas formas de N (NO_3^- , NH_4^+ y N orgánico) disminuían de forma importante bajo el tratamiento 2 mM de B

(Figura 3.7). Dicho fenómeno fue acompañado de una inhibición de las enzimas NR y NiR (Tabla 3.7), encargadas de la reducción del NO_3^- a NH_4^+ . La enzima NR es el principal punto de regulación en la asimilación del N (Lea y Azevedo, 2007), de modo que la inhibición de dicha enzima podría considerarse una de las principales causas que contribuyeron a la reducción del crecimiento en las plantas de tomate sometidas a toxicidad de B. En este sentido, el cv. Josefina también se mostró más sensible a este estrés nutricional, ya que registró una mayor inhibición de la actividad NR con respecto al cv. Kosaco (Tabla 3.7). El siguiente paso en la asimilación del N va a ser la incorporación del NH_4^+ a esqueletos carbonados, un proceso mediado principalmente por el ciclo GS/GOGAT. Al contrario de lo que ocurrió en la reducción del NO_3^- , en ambos cultivares de tomate las enzimas implicadas en este proceso fueron inducidas de forma activa con el incremento de los niveles de B en el medio (Figura 3.8). Asimismo, la enzima GDH, a veces implicada en la asimilación del NH_4^+ , también se indujo bajo los tratamientos de toxicidad (Figura 3.8). Estos resultados sugieren un papel protector de dichas enzimas, ya que el NH_4^+ derivado de la fotorrespiración, más activa bajo condiciones de estrés, podría acumularse produciendo un efecto fitotóxico. Sin embargo, puesto que los niveles de N, incluyendo los de NH_4^+ disminuyeron con el incremento de la concentración de B en el medio, cabe pensar que la activación de dicho proceso podría tener otra finalidad. En este sentido, el incremento de la concentración foliar de aminoácidos junto con la reducción de los niveles de proteína soluble en hoja (Tabla 3.8) sugiere un proceso de removilización de N hacia los órganos en desarrollo en las plantas sometidas a toxicidad de B. Este fenómeno, unido a una mayor eficiencia en la utilización del N acumulado, como se vio reflejado en el NUtE (Figura 3.10), podría indicar cambios importantes en la economía del N, posiblemente con la finalidad de intentar mantener la producción de biomasa y el desarrollo normal de la planta durante el máximo tiempo posible.

En definitiva, los resultados presentados en este bloque experimental sugieren que la actividad antioxidante, mediada principalmente por el ASA, así como el control de la asimilación del NO_3^- , tienen un papel importante en la respuesta de plantas de tomate a elevadas concentraciones de B en el medio. Asimismo, la comparación de los dos cultivares empleados en nuestro estudio demuestra que pequeñas variaciones en estas respuestas pueden repercutir sobre el crecimiento de las plantas sometidas a este estrés nutricional.

BLOQUE EXPERIMENTAL II

Lignificación, expresión de proteínas de la pared celular, permeabilidad de membrana y eflujo de boro en raíces de tomate.

3.2.1. Crecimiento y acumulación de boro.

Las raíces de plantas de tomate sufrieron una reducción de biomasa y de RGR_R después de 16 días bajo el tratamiento 2 mM de B (Tabla 3.9; Figura 3.11). Sin embargo, bajo el tratamiento 0.5 mM no se observaron cambios significativos sobre dichos parámetros (Tabla 3.9). Ambos cultivares también mostraron un incremento similar del índice parte aérea/raíz y de la concentración de B en raíces (Tabla 3.9). En este caso, el tipo de cultivar empleado en el experimento no tuvo ningún efecto significativo sobre dichos parámetros (Tabla A3, ver Apéndice). Esta reducción del crecimiento radicular e incremento de la concentración de B se ha observado previamente en otros tipos de plantas como en trigo (Kalacy *et al.*, 1998), soja (Kováčik y Klejdus, 2008), cebada (Karabal *et al.*, 2003) y vid (Gunes *et al.*, 2006). Por otra parte, de forma similar a nuestros resultados, estudios con trigo y cebada también han mostrado que la producción de biomasa se ve afectada de forma más importante en la raíz que en la parte aérea de la planta (Kalacy *et al.*, 1998; Hayes y Reid, 2004).

Tabla 3.9. Biomasa, RGR_R , relación parte aérea / raíz y concentración de B (total y libre) de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 16 días.

Cultivar/Boro	Biomasa (g)	RGR_R ($g \cdot g^{-1} \cdot día^{-1}$)	Biomasa parte aérea / raíz	Boro total ($μg \cdot g^{-1}$ ps)	Boro libre ($μg \cdot g^{-1}$ ps)
cv. Kosaco					
0.05 mM	0.43±0.01 a ¹	0.166±0.005 a	22.77±0.31 b	51.99±14.08 c	1.40±0.51 b
0.50 mM	0.48±0.01 a	0.162±0.005 a	23.35±0.26 b	132.67±11.05 b	4.51±0.99 a
2.00 mM	0.23±0.04 b	0.098±0.003 b	29.67±0.33 a	196.06± 6.87 a	4.91±0.68 a
<i>P</i>	**2	***	**	***	**
LSD _{0.05}	0.07	0.014	0.91	38.30	2.27
cv. Josefina					
0.05 mM	0.45±0.02 a	0.152±0.004 a	22.78±0.35 b	47.50± 8.16 c	2.03±0.63 b
0.50 mM	0.41±0.01 a	0.136±0.005 a	23.21±0.28 b	97.48± 6.07 b	3.29±0.81 b
2.00 mM	0.22±0.03 b	0.098±0.002 b	29.19±0.27 a	204.12±21.04 a	5.85±0.68 a
<i>P</i>	**	**	**	**	**
LSD _{0.05}	0.08	0.014	0.88	46.69	2.14

¹ Los valores son medias ± SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

² Los niveles de significación están representados por * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) y ns (no significativo; $P > 0.05$).

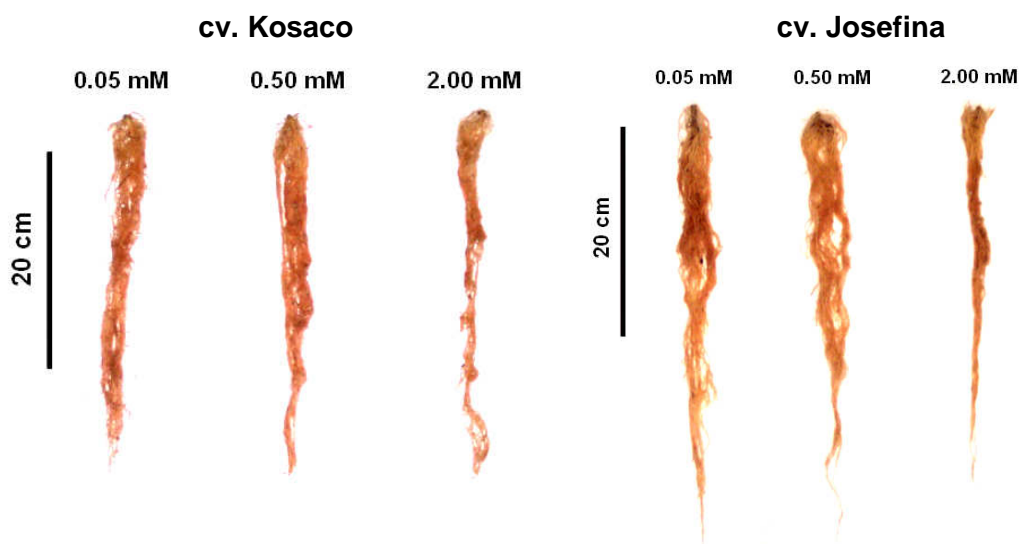


Figura 3.11. Raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) después de 16 días bajo 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B.

3.2.2. Estrés oxidativo y lignificación.

Como ya observamos en hojas en el apartado 3.1.2, uno de los factores más importantes por el que las plantas son dañadas durante condiciones adversas es la excesiva acumulación de ROS en los tejidos, tales como el O_2^{\bullet} o el H_2O_2 (Mittler, 2002). En el presente experimento los tratamientos de exceso de B no produjeron cambios significativos sobre la producción de O_2^{\bullet} en raíces del cv. Kosaco (Figura 3.12 a), pero si un incremento de la concentración de H_2O_2 después de 16 días de tratamientos (Figura 3.12 c). Por otra parte, en raíces del cv. Josefina sometidas a 0.5 y 2 mM de B se observó un ligero descenso en la producción de ROS a lo largo del experimento (Figura 3.12 b y d). El análisis de peroxidación de lípidos representado por la actividad LOX y el contenido en MDA también puede indicar la prevalencia y activación de ROS en los tejidos vegetales sometidos a estrés (Fu y Huang, 2001). En raíces del cv. Kosaco sometidas a exceso de B la actividad LOX disminuyó después de 16 días de aplicación de los tratamientos (Figura 3.12 e), mientras que no se observaron importantes cambios en la concentración de MDA en comparación con los tratamientos control (Figura 3.12 g). De forma parecida, excepto bajo el tratamiento 0.5 mM en los días 4 y 8, en raíces del cv. Josefina no se encontraron importantes cambios que denotaran un incremento de la peroxidación de lípidos como consecuencia de la toxicidad de B (Figura 3.12 f y h). Puesto que las plantas que crecen sometidas a elevadas concentraciones de B suelen acumular en raíces una concentración de dicho elemento relativamente pequeña en comparación con la que aparece en hoja (Nable *et al.*, 1997), es posible que la concentración de B alcanzada

en raíces sea insuficiente como para producir en ellas daño oxidativo. De acuerdo con esta hipótesis y con nuestros resultados, Karabal *et al.* (2003) no observaron cambios significativos ni a nivel de producción de ROS ni de peroxidación de lípidos en raíces de cebada sometidas a exceso de B.

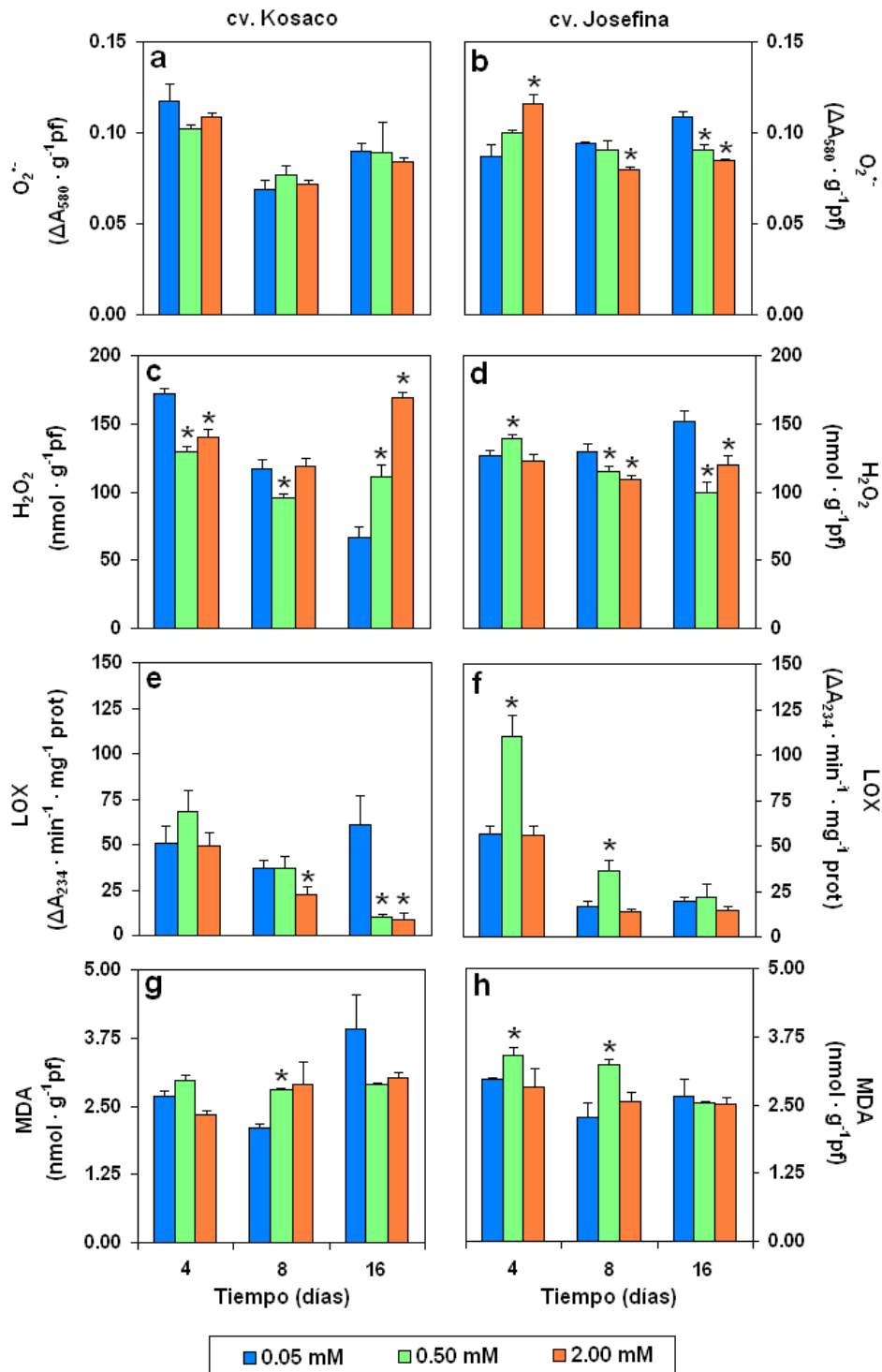


Figura 3.12. Nivel de $O_2^{\bullet-}$ (a, b), H_2O_2 (c, d), actividad LOX (e, f) y concentración de MDA (g, h) en raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos durante 4, 8 y 16 días a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B. Los datos son medias \pm SE. * Un asterisco indica diferencias significativas respecto al control (LSD; $P = 0.05$).

En cuanto a la concentración de lignina, ésta incrementó de forma significativa en raíces del cv. Kosaco sometidas a elevados niveles de B durante 16 días, mientras que en el cv. Josefina disminuyó ligeramente con los tratamientos (Tabla 3.10). En varios procesos metabólicos se utilizan ROS de modo beneficioso, como el H₂O₂ y el O₂^{•-}, que están implicados en la formación de lignina durante la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos (Inzé y Van Montagu, 1995). Se ha sugerido que la acumulación de H₂O₂ durante estrés hídrico actúa como una señal molecular que desencadena la lignificación de los tejidos vegetales (Lee *et al.*, 2007). En este sentido, nuestros resultados muestran una relación positiva entre los niveles de H₂O₂ y lignina presentes en raíces de plantas de tomate sometidas a elevados niveles de B. Por otro lado, también se han implicado a los ROS en la señal que se origina entre la percepción de un estrés y la expresión de la PAL (Dixon *et al.*, 1994). La PAL es la enzima responsable de la conversión de la L-fenilalanina a ácido *trans*-cinámico, un intermediario clave en la ruta de biosíntesis de fenoles y lignina (Rivero *et al.*, 2001; Kováčic y Klejdus, 2008). En el presente experimento, aunque ambos cultivares presentaron un incremento de la actividad PAL cuando fueron sometidos a elevados niveles de B (Tabla 3.10), no se observó ninguna relación entre la concentración de fenoles solubles y la actividad de dicha enzima (Tabla 3.10). La actividad PAL puede regularse por el producto de su reacción (Blount *et al.*, 2000), por tanto, una reducida concentración de fenoles en raíces de tomate podría haber contribuido a incrementar la actividad PAL. Por otra parte, de acuerdo con Ghanati *et al.* (2005), la inducción de la actividad PAL a causa de niveles tóxicos de B podría influenciar el contenido de fenoles presentes en la pared celular.

Tabla 3.10. Lignina, actividad PAL y concentración de fenoles en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 16 días.

Cultivar/Boro	Lignina (mg · g ⁻¹ ps)	PAL (ΔA ₅₃₀ · min ⁻¹ · mg ⁻¹ prot)	Fenoles (mg ácido cafeico · g ⁻¹ pf)
cv. Kosaco			
0.05 mM	11.69±0.21 c ¹	0.043±0.002 b	2.21±0.04 a
0.50 mM	14.69±0.46 b	0.063±0.005 a	2.10±0.02 b
2.00 mM	16.04±0.25 a	0.054±0.003 a	2.05±0.02 b
<i>P</i>	*** ²	*	**
LSD _{0.05}	0.95	0.009	0.08
cv. Josefina			
0.05 mM	12.89±0.35 a	0.042±0.002 b	2.16±0.02 a
0.50 mM	9.96±0.17 b	0.050±0.001 ab	2.20±0.02 a
2.00 mM	10.68±0.19 b	0.056±0.005 a	2.20±0.01 a
<i>P</i>	***	*	ns
LSD _{0.05}	0.73	0.010	0.06

¹ Los valores son medias ± SE (n = 9). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD (*P* = 0.05). ² Los niveles de significación están representados por * (*P* < 0.05), ** (*P* < 0.01), *** (*P* < 0.001) y ns (no significativo; *P* > 0.05).

Otra enzima que normalmente está implicada en el metabolismo fenólico y de la lignina es la PPO, que cataliza la oxidación de los polifenoles y la hidroxilación de los monofenoles (Rivero *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007). En comparación con el tratamiento control, la actividad de esta enzima incrementó de forma significativa en raíces del cv. Kosaco después de 16 días bajo el tratamiento 2 mM de B (Figura 3.13 a), mientras que en el cv. Josefina se redujo (Figura 3.13 b). En estudios anteriores se ha observado que la actividad de esta enzima incrementa en respuesta a diversos tipos de estrés abiótico como la sequía, elevadas temperaturas o metales pesados (Rivero *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Las peroxidasas son las enzimas que más directamente se encuentran implicadas en las biosíntesis de lignina, catalizando la polimerización oxidativa de los precursores de lignina en presencia de H_2O_2 (Barceló *et al.*, 2004). Después de 8 días desde el inicio de los tratamientos, las raíces del cv. Kosaco sometidas a 2 mM de B mostraron una mayor actividad GPOX en comparación con el tratamiento control (Figura 3.13 c). Por otro lado, a los 4 días del inicio de los tratamientos, las raíces de dicho cultivar sometidas a exceso de B mostraron una reducción de la actividad SPOX y SPOX-CW (Figura 3.13 e y g). No obstante, de forma paralela a la enzima GPOX, la actividad SPOX también mostró un incremento significativo en raíces sometidas a 2 mM de B durante 8 y 16 días (Figura 3.13 e). En el caso del cv. Josefina, aunque el exceso de B no causó un efecto bien definido sobre la actividad peroxidasa (Figura 3.13 d, f y h), a los 16 días también se observó un incremento significativo de la actividad SPOX bajo el tratamiento 2 mM (Figura 3.13 f). De forma similar a estos resultados, en raíces de soja también se ha observado un incremento de la actividad SPOX frente a elevadas concentraciones de B en el medio (Ghanati *et al.*, 2005).

En el presente experimento, el análisis conjunto de los datos obtenidos sobre H_2O_2 , lignina, PPO, GPOX y SPOX sugiere que niveles tóxicos de B inducen lignificación en raíces del cv. Kosaco pero no en raíces del cv. Josefina. Esta diferencia de lignificación entre ambos cultivares de tomate podría indicar una elevada variación genotípica a nivel de raíz en respuesta a la toxicidad por B. De acuerdo con esta hipótesis, se ha observado que existe una amplia variabilidad genética en relación con la deposición de lignina de plantas sometidas a diversos tipos de estrés como patógenos, salinidad o toxicidad por Al (Jbir *et al.*, 2001; Pomar *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 2008). Por otra parte, nuestros resultados también sugieren que la lignificación de raíces no es un factor esencial que esté implicado en la reducción del crecimiento radicular bajo condiciones de exceso de B, ya que la disminución de biomasa en raíces

del cv. Josefina sometidas a 2 mM de B no puede relacionarse con una mayor concentración de lignina.

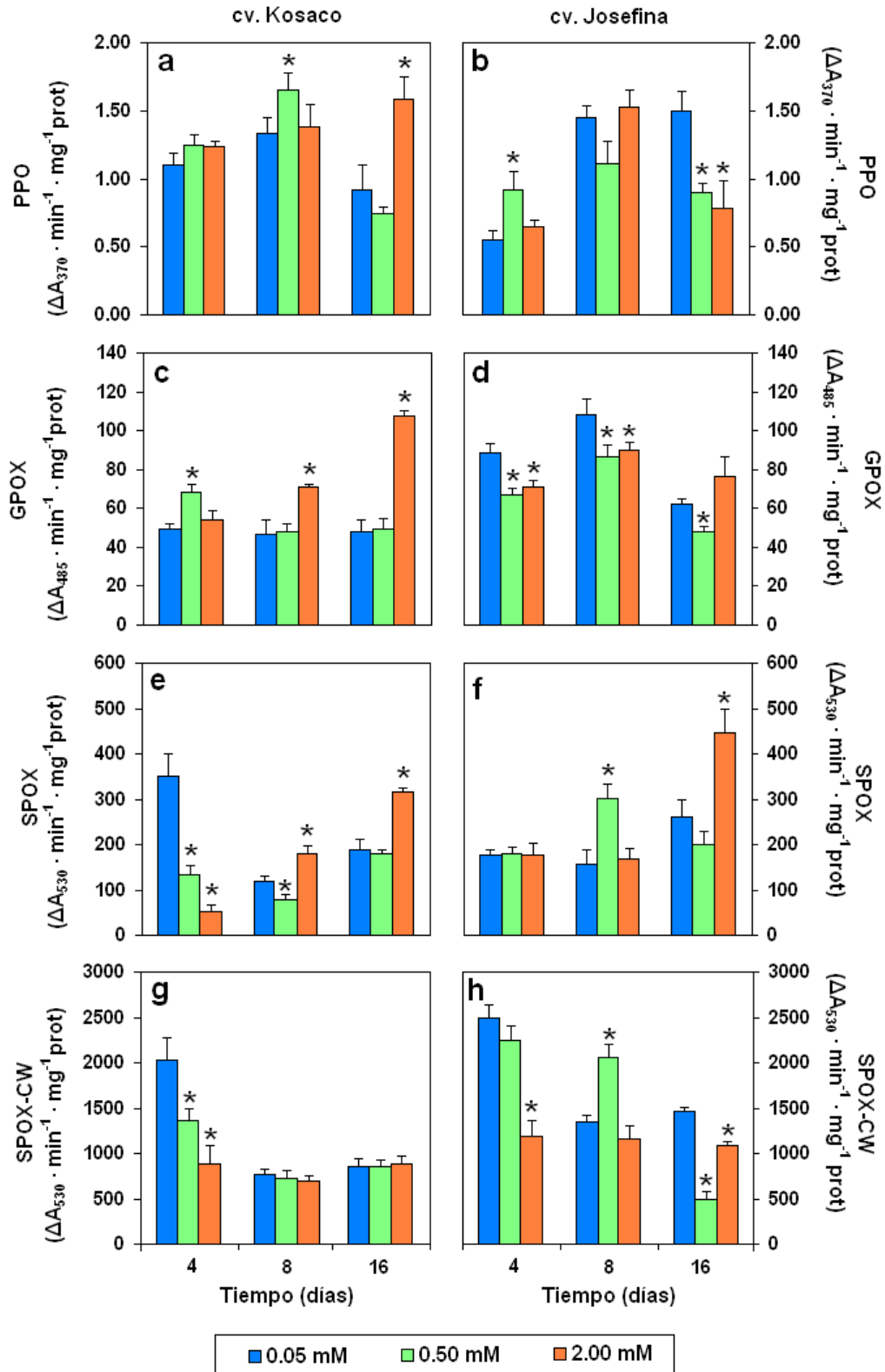


Figura 3.13. Actividad PPO (a, b), GPOX (c, d), SPOX (e, f) y SPOX-CW (g, h) en raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos durante 4, 8 y 16 días a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B. Los datos son medias \pm SE. * Un asterisco indica diferencias significativas respecto al control (LSD; $P = 0.05$).

3.2.3. Expresión de proteínas de la pared celular.

Uno de los constituyentes esenciales de la pared celular en los organismos vegetales son proteínas. Éstas se encuentran implicadas en la estructura de la pared y en la modificación de sus componentes, y además intervienen en la transmisión de señales mediante la interacción con otras proteínas de la membrana plasmática (Pilling y Höfte, 2003; Jamet *et al.*, 2006). En el presente bloque experimental realizamos geles bidimensionales para estudiar de forma preliminar el efecto de niveles tóxicos de B sobre la expresión de proteínas iónicamente unidas a la pared. Una vez realizada la electroforesis en dos dimensiones se encontró un patrón muy similar entre la expresión de dichas proteínas en raíces sometidas a 2 mM de B y bajo condiciones control (0.05 mM), observando bajo ambos tratamientos una mayoría de proteínas de carácter básico (Fibura 3.14). Entre las pocas diferencias significativas halladas, también se encontró una mayoría de proteínas inhibidas bajo el tratamiento 2 mM de B, fundamentalmente en el cv. Kosaco (Figura 3.15 a y b; Tabla A5, ver Apéndice).

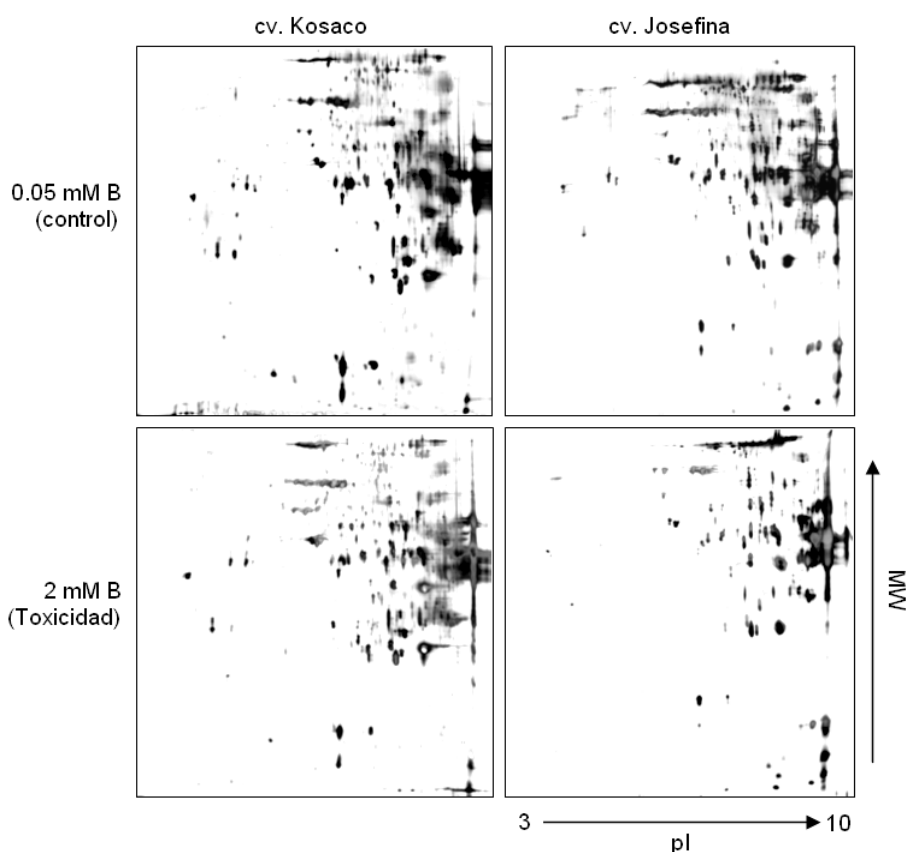


Figura 3.14. Geles bidimensionales teñidos con nitrato de plata. Patrón de proteínas iónicamente unidas a la pared celular en raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos durante 16 días a 0.05 (control) y 2 mM de B. La flecha horizontal indica la separación de acuerdo al punto isoeléctrico (pI) y la vertical la separación de menor a mayor peso molecular (MW).

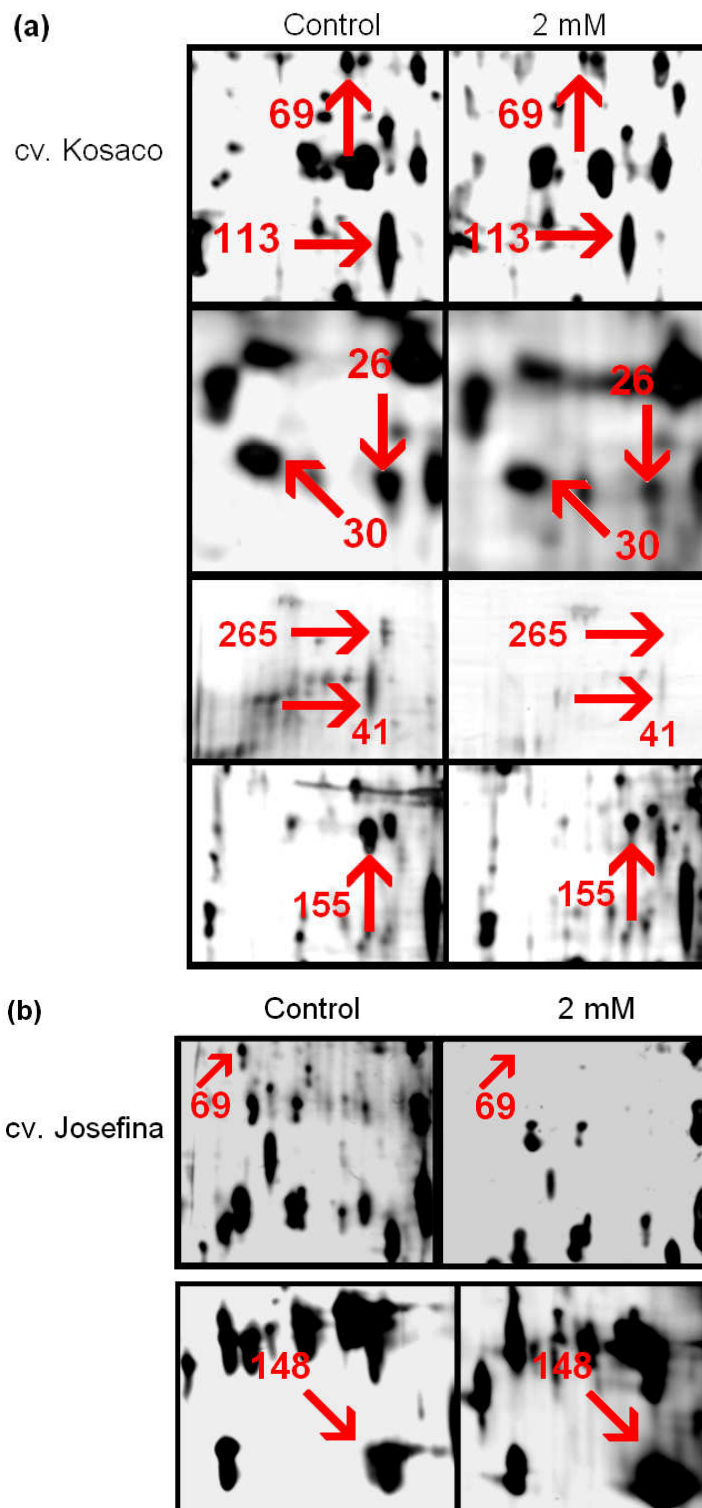


Figura 3.15. Detalle de diferentes zonas de geles bidimensionales teñidos con nitrato de plata. Comparación de patrones de expresión de proteínas iónicamente unidas a la pared celular en raíces de dos cultivares de tomate, Kosaco (a) y Josefina (b), sometidos durante 16 días a 0.05 (control) y 2 mM de B. Las flechas rojas indican aquellos 'spots' que mostraron diferencias significativas en sus volúmenes.

La proteómica es una de las herramientas biotecnológicas más recientes que se están utilizando con el fin de discernir la función biológica de proteínas que participan en respuestas de tipo biótico y abiótico (Agrawal *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004), de modo que no es solo una herramienta útil para describir proteomas completos sino también para comparar proteomas afectados por diferentes situaciones fisiológicas, tales como aquellas resultantes de la exposición de las plantas a estrés (Ahsan *et al.*, 2007). Mediante esta técnica, en raíces sometidas a sequía o toxicidad por Al se han observado cambios en la expresión de proteínas de la pared celular (Kenzhebaeva *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2007). De forma similar, nuestros resultados indican que la presencia de niveles tóxicos de B en el medio puede afectar a la expresión de dichas proteínas. Sin embargo, aunque la mayoría del B de las células vegetales se sitúa en la pared celular, donde es esencial para la formación de dímeros de RG-II (Brown *et al.*, 2002; O'Neill *et al.*, 2004), todavía es necesaria una mayor investigación para saber si los cambios de expresión observados en raíces de tomate están relacionados con la presencia del B en la pared o bien derivan de un efecto secundario común a cualquier otro tipo de estrés abiótico. Por otro lado, si comparamos los datos obtenidos en ambos cultivares, podemos observar que éstos solamente coincidieron en la inhibición de una proteína (Figura 3.15 a y b; Tabla A5, ver Apéndice), un resultado, que junto a las diferencias de lignificación, podría indicar cierta variabilidad genética a nivel radicular en la respuesta a la toxicidad por B de plantas de tomate.

3.2.4. Permeabilidad de membrana y eflujo de boro.

El grado de susceptibilidad de las plantas a la deficiencia o exceso de B se ha atribuido en parte a la variabilidad en la composición lipídica de sus membranas (Dordas y Brown, 2000). Varios estudios han demostrado que la deficiencia de B altera el flujo de iones y solutos a través de la membrana plasmática (Cara *et al.*, 2002), pero apenas existe información sobre lo que ocurre con la permeabilidad de las membranas en raíces sometidas toxicidad por B. En nuestro estudio, las raíces de ambos cultivares de tomate mostraron una mayor permeabilidad al K^+ cuando crecieron bajo 2 mM de B (Tabla 3.11). En el cv. Kosaco, además se observó un incremento significativo de permeabilidad a la sacarosa bajo dicho tratamiento (Tabla 3.11). De modo similar, en otro estudio con raíces de girasol, la aplicación de B al medio incrementó la permeabilidad al K^+ con respecto a condiciones de deficiencia de dicho elemento (Schon *et al.*, 1990). Es posible que esta inducción de la permeabilidad al K^+ este relacionada con un papel del B en el mantenimiento de la integridad de las membranas (Brown *et al.*, 2002). En nuestro estudio, aunque el incremento de la concentración de

B en el medio indujo cambios en la permeabilidad de algunos solutos (Tabla 3.12), los datos de peroxidación de lípidos (Figura 3.12 e-h) y de permeabilidad analizados juntos parecen indicar que el exceso de B no produjo daños en las membranas de raíces de tomate. De acuerdo con estos resultados, Karabal *et al.* (2003) tampoco encontró indicios de daños en las membranas celulares de raíces de cebada sometidas a niveles tóxicos de B.

Tabla 3.11. Permeabilidad de membrana de diferentes solutos (aminoácidos, fenoles, sacarosa y K⁺) en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B durante 16 días.

