

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL



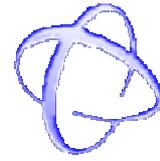
***BIOFORTIFICACIÓN CON YODO EN PLANTAS DE
LECHUGA (LACTUCA SATIVA L.): IMPLICACIONES
FISIOLÓGICAS Y NUTRICIONALES***

BEGOÑA BLASCO LEÓN
TESIS DOCTORAL
GRANADA, FEBRERO 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Begoña Blasco León
D.L.: GR 2324-2010
ISBN: 978-84-693-1300-8



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias



Biofortificación con yodo en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.): Implicaciones fisiológicas y nutricionales

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Biología Begoña
Blasco León para aspirar al grado de Doctor:

Fdo. Begoña Blasco León

V^oB^o Director del trabajo:

Fdo.: Dr. Luis M. Romero Monreal

Catedrático de Universidad

Departamento de Fisiología Vegetal

Facultad de Ciencia - Universidad de Granada

Granada, Febrero 2010

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 del grupo de investigación AGR161 este proyecto ha sido financiado por una beca predoctoral correspondiente al programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) a Begoña Blasco León.

Durante la realización de esta Tesis doctoral me enorgullece haber contado con el apoyo y afecto de las personas que me han rodeado y que han hecho posible que haya realizado este trabajo:

En primer lugar agradecer a mis padres y hermano por su apoyo incondicional, ánimos y ayuda tanto a lo largo de estos cuatro años de duro trabajo como durante toda mi vida. Por su confianza que han depositado en mí y por darme las lecciones que ningún libro puede enseñar.

A mi director de tesis, el Dr. Luis M. Romero Monreal por la oportunidad que me ha brindado, por su paciencia y comprensión, a la vez que por su labor en mi instrucción durante este periodo de trabajo juntos.

A mis compañeros de laboratorio: Luismi, Miguel, M^o del Mar y Eva, así como a Rosa y a Ana, por vuestra colaboración en la realización del trabajo y amistad mostrada día a día. En especial a Juanjo, por haber sabido sacarme unas risas en los momentos más bajos y disfrutar junto a mí con los más altos.

A mis padres y a mi hermano

“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo,
involúcrame y lo aprendo”.

Benjamin Franklin

Índice

BLOQUE I. BIOFORTIFICACIÓN Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA L. VAR. LONGIFOLIA*): BENEFICIOS POTENCIALES PARA EL CULTIVO Y LA SALUD HUMANA

I.1. Introducción.....	27
I.2. Material y métodos.....	35
I.2.1. Material vegetal.....	35
I.2.2. Condiciones de cultivo y diseño experimental.....	37
I.2.3. Muestreo del material vegetal.....	39
I.2.4. Análisis del material vegetal.....	40
II.2.4.1. Medida de la peroxidación de lípidos.....	40
II.2.4.2. Determinación de fenoles totales.....	41
II.2.4.3. Determinación de flavonoides.....	41
II.2.4.4. Determinación de antocianinas.....	42
II.2.4.5. Determinación del ascorbato total.....	42
II.2.4.6. Ensayo FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma).....	43
II.2.4.7. Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity).....	43
II.2.4.8. Test del Poder Reductor.....	44
II.2.4.9. Determinación de yodo total.....	45
II.2.4.10. Factor de transferencia (FT), coeficiente de distribución (CD) y cantidad semanal recomendada (CSR).....	45
I.2.4. Análisis estadístico.....	46
I.3. Resultados y discusión.....	46
I.4. Referencias.....	64

BLOQUE II. BIOFORTIFICACIÓN CON YODO EN PLANTAS DE LECHUGA: IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS

Bloque II. Capítulo I. ¿Está el Metabolismo Oxidativo de Plantas de Lechuga (*Lactuca sativa* L. var. longifolia) Influenciado por la Biofortificación con Yodo?

II.1.1. Introducción.....	81
II.1.2. Material y métodos.....	87
II.1.2.1. Muestreo del material vegetal.....	87
II.1.2.2. Análisis del material vegetal.....	88
II.1.2.2.1. Determinación de peróxido de hidrógeno.....	88
II.1.2.2.2. Análisis de las formas de acorbato y glutatión.....	88
II.1.2.2.3. Determinación de las enzimas antioxidantes.....	90
II.1.2.2.3.1. Superóxido dismutasa.....	90
II.1.2.2.3.2. Catalasa.....	91
II.1.2.2.3.3. Ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa.....	92
II.1.2.2.3.4. Monodehidroascorbato reductasa y dehidroascorbato reductasa.....	92
II.1.2.2.3.5. L-galactosa deshidrogenasa.....	93
II.1.2.2.4. Cuanficación de las proteínas de extractos enzimáticos.....	94
II.1.3. Resultados y discusión.....	94
II.1.4. Referencias.....	104

Bloque II. Capítulo 2. Alteraciones en el Metabolismo Nitrogenado y Fotorrespiración Inducidos por la Biofortificación con Yodo Plantas de Lechuga (*Lactuca sativa* L. var. longifolia)

II.2.1. Introducción.....	111
II.2.2. Material y métodos.....	115
II.2.2.1. Muestreo del material vegetal.....	115
II.2.2.2. Análisis del material vegetal.....	116
II.2.2.2.1. Determinación de las distintas formas de N.....	116
II.2.2.2.2. Determinación de aminoácidos y proteínas solubles.....	117
II.2.2.2.3. Determinación de los metabolitos de la fotorrespiración.....	117
II.2.2.2.4. Extracción y ensayos de las enzimas del metabolismo nitrogenado y fotorrespiración.....	117
II.2.2.2.4.1. Nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa.....	117
II.2.2.2.4.2. Glutamina sintetasa y aspartato aminotransferasa.....	119
II.2.2.2.4.3. Glicolato oxidasa.....	120
II.2.2.2.4.4. Glutamato:glioxilato aminotransferasa, serina:glioxilato aminotransferasa e hidroxipiruvato reductasa.....	121
II.2.2.2.4.5. Catalasa.....	122
II.2.3. Resultados y discusión.....	122
II.2.3.1. Producción de NH_4^+ : Reducción del NO_3^- y fotorrespiración.....	122
II.2.3.2. Incorporación de NH_4^+ y productos de asimilación.....	128
II.2.4. Referencias.....	138

Bloque II. Capítulo 3. Influencia de la Biofortificación con Yodo sobre la Eficiencia en el Uso de Nitrógeno de Plantas de Lechuga (*Lactuca sativa* L. var. longifolia)

II.3.1. Introducción.....	147
II.3.2. Material y métodos.....	151
II.3.2.1. Muestreo del material vegetal.....	151
II.3.2.2. Análisis del material vegetal.....	152
II.3.2.2.1. Parámetros de eficiencia en el uso del nitrógeno.....	152
II.3.2.2.3.1. Acumulación total de N (TNA).....	152
II.3.2.2.3.2. Eficiencia en la absorción de N (NUpE).....	152
II.3.2.2.3.3. Eficiencia en la utilización del N (NUtE).....	152
II.3.3. Resultados y discusión.....	152
II.3.4. Referencias.....	157

Bloque II. Capítulo 4. Fotosíntesis y Metabolismo de Azúcares de Plantas de Lechuga (*Lactuca sativa* L. var. longifolia) Sometidas a Biofortificación con Yodo

II.4.1. Introducción.....	163
II.4.2. Material y métodos.....	168
II.4.2.1. Muestreo del material vegetal.....	169
II.4.2.2. Análisis del material vegetal.....	169
II.4.2.2.1. Análisis de los parámetros fotosintéticos.....	169
II.4.2.2.1.1. Tasa fotosintética neta, transpiración y conductancia estomática.....	170
II.4.2.2.1.2. Eficiencia en el uso del agua.....	170
II.4.2.2.1.3. Pigmentos fotosintéticos.....	170
II.4.2.2.2. Metabolismo de los azúcares.....	171

II.4.2.2.2.1. Análisis de los azúcares solubles.....	171
II.4.2.2.2.2. Enzimas de síntesis y degradación de sacarosa.....	171
II.4.2.2.2.2.1. Actividad fructosa 1,6-bifosfatasa.....	171
II.4.2.2.2.2.2. Actividad sacarosa fosfato sintasa.....	172
II.4.2.2.2.2.3. Actividad invertasa ácida y neutra.....	172
II.4.3. Resultados y discusión.....	173
II.4.4. Referencias.....	184

Bloque II. Capítulo 5. Estado Nutricional en Plantas de Lechuga: (*Lactuca sativa* L. var. longifolia): Efecto de la Biofortificación con Yodo

II.5.1. Introducción.....	193
II.5.2. Material y métodos.....	196
II.5.2.1. Muestreo del material vegetal.....	196
II.5.2.2. Análisis del material vegetal.....	196
II.5.2.2.1. Determinación de los nutrientes minerales.....	196
II.5.2.2.1.1. Determinación de N.....	197
II.5.2.2.1.2. Determinación de P.....	198
II.5.2.2.1.3. Determinación de S.....	198
II.5.2.2.1.4. Determinación de K, Ca y Mg.....	198
II.5.2.2.1.5. Determinación de Cu, Fe, Mn, Zn.....	199
II.5.2.2.1.6. Determinación de B.....	199
II.5.2.2.1.7. Determinación de Cl.....	200
II.5.3. Resultados y discusión.....	200
II.5.4. Referencias.....	213
Conclusiones.....	219

Bloque I

***Biofortificación con yodo y capacidad antioxidante
en plantas de lechuga: Beneficios potenciales
para el cultivo y la salud humana***

Los resultados que se presentan en este Bloque I han sido publicados y presentados en las siguientes revistas y foros que se indican a continuación:

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Rios JJ, Cervilla LM, Ruiz JM, Romero L
Titulo: Análisis foliar de la capacidad antioxidante inducida por yodo en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) (S4P17)
Tipo de participación: Poster
Congreso: *XI Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas – Nutriplant2006*
Publicación:
Lugar celebración: Pamplona Fecha: 2006

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Rios JJ, Cervilla LM, Ruiz JM, Romero L
Titulo: Análisis foliar de la capacidad antioxidante inducida por yodo en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)
Ref. € revista: € libro: Nutrición Mineral. Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales
Clave: CL Volumen: II Paginas, inicial: 477 final: 484 fecha: 2006
Editorial (si libro): Universidad Pública de Navarra. ISBN: 84-9769-165-2
Lugar de publicación: Pamplona (España)

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Rios JJ, Cervilla LM, Rosales MA, Rubio-Wilhelmi MM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L
Titulo: Biofortificación y distribución de yodo en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)
Tipo de participación: Poster
Congreso: *XVI Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal – X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal*
Publicación:
Lugar celebración: Alcalá de Henares (España) Fecha: 2007

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Ríos JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L
Titulo: Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health
Ref. revista: *Annals of Applied Biology* libro:
Clave: A Volumen: 152 Paginas, inicial: 289 final: 299 fecha: 2008
Editorial (si libro):
Lugar de publicación: UK

**BIOFORTIFICACIÓN Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DE LECHUGA
(*LACTUCA SATIVA L. VAR. LONGIFOLIA*): BENEFICIOS POTENCIALES PARA EL
CULTIVO Y LA SALUD HUMANA**

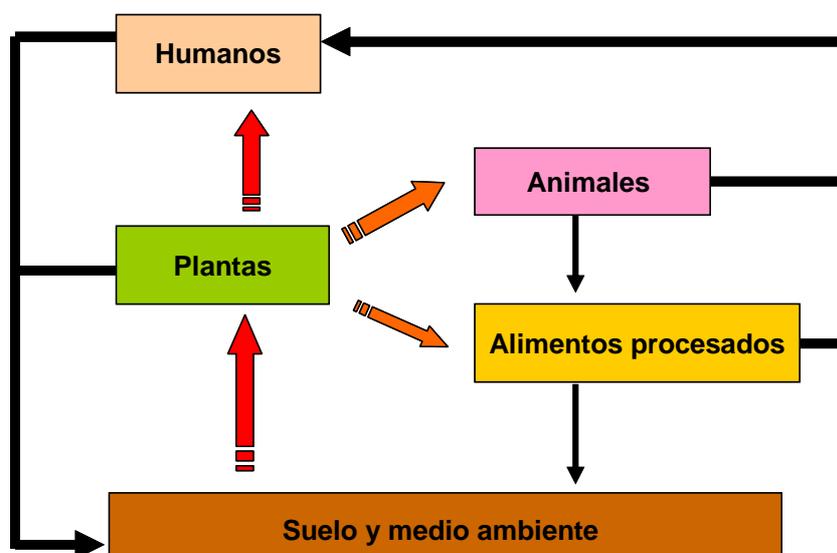
I. Introducción

A lo largo de la historia, la agricultura ha sido la encargada de proporcionar los nutrientes necesarios (macronutrientes y micronutrientes) para que los humanos podamos llevar una vida completamente saludable. Desafortunadamente, por la situación demográfica actual, en las últimas décadas los sistemas agrícolas han tendido al monocultivo viéndose restringido tanto el cultivo de especies como de las distintas variedades de una especie, siempre a favor de las más comerciales. Este hecho ha derivado sobre todo en que los sistemas de suministro de alimentos no están aportando cantidades adecuadas de micronutrientes esenciales a una amplia proporción de la población mundial (Welch, 2005; Xiao et al., 2007).