Cultivar/Boro	Permeabilidad de membrana ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$)			
	Aminoácidos	Fenoles	Sacarosa	K ⁺
cv. Kosaco				
0.05 mM	0.75±0.04 a ¹	0.56±0.02 a	0.59±0.04 b	3.05±0.06 b
0.50 mM	0.61±0.05 a	0.58±0.07 a	0.52±0.03 b	2.94±0.03 b
2.00 mM	0.62±0.06 a	0.65±0.04 a	0.95±0.07 a	4.20±0.04 a
<i>P</i>	ns ²	ns	**	***
LSD _{0.05}	0.16	0.14	0.16	0.16
cv. Josefina				
0.05 mM	0.83±0.03 b	0.66±0.03 b	0.89±0.08 a	3.43±0.05 b
0.50 mM	1.15±0.08 a	1.09±0.17 a	0.67±0.01 a	3.41±0.03 b
2.00 mM	0.70±0.07 b	0.98±0.17 ab	0.69±0.03 a	3.98±0.03 a
<i>P</i>	**	*	ns	***
LSD _{0.05}	0.21	0.39	0.17	0.13

¹ Los valores son medias ± SE (*n* = 9). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD (*P* = 0.05). ² Los niveles de significación están representados por * (*P* < 0.05), ** (*P* < 0.01), *** (*P* < 0.001) y ns (no significativo; *P* > 0.05).

Las raíces de ambos cultivares también mostraron un rápido eflujo de B cuando fueron sometidas a elevados niveles de dicho elemento (Figura 3.16). Este efecto ocurrió de forma similar cuando el eflujo se ensayó en presencia de un inhibidor metabólico (NaN₃) (Figura 3.16). Generalmente, bajo niveles óptimos de B, el transporte de dicho micronutriente ocurre a través de difusión pasiva, un proceso que depende de la composición y origen de la membrana así como del tipo de planta (Brown *et al.*, 2002). Al igual que se ha encontrado en estudios anteriores, nuestros resultados sugieren que en plantas de tomate sometidas a elevados niveles de B, el eflujo de éste está fuertemente condicionado por su concentración en la raíz. Así, en plantas de cebada, Hayes y Reid (2004) observaron que un rápido eflujo de B ocurría cuando se incubaban raíces (previamente suplementadas con niveles tóxicos de B) en una solución libre de dicho elemento. Por otro lado, en un experimento diferente, se observó que la aplicación de 5 mM de B junto con 0.5 mM de NaN₃ incrementaba la concentración de B en raíces de cultivares de cebada tolerantes, pero no en raíces de cultivares sensibles, a elevadas concentraciones de dicho micronutriente (Hayes y

Reid, 2004). Este fenómeno se debe a la presencia de un eflujo activo en los genotipos tolerantes (Takano *et al.*, 2008). En el presente trabajo, los datos sobre acumulación y eflujo de B así como de crecimiento radicular en raíces de ambos cultivares de tomate, sugieren que estos probablemente no presentan ningún mecanismo activo de exclusión. Esto es coherente con lo que se ha observado en otros estudios realizados con plantas de cebada, dónde los cultivares que presentan este mecanismo se caracterizan por mantener constante su crecimiento y concentración de B en la raíz cuando crecen en un medio que contiene niveles tóxicos de dicho elemento (Choi *et al.*, 2007; Takano *et al.*, 2008).

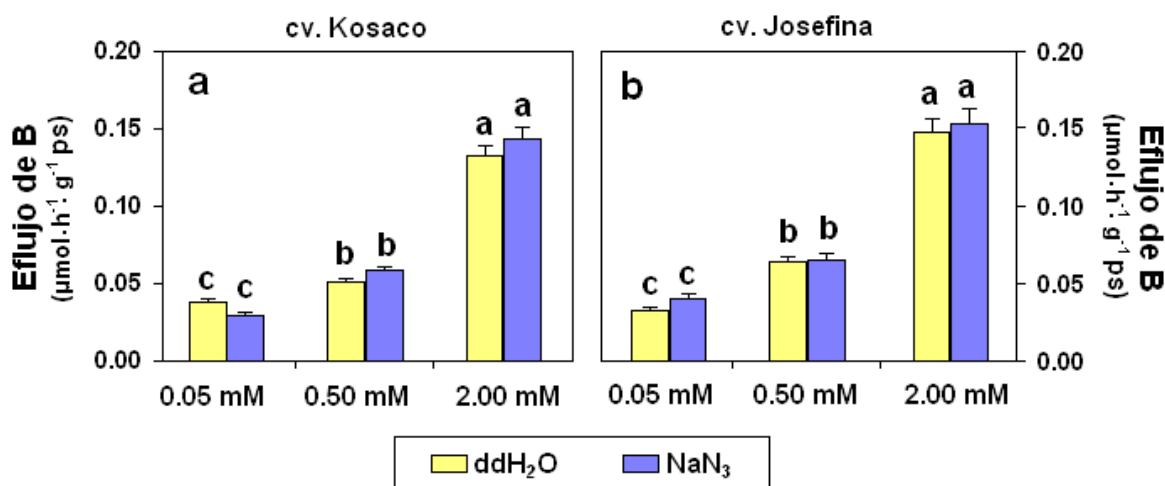


Figura 3.16. Eflujo de B ensayado en ausencia (ddH₂O) y en presencia de un inhibidor metabólico (NaN₃) en raíces de dos cultivares de tomate, Kosaco (a) y Josefina (b), sometidos durante 16 días a 0.05 (control), 0.5 y 2 mM de B. Los datos son medias ± SE ($n = 9$). En cada cultivar las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas LSD ($P = 0.05$).

3.2.5. Interpretación general del bloque experimental II.

A diferencia de lo que ocurre en la parte aérea de la planta, las raíces sometidas a exceso de B no parecen desarrollar síntomas visibles de toxicidad (Nable *et al.*, 1997), aunque si muestran una reducción del crecimiento (Kalayci *et al.*, 1998; Gunes *et al.*, 2006). Esto fue observado en nuestro estudio con plantas de tomate expuestas a 2 mM de B, las cuales no solamente presentaron un incremento de la concentración radicular de dicho elemento sino también una disminución significativa de biomasa y de RGR_R (Tabla 3.9; Figura 3.11). Una de las posibles consecuencias del incremento de la concentración de B en raíces podría ser el desarrollo de estrés oxidativo. Sin embargo, excepto un incremento de los niveles de H_2O_2 en el cv. Kosaco (Figura 3.12 c), el análisis de los niveles de ROS y de peroxidación de lípidos no indicó la existencia de tal estrés a nivel radicular (Figura 3.12).

Algunos tipos de estrés inhiben la elongación de la raíz como consecuencia de una mayor deposición de lignina en la pared celular (Shopfer *et al.*, 2001), por lo que ésta también podría ser una causa de la disminución del crecimiento radicular en plantas de tomate. Sin embargo, el exceso de B en el medio produjo un incremento de la concentración de lignina solamente en el cv. Kosaco (Tabla 3.10), lo que sugiere que la lignificación no fue una causa fundamental que contribuyera a la reducción de la biomasa y del RGR_R , un hecho que fue similar en ambos cultivares. Por otro lado, dicho resultado también podría explicar que tras 16 días bajo elevadas concentraciones de B el cv. Kosaco presentara un mayor incremento con respecto a las plantas control de los niveles de H_2O_2 , puesto que éste último es necesario para la polimerización oxidativa de los precursores de lignina (Barceló *et al.*, 2004). En este sentido, las plantas de tomate también mostraron un incremento de la actividad de varias enzimas implicadas en el metabolismo de los fenoles y en la biosíntesis de lignina (PAL, PPO, GPOX y SPOX), cambios que tuvieron lugar principalmente en el cv. Kosaco (Tabla 3.10; Figura 3.13 a-f). Aunque, un estudio más profundo sería necesario, cabe la posibilidad de que las diferencias de lignificación encontradas entre el cv. Kosaco y el cv. Josefina estén relacionadas con el nivel de sensibilidad que estos mostraron frente a la toxicidad de B (véase apartado 3.1.1 y 3.3.1).

Dado que en los organismos vegetales el B se encuentra principalmente asociado a la pared celular (Brown *et al.*, 2002), nos planteamos si un exceso de dicho elemento podría alterar las proteínas presentes en la raíz de plantas de tomate. Así, el análisis en geles bidimensionales de proteínas unidas iónicamente a la pared celular

reveló ciertas diferencias entre los dos cultivares estudiados. No obstante ambos coincidieron en que la mayoría de las proteínas que presentaban alterada su expresión estaban inhibidas bajo toxicidad por B (Tabla A5, ver Apéndice), lo que en definitiva demuestra que el exceso de dicho micronutriente en el medio también es capaz de alterar la composición proteica de la pared celular.

Otro posible efecto del exceso de B en las raíces sería un cambio en la permeabilidad de las membranas, lo que podría afectar a la interacción de la planta con el suelo y al transporte de sustancias a través de la raíz. Sin embargo, los resultados de permeabilidad junto con los de estrés oxidativo en raíces sugieren que en dicho tejido los niveles de B fueron insuficientes como para inducir un daño significativo sobre las membranas (Figura 3.12 e-h; Tabla 3.11). Por otra parte, de acuerdo con estudios anteriores (Hayes y Reid, 2004), nuestros datos también indican que ambos cultivares de tomate presentaban un rápido eflujo de B en la raíz (Figura 3.16), el cual sería independiente de transportadores activos, de forma similar a lo que ocurre con la absorción de B bajo condiciones óptimas de dicho elemento. Esto último concuerda con la ausencia de un mecanismo activo de eflujo de B en plantas de tomate y por tanto con la elevada acumulación foliar de dicho elemento que éstas mostraron en los experimentos presentados a lo largo de esta tesis (véase apartado 3.1.1 y 3.3.1).

BLOQUE EXPERIMENTAL III

Evolución temporal de diferentes indicadores de estrés en hoja.

3.3.1. Crecimiento y acumulación de boro.

Sólo en el día 15 después de iniciar los tratamientos se observó una reducción significativa de biomasa foliar bajo los tratamientos de toxicidad de B (Figura 3.17 a). Sin embargo, en el día 10 ambos cultivares ya mostraban una reducción del área foliar bajo el tratamiento 2 mM (Figura 3.17 b). La descompensación en el tiempo entre biomasa y área foliar probablemente fue debida a la elevada presencia de necrosis en las hojas sometidas a niveles tóxicos de B, cuya aparición fue anterior al día 10. En el caso del cv. Josefina también se observó una importante reducción de la biomasa y del área foliar respecto al tratamiento control bajo 0.5 mM de B (Figura 3.17 a y b), lo que sugiere, como ya fue indicado en el apartado 3.1.1 (véase pág. 63), que dicho cultivar presenta una mayor sensibilidad a la toxicidad por B que el cv. Kosaco.

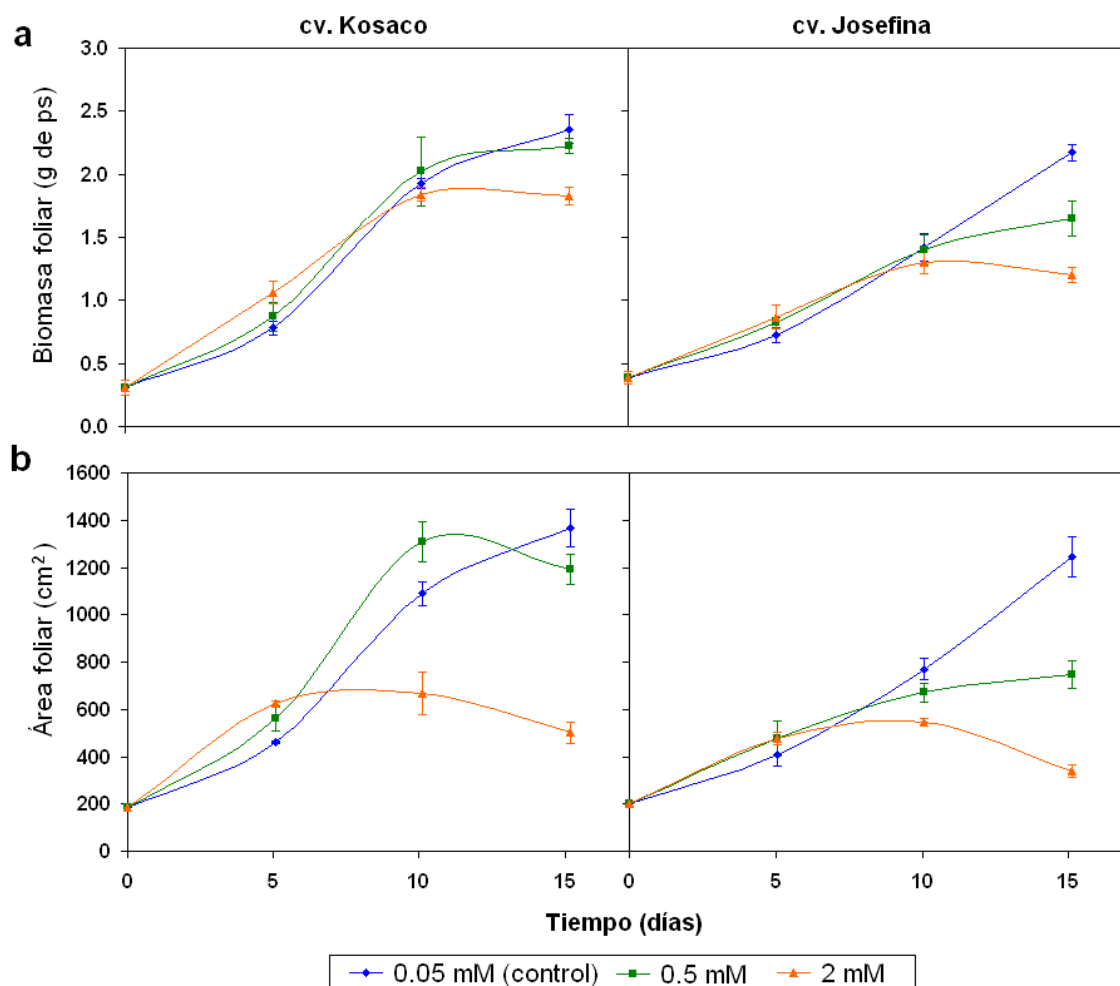


Figura 3.17. Cambios de biomasa (a) y área foliar (b) a lo largo de 15 días en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B. Los datos representados son medias (n=9) \pm SE.

La concentración foliar de B incrementó rápidamente con los tratamientos de toxicidad de este micronutriente, un efecto que fue evidente desde el día 5 en las plantas crecidas bajo el tratamiento 2 mM (Figura 3.18). Además de los tratamientos, el tipo de cultivar también tuvo un efecto significativo sobre los niveles de B en hoja (Tabla A4, ver Apéndice). En este sentido, en los días 10 y 15, el cv. Josefina fue el que registró la mayor concentración foliar de dicho elemento (Figura 3.18). Por otro lado, nuestros resultados muestran que las plantas de tomate sometidas a exceso de B fueron capaces de mantener su crecimiento durante cierto tiempo a pesar de acumular una concentración de B en hojas muy superior a las plantas crecidas bajo condiciones control. Dicho fenómeno fue más evidente en el cv. Kosaco, dónde las plantas sometidas a 0.5 mM de B mostraron un crecimiento muy similar al control (Figura 3.17), a pesar de duplicar su concentración foliar de B (Figura 3.18).

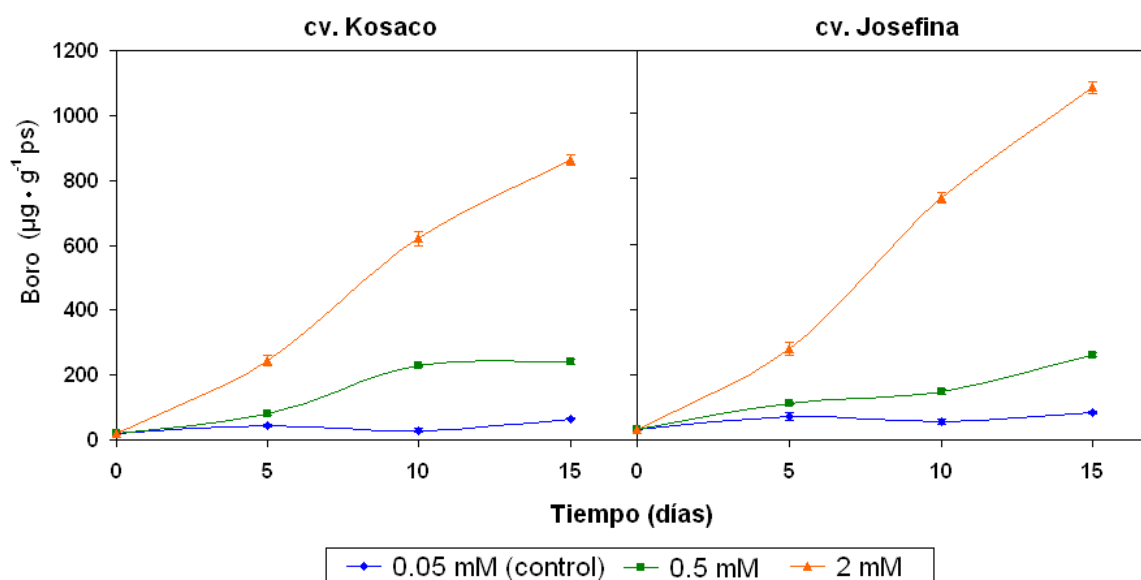


Figura 3.18. Cambios en la concentración foliar de B a lo largo de 15 días en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B. Los datos representados son medias (n=9) \pm SE.

Mientras que muchas plantas tolerantes a elementos traza (metales y metaloides) excluyen o limitan la entrada de dichos elementos, como ocurre en ciertos genotipos de cebada tolerantes a la toxicidad de B (Nable *et al.*, 1997), otras en cambio son capaces de acumularlos y mantener su crecimiento, lo que las define en muchos casos como hiperacumuladoras (Verbruggen *et al.*, 2009). En este sentido, recientemente se han encontrado que algunas especies del género *Gypsophila* son capaces de crecer en suelos con niveles tóxicos de B a pesar de mostrar elevadas concentraciones de dicho elemento en hojas (Babaoglu *et al.*, 2004). Aunque las

plantas de tomate empleadas en el presente experimento no parecen ser hiperacumuladoras, nuestros datos indican que si bien éstas tampoco parecen presentar ningún mecanismo de exclusión de B, son capaces de mantener un índice de crecimiento relativamente alto a pesar de acumular concentraciones de B muy superiores a las registradas bajo condiciones óptimas (0.05 mM), un hecho especialmente evidente en el cv. Kosaco.

3.3.2. Indicadores de estrés.

Diferentes tipos de estrés abiótico pueden tener efectos similares en la planta, sin embargo, cada uno por separado va a promover la aparición de unas condiciones determinadas frente a las cuales la planta responde de forma específica para intentar aclimatarse (Mittler, 2006). Esto hace que el estudio por separado de cada situación adversa requiera de un mayor conocimiento sobre los parámetros que mejor identifican la presencia de un estrés determinado en la planta. Entre los diversos parámetros que generalmente se analizan frente a los diversos tipos de estrés abiótico destacan los relacionados con el daño oxidativo, la osmorregulación, la captación de luz y el metabolismo fenólico (Rosales, 2008).

Como ya fue comentado en el apartado 3.1.2 (véase pág. 65), la toxicidad por B puede promover la aparición de ROS, los cuales son capaces de dañar procesos metabólicos, alterar las membranas a través de la peroxidación de lípidos y provocar la muerte celular (Mittler, 2002). En el presente experimento, al analizar la tendencia temporal de la acumulación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 en hojas, encontramos un patrón similar en ambos cultivares de tomate, en el que estos parámetros se caracterizan por incrementar desde el día 5 bajo el tratamiento 2 mM de B (Figura 3.19 a y b). En cuanto a la concentración de MDA, solamente se observaron incrementos respecto al control en los días 10 y 15, destacando la presencia de un pico en su acumulación el día 10 en las plantas sometidas a 2 mM de B (Figura 3.19 c). Si bien otros autores también han observado incrementos en la concentración de H_2O_2 y MDA en hojas de plantas sometidas a toxicidad de B (Molassiotis *et al.*, 2006; Gunes *et al.*, 2006), nuestros resultados además indican que la acumulación de ROS es constante y que aparece de forma previa a la peroxidación de lípidos. Por otro lado, también observamos que independientemente de la aplicación de B, el tipo de cultivar influyó de forma significativa sobre los niveles de H_2O_2 y MDA (Tabla A4, ver Apéndice), siendo el cv. Josefina el que registró los mayores niveles de dichos parámetros en los días 15 y 10 respectivamente (Figura 3.19 b y c).

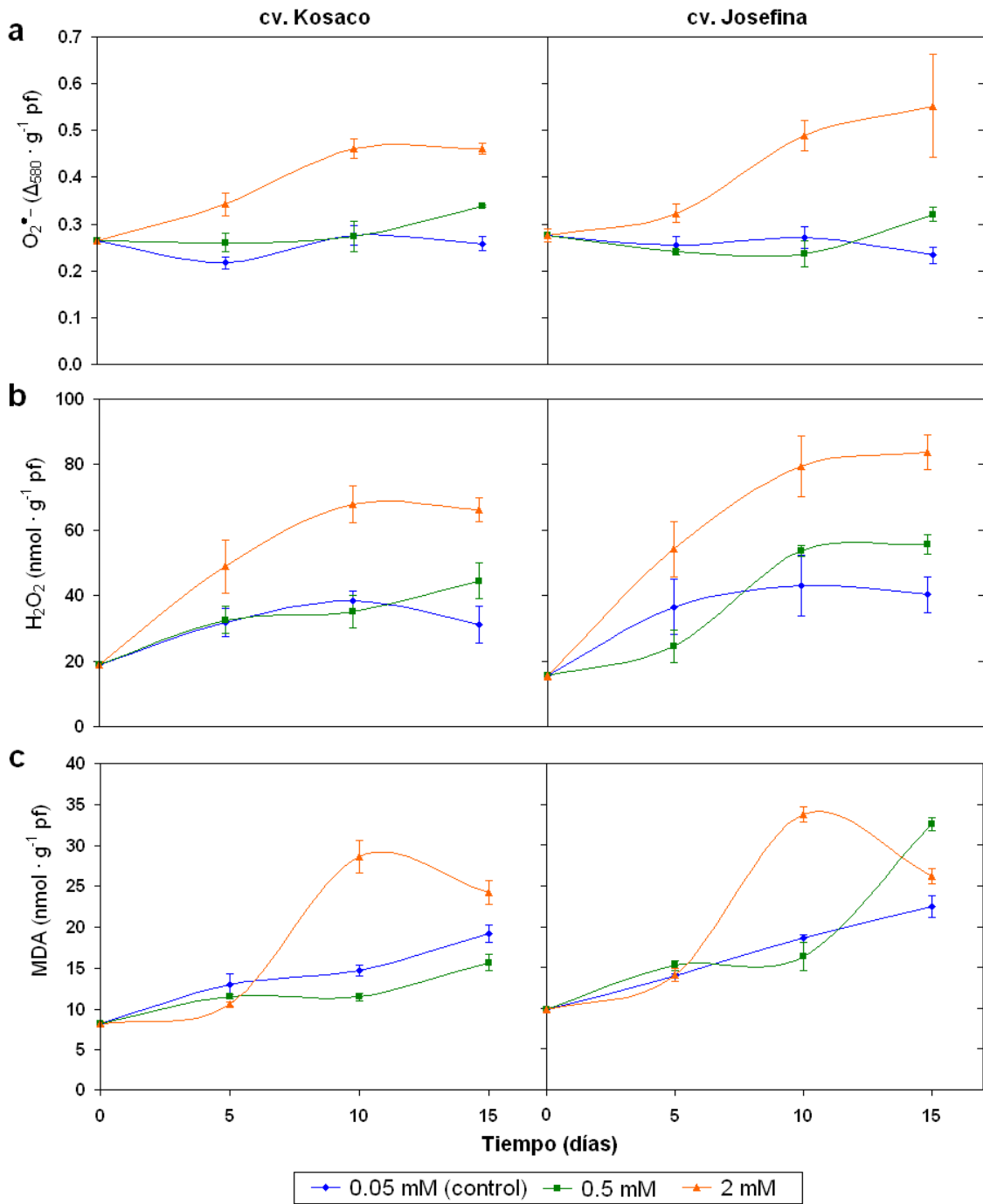


Figura 3.19. Cambios en la concentración foliar de $O_2^{\bullet-}$ (a), H_2O_2 (b) y MDA (c) a lo largo de 15 días en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B. Los datos representados son medias ($n=9$) \pm SE.

Aunque ni el $O_2^{\bullet-}$ ni el H_2O_2 presentaron correlación alguna con la biomasa, obtuvieron un coeficiente de correlación positivo mucho más elevado que el MDA con respecto a la concentración foliar de B (Figura 3.20). Este fue especialmente alto en el caso del $O_2^{\bullet-}$ (Figura 3.20), posiblemente debido a que dicho ROS es más reactivo y aparece de forma previa al H_2O_2 en la cadena de oxidación/reducción del metabolismo oxidativo (Mittler, 2002).

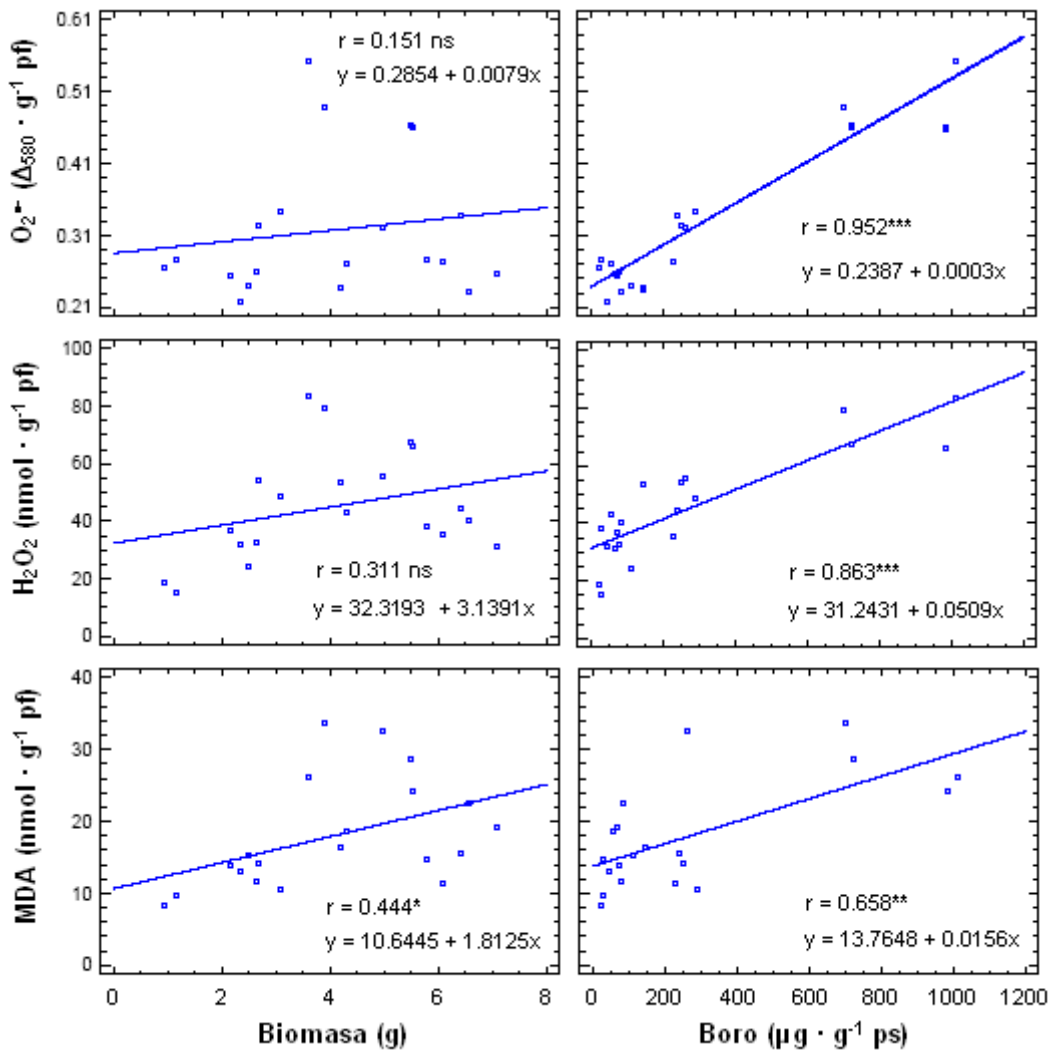


Figura 3.20. Análisis de regresión lineal ($n = 20$) dónde se enfrentan la biomasa (eje x, izquierda) y la concentración foliar de B (eje x, derecha) con la concentración de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y MDA (eje y) en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina). Los niveles de significación están representados por * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) y ns (no significativo; $P > 0.05$).

Uno de los efectos más frecuentes que aparece en las plantas sometidas a ciertos tipos de estrés abiótico como elevada temperatura, sequía o salinidad, es la acumulación de solutos osmoprotectores tales como la prolina (Ruiz *et al.*, 2002; Rivero *et al.*, 2004; Parvaiz y Styawati, 2008). Entre otras funciones, a este aminoácido también se le atribuye un papel en la detoxificación de ROS y en la protección de las membranas frente a la peroxidación de lípidos (Hong *et al.*, 2000). Bajo condiciones de exceso de B, en cítricos, manzano y vid se ha observado una reducción de los niveles de prolina en hojas, y se ha sugerido que estos podrían estar relacionados con el aumento de los niveles de MDA independientemente de la actuación de otros mecanismos antioxidantes (Keles *et al.*, 2004; Molassiotis *et al.*, 2006; Gunes *et al.*, 2006). Por el contrario, en un estudio anterior con plantas de cebada sometidas a exceso de B, Karabal *et al.* (2003) no observaron ninguna relación entre los niveles de prolina y MDA.

En nuestro experimento, los días 10 y 15 después de la aplicación de los distintos tratamientos de B, ambos cultivares de tomate mostraron un incremento de la concentración de prolina bajo el tratamiento 2 mM de B (Figura 3.21). En el caso del cv. Josefina, en el día 15 también se observó un incremento de dicho parámetro bajo el tratamiento 0.5 mM (Figura 3.21), aunque independientemente de los tratamientos el tipo de cultivar empleado en el experimento no influyó sobre los niveles de prolina (Tabla A4, ver Apéndice). Similarmente, Eraslan *et al.* (2007b) también observaron un incremento de los niveles de prolina en hojas de plantas de tomate y pimiento sometidas a toxicidad de B. La acumulación de prolina puede producirse bien por un incremento en su biosíntesis o por una alteración de la síntesis/degradación de proteínas (Delauney y Verma, 1993; Claussen, 2005). Como describimos en el apartado 3.1.3 (véase pág. 78), el incremento de la concentración de B en el medio hasta niveles tóxicos promueve cambios en el metabolismo del N que podrían sugerir la removilización de aminoácidos hacia los tejidos meristemáticos. Por tanto, como ocurre bajo otras condiciones de estrés (Becker y Fock, 1986), el incremento de la concentración de prolina en hojas maduras podría ser una consecuencia de la regulación del metabolismo nitrogenado. En cualquier caso, si enfrentamos la biomasa y la concentración de B con los niveles de prolina obtenidos en nuestro trabajo, encontramos que existe una correlación positiva entre la acumulación de dicho aminoácido y la de B en hojas (Figura 3.22), aunque no existe correlación con la biomasa (Figura 3.22). Esto sugiere que, independientemente de un papel protector, el incremento de la concentración de prolina es otra consecuencia directa del estrés producido por la toxicidad de B en plantas de tomate.

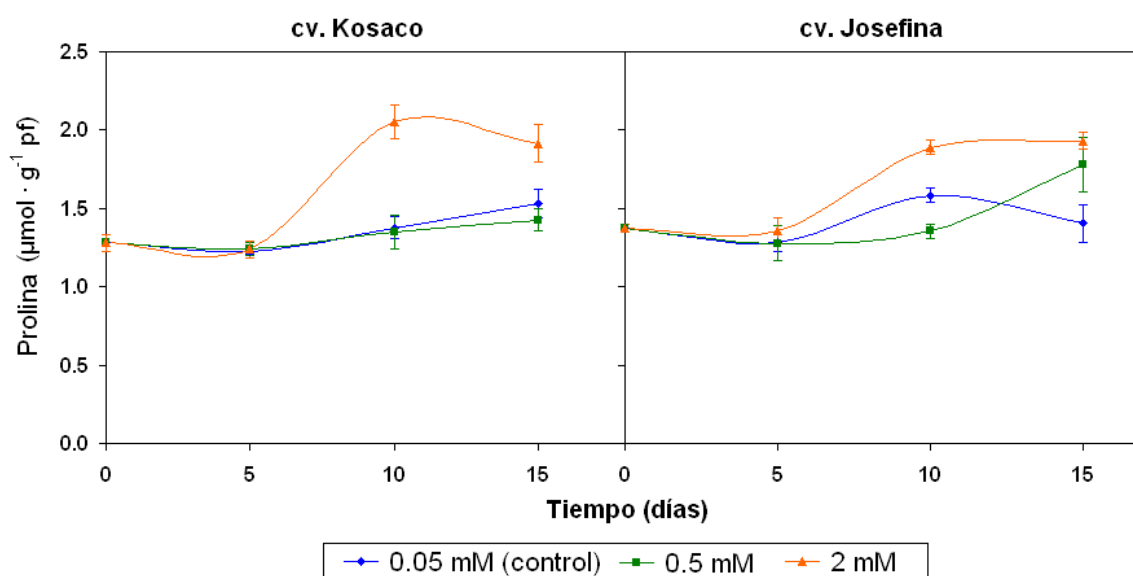


Figura 3.21. Cambios en la concentración foliar de prolina a lo largo de 15 días en de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B. Los datos representados son medias ($n=9$) \pm SE.

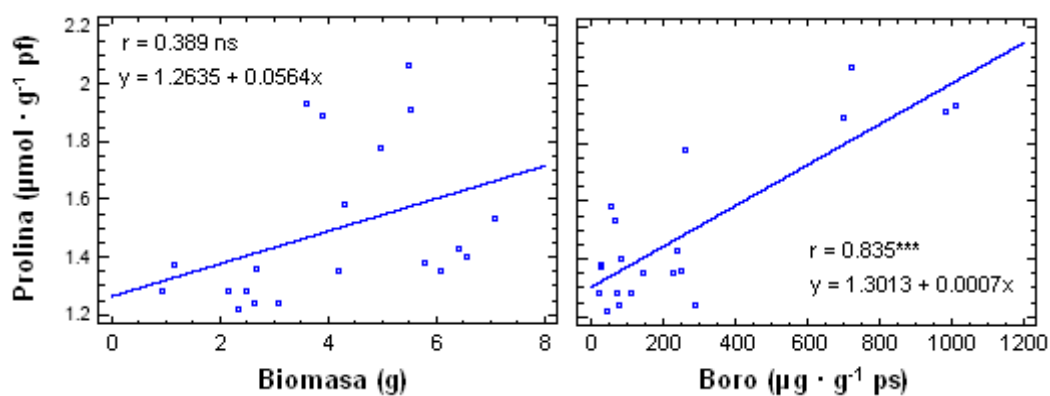


Figura 3.22. Análisis de regresión lineal ($n = 20$) dónde se enfrentan la biomasa (eje x, izquierda) y la concentración foliar de B (eje x, derecha) con la concentración de prolina (eje y) en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina). Los niveles de significación están representados por * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) y ns (no significativo; $P > 0.05$).

Otro posible indicativo de la presencia de estrés abiótico en la planta es la alteración de la composición de pigmentos en hojas, destacando la de clorofilas, carotenoides y algunos compuestos fenólicos como las antocianinas. Los pigmentos más importantes son las clorofilas, puesto que intervienen directamente en el proceso de absorción y conversión de energía luminosa sin el cual no puede llevarse a cabo la fotosíntesis (Nishio, 2000). En nuestro estudio, la aplicación de concentraciones elevadas de B al medio produjo algunos cambios en la concentración de estos pigmentos, principalmente en el cv. Josefina (Figura 3.23). Aunque el cv. Kosaco no mostró cambios significativos ni en la concentración de clorofila a ni en la concentración de clorofila a+b, al igual que el cv. Josefina, después de 15 días desde el inicio del experimento también mostró una mayor acumulación de clorofila b bajo el tratamiento 2 mM de B (Figura 3.23 b). No obstante, de forma independiente a los tratamientos, el tipo de cultivar no influyó de forma significativa sobre los niveles de clorofila (Tabla A4, ver Apéndice).

El contenido de clorofila es uno de los factores más importantes que reflejan la tasa fotosintética (Mao *et al.*, 2007) y la producción de biomasa (Gosh *et al.*, 2004). En este sentido, nuestros resultados indican que la principal causa de la reducción de biomasa foliar no fue debida a una pérdida de pigmentos fotosintéticos, sino probablemente a una menor capacidad para absorber y reducir el NO_3^- a NH_4^+ (véase apartado 3.1.3, pág. 76), y a la pérdida de área foliar (véase apartado 3.3.1; pág. 103), una situación que fue agravada por el incremento de la concentración de ROS (pág. 105). Aunque un estudio más detallado es necesario, es probable que los cambios en la concentración de clorofila en plantas de tomate sometidas a elevados niveles de B, fundamentalmente bajo el tratamiento 2 mM, sea una respuesta de la planta para compensar la pérdida de área foliar derivada tanto de la disminución del tamaño de las hojas como de una mayor superficie ocupada por necrosis. De forma opuesta, en cítricos, se ha observado que la toxicidad por B produce una reducción de la concentración de clorofila (Keles *et al.*, 2004; Papadakis *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2009), fenómeno que refleja la fuerte presencia de clorosis, uno de los principales síntomas de toxicidad de B en dichas plantas. Por otro lado, de forma similar a los resultados encontrados en el cv. Kosaco, Eraslan *et al.* (2007a) no observaron cambios significativos en la concentración de clorofila total de plantas de zanahoria (*Daucus carota*) sometidas a elevadas concentraciones de B.

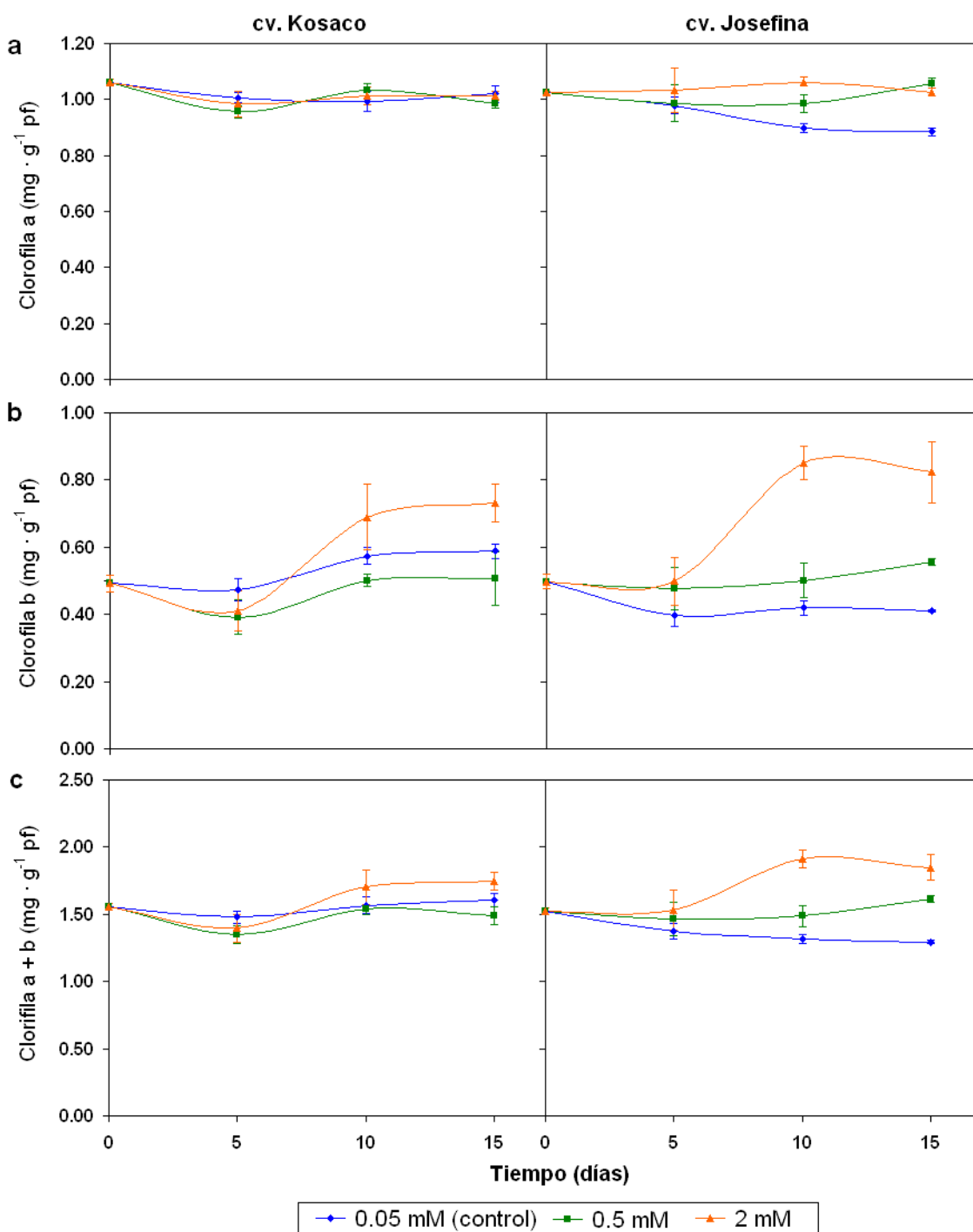


Figura 3.23. Cambios en la concentración foliar de clorofila a (a), clorofila b (b) y clorofila a+b (c) a lo largo de 15 días en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B. Los datos representados son medias (n=9) ± SE.

Los carotenoides pueden actuar como antenas alternativas en la captación de luz, absorbiendo en la región azul del espectro (400-600 nm) y transfiriendo su energía a las clorofilas. No obstante la principal función de los carotenoides es la de proteger el aparato fotosintético, disipando energía para evitar la foto-oxidación (Bartley y Scolnik, 1995). De forma similar, las antocianinas también tienen un papel antioxidante, evitando la formación de ROS y el daño oxidativo sobre lípidos, proteínas y otras macromoléculas (Steyn *et al.*, 2002; Gould *et al.*, 2004). Esto ha hecho que dichos pigmentos hayan sido involucrados en la tolerancia de las plantas frente a diversos tipos de estrés como sequía, exceso de luz UV-B o toxicidad por metales pesados (Gould, 2004).

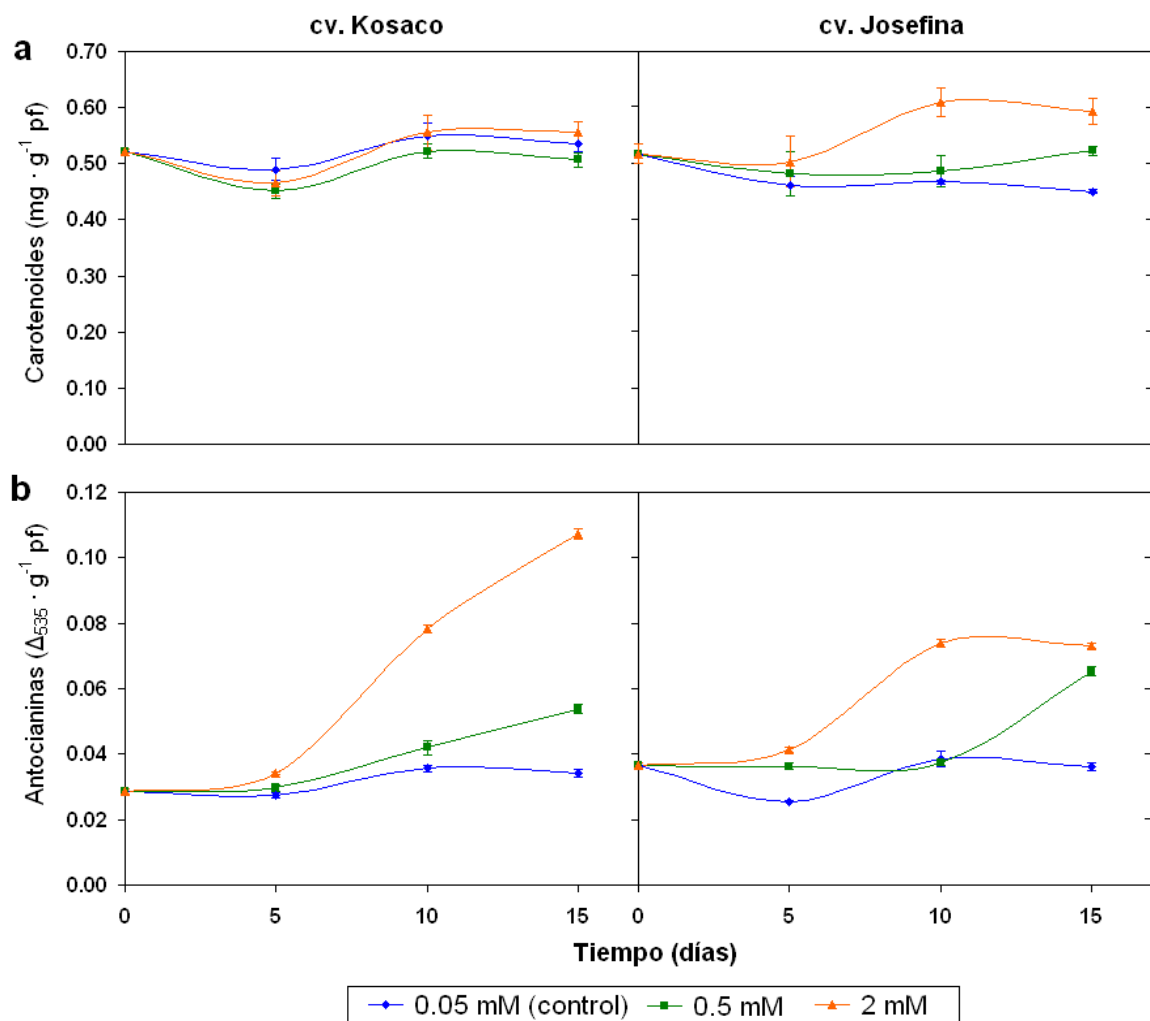


Figura 3.24. Cambios en la concentración foliar de carotenoides (a) y antocianinas (b) a lo largo de 15 días en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B. Los datos representados son medias ($n=9$) \pm SE.

Bajo 0.5 y 2 mM de B, las hojas del cv. Josefina mostraron un incremento de la concentración de carotenoides, hecho que no ocurrió en el cv. Kosaco (Figura 3.24 a). Por otra parte, ambos cultivares mostraron una rápida acumulación de antocianinas después del quinto día desde el inicio de los tratamientos, destacando en este caso el cv. Kosaco (Figura 3.24 b). En este sentido, independientemente del tratamiento de B, el tipo de cultivar empleado en el experimento no influyó sobre los niveles de ambos pigmentos (Tabla A4, ver Apéndice). Existen muy pocos estudios que analicen los efectos de la toxicidad de B sobre estos antioxidantes. En un estudio de campo utilizando cítricos irrigados con aguas que contenían elevadas concentraciones de B, Keles *et al.* (2004) no observaron cambios significativos en la concentración foliar de carotenoides. En hojas de zanahoria la toxicidad por B no afectó ni a la concentración de carotenoides ni a la de antocianinas (Eraslan *et al.*, 2007a). Similarmente, en espinaca (*Spinacia oleracea*) tampoco se observaron cambios significativos en la concentración foliar de dicho pigmento (Eraslan *et al.*, 2008). No obstante, al igual que se ha observado frente a diversos tipos de estrés abiótico dónde las antocianinas parecen jugar un importante papel de defensa (Gould, 2004), nuestros resultados en plantas de tomate sugieren que éstas podrían estar implicados en la protección frente al estrés oxidativo desencadenado por toxicidad de B.

Al comparar con la biomasa y la concentración foliar de B los niveles de los diferentes pigmentos analizados en hojas de tomate, encontramos que excepto la clorofila a, todos presentaban una elevada correlación con los niveles de B en hoja (Figura 3.25). Entre ellos, el mayor coeficiente de correlación se observó con las antocianinas (Figura 3.25). Esto sugiere de nuevo que dicho pigmento fue importante en la respuesta de las plantas a la toxicidad por B, posiblemente contribuyendo a evitar el daño oxidativo y por tanto a mantener estable el desarrollo de la planta.

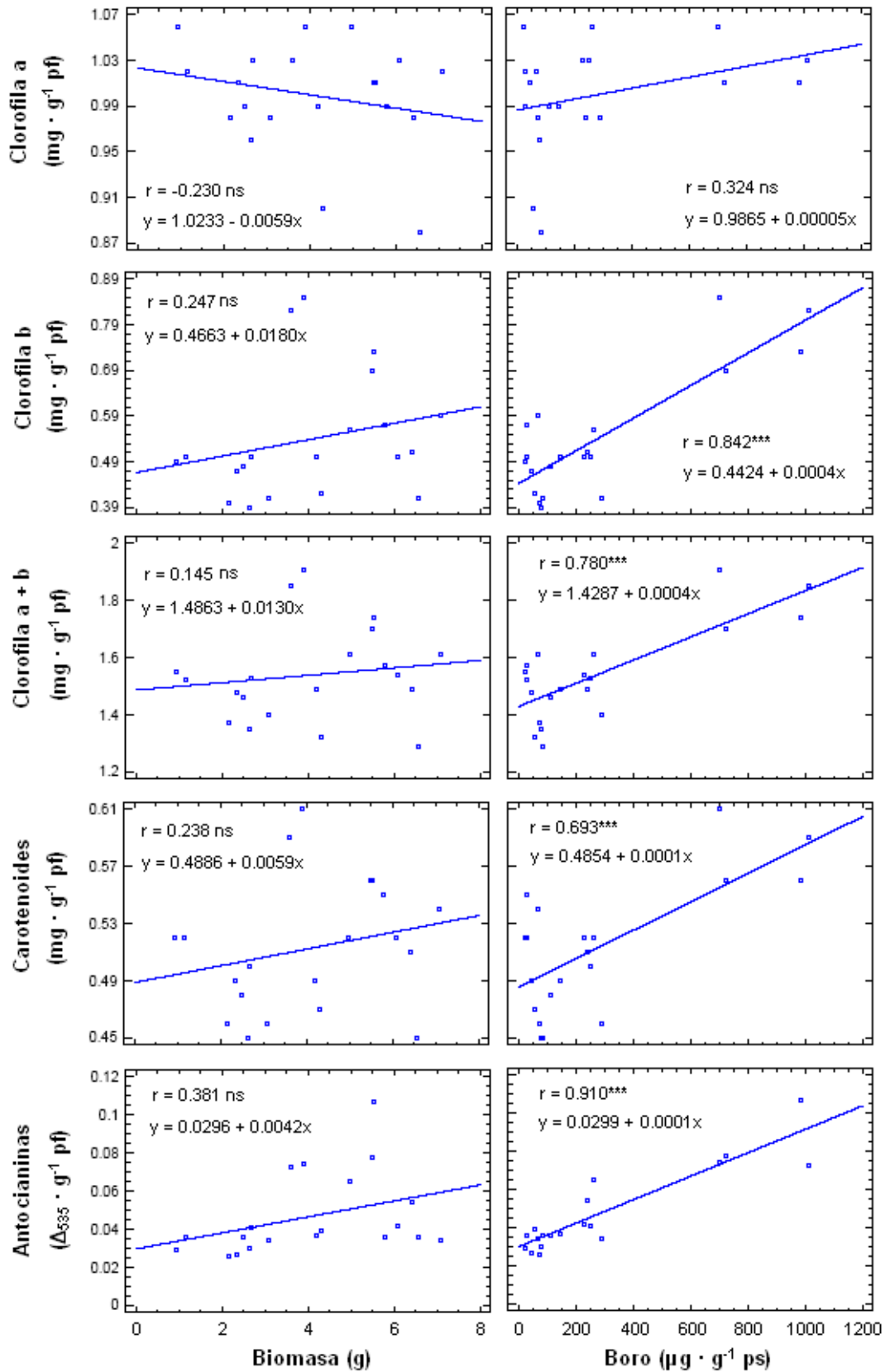


Figura 3.25. Análisis de regresión lineal (n = 20) dónde se enfrentan la biomasa (eje x, izquierda) y la concentración foliar de B (eje x, derecha) con la concentración de clorofila a, clorofila b, carotenoides y antocianinas (eje y) en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina). Los niveles de significación están representados por * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) y ns (no significativo; $P > 0.05$).

Los fenoles son compuestos derivados del metabolismo secundario que se caracterizan por presentar múltiples funciones en la planta, incluyendo la de antioxidante, como ocurre en el caso de los flavonoides que se acumulan en los tejidos vegetales frente a diversos tipos de estrés biótico y abiótico (Yamasaki *et al.*, 1997; Kähkönen *et al.*, 1999). Estos últimos son complejos polifenólicos formados por dos anillos aromáticos unidos a un heterociclo y constituyen un amplio grupo de compuestos al cual pertenecen las antocianinas (Pourcel *et al.*, 2006). En nuestro estudio con plantas de tomate, tanto la concentración total de fenoles como la de flavonoides incrementó de forma significativa bajo el tratamiento 2 mM de B (Figura 3.26), siendo el cv. Kosaco el que registró una mayor concentración de ambos bajo dicho tratamiento (Figura 3.26). Sin embargo, en cítricos, Keles *et al.* (2004) no observaron cambios significativos en la concentración de fenoles cuando estos eran irrigados con aguas que presentaban elevados niveles de B.

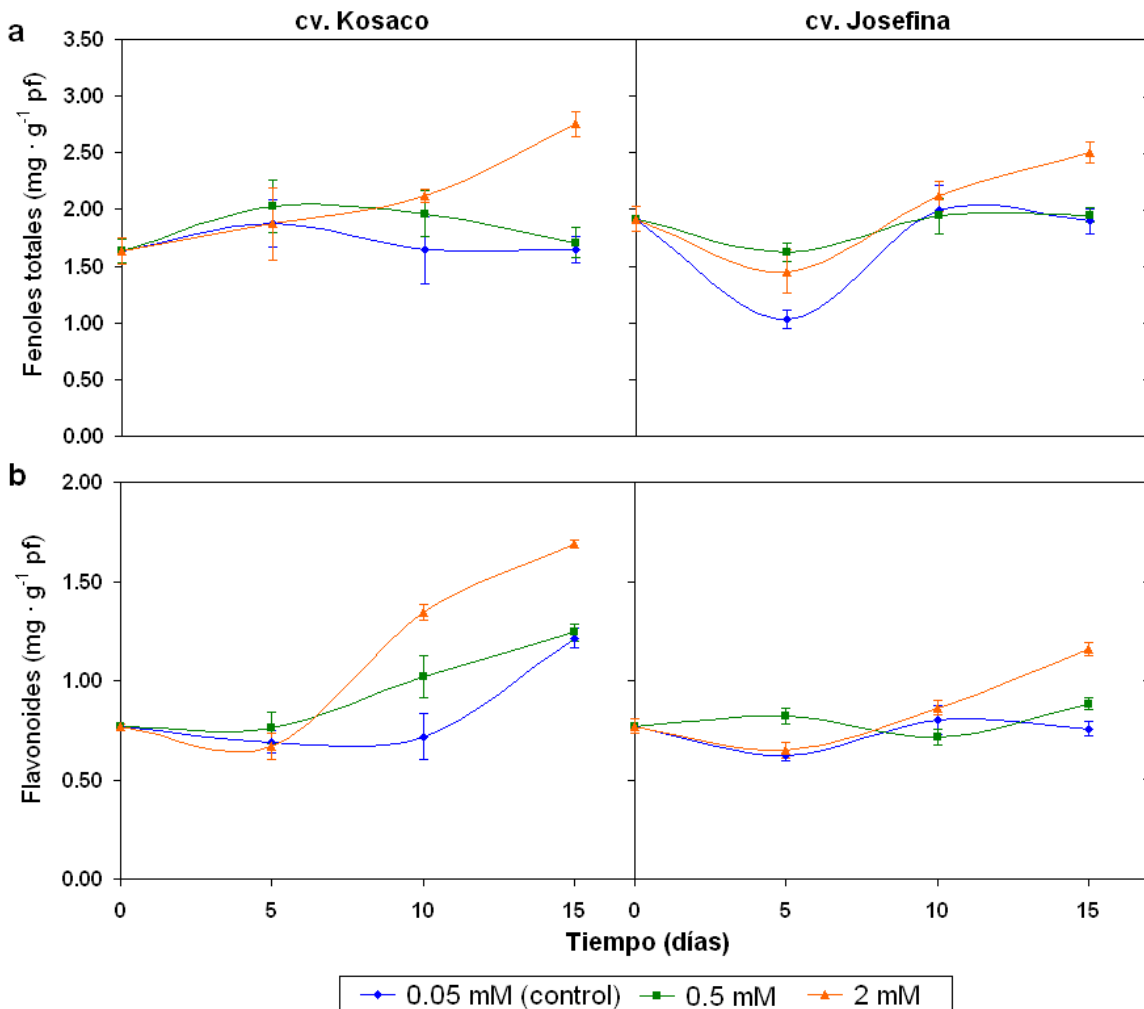


Figura 3.26. Cambios en la concentración foliar de flavonoides (a) y fenoles totales (b) a lo largo de 15 días en dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B. Los datos representados son medias ($n=9$) \pm SE.

Algunas enzimas implicadas en el metabolismo fenólico, como las peroxidas y la PPO, responden generalmente de forma activa a la presencia de estrés en la planta (Yamasaki *et al.*, 1997). Dichas enzimas pueden reaccionar con flavonoides produciendo semiquinonas capaces de detoxificar diferentes tipos de ROS, o bien, como ocurre con las peroxidasas, mediar reacciones en las que se reduce H_2O_2 a H_2O (Pourcel *et al.*, 2006). Después de 5 días desde el inicio del presente experimento, ambos cultivares de tomate mostraron un incremento de la actividad GPOX en hojas bajo condiciones de exceso de B (Figura 3.27 a). Asimismo, el cv. Kosaco también se caracterizó por presentar un rápido incremento de la actividad PPO bajo 2 mM de B (Figura 3.27 b), aunque independientemente del tratamiento el tipo de cultivar no influyó de forma significativa sobre dicho parámetro (Tabla A4, ver Apéndice).

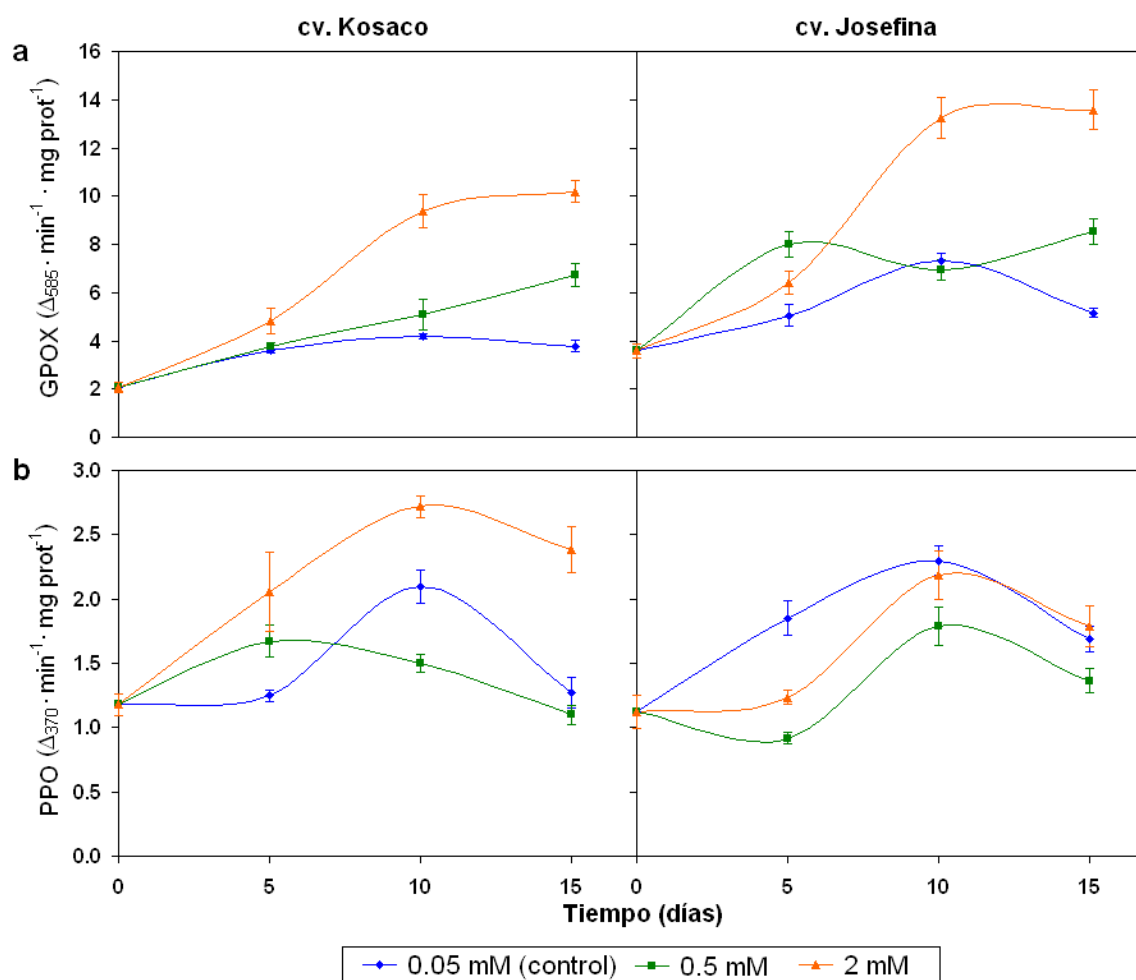


Figura 3.27. Cambios en la actividad GPOX (a) y PPO (b) a lo largo de 15 días en hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05, 0.5 y 2 mM de B. Los datos representados son medias ($n=9$) \pm SE.

Al comparar la biomasa y la concentración foliar de B con la concentración de fenoles y flavonoides, así como con la actividad PPO y GPOX, observamos que dichos parámetros se correlacionaban de forma significativa con los niveles de B en hoja,

siendo la concentración de flavonoides la única que presentó cierta correlación con la biomasa (Figura 3.28). Este resultado, junto con el obtenido para los niveles de ROS y antocianinas, demuestra la importancia del metabolismo oxidativo y la respuesta antioxidante en plantas de tomate sometidas a toxicidad por B, puesto que denotan el efecto de la sucesiva acumulación de dicho micronutriente en la hoja.

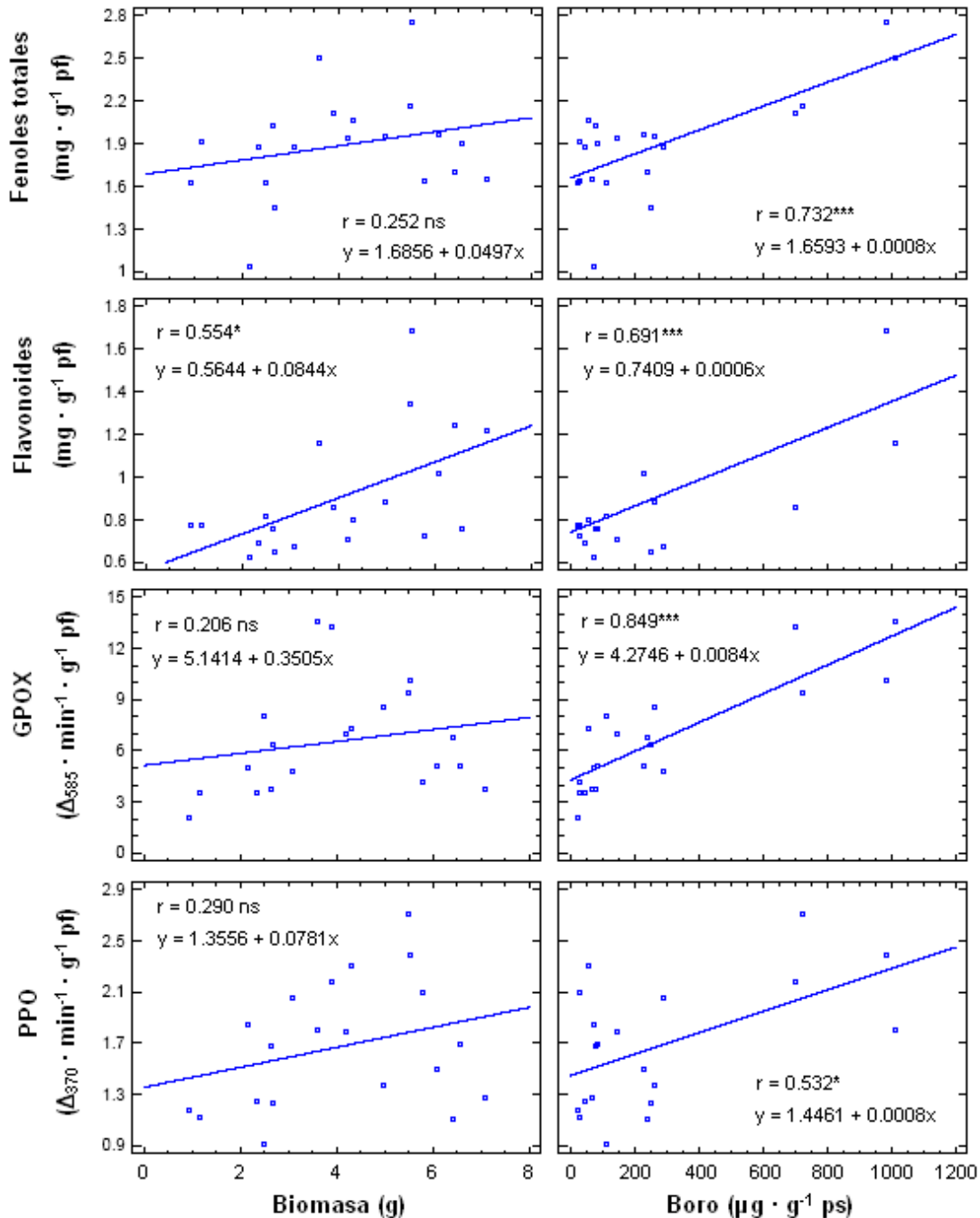


Figura 3.28. Análisis de regresión lineal (n = 20) dónde se enfrentan la biomasa (eje x, izquierda) y la concentración foliar de B (eje x, derecha) con la concentración de fenoles y flavonoides, así como con la actividad GPOX y PPO (eje y) de hojas de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina). Los niveles de significación están representados por * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) y ns (no significativo; $P > 0.05$).

3.3.3. Interpretación del bloque experimental III.

En el presente bloque experimental hemos hallado que las plantas de tomate son capaces de mantener su crecimiento durante al menos 10 días a pesar de acumular rápidamente concentraciones de B muy superiores a las registradas bajo condiciones óptimas, destacando en este caso las plantas del cv. Kosaco sometidas a 0.5 mM de B (Figura 3.17 a; Figura 3.18). Uno de los factores más importantes que va a afectar al crecimiento de una planta es su capacidad para captar energía luminosa (Gosh *et al.*, 2004). En este sentido, la reducción del área foliar podría ser una de las principales causas que frenaron el crecimiento de las plantas sometidas a toxicidad de B (Figura 3.17 b), hecho que podría estar relacionado no sólo con la disminución del tamaño de las hojas sino también con el incremento de necrosis en éstas. Aquí también cabe destacar que las plantas del cv. Kosaco sometidas a 0.5 mM de B presentaron un área foliar muy similar a la del tratamiento control durante todo el experimento (Figura 3.17 b), lo que sugiere de nuevo que este cultivar es menos sensible al exceso de B que el cv. Josefina.

Cada estrés abiótico requiere de una respuesta de aclimatación diferente que va a variar dependiendo de las necesidades específicas de cada tipo de planta (Mittler, 2006). En este bloque hemos comprobado que en general, los indicadores de estrés abiótico analizados son independientes de la biomasa bajo las condiciones en las que se desarrolló el experimento. Sin embargo, la mayoría de dichos indicadores parecen guardar una estrecha relación con los niveles de B en hoja, destacando por su elevado coeficiente de correlación el $O_2^{\bullet-}$ (Figura 3.20 a) y las antocianinas (Figura 3.25). Como ya fue comentado en el apartado 3.1.2, el exceso de B en el medio provoca la aparición de estrés oxidativo en hojas, a lo que la planta responde con un incremento de la actividad antioxidante. En este sentido, hemos encontrado que el primer indicio de la presencia de elevadas concentraciones de B en hoja es el incremento de los niveles de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Figura 3.19 a y b), un fenómeno seguido estrechamente por el aumento de los niveles de prolina (Figura 3.21) y antocianinas (Figura 3.24 b). Esto sugiere que analizar los niveles de ROS en hoja es un parámetro fiable para detectar el grado de estrés provocado por este desorden nutricional en plantas de tomate. Asimismo, los resultados mostrados en este bloque experimental ponen de nuevo de manifiesto la importancia de la respuesta antioxidante bajo dicho estrés nutricional.

Muchos de los compuestos fenólicos son precursores de moléculas antioxidantes requeridas por las peroxidasas, siendo bajo diferentes condiciones adversas indicadores del nivel de estrés en la planta (Yamasaki *et al.*, 1997; Kähkönen *et al.*, 1999). En nuestro experimento, hemos comprobado que entre otros parámetros la actividad peroxidasa es uno de los mejores indicadores de la activación del metabolismo fenólico bajo toxicidad de B (Figura 3.28). En este sentido, después de 15 días desde el inicio del experimento, el cv. Kosaco fue el que presentó una mayor concentración foliar de fenoles y flavonoides (Figura 3.26), y además a diferencia del cv. Josefina mostró un rápido incremento de la actividad PPO (Figura 3.27). Por lo tanto, al igual que vimos con la lignificación de raíces en el apartado 3.2.2, algunos aspectos del metabolismo fenólico también podrían estar implicados en el diferente grado de sensibilidad al exceso de B que mostraron ambos cultivares de tomate.