Esta situación de malnutrición de micronutrientes (MNM) comenzó a hacerse patente a mediados de los 80, cuando comenzaron los problemas socio-económicos derivados de la deficiencia de micronutrientes. En 1990 las Naciones Unidas apoyada por organismos como la FAO, WHO y UNICEF entre otros, tomaron las riendas ante esta situación de MNM. Pero no fue hasta el año 2000 cuando varios de estos organismos apuntaron directamente a la necesidad de eliminación o reducción significativa de las deficiencias de yodo,

hierro y vitamina A (Mayer et al., 2008). Fue en este periodo cuando comenzó el desarrollo nuevas vías por las que se pudiese incrementar la concentración de microelementos esenciales en los productos vegetales. Actualmente, todas estas investigaciones han desembocado en la existencia de numerosas técnicas agrícolas capaces de cumplir con este propósito, aunque a pesar de la gran variedad de ellas, la biofortificación se presenta como una de las técnicas más prometedoras de esta década no sólo por su gran efectividad incorporando micronutrientes del suelo a los vegetales destinados al consumo humano, sino también por el bajo coste que conlleva su aplicación (Whelch y Graham, 2005).

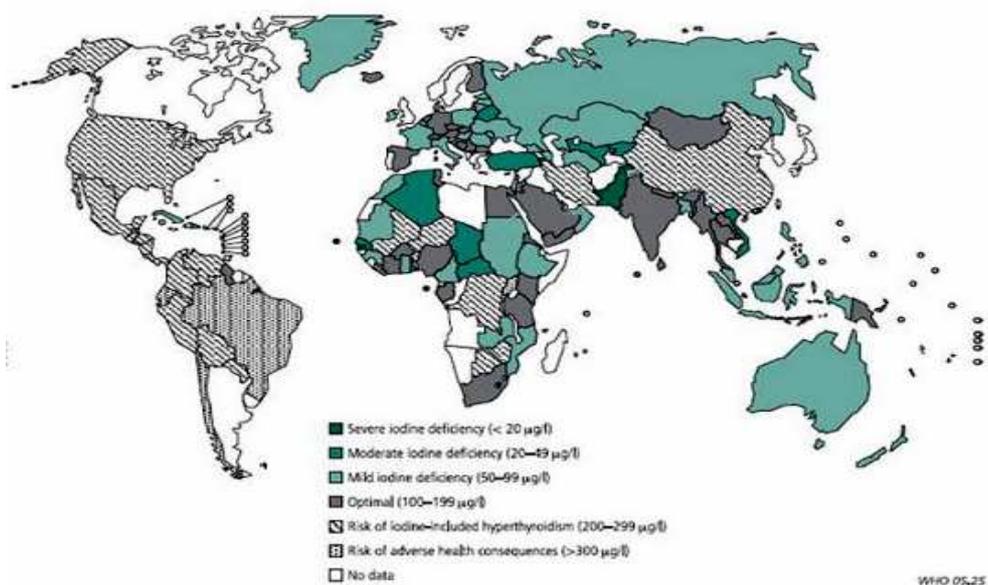
La biofortificación ha sido definida como el proceso que incrementa la concentración de elementos esenciales biodisponibles en las porciones comestibles de las plantas de cultivo a través de la intervención agronómica o la selección genética (White y Broadly, 2005). Posteriormente, Campos-Bowers y Wittenmyer (2007), indicaron además la posibilidad del uso de estos productos vegetales tanto para el consumo humano como para el animal, generándose así un sistema de flujo de micronutrientes (ver Esquema 1).



Esquema 1. Ciclo de nutrientes incrementados en los programas de biofortificación

En la actualidad el yodo se considera un elemento traza esencial para los mamíferos, cuyos efectos sobre la salud humana han pasado desapercibidos debido a que es necesario tan solo en pequeñas proporciones. Estudios recientes indican que aproximadamente el 30% de la población mundial se encuentra afectadas por la deficiencia de este elemento, además de la existencia de 1 millón de personas que forman un grupo de riesgo susceptible de padecerla (ver Esquema 2) (White y Broadley, 2005; Abrahams, 2006). Por lo general, las regiones más afectadas por la deficiencia de yodo son aquellas que se encuentran en vías de desarrollo como África, Sudamérica y el sudeste de Asia, siendo las causas de este desorden nutricional el escaso consumo de alimentos ricos en yodo, suelos cultivables pobres en este elemento, escasez o ausencia de éste en el agua de bebida y riego, elevada fijación a la materia orgánica de los suelos y cuestiones culturales como el modo de preparación y

manipulación de los alimentos (Zhang et al., 2002; Krajčovičová-Kudláčková et al., 2003). Sin embargo, recientemente se ha empezado a detectar este desorden nutricional en países desarrollados como USA, Alemania, Gran Bretaña y Australia entre otros (Kersting et al., 2001; Fields et al., 2005). En estas zonas se incluyen como población de riesgo las mujeres embarazadas, por su gran requerimiento de este mineral (Delange, 2001; Glioner, 2001) y vegetarianos, debido a que alimentos como la fruta, verdura y frutos secos poseen una escasa o inexistente cantidad de yodo (Draper et al., 1993; Lightowler y Davies, 1996). En niños y adolescentes la situación es más grave debido a que se ha encontrado que la ingesta de yodo se encuentra por debajo de los niveles de referencia, reflejando situaciones endémicas de deficiencia de este elemento (Maz, 1996).



Esquema 2. Distribución global del grado de deficiencia de yodo basada en la excreción urinaria media según la WHO.

En el ser humano la acción fisiológica del yodo abarca varios niveles interviniendo en procesos tan importantes como la síntesis de hormonas tiroideas, causando la deficiencia de este elemento el aumento de tamaño del tiroides o bocio, patogénesis cuyo principal origen es nutricional. Además está implicado en el crecimiento, desarrollo y regulación metabólica, lo que hace que su deficiencia esté relacionada con trastornos tan diversos como retraso del crecimiento y maduración de todos los órganos y sistemas, fallos reproductivos y del sistema inmune, retraso mental, deterioro del oído y cretinismo, así como daños cerebrales (Welch y Graham 1999; Welch, 2002). Todas estas patologías se engloban en las denominadas enfermedades por deficiencia de yodo (IDD, Iodine Deficiency Diseases), cuya distribución ha sido subestimada por el hecho de que los sondeos realizados para averiguar el posible alcance de estas enfermedades en la población mundial están basados en la detección de los síntomas visuales, de modo que no se consideran desórdenes aquellos cuya sintomatología no es externa como el retraso mental (Zhu et al., 2003).

Una de las soluciones tradicionales a estos problemas es el fomento del consumo de la sal yodada, si bien este método es efectivo tan solo cuando la deficiencia padecida es leve, como se indica en los estudios realizados por Zhu et al. (2003). Por ello, y debido a que la agricultura es la principal fuente de todos los nutrientes requeridos para la salud humana (Welch, 2002), recientemente se ha propuesto la mejora nutricional de los productos vegetales destinados al consumo humano a través de la biofortificación.

En China, en la región de Xingjiang, donde tanto el suelo como el agua de consumo son escasos en yodo, se ha llevado a cabo la fertirrigación de cultivos suplementados con este elemento y se concluyó que este es un método efectivo y económico para reducir su deficiencia en la población (Cao et al., 1994). Posteriormente, Mackoviak y Grossl (1999) realizaron programas de biofortificación de arrozales con poco éxito debido a que el yodo tiene poca movilidad floemática (Herret et al., 1962) y en consecuencia la traslocación de este elemento al grano es limitada. Además, como queda reflejado en otros estudios, la acumulación de este elemento en las hojas depende principalmente de su transporte por el xilema (Herret et al., 1962), por lo que podemos presuponer que la utilización de vegetales cuya parte comestible es la hoja en un programa de biofortificación con yodo, son un medio efectivo para compensar el déficit nutricional causado por la reducida ingesta de este elemento.

Distintas investigaciones han comprobado que la absorción de yodo por parte de los vegetales depende tanto de la concentración como de la forma existente en el medio. Así, Zhu et al. (2003) demostraron con *Spinacea oleracea L.* una relación directamente proporcional entre la concentración de yodo en las plantas y la aplicación externa de este elemento tanto en su forma de yodato (IO_3^-) como de yoduro (I^-). Además, la concentración de yodo en los vegetales era mayor cuando la forma aplicada a la solución nutritiva era el I^- . Este hecho es debido a que el IO_3^- , además de tener una mayor valencia y peso molecular, ha de ser reducido a I^- para su posterior absorción (Umaly y Poel, 1971;

Whitehead, 1975), siendo por lo tanto esta forma la de mayor biodisponibilidad para las plantas. Respecto a su transporte, mientras que en la raíz este I^- sigue la vía de absorción del Cl^- mediante de un cotransporte con H^+ , su descarga al xilema se realiza a través de canales aniónicos no específicos. Finalmente se ha especulado que su entrada y distribución en las células del mesófilo foliar se podría deber a canales aniónicos no específicos y/o a un antiporte con H^+ (White y Broadley, 2009)

A pesar de la posible efectividad que hasta el momento han demostrado los programas de biofortificación del yodo para aumentar el consumo de este elemento en seres humanos a través de la dieta vegetal, ninguno de estos trabajos ha estudiado el efecto de la biofortificación con I sobre la calidad nutricional, y en especial la capacidad antioxidante, máxime cuando existen evidencias de que una aplicación excesiva de yodo puede dar lugar a afectos fitotóxicos para las plantas y por lo tanto puede afectar a esta característica nutricional.

La capacidad antioxidante se considera muy importante en la dieta del ser humano ya que esta ligada a la disminución del riesgo de padecer arteriosclerosis cardiovascular (Joshiyura et al., 1999, 2001; Brazzano et al., 2002), cancer (Smith-Warner et al., 2003), trastornos degenerativos oculares (Brown et al., 1999; Cho et al., 2004) y otras enfermedades neurodegenerativas y crónicas, como el Alzheimer y Parkinson, que ocurren con frecuencia en ciudades industrializadas. Todas estas patologías parecen estar relacionadas

con la aparición del estrés oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno (ROS), los cuales provocan daños en numerosos componentes celulares como lípidos, proteínas y ADN, y que pueden ser originados bien en procesos celulares normales o bien por las condiciones ambientales a las que estamos expuestos. En consecuencia, nuestros sistemas antioxidantes en combinación con los compuestos antioxidantes procedentes de frutas y verduras frescas juegan un papel importante combatiendo el estrés oxidativo. La actividad antioxidante (AA) de los compuestos fitoquímicos como carotenoides (β -caroteno y licopeno), vitaminas C y E, antocianinas y compuestos fenólicos pueden ayudar a explicar la relación entre el consumo de frutas y verduras y la disminución del riesgo de padecer trastornos crónicos (Connor et al., 2005).

Los datos que presentamos en este trabajo son novedosos puesto que no sólo se comprueba la viabilidad del uso del cultivo de lechuga en un programa de biofortificación con yodo, sino que también se define la dosis y forma a aplicar. Además, se muestra una relación directa entre la aplicación externa de yodo y el incremento tanto de la respuesta antioxidante como de la calidad nutricional pudiéndose sugerir la posibilidad de considerar al yodo como elemento beneficioso para el cultivo de lechuga.

I.2. Material y métodos

I.2.1. Material vegetal

En nuestras experiencias el material vegetal utilizado fue plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var Longifolia). Pertenece a la Familia *Astraceae* y se caracterizan por ser plantas anuales o bianuales, de porte recto y hasta 1 m de altura, lampiñas y con tallos ramificados. Sus hojas son basales arrosetadas, ovaladas y dentado-crenadas (Sanchez-Monge, 1991). Esta especie vegetal es ampliamente cultivada en todas sus variedades, siendo el principal cultivo consumido en ensalada cuyas hojas se consumen crudas (Giacconi, 1995).

Lactuca sativa L. var. longifolia, corresponde a las plantas de lechuga conocidas como romanas. Esta planta hortícola desarrolla hojas grandes, erguidas y oblongas de 20 a 30 cm de largo y de 6 a 10 cm de ancho, con nervadura central prominente, superficie ligeramente ondulada y borde irregularmente dentado. El tallo se presenta con una longitud superior al resto de variedades cultivadas y permanece protegido por el conjunto de hojas, las que forman una cabeza cónica o cilíndrica (Sanchez-Monge, 1991).



Fotografía 1. *Lactuca sativa* L. var. longifolia

La lechuga tiene una gran importancia en la dieta humana siendo una de las plantas más consumidas en fresco en ensaladas del mundo (FAO, 2006). Como características nutricionales cabe destacar que es un vegetal con bajo contenido calórico y con gran aporte de nutrientes esenciales, como se muestra en la tabla desarrollada por Gebhardt y Tomas (2002).

Valor nutricional obtenido por cada 100 gr de lechuga	
Lechuga	100gr
Agua	95%
Calorías	18gr
Proteínas	2gr
Grasas	-
Colesterol	-
Hidratos de Carbono	4gr
Ca	52mg
Fe	0,5mg
K	419mg
Na	8mg
Vitamina A	1,58 International Unit
Tiamina	0,10mg
Riboflavina	0,10mg
Niacina	0,5mg
Vitamina C	13mg

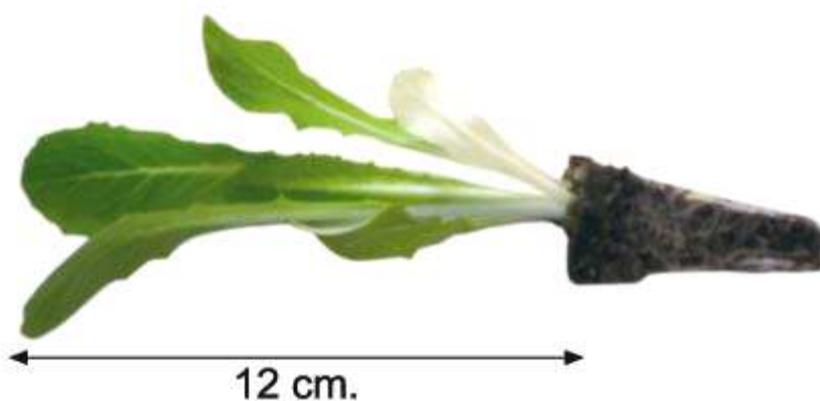
La elección de esta planta para el desarrollo de un programa de biofortificación con yodo se debe básicamente a 2 razones:

- 1- Al tratarse de un vegetal cuya parte comestible es la hoja (leafy vegetable) cabe esperar que la concentración de yodo en este tejido incremente de forma paralela a la cantidad de este elemento aplicada en el medio de cultivo. Esta característica además de incrementar la posibilidad de que este programa de biofortificación se desarrolle con éxito, facilita el estudio del efecto que tiene la acumulación foliar de yodo sobre los distintos procesos fisiológicos y nutricionales.
- 2- Es una de las plantas hortícolas más cultivadas en el mundo, siendo su producción mundial anual de 23.131.432 toneladas. Asimismo, España es uno de los principales productores llegando a producir 1.069.500 toneladas/año. Esta cantidad es tan solo superada por China y Estados Unidos con producciones anuales de 11.605.250 toneladas y 4.659.460 toneladas respectivamente (FAO, 2006).

1.2.2. Condiciones de cultivo y diseño experimental

Plantas de *Lactuca sativa* L. var. Longifolia germinaron y crecieron durante 35 días en un semillero del sur de España (Granada, Motril, Saliplant S.L.). A los 35 días después de la germinación las plantas fueron transplantadas a una cámara de cultivo del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de

Ciencias de la Universidad de Granada, bajo condiciones ambientales controladas (humedad relativa del 60-80%, temperatura 22/18°C (día/noche) y un fotoperiodo de 12/12 horas a una densidad de flujo de fotones fotosintético (PPFD) de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medido por encima de las plantas con un sensor 190 SB, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) (ver fotografías 2 y 3). Las plantas crecieron en maceteros individuales (25 cm diámetro superior, 17 cm diámetro menor, 25 cm de altura) de 8 L de volumen, rellenos con vermiculita. Hasta el final del experimento las plantas recibieron una solución nutritiva completa la cual estuvo compuesta por: 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)$, 6 mM KNO_3 , 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 50 μM H_3BO_3 , 2 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 1 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 10 μM Fe-EDDHA. La solución nutritiva tuvo un pH 5.5-6.0 y fue renovada cada tres días lavándose la vermiculita en cada cambio de la solución nutritiva con agua destilada con el fin de evitar la acumulación de nutrientes.



Fotografía 2. Tamaño lechuga en el momento del transplante a la cámara de cultivo



Fotografía 3. Cultivo de plantas de lechuga bajo condiciones ambientales controladas

A los 45 días después de la germinación, se aplicaron los distintos tratamientos junto a la solución nutritiva descrita anteriormente. Los tratamientos consistieron en: yoduro (10, 20, 40, 80, 120, 160, 240 $\mu\text{mol L}^{-1}$ como KI) y yodato (10, 20, 40, 80, 120, 160, 240 $\mu\text{mol L}^{-1}$ como KIO_3) y se mantuvieron durante 21 días, y además un tratamiento control al que se lo aplicó la solución nutritiva descrita anteriormente en ausencia de I. El diseño experimental fue totalmente aleatorio y consistió en 15 tratamientos con tres repeticiones cada uno y seis plantas por tratamiento ($n=9$).

1.2.3. Muestreo del material vegetal

Las plantas (hojas y raíces) fueron muestreadas transcurridos 66 días después de la germinación. Las muestras foliares fueron estandarizadas mediante el uso de las hojas totalmente expandidas de la parte media de las plantas en todas las repeticiones, pues en estas hojas es donde se refleja más claramente el estado nutricional y metabólico, y por tanto el efecto de los

tratamientos aplicados. El material vegetal (hojas y raíces) fue lavado tres veces con agua destilada después de su descontaminación con un detergente no iónico al 1 % y se secaron en papel de filtro. Una parte de las hojas muestreadas fue usada en fresco para el análisis de la peroxidación de lípidos [actividad de la lipoxigenasa (LOX) y contenido en malondialdehído (MDA)], fenoles totales, flavonoides, antocianinas, ascorbato y capacidad antioxidante (the Ferric Reducing Ability of Plasma [FRAP], Trolox Equivalent Antioxidant Activity [TEAC] y Poder Reductor). El resto de las hojas y raíces se sometieron a un proceso de liofilización para su secado y posteriormente se utilizaron para determinar los parámetros biomasa y concentración de yodo tanto aérea como radicular.

II.2.4. Análisis del material vegetal

II.2.4.1. Medida de la peroxidación de lípidos

Para el ensayo del MDA, 0,5 g de hoja de lechuga fueron homogeneizados en 5 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.25% en ácido tricloroacético (TCA) al 10%. La mezcla fue calentada a 95°C durante 30 min. y a continuación se enfrió en un baño de hielo. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 9500 rpm durante 10 min. y se cuantificó el contenido en MDA en el sobrenadante a A_{532} . También se obtuvo el valor de absorbancia no específica a A_{600} para corregir la turbidez. La concentración de MDA fue

calculada usando como coeficiente de extinción $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Fu y Huang, 2001).

La actividad LOX fue medida de acuerdo con Mínguez-Mosquera et al. (1993), usando 50 mM de buffer K-fosfato, pH 6 para la extracción. El extracto enzimático se mezcló con 0,5 mM de ácido linoleico en buffer K-fosfato 50 mM, pH 6 y tween 20 al 0.1%. La actividad LOX fue calculada mediante la diferencia de absorbancia a 234 nm usando un coeficiente de extinción de $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.2.4.2. Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales del tejido vegetal fueron extraídos con metanol, cloroformo y solución salina al 1%. El contenido se cuantificó a una absorbancia de 765 nm utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteau (Rivero et al., 2001). Los resultados obtenidos fueron expresados como μg de ácido cafeico g^{-1} peso fresco (PF).

II.2.4.3. Determinación de flavonoides

El contenido en flavonoides fue medido mediante método colorimétrico seguido por 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 le 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 μg rutín g^{-1} PF.

II.2.4.4. Determinación de antocianinas

El análisis de las antocianinas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Ticconi et al. (2001). Para ello se homogenizaron 2 g PF en una solución de propanol-clorhídrico-agua a una proporción de 18:1:81. Posteriormente los homogenizados se hirvieron en un baño de agua durante 3 min. y se dejaron en oscuridad 24 horas. Transcurrido este tiempo se tomaron 3 ml del sobrenadante y se centrifugó a 6500 rpm durante 40 min. Finalmente las muestras se midieron a 535 y 650 nm y los datos se expresaron como densidad óptica (DO). Se obtuvo un valor de absorbancia corregida mediante la fórmula:

$$A = A_{535} - A_{650}$$

II.2.4.5. Determinación del ascorbato total

El ascorbato total fue determinado espectrofotométricamente siguiendo el método usado por Gossett et al. (1994). Hojas de lechuga (1-1.5 g PF) fueron homogenizadas en 10 ml de ácido m-fosfórico 5% (w/v) frío. EL

homogeneizado fue centrifugado a 13500 rpm durante 15 min. Para la determinación del ascorbato total 100 μ l del sobrenadante fue incubado a 25 °C durante 10 min. en oscuridad con una mezcla de reacción formada por 110 mM KH_2PO_4 , 3,6 mM EDTA y 1,5 mM DTT. Tras la incubación, se añadió 100 μ l de 0,5% (w/v) n-etilmaleimida. El color apareció tras la adición de 400 μ l 10% (w/v) ácido tricloroacético, 400 μ l de ácido o-fosforico al 44%, 400 μ l de 6,5 mM á - á -1 -dipiridil en etanol al 70%, y 200 μ l de 110 mM FeCl_3 . La mezcla de reacción fue incubada a 40°C durante 40 min. y finalmente fue cuantificada a A_{525} .