IV. CONCLUSIONES

En base a los resultados y discusión de este trabajo de investigación hemos obtenido las siguientes conclusiones:

- 1) La aplicación de niveles tóxicos de B al medio de cultivo induce la formación de ROS así como la peroxidación de lípidos en hojas de plantas de tomate, pero no en raíces. En respuesta al estrés oxidativo en hojas, la planta incrementa la actividad de enzimas y compuestos antioxidantes, entre los que destacan el ascorbato y algunos flavonoides como las antocianinas. Dicha respuesta podría considerarse un mecanismo de defensa que contribuyese, al menos en parte, a reducir los síntomas y por tanto a tolerar la toxicidad por B.
- 2) El estrés provocado por el exceso de B en el medio inhibe la capacidad de absorber y reducir el NO_3^- a NH_4^+ , lo que disminuye el N orgánico y por tanto repercute directamente en el crecimiento de la planta. Sin embargo, bajo dichas condiciones, se induce la asimilación del NH_4^+ y una mayor producción de biomasa por unidad de N disponible. Esto, unido a la removilización del N, denota una respuesta específica de la planta cuya finalidad podría ser la de mantener el crecimiento y/o el desarrollo de regiones meristemáticas bajo condiciones de exceso de B.
- 3) El contenido de lignina en la pared celular no parece un factor implicado en la reducción del crecimiento radicular en plantas de tomate sometidas a elevados niveles de B. Sin embargo, la toxicidad por B induce pequeños cambios en la expresión de proteínas unidas iónicamente a la pared que podrían afectar a dicho crecimiento. Asimismo, un estudio más detallado podría determinar si un incremento de la lignificación de raíces, como mostró el cv. Kosaco, contribuye a que las plantas de tomate sean menos sensibles a la toxicidad de B.
- 4) Al contrario de lo que ocurre en hoja, el exceso de B no produce estrés oxidativo ni daños significativos en la membrana de raíces de tomate. En este sentido, bajo condiciones de toxicidad el flujo de B a través de la membrana es independiente de un transporte activo, lo que sugiere junto a la acumulación de B en hojas que las plantas de tomate analizadas no presentan mecanismos activos de exclusión de B.

- 5) Entre otros indicadores de estrés, los niveles de ROS y antocianinas son los que mejor se correlacionan con el incremento de la concentración de B en hoja, seguidos por otros parámetros como la GPOX, clorofila b y prolina. Estos parámetros podrían ser utilizados para evaluar el nivel de estrés así como para desarrollar modelos que ayuden a prevenir los daños producidos por la toxicidad de B en plantas de tomate.

- 6) A lo largo de este trabajo de investigación, el cv. Kosaco se mostró menos sensible a la toxicidad por B que el cv. Josefina. Las diferencias halladas entre ambos cultivares sugieren no sólo cierta variabilidad genética frente al exceso de B, sino también que pequeñas variaciones en la respuesta a dicho estrés nutricional pueden repercutir sobre el crecimiento, como el hecho de acumular menos B, incrementar los niveles de importantes moléculas antioxidantes como el ASA o mantener más estable la actividad NR.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal GK, Rakwal R, Yonekura M, Kubo A, Saji H. 2002.** Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics* **2**: 947-959.
- Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Kim PJ, Yoon HS, Kim J-S, Lee BH. 2007.** Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* **67**: 1182-1193.
- Ali MB, Singh N, Shohael AM, Hahn EJ, Paek K-Y. 2006.** Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science* **171**: 147-154.
- Amthor JS. 2003.** Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Annals of Botany* **91**: 673-695.
- Anderson DL, Kitto ME, McCarthy L, Zoller WH. 1994.** Sources and atmospheric distribution of particulate and gasphase boron. *Atmospheric Environment*. **28**: 1401-1410.
- Ardic M, Sekmen AH, Turkan I, Tokur S, Ozdemir F. 2009^a.** The effects of boron toxicity on root antioxidant systems of two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Plant and Soil* **314**: 99-108.
- Ardic M, Sekmen AH, Tokur S, Ozdemir F, Turkan I. 2009^b.** Antioxidant responses of chickpea plants subjected to boron toxicity. *Plant Biology* **11**: 328-338.
- Argust P. 1998.** Distribution of boron in the environment. *Biological Trace Element Research*. **66**: 131-143.
- At-Kinson S. 2005.** Desalination project worldwide. *Membrane Technology* **1**: 7-10.
- Babaoglu M, Gezgin S, Topal A, Sade B, Dural H. 2004.** *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat.: a boron hyperaccumulator plant species that may phytoremediate soils with toxic B levels. *Turkish Journal of Botany* **28**: 273-278.

- Baethgen WE, Alley MM. 1989.** A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **20**: 961-969.
- Bagheri A, Paull JG, Rathjen AJ. 1994.** The response of *Pisum sativum* L. germplasm to high concentrations of soil boron. *Euphytica* **75**: 9–17.
- Bai Y, Lindhout P. 2007.** Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. *Annals of Botany* **100**: 1085-1094.
- Bañuelos GS, Cardon G. et al 1993.** Boron and selenium removal in boron-laden soils by four sprinkler irrigated plant species. *Journal of Environmental Quality* **22**: 786-792.
- Barceló AR, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS, Pedreño MA. 2004.** Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution?. *Phytochemistry Reviews* **3**: 61-78.
- Barneix AJ. 2007.** Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology* **164**: 581-590.
- Bauer D, Biehler K, Fock H, Carrayol E, Hirel B, Migge A, Becker TB. 1997.** A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiologia Plantarum* **99**: 241-248.
- Becker TW, Fock HP. 1986.** The activity of nitrate reductase and pool size of some amino acids and some sugars in water-stressed maize leaves. *Photosynthesis Research* **8**: 267-274.
- Bellaloui N, Brown PH. 1998.** Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Plant and Soil* **198**: 153-158.
- Bennett A, Rowe RI, Soch N, Eckhert CD. 1993.** Boron stimulates yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth. *The Journal of Nutrition*. **129**: 2236-2238.

- Benzie IEF, Strain JJ. 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* **239**: 70–76.
- Beyer WF, Fridovitch I. 1987.** Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* **161**: 559-566.
- Bhumbla DR, Ckhabra R. 1982.** Chemistry of sodic soils in review of soil research in India. *In*. Trans. 12th Int. Cong. Soil Sci. New Delhi, India.
- Blevins DG, Lukaszewski KM. 1998.** Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 481-500.
- Blount JW, Korth KL, Masoud SA, Rasmussen S, Lamb C, Dixon RA. 2000.** Altering Expression of Cinnamic Acid 4-Hydroxylase in Transgenic Plants Provides Evidence for a Feedback Loop at the Entry Point into the Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiology* **122**: 107-116.
- Bolaños L, Lukaszewski K, Bonilla I, Blevins D. 2004.** Why boron?. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 907-912.
- Bonilla I, Cadahía C, Capena O. 1980.** Effects of boron on nitrogen metabolism and sugar levels of sugar beet. *Plant and Soil* **57**: 3-9.
- Bonilla I, García-González M, Mateo P. 1990.** Boron requirement in cyanobacteria. Its possible role in the early evolution of photosynthetic organisms *Plant Physiology* **94**: 1554-1560.
- Bonilla I, Mateo P, Garate A. 1988.** Acción del boro sobre el metabolismo nitrogenado en *Lycopersicum esculentum* cv. Dombo, cultivado en hidroponía. *Agrochimica* **32**: 276-284.
- Bonilla I, Mergold-Villasenor C, Campos ME, Sánchez N, Pérez H, López L, Castrejón L, Sánchez F, Cassab GI. 1997.** The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyproline-/proline-rich proteins. *Plant Physiology* **115**: 1329-1340.

- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brady JE, Humiston GE. 1978.** *General chemistry: Principles and structure*. New York. John Wiley and Sons.
- Brown PH, Bellaloui N, Wimmer MA, Bassil ES, Ruiz J, Hu H, Pfeffer H, Dannel F, Römheld V. 2002.** Boron in plant biology. *Plant Biology* **4**: 205-223.
- Brown PH, Shelp BJ. 1997.** Boron mobility in plants. *Plant and Soil* **193**: 85-101.
- Bruce RJ, West CA. 1989.** Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology* **91**: 889-897.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004.** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* **74**: 2157-2184.
- Camacho-Cristóbal JJ, González-Fontes A. 2007.** Boron deficiency decreases plasmalemma H⁺-ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots. *Planta* **226**: 443-451.
- Camacho-Cristóbal JJ, Herrera-Rodríguez MB, Beato VM, Rexach J, Navarro-Gochicoa MT, Maldonado JM et al. 2008.** The expression of several cell wall-related genes in Arabidopsis roots is down-regulated under boron deficiency. *Environmental and Experimental Botany* **63**: 351-358.
- Cara FA, Sánchez E, Ruiz JM, Romero L. 2002.** Is phenol oxidation responsible for the short-term effects of boron deficiency on plasma-membrane permeability and fuction in squash roots?. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 853-858.
- Cortina C, Culiáñez-Macià FA. 2005.** Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* **169**: 75-82.

- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Young VL. 1975.** Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **6**: 71-80.
- Chesworth W. 1991.** *Geochemistry of micronutrients. Micronutrients in agriculture.* Eds. JJ Mortvedt, FR Cox, LM Shuman, RM Welch. Soil Science Society of America. Madison, WI, USA.
- Choi E-Y, Kolesik P, McNeill A, Collins H, Zhang Q, Huynh B-Y, Graham R, Stangoulis J. 2007.** The mechanism of boron tolerance for maintenance of root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant, Cell and Environment* **30**: 984-993.
- Claussen W. 2005.** Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science* **168**: 241-248.
- Coughlin JR. 1998.** Sources of human exposure: overview of water supplies as sources of boron. *Biological Trace Element Research* **66**: 87-100.
- Dannel F, Pfeffer H, Romheld V. 1999.** Distribution within the plant or compartmentation does not contribute substantially to the detoxification of excess boron in sunflower (*Helianthus annuus*). *Australian Journal of Plant Physiology* **26**: 95-99.
- Delauney AJ, Verma DPS. 1993.** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* **4**: 215-223.
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb C. 1994.** Early events in the activation of plant defence response. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 479-501.
- Doke N. 1983.** Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and hyphal wall components. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **23**: 345-357.
- Dordas C, Brown PH. 2000.** Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. *Journal of Membrane Biology* **175**: 95-105.

- Dordas C, Chrispeels MJ, Brown PH. 2000.** Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiology* **124**: 1349-1361.
- Eaton FM. 1944.** Deficiency, toxicity and accumulation of boron in plants. *Journal of Agricultural Research* **69**: 237-277.
- Ederli L, Reale L, Ferranti F, Pasqualini S. 2004.** Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiologia Plantarum* **121**: 66–74.
- Elliot GC, Läuchli A. 1985.** Phosphorous efficiency and phosphate- iron interaction in maize. *Agronomical Journal* **77**: 399-403.
- Eraslan F, Inal A, Gunes A, Alpaslan M. 2007^a.** Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **113**: 120-128.
- Eraslan F, Inal A, Gunes A, Alpaslan M. 2007^b.** Boron toxicity alters nitrate reductase activity, proline accumulation, membrane permeability, and mineral constituents of tomato and pepper plants. *Journal of Plant Nutrition* **30**: 981-994.
- Eraslan F, Inal A, Pilbeam DJ, Gunes A. 2008.** Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) grown under boron toxicity and salinity. *Plant Growth Regulation* **55**: 207-219.
- Foyer CH, Dujardyn M, Lemoine Y. 1989.** Responses of photosynthesis and the xanthophyll and ascorbate–glutathione cycle to changes in irradiances, photoinhibition and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry* **27**: 751–760.
- Francois LE. 1988.** Yield and quality responses of celery and crisphead lettuce to excess boron. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **113**: 538-542.

- Fu J, Huang B. 2001.** Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* **45**: 105–114.
- Fukutoku Y, Yamada Y. 1984.** Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II Fate of ¹⁵N-labelled protein. *Physiologia Plantarum* **61**: 622-628.
- García-González M, Mateo P, Bonilla I. 1991.** Boron requirement for envelope structure and function in *Anabaena* PCC 7119 heterocysts. *Journal of Experimental Botany* **42**: 925-929.
- García-Pineda E, Castro-Mercado E, Lozoya-Gloria E. 2004.** Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annum* L.) ascorbate oxidase during elicitor and wounding stress. *Plant Science* **166**: 237–243.
- Gatzek S, Wheeler GL, Smirnoff N. 2002.** Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant Journal* **30**: 541-553.
- Ghanati F, Morita A, Yokota H. 2001.** Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells. *Soil Science and Plant Nutrition* **48**: 357-364.
- Ghanati F, Morita A, Yokota H. 2005.** Deposition of suberin in roots of soybean induced by excess boron. *Plant Science* **168**: 397-405.
- Ghosh PK, Ajay, Bandyopadhyay KK, Manna MC, Mandal KG, Misra AK, Hati KM. 2004.** Comparative effectiveness of cattle manure, poultry manure, phosphocompost and fertilizar-NPK on three croppings systems in vertisols of semi-arid tropics. II. Dry matter yield, nodulation, chlorophyll content and enzyme activity. *Bioresource Technology* **95**: 85-93.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977.** Superoxide dismutase occurrence in higher plants. *Plant Physiology* **59**: 309-314.

- Bartley GE, Scolnik PA. 1995.** Plant carotenoides: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* **7**: 1027-1038.
- Goldbach HE, Wimmer MA. 2007.** Boron in plants and animals: Is there a role beyond cell-wall structure?. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **170**: 39-48.
- Gonzalez-Fontes A, Rexach J, Navarro-Gochicoa MT, Herrera-Rodríguez MB, Beato VM, Maldonado JM, Camacho-Cristóbal JJ. 2008.** Is boron involved solely in structural roles in vascular plants?. *Plant Signalling & Behaviour* **3**: 24-26.
- Gossett DR, Millhollon EP, Lucas MC. 1994.** Antioxidants responses to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* **34**: 706-714.
- Gould KS. 2004.** Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **5**: 314-320.
- Groat RG, Vance CP. 1981.** Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* **67**: 1198-1203.
- Günes A, Alpaslan M, Çikili Y, Özcan H. 1999.** Effect of zinc on the alleviation of boron toxicity in tomato. *Journal of Plant Nutrition* **22**: 1061-1068.
- Gunes A, Soylemezoglu G, Inal A, Bagci EG, Coban S, Sahin O. 2006.** Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **110**: 279-284.
- Gupta UC. 1979.** Boron nutrition of crops. *Advances in Agronomy* **31**: 273-307.
- Hageman RH, Hucklesby DP. 1971.** Nitrate reductase. *Methods in Enzymology* **23**: 497-503.
- Han S, Tang N, Jiang H-X, Yang L-T, Li Y, Chen L-Song. 2009.** CO₂ assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress. *Plant Science* **176**: 143-153.

- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 1999.** Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* **50**: 413-434.
- Hayes JE, Reid RJ. 2004.** Boron tolerance in barley is mediated by efflux of boron from the roots. *Plant Physiology* **136**: 3376-3382.
- Heath RL, Packer L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts:I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 189–198.
- Holleman AF, Wiberg E. 2001.** *Inorganic chemistry*. New York. Academic Press.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS. 2000.** Removal of feedback inhibition of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* **122**: 1129-1136.
- Hosseini SM, Maftoun M, Karimian N, Ronaghi A, Emam Y. 2007.** Effect of zinc x boron interaction on plant growth and tissue nutrient concentration of corn. *Journal of Plant Nutrition* **30**: 773-781.
- Hu H, Brown PH. 1997.** Absorption of boron by plant roots. *Plant and Soil* **193**: 49-58.
- Hu H, Penn SG, Lebrilla CB, Brown PH. 1997.** Isolation and characterization of soluble B-complexes in higher plants. *Plant Physiology* **113**: 649-655.
- Hu, H, Brown PH, Labavitch JM. 1996.** Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany* **47**: 227-232.
- Inal A, Tarakcioglu C. 2001.** Effects of nitrogen forms on growth, nitrate accumulation, membrane permeability, and nitrogen use efficiency of hydroponically growth bunch onion under boron deficiency and toxicity. *Journal of Plant Nutrition* **24**: 1521-1534.
- Inal A, Pilbeam DJ, Gunes A. 2009.** Silicon increases tolerance to boron toxicity and reduces oxidative damage in barley. *Journal of Plant Nutrition* **32**:112-128.

- Inzé D, Van Montagu M. 1995.** Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: 153-158.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M. 1992.** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* **84**: 55-60.
- Irshad M, Eneji AE, Yasuda H. 2008.** Comparative effect of nitrogen sources on Maite under saline and non-saline conditions. *Journal of Agronomy & Crop Science* **194**: 256-261.
- Ishikawa T, Dowdle J, Smirnoff N. 2006.** Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum* **126**: 343-355.
- Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF. 2006.** Cell wall proteomics: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science* **11**: 33-39.
- Jamjod S. 1996.** Genetics of boron tolerance in durum wheat. Tesis doctoral, University of Adelaide, South Australia.
- Jbir N, Chaïbi W, Ammar S, Jemmali A, Ayadi A. 2001.** Root growth and lignification of two wheat species differing in their sensitivity to NaCl, in response to salt stress. *Life Sciences* **324**: 863-868.
- Kähkönen M, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999.** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 3954-3962.
- Kaiser JJ, Lewis OAH. 1984.** Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant and Soil* **70**: 127-130.
- Kalayci M, Alkan A, Çakmak I, Bayramoğlu O, Yilmaz A, Aydin M, Ozbek V, Ekiz H, Ozberisoy F. 1998.** Studies on differential response of wheat cultivars to boron toxicity. *Euphytica* **100**: 123-129.
- Karabal E, Yücel M, Ökte HA. 2003.** Antioxidants responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science* **164**: 925-933.

- Kasajima I, Fujiwara T. 2007.** Identification of novel *Arabidopsis thaliana* genes which are induced by high levels of boron. *Plant Biotechnology* **24**: 355-360.
- Kastori R, Petrovic N. 1989.** Effect of boron on nitrate reductase activity in young sunflower plants. *Journal of Plant Nutrition* **12**: 621-632.
- Keles Y, Öncel I, Yenice N. 2004.** Relationship between boron content and antioxidant compounds in *Citrus* leaves taken from fields with different water source. *Plant and Soil* **265**: 345-353.
- Kenzhebaeva SS, Yamamoto Y, Matsumoto H. 2001.** Aluminium-induced changes in cell-wall glycoproteins in the root tips of Al-tolerant and Al-sensitive wheat lines. *Russian Journal of Plant Physiology* **48**: 441-447.
- Kerem R, Bingham FT. 1985.** *Boron in water, soils, and plants*. Advances in soil science VI. Ed. BA Stewart. New York. Springer-Verlag.
- Kim D, Jeong SW, Lee CY. 2003.** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* **81**: 321-326.
- Kim ST, Kim SG, Hwang DH, Kang SY, Kim HJ, Lee BH, Lee JJ, Kang KY. 2004.** Proteomics analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* **4**: 3569-3578.
- Kobayashi M, Matoh T, Azuma J. 1996.** Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiology* **110**: 1017-1020.
- Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T, Matoh T. 1999.** Borate-rhamnolagalacturonan II bonding reinforced by Ca²⁺ retains pectic polysaccharides in higher plant cell walls. *Plant Physiology* **119**: 199-204.
- Kobayashi M, Mutoh T, Matoh T. 2004.** Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. IV. Genes induced under low boron supply. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1441-1443.

- Kováčik J, Klejdus B. 2008.** Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Report* **27**: 605-615.
- Kubis J. 2008.** Exogenous spermidine differentially alters activities of some scavenging system enzymes, H₂O₂ and superoxide radical levels in water-stressed cucumber leaves. *Journal of Plant Physiology* **165**: 397-406.
- Lange H, Shropshire W, Mohr H. 1971.** An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. *Plant Physiology* **47**: 649-655.
- Lea PJ, Ireland R J. 1999.** Nitrogen metabolism in higher plants. In: B. K. Singh (ed). *Plant Amino Acids, Biochemistry and Biotechnology*. Marcell Dekker, Inc., New York: 1-47.
- Lea PJ, Avezedo RA. 2006.** Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology* **149**: 243-247.
- Lea-Cox JD, Syvertsen JP. 1993.** Salinity reduces water use and nitrate-N-use efficiency of Citrus. *Annals of Botany* **72**: 47-54.
- Li F, Kang S, Zhang J, Cohen S. 2003.** Effects of atmospheric CO₂ enrichment, water status and applied nitrogen on water-and nitrogen-use efficiencies of wheat. *Plant and Soil* **254**: 279-289.
- Lillo C. 1984.** Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiologia Plantarum* **61**: 214-218.
- Liu D, Jiang W, Zhang L, Li L. 2000.** Effects of boron ions on root growth and cell division of broadbean (*Vicia faba* L.). *Israel Journal of Plant Science* **48**: 47-51.
- López-Gómez E, San Juan MA, Diaz-Vivancos P, Mataix Beneyto J, García-Legaz MF, Hernández JA. 2007.** Effect of rootstocks grafting and boron on the antioxidant systems and salinity tolerance of loquat plants (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Environmental and Experimental Botany* **60**: 151-158.

- López-Lefebre LR, Ruiz JM, Rivero RM, García PC, Sánchez E, Romero L. 2002.** Supplemental boron stimulates ammonium assimilation in leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Growth Regulation* **36**: 231-236.
- López-Millán AF, Morales F, Abadía A, Abadía J. 2000.** Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiology* **124**: 873-884.
- Lyday PA. 2000.** *Boron*. US Geological Survey.
- Mahboobi H, Yücel M, Ökten HA. 2001.** Cell wall uronic acid concentrations of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under boron toxicity. *Journal of Plant Nutrition* **24**: 1965-1973.
- Mahboobi H, Yücel M, Ökten HA. 2002.** Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under boron toxicity. *Journal of Plant Nutrition*, **25**, 1829-1837.
- Maier KJ, Knight AW. 1992.** The toxicity of waterborne boron to *Daphnia* and *Chironomus decorus* and the effects of water hardness and sulphate on boron toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **20**: 282-287.
- Malina G. 2004.** Ecotoxicological and environmental problems associated with the former chemical plant in Tarnowski Gory. *Poland Toxicology* **205**: 157-172.
- Mansour MMF. 2000.** Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum* **43**: 491-500.
- Mao LZ, Lu HF, Wang Q, Cai MM. 2007.** Comparative photosynthesis characteristics of *Calycanthus chinensis* and *Chimonanthus praecos*. *Photosynthetica* **45**: 601-605.
- Martínez Beltrán J, Koo-Oshima S. 2006.** *Water desalination for agricultural applications*. FAO, Roma.
- Martinez V, Cerda A, Fernandez FG. 1987.** Salt tolerance of four tomato hybrids. *Plant and Soil* **97**: 233-242.

- Martínez-Ballesta MC, Bastías E, Zhu C, Schöffner AR, González-Moro B, González-Murua C et al. 2008.** Boric acid and salinity effects on maize roots. Response of aquaporins ZmPIP1 and ZmPIP2, and plasma membrane H⁺-ATPase, in relation to water and nutrient uptake. *Plant Physiology* **132**: 479-490.
- Marschner H. 1995.** Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd edn. Academic Press. San Diego.
- Migge A, Becker TW. 1996.** In tobacco leaves, the genes encoding the nitrate-reducing or the ammonium-assimilating enzymes are regulated differently by external nitrogen-sources. *Plant Physiology and Biochemistry* **34**: 665-671.
- Miller AJ, Cramer MD. 2004.** Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* **274**: 1-36.
- Minguez-Mosquera MI, Jaren-Galen M, Garrido-Fernandez J. 1993.** Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. *Phytochemistry* **32**: 1103-1108.
- Mittler R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410.
- Mittler R. 2006.** Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**: 15-19.
- Miwa K, Takano J, Omori H, Seki M, Shinozaki K, Fujiwara T. 2007.** Plants tolerant of high boron levels. *Science* **318**: 1417.
- Molassiotis A, Sotiropoulos T, Tanou G, Diamantidis G, Therios I. 2006.** Boron induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental and Experimental Botany* **56**: 54-62.
- Moll RH, Kamprath EJ, Jackson WA. 1982.** Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal* **74**: 562-654.

- Mondy NI, Munshi CB. 1993.** Effect of boron on enzymatic discoloration and phenolic and ascorbic acid contents of potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**: 554-558.
- Moody DB, Rathjen AJ, Cartwright B, Paull JG, Lewis J. 1988.** Genetic diversity and geographical distribution of tolerance to high levels of soil boron. *In Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp., Cambridge*. Eds. TE Miller, RMD Koebner. pp 859–865.
- Moss MA, Nagpal NK. 2003.** Ambient Water Quality Guidelines for Boron. National Library of Canada Cataloguing in Publication Data.
- Mukherjee SP, Choudhuri MA. 1983.** Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum* **58**: 166-170.
- Nable RO. 1988.** Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: a preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant and Soil* **112**: 45-52.
- Nable RO, Bañuelos GS, Paull JG. 1997.** Boron toxicity. *Plant and Soil* **193**: 181-198.
- Nakano Y, Asada K. 1981.** Hydrogen peroxide scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology* **22**: 867–880.
- Nishio JN. 2000.** Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. *Plant Cell and Environment* **23**: 539-548.
- Nguyen HTT, Shim IS, Kobayashi K, Usui K. 2005.** Regulation of ammonium accumulation during salt stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Production Science* **8**: 397-404.
- Noctor G, Foyer C. 1998.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279.

- O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG. 2004.** Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 109-139.
- Papadakis IE, Dimassi KN, Bosabalidis AM, Therios IN, Patakas A, Giannakoula A. 2004.** Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants on two rootstocks. *Plant Science* **166**: 539-547.
- Pathak RR, Ahmad A, Lochab S, Raghuram N. 2008.** Molecular physiology of plant nitrogen use efficiency and biotechnology options for its enhancement. *Current Science* **94**: 1394-1403.
- Parks JL, Edwards M. 2005.** Boron in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **35**: 81-114.
- Parvaiz A, Satyawatti S. 2008.** Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. *Plant Soil Environ* **54**: 89-99.
- Paull JG, Nable RO, Rathjen AJ. 1992.** Physiological and genetic control of the tolerance of wheat to high concentrations of boron and implications for plant breeding. *Plant and Soil* **146**: 251-260.
- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH. 2003.** The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology* **132**: 1631-1641.
- Pilling E, Höfte E. 2003.** Feedback from the wall. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 611-616.
- Pomar F, Novo M, Bernal MA, Merino F, Barceló AR. 2004.** Changes in item lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annum*. *New Phytologist* **163**: 111-123.
- Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I. 2006.** Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* **12**: 29-36.

- Power PP, Woods WG. 1997.** The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant and Soil* **193**: 1-13.
- Qiu D, Diretto G, Tavarza R, Giuliano G. 2007.** Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. *Scientia Horticulturae* **112**: 172-175.
- Ramon AM, Ruiz, RO, Garate A. 1989.** In vitro stabilization and distribution of nitrate reductase in tomato plants: incidence of boron deficiency. *Journal of Plant Physiology* **135**: 126-128.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB. 1997.** Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes: salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiology* **115**: 137-149.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. 1996.** Ultraviolet-B radiation and ozone-induced biochemical changes in the antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**: 125-136.
- Raun WR, Johnson GV. 1999.** Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agronomy Journal* **91**: 357-363.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**: 1231-1237.
- Redondo-Nieto M, Rivilla R, El-Hamdaoui A, Bonilla I, Bolaños L. 2001.** Boron deficiency affects early infection events in the pea-*Rhizobium* symbiotic interaction. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 819-823.
- Reid R. 2007.** Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant and Cell Physiology* **48**: 1673-1678.
- Reid RJ, Hayes JE, Post A, Stangoulis JCR, Graham RD. 2004.** A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant Cell and Environment* **25**: 1405-1414.

- Rivero RM, Ruiz JM, García PC, López-Lefebre LR, Sánchez E, Romero L. 2001.** Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* **160**: 315-321.
- Rivero RM, Ruiz JM, Romero L. 2003^a.** Role of grafting in horticultural plants under stress conditions. *Food, Agriculture & Environment* **1**: 70-74.
- Rivero RM, Ruiz JM, Sánchez E, Romero L. 2003^b.** Does grafting provide tomato plants an advantage against H₂O₂ production under conditions of thermal shock?. *Physiologia Plantarum* **117**: 44-50.
- Rivero RM, Ruiz JM, Romero L. 2004.** Importance of N source on heat stress tolerance due to the accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in tomato plants. *Plant Biology* **6**: 702-707.
- Robinson B, Green S. et al. 2003.** Phytoremediation: using plants as biopumps to improve degraded environments. *Australian Journal of Soil Research* **41**: 599-611.
- Robinson SA, Slade AP, Fox GG, Phillips R, Ratclife RG, Stewart GR. 1991.** The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiology* **95**: 809-816.
- Rosahl S. 1996.** Lipoxygenases in plants – their role in development and stress response. *Zeitschrift fur Naturforschung* **51c**: 123-138.
- Rosales MA, Ruiz JM, Hernández J, Soriano T, Castilla N, Romero L. 2006.** Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 1545-1551.
- Rosales MA. 2008.** *Producción y calidad nutricional en frutos de tomate cherry cultivados en dos invernaderos mediterráneos experimentales: respuestas metabólicas y fisiológicas.* Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Rowe RI, Eckhert CD. 1999.** Boron is required for zebra fish embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* **202**: 1649-1654.

- Ruiz JM, Baghour M, Bretones G, Belakbir A, Romero L. 1998.** Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): role of boron as a possible regulatory factor. *International Journal of Plant Science* **159**: 121-126.
- Ruiz JM, Blumwald, E. 2002.** Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus*. *Planta* **214**: 965-969.
- Ruiz JM, Sánchez E, García PC, López-Lefebvre LR, Rivero RM, Romero L. 2002.** Proline metabolism and NAD kinase activity in greenbean plants subjected to cold-shock. *Phytochemistry* **59**: 473-478.
- Ruiz JM, Rivero RM, Romero L. 2003.** Preliminary studies on the involvement of biosynthesis of cysteine and glutathione in the resistance to boron toxicity in sunflower plants. *Plant Science* **165**: 811-817.
- Ruiz JM, Blasco B, Rivero RM, Romero L. 2005.** Nicotine-free and salt-tolerant tobacco plants obtained by grafting to salinity-resistant rootstocks of tomato. *Physiologia Plantarum* **124**: 465-475.
- Ruiz JM, Rivero RM, Cervilla LM, Castellano R, Romero L. 2006.** Grafting to improve nitrogen-use efficiency traits in tobacco plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 1014-1021.
- Sanmartin M, Drogoudi PD, Lyons T, Pateraki I, Barners J, Kanellis AK. 2003.** Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* **216**: 918-928.
- Schiffler M. 2004.** Perspectives and challenges for desalination in the 21st century. *Desalination* **165**: 1-9.
- Sharma CP. 2006.** *Plant Micronutrients*. Science Publishers. Enfield (USA).
- Shen ZG, Liang YC, Shen K. 1993.** Effect of boron on the nitrate reductase-activity in oilseed rape plants. *Journal of Plant Nutrition* **16**: 1229-1239.

- Shopfer P, Lapierre C, Nolte T. 2001.** Light-controlled growth of the maize seedling mesocotyl: mechanical cell-wall changes in the elongation zone and related changes in lignification. *Plant Physiology* **111**: 83-92.
- Siddiqi MY, Glass AD. 1981.** Utilization index: a modified phosphorous nutrition of eight form of two clover species: *Trifolium ambiguum* and *T. repens*. *Journal of Plant Nutrition* **4**: 289-302.
- Singh RP, Srivastava HS. 1986.** Increase in glutamate synthase activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiologia Plantarum* **66**: 413–416.
- Singleton VL, Salgues M, Zaya J, Trousdale E. 1985.** Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **36**: 50–56.
- Sivasankar S, Oaks A. 1996.** Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiology and Biochemistry* **34**: 609-620.
- Smirnoff N. 1995.** Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff N, ed. *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation*. Oxford, BIOS Scientific Publishers, 271-243.
- Smirnoff N. 2000.** Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 229-235.
- Smyth DA, Dugger WM. 1981.** Cellular changes during boron-deficient culture of the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Plant Physiology* **51**: 111-117.
- Soares N, Francisco R, Cândido PR, Jackson PA. 2007.** Proteomics of ionically bound and soluble extracellular proteins in *Medicago truncatula* leaves. *Proteomics* **7**: 2070-2082.
- Sorgona A, Abenavoli MA, Gringeri PG, Cacco G. 2006.** A comparison of nitrogen use efficiency definitions in Citrus rootstocks. *Scientia Horticulturae* **109**: 389-393.

- Sotiropoulos TE, Molassiotis A, Almaliotis D, Mouhtaridou G, Dimassi K, Therios I, Diamantidis G. 2006.** Growth, nutritional status, chlorophyll content, and antioxidant responses of the apple rootstock MM 111 shoots cultured under high Boron concentrations in vitro. *Journal of Plant Nutrition* **29**: 575-583.
- Sotiropoulos TE, Therios IN, Dimassi KN. 1999.** Calcium application as a means to improve tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **81**: 443-449.
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G. 2002.** Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* **155**: 349-361.
- Sutton T, Baumann U, Hayes J, Collins NC, Shi BJ, Schnurbusch T, Hay A, Mayo G, Pallotta M, Tester M, Langridge P. 2007.** Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification. *Science* **318**: 1446-1449.
- Swietlik D. 1995.** Interaction between zinc deficiency and boron toxicity on growth and mineral nutrition of sour orange seedlings. *Journal of Plant Nutrition* **18**: 1191-1207.
- Tahara K, Yamanoshita T, Norisada M, Hasegawa I, Kashima H, Sasaki S, Kojima K. 2008.** Aluminium distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminium resistance. *Plant and Soil* **307**: 167-178.
- Takano J, Miwa K, Fujiwara T. 2008.** Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in Plant Science* **13**: 451-457.
- Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wirén N, Fujiwara T. 2006.** The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* **18**: 1498-1509.
- Tanaka H. 1967.** Boron absorption by crop plants as affected by other nutrients of the medium. *Soil Science and Plant Nutrition* **13**: 41-44.
- Tariq M, Mott CFB. 2007.** The significance of boron in plant nutrition and environment- A review. *Journal of Agronomy* **6**: 1-10.

- Ticconi CA, Delatorre CA, Steffen A. 2001.** Attenuation of phosphate starvation responses by phosphate in Arabidopsis. *Plant Physiology* **127**: 963-972.
- Tischner R. 2000.** Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment* **23**: 1005-1024.
- Tisdale SL, Nelson WL, Beaton JD. 1985.** *Soil Fertility and Fertilizers 4th Edn.* New York. Macmillan Publishing Company.
- Ullrich WR. 2002.** Salinity and nitrogen nutrition. In: A. Läuchli, U. Lüttge (Eds). *Salinity: Environment – Plants – Molecules.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 229-248.
- USEPA. 1975.** *Preliminary investigations of effects on the environment of boron, indium, nickel, selenium, tin, vanadium and their compounds.* Vol. 1. Report No. 56/2-75-005A.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H. 2009.** Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**: 759-776.
- Vouthckow N. 2005.** Desalination-water for the next generation. *Filtration & Separation* **42**: 14-25.
- Wallsgrave RM, Lea PJ, Mifflin BJ. 1979.** Distribution of enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiology* **63**: 232-236.
- Warington K. 1923.** The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Annals of Botany* **37**: 629-672.
- Wellburn AR. 1994.** The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* **144**: 307-313.
- Wolf B. 1974.** Improvement in the Azomethine-H method for determination of boron. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **5**: 39-44.