II.2.4.6. Ensayo FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

El ensayo fue realizado con el reactivo FRAP, compuesto de 1 mM 2,4,6-tripirildil-2-triazina (TPTZ) y 20 mM FeCl_3 en 0,25 M CH_3COONa , pH 3,6. Un extracto de 100 μ l obtenido de la homogenización de 1 g p.f. en 10 ml de metanol fue añadido a 2 ml de reactivo FRAP. Posteriormente la mezcla fue incubada a temperatura ambiente (20°C) durante 5 min.. La absorbancia fue medida a A_{593} frente a una curva patrón de 25–1600 $\mu\text{M Fe}^{3+}$ preparada usando una solución madre 25 mM de sulfato ferroso (Benzie y Strain, 1996).

II.2.4.7. Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity)

El test TEAC fue llevado a cabo 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 metanol como blanco) hasta que registró un valor de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Una alícuota de 100 μ L 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 minutos e inmediatamente después se registró la absorbancia a 734 nm. Las muestras fueron enfrentadas a una curva patrón de 0-15 μ M de trolox que siguió el mismo procedimiento anterior.

II.2.4.8. Test del Poder Reductor

El poder reductor de la lechuga fue medido de acuerdo con el método descrito por Hsu et al. (2003). A 1 ml de extracto de lechuga (1 g/5 ml metanol 80 %) se le añadió buffer fosfato (0,2 M, pH 6.6) y $K_3Fe(CN)_6$ (1% v/w) y la mezcla fue incubada durante 20 min. a 50°C. Posteriormente los tubos fueron enfriados inmediatamente sumergiéndolos en hielo y entonces se les añadió 0,5 ml Cl_3CCOOH al 10%. A continuación, fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min.; se tomó 1 ml del sobrenadante obtenido y se mezcló con 1 ml de agua destilada y 0,1 ml de $FeCl_3$ (0,1%), la mezcla se incubó durante 10 min. y la absorbancia fue medida a 700 nm.

II.2.4.9. Determinación de yodo total

Para la determinación de la concentración de I (IC), 25 mg de tejido vegetal seco fue sometido a un proceso de mineralización con 2,5 ml HNO₃ concentrado y 1 ml de H₂O₂. La solución resultante fue diluida en 25 ml de agua destilada y la concentración del elemento fue determinada mediante espectrofotometría de absorción atómica de acuerdo con Soudek et al. (2006). La IC en hojas y raíces fue expresada como mg Kg⁻¹ peso seco (PS).

II.2.4.10. Factor de transferencia (FT), coeficiente de distribución (CD) y cantidad semanal recomendada (CSR)

El FT de la solución a la hoja fue calculado usando tanto la IC de las hojas frescas como la IC de la solución (Zhu et al., 2003). De este modo el FT fue calculado de la siguiente manera:

$$FT_{\text{solución - hoja}} = [IC_{\text{hoja}}]_{\text{fresca}} / IC_{\text{solución}}$$

El CD fue calculado usando la concentración en peso seco y definido como la razón entre la IC en la hoja y la IC en la raíz.

La CSR fue calculada usando como valor de referencia la cantidad diaria recomendada (CDR) que en este caso es 150 µg al día, y como valor de partida la IC en hojas frescas.

II.2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) simple con un intervalo de confianza del 95% usando el programa Statgraphics 6.1. Por otro lado, para conocer si las dosis y formas de I aplicada en el experimento afectaron de forma significativa a los resultados, se llevó a cabo una ANOVA de dos vías y las medias se compararon mediante el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD, Lower Significant Difference). Los niveles de significación para ambos análisis fueron expresados como: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y NS: no significativo.

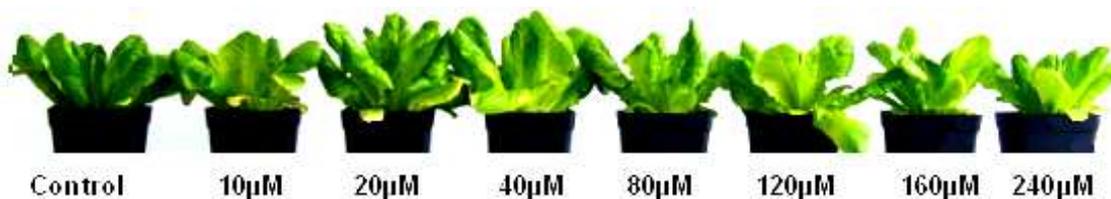
II.3. Resultados y discusión

Ante la aparición de una situación de estrés se ven inhibidos el crecimiento y desarrollo de las plantas, además se generan las denominadas ROS que son las responsables del daño de numerosas macromoléculas y estructuras celulares. En consecuencia, ante condiciones adversas algunos de los indicadores de estrés más fiables y ampliamente usados son la biomasa vegetal y la peroxidación de lípidos, expresada como actividad LOX y concentración de MDA (Juan et al., 2005; Ruiz et al., 2005; Rosales et al., 2006). En este estudio se observó una disminución significativa de la biomasa aérea en dosis superiores a 40 μM cuando la forma aplicada era I^- (Tabla 1, Fotografía 4). Sin embargo, la concentración de IO_3^- no tuvo efecto negativo

sobre la biomasa, incluso se pueden observar fluctuaciones entre los distintos tratamientos con una cierta estimulación del crecimiento vegetal (Tabla 1, Fotografía 5).



Fotografía 4. Crecimiento de plantas de lechuga ante distintas dosis de I^- .



Fotografía 5. Crecimiento de plantas de lechuga ante distintas dosis de IO_3^- .

De acuerdo con nuestros datos, Mackowiak y Grossl (1999) encontraron una reducción de la biomasa en plantas de arroz cuando se les aplicaba I^- , aunque por otra parte esta disminución se produjo a concentraciones de $10 \mu M$ o superiores. Al igual que en el caso anterior, Zhu et al. (2003) al trabajar con plantas de espinaca observaron que existía una reducción de la biomasa foliar en los tratamientos 10 y $100 \mu M$ de I^- , al mismo tiempo, el IO_3^- tampoco tuvo efecto sobre la biomasa y el efecto de la interacción entre las formas y dosis también fue significativo al igual que en nuestro experimento (Tabla 1). Asimismo, Dai et al. (2004) desarrollaron una experiencia con seis vegetales clasificados según su parte comestible fuese raíz, tubérculo, parte aérea u hoja.

Tras aplicar los tratamientos y examinar los datos observaron que la concentración de IO_3^- tan sólo tuvo efecto significativo sobre la biomasa de plantas en aquellas cuya parte comestible era la hoja. De este modo, podemos observar que la reducción de la biomasa no sólo depende de la forma y de la dosis aplicada sino también de la especie vegetal utilizada, ya que no todas las plantas reaccionan de la misma forma ante la presencia de I^- y su efecto parece ser ampliamente dependiente de la naturaleza de los cultivos (Ehling, 1928). El efecto fitotóxico del I^- sobre el crecimiento de las plantas que observamos en nuestro experimento puede deberse bien a una acumulación excesiva de este elemento traza en los tejidos vegetales, o bien a que una vez absorbido puede darse una oxidación intracelular a I_2 , que produce una inhibición del proceso fotosintético (Mynet y Wain, 1973).

Tabla 1. Producción de biomasa y peroxidación de lípidos en plantas de lechuga sometidas a distintos tratamientos de I.

Tratamientos Dosis I (μM)	Biomasa		MDA		LOX	
	I ⁻	IO ₃ ⁻	I ⁻	IO ₃ ⁻	I ⁻	IO ₃ ⁻
0	3.02	3.02	6.17	6.17	4.81	4.81
10	3.04	3.81	5.24	5.78	4.07	3.89
20	2.85	3.75	5.93	6.33	5.22	3.21
40	2.98	3.55	6.58	5.29	4.83	3.57
80	2.34	3.37	7.50	5.07	6.65	4.13
120	2.47	4.30	10.68	6.15	6.99	3.56
160	1.99	3.34	9.63	5.87	7.12	3.24
240	1.92	3.11	9.47	5.52	7.03	4.27
<i>P</i> -valor	***	*	**	NS	***	NS
LSD	0.34	0.81	1.99	1.61	1.21	1.78

Análisis de la varianza			
Formas (F)	***	NS	**
Dosis (D)	***	***	**
F x D	***	NS	**
LSD	0.26	2.07	1.07

Biomasa: g p.s./parte aérea; MDA: mmol g⁻¹ PF; LOX: mmol de ácido linoléico oxidado mg⁻¹ prot min⁻¹.

Los niveles de significación se expresaron como $P > 0.05$ (NS, no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

Con respecto a la peroxidación de lípidos, los datos mostraron que la concentración de MDA fue afectada exclusivamente por la aplicación de I⁻ a dosis superiores de 80 μM , produciéndose un incremento significativo respecto a las plantas control. Por el contrario, la aplicación de IO₃⁻ no presentó efectos significativos sobre el contenido de MDA (Tabla 1). Las plantas tratadas con I⁻ si presentaron un incremento significativo en dosis superiores a 40 μM (Tabla 1), indicando que en nuestro experimento la peroxidación de lípidos se asoció con una inhibición del crecimiento y desarrollo de las plantas y por tanto, con una menor biomasa. Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias significativas para la actividad LOX en plantas tratadas con IO₃⁻ (Tabla 1).

El transporte de yodo depende tanto de la concentración como de la forma en la que se encuentre en el medio, aunque en algunas especies la mayor parte de este elemento es retenido en la raíz (Whitehead, 1973). En el suelo se puede encontrar principalmente en dos formas inorgánicas que pueden coexistir (I^- y IO_3^-), dependiendo la proporción entre los distintos aniones de las condiciones edáficas y del potencial redox, siendo este factor el que controla la prevalencia de una forma u otra. Así, bajo condiciones reductoras como las que podemos encontrar en los arrozales, la forma dominante es el I^- y bajo condiciones oxidantes predomina la forma IO_3^- (Muramatsu et al., 1990; Yuita, 1992). Al analizar la concentración de yodo aérea encontramos diferencias significativas en ambos tratamientos ($P < 0.001$). Para los tratamientos con I^- se observó un incremento de la concentración foliar de este elemento traza paralelo a la dosis aplicada en la solución nutritiva hasta la concentración 120 μM , a partir de la cual se produjo una disminución (Fig. 1). Los tratamientos con IO_3^- siguieron la misma dinámica, observándose en este caso la máxima concentración en la dosis 80 μM (Fig. 2). Asimismo, la concentración de yodo radicular también presentó diferencias significativas entre los tratamientos, incrementándose a medida que aumentaban los niveles en la solución nutritiva, y encontrándose los valores más elevados en 240 μM para el I^- (Fig. 1) y a partir de 120 μM para el IO_3^- (Fig. 2). Los niveles de yodo radiculares superaron a los foliares en los tratamientos mayores o iguales a 80 μM para el I^- (Fig. 1) mientras que para el IO_3^- fueron superados en todos los tratamientos (Fig. 2). En las plantas control este elemento no fue detectado, aunque en otros

trabajos se han encontrado cantidades traza debido a que puede ser adquirido de la atmósfera por absorción foliar (Zhu et al., 2004).

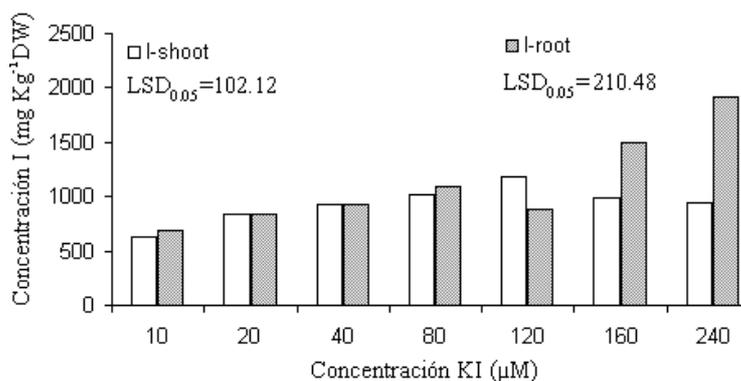


Figura 1. Efecto de las diferentes dosis de I^- sobre la concentración foliar y radicular de yodo

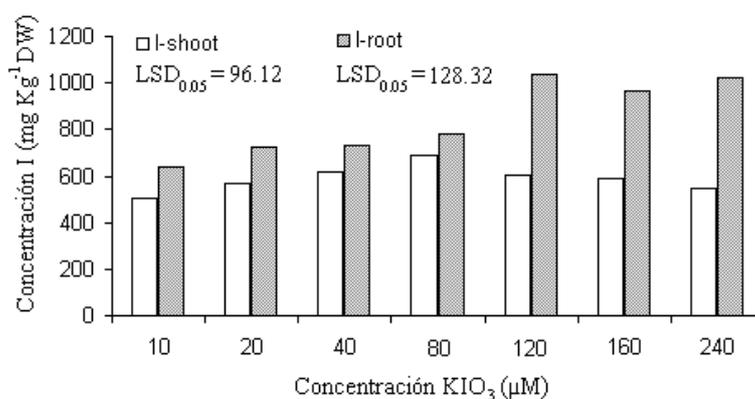


Figura 2. Efecto de las diferentes dosis de IO_3^- sobre la concentración foliar y radicular de yodo

La concentración de yodo en hojas y raíces de lechuga tratadas con I^- generalmente fue mayor que en las plantas tratadas con IO_3^- (Figs. 1 y 2). Este hecho es debido a que el yodato ha de ser reducido a yoduro antes de su absorción, de modo que la acumulación de I^- en los vegetales posiblemente se

vea limitada por el propio proceso de reducción (Whitehead, 1975; Zhu et al., 2003). Por esta razón, las raíces de plantas sometidas a IO_3^- únicamente deberían absorber este ión en forma de I^- como sugieren Böszörményi y Cseh (1960). Además, la absorción de un ión es principalmente determinada por el transporte a través de la membrana por lo que el diámetro y la valencia del ión juegan un papel principal en el transporte (Marschner, 1995). Por otro lado, la mayor retención radicular de yodo, especialmente en los tratamientos de I^- en las dosis 160 y 240 μM (Fig. 1), podría estar provocando una posible lignificación ya que visualmente las raíces disminuían su tamaño pero no variaba o incluso aumentaba levemente su peso seco (datos no mostrados).

En definitiva, nuestros resultados son similares a los descritos en la bibliografía. Así, Mackowiak y Grossl (1999) encontraron que la concentración de yodo en los tejidos vegetales analizados (raíz, tallo y hojas) era mayor cuando a las plantas de arroz se les aplicaba I^- de modo que los tratamientos con IO_3^- eran menos efectivos para suplementar a los vegetales. Por otra parte, Zhu et al. (2003) encontraron que a medida que incrementaba la concentración de yodo en la solución nutritiva aumentaba la concentración del elemento en la biomasa aérea, además los niveles foliares de I^- en los tratamientos 100 μM de I^- eran aproximadamente cinco veces mayor que en hojas de plantas tratadas con IO_3^- . Asimismo, encontraron que la concentración de yodo en las hojas era generalmente mayor que en las raíces. Del mismo modo, Dai et al. (2004) obtuvieron resultados similares al trabajar con distintos tipos de plantas, puesto que además de la relación entre la concentración de yodo de la solución y la

absorción del elemento, indicaron que la concentración de este elemento traza en la parte comestible de la espinaca era mucho mayor que para cualquier vegetal y tratamiento utilizado en el experimento. Aunque en todos estos casos se ha observado la relación directa entre concentración de la solución externa y la parte aérea, en nuestro trabajo los datos mostraron que a dosis elevadas existe una disminución de los niveles de yodo foliares (Figs. 1 y 2). Posiblemente dicha disminución ha pasado desapercibida por estos autores debido a que en ninguna de las experiencias descritas anteriormente se han usado dosis tan elevadas como las aplicadas en nuestro trabajo.

El FT nos puede dar una idea tanto de la biodisponibilidad cómo de la movilidad del yodo desde la solución externa hasta la parte aérea de la planta. Un incremento del FT nos indica una mayor eficiencia de absorción y acumulación en la parte aérea. De este modo, los resultados obtenidos mostraron un mayor FT para todos los tratamientos con I^- , presentando el máximo valor a la concentración $10 \mu M$ y disminuyendo al incrementar la concentración de yodo de la solución externa (Tabla 2). La disminución del FT para los tratamientos con IO_3^- fue 10 veces superior a los tratamientos con I^- (Tabla 2). Este menor FT para el IO_3^- puede deberse a su menor biodisponibilidad dada la necesidad de reducción del ión vía una reductasa estándar (Bienfait y Lüttge, 1988) antes de su captación, por ello tanto la absorción como la acumulación foliar se encuentran limitadas. La disminución de este factor a medida que incrementan las dosis de yodo de la solución nutritiva en ambos tratamientos puede deberse bien a que el elemento se esté

acumulando en otras partes de la planta, en este caso y como se puede observar en la figura 1 sucede en la raíz, o bien a una saturación de los transportadores, ya que se ha sugerido que la entrada de yodo a la planta puede producirse mediante absorción activa (Whitehead, 1973). Apoyando nuestros datos, Mackowiak y Grossl (1999) encontraron que la absorción de IO_3^- era más limitada que la de I^- y la captación de yodo estaba cada vez más restringida con el incremento de la concentración de la solución externa. Sin embargo, y en contraposición a nuestros resultados, los valores del FT para la forma I^- obtenidos por Zhu et al. (2003) incrementaban de 1 a 10 μM mientras que en dosis más elevadas permanecían constantes. Por otra parte, este factor para la forma IO_3^- disminuía al incrementar la concentración de la solución. Los valores de FT de nuestro trabajo son mayores que los aportados por Mackowiak y Grossl (1999) al trabajar con solución nutritiva y Shinonaga et al (2000) que llevó a cabo su experiencia en condiciones de campo, ya que el yodo tiene baja movilidad floemática y estos autores obtuvieron sus datos de concentración de I en granos de arroz y maíz respectivamente.

El CD hojas-raíz nos informa del lugar donde está siendo acumulado el yodo. Así, los resultados mostraron diferencias significativas para ambos tratamientos, encontrándose una mayor acumulación foliar de yodo desde las dosis más bajas hasta 120 μM para la forma I^- y hasta 80 μM para el IO_3^- produciéndose posteriormente una acumulación radical en dosis más elevadas (Tabla 2). Los datos del CD para plantas tratadas con I^- fueron mayores que para plantas tratadas con IO_3^- indicando una mayor acumulación de yodo en

hojas cuando las plantas son tratadas con I^- (Tabla 2). En este sentido, Zhu et al. (2003) observaron un incremento del CD paralelo al incremento de la concentración de yodo de la solución nutritiva en plantas tratadas con I^- mientras que plantas tratadas con IO_3^- los coeficientes eran similares en todo el rango de concentraciones aplicadas a la solución. En contraposición a nuestros datos, estos autores encontraron una mayor acumulación foliar de yodo cuando las plantas fueron tratadas con IO_3^- ya que los CD para esta forma fueron superiores que para el I^- . Posiblemente este hecho sea debido a que en espinaca se produce una mayor retención radicular de yodo en los tratamientos con I^- que en plantas de lechuga.

Tabla 2. Valores de factor de transferencia (FT), coeficiente de distribución (CD) y cantidad semanal recomendada (CSR) en plantas de lechuga sometidas a distintos tratamientos de yodo.

Tratamientos Dosis (μ M)	FT		CD		CSR	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
10	20.97	11.39	0.91	0.78	30.12	43.07
20	16.63	6.31	1.00	0,78	19.01	38.87
40	8.86	3.40	1.01	0.84	17.84	36.03
80	5.12	1.96	0.94	0.86	15.42	31.26
120	4.27	1.31	1.33	0.58	12.34	31.15
160	2.89	0.89	0.66	0.61	13.66	34.31
240	1.89	0.48	0.50	0.53	13.90	37.06
P-valor	***	***	***	***	***	***
LSD	1.14	0.94	0.09	0.06	0.94	1.62

Análisis de varianza			
Dosis (D)	***	***	***
Formas (F)	***	***	***
D x F	***	***	***
LSD	0.70	0.05	0.89

CSR: g PF

Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

Ya que el consumo de plantas de lechuga se realiza en hojas frescas, se calculó la concentración de yodo en peso fresco (datos no mostrados) y posteriormente la ingesta semanal de hojas que cubre las necesidades fisiológicas humanas de este elemento o cantidad semanal recomendada (CSR). Como podemos observar en la tabla 2, los datos mostraron diferencias significativas para ambos tratamientos encontrándose la máxima cantidad de peso fresco a ingerir en 10 μM para ambos tratamientos y la mínima en 120 μM para el I^- y en 80-120 μM para el IO_3^- .

A pesar de todos los estudios realizados hasta el momento sobre la aplicación de yodo a las plantas, ninguno de estos ha comprobado si este elemento traza puede influir sobre la calidad nutricional de la dieta vegetal. Cada vez existen un mayor número de evidencias científicas que señalan los efectos aditivos y sinérgicos que los compuestos antioxidantes procedentes de frutas y verduras pueden tener sobre la salud humana, ya que pueden disminuir el riesgo de padecer numerosas patologías relacionadas con el estrés oxidativo. Entre los fotoquímicos de mayor actividad encontramos los compuestos fenólicos que son un extenso grupo con un amplio rango de estructuras químicas. Un aspecto importante es que estos compuestos pueden formar radicales estables capaces modificar los procesos de oxidación mediados por radicales libres. Pueden actuar como quelantes de metales e inhibidores de enzimas como la xantina oxidasa, por lo que evitan la formación enzimática y no enzimática de ROS. Al ser buenos donadores de hidrógeno pueden impedir la reacción de propagación de los radicales generados en macromoléculas, rompiendo el ciclo

de generación de nuevos radicales. Además, a algunos se les ha atribuido un posible papel anticarcinogénico ya que son capaces de bloquear o inhibir enzimas que son potenciales activadoras de precarcinógenos, incluso pueden inhibir la proliferación celular actuando sobre la tirosina kinasa (Parr y Bolwell, 2000). Los resultados de nuestro trabajo mostraron diferencias significativas para ambos tratamientos, presentándose las máximas concentraciones en la dosis 160 μM para el I^- y en 80 μM para el IO_3^- (Tabla 3). La inducción de compuestos fenólicos era mucho mayor en plantas sometidas a tratamientos con I^- que en las plantas sometidas a IO_3^- (Tabla 3).

Otro de los compuestos antioxidantes de gran importancia son los flavonoides, familia que exhibe varias actividades biológicas incluyendo antialérgenos, antitumorales, antivirales y antioxidantes. Generalmente poseen un gran número de grupos hidroxilo, además de abundantes ortosustituciones con grupos metoxi o alquil que incrementan la estabilidad de los radicales libres y aumentan su potencial antioxidante (Rice-Evans et al., 1995). Aunque suelen encontrarse en bajas cantidades en frutas y verduras, pueden tener una gran actividad antioxidante (Shahidi y Wanasundara, 1992). En este caso, los estudios foliares mostraron de nuevo diferencias significativas en ambos tratamientos, hallándose que las dosis 120 y 160 μM de I^- presentaban un contenido en flavonoides 4-5 veces superior que el control (Tabla 3). En los tratamientos con IO_3^- no se observó este gran incremento, presentándose el máximo valor en 80 μM (Tabla 3).

Tabla 3. Influencia de las distintas dosis y formas de yodo sobre los compuestos antioxidantes.