- Yamamoto A, Bhuiyan MNH, Waditee R, Tanaka Y, Esaka M, Oba K, Jagendorf AT, Takabe T. 2005.** Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1785-1796.
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N. 1997.** Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology* **115**:1505-1412
- Yemm EW, Cocking EC. 1995.** The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* **80**: 209-213.
- Yermiyahu U, Ben-Gal A, Keren R, Reid RJ. 2008.** Combined effect of salinity and excess boron on plant growth and yield. *Plant and Soil* **304**: 73-87.
- Yermiyahu U, Tal A, Ben-Gal A, Bar-Tal A, Tarchitzky J, Lahav O. 2007.** Rethinking desalinated water quality and agriculture. *Science* **318**: 920-921.
- Yokota H, Konishi S. 1990.** Effect of the formation of sugar borate complex on the growth inhibition of pollen tubes of *Camellia sinensis* and culture cells of *Nicotiana tabacum* by toxic levels of borate. *Soil Science and Plant Nutrition* **36**: 275-281.
- Yu Q, Osborne L, Rengel Z. 1998.** Micronutrient deficiency changes activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco plants. *Journal of Plant Nutrition* **21**: 1427-1437.
- Zhu J, Alvarez S, Marsh EL, LeNoble ME, Cho IJ, Sivaguru M, Chen S, Nguyen HT, Wu Y, Schachtman DP, Sharp RE. 2007.** Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. Region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit. *Plant Physiology* **145**: 1533-1548.

APÉNDICE

TABLAS

Tabla A1. ANOVA factorial dónde se analiza el efecto independiente del tipo de cultivar (CV) y tratamiento de boro (B) empleado sobre diversos parámetros analizados en el bloque experimental I.

Variable dependiente	Variable independiente	
	CV	B
ps	12.55 ** ¹	37.89 ***
RGR _F	10.38 **	47.12 ***
B total	84.31 ***	435.16 ***
B libre	18.31 **	143.02 ***
MDA	26.12 ***	47.27 ***
H ₂ O ₂	106.76 ***	37.92 ***
FRAP	2009.56 ***	2.26 ns
TEAC	139.56 ***	155.06 ***
ASA	60.96 ***	35.82 ***
DHA	7.10 *	10.48 **
ASA total	18.72 ***	19.03 ***
ASA/ASA total	0.38 ns	8.70 **
GSH	21.45 ***	7.45 **
GSSG	2.73 ns	18.03 ***
GSH total	14.90 **	4.05 *
ASA/GSH total	4.27 ns	2.52 ns
SOD	25.63 ***	65.46 ***
CAT	65.85 ***	212.57 ***
APOX	7.50 *	5.33 *
DHAR	32.96 ***	46.42 ***
MDHAR	12.84 **	31.02 ***
GR	4.59 ns	44.74 ***
AO	0.84 ns	18.69 ***
AO-CW	2.84 ns	4.23 *
L-GALDH	8.40 *	49.43 ***
Glucosa	1.40 ns	211.85 ***
Fructosa	0.95 ns	749.22 ***
Sacarosa	2.02 ns	67.58 ***

¹Los valores representan el estadístico *F* (5%); *P*>0.05 (ns, no significativo), *P*<0.05 (*), *P*<0.01 (**), *P*<0.001 (***)

Tabla A2. ANOVA factorial dónde se analiza el efecto independiente del tipo de cultivar (CV) y tratamiento de boro (B) empleado sobre diversos parámetros analizados en el bloque experimental I.

Variable dependiente	Variable independiente	
	CV	B
N orgánico	4.32 * ¹	46.17 ***
NO ₃ ⁻	0.07 ns	63.04 ***
NH ₄ ⁺	1.09 ns	186.34 ***
NR	16.65 **	104.33 ***
NiR	88.89 ***	128.82 ***
GS	14.14 **	70.69 ***
GOGAT	0.11 ns	62.25 ***
GDH	3.65 ns	59.81 ***
Aminoácidos	1.95 ns	136.43 ***
Proteínas	6.29 *	10.71 **
TNC	1.34 ns	34.27 ***
TNA	0.91 ns	54.64 ***
NUpE	0.13 ns	21.42 ***
NUtE	0.96 ns	43.00 ***

¹Los valores representan el estadístico *F* (5%); *P*>0.05 (ns, no significativo), *P*<0.05 (*), *P*<0.01 (**), *P*<0.001 (***)

Tabla A3. ANOVA factorial dónde se analiza el efecto independiente del tipo de cultivar (CV) y tratamiento de boro (B) empleado, así como del día de muestreo (T), sobre diversos parámetros analizados en el bloque experimental II.

Variable dependiente	Variable independiente		
	CV	B	T
ps	3.91 * ¹	14.12 ***	-
RGR _R	7.21 **	12.74 ***	-
ps parte aérea/raíz	0.91 ns	10.93 ***	-
B total	1.00 ns	68.51 ***	-
B libre	0.00 ns	10.94 ***	-
O ₂ ^{•-}	1.82 ns	0.41 ns	17.01 ***
H ₂ O ₂	0.01 ns	4.74 *	11.73 ***
LOX	0.00 ns	7.24 **	42.17 ***
MDA	0.21 ns	1.37 ns	1.33 ns
Lignina	38.27 ***	2.17 ns	-
PAL	1.69 ns	10.05 ***	-
Fenoles	7.23 **	2.30 ns	-
PPO	8.69 **	0.93 ns	16.24 ***
GPOX	32.09 ***	11.14 ***	3.56 *
SPOX	13.32 ***	1.53 ns	10.39 ***
SPOX-CW	44.82 ***	15.86 ***	37.73 ***
<i>Permeabilidad</i>			
Aminoácidos	12.56 **	3.70 *	-
Fenoles	15.25 ***	3.27 ns	-
Sacarosa	2.41 ns	2.41 ns	-
K ⁺	5.97 *	46.29 ***	-
<i>Eflujo de B</i>			
ddH ₂ O	5.78 *	446.02 ***	-
NaN ₃	4.56 *	273.07 ***	-

¹Los valores representan el estadístico *F* (5%); *P*>0.05 (ns, no significativo), *P*<0.05 (*), *P*<0.01 (**), *P*<0.001 (***)

Tabla A4. ANOVA factorial dónde se analiza el efecto independiente del tipo de cultivar (CV) y tratamiento de boro (B) empleado, así como del día de muestreo (T), sobre diversos parámetros analizados en el bloque experimental III.

Variable dependiente	Variable independiente					
	CV		B		T	
Biomasa	23.07	*** ¹	3.02	ns	82.70	***
Área foliar	13.99	***	14.86	***	27.81	***
B total	4.47	*	287.24	***	61.87	***
O ₂ ^{•-}	0.08	ns	49.63	***	6.78	***
H ₂ O ₂	9.09	**	56.90	***	18.17	***
MDA	37.54	***	24.70	***	52.38	***
Prolina	0.95	ns	15.79	***	14.52	***
Clorofila a	1.27	ns	3.99	*	1.68	ns
Clorofila b	0.02	ns	16.49	***	7.89	***
Clorofila a+b	0.02	ns	12.32	***	4.77	**
Carotenoides	0.48	ns	8.43	***	6.41	***
Antocianinas	0.08	ns	68.71	***	31.27	***
Fenoles	15.56	***	930.13	***	24.50	***
Flavonoides	33.88	***	12.80	***	51.39	***
GPOX	85.29	***	99.86	***	30.45	***
PPO	1.84	ns	29.74	***	25.51	***

¹Los valores representan el estadístico *F* (5%); $P > 0.05$ (ns, no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

Tabla A5. Volumen (%) de 'spots' obtenidos a partir de geles bidimensionales realizados con proteínas unidas iónicamente a la pared celular de raíces de dos cultivares de tomate (Kosaco y Josefina) sometidos a 0.05 mM (control) y 2 mM de B durante 16 días.

SPOT ID	cv. Kosaco				cv. Josefina			
	0.05 mM B	2.00 mM B	Ttest	exp.	0.05 mM B	2.00 mM B	Ttest	exp.
25	-	-	-	-	0.29 ± 0.07	0.08 ± 0.03	0.048	▼
26	0.20 ± 0.02 ¹	0.11 ± 0.02	0.008 ²	▼ ³	-	-	-	-
30	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.030	▼	-	-	-	-
41	0.28 ± 0.08	-	-	▼	-	-	-	-
59	0.04 ± 0.02	-	-	▼	-	-	-	-
64	0.44 ± 0.05	-	-	▼	-	-	-	-
69	0.26 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.034	▼	0.13 ± 0.02	-	-	▼
108	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.031	▲	-	-	-	-
113	0.88 ± 0.15	0.29 ± 0.13	0.023	▼	-	-	-	-
121	0.05 ± 0.01	-	-	▼	-	-	-	-
130	0.05 ± 0.01	-	-	▼	-	-	-	-
137	0.03 ± 0.01	-	-	▼	-	-	-	-
148	-	-	-	-	4.32 ± 0.64	8.24 ± 0.35	0.011	▲
150	0.07 ± 0.03	-	-	▼	-	-	-	-
153	0.13 ± 0.05	-	-	▼	-	-	-	-
155	1.02 ± 0.09	0.51 ± 0.05	0.006	▼	-	-	-	-
161	0.09 ± 0.02	-	-	▼	-	-	-	-
187	-	0.03 ± 0.00	-	▲	-	-	-	-
207	0.05 ± 0.02	-	-	▼	-	-	-	-
241	-	0.16 ± 0.10	-	▲	-	-	-	-
243	0.16 ± 0.03	-	-	▼	-	-	-	-
265	0.21 ± 0.03	-	-	▼	-	-	-	-
285	-	0.72 ± 0.39	-	▲	-	-	-	-
294	-	-	-	-	3.35 ± 0.33	1.13 ± 0.43	0.017	▼
342	-	-	-	-	2.40 ± 0.43	0.95 ± 0.24	0.036	▼

¹ Los valores representan medias ± SE de al menos tres muestras independientes.

² Valor $P > 0.05$ obtenido a partir de Ttest.

³ Indica si la proteína representada por el 'spot' tuvo una expresión menor (▼) o mayor (▲) que el control.

PUBLICACIONES

Oxidative Stress and Antioxidants in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Plants Subjected to Boron Toxicity

LUIS M. CERVILLA*, BEGOÑA BLASCO, JUAN J. RÍOS, LUIS ROMERO and JUAN M. RUIZ

Department of Plant Physiology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

Received: 28 March 2007 Returned for revision: 17 May 2007 Accepted: 14 June 2007 Published electronically: 28 July 2007

- **Background and Aims** Boron (B) toxicity triggers the formation of reactive oxygen species in plant tissues. However, there is still a lack of knowledge as to how B toxicity affects the plant antioxidant defence system. It has been suggested that ascorbate could be important against B stress, although existing information is limited in this respect. The objective of this study was to analyse how ascorbate and some other components of the antioxidant network respond to B toxicity.
- **Methods** Two tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars ('Kosaco' and 'Josefina') were subjected to 0.05 (control), 0.5 and 2 mM B. The following were studied in leaves: dry weight; relative leaf growth rate; total and free B; H₂O₂; malondialdehyde; ascorbate; glutathione; sugars; total non-enzymatic antioxidant activity, and the activity of superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, ascorbate oxidase and L-galactose dehydrogenase.
- **Key Results** The B-toxicity treatments diminished growth and boosted the amount of B, malondialdehyde and H₂O₂ in the leaves of the two cultivars, these trends being more pronounced in 'Josefina' than in 'Kosaco'. B toxicity increased ascorbate concentration in both cultivars and increased glutathione only in 'Kosaco'. Activities of antioxidant- and ascorbate-metabolizing enzymes were also induced.
- **Conclusions** High B concentration in the culture medium provokes oxidative damage in tomato leaves and induces a general increase in antioxidant enzyme activity. In particular, B toxicity increased ascorbate pool size. It also increased the activity of L-galactose dehydrogenase, an enzyme involved in ascorbate biosynthesis, and the activity of enzymes of the Halliwell–Asada cycle. This work therefore provides a starting point towards a better understanding of the role of ascorbate in the plant response against B stress.

Key words: Boron toxicity, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, ascorbate, glutathione, tomato.

INTRODUCTION

Boron (B) toxicity, an important agricultural problem that limits crop productivity in different regions of the world, can occur in B-rich soils or in soils exposed to B-rich irrigation waters, fertilizers, sewage sludge, or fly ash (Nable *et al.*, 1997). Furthermore, in recent years, B toxicity has attracted increasing interest owing to the greater demand for desalinated water, in which the B concentration may be too high for healthy irrigation (Parks and Edwards, 2005).

The typical symptoms shown by plants exposed to excess B are reduced vigour, delayed development, leaf burn (chlorotic and necrotic patches in older leaves), and decreased number, size and weight of fruits (Paull *et al.*, 1992; Nable *et al.*, 1997). However, despite the importance of this nutritional disorder, it is not understood why B is toxic to plants, or how tolerant plants avoid toxicity (Reid *et al.*, 2004). It has long been known that the optimum B level for one species could be either toxic or insufficient for other species (Blevins and Lukaszewski, 1998). Genetic variation in response to high B concentrations has prompted investigation into the mechanism operating in plants against B excess. In wheat (*Triticum aestivum*) and barley (*Hordeum vulgare*) cultivars, several possible tolerance mechanisms have been proposed, these operating mainly by exclusion (Paull *et al.*, 1992; Hayes and Reid,

2004). These mechanisms are based on studies demonstrating an ability of plants to accumulate less B in shoots, although the transporters which participate in the exclusion process have not yet been identified. On the other hand, it has been suggested that an antioxidant response may reduce B-toxicity damage in some plants (Gunes *et al.*, 2006). This antioxidant response is considered to be a critical process for protecting plants against oxidative damage in combination with a wide range of environmental factors (Inzé and Van Montagu, 1995), including UV-light excess, salinity, drought, heavy metals, chilling, oxygen shortage and nutritional deprivation (Mittler, 2002). During oxidative stress, the excess production of reactive oxygen species (ROS) causes membrane damage that eventually leads to cell death. For protection against ROS, plants contain antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) or ascorbate peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11), as well as a wide array of non-enzymatic antioxidants (Mittler, 2002; Blokhina *et al.*, 2003).

As in most ionic stresses, toxic levels of B cause the formation of ROS. Karabal *et al.* (2003) observed in barley cultivars that B toxicity induced oxidative and membrane damage in leaves. Recently, in apple (*Malus domestica*) and grapevine (*Vitis vinifera*), it has been reported that B toxicity induces oxidative damage by lipid peroxidation and hydrogen peroxide accumulation (Molassiotis *et al.*, 2006; Gunes *et al.*, 2006). Regarding the relationship

* For correspondence. E-mail lmcerv@ugr.es

between non-enzymatic antioxidants and B toxicity, little information is available. Studying apple rootstock, Molassiotis *et al.* (2006) and Sotiropoulos *et al.* (2006) found that the non-enzymatic antioxidant activity increased with increasing B concentrations in the culture medium. Nevertheless, it has been shown that B excess inhibited the formation of glutathione in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves (Ruiz *et al.*, 2003) and tocopherol in orange (*Citrus sinensis*) plants (Keles *et al.*, 2004). On the other hand, in recent years a close relationship has been discerned between B and ascorbate metabolism (Blevins and Lukaszewski, 1998; Brown *et al.*, 2002). Ascorbate or vitamin C is the most abundant antioxidant in plants, found in all subcellular compartments including the apoplast. It has been suggested that plants with increased ascorbate concentration may improve their growth and stress resistance (Smirnoff, 2000), even under B excess (Keles *et al.*, 2004). In addition, ascorbate regeneration by the Halliwell–Asada cycle is a key antioxidant mechanism against ROS formation (Mittler, 2002). However, more data on the response of the plant's antioxidant defence system to B toxicity are required.

In view of the above, the present study was designed to investigate the oxidative damage, antioxidant system and ascorbate pool of two tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars subjected to high B levels in the root medium. The results show that B toxicity causes oxidative damage in tomato leaves and that antioxidant defences, particularly related to ascorbate, are increased.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

The two cultivars of tomato plants [*Solanum lycopersicum* L. (*Lycopersicon esculentum* Mill.)] used in the present study were 'Josefina' and 'Kosaco'. Seeds of the two cultivars were germinated and grown for 30 d in cell flats (cell size, 3 × 3 × 10 cm) filled with a peatlite mixture, and the flats were placed on benches in an experimental greenhouse in southern Spain (Granada, Saliplant S.L.). The 30-d-old seedlings were transferred to a controlled environmental chamber used with relative humidity of 60–80 %, temperature 25 °C/15 °C (day/night), and 16-h/8-h photoperiod at a PPFD (photosynthetic photon-flux density) of 350 μmol m⁻² s⁻¹ (measured at the top of the plants with a 190 SB quantum sensor, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Plants were grown in individual pots (25 cm upper diameter, 17 cm lower diameter, 25 cm in height) of 8 L volume, filled with vermiculite. Throughout the experiment, the plants were grown in a nutrient solution containing: 4 mM KNO₃, 3 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 2 μM MnCl₂, 1 μM ZnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 0.1 μM Na₂MoO₄, 5 μM Fe-EDDHA and 50 μM H₃BO₃. The nutrient solution (pH 5.8) was renewed every 3 d and the vermiculite partly rinsed with Millipore-filtered water in order to avoid nutrient accumulation.

The B treatments (0.50 and 2.00 mM H₃BO₃) were started 42 d after sowing and maintained for 14 d, when most of the

'Josefina' plants showed clear symptoms of B toxicity. The control treatment received the complete nutrient solution alone (0.05 mM B). The experimental design was a randomized complete block with three treatments, arranged in individual pots with six plants per treatment, and three replicates. The experiment was repeated three times under the same conditions (*n* = 9).

Plant sampling and determination of relative leaf growth rate

To determine the relative leaf growth rate (*RGR_L*), leaves from three plants per cultivar were sampled on day 42 after sowing, immediately before the start of the B treatment (*T_i*). The leaves were dried in a forced-air oven at 70 °C for 24 h, and dry weight (DW) was recorded as grams per plant. The remaining plants were sampled 56 d after sowing (day 14 of treatments, *T_F*). Leaves were rinsed three times in distilled water after cleaning with non-ionic detergent at 1 %, and then blotted on filter paper. From each treatment, half the leaves were used fresh for analysis of free B, malondialdehyde (MDA), H₂O₂, enzymatic activity, sugars, glutathione, ascorbate and total non-enzymatic antioxidant activity. The other half was used to determine the DW of leaves and total B concentration. The relative growth rate was calculated from the increase in leaf DW at the beginning and at the end of the B treatment, using the equation $RGR_L = (\ln DW_F - \ln DW_i) / (T_F - T_i)$ where *T* is the time and the subscripts denote the first and last sampling (i.e. days 0 and 14, respectively, after the B treatment; Bellaloui and Brown, 1998).

Boron analysis

The total B concentration was analysed after digestion of 0.15 g dry and milled leaf material with H₂SO₄ (5 mL at 98 %) and H₂O₂ (30 %). For free B extraction, a batch of 0.15 g of fresh leaves cut into discs 7 mm in diameter were placed in a test tube with 10 mL infiltration medium (propanol 1 %, which increases membrane permeability), then subjected to vacuum for 25 min, and later filtered. To measure B concentration, the azomethine-H method was followed and the absorbance was read by spectrophotometry at 410 nm (Wolf, 1974). The total B concentration was expressed as μg g⁻¹ DW and free B as μg g⁻¹ fresh weight (FW).

Concentration of MDA and H₂O₂

For the MDA assay, leaves were homogenized with 5 mL of 50 mM solution containing 0.07 % NaH₂PO₄·2H₂O and 1.6 % Na₂HPO₄·12H₂O, ground with a mortar and pestle, and centrifuged at 20 000 g for 25 min in a refrigerated centrifuge. For measurement of MDA concentration, 4 mL of 20 % trichloroacetic acid containing 0.5 % thiobarbituric acid was added to a 1-mL aliquot of the supernatant. The mixture was heated at 95 °C for 30 min and then quickly cooled in an ice bath. After the tube was centrifuged at 10 000 g for 10 min, the absorbance of the supernatant was read at 532 nm. The value for the non-specific absorbance at 600 nm was subtracted from the reading at 532 nm.

The concentration of MDA was calculated using the MDA extinction coefficient of $155 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath and Packer, 1968; Fu and Huang, 2001).

The H_2O_2 content of leaf samples was colorimetrically measured as described by Mukherjee and Choudhuri (1983). Leaf samples were extracted with cold acetone to determine the H_2O_2 levels. An aliquot (1 mL) of the extracted solution was mixed with 200 μL of 0.1 % titanium dioxide in 20 % (v/v) H_2SO_4 and the mixture was then centrifuged at 6000 g for 15 min. The intensity of yellow colour of the supernatant was measured at 415 nm. The H_2O_2 concentration was calculated from a standard curve plotted within the range of 100–1000 nmol H_2O_2 .

Non-enzymatic antioxidant activity, ascorbate and glutathione

Total non-enzymatic antioxidant activity was measured using the Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assays. For both tests, the leaf tissue (0.5 g) was homogenized in

TABLE 1. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mM) on leaf dry weight and relative leaf growth rate (RGR_L) of two tomato cultivars ('Kosaco' and 'Josefina')

	Dry weight (g)		RGR _L (g g ⁻¹ DW d ⁻¹)	
	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'
0.05 mM	1.85 ± 0.06 ^{a†}	2.16 ± 0.06 ^a	0.108 ± 0.002 ^a	0.108 ± 0.002 ^a
0.50 mM	1.84 ± 0.05 ^a	1.84 ± 0.06 ^b	0.108 ± 0.003 ^a	0.097 ± 0.002 ^b
2.00 mM	1.46 ± 0.05 ^b	1.62 ± 0.05 ^c	0.092 ± 0.001 ^b	0.088 ± 0.001 ^c
P	** [§]	**	**	***
'Kosaco'	1.72 ^{b‡}		0.103 ^a	
'Josefina'	1.87 ^a		0.098 ^b	
P	*		*	
LSD _{0.05}	0.11		0.004	

[†] Values are means ± s.e. ($n = 9$) and differences between means were compared using Duncan's test ($P = 0.05$).

[‡] Values are means ($n = 27$) and differences between means were compared using LSD test ($P = 0.05$).

[§] Levels of significance are represented by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

5 mL methanol. The homogenate was filtered and centrifuged at $12\,800 \times g$ for 2 min. The FRAP assay was made with FRAP reagent, i.e. 1 mM 2,4,6-tripyridyl-2-triazine (TPTZ) and 20 mM ferric chloride in 0.25 M sodium acetate (pH 3.6). An aliquot of 100 μL of leaf extract (0.5 g/10 mL in methanol) was added to 2 mL of FRAP reagent and thoroughly mixed. After the mixture was left at 20° C for 5 min, absorbance at 593 nm was measured. Calibration was against a standard curve (25–1600 μM ferrous iron) using freshly prepared ammonium ferrous sulfate (Benzie and Strain, 1996; Rosales *et al.*, 2006).

The TEAC assay was performed according to a modified version of the method of Re *et al.* (1999) and Cai *et al.* (2004). ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation (ABTS^{•+}) was produced with 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate after incubation at room temperature in darkness for 16 h. After incubation, the ABTS^{•+} solution was diluted with methanol to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. An aliquot of 100 μL of leaf extract (0.5 g/10 mL in methanol) was added to 3.9 mL of diluted ABTS^{•+} solution and mixed thoroughly. The reactive mixture was allowed to stand at room temperature for 6 min and the absorbance was immediately recorded at 734 nm. Trolox standard solution (0–15 μM) in methanol was prepared and assayed under the same conditions. The absorbance of the resulting oxidized solution was compared with that of the calibrated Trolox standard. Results were expressed in terms of Trolox-equivalent antioxidant capacity (μmol Trolox equivalents per g FW).

Reduced ascorbate (ASA), dehydroascorbate (DHA) and total ascorbate (ASA + DHA) were determined spectrophotometrically following Gossett *et al.* (1994). The amounts of reduced ascorbate and total ascorbate were assayed from the same extract. ASA standards ranging between 0.1 and 1.5 μM L-ascorbic acid in metaphosphoric acid were analysed in the same manner as the extracts. For each sample, DHA was estimated from the difference between total ascorbate and ASA.

Reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and total glutathione (GSH + GSSG) were

TABLE 2. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mM) on total and free B concentration in leaves of two tomato cultivars ('Kosaco' and 'Josefina')

	Total B ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)		Free B ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)	
	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'
0.05 mM	87.71 ± 3.57 ^{b†}	94.92 ± 5.63 ^c	10.03 ± 0.81 ^b	13.02 ± 3.63 ^b
0.50 mM	209.18 ± 43.37 ^b	367.18 ± 3.61 ^b	15.14 ± 1.38 ^b	22.45 ± 0.29 ^b
2.00 mM	627.63 ± 43.61 ^a	1055.58 ± 18.25 ^a	64.55 ± 4.70 ^a	103.85 ± 9.83 ^a
P	*** [§]	***	***	***
'Kosaco'	308.17 ^{b‡}		29.91 ^b	
'Josefina'	505.90 ^a		46.44 ^a	
P	**		*	
LSD _{0.05}	108.54		12.04	

[†] Values are means ± s.e. ($n = 9$) and differences between means were compared using Duncan's test ($P = 0.05$).

[‡] Values are means ($n = 27$) and differences between means were compared using LSD test ($P = 0.05$).

[§] Levels of significance are represented by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

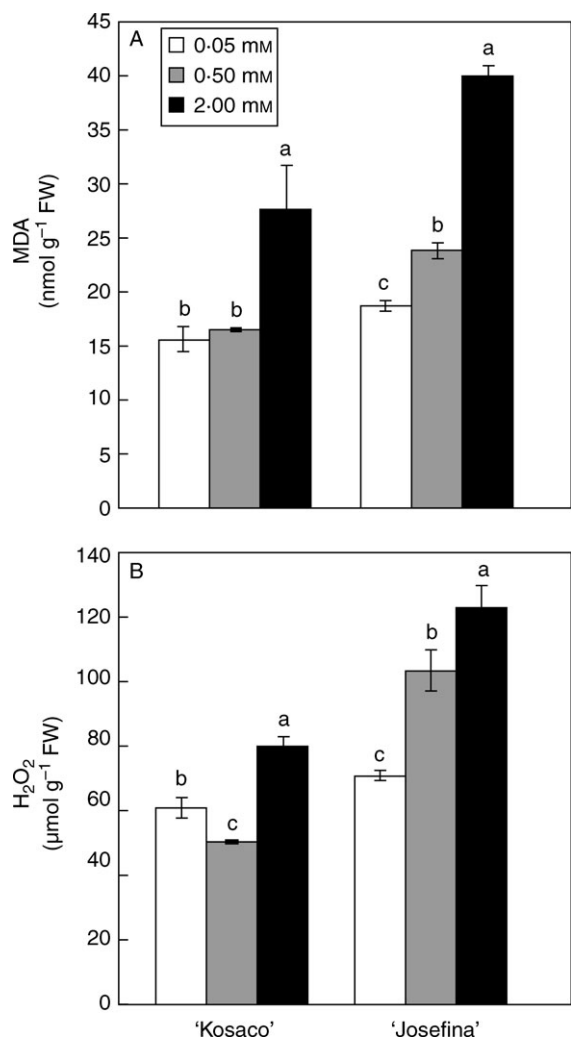


FIG. 1. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mM) on (A) MDA and (B) H₂O₂ concentration in leaves of two tomato cultivars: 'Kosaco' and 'Josefina'. Bars represent means \pm s.e. ($n = 9$); for each cultivar, bars followed by the same letters are not significantly different using Duncan's test ($P = 0.05$).

determined following Gossett *et al.* (1994). From the same extract, GSSG and total glutathione were assayed. A standard curve was developed by preparing solutions of 0.002–0.0001 g mL⁻¹ GSH in 60 mL metaphosphoric acid (pH 2.8) containing 1 mM EDTA, diluting 1:2000 with 50 mL L⁻¹ Na₂PO₄, and analysing in the same manner as for the extracts. Levels of GSH were estimated as the difference between total glutathione and GSSG.

Activity of antioxidant enzymes

SOD (EC 1.15.1.1) activity was assayed by monitoring the inhibition of the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT), according to the methods of Giannopolitis and Ries (1977) and Beyer and Fridovitch (1987), with some modifications (Yu *et al.*, 1998). A 5-mL reaction mixture was used, containing 50 mM Na₂CO₃ (pH 10.0), 13 mM methionine, 0.025% (v/v) Triton X-100, 63 μM NBT, 1.3 μM riboflavin and an appropriate aliquot of enzyme extract. The reaction mixtures were illuminated for 15 min at a PPF of 380 μmol⁻² s⁻¹. Mixtures not illuminated were used to correct for background absorbance. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of the reduction of NBT as monitored at 560 nm.

CAT (1.11.1.6) activity was determined by following the consumption of H₂O₂ at 240 nm for 5 min (Nakano and Asada, 1981; Rao *et al.*, 1997). The reaction mixture (3 mL total volume) contained 25 mM Tris-acetate buffer (pH 7.0), 0.8 mM Na-EDTA and 20 mM H₂O₂, and enzyme assay was performed at 25 °C.

The enzymes APX (EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.1) were assayed following Rao *et al.* (1996). APX activity was determined by registering the absorbance change at 290 nm for 3 min of a reaction mixture (3.75 mL) containing 100 mM phosphate potassium buffer (pH 7.5), 0.5 mM ASA, 0.2 mM H₂O₂ and 0.75 mL enzyme extract. GR activity was measured after monitoring the oxidation of NADPH at 340 nm for 3 min in a reaction mixture (3.5 mL) containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 2 mM Na₂-EDTA, 0.2 mM NADPH, 0.5 mM GSSG and 0.75 mL enzyme extract.

TABLE 3. FRAP and TEAC assay in leaves of two tomato cultivars ('Kosaco' and 'Josefina') subjected to 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mM)

	FRAP (μmol g ⁻¹ FW)		TEAC (μmol g ⁻¹ FW)	
	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'
0.05 mM	1005.13 \pm 5.18 ^{b†}	729.62 \pm 0.90 ^b	6.20 \pm 0.07 ^b	5.01 \pm 0.09 ^b
0.50 mM	955.62 \pm 4.71 ^c	769.33 \pm 12.16 ^a	6.02 \pm 0.04 ^b	5.29 \pm 0.10 ^b
2.00 mM	1025.41 \pm 4.54 ^a	721.28 \pm 8.94 ^b	6.82 \pm 0.06 ^a	6.66 \pm 0.06 ^a
<i>P</i>	*** [§]	*	***	***
'Kosaco'	995.39 ^{a‡}		6.34 ^a	
'Josefina'	737.41 ^b		5.65 ^b	
<i>P</i>	***		***	
LSD _{0.05}	29.01		0.27	

[†] Values are means \pm s.e. ($n = 9$) and differences between means were compared using Duncan's test ($P = 0.05$).

[‡] Values are means ($n = 27$) and differences between means were compared using LSD test ($P = 0.05$).

[§] Levels of significance are represented by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

TABLE 4. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mM) on ASA, DHA, total ascorbate concentration and status redox (ASA/Total ascorbate) in leaves of two tomato cultivars ('Kosaco' and 'Josefina')

	ASA (nmol g ⁻¹ FW)		DHA (nmol g ⁻¹ FW)		Total ascorbate (nmol g ⁻¹ FW)		ASA/Total ascorbate (%)	
	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'
0.05 mM	198.94 ± 0.33 ^{c†}	150.14 ± 3.13 ^c	32.29 ± 0.35 ^c	47.03 ± 3.13 ^c	231.23 ± 14.11 ^c	197.18 ± 9.40 ^c	86.01 ± 0.57 ^a	76.10 ± 1.73 ^a
0.50 mM	326.69 ± 16.40 ^b	169.63 ± 6.39 ^b	106.53 ± 16.40 ^b	86.66 ± 6.38 ^b	433.21 ± 18.45 ^b	256.28 ± 9.58 ^b	75.33 ± 3.75 ^b	66.33 ± 2.60 ^b
2.00 mM	379.95 ± 14.35 ^a	258.68 ± 1.06 ^a	536.19 ± 14.35 ^a	112.16 ± 1.04 ^a	916.14 ± 6.15 ^a	370.84 ± 9.40 ^a	41.32 ± 1.45 ^c	69.66 ± 3.33 ^b
P	***§	***§	***§	***§	***§	***§	***§	*
'Kosaco'	301.86 ^{†‡}		225.00 [†]		526.86 [†]		67.55 [†]	
'Josefina'	192.82 ^b		81.95 ^b		274.77 ^b		70.66 ^a	
P	***§		*		***§		ns	
LSD _{0.05}	29.95		115.18		124.95		10.77	

[†] Values are means ± s.e. (n = 9) and differences between means were compared using Duncan's test (P = 0.05).

[‡] Values are means (n = 27) and differences between means were compared using LSD test (P = 0.05).

[§] Levels of significance are represented by *P < 0.05, ***P < 0.001 and ns (not significant, P > 0.05).

Dehydroascorbate reductase activity (DHAR; EC 1.8.5.1) was measured at 265 nm for 3 min following the change in absorbance resulting from the formation of ASA (Nakano and Asada, 1981). The reaction mixture (3.1 mL) contained 25 mM phosphate sodium buffer (pH 7), 2.5 mM GSH, 0.4 mM DHA and 0.1 mL enzyme extract. The molar extinction coefficient used to calculate the activity of this enzyme was 7.0 mm⁻¹ cm⁻¹. In addition, the enzyme monodehydroascorbate reductase (MDHAR; EC 1.6.5.4) was assayed by registering the change in absorbance of the samples at a wavelength of 340 nm (Foyer *et al.*, 1989). The reaction mixture (3.3 mL) contained 100 mM HEPES-HCl (pH 7.6) buffer, 2.5 mM ASA, 25 mM NADPH and 300 µL enzyme extract. The NADPH molar extinction coefficient of 6.22 mm⁻¹ cm⁻¹ was used to calculate the MDHAR activity.

Ascorbate oxidase (AO; EC 1.10.3.3) activity was measured according to a modified version of the method of García-Pineda *et al.* (2004), based on the fact that ASA absorbs at 265 nm whereas the oxidation product, MDHA, does not. The reaction mixture (1 mL) consisted of 0.025 mM citrate/phosphate buffer (pH 5.6), 0.08 mM L-ascorbic acid, 0.02 mM neutralized Na₂-EDTA, 0.15 g L⁻¹ bovine serum albumin solution, and up to 200 µL of enzyme extract (extinction coefficient = 9246 M⁻¹ cm⁻¹ at 265 nm).

Finally, L-galactose dehydrogenase activity (L-GalDH) was determined following the method of Gatzek *et al.* (2002). For this, a reaction mixture (1.1 mL) containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer, 0.1 mM NAD, 5 mM L-galactose and 0.1 mL of plant extract was used. The formation of NADH during the reaction was measured at 340 nm and L-GalDH activity was calculated according to the molar extinction coefficient of 6.22 mm⁻¹ cm⁻¹.

The protein concentration of the extracts was determined according to the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

Determination of sugar concentrations

Sucrose, glucose and fructose were extracted and quantified by use of a kit (Roche Biopharm, France), based on enzyme-linked formation of NADPH.

Statistical analysis

The data compiled were submitted to an analysis of variance (ANOVA) and the differences between the means were compared by Duncan's multiple-range test (P < 0.05). In addition, to ascertain whether the type of cultivar used in the experiment significantly influenced the results, a two-way ANOVA was used and the means were compared by Fisher's least-significant difference test (LSD).

RESULTS AND DISCUSSION

Tomato leaf biomass and *RGR*_L decreased as a result of higher B concentration in the root medium (Table 1). Both cultivars also showed an increase in the total and

TABLE 5. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mM) on GSH, GSSG and total glutathione concentration in leaves of two tomato cultivars ('Kosaco' and 'Josefina')

	GSH (nmol g ⁻¹ FW)		GSSG (nmol g ⁻¹ FW)		Total glutathione (nmol g ⁻¹ FW)	
	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'
0.05 mM	470.64 ± 4.84 [†]	452.00 ± 2.61 ^a	166.06 ± 4.83 ^b	174.75 ± 2.61 ^a	636.03 ± 0.40 ^b	626.75 ± 11.49 ^a
0.50 mM	918.03 ± 4.51 ^a	460.72 ± 6.73 ^a	105.82 ± 4.51 ^c	154.35 ± 6.73 ^b	1023.85 ± 45.74 ^a	615.07 ± 34.31 ^a
2.00 mM	663.65 ± 2.76 ^b	468.86 ± 0.71 ^a	195.80 ± 2.76 ^a	177.93 ± 0.71 ^a	859.45 ± 88.28 ^a	646.79 ± 13.77 ^a
P	***§	ns	***	*	**	ns
'Kosaco'	684.11 ^{a‡}		155.89 ^a		840.11 ^a	
'Josefina'	460.53 ^b		169.01 ^a		629.54 ^b	
P	***		ns		**	
LSD _{0.05}	103.54		17.04		116.99	

[†] Values are means ± s.e. ($n = 9$) and differences between means were compared using Duncan's test ($P = 0.05$).

[‡] Values are means ($n = 27$) and differences between means were compared using LSD test ($P = 0.05$).

[§] Levels of significance are represented by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and ns (not significant, $P > 0.05$).

free B concentration, the latter being higher in 'Josefina' than in 'Kosaco' (Table 2). A reduction in growth and increase of B concentration in the plant tissues as a consequence of B toxicity has previously been observed in tomato (Gunes *et al.*, 1999), sunflower (Ruiz *et al.*, 2003) and barley (Karabal *et al.*, 2003).

The MDA and H₂O₂ concentrations were measured in leaves as an indicator of oxidative stress (Mittler, 2002). Both parameters increased significantly under B toxicity (Fig. 1). Mittler (2002) proposed that membrane damage might be caused by high H₂O₂ levels, which could accelerate the Haber–Weiss reaction, resulting in hydroxyl radical (OH[•]) formation and thus lipid peroxidation. However, Karabal *et al.* (2003) found no relationship between the H₂O₂ concentration and lipid peroxidation in barley subjected to high B levels. In accordance with the present results, others have recently found that excess B increased both MDA and H₂O₂ concentrations in apple rootstock (Molassiotis *et al.*, 2006) and grape (Gunes *et al.*, 2006).

Non-enzymatic antioxidant activity is represented by a series of antioxidant molecules that the plant uses against ROS formation (Mittler, 2002). FRAP and TEAC were used to provide information on total non-enzymatic antioxidant activity. Except in the FRAP test made on 'Josefina', the assays showed significantly greater antioxidant activity under the treatment with 2 mM B (Table 3). Similarly, in apple Molassiotis *et al.* (2006) and Sotiropoulos *et al.* (2006) found that B toxicity increased non-enzymatic antioxidant activity.

To investigate this latter aspect further, leaf ascorbate and glutathione concentrations were also determined. These antioxidant molecules are found in high concentrations in chloroplasts and other cellular compartments and have a major defence function against oxidative stress (Noctor and Foyer, 1998). In the present experiment, the ascorbate concentration increased significantly in both cultivars (Table 4). Boron application is known to elevate the ascorbate concentration in plant tissues as compared with B-deficient conditions (Blevins and Lukaszewski, 1998). Increased ascorbate concentration by foliar applications of B was reported in potato (*Solanum tuberosum*; Mondy and Munshi, 1993). More recently, Keles *et al.* (2004),

studying orange, observed a significant rise in this antioxidant under conditions of excess B in the medium, proposing that this could be important against ROS formation. In the current study, with 0.5 and 2 mM B, reduced ascorbate increased, respectively, by 64 and 91 % in 'Kosaco' and by 13 and 72 % in 'Josefina' (Table 4). Given that ascorbate can directly scavenge superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen and reduce H₂O₂ to water via the APX reaction (Noctor and Foyer, 1998), the increase of ascorbate concentration in tomato plants suggests an important role for this antioxidant against oxidative stress provoked by B toxicity. Moreover, with 0.5 and 2 mM B, the DHA concentration was elevated, respectively, by 230 and 1561 % in 'Kosaco' and by 84 and 134 % in 'Josefina', resulting in a generally more oxidized ascorbate pool (Table 4). This suggests that oxidative stress caused by B toxicity both increases the ascorbate pool and increases its oxidation. Regarding glutathione, a significant increase was observed only in 'Kosaco' (Table 5). As with results under high-salinity conditions (Ruiz and Blumwald, 2002), this antioxidant could be important in protecting against oxidative stress triggered by high B concentrations. In sunflower, Ruiz *et al.* (2003) showed that B toxicity inhibited glutathione synthesis and that the external application of this antioxidant reduced phytotoxicity caused by the high B concentration.

To study the enzymatic response of the tomato plants against B toxicity, antioxidant enzymes in the leaves were analysed, such as SOD, CAT and APX, in addition to other enzymes that participate in the regeneration of ascorbate in the Halliwell–Asada cycle. With 2 mM B, CAT and APX activities increased significantly in both cultivars with respect to the control treatment (Fig. 2B, C), while SOD activity increased with 2 mM B only in 'Kosaco' (Fig. 2A). SOD activity increased significantly with 0.5 mM in both cultivars (Fig. 2A). Boron toxicity effects on enzyme activities in leaves vary widely, depending on the plant species. In barley, Karabal *et al.* (2003) found that excess B in the medium significantly increased APX activity but not that of SOD. Recently, in apple rootstock, it was reported that an increase of B concentration in the culture medium from 0.1 to 6 mM reduced CAT activity,

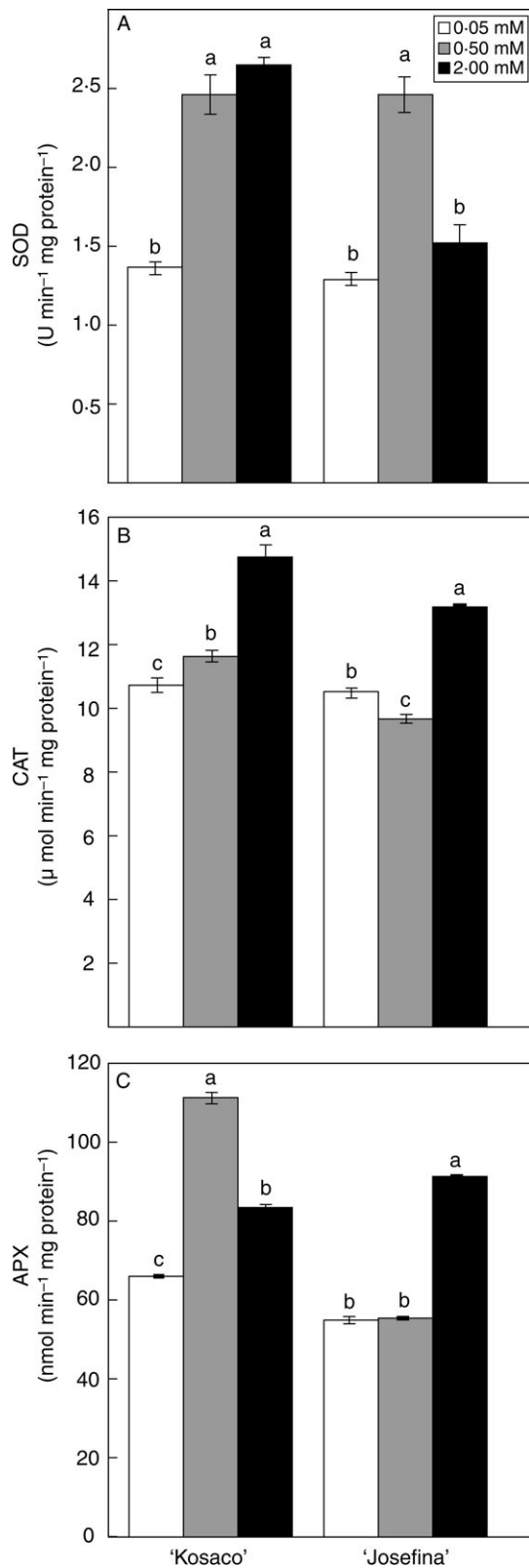


FIG. 2. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mm) on (A) SOD, (B) CAT and (C) APX activity in leaves of two tomato cultivars: 'Kosaco' and 'Josefina'. Bars represent means \pm s.e. ($n = 9$); for each cultivar, bars followed by the same letters are not significantly different using Duncan's test ($P = 0.05$).

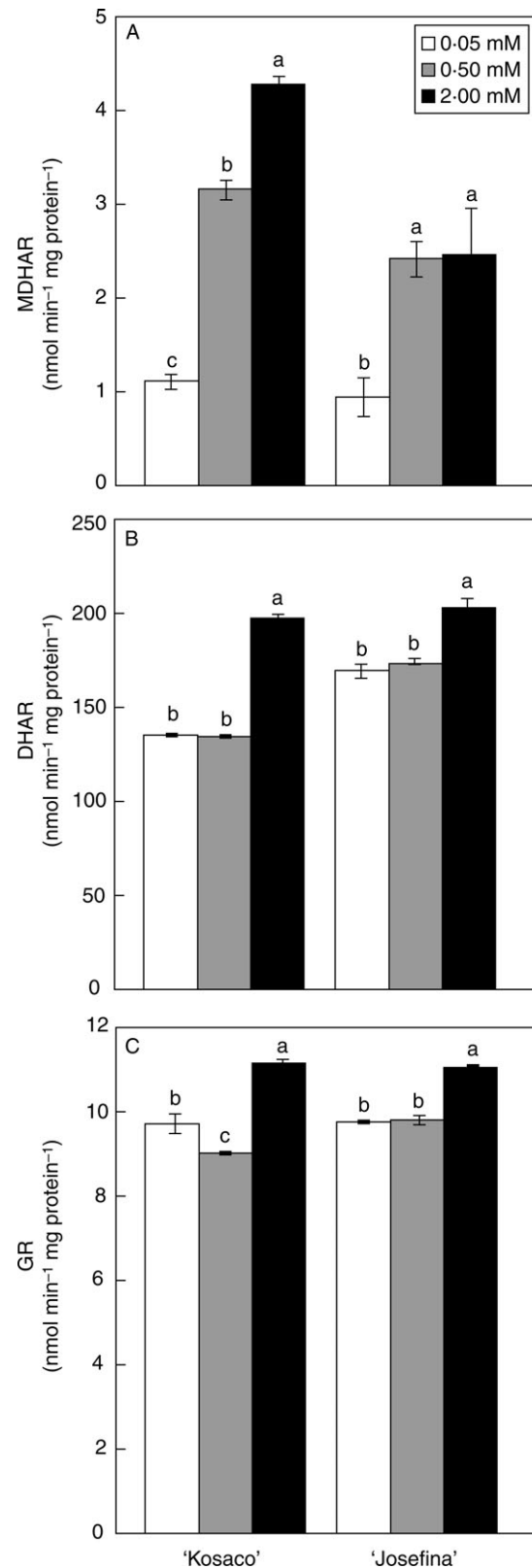


FIG. 3. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mm) on (A) MDHAR, (B) DHAR and (C) GR activity in leaves of two tomato cultivars: 'Kosaco' and 'Josefina'. Bars represent means \pm s.e. ($n = 9$); for each cultivar, bars followed by the same letters are not significantly different using Duncan's test ($P = 0.05$).

TABLE 6. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mM) on AO activity in leaves of two tomato cultivars ('Kosaco' and 'Josefina')

	Free AO (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		Cell-wall AO (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	
	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'
0.05 mM	20.69 ± 0.06 ^{b†}	17.28 ± 0.26 ^c	3.54 ± 0.19 ^a	2.88 ± 0.01 ^b
0.50 mM	26.68 ± 0.48 ^a	22.57 ± 0.06 ^a	2.97 ± 0.01 ^a	3.40 ± 0.18 ^b
2.00 mM	14.46 ± 0.29 ^c	19.00 ± 0.68 ^b	3.28 ± 0.39 ^a	5.29 ± 0.43 ^a
P	***§	***	ns	**
'Kosaco'	20.61 ^{a‡}		3.26 ^a	
'Josefina'	19.62 ^a		3.86 ^a	
P	ns		ns	
LSD _{0.05}	2.33		0.75	

[†] Values are means ± s.e. (*n* = 9) and differences between means were compared using Duncan's test (*P* = 0.05).

[‡] Values are means (*n* = 27) and differences between means were compared using LSD test (*P* = 0.05).

[§] Levels of significance are represented by ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 and ns (not significant, *P* > 0.05).

while inducing SOD and peroxidase activities in leaves (Molassiotis *et al.*, 2006). However, in grape, Gunes *et al.* (2006) have reported that B toxicity augments CAT and SOD activity at the same time as it diminishes that of APX.

The regeneration of ascorbate is also a process of great importance in the antioxidant response. This process involves the enzymes MDHAR, DHAR and GR, which are situated in most cellular compartments (Ishikawa *et al.*, 2006). In the present study the activity of these enzymes increased significantly with 2 mM B in both cultivars (Fig. 3). Recently, it has been suggested that over-expression of MDHAR might both affect ascorbate accumulation and raise the redox status of ascorbate towards reduction, because MDHAR functions upstream of DHAR in the ascorbate recycling pathway (Ishikawa *et al.*, 2006). We found that with 0.5 and 2 mM B, MDHAR increased more than 50% in both cultivars (Fig. 3). By contrast, both MDHAR and DHAR may still be a limiting factors for the accumulation of reduced

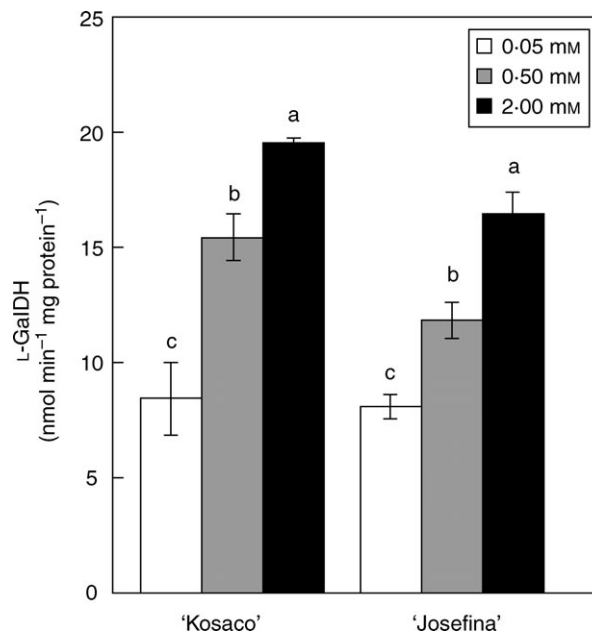


FIG. 4. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mM) on L-GalDH activity in leaves of two tomato cultivars: 'Kosaco' and 'Josefina'. Bars represent means ± s.e. (*n* = 9); for each cultivar, bars followed by the same letters are not significantly different using Duncan's test (*P* = 0.05).

ascorbate in leaves, as the redox status decreased with B toxicity in both cultivars (Table 4). There are only a few previous studies that describe the effect of B toxicity on the enzymes of the Halliwell–Asada cycle. In loquat (*Eriobotrya japonica*), grown under high salinity, an increase of B concentration from 0.01 to 0.2 mM in the culture medium significantly inhibited MDHAR activity but stimulated that of DHAR (López-Gómez *et al.*, 2007), indicating that B can affect the activity of these enzymes under stress conditions. Similar to the results here, B stress increased GR activity in barley (Karabal *et al.*, 2003).

In addition, the response of AO activity to B toxicity was measured. This glycoprotein, found in the cell wall, has functions that are still not well understood, although it

TABLE 7. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2 mM) on glucose, fructose and sucrose concentration in leaves of two tomato cultivars ('Kosaco' and 'Josefina')

	Glucose (mg g ⁻¹ FW)		Fructose (mg g ⁻¹ FW)		Sucrose (mg g ⁻¹ FW)	
	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'	'Kosaco'	'Josefina'
0.05 mM	0.77 ± 0.05 ^{b†}	0.27 ± 0.17 ^c	1.18 ± 0.04 ^c	0.86 ± 0.17 ^c	0.81 ± 0.05 ^c	0.82 ± 0.02 ^c
0.50 mM	0.69 ± 0.03 ^b	0.68 ± 0.03 ^b	1.45 ± 0.01 ^b	1.39 ± 0.03 ^b	1.06 ± 0.01 ^b	1.14 ± 0.01 ^b
2.00 mM	2.58 ± 0.01 ^a	2.75 ± 0.01 ^a	4.46 ± 0.04 ^a	4.60 ± 0.10 ^a	1.61 ± 0.01 ^a	1.33 ± 0.03 ^a
P	***§	***	***	***	***	***
'Kosaco'	1.35 ^{a‡}		2.36 ^a		1.16 ^a	
'Josefina'	1.24 ^a		2.28 ^a		1.10 ^a	
P	ns		ns		ns	
LSD _{0.05}	0.20		0.17		0.10	

[†] Values are means ± s.e. (*n* = 9) and differences between means were compared using Duncan's test (*P* = 0.05).

[‡] Values are means (*n* = 27) and differences between means were compared using LSD test (*P* = 0.05).

[§] Levels of significance are represented by ****P* < 0.001 and ns (not significant, *P* > 0.05).

appears to be linked to the maintenance of the proper redox status in the apoplast and therefore to ASA oxidation to MDHA (Pignocchi *et al.*, 2003). In the current study, the behaviour of the soluble AO fraction was similar in both cultivars, reaching its maximum activity under 0.5 mM B (Table 6). By contrast, when the cell-wall-bound fraction was analysed, a significant increase was found only in 'Josefina', although, independently of the treatments, no significant differences were found between the two cultivars (Table 6). Although there are no earlier studies on the effect of B toxicity on AO activity, it has been observed that the activity of this enzyme is induced under other types of stress, for example high temperature or strong solar radiation (Rosales *et al.*, 2006). Recent studies on transgenic plants with altered AO activity indicate that this enzyme could affect adaptation to stress by leading to H₂O₂ accumulation in the apoplast (Sanmartin *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2005). In the present study, although a certain effect of B toxicity was detected on AO activity, it remains difficult to associate H₂O₂ levels with the behaviour of this enzyme.

The effect of B toxicity on ascorbate synthesis in plants has not yet been established. In the mannose–galactose pathway, ascorbate is produced from hexoses and by the oxidation of L-galactose, a process involving the enzyme L-GalDH (Ishikawa *et al.*, 2006). In the present experiments, analysis of the glucose, fructose and sucrose concentrations (the early precursors in ascorbate biosynthesis) revealed increases in these sugars under B toxicity without significant differences between 'Kosaco' and 'Josefina' (Table 7). It has been suggested that the accumulation of soluble carbohydrates in leaves is necessary to alleviate the toxicity symptoms of high B concentrations (Yokota and Konishi, 1990). As under other types of stress, this accumulation of soluble sugars appears to be due to a limitation of their use by some metabolic processes involved in plant growth in favour of others that help to combat oxidative stress, as might be the case with ascorbate synthesis. In agreement with the present study, Keles *et al.* (2004) reported that in orange plants excess B in the medium boosted the concentration of ascorbate as well as that of glucose and fructose. In terms of L-GalDH activity, the results show that this enzyme increased with the B toxicity treatments in both cultivars (Fig. 4). Increased L-GalDH activity, along with an increased supply of sugar precursor, could indicate a higher capacity for ascorbate synthesis. Furthermore, improved recycling in the Halliwell–Asada cycle could also stabilize and increase the ascorbate pool during B toxicity.

In conclusion, the present study shows that high B concentrations in the culture medium provoke oxidative damage in leaves of tomato, inducing a general response of antioxidant enzymes. The data also suggest that non-enzymatic antioxidant activity, by synthesizing molecules such as glutathione and ascorbate, could present a protective function against oxidative stress by B. In this sense, B toxicity results in an important effect on the ascorbate pool, on an enzyme involved in ascorbate metabolism (L-GalDH) and on enzymes of the Halliwell–Asada cycle. This work therefore provides a basis for understanding

the role of ascorbate and other antioxidants in the response to B toxicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Plan Nacional de I + D + i of Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (AGL2006-03164/AGR).

LITERATURE CITED

- Bellaloui N, Brown PH. 1998.** Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Plant and Soil* **198**: 153–158.
- Benzie IEF, Strain JJ. 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* **239**: 70–76.
- Beyer WF, Fridovitch I. 1987.** Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* **161**: 559–566.
- Blevins DG, Lukaszewski KM. 1998.** Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 481–500.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003.** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179–194.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Brown PH, Bellaloui N, Wimmer MA, Bassil ES, Ruiz J, Hu H, et al. 2002.** Boron in plant biology. *Plant Biology* **4**: 205–223.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004.** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* **74**: 2157–2184.
- Foyer CH, Dujardin M, Lemoine Y. 1989.** Responses of photosynthesis and the xanthophyll and ascorbate–glutathione cycle to changes in irradiances, photoinhibition and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry* **27**: 751–760.
- Fu J, Huang B. 2001.** Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* **45**: 105–114.
- García-Pineda E, Castro-Mercado E, Lozoya-Gloria E. 2004.** Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) ascorbate oxidase during elicitor and wounding stress. *Plant Science* **166**: 237–243.
- Gatzek S, Wheeler GL, Smirnov N. 2002.** Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant Journal* **30**: 541–553.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977.** Superoxide dismutase occurrence in higher plants. *Plant Physiology* **59**: 309–314.
- Gossett DR, Millhollon EP, Lucas MC. 1994.** Antioxidants responses to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* **34**: 706–714.
- Gunes A, Alpaslan M, Cikili Y, Ozcan H. 1999.** Effect of zinc on the alleviation of boron toxicity in tomato. *Journal of Plant Nutrition* **22**: 1061–1068.
- Gunes A, Soylemezoglu G, Inal A, Bagci EG, Coban S, Sahin O. 2006.** Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **110**: 279–284.
- Hayes JE, Reid RJ. 2004.** Boron tolerance in barley is mediated by efflux of boron from the roots. *Plant Physiology* **136**: 3376–3382.
- Heath RL, Packer L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 189–198.
- Inzé D, Van Montagu M. 1995.** Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: 153–158.
- Ishikawa T, Dowdle J, Smirnov N. 2006.** Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum* **126**: 343–355.

- Karabal E, Yücel M, Ökte HA. 2003. Antioxidants responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science* **164**: 925–933.
- Keles Y, Öncel I, Yenice N. 2004. Relationship between boron content and antioxidant compounds in *Citrus* leaves taken from fields with different water source. *Plant and Soil* **265**: 345–353.
- López-Gómez E, San Juan MA, Diaz-Vivancos P, Mataix Beneyto J, García-Legaz MF, Hernández JA. 2007. Effect of rootstocks grafting and boron on the antioxidant systems and salinity tolerance of loquat plants (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Environmental and Experimental Botany* **60**: 151–158.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405–410.
- Molassiotis A, Sotiropoulos T, Tanou G, Diamantidis G, Therios I. 2006. Boron induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh.). *Environmental and Experimental Botany* **56**: 54–62.
- Mondy NI, Munshi CB. 1993. Effect of boron on enzymatic discoloration and phenolic and ascorbic acid contents of potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**: 554–558.
- Mukherjee SP, Choudhuri MA. 1983. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum* **58**: 166–170.
- Nable OR, Bañuelos GS, Paull JG. 1997. Boron toxicity. *Plant and Soil* **193**: 181–198.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology* **22**: 867–880.
- Noctor G, Foyer C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249–279.
- Parks JL, Edwards M. 2005. Boron in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **35**: 81–114.
- Paull JG, Nable RO, Rathjen AJ. 1992. Physiological and genetic control of the tolerance of wheat to high concentrations of boron and implications for plant breeding. *Plant and Soil* **146**: 251–260.
- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH. 2003. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology* **132**: 1631–1641.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. 1996. Ultraviolet-B radiation and ozone-induced biochemical changes in the antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**: 125–136.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes: salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiology* **115**: 137–149.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**: 1231–1237.
- Reid RJ, Hayes JE, Post A, Stangoulis JCR, Graham RD. 2004. A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant Cell and Environment* **25**: 1405–1414.
- Rosales MA, Ruiz JM, Hernández J, Soriano T, Castilla N, Romero L. 2006. Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 1545–1551.
- Ruiz JM, Blumwald E. 2002. Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus*. *Planta* **214**: 965–969.
- Ruiz JM, Rivero RM, Romero L. 2003. Preliminary studies on the involvement of biosynthesis of cysteine and glutathione in the resistance to boron toxicity in sunflower plants. *Plant Science* **165**: 811–817.
- Sanmartin M, Drogoudi PD, Lyons T, Pateraki I, Barners J, Kanellis AK. 2003. Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* **216**: 918–928.
- Smirnoff N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 229–235.
- Sotiropoulos TE, Molassiotis A, Almaliotis D, Mouhtaridou G, Dimassi K, Therios I, Diamantidis G. 2006. Growth, nutritional status, chlorophyll content, and antioxidant responses of the apple rootstock MM 111 shoots cultured under high boron concentrations *in vitro*. *Journal of Plant Nutrition* **29**: 575–583.
- Wolf B. 1974. Improvement in the Azomethine-H method for determination of boron. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **5**: 39–44.
- Yamamoto A, Bhuiyan MNH, Waditee R, Tanaka Y, Esaka M, Oba K, et al. 2005. Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1785–1796.
- Yokota H, Konishi S. 1990. Effect of the formation of sugar borate complex on the growth inhibition of pollen tubes of *Camellia sinensis* and culture cells of *Nicotiana tabacum* by toxic levels of borate. *Soil Science and Plant Nutrition* **36**: 275–281.
- Yu Q, Osborne L, Rengel Z. 1998. Micronutrient deficiency changes activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco plants. *Journal of Plant Nutrition* **21**: 1427–1437.



Involvement of lignification and membrane permeability in the tomato root response to boron toxicity

L.M. Cervilla*, M.A. Rosales, M.M. Rubio-Wilhelmi, E. Sánchez-Rodríguez, B. Blasco, J.J. Ríos, L. Romero, J.M. Ruiz

Department of Plant Physiology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2008
Received in revised form 17 January 2009
Accepted 21 January 2009
Available online 30 January 2009

Keywords:

Boron toxicity
Lignification
Membrane permeability
Oxidative stress
Peroxidase activity
Tomato roots

ABSTRACT

To gain an insight into the role of lignification and membrane permeability in the root response to boron (B) toxicity, lignification-related enzymes and a number of physiological and oxidative stress parameters were analyzed in two tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars (Kosaco and Josefina) subjected to 0.05 (control), 0.5 and 2 mM B during 16 days. 2 mM B supply inhibited root growth and increased the root B concentration in both tomato cultivars. Although excess B increased the hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration in Kosaco, no major changes were observed in other oxidative-stress-related parameters. High levels of B supply also induced higher lignin deposition in Kosaco roots but did not in Josefina ones. The latter result was associated with an increase of the polyphenol oxidase (PPO), guaiacol peroxidase (GPOX) and soluble syringaldazine peroxidase (SPOX) activity in Kosaco roots. Boron toxicity did not induce lipid peroxidation but increased the leakage of K⁺ and the passive efflux of B in tomato roots. We conclude that high concentrations of B do not cause major oxidative or membrane damage in tomato roots. The data also indicate that high levels of B supply induce a higher lignin deposition in Kosaco roots but not in Josefina ones. This phenomenon suggests that lignification is not an essential factor reducing root growth in tomato plants, however, it proves that exist a high genotypic variation in response to excess B at root level.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Boron (B) is an essential nutrient for vascular plants, but in high concentrations it is toxic and limits crop productivity. When plants are exposed to B toxicity, it will cause reduction of leaf area, formation of chlorotic and necrotic patches in older leaves, delay of development and inhibition of plant growth [1]. It has long been known that the optimum B level for one species could be either toxic or insufficient for other species [2]. Researchers have identified a range of genotypic variation in response to B toxicity with mechanisms including B exclusion [3] and an inherent ability to tolerate high B levels in plant tissues [4].

Although visible symptoms of B toxicity do not seem to develop in roots [1], plants subjected to B toxicity show a reduction of root growth compared to that of plants grown at optimal levels of B supply [5–7]. Boron toxicity is associated with abnormal cell division in the root meristem [8]. In wheat (*Triticum aestivum* L.), Reid et al. [9] reported that rapid inhibition of root growth

occurred when high B was applied to the root tip, but not when high B was applied to mature sections of the root. In soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), it was shown that inhibition of root growth by excess of B occurred as a result of the formation of hypodermis and the progressive deposition of suberin in cortical cell walls [10]. The latter phenomenon was suggested as a relevant strategy of the plant by which the radial transport of water and B toward conductive tissues was hindered. More recently, Choi et al. [11] reported that B tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) could be associated with root morphological changes and a complex control of sucrose levels between leaf and root tip that assist in maintaining root growth. All these observations prove the importance of root in the plant response to B stress.

Lignins are cell wall phenolic heteropolymers which result from the oxidative coupling of monolignols in a reaction mediated by peroxidases (EC 1.11.1.7) [12]. The incorporation of lignin into cell walls provides structural rigidity and durability to plant tissues. A number of biotic and abiotic stresses are responsible for the increase in cell wall lignification which may have a negative effect on root elongation by reducing cell wall extensibility [13]. High activation of lignifying enzymes and lignin deposition by aluminium (Al) toxicity has been suggested as an Al-induced

* Corresponding author.

E-mail address: lmcerv@ugr.es (L.M. Cervilla).

injurious symptom which leads to reduced root growth [14]. Nevertheless, it has been reported that lignification may be a mechanism for adaptation to stress. In copper (Cu) or cadmium (Cd) enriched environments lignification is considered to be a part of the defence reaction which reduces metal entry into plant tissue [15,16]. However, little is known about the role of lignification in B-stressed roots and therefore more data are required. On the other hand, it may be important to analyze the effects of B toxicity on the membrane permeability, since passive transport across cell membrane is the most important mechanism of B uptake in plants and a possible role for B in cell membrane has been suggested [17]. In addition, whereas some studies have shown that B toxicity causes oxidative stress in leaf cells [7,18,47], it is not clear whether B toxicity produce oxidative burst and membrane damage at root level.

In view of the above, the purpose of this study was to gain an insight into the role of lignification and membrane permeability in the root response to B toxicity. The experiments were focused on two tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars, which, in our previous research, these cultivars showed increase in their leaf antioxidants response against oxidative stress triggered by B in a way similar to other plants.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Cultivars Kosaco and Josefina from tomato (*S. lycopersicum* L.) were used in the present study according to previous studies in our laboratory [18]. Seeds of the two cultivars were germinated and grown for 30 days in cell flats (cell size, 3 cm × 3 cm × 10 cm) filled with a peatlite mixture, and the flats were placed on benches in an experimental greenhouse in southern Spain (Granada, Saliplant S.L.). The 30-day-old seedlings were transferred to a controlled environmental chamber with relative humidity of 60–80%, temperature 25 °C/15 °C (day/night), and 16 h/8 h photoperiod at a PPF (photosynthetic photon-flux density) of 350 μmol m⁻² s⁻¹ (measured at the top of the plants with a 190SB quantum sensor, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Plants were grown in individual pots (25 cm upper diameter, 17 cm lower diameter, 25 cm in height) of 8 L volume, filled with vermiculite. Throughout the experiment, the plants were grown in a nutrient solution containing: 4 mM KNO₃, 3 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 2 μM MnCl₂, 1 μM ZnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 0.1 μM Na₂MoO₄, 5 μM Fe-EDDHA and 0.05 mM H₃BO₃. The nutrient solution (pH 5.8) was renewed every 3 days and the vermiculite partly rinsed with Millipore-filtered water in order to avoid nutrient accumulation. The B treatments (0.50 mM and 2.00 mM H₃BO₃) were started 42 days after sowing and maintained for 16 days. The control treatment received the complete nutrient solution alone (0.05 mM B). The experimental design was a randomized complete block with three treatments, arranged in individual pots with six plants per treatment, and three replicates. The experiment was repeated three times under the same conditions (*n* = 9).

2.2. Plant sampling and determination of relative root growth rate

To determine the relative root growth rate (RGR_r), roots from three plants per cultivar were sampled 42 days after sowing, immediately before the start of the B treatment (*T*_i). The roots were dried in a forced-air oven at 70 °C for 24 h, and dry weight (DW) was recorded per plant. The remaining plants were sampled 46 (day 4 of treatments), 50 (day 8 of treatments) and 58 days after sowing (day 16 of treatments, *T*_F), then the corresponding roots were used for assays of malondialdehyde (MDA), superoxide anion

(O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂), lipoxygenase (LOX; 1.13.11.12), polyphenol oxidase (PPO; EC 1.14.18.1), guaiacol peroxidase (GPOX) and syringaldazine peroxidase (SPOX). Sampled roots after 16 days of treatments were also used to determine DW; boron, soluble phenols and lignin concentration; activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4.3.1.5); membrane permeability; and efflux of B in the presence or absence of (a metabolic inhibitor). To calculate the shoot/root DW ratio, shoots were dried in a forced-air oven at 70 °C for 24 h and then the shoot DW was recorded as g of DW per plant. The RGR_r was calculated from the increase in root DW at the beginning and at the end of the B treatment, using the equation $RGR_r = (\ln DW_F - \ln DW_i) / (T_F - T_i)$ where *T* is the time and the subscripts denote the first and last sampling (i.e. 0 and 16 days after the B treatment, respectively) [19].

2.3. Analysis of boron concentration in roots

The total B concentration was analyzed after digestion of 0.15 g dried and milled root material with H₂SO₄ (5 mL at 98%) and H₂O₂ (30%). For free B extraction, a batch of 1 g of fresh roots cut into 1 mm fragments were placed in a test tube containing 5 mL propanol 1%, then subjected to vacuum for 35 min, and then was filtered [18]. To measure B concentration, the azomethine-H method was followed and the absorbance was measured by a spectrophotometer (Infinite 200 Nanoquant, Tecan, Switzerland) at 410 nm [20]. The total B concentration was expressed as μg g⁻¹ DW and free B as μg g⁻¹ FW.