Tratamientos Dosis (μM)	Fenoles		Flavonoides		Antocianinas		Ascorbato	
	I ⁻	IO ₃ ⁻						
0	43.50	43.50	0.31	0.31	31.66	31.66	10.73	10.73
10	130.18	34.73	0.94	0.26	43.00	31.00	14.05	10.73
20	118.81	76.94	1.00	0.54	39.34	37.67	12.78	11.36
40	254.84	84.71	1.69	0.59	41.33	33.66	13.56	11.02
80	443.46	95.12	3.11	0.68	57.02	47.66	17.07	12.39
120	587.27	69.14	4.28	0.56	49.01	34.02	19.12	13.85
160	775.89	71.09	5.32	0.62	50.00	32.01	23.22	12.49
240	334.05	51.61	2.58	0.38	46.67	33.33	22.15	13.07
<i>P</i> -valor	***	***	***	***	***	***	***	***
LSD	23.33	10.00	0.12	0.04	6.68	4.92	1.44	1.05

Análisis de la varianza				
Formas (F)	***		***	***
Dosis (D)	***		***	***
F x D	***		***	NS
LSD	12.19		0.06	3.98

Ascorbato, Fenoles y Flavonoides expresados como $\mu\text{g g}^{-1}$ PF; Antocianinas expresadas como D.O.

Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles en plantas (Wong, 1989). El interés actual en las propiedades biológicas de las antocianinas se debe tanto a su papel como antioxidante como al efecto potenciador que posee sobre algunos compuestos como el ácido ascórbico (García Alonso et al., 2004). Los resultados de nuestra experiencia mostraron diferencias significativas para ambas formas del yodo (Tabla 3). Asimismo la máxima concentración de estos pigmentos la podemos observar en la dosis 80 μM para ambos tratamientos siendo de nuevo la forma que más indujo la síntesis y acumulación de antocianinas el I⁻ (Tabla 3).

En último lugar, cabe destacar las funciones del ácido L-ascórbico (Vitamina C) que es el antioxidante hidrosoluble más abundante en las plantas. Los humanos son incapaces de sintetizarlo por lo que sus necesidades dependen completamente de su consumo a través de la dieta. Su principal función reside en su actividad antioxidante consistente en originar productos y radicales no tóxicos (Hassimotto, 2005) como por ejemplo el dehidroascorbato (DHA) o el ácido 2,3-diketoglucónico. Por otra parte, además de ser capaz de donar electrones a un amplio rango de sustratos, interviene en la regeneración del α -Tocoferol (Hassimotto, 2005). Tras realizar el análisis de esta vitamina, nuestros datos mostraron la existencia de un incremento significativo en las dosis 80 μ M o superiores para ambos tratamientos (Tabla 3), siendo la forma que más incrementó la concentración de ascorbato el I^- (Tabla 3).

Al examinar estos resultados podemos indicar que la aplicación de I^- no produce efectos fitotóxicos en las dosis 40 μ M o inferiores (Tabla 1), por lo que se observa una clara inducción de los compuestos antioxidantes analizados en nuestro trabajo (Tabla 3) y por lo tanto un posible efecto beneficioso de este elemento traza en las plantas. A dosis superiores sigue existiendo un incremento de dichos compuestos aunque en este caso se puede deber a un posible efecto tóxico del yodo ya que los datos muestran una reducción de la biomasa (Tabla 1). Por otra parte, el hecho de que en los tratamientos con IO_3^- no se observe una disminución de la biomasa (Tabla 1), ni una inducción tan significativa de los niveles foliares de los distintos compuestos antioxidantes como con la aplicación de I^- (Tabla 3), puede ser debido a que en ninguno de

los tratamientos con IO_3^- se alcanzaron concentraciones de yodo foliares tan elevadas como con los tratamientos de I^- (Figuras 1 y 2).

En los últimos años se han desarrollado numerosos métodos analíticos para cuantificar la actividad antioxidante de todo tipo de matrices como plasma, bebidas, frutas y verduras. Uno de los mayores problemas que se presenta es escoger el método de análisis químico ya que normalmente cada test es específico para una sola propiedad. Algunos de ellos pueden estar basados en la habilidad de inhibir la oxidación de un sustrato diana por parte de los radicales libres mientras que otros evalúan la capacidad de quelar metales o detoxificar radicales sintéticos como el catión 2,2'-azinois(3-etilbenzotiazolina 6-sulfonato) ($\text{ABTS}^{+\cdot}$). Por esta razón y con el fin de determinar la capacidad antioxidante de la manera más precisa posible, se ha llevado a cabo el análisis de diferentes test antioxidantes.

En primer lugar se realizó el análisis FRAP, ya que es considerado uno de los test más rápidos y usados para determinar la actividad antioxidante (Rice-Evans, 2000). Está basado en la reducción del complejo amarillo Fe^{3+} -TPTZ a un complejo de color azul, Fe^{2+} -TPTZ, por sustancias donadoras de electrones bajo condiciones ácidas. Por otra parte también se realizó el análisis TEAC, basado en la reducción del radical catiónico coloreado $\text{ABTS}^{+\cdot}$. La capacidad antioxidante es cuantificada análogamente como la concentración (en mM) de vitamina E soluble (Becker et al., 2004). Finalmente se llevó a cabo el test del Poder Reductor, el cual está basado en la transición del Fe^{3+} a Fe^{2+} por la

reducción del complejo ferricianida ferrica al complejo ferricianida ferrosa que posee color azul y sirve como un indicador significativo de la actividad antioxidante potencial de un extracto, medida como % de actividad equivalente de ácido ascórbico (1mM) (Meir et al., 1995).

Tabla 4. Respuesta de diferentes test antioxidantes en hojas de lechuga sometidas a distintas dosis y formas de yodo

Tratamientos Dosis (μM)	FRAP		TEAC		Poder Reductor	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	3.91	3.91	0.28	0.28	2.60	2.60
10	4.56	3.66	0.37	0.24	5.61	2.34
20	7.22	3.87	0.64	0.34	5.76	3.42
40	7.20	3.42	0.77	0.34	5.94	3.53
80	6.43	3.87	1.06	0.32	11.61	4.44
120	13.17	5.96	1.31	0.33	12.86	3.23
160	12.77	5.00	1.40	0.39	12.75	3.08
240	11.80	6.05	1.58	0.36	20.79	3.54
<i>P-valor</i>	***	***	***	***	***	***
LSD	0.19	0.65	0.12	0.02	3.63	0.34
Análisis de la varianza						
Formas (F)	***		***		***	
Dosis (D)	***		***		***	
F x D	***		***		***	
LSD	0.32		0.07		1.75	

FRAP: $\text{mmol FeSO}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PF}$; TEAC: $\mu\text{mol equivalentes trolox g}^{-1} \text{ PF}$; Poder Reductor: $\% \text{ g}^{-1} \text{ PF}$

Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

En esta experiencia los datos mostraron la existencia de diferencias significativas entre las distintas formas y dosis de yodo aplicadas respecto a las plantas control para todos los test (Tabla 4). La contribución al incremento de la capacidad antioxidante fue mucho mayor al aplicar los tratamientos con I^- como se puede observar en la tabla 4. Para todos los test se observó un

incremento en la capacidad antioxidante a medida que se incrementaba la concentración de yodo de los distintos tratamientos. En el test FRAP el mayor incremento se produjo en las concentraciones iguales o superiores a 120 μM para ambas formas, aunque la aplicación de I^- hizo que este aumento fuese 3-4 veces superior respecto a las plantas control mientras que la forma IO_3^- tan sólo incrementó 1-2 veces su capacidad antioxidante (Tabla 4). Por otra parte, en el análisis TEAC encontramos la máxima reducción del radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ en las dosis 160 μM y 240 μM para ambas formas, siendo de nuevo la forma aplicada de I^- la que produjo un mayor incremento respecto a plantas control (Tabla 4). En último lugar, al llevar a cabo el test del Poder Reductor los datos mostraron que para la forma I^- , la capacidad antioxidante aumentaba a medida que aumentaban las concentraciones de I^- , mientras que la forma IO_3^- presentó el mayor incremento en la dosis 80 μM (Tabla 4). También se observó una mayor capacidad antioxidante en plantas tratadas con I^- respecto a las plantas tratadas con IO_3^- (Tabla 4).

La efectividad de un programa de biofortificación con yodo viene determinada por la capacidad de los cultivos de acumular este elemento traza en las partes que están destinadas al consumo humano, es decir, para que estos programas se lleven a cabo con éxito es importante definir el tipo de cultivo. Además, su principal objetivo es lograr una acumulación de elemento en la parte comestible tal que, tras la ingesta de estos vegetales se cumpla la cantidad diaria recomendada (CDR) estipulada para adultos (150 μg diarios). Esta acumulación ha de producirse sin que se exista la aparición de efectos

fitotóxicos en las plantas y reducción de producción agrícola. Por otro lado, también es importante tener en cuenta el efecto del yodo sobre la calidad nutricional del cultivo de lechuga, asumida en este caso como un incremento de los compuestos antioxidantes y por tanto de la capacidad antioxidante de las plantas de lechuga. Para lograr estos objetivos se hace imprescindible precisar tanto la dosis como la forma de yodo a aplicar. Considerando todos estos aspectos podemos indicar que las dosis más apropiadas a aplicar en cultivo hidropónico de plantas de lechuga son 40 μM bajo la forma de I^- o 80 μM bajo la forma de IO_3^- por varias razones:

i) No se produce una reducción de la biomasa respecto a las plantas control.

ii) Causan un incremento de los compuestos antioxidantes de mayor relevancia para los vegetales, siendo superior en el caso de la aplicación de I^- al que podemos encontrar tras la aplicación de IO_3^- .

iii) Dan lugar a una acumulación foliar de yodo suficiente como para cubrir las necesidades fisiológicas de este elemento en humanos, garantizándose así la viabilidad del uso del cultivo de lechuga en un programa de biofortificación.

Finalmente, nuestros resultados son novedosos ya que se demuestra la posibilidad de considerar al yodo como un elemento beneficioso debido a que

la aplicación de ciertas dosis de este elemento traza, principalmente bajo la forma I⁻, incrementan la respuesta antioxidante de las plantas y por lo tanto la calidad nutricional, sin que se produzca un efecto fitotóxico.

II.4. Referencias

- Abrahams PW. 2006. Soil, geography and human disease: a critical review of the importance of medical cartography. *Progress in Physical Geography* 30: 490-512.
- Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH. 2004. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research Technology* 219: 561-571.
- 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.
- Bienfait F, Lüttge U. 1988. On the function of two systems that can transfer electrons across the plasma membrane. *Plant Physiology and Biochemistry* 26: 665-671.
- Böszörményi Z, Cseh E. 1960. The uptake and reduction of iodate by wheat-roots. *Current Science* 29: 340-341.

- Brazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, Welton PK. 2002. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in U.U. adults: The first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 93-99.
- Brown L, Rimm EB, Seddom JM, Giovannucci EL, Chasan-Taber L, Spiegelman D, Willet WC, Hankinson SE. 1999. A prospective study a carotenoid intake and risk of cataract extraction in U.S. men. *American Journal of Clinical Nutrition* 70: 517-524.
- Cai Y, Luo M, Sun HC. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medical plants associated with anticancer. *Life Science* 74: 2157-2184.
- Cao XY, Jiang XM, Kareem A, Dou ZZ, Rakeman MA, Zhang ML. 1994. Iodination of irrigation waters as a method of supplying iodine to a several iodine-deficient population in Xinjiang, China. *Lancet* 344: 107-109.
- Cho E, Seddom JM, Rosner B, Willet WC, Hankinson SE. 2004. Prospective study of intake of fruit, vegetables, vitamins and carotenoids and risk of age-related maculopathy. *Archives of Ophthalmology* 122: 883- 892.
- Connor AM, Finn CE, Alspach PA. 2005. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity and total phenolic content among blackberry and hybridberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130: 527-533.