2.4. Determination of O₂^{•-}, H₂O₂, MDA, soluble phenols and lignin

The detection of O₂^{•-} was based on its ability to reduce nitro blue tetrazolium (NBT) [21] and measured as described by Kubis [22]. A batch of 0.1 g of fresh roots were cut into 1 mm fragments and immersed in 10 mM K-phosphate buffer, pH 7.8, containing 0.05% (w/v) NBT and 10 mM sodium azide (NaN₃), and left for 1 h at room temperature. After incubation, 2 mL of the reaction solution was heated at 85 °C for 15 min and cooled rapidly. Optical density was measured at a wavelength of 580 nm and the O₂^{•-} content was expressed as an increase of absorbance g⁻¹ FW. The H₂O₂ content of root samples was colorimetrically measured as described by Mukherjee and Choudhuri [23]. Root samples were extracted with cold acetone to determine the H₂O₂ levels. An aliquot (1 mL) of the extracted solution was mixed with 200 μL of 0.1% titanium dioxide in 20% (v/v) H₂SO₄ and the mixture was then centrifuged at 6000 × *g* for 15 min. The intensity of yellow colour of the supernatant was measured at 415 nm. The H₂O₂ concentration was calculated from a standard curve plotted within the range of 100–1000 nmol H₂O₂. For the MDA assay, roots were homogenized in 5 mL of 50 mM solution containing 0.07% of NaH₂PO₄·2H₂O and 1.6% Na₂HPO₄·12H₂O, with a mortar and pestle, and centrifuged at 20,000 × *g* for 25 min in a refrigerated centrifuge. For measurement of MDA concentration, 4 mL of 20% trichloroacetic acid containing 0.5% thiobarbituric acid was added to a 1 mL aliquot of the supernatant. The mixture was heated at 95 °C for 30 min and then quickly cooled in an ice bath. After the tube was centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min, the absorbance of the supernatant was read at 532 nm. The value for the nonspecific absorption at 600 nm was subtracted from the 532 nm reading. The concentration of MDA was calculated using the MDA extinction coefficient of 155 mM⁻¹ cm⁻¹ [24,25]. Total soluble phenolics content was determined by the Folin-Ciocalteu method [26] and expressed as caffeic acid equivalents in mg g⁻¹ FW. Lignin was extracted and measured by the method of Bruce and West [27]. Two grams of roots were homogenized in 6 mL of 99.5% ethanol and the extract was centrifuged at 10,000 × *g* for 15 min. The pellets were

transferred to glass Petri dishes and air-dried over night. Ten milligrams of dried residues were placed in screw-cap tubes, and 1 mL of 2N HCl and 0.1 mL of thioglycolic acid were added to each. The sealed tubes were heated at 100 °C for 12 h. After cooling, the contents were centrifuged at 14,000 × g for 30 min at 4 °C. The pellet was washed once with 1 mL of water and centrifuged at 14,000 × g for 30 min at 4 °C, then resuspended in 1 mL of 2.5N NaOH. The solution was agitated gently at 25 °C for 18 h. After centrifugation at 14,000 × g for 30 min, the supernatant was transferred to a 2 mL plastic tube. One milliliter of concentrated HCl was added to the eppendorf tube and the lignin thioglycolate was allowed to precipitate at 4 °C for 6 h. After centrifugation at 14,000 × g for 30 min, pellets were dissolved in 1 mL of 0.5N NaOH. The absorbance was measured against a NaOH blank at 280 nm. The amount of lignin was calculated from a linear calibration curve (0–20 µg) with commercial alkali lignin (Sigma–Aldrich).

2.5. Enzyme assays

Lipoxygenase activity was determined according to Minguez-Mosquera et al. [28], using 50 mM K-phosphate buffer (pH 6.0) for extraction. The reaction mixture consisted of 25 µL of crude extract and 200 µL of 0.5 mM linoleic acid in 50 mM K-phosphate buffer (pH 6.0). The LOX activity was calculated following changes in absorbance at 234 nm. LOX activity was expressed as $\Delta A_{234} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. PPO and GPOX activity were determined following a modified version of Cara et al. [29] using 100 mM K-phosphate buffer (pH 7) for extraction. PPO was followed by monitoring the disappearance of caffeic acid by enzyme oxidation at 370 nm in a reaction mixture containing 30 µL of enzyme extract and 560 µL of 10 mM caffeic acid in 100 mM K-phosphate buffer (pH 7). PPO activity was expressed as $\Delta A_{370} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. The activity of GPOX was determined by monitoring guaiacol oxidation at 485 nm in a reaction mixture (550 µL) containing 40 µL of enzyme extract, 0.02% guaiacol (v/v) and 2.5 mM H₂O₂ in 100 mM K-phosphate buffer (pH 7). GPOX activity was expressed as $\Delta A_{485} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. SPOX was extracted and measured in two fractions by a modified version of Ghanati et al. [10]. Roots were homogenized using 100 mM Na-acetate buffer (pH 6) and centrifuged at 18,000 × g for 15 min. Supernatant was used to assay soluble SPOX. Pellets were washed using Na-acetate buffer, incubated with 0.2 M CaCl₂ for 2 h at 4 °C and centrifuged at 18,000 × g. The resulting supernatant was used to determine the activity of ionically wall-bound enzyme (SPOX-CW). The reaction mixture (800 µL) consisted of crude enzyme, 5 µM syringaldazine and 16 mM H₂O₂ and 100 mM Na-acetate buffer (pH 6). SPOX activity was measured by monitoring changes in absorbance at 530 nm. SPOX activity was expressed as $\Delta A_{530} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. PAL activity was determined according to Rivero et al. [30] using 50 mM K-phosphate buffer (pH 7)

containing 5% polyvinylpyrrolidone (w/v), 50 mM Na-ascorbate, 18 mM mercaptoethanol and 0.1% (v/v) Triton X-100 for extraction. The reaction mixture (520 µL) consisted of crude enzyme, 11 mM L-phenylalanine and 0.06 M Na-borate buffer (pH 8.8). Reaction was carried out in eppendorf tubes, incubated at 30 °C for 60 min and stopped by the addition of 35% (w/v) trifluoroacetic acid. PAL activity was measured by monitoring the yield of cinnamic acid at 290 nm and the enzyme activity expressed as $\Delta A_{290} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. The protein concentration of the enzyme extracts was determined by the Bradford method [31], using bovine serum albumin as a standard.

2.6. Measurements of membrane permeability and efflux of boron

Measurement of membrane permeability was determined according to the method of Cakmak et al. [32]. Fresh roots were gently rinsed in distilled water, and then transferred to 50 mL glass vessels containing aerated double-distilled water (ddH₂O). Similarly, to determine the efflux of B in the presence of a metabolic inhibitor, in a separate experiment, fresh roots were transferred to glass vessels containing ddH₂O at pH 5.5 (control) or 0.5 mM NaN₃ (metabolic inhibitor). The experiments were carried out in darkness and at room temperature. At 1 h after transfer, small aliquots of the incubation solutions were sampled, and the followings were determined: concentration of K⁺ by atom absorption spectrometry [33], the sucrose concentration by the method of Irigoyen et al. [34], the amino acid concentration by the ninhydrin method of Yemm and Cocking [35], the phenolic concentration using Folin reagent [26], and the B concentration by the azomethine-H method [20]. Measurements were expressed as $\mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$.

2.7. Statistical analysis

The data were analyzed by a simple variance analysis (ANOVA) and differences between the means were compared by Fisher's least-significant difference test (LSD).

3. Results and discussion

Root growth did not change when plants were supplied with 0.5 mM B for 16 days (Table 1). However, root dry weight and RGR_r decreased in tomato plants subjected to 2 mM B (Table 1). Both cultivars also registered an increase in the shoot/root DW ratio and root B concentration (Table 1). A reduction in growth and increase of B concentration in roots as a consequence of B toxicity has previously been observed in wheat [6], barley [36], soybean [16] and grapevine (*Vitis vinefera* L.) [7]. Similar to our results, studies on wheat and barley have shown that root DW was affected more than shoot DW when plants were supplied with high levels of B [3,6].

Table 1

Root dry weight (DW), relative root growth rate (RGR_r), shoot/root DW ratio and boron concentration of two tomato cultivars (Kosaco and Josefina) subjected to 0.05 (control), 0.5 and 2 mM B during 16 days. Values are mean ± S.E. (n = 9) and differences between means were compared by Fisher's least-significant difference test (LSD; P = 0.05). Means followed by the same letter do not differ significantly.

Cultivar/boron	Root dry weight (g)	RGR _r (g g ⁻¹ day ⁻¹)	Shoot/root DW ratio	Total boron (µg g ⁻¹ DW)	Free boron (µg g ⁻¹ FW)
cv. Kosaco					
0.05 mM	0.43 ± 0.01 a	0.166 ± 0.005 a	22.77 ± 0.31 b	51.99 ± 14.08 c	1.40 ± 0.51 b
0.50 mM	0.48 ± 0.01 a	0.162 ± 0.005 a	23.35 ± 0.26 b	132.67 ± 11.05 b	4.51 ± 0.99 a
2.00 mM	0.23 ± 0.04 b	0.098 ± 0.003 b	29.67 ± 0.33 a	196.06 ± 6.87 a	4.91 ± 0.68 a
LSD _{0.05}	0.07	0.014	0.91	38.30	2.27
cv. Josefina					
0.05 mM	0.45 ± 0.02 a	0.152 ± 0.004 a	22.78 ± 0.35 b	47.50 ± 8.16 c	2.03 ± 0.63 b
0.50 mM	0.41 ± 0.01 a	0.136 ± 0.005 a	23.21 ± 0.28 b	97.48 ± 6.07 b	3.29 ± 0.81 b
2.00 mM	0.22 ± 0.03 b	0.098 ± 0.002 b	29.19 ± 0.27 a	204.12 ± 21.04 a	5.85 ± 0.68 a
LSD _{0.05}	0.08	0.014	0.88	46.69	2.14

One of the most important mechanisms by which plants are damaged during adverse environmental conditions is the excess production of reactive oxygen species (ROS), such as $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 [37]. In our experiment, B treatments did not cause significant

changes in $O_2^{\bullet-}$ production in Kosaco roots (Fig. 1A), whereas H_2O_2 concentration was increased after 16 days of treatments, as compared to the control plants (Fig. 1C). Josefina roots subjected to 0.5 and 2 mM B showed a slight decrease in the ROS production

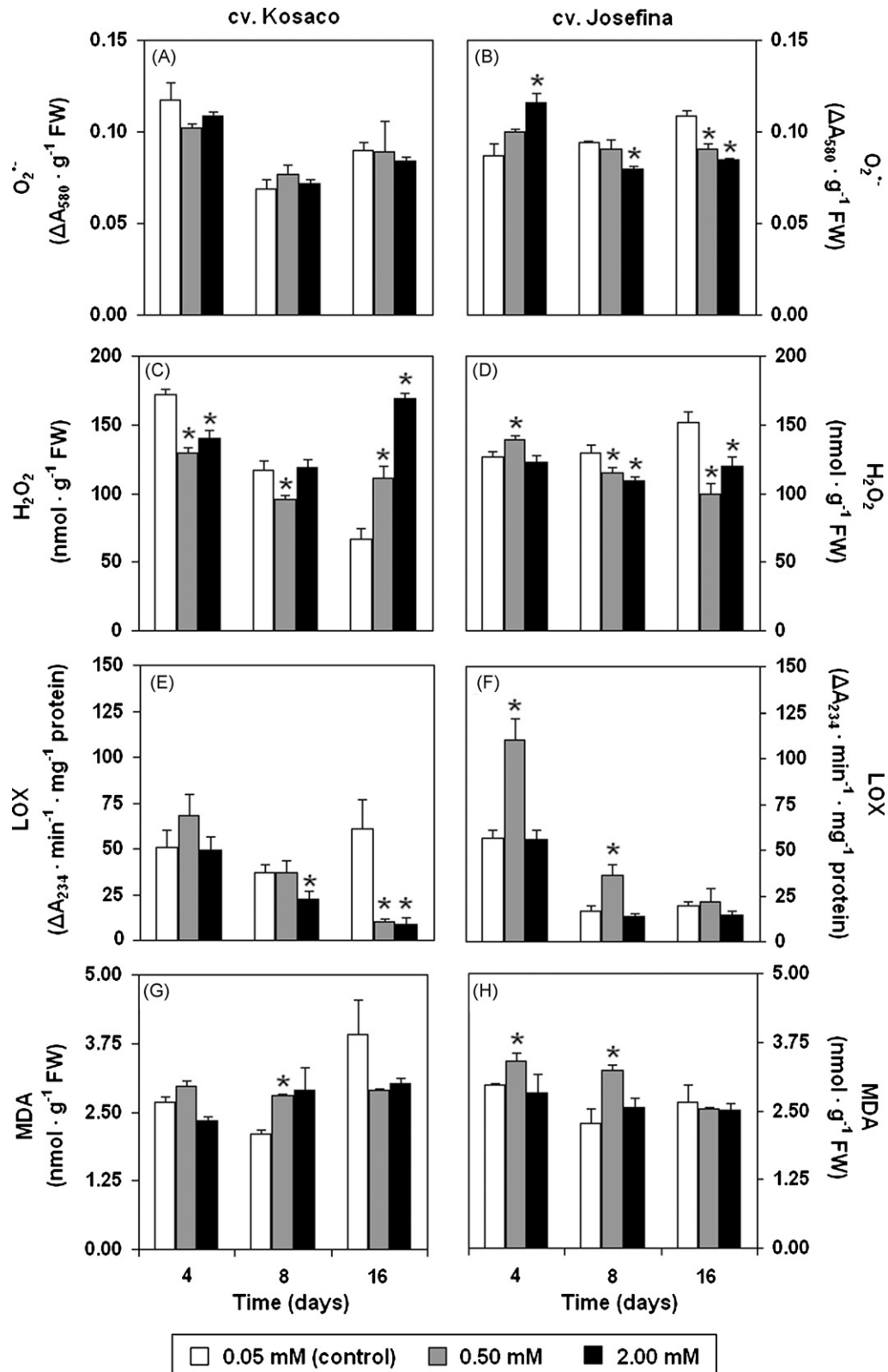


Fig. 1. Changes in (A and B) superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$; (C and D) hydrogen peroxide, H_2O_2 ; (E and F) lipoxygenase, LOX; and (G and H) malondialdehyde, MDA, in roots of two tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars (Kosaco and Josefina) subjected to 0.05 (control), 0.5 and 2 mM B for 16 days. Columns are mean \pm S.E. ($n = 9$) and differences between means were compared by Fisher's least-significant difference test (LSD; $P = 0.05$). Asterisk (*) indicates significant difference with control groups.

during the experiment (Fig. 1B and D). The analysis of lipid peroxidation expressed as LOX activity and MDA content also indicated the prevalence and activation of ROS in excess B-treated tissues [25]. In Kosaco roots, LOX activity was decreased after 16 days of treatments (Fig. 1E), whereas no major changes were observed in MDA (Fig. 1G), as compared to controls. Josefina roots grown with 0.5 mM B showed an increase of LOX activity and MDA at 4 and 8 days of treatments but no changes were observed in roots grown with 2 mM B (Fig. 1F and H). Recent research in our laboratory showed that excess B caused oxidative stress in leaves of both tomato cultivars [18]. However, except for the H₂O₂ concentration in Kosaco, high levels of B supply did not produce major changes denoting oxidative stress in tomato roots after 16 days of treatments. It is well known that when plants are grown under high B levels, the B concentration in roots remains relatively low compared to those in leaves [1]; therefore it is possible that the B accumulation in roots is insufficient to trigger oxidative damage at root level. Similar to our results, Karabal et al. [36] did not observe changes neither in ROS levels nor in lipid peroxidation of barley roots subjected to B toxicity.

Lignin concentration increased in Kosaco roots grown during 16 days with high levels of B supply (Table 2). Nevertheless, lignin concentration was slightly decreased by excess B in Josefina roots (Table 2). Several metabolic processes make use of ROS in a beneficial way, e.g. H₂O₂ and O₂^{•−} are involved in lignin formation in cell walls during defence response to pathogens [38]. The intrinsic accumulation of H₂O₂ under water-deficit stress was suggested as a signalling molecule triggering lignification [39]. In this sense, our results show a positive correlation between H₂O₂ and lignin concentration in tomato roots subjected to excess B. ROS have also been suggested to be involved in the signalling between stress perception and PAL expression [40]. PAL is considered to be responsible for the conversion of L-phenylalanine to trans-cinnamic acid, a key intermediate in the biosynthesis pathways of phenolics and lignin [16,30]. In our experiment, although both tomato cultivars showed an increase of PAL activity when were grown under high levels of B (Table 2), no relationship was observed between soluble phenol concentration and PAL activity (Table 2). PAL can be regulated by its product [48], therefore the low concentration of soluble phenols in tomato roots could have contributed to increase the PAL activity. Moreover, according to Ghanati et al. [10], induction of PAL activity by B toxicity could affect the content of wall bound phenolics. Other enzyme usually involved in phenol and lignin metabolism is the PPO, which catalyses the oxidation of polyphenols and the hydroxylation of monophenols [30,39]. Compared to controls, the activity of this enzyme was significantly increased after 16 days of treatments in Kosaco roots supplied with 2 mM B (Fig. 2A), whereas was decreased in Josefina roots (Fig. 2B). The activity of this enzyme has previously been shown to increase in response to several abiotic stresses such as water-deficit, heat and heavy metals [30,39,41].

Peroxidases are of the enzymes which are most directly involved in lignin biosynthesis and catalyze the oxidative polymerization of the lignin precursors in the presence of H₂O₂ [12]. In our experiment, Kosaco roots grown in 2 mM B showed a higher GPOX activity after 8 days of treatments, as compared to controls (Fig. 2C). A decrease in the activity of soluble and ionically bound SPOX was observed at 4 days of treatments in Kosaco roots subjected to high levels of B supply (Fig. 2E and G). However, after 8 days, Kosaco roots grown with 2 mM B also showed a higher soluble SPOX activity, as compared to controls (Fig. 2E). In Josefina roots, although B toxicity did not cause a well-defined effect on peroxidase activity (Fig. 2D, F, and H), a higher soluble SPOX activity was observed when plants were supplied with 2 mM B during 16 days (Fig. 2F). SPOX activity was also shown to increase in soybean roots subjected to B toxicity [10]. In our study, data of H₂O₂, lignin, PPO, GPOX and SPOX analyzed together suggest that B toxicity induces lignification in Kosaco roots but does not in Josefina ones. This difference in lignification between tomato cultivars could denote a high genotypic variation in the response to excess B at root level. Genetic variation in lignification has also been shown in plant response to others stresses such as pathogens, salinity or Al toxicity [14,42,43]. Although we did not measure how supplied B was distributed between root and shoot, it is possible that the lower leaf B concentration in Kosaco than Josefina [18] is related to the differences in root lignification. In this sense, a relationship between lignosuberization of roots and reduction of water uptake and B uptake was suggested in soybean seedlings grown with high levels of B supply [10]. In any case, our results suggest that lignification is not an essential cause of the inhibition of root growth by B toxicity, since the declined growth in Josefina roots (Table 1) was not associated with a higher lignin deposition (Table 2).

The genetic differences in the susceptibility of plants to B deficiency or toxicity have been attributed in part to variability in the lipid composition of their membranes [44]. A number of studies demonstrate that B deficiency alters ion and solute flows across root cell plasma membranes [29], however, little information is available about the relationship between membrane permeability and B-stressed roots. In our experiment, both tomato cultivars showed an increase of K⁺ leakage when plants were supplied with 2 mM B (Table 3). Sucrose leakage increased in the Kosaco roots as well (Table 3). In a similar way, B was shown to increase membrane permeability to K⁺ in sunflower root cells as compared to deficient conditions [45]. Perhaps the B-induced increase in K⁺ leakage is related to a role of B in membrane structure and function, as suggested by previous studies [17]. Although B toxicity produced changes in the leakage of some solutes, data of lipid peroxidation (Fig. 1E–H) and leakage analyzed together suggest that B toxicity did not produce membrane damage in tomato roots. According to this

Table 2

Lignin, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and soluble phenol concentration in roots of two tomato cultivars (Kosaco and Josefina) subjected to 0.05 (control), 0.5 and 2 mM B during 16 days. Values are mean ± S.E. (n = 9) and differences between means were compared by Fisher's least-significant difference test (LSD; P = 0.05). Means followed by the same letter do not differ significantly.

Cultivar/boron	Lignin (mg g ⁻¹ DW)	PAL (ΔA ₅₃₀ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	Soluble phenols (mg caffeic acid g ⁻¹ FW)
cv. Kosaco			
0.05 mM	11.69 ± 0.21 c	0.043 ± 0.002 b	2.21 ± 0.04 a
0.50 mM	14.69 ± 0.46 b	0.063 ± 0.005 a	2.10 ± 0.02 b
2.00 mM	16.04 ± 0.25 a	0.054 ± 0.003 a	2.05 ± 0.02 b
LSD _{0.05}	0.95	0.009	0.08
cv. Josefina			
0.05 mM	12.89 ± 0.35 a	0.042 ± 0.002 b	2.16 ± 0.02 a
0.50 mM	9.96 ± 0.17 b	0.050 ± 0.001 ab	2.20 ± 0.02 a
2.00 mM	10.68 ± 0.19 b	0.056 ± 0.005 a	2.20 ± 0.01 a
LSD _{0.05}	0.73	0.010	0.06

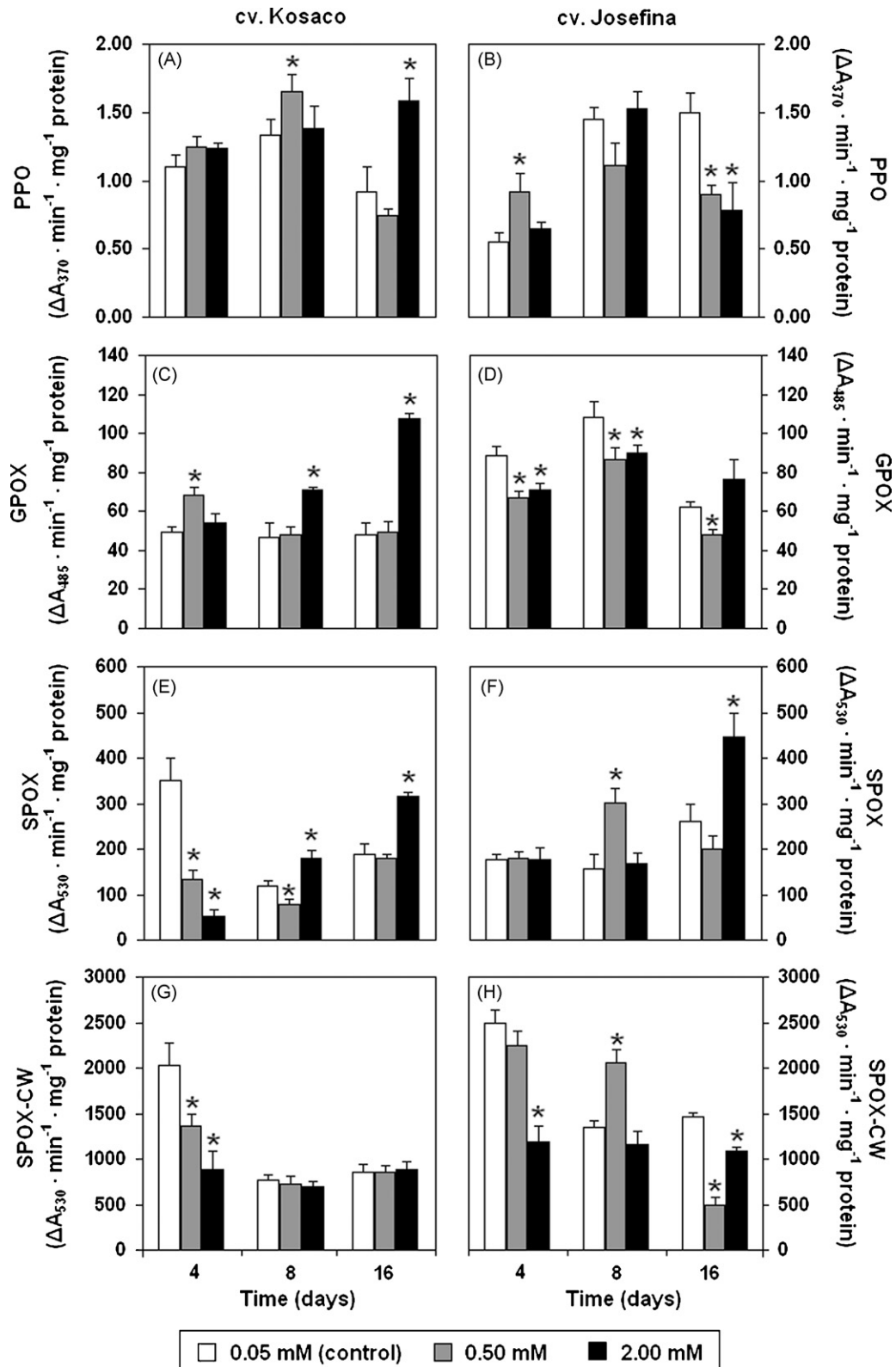


Fig. 2. Changes in the activity of (A and B) polyphenol oxidase, PPO; (C and D) guaiacol peroxidase, GPOX; (E and F) soluble syringaldazine peroxidase, SPOX; and (G and H) ionically wall-bound SPOX, SPOX-CW, in roots of two tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars (Kosaco and Josefina) subjected to 0.05 (control), 0.5 and 2 mM B for 16 days. Columns are mean \pm S.E. ($n = 9$) and differences between means were compared by Fisher's least-significant difference test (LSD; $P = 0.05$). Asterisk (*) indicates significant difference with control groups.

result, no membrane damage was observed in barley roots grown with high levels of B supply [36]. On the other hand, compared to control, both tomato cultivars showed a rapid B efflux when were grown with 0.5 or 2 mM B (Fig. 3A and B). This

effect occurred in a similar way when a metabolic inhibitor was applied (Fig. 3A and B). It is thought that under normal B supply, the transport of B occurs mainly by passive diffusion through plasma membrane, a process which varies depending on

Table 3

Leakage of different solutes in roots of two tomato cultivars (Kosaco and Josefina) subjected to 0.05 (control), 0.5 and 2 mM B during 16 days. Values are mean \pm S.E. ($n = 9$) and differences between means were compared by Fisher's least-significant difference test (LSD; $P = 0.05$). Means followed by the same letter do not differ significantly.

Cultivar/boron	Leakage ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$)			
	Amino acids	Phenolics	Sucrose	K ⁺
cv. Kosaco				
0.05 mM	0.75 \pm 0.04 a	0.56 \pm 0.02 a	0.59 \pm 0.04 b	3.05 \pm 0.06 b
0.50 mM	0.61 \pm 0.05 a	0.58 \pm 0.07 a	0.52 \pm 0.03 b	2.94 \pm 0.03 b
2.00 mM	0.62 \pm 0.06 a	0.65 \pm 0.04 a	0.95 \pm 0.07 a	4.20 \pm 0.04 a
LSD _{0.05}	0.16	0.14	0.16	0.16
cv. Josefina				
0.05 mM	0.83 \pm 0.03 b	0.66 \pm 0.03 b	0.89 \pm 0.08 a	3.43 \pm 0.05 b
0.50 mM	1.15 \pm 0.08 a	1.09 \pm 0.17 a	0.67 \pm 0.01 a	3.41 \pm 0.03 b
2.00 mM	0.70 \pm 0.07 b	0.98 \pm 0.17 ab	0.69 \pm 0.03 a	3.98 \pm 0.03 a
LSD _{0.05}	0.21	0.39	0.17	0.13

membrane composition, membrane origin and type of plant [17]. Our results suggest that, in tomato plants subjected to B toxicity, the efflux of B from root cells is closely conditioned by the root B concentration, as predicted by previous studies. Hayes and Reid [3] reported that a rapid efflux of B occurred in barley when roots (previously supplied with high B) were incubated in a B-free solution. Nevertheless, in a different experiment, the application of 5 mM B and 0.5 mM NaN₃ increased the root B concentration of the tolerant barley cultivar but not for the sensitive one [3]. In this sense, a number of studies have proved that an active efflux of B from the roots occurs in B-toxicity tolerant genotypes [46]. In the present work, results of root growth, B accumulation and efflux of B suggest that no active mechanisms of B exclusion probably exist in the analyzed tomato plants. It is in concordance with previous studies on

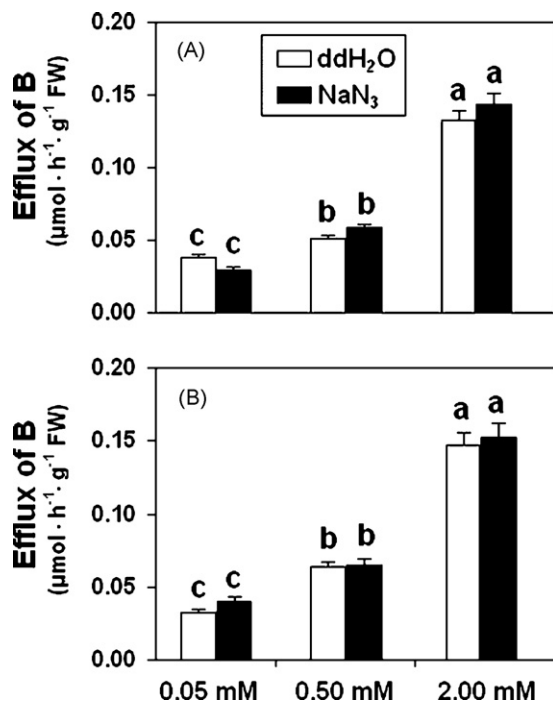


Fig. 3. Efflux of B assayed without (ddH₂O) or with metabolic inhibitor (NaN₃) in roots of two tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars. (A) Kosaco and (B) Josefina, subjected to 0.05 (control), 0.5 and 2 mM B for 16 days. Columns are mean \pm S.E. ($n = 9$) and differences between means were compared by Fisher's least-significant difference test (LSD; $P = 0.05$). Error bars represent S.E. Means followed by the same letter do not differ significantly.

tolerant barley cultivars maintaining root growth and low root B concentration against B toxicity [11,46].

In summary, based on the present work, it can be concluded that high levels of B supply produce inhibition of root growth in tomato plants, a process involving the membrane permeability to B. We also conclude that high concentrations of B do not cause major oxidative or membrane damage in tomato roots. In addition, our results show that excess B increases lignin deposition in Kosaco roots but does not in Josefina ones. This phenomenon suggests that lignification is not an essential factor reducing root growth in tomato plants, however, it proves that exist a high genotypic variation in response to excess B at root level. Finally, we think that the knowledge obtained in this paper provides a basis for a better understanding of the causes of B toxicity in plants.

Acknowledgement

This work was supported by Plan Nacional de I + D + i of Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (AGL2006-03164/AGR).

References

- [1] R.O. Nable, G.S. Bañuelos, J.G. Paull, Boron toxicity, *Plant Soil* 193 (1997) 181–198.
- [2] D.G. Blevins, K.M. Lukaszewski, Boron in plant structure and function, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 481–500.
- [3] J.E. Hayes, R.J. Reid, Boron tolerance in barley is mediated by efflux of boron from the roots, *Plant Physiol.* 136 (2004) 3376–3382.
- [4] A.A. Torun, A. Yazici, H. Erdem, I. Cakmak, Genotypic variation in tolerance to boron toxicity in 70 durum wheat genotypes, *Turk. J. Agric. For.* 30 (2006) 49–58.
- [5] R.O. Nable, Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: a preliminary examination of the resistance mechanism, *Plant Soil* 112 (1988) 45–52.
- [6] M. Kalayci, A. Alkan, I. Cakmak, O. Bayramoğlu, A. Yilmaz, M. Aydin, V. Ozbek, H. Ekiz, F. Ozberisoy, Studies on differential response of wheat cultivars to boron toxicity, *Euphytica* 100 (1998) 123–129.
- [7] A. Gunes, G. Soylemezoglu, A. Inal, E.G. Bagci, S. Coban, O. Sahin, Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity, *Sci. Hortic.* 110 (2006) 279–284.
- [8] D. Liu, W. Jiang, L. Zhang, L. Li, Effects of boron ions on root growth and cell division of broadbean (*Vicia faba* L.), *Isr. J. Plant Sci.* 48 (2000) 47–51.
- [9] R.J. Reid, J.E. Hayes, A. Post, J.C.R. Stangoulis, R.D. Graham, A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants, *Plant Cell Environ.* 25 (2004) 1405–1414.
- [10] F. Ghanati, A. Morita, H. Yokota, Deposition of *suberin* in roots of soybean induced by excess boron, *Plant Sci.* 168 (2005) 397–405.
- [11] E.-Y. Choi, P. Kolesik, A. McNeill, H. Collins, Q. Zhang, B.Y. Huynh, R. Graham, J. Stangoulis, The mechanism of boron tolerance for maintenance of root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Cell Environ.* 30 (2007) 984–993.
- [12] A.R. Barceló, L.V. Gómez Ros, C. Gabaldón, M. López-Serrano, F. Pomar, J.S. Carrión, M.A. Pedreño, Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution? *Phytochem. Rev.* 3 (2004) 61–78.
- [13] P. Shopfer, C. Lapiere, T. Nolte, Light-controlled growth of the maize seedling mesocotyl: mechanical cell-wall changes in the elongation zone and related changes in lignification, *Plant Physiol.* 111 (2001) 83–92.
- [14] K. Tahara, T. Yamanoshita, M. Norisada, I. Hasegawa, H. Kashima, S. Sasaki, K. Kojima, Aluminium distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminium resistance, *Plant Soil* 307 (2008) 167–178.
- [15] L. Ederli, L. Reale, F. Ferranti, S. Pasqualini, Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots, *Physiol. Plant.* 121 (2004) 66–74.
- [16] J. Kováčik, B. Klejdus, Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots, *Plant Cell Rep.* 27 (2008) 605–615.
- [17] P.H. Brown, N. Bellaloui, M.A. Wimmer, E.S. Bassil, J. Ruiz, H. Hu, H. Pfeffer, F. Dannel, V. Römhild, Boron in plant biology, *Plant Biol.* 4 (2002) 205–223.
- [18] L.M. Cervilla, B. Blasco, J.J. Ríos, L. Romero, J.M. Ruiz, Oxidative stress and antioxidants in tomato plants subjected to boron toxicity, *Ann. Bot.* 100 (2007) 747–756.
- [19] N. Bellaloui, P.H. Brown, Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*), *Plant Soil* 198 (1998) 153–158.
- [20] B. Wolf B, Improvement in the Azomethine-H method for determination of boron, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 5 (1974) 39–44.
- [21] N. Doke, Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and the hyphal wall components, *Physiol. Plant Pathol.* 23 (1983) 345–357.
- [22] J. Kubis, Exogenous spermidine differentially alters activities of some scavenging system enzymes, H₂O₂ and superoxide radical levels in water-stressed cucumber leaves, *J. Plant Physiol.* 165 (2008) 397–406.
- [23] S.P. Mukherjee, M.A. Choudhuri, Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings, *Physiol. Plant.* 58 (1983) 166–170.