- Dai JL, Zhu YG, Zhang M, Huang YZ. 2004. Selecting iodine-enriched vegetables and the residual effect of iodate application to soil. *Biology of Trace Element Research* 101: 265-276.
- Delange F. 2001. Iodine deficiency is a cause of brain damage. *Postgraduate Medical Journal* 77: 217-220.
- Draper A, Lewis J, Malhotra N, Wheeler E. 1993. The energy and nutrient intakes of different types of vegetarians, a cause for supplements? *British Journal of Nutrition* 69: 3-19.
- Ehling L. 1928. Über die quellen der pflanzlichen jodversorgung. Dissertation, Technische Hochschule, Stuttgart.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006). Disponible: <http://faostat.fao.org/site/554/DesktopDefault.aspx?PageID=554>
- Fields C, Dourson M, Borak J. 2005. Iodine deficient Vegetarians: A hypothetical perchlorate-susceptible population?. *Regional of Toxicology and Pharmacology* 42: 37-46.
- Fu J, Huang B. 2001. Involvement of antioxidant and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45: 105-114.
- García-Alonso M, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2004. Evaluations of the antioxidant properties of fruit. *Food Chemistry* 84: 13-18.
- Glioner D. 2001. Pregnancy and iodine. *Thyroid* 11: 471-481.
- Giacconi V. 1995. Cultivo de la lechuga. Universitaria Editorial. Santiago de Chile. 337.

- Gossett DR, Millhollon EP, Lucas MC. 1994. Antioxidant responses to NaCl stress in salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* 34: 706-714.
- Hassimotto NM. 2005. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2928-2935.
- Herret RA, Hatfield JrHH, Crosby DG, Vlitos AJ. 1962. Leaf abscision induced by the iodine ion. *Plant Physiology* 37: 358-363.
- Hsu CL, Chen W, Weng YM, Tseng CY. 2003. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chemistry* 83: 85-92.
- Joshipura KJ, Ascherio A, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Hennekens CH, Spiegelman D, Willet WC. 1999. Fruit and vegetable intake inrelation to risk of ischemic stroke. *Journal of the American Medical and Assistance* 282: 1233-1239.
- Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Colditz C, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D, Willet WC. 2001. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals International of Medicine* 134: 1106-1114.
- Juan M, Rivero RM, Romero L, Ruiz JM. 2005. Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 54: 193-201.
- Kersting M, Alexy U, Sichert- Hellert W. 2001. Dietary intakes and food sources of minerals in 1 to 18 year old German children and adolescents. *Nutrition Research* 21: 607-616.

- Kim D, Jeong SW, Lee CY. 2006. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 81: 321-326.
- Krajčovičová-Kudláčková M, Bučková K, Klimeš I, Ševoková E. 2003. Iodine deficiency in vegetarians. *Annals of Nutrition and Metabolism* 47: 183-185.
- Lightowler HJ, Davies G.J. 1996. Source of iodine in the vegan diet. *Proceedings of Nutrition Society* 55: 13.
- Mackoviak CL, Grossl PR. 1999. Iodate and iodide effect on iodine uptake and partitioning in rice (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture. *Plant and Soil* 212: 135-143.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Maz F. 1996. Schriftenreihe BMG N° 110. Baden-Baden, Nomos (in German)
- Mayer JE, Pfeiffer WH, Beyer P. 2008. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 166-170.
- Meir S, Kanner J, Akiri B, Hadas SP. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1813 - 817.
- Minguez-Mosquera MI, Jaren-Galen M, Garrido-Fernández J. 1993. Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. *Phytochemistry* 32: 1103-1108.

- Muramatsu Y, Uchida S, Sriyotha P, Sriyotha K. 1990. Some considerations on the sorption and desorption phenomena of iodide and iodate on soil. *Water, Air and Soil Pollution* 49: 125-138.
- Mynet A, Wain RL. 1973. Herbicidal action of iodine: effect on chlorophyll content and photosynthesis in dwarf bean *Phaseolus vulgaris*. *Weed Research* 13: 101-109.
- Parr AJ, Bolwell GP. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 985-1012.
- Re R, Pellegrini A, Proteggente A, Pannala M, Yang C, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- Rice-Evans CA. 2000. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Radical* 33: 559-566.
- Rice-Evans C, Miller MJ, Bolwell PG, Barmley PM, Pridham JB. 1995. The relative antioxidant activity of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 66: 401-436.
- Rivero RM, Ruiz JM, García PC, López-Lefebvre 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.

- 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 and Food Agriculture* 86: 1545-1551.
- 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.
- Sánchez-Mongue E. 1991. *Flora Agrícola*. Ministerio de agricultura; pesca y alimentación de España.
- Shahidi F, Wanasundara PKJPD. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Review of Food Science and Nutrition* 32: 67-103.
- Shinonaga T, Casta J, Muck K, Gerzabek MH. 2000. Determination of iodine in cereal grains and standard reference materials by neutron activation analysis. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* 78: 175-84.
- Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Albanes D, Beeson WL, Van der Brandt PA, Fescanich D, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldohm RA, Graham S, Kushi LH, Miller AB, Pietinen P, Rohan TE, Speizer FE, Willet WC, Hunter DJ. 2003. Fruits, vegetables and lung cancer: A pooled analysis of cohort studies. *International Journal of Cancer* 107: 1001-1011.
- Soudek P, Tykva R, Vaňková R, Vaněk T. 2006. Accumulation of radioiodine from aqueous solution by hidroponically cultivated sunflower (*Helianthus annulus* L.). *Environmental and Experimental Botany* 57: 220-225.

- Ticconi CA, Delatorre CA, Steffen A. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 963-972.
- Umaly RC, Poel LW. 1971. Effects of iodine in various formulations in growth of barley and pea plants in nutrient solution culture. *Annals of Botany* 35: 127-131.
- Welch RM, Graham RD. 1999. A new paradigm for world agriculture: meeting human needs. Productible, sustainable, nutritious. *Field Crop Research* 60: 1-10.
- Welch RM. 2002. The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. *Plant and Soil* 247: 83-90.
- Welch RM, Graham RD. 2005. Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 299-307.
- Welch RM. 2005. Biotechnology, biofortification and global health. *Food and Nutrition Bulletin* 26: 419-421.
- White PJ, Broadley MR. 2005. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science* 10: 586-593.
- White PJ, Broadley MR. 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist* 182: 49-84.
- Whitehead DC. 1973. Uptake and distribution of iodine in grass and clover plants grown in solution culture. *Journal of the Science and Food Agriculture* 24: 43-50.

- Whitehead DC. 1975. Uptake by perennial ryegrass of iodide, elemental iodine and iodate added to soil as influenced by various amendments. *Journal of the Science and Food Agriculture* 26: 361-367.
- Wong DWS. 1989. *Mechanism and Theory in food chemistry*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- World Bank. 1994. The challenge of dietary deficiencies of vitamins and minerals. *Amonymous enriching lives: overcoming vitamin and mineral malnutrition in developing countries* Washintong, DC. 6-13.
- Xiao E, Yang, Chen WR, Feng Y. 2007. Improving human micronutrient nutrition through biofortification in the soil-plant system: China as a case study. *Environmental and Geochemical Health* 29: 413-428.
- Yuita K. 1992. Dynamics of iodine, bromine and chlorine in soil. II. Chemical forms of iodine in soil solutions. *Soil Science and Plant Nutrition* 38: 281-287.
- Zhang L, Chen Z, Wang J, Bao J. 2002. Iodine loss iodinised salt during processing, sale and consumption. *Zhejiang Prevention Medicine* 12: 32-34.
- Zhu Y-G, Huang Y-Z, Hu Y, Liu Y-X. 2003. Iodine uptake by spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants grown in solution culture: effects of iodine species and solution concentrations. *Environment International* 29: 33-37.
- Zhu YG, Husng Y, Hu Y, Liu Y, Christie P. 2004. Interactions between selenium and iodine uptake by spinach (*Spinacea oleracea* L.) in solution culture. *Plant and Soil* 261: 99-105.

Bloque II

Biofortificación con yodo en plantas de lechuga:

implicaciones fisiológicas

Debido al gran desconocimiento que existe acerca de cómo la aplicación de elementos traza puede afectar al crecimiento y desarrollo de los cultivos, este segundo bloque está dirigido al estudio de la fisiología de plantas de lechuga sometidas a un proceso de biofortificación con yodo.

Basándonos en los datos obtenidos en el primer bloque y con el fin de simplificar el desarrollo del bloque II, se decidió prescindir de las dosis 10, 120, 160 y 240 μM de ambos tratamientos. Las razones que nos llevaron a tomar esta decisión fueron las siguientes:

- i) La aplicación de este elemento traza a dosis iguales a 10 μM mostraron un comportamiento muy similar al de las plantas control, sobre todo en el caso de la aplicación de IO_3^- .
- ii) Los tratamientos iguales o superiores a 80 μM de I^- resultaban fitotóxicos para las plantas de lechuga ya que reducían la biomasa vegetal. Este hecho fue determinante ya que al verse afectada la producción del cultivo, estas dosis no poseían interés desde el punto de vista agronómico.
- iii) La concentración de yodo en la parte aérea alcanzó su máximo valor en las dosis 80 μM de IO_3^- , momento a partir del cual este elemento empezó a acumularse en mayor cantidad en la raíz.

Finalmente, el diseño experimental quedó compuesto por las plantas control y los tratamientos 20 40 y 80 μM de I^- o IO_3^- respectivamente.

Con los resultados que se presentan en este Bloque II se han elaborado las siguientes publicaciones:

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Rios JJ, Cervilla LM, Rosales MA, Rubio-Wilhelmi MM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L

Título: Evaluación del yodo como elemento beneficioso y su papel sobre la acumulación y reducción de nitratos en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Longifolia)

Ref. € revista: € libro: Presente y Futuro de la Nutrición Mineral de las Plantas

Clave: CL Volumen: 1 Páginas, inicial: 519 final: 531 fecha: 2008

Editorial (si libro): INDEMA ISBN: 978-84-89780-10-7

Lugar de publicación: Granada (España)

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Rios JJ, Cervilla LM, Rubio-Wilhelmi MM, Rosales MA, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L

Título: Aplicación de yodo como elemento beneficioso potencial. Influencia sobre la reducción de NO_3^- en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Tipo de participación: Oral (S2O9)

Congreso: *XII Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas*

Publicación:

Lugar celebración: Granada (España)

Fecha: 2008

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Ríos JJ, Cervilla LM, Rubio-Wilhelmi MM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L

Título: Fotorrespiración en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.): proceso influenciado por la biofortificación con yodo

Tipo de participación: Poster (S1P7)

Congreso: *XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV) – XI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal*

Publicación:

Lugar celebración: Zaragoza (España)

Fecha: 2009

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Ríos JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi MM, Rosales MA, Ruiz JM, Romero L

Título: Iodine biofortification affects nitrogen use efficiency of lettuce plants (*Lactuca sativa* L.)

Ref. revista: *HortScience* (aceptado)

Fecha: 2010

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Ríos JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi MM, Rosales MA, Ruiz JM, Romero L

Título: Photorespiration and Nitrogen metabolism in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.): induced changes in response to iodine biofortification

Ref. revista: *Journal of Plant Growth Regulation* (en revision) Fecha: 2010

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Ríos JJ, Leyva R, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi MM, Rosales MA, Ruiz JM, Romero L

Título: Is affected the oxidative metabolism in lettuce plants by iodine biofortification?

Ref. revista: *Environmental and Experimental Botany* (en revisión) Fecha: 2010

■ Autores (p.o. de firma): Blasco B, Ríos JJ, Leyva R, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi MM, Rosales MA, Ruiz JM, Romero L

Título: Study of the ionome in lettuce plants: Influence of iodine biofortification

Ref. revista: *Plant and Soil* (enviado) Fecha: 2010

BLOQUE II CAPÍTULO 1

¿ESTÁ EL METABOLISMO OXIDATIVO DE PLANTAS DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA* L. VAR. *LONGIFOLIA*) INFLUENCIADO POR LA BIOFORTIFICACIÓN CON YODO?