- [24] R.L. Heath, L. Packer, Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.* 125 (1968) 189–198.
- [25] J. Fu, B. Huang, Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress, *Environ. Exp. Bot.* 45 (2001) 105–114.
- [26] V.L. Singleton, M. Salgues, J. Zaya, E. Trousdale, Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine, *Am. J. Enol. Vitic.* 36 (1985) 50–56.
- [27] R.J. Bruce, C.A. West, Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean, *Plant Physiol.* 91 (1989) 889–897.
- [28] M.I. Minguez-Mosquera, M. Jaren-Galen, J. Garrido-Fernandez, Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika, *Phytochemistry* 32 (1983) 1103–1108.
- [29] F.A. Cara, E. Sánchez, J.M. Ruiz, L. Romero, Is phenol oxidation responsible for the short-term effects of boron deficiency on plasma-membrane permeability and function in squash roots? *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 853–858.
- [30] R.M. Rivero, J.M. Ruiz, P.C. García, L.R. López-Lefebvre, E. Sánchez, L. Romero, Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants, *Plant Sci.* 160 (2001) 315–321.
- [31] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [32] I. Cakmak, H. Kurz, H. Marschner, Short-term effects of boron, germanium and high light intensity of membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower, *Physiol. Plant.* 95 (1995) 11–18.
- [33] P.J. Hocking, J.S. Pate, Mobilization of minerals to developing seeds of legumes, *Ann. Bot.* 41 (1977) 1259–1278.
- [34] J.J. Irigoyen, D.W. Emerich, M. Sanchez-Diaz, Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants, *Physiol. Plant.* 84 (1992) 55–60.
- [35] E.W. Yemm, E.C. Cocking, The determination of amino acids with ninhydrin, *Analyst* 80 (1955) 209–213.
- [36] E. Karabal, M. Yücel, H.A. Ökte, Antioxidants responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity, *Plant Sci.* 164 (2003) 925–933.
- [37] R. Mittler, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 405–410.
- [38] D. Inzé, M. Van Montagu, Oxidative stress in plants, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6 (1995) 153–158.
- [39] R.B. Lee, K.Y. Kim, W.J. Jung, J.C. Avice, A. Ourry, T.H. Kim, Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.), *J. Exp. Bot.* 58 (2007) 1271–1279.
- [40] R.A. Dixon, M.J. Harrison, C. Lamb, Early events in the activation of plant defence response, *Annu. Rev. Phytopathol.* 32 (1994) 479–501.
- [41] M.B. Ali, N. Singh, A.M. Shohael, E.J. Hahn, K.Y. Paek, Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress, *Plant Sci.* 171 (2006) 147–154.
- [42] N. Jbir, W. Chaïbi, S. Ammar, A. Jemmali, A. Ayadi, Root growth and lignification of two wheat species differing in their sensitivity to NaCl, in response to salt stress, *Life Sci.* 324 (2001) 863–868.
- [43] F. Pomar, M. Novo, M.A. Bernal, F. Merino, A.R. Barceló, Changes in item Lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*, *New Phytol.* 163 (2004) 111–123.
- [44] C. Dordas, P.H. Brown PH, Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it, *J. Membr. Biol.* 175 (2000) 95–105.
- [45] M.K. Schon, A. Novacky, D.G. Blevins, Boron induces hyperpolarization of sunflower root cell membranes and increases membrane permeability to K⁺, *Plant Physiol.* 93 (1990) 566–571.
- [46] J. Takano, K. Miwa, T. Fujiwara, Boron transport mechanism: collaboration of channels and transporters, *Trends Plant Sci.* 13 (2008) 451–457.
- [47] S. Han, N. Tang, H.X. Jiang, L.T. Yang, Y. Li, L.S. Chen, CO₂ assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress, *Plant Sci.* 176 (2009) 143–153.
- [48] J.W. Blount, K.L. Korth, S.A. Masoud, S. Rasmussen, C. Lamb, R.A. Dixon, Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway, *Plant Physiol.* 122 (2000) 107–116.

RESEARCH PAPER

Response of nitrogen metabolism to boron toxicity in tomato plants

L. M. Cervilla, B. Blasco, J. J. Ríos, M. A. Rosales, M. M. Rubio-Wilhelmi, E. Sánchez-Rodríguez, L. Romero & J. M. Ruiz

Department of Plant Physiology, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain

Keywords

Amino acids; ammonium assimilation; boron toxicity; nitrate reduction; tomato.

Correspondence

L. M. Cervilla, Department of Plant Physiology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain.
E-mail: lmcerv@ugr.es

Editor

R. Leegood

Received: 14 February 2008; Accepted: 1 October 2008

doi:10.1111/j.1438-8677.2008.00167.x

ABSTRACT

Boron (B) toxicity has become important in areas close to the Mediterranean Sea where intensive agriculture has been developed. The objective of this research was to study the effects of B toxicity (0.5 mM and 2.0 mM B) on nitrogen (N) assimilation of two tomato cultivars that are often used in these areas. Leaf biomass, relative leaf growth rate (RGR_L), concentration of B, nitrate (NO₃⁻), ammonium (NH₄⁺), organic N, amino acids and soluble proteins, as well as nitrate reductase (NR), nitrite reductase (NiR), glutamine synthase (GS), glutamate synthetase (GOGAT) and glutamate dehydrogenase (GDH) activities were analysed in leaves. Boron toxicity significantly decreased leaf biomass, RGR_L, organic N, soluble proteins, and NR and NiR activities. The lowest NO₃⁻ and NH₄⁺ concentration in leaves was recorded when plants were supplied with 2.0 mM B in the root medium. Total B, amino acids, activities of GS, GOGAT and GDH increased under B toxicity. Data from the present study prove that B toxicity causes inhibition of NO₃⁻ reduction and increases NH₄⁺ assimilation in tomato plants.

INTRODUCTION

Among the nutrient disorders of crop plants, boron (B) toxicity has gained in importance in recent years because of the high B concentrations in irrigation water throughout the world (Nable *et al.* 1997). Boron toxicity can produce symptoms in tomato (*Solanum lycopersicum*), which, with more than 3 million ha in cultivation, is one of the most important vegetables worldwide. Much of the tomato crop is grown under plastic greenhouse conditions in areas close to the Mediterranean Sea (Martinez *et al.* 1987). In future, B problems may increase in these areas due to the scarce rainfall and ever-growing demand for desalinated water for use in agriculture where the B concentration is too high for healthy irrigation with other water supplies (Parks & Edwards 2005). The typical symptoms shown by plants exposed to excess B are reduced vigour, delayed development, leaf burn (chlorotic and necrotic patches in older leaves) and decreased number, size and weight of fruits (Paull *et al.* 1992; Nable *et al.* 1997). However, despite the importance of B toxicity for crop productivity, our understanding of mechanisms by which plants respond to excess B is still not

completely understood and further investigation is necessary.

Nitrogen (N) is an essential element in biological materials and changes in its availability and metabolism are of particular importance for maintaining high productivity of crops (Ullrich 2002). Nitrate (NO₃⁻) is the predominant source of N for crops in most agricultural soils. The assimilation of NO₃⁻ by plants requires the uptake of NO₃⁻, reduction to NO₂⁻, the conversion of NO₂⁻ to ammonium (NH₄⁺), and the incorporation of NH₄⁺ into organic compounds (Migge & Becker 1996; Sivasankar & Oaks 1996). This process is complex and is regulated by a number of physiological and environmental factors such as NO₃⁻ availability, cold, salt and light. Several studies have also implicated B in N metabolism. Boron has been shown to be essential in fixing N in cyanobacteria heterocysts (Bonilla *et al.* 1990). In sugarbeet (*Beta vulgaris*), tomato, sunflower (*Helianthus annuus*), corn (*Zea mays*) and oilseed rape (*Brassica napus*) deficient in B, NO₃⁻ concentrations rise as a consequence of reduced NO₃⁻ reductase (NR) (EC 1.6.6.1) activity (Bonilla *et al.* 1988; Kastori & Petrovic 1989; Ramon *et al.* 1989; Shen *et al.* 1993). It has been suggested that the higher NR activity

and NO_3^- assimilation under normal B levels occurs as a result of either increased *de novo* synthesis of the proteins involved in this metabolic process or as a result of the facilitation of NO_3^- absorption (Ruiz *et al.* 1998). López-Lefebvre *et al.* (2002) reported that supplemental B from 5 to 20 μM stimulates NH_4^+ assimilation in tobacco (*Nicotiana tabacum*). However, little is known about the effects of B toxicity on N assimilation. Toxic levels of B have been shown to reduce NR activity in sunflower (Kastori & Petrovic 1989), wheat (*Triticum aestivum*) and barley (*Hordeum vulgare*) (Mahboobi *et al.* 2002). Bonilla *et al.* (1980) suggested that an antagonism between B and molybdenum (Mo) could explain the inhibition of NR activity by B toxicity since Mo is an element that is part of the NR protein. On the other hand, while most studies focus on the relationship between B toxicity and NO_3^- reduction, there are still open questions about how B toxicity affects NH_4^+ assimilation, a process involving the glutamine synthetase/glutamate synthase (GS/GOGAT) (EC 6.3.1.2/EC 1.4.1.14) cycle and glutamate dehydrogenase (GDH) (EC 1.4.1.2).

In view of the above questions, the present study was designed to analyse how B toxicity affects NO_3^- reduction and NH_4^+ assimilation in two tomato cultivars that are often grown in areas close to the Mediterranean Sea. The results show that B toxicity produces inhibition of NO_3^- reduction and induces GS/GOGAT and GDH activities.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

The two cultivars of tomato [*Solanum lycopersicum* L. (*Lycopersicon esculentum* Mill.)] used in the present study were Josefina and Kosaco. Seeds of the two cultivars were germinated and grown for 30 days in cell flats (cell size, $3 \times 3 \times 10$ cm) filled with a peatlite mixture, and the flats were placed on benches in an experimental greenhouse in southern Spain (Granada, Saliplant S.L.). The 30-day-old seedlings were transferred to a controlled environmental chamber with a relative humidity of 60–80%, temperature of 25 °C/15 °C (day/night), and a 16 h/8 h photoperiod at a PPF (photosynthetic photon flux density) of 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (measured at the top of the plants with a 190 SB quantum sensor, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Plants were then transferred to individual pots (25 cm upper diameter, 17 cm lower diameter, 25 cm high) of 8 l volume, filled with vermiculite. Throughout the experiment, the plants were grown with a nutrient solution containing: 4 mM KNO_3 , 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 2 μM MnCl_2 , 1 μM ZnSO_4 , 0.25 μM CuSO_4 , 0.1 μM Na_2MoO_4 , 5 μM Fe-EDDHA and 50 μM H_3BO_3 . The nutrient solution (pH 5.8) was renewed every 3 days and the vermiculite partly rinsed with Millipore-filtered water in order to avoid nutrient accumulation.

The B treatments (0.5 mM and 2.0 mM H_3BO_3) were started 42 days after sowing and maintained for 14 days,

when most of the Josefina plants showed clear symptoms of B toxicity. The control treatment received the complete nutrient solution alone (0.05 mM B). The experimental design was a randomised complete block with three treatments, arranged in individual pots with six plants per treatment and three replicates. The experiment was repeated three times under the same conditions ($n = 9$).

Plant sampling and relative leaf growth rate

To determine the relative leaf growth rate (RGR_L), leaves from three plants per cultivar were sampled on day 42 after sowing, immediately before the start of the B treatment (T_i). The leaves were dried in a forced-air oven at 70 °C for 24 h, and dry weight (DW) was recorded as g DW per plant. The remaining plants were sampled 56 days after sowing (day 14 of treatments, T_F). Leaves were rinsed three times in distilled water after disinfecting with non-ionic detergent at 1%, and then blotted on filter paper. From each treatment, half the leaves were used fresh for analysis of enzymatic activity, amino acids and soluble proteins; the other half was used to determine the DW of leaves, total B concentration, organic N, NO_3^- and NH_4^+ concentrations. The relative growth rate was calculated from the increase in leaf DW at the beginning and at the end of the B treatment, using the equation $\text{RGR}_L = (\ln \text{DW}_F - \ln \text{DW}_i) / (T_F - T_i)$, where T is the time and the subscripts denote the first and last sampling (*i.e.* 0 and 14 days, respectively, after the B treatment) (Bellaloui & Brown 1998).

Analysis of boron and nitrogen forms

The total B and organic N concentration was analysed after digestion of 0.15 g dry and milled leaf material with H_2SO_4 (5 ml at 98%) and H_2O_2 (30%). To measure B concentration, the azomethine-H method was followed and the absorbance was read with a spectrophotometer at 410 nm (Wolf 1974). The total B concentration was expressed as $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. To measure organic N, after digestion and dilution with deionized water, an aliquot of 1 ml was added to a reaction medium containing buffer [5% potassium sodium tartrate, 100 mM sodium phosphate, 5.4% (w/v) sodium hydroxide], 15%/0.03% (w/v) sodium salicylate/sodium nitroprusside, and 5.35% (v/v) sodium hypochlorite. Samples were incubated at 37 °C for 15 min, and organic N measured by spectrophotometry (Baethgen & Alley 1989). The results were expressed as $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW.

NO_3^- and NH_4^+ were analysed from an aqueous extraction of 0.2 g of dried and ground leaf material in 10 ml of Millipore-filtered water. A 100- μl aliquot was taken for NO_3^- determination and added to 10% (w/v) salicylic acid in 96% H_2SO_4 , and the NO_3^- concentration was measured by spectrophotometry following Cataldo *et al.* (1975). NH_4^+ was determined following the method described by Krom (1980). The results were expressed as $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW.

Enzyme extraction and assay

Leaves were ground in a mortar at 0 °C in 50 mM buffer KH_2PO_4 (pH 7.5), containing 2 mM EDTA, 1.5% (w/v) soluble casein, 2 mM dithiothreitol (DTT) and 1% (w/v) insoluble polyvinylpyrrolidone. The homogenate was filtered and then centrifuged at $30,000 \times g$ for 20 min. The resulting extract (cytosol and organelle fractions) was used to measure enzyme activity. The extraction medium was optimised for the enzyme activities so that these could be extracted together according to the same method (Groat & Vance 1981; Kaiser & Lewis 1984; Lillo 1984; Singh & Srivastava 1986).

The NR assay (EC 1.6.6.1) followed the methodology of Kaiser & Lewis (1984). In a final volume of 2 ml, the reaction mixture contained 100 mM buffer KH_2PO_4 (pH 7.5), 100 mM KNO_3 , 10 mM cysteine, 2 mM NADH and enzyme extract. For the NR assay, incubation was carried out at 30 °C for 30 min and stopped by addition of 1000 mM zinc acetate. The nitrite formed was colorimetrically determined at 540 nm after coupling with sulphanylamine and naphthylethylenediamine dihydrochloride according to the method of Hageman & Hucklesby (1971). The NR activity was expressed as nmol of NO_2^- mg^{-1} protein $\cdot \text{min}^{-1}$.

Nitrite reductase (NiR) activity (EC 1.7.7.1) was determined by the disappearance of NO_2^- from the reaction medium (Lillo 1984). The reaction mixture contained 50 mM buffer KH_2PO_4 (pH 7.5), 20 mM KNO_2 , 5 mM methyl viologen, 300 mM NaHCO_3 and 0.2 ml of enzyme extract. After incubation at 30 °C for 30 min, the nitrite content was determined colorimetrically as above (Hageman & Hucklesby 1971) and expressed as nmol of NO_2^- mg^{-1} protein $\cdot \text{min}^{-1}$.

GS (EC 6.3.1.2) was determined by the hydroxamate synthetase assay, adapted from Kaiser & Lewis (1984). The reaction mixture used in the assay of GS was composed of 100 mM buffer KH_2PO_4 (pH 7.5) with 4 mM EDTA, 1000 mM L-sodium glutamate, 450 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 300 mM hydroxylamine, 100 mM ATP and enzyme extract. Two controls were prepared, one without glutamine and the other without hydroxylamine. After incubation at 28 °C for 30 min, the formation of glutamylhydroxamate was colorimetrically determined at 540 nm after complexing with acidified ferric chloride (Wallsgrave *et al.* 1979). GS was expressed as nmol of formed glutamylhydroxamate mg^{-1} protein $\cdot \text{min}^{-1}$.

GOGAT (EC 1.4.1.14) activity was assayed spectrophotometrically at 30 °C by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm, essentially as indicated by Groat & Vance (1981) and Singh & Srivastava (1986), and always within 2 h of extraction. The reaction mixture consisted of 50 mM buffer KH_2PO_4 (pH 7.5) with 0.1% (v/v) mercaptoethanol and 1 mM EDTA, 18.75 mM 2-oxoglutarate, 75 mM L-glutamine and enzyme extract. Two controls, without ketoglutarate or without glutamine, were used to correct for endogenous NADH oxidation. The decrease in absorbance (linear for at least 10 min) was recorded for

5 min. The activity was expressed as nmol of NAD mg^{-1} protein $\cdot \text{min}^{-1}$.

GDH (EC 1.4.1.2) activity was assayed by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm essentially as indicated by Groat & Vance (1981) and Singh & Srivastava (1986). The reaction mixture consisted of 50 mM buffer KH_2PO_4 (pH 7.5) with 200 mM NH_4^+ sulphate, 0.15 mM NADH, 2.5 mM 2-oxoglutarate and enzyme extract. Two controls, without ketoglutarate or NH_4^+ sulphate, were used to correct for endogenous NADH oxidation. The decrease in absorbance (linear for at least 10 min) was recorded for 3 min. The activity was expressed as nmol of NAD per protein $\cdot \text{min}^{-1}$.

Amino acid and protein concentration

Amino acids and proteins were determined by homogenisation of 0.5 g of fresh leaf samples in 50 mM cold KH_2PO_4 buffer (pH 7.0) and centrifugation at $12,000 \times g$ for 15 min. The resulting supernatant was used for the determination of total amino acids according to the ninhydrin method of Yemm & Cocking (1995). Total free amino acids were expressed as $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of FW. Soluble proteins were measured with the Bradford G-250 reagent (Bradford 1976) and expressed as $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of FW, using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Statistical analysis

The data compiled were submitted to a simple variance analysis (ANOVA) and differences between the means were compared by Fisher's least significant difference test (LSD).

RESULTS AND DISCUSSION

The tomato cultivars used in the experiment had reduced foliar biomass and relative leaf growth rate (RGR_L) as a consequence of the increased concentration of B in the culture medium (Table 1). In cv. Josefina, the reduction of foliar biomass and RGR_L occurred parallel to the increase in B in the culture solution, while in Kosaco the reduction was significant only with 2.0 mM B (Table 1). The increase in B levels in the root medium significantly increased the B concentration in leaves, this being higher in Josefina than Kosaco (Fig. 1A).

The reduction in growth and the increased B concentration in plant tissues as a consequence of B toxicity has been characterised in plants such as sunflower (Ruiz *et al.* 2003) and barley (Karabal *et al.* 2003). Data from the present study also show that leaf biomass and RGR_L declines are due to the accumulation of B in leaves. In this sense, the relationship between B accumulation and growth indicates that Kosaco was more tolerant than Josefina when the root medium was supplied with 0.5 mM B.

Boron excess also affected the concentration of the different forms of N. Both cultivars showed a decrease in the NO_3^- , NH_4^+ and organic N concentration when plants

boron	dry weight (g)		RGR _L (g·g ⁻¹ DW·day ⁻¹)	
	Kosaco	Josefina	Kosaco	Josefina
0.05 mM	1.85 ± 0.06a	2.16 ± 0.06a	0.108 ± 0.002a	0.108 ± 0.002a
0.50 mM	1.84 ± 0.05a	1.84 ± 0.06b	0.108 ± 0.003a	0.097 ± 0.002b
2.00 mM	1.46 ± 0.05b	1.62 ± 0.05c	0.092 ± 0.001b	0.088 ± 0.001c
P	**	**	**	***
LSD _{0.05}	0.19	0.18	0.01	0.01

Values are means ± SE (n = 9) and differences between means were compared using LSD (P = 0.05). Means followed by the same letter in the same column do not differ significantly. Levels of significance are represented by *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ns (not significant) P > 0.05.

Table 1. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2.0 mM) on leaf dry weight and relative leaf growth rate (RGR_L) of two tomato cultivars (Kosaco and Josefina).

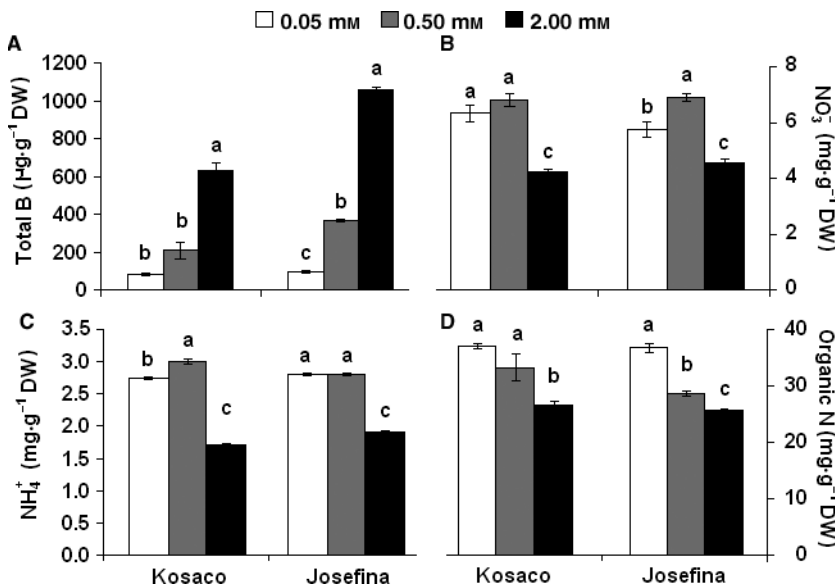


Fig. 1. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2.0 mM) on (A) total boron, (B) NO₃⁻, (C) NH₄⁺ and (D) organic N concentration in leaves of two tomato cultivars (Kosaco and Josefina). Bars represent means ± SE (n = 9); for each cultivar, bars followed by the same letter are not significantly different using LSD (P = 0.05).

were grown with 2.0 mM B (Fig. 1B–D). Moreover, B toxicity decreased both NR and NiR activity (Table 2). These data confirm previous reports on the effect of B toxicity on NO₃⁻ reduction in plants. Kastori & Petrovic (1989) reported that B toxicity decreased total N content and NR activity in shoots of sunflower. Similarly, a reduction of NR activity was found in wheat and barley

(Mahboobi *et al.* 2002). Increasing evidence indicates the role of B in membrane integrity and membrane functions such as formation and maintenance of membrane potentials and membrane permeability (Blevins & Lukaszewski 1998; Brown *et al.* 2002). It has been reported that membrane permeability is increased with increasing severity of B toxicity in barley (Karabal *et al.* 2003), tomato and

boron	NR (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ protein)		NiR (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ protein)	
	Kosaco	Josefina	Kosaco	Josefina
0.05 mM	5.15 ± 0.02a	5.34 ± 0.09a	22.60 ± 0.32a	25.03 ± 0.13a
0.50 mM	4.50 ± 0.01b	2.52 ± 0.02b	14.18 ± 0.23b	19.99 ± 0.14b
2.00 mM	1.50 ± 0.04c	0.44 ± 0.03c	14.88 ± 0.07b	18.27 ± 0.18c
P	***	***	***	***
LSD _{0.05}	0.08	0.18	0.87	0.52

Values are means ± S.E. (n = 9) and differences between means were compared using LSD (P = 0.05). Means followed by the same letter in the same column do not differ significantly. Levels of significance are represented by *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ns (not significant) P > 0.05.

Table 2. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2.0 mM) on nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR) of two tomato cultivars (Kosaco and Josefina).

pepper (*Capsicum annuum*) (Eraslan *et al.* 2007). Although the effect of B toxicity on NO_3^- absorption has still not been analysed, the decrease in NO_3^- concentration in tomato plants supplied with 2.0 mM B could be due to electrochemical changes in the plasma membrane. According to this hypothesis, B deficiency has been shown

to decrease NO_3^- uptake by alterations in plasmalemma H^+ -ATPase expression (Camacho-Cristóbal & González-Fontes 2007). On the other hand, inhibition of NR activity could increase NO_3^- levels in plants subjected to B toxicity (Bonilla *et al.* 1980). This effect was only observed in plants of cv. Josefina subjected to 0.5 mM B treatment (Fig. 1B).

The main pathway of NH_4^+ assimilation is through the enzymatic activities of the GS/GOGAT cycle (Lea & Ireland 1999). In this pathway, the NH_4^+ originating in the plant from NO_3^- reduction is incorporated into an organic form by GS, which catalyses the conversion of the amino acid glutamate into the amide glutamine. Then, GOGAT catalyses the reductive transfer of the amide group of glutamine formed by GS to 2-oxoglutarate to yield two molecules of glutamate. Another enzyme sometimes essential in the assimilation of NH_4^+ is GDH, which catalyses the amination of 2-oxoglutarate (Robinson *et al.* 1991). In our experiment, tomato plants subjected to B toxicity showed a significant increase in the activities of the enzymes GS, GOGAT and GDH (Fig. 2). Similar to our results, Mahboobi *et al.* (2002) reported higher GDH activity in wheat and barley under B toxicity than under normal conditions. Boron was also shown to increase NH_4^+ assimilation as compared to B-deficient conditions in leaves of tobacco (López-Lefebvre *et al.* 2002). Higher activities of these enzymes have been shown to be induced during salinity, prolonged darkness, high temperature, water stress and air pollution (Mansour 2000; Mahboobi *et al.* 2002), being essential to avoid high NH_4^+ from photorespiration reaching toxic levels (Nguyen *et al.* 2005). In a similar way, our results could suggest a protective role for GS/GOGAT and GDH during B stress. However, both tomato cultivars had low concentrations of NH_4^+ with 2.0 mM B treatment (Fig. 1); therefore, it may be possible that the activation of GS/GOGAT and GDH was an attempt to keep the N assimilation pathways in good working order.

Boron toxicity also produced an increase in amino acids in both tomato cultivars and a decrease in leaf soluble proteins (Table 3). Protein breakdown and reduced organic N in the B-stressed leaves, together with increased GS activity and amino acids, could indicate

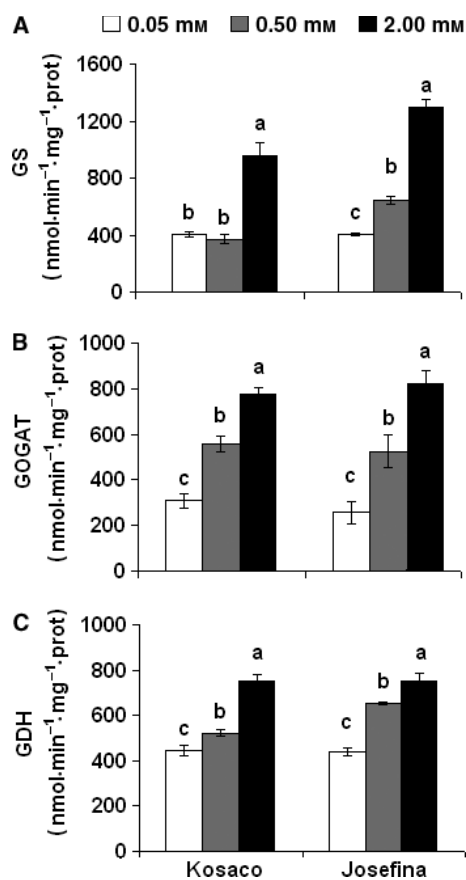


Fig. 2. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2.0 mM) on (A) GS, (B) GOGAT and (C) GDH activity in leaves of two tomato cultivars (Kosaco and Josefina). Bars represent means \pm SE ($n = 9$); for each cultivar, bars followed by the same letter are not significantly different using LSD ($P = 0.05$).

Table 3. Effect of 0.05 mM B (control) and B toxicity (0.5 and 2.0 mM) on amino acid and soluble protein concentrations of two tomato cultivars (Kosaco and Josefina).

boron	amino acids ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)		soluble proteins ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	
	Kosaco	Josefina	Kosaco	Josefina
0.05 mM	0.77 \pm 0.02c	0.77 \pm 0.03c	3.87 \pm 0.03a	4.01 \pm 0.06a
0.50 mM	0.98 \pm 0.04b	0.87 \pm 0.01b	3.98 \pm 0.06a	3.61 \pm 0.06b
2.00 mM	1.23 \pm 0.01a	1.26 \pm 0.03a	3.70 \pm 0.03b	3.41 \pm 0.02c
P	***	***	**	***
LSD _{0.05}	0.08	0.09	0.14	0.17

Values are means \pm SE ($n = 9$) and differences between means were compared using LSD ($P = 0.05$). Means followed by the same letter in the same column do not differ significantly. Levels of significance are represented by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and ns (not significant) $P > 0.05$.

remobilisation of leaf N towards meristematic tissues. Some plant species, e.g. tomato and bean, respond to extended periods of stress with remobilisation of N through protein breakdown and transport of the resulting amino acids and NH_4^+ thus released to rapidly developing organs (Fukutoku & Yamada 1984; Becker *et al.* 1986). In this sense, Bauer *et al.* (1997) found, in leaves of tomato plants, that GS and protein breakdown were stimulated by drought. Contrary to our results, in barley, B toxicity did not cause significant differences in leaf protein content (Karabal *et al.* 2003).

In conclusion, the results of this study prove that B toxicity causes inhibition of NO_3^- reduction and decreases N organic concentration in tomato plants, resulting in reduced growth. The present work also shows that B toxicity induces the GS/GOGAT and GDH pathways for NH_4^+ assimilation. Although further study is needed, this effect could be a protective response of tomato plants to B toxicity since it helps to avoid accumulation of NH_4^+ and incorporates N into organic forms that may be destined for meristematic tissues.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Plan Nacional de I+D+I of the Ministry for Education and Science, Spain (AGL2006-03164/AGR).

REFERENCES

- Baethgen W.E., Alley M.M. (1989) A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **20**, 961–969.
- Bauer D., Biehler K., Fock H., Carrayol E., Hirel B., Migge A., Becker T.B. (1997) A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiologia Plantarum*, **99**, 241–248.
- Becker T.W., Hoppe M., Fock H.P. (1986) Evidence for the participation of dissimilatory processes in maintaining high carbon fluxes through the photosynthetic carbon reduction and oxidation cycles in water-stressed bean leaves. *Photosynthetica*, **20**, 153–157.
- Bellaloui N., Brown P.H. (1998) Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Plant and Soil*, **198**, 153–158.
- Blevins D.G., Lukaszewski K.M. (1998) Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 481–500.
- Bonilla I., Cadahía C., Capena O. (1980) Effects of boron on nitrogen metabolism and sugar levels of sugar beet. *Plant and Soil*, **57**, 3–9.
- Bonilla I., Mateo P., Garate A. (1988) Acción del boro sobre el metabolismo nitrogenado en *Lycopersicon esculentum* cv. Dombo, cultivado en hidroponía. *Agrochimica*, **32**, 276–284.
- Bonilla I., Garcia-González M., Mateo P. (1990) Boron requirement in cyanobacteria. Its possible role in the early evolution of photosynthetic organisms. *Plant Physiology*, **94**, 1554–1560.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.
- Brown P.H., Bellaloui N., Wimmer M.A., Bassil E.S., Ruiz J., Hu H., Pfeffer H., Dannel F., Römheld V. (2002) Boron in plant biology. *Plant Biology*, **4**, 205–223.
- Camacho-Cristóbal J.J., González-Fontes A. (2007) Boron deficiency decreases plasmalemma H⁺-ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots. *Planta*, **226**, 443–451.
- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., Young V.L. (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **6**, 71–80.
- Eraslan F., Inal A., Gunes A., Apaslan M. (2007) Boron toxicity alters nitrate reductase activity, proline accumulation, membrane permeability, and mineral constituents of tomato and pepper plants. *Journal of Plant Nutrition*, **30**, 981–994.
- Fukutoku Y., Yamada Y. (1984) Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II Fate of ¹⁵N-labelled protein. *Physiologia Plantarum*, **61**, 622–628.
- Groat R.G., Vance C.P. (1981) Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*, **67**, 1198–1203.
- Hageman R.H., Hucklesby D.P. (1971) Nitrate reductase. *Methods in Enzymology*, **23**, 497–503.
- Kaiser J.J., Lewis O.A.H. (1984) Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant and Soil*, **70**, 127–130.
- Karabal E., Yücel M., Ökte H.A. (2003) Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science*, **164**, 925–933.
- Kastori R., Petrovic N. (1989) Effect of boron on nitrate reductase activity in young sunflower plants. *Journal of Plant Nutrition*, **12**, 621–632.
- Krom M.D. (1980) Spectrophotometric determination of ammonia: study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst*, **105**, 305–316.
- Lea P.J., Ireland R.J. (1999) Nitrogen metabolism in higher plants. In: Singh B.K. (Ed.), *Plant Amino Acids, Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York: 1–47.
- Lillo C. (1984) Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiologia Plantarum*, **61**, 214–218.
- López-Lefebvre L.R., Ruiz J.M., Rivero R.M., García P.C., Sánchez E., Romero L. (2002) Supplemental boron stimulates ammonium assimilation in leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Growth Regulation*, **36**, 231–236.

- Mahboobi H., Yücel M., Öktem H.A. (2002) Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under boron toxicity. *Journal of Plant Nutrition*, **25**, 1829–1837.
- Mansour M.M.F. (2000) Nitrogen-containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum*, **43**, 491–500.
- Martinez V., Cerda A., Fernandez F.G. (1987) Salt tolerance of four tomato hybrids. *Plant and Soil*, **97**, 233–242.
- Migge A., Becker T.W. (1996) In tobacco leaves, the genes encoding the nitrate-reducing or the ammonium-assimilating enzymes are regulated differently by external nitrogen sources. *Plant Physiology and Biochemistry*, **34**, 665–671.
- Nable O.R., Bañuelos G.S., Paull J.G. (1997) Boron toxicity. *Plant and Soil*, **193**, 181–198.
- Nguyen H.T.T., Shim I.S., Kobayashi K., Usui K. (2005) Regulation of ammonium accumulation during salt stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Production Science*, **8**, 397–404.
- Parks J.L., Edwards M. (2005) Boron in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **35**, 81–114.
- Paull J.G., Nable R.O., Rathjen A.J. (1992) Physiological and genetic control of the tolerance of wheat to high concentrations of boron and implications for plant breeding. *Plant and Soil*, **146**, 251–260.
- Ramon A.M., Ruiz R.O., Garate A. (1989) *In vitro* stabilization and distribution of nitrate reductase in tomato plants: incidence of boron deficiency. *Journal of Plant Physiology*, **135**, 126–128.
- Robinson S.A., Slade A.P., Fox G.G., Phillips R., Ratcliffe R.G., Stewart G.R. (1991) The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiology*, **95**, 809–816.
- Ruiz J.M., Baghour M., Bretones G., Belakbir A., Romero L. (1998) Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): role of boron as a possible regulatory factor. *International Journal of Plant Science*, **159**, 121–126.
- Ruiz J.M., Rivero R.M., Romero L. (2003) Preliminary studies on the involvement of biosynthesis of cysteine and glutathione in the resistance to boron toxicity in sunflower plants. *Plant Science*, **165**, 811–817.
- Shen Z.G., Liang Y.C., Shen K. (1993) Effect of boron on the nitrate reductase-activity in oilseed rape plants. *Journal of Plant Nutrition*, **16**, 1229–1239.
- Singh R.P., Srivastava H.S. (1986) Increase in glutamate synthase activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiologia Plantarum*, **66**, 413–416.
- Sivasankar S., Oaks A. (1996) Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiology and Biochemistry*, **34**, 609–620.
- Ullrich W.R. (2002) Salinity and nitrogen nutrition. In: Läuchli A., Lüttge U. (Eds), *Salinity: Environment – Plants – Molecules*. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands: 229–248.
- Wallsgrave R.M., Lea P.J., Mifflin B.J. (1979) Distribution of enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiology*, **63**, 232–236.
- Wolf B. (1974) Improvement in the Azomethine-H method for determination of boron. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **5**, 39–44.
- Yemm E.W., Cocking E.C. (1995) The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, **80**, 209–213.