II.1.1. Introducción

Bajo condiciones normales de crecimiento, los organismos aeróbicos producen especies reactivas de oxígeno (ROS) a bajos niveles en los diferentes procesos metabólicos. Sin embargo, durante su ciclo de vida las plantas están expuestas a distintos tipos de estrés que alteran la homeostasis celular. Estos estreses pueden ser originados por la actividad humana o por causas naturales como, por ejemplo, temperatura, luz, sequía y limitaciones nutricionales. El común denominador de todas estas condiciones adversas es la sobreproducción de ROS en los distintos compartimentos celulares, por lo que es posible que actúen como señales para la activación de la respuesta al estrés. (Mittler, 2002; Arora et al., 2002; Jaleel et al., 2009). Este incremento de ROS generalmente es conocido con el sobrenombre de “estrés oxidativo”.

La molécula de oxígeno (O_2) no es reactiva “per se” debido a su configuración electrónica, por lo que necesita ser activada para dar lugar a la formación de ROS. Para ello, en primer lugar se requiere energía y la donación de un electrón, posteriormente las reducciones pueden suceder espontáneamente o demandar un donador de e^-/H^+ apropiado. De este modo, una molécula inerte pasa a generar radicales libres como los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e

hidroperoxil (OH^\cdot) y moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Blokhina et al., 2003). Habitualmente la fotosíntesis y fotorrespiración han sido consideradas como las principales fuentes de ROS en la planta, aunque recientemente se ha observado que procesos como la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la oxidación de proteínas contribuyen de manera importante a la generación de estrés oxidativo en la planta. Así, los sitios donde se van a generar en mayor cantidad estas moléculas reactivas son los cloroplastos, mitocondria, peroxisoma, membrana plasmática y apoplasto (Foyer y Noctor, 2003; Ahmad et al., 2008).

Los ROS además de ser una parte fundamental de la comunicación química celular básica, regulan numerosos procesos metabólicos que son activados en respuesta al estrés oxidativo. Para mantener la regulación redox a la que están sujetas estas respuestas es necesario que exista un riguroso balance entre la producción y detoxificación de ROS (Arora et al., 2002; Fedoroff, 2006). Cuando se rompe este equilibrio y la producción supera la detoxificación, se produce un incremento de radicales que causan daño celular a distintos niveles. Los ROS reaccionan con los ácidos grasos insaturados de la membrana y pueden iniciar una cadena de reacciones auto-oxidativas, generando la peroxidación de lípidos y en consecuencia un efecto perjudicial o fitotóxico (Smirnoff, 2000a). A nivel proteico, este ataque oxidativo produce una modificación específica de aminoácidos que resulta en un incremento de la susceptibilidad a la proteólisis. Además, también pueden

inducir numerosas lesiones letales al ADN como mutaciones y deleciones entre otras (Srivalli et al., 2003).

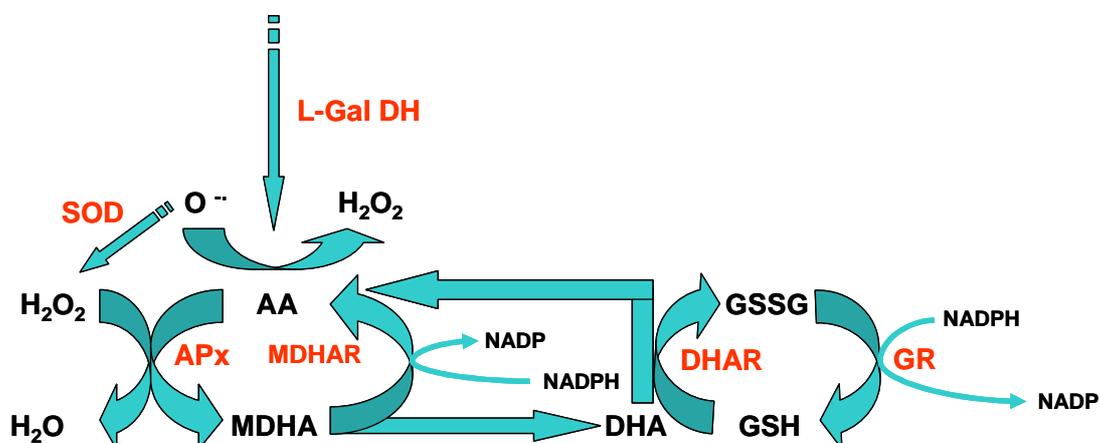
Para evitar todos estos daños producidos por el estrés oxidativo y debido a que los ROS son especies cargadas que no pueden atravesar la membrana (excepto el H_2O_2), las plantas han desarrollado numerosos sistemas antioxidantes en todos los compartimentos celulares (Blockhina et al., 2003). La expresión de estos sistemas antioxidantes varía en respuesta a las alteraciones metabólicas generadas por un ambiente cambiante. Así, la habilidad de las plantas para movilizar las defensas frente a los ROS va a ser un factor determinante en la tolerancia de la planta a las condiciones adversas. De este modo, plantas que posean elevados sistemas antioxidantes, bien de forma constitutiva o bien de forma inducida, tienen una mayor resistencia frente al estrés oxidativo (Stohr y Stremlau, 2006; Mullineaux et al., 2006).

El término antioxidante hace referencia a la actividad que poseen numerosos metabolitos secundarios, vitaminas y otros fitoquímicos para actuar como protectores frente al daño producido por los radicales libres (Mc Dermott, 2000; Eraslan et al., 2007). Las células vegetales normalmente se encuentran protegidas por un complejo sistema antioxidante que puede ser enzimático y no enzimático. Entre los sistemas antioxidantes enzimáticos encontramos la superóxido dismutasa (SOD), enzima encargada de combatir el estrés oxidativo generado por un estrés abiótico. Esta enzima constituye la primera línea de defensa frente a los ROS (Alscher et al., 2002) y juega un papel crítico en la

supervivencia de las plantas. Se trata de una metaloenzima que produce la dismutación del radical $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y O_2 (Esquema 1). Su acción combinada con la actividad catalasa (CAT) combate la formación del radical más tóxico y reactivo, el radical OH^{\cdot} que puede reaccionar de forma indiscriminada con todas las macromoléculas (Scandalios, 1997).

La actividad ascorbato peroxidasa (APX) también incrementa en respuesta a una gran variedad de estreses bióticos y abióticos. Es una de las enzimas involucradas en la detoxificación del H_2O_2 en el ciclo de Halliwell-Asada (Esquema 1). Para ello, el ascorbato (AA) actúa como donador de electrones siendo oxidado por la APX a monodehidroascorbato (MDHA), que puede ser regenerado a AA por la acción de la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) usando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Este MDHA, puede transformarse en dehidroascorbato (DHA) mediante reacciones no enzimáticas, que será usado para la regeneración de AA por la dehidroascorbato reductasa (DHAR). Finalmente, la enzima DHAR actúa gracias a la oxidación glutatión reducido (GSH) que pasa a su forma oxidada (GSSG), el cual es transformado de nuevo en GSH en presencia de NADPH por la enzima glutatión reductasa (GR) (Asada, 1999). Aunque la GR forma parte del ciclo ascorbato-glutatión catalizando el último paso, es considerada una enzima antioxidante de gran relevancia ya que juega un papel fundamental en el mantenimiento del pool de GSH. Asimismo, se ha observado que existe un incremento en su actividad como respuesta al estrés ambiental

por lo que también puede estar relacionada con la tolerancia de las plantas a las condiciones adversas (Ishikawa y Shigeoka, 2008; Ahmad et al., 2008).



Esquema 1. Esquema de la detoxificación de las distintas formas de ROS

La actividad CAT es indispensable para la detoxificación de ROS durante el estrés ya que puede dismutar H_2O_2 y puede actuar neutralizando o detoxificando radicales libres y oxointermediarios (Esquema 1) (Karpinski y Muhlenbock, 2007; Sang et al., 2007). En plantas C3 es muy abundante en los peroxisomas, donde elimina el H_2O_2 producido durante la fotorrespiración por la conversión del glicolato en glioxilato. Debido a que se ha demostrado que existe una proliferación de peroxisomas bajo condiciones adversas, es considerada una de las principales enzimas detoxificadoras de los radicales producidos durante un estrés (Foyer y Fletcher, 2001; Mittler, 2002).

El sistema no enzimático de defensa vegetal frente al estrés oxidativo está constituido por moléculas antioxidantes como el AA, GSH, α -tocoferol, carotenoides y compuestos fenólicos. Cabe destacar el la función del AA por

ser el antioxidante soluble más abundante que ha sido detectado en la mayoría de los tipos celulares, orgánulos y apoplasto (Smirnoff, 2000b; Giovannoni, 2007). Esta molécula detoxifica un gran número de radicales libres y principalmente H_2O_2 , minimizando así el daño oxidativo a numerosas actividades enzimáticas y previniendo la fotooxidación. Además de su función frente al estrés oxidativo, el AA está involucrado en el normal funcionamiento de numerosos procesos fisiológicos como crecimiento, diferenciación, respuesta frente a patógenos y metabolismo vegetal (Mehiron et al., 1996; Jaleel et al., 2009). También adquiere gran importancia la molécula de GSH por ser la molécula azufrada de bajo peso molecular más abundante en las plantas y representar el mayor pool de azufre reducido no proteico (Kunert y Foyer 1993). Este tripeptido está envuelto en la regulación redox pudiendo existir tanto en su forma reducida GSH como oxidada GSSG. Es la molécula encargada de la regeneración del AA, ya que el GSH reduce rápidamente el DHA a AA por la acción de la GR principalmente, aunque esta reacción también puede ser catalizada por otras enzimas como las glutarredixinas (tioltransferasas), isomerasas e inhibidores de la tripsina (Wells et al., 1990; Trümper et al., 1994; Rouhier et al., 2008). A pesar de ser un antioxidante de gran importancia, una elevada biosíntesis de GSH en los cloroplastos no es beneficioso para las plantas, pues más que proteger la célula vegetal, puede resultar en un daño oxidativo posiblemente debido a la alteración del estado redox de este orgánulo (Mittler, 2002).

Recientemente, se ha comprobado que la aplicación de este elemento traza en programas de biofortificación en plantas de lechuga, afecta a la fisiología de los cultivos produciendo un incremento de su capacidad antioxidante (Blasco et al., 2008). Este hecho sumado a que existen evidencias de que una aplicación en exceso produce fitotoxicidad en las plantas (Cao et al., 1994; Zhu et al., 2003; Blasco et al., 2008) nos llevo a plantear el objetivo de nuestro trabajo que fue comprobar si la biofortificación con yodo en plantas de lechuga produce alteración del metabolismo oxidativo de este cultivo.

II.1.2. Material y Métodos

Tanto las condiciones de cultivo, los tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico son iguales a los descritos en el Bloque I.

II.1.2.1. Muestreo del Material Vegetal

Parte aérea de plantas de lechuga fueron muestreadas a los 66 días después de la germinación de las plantas. Una parte de este material vegetal tras cuantificar el peso fresco (PF) fue secado mediante liofilización para calcular el peso seco (PS). El resto del material vegetal muestreado fue usado para el ensayo del H₂O₂, formas de AA y de GSH y actividades antioxidantes.

II.1.2.2. Análisis del Material Vegetal

II.1.2.2.1. Determinación de peróxido de hidrógeno

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 μ L de dióxido de titanio al 0.1% en 20% (v/v) de H_2SO_4 . El resultado se agitó y centrifugó a 3500 rpm 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.

II.1.2.2.2. Análisis de las formas de ascorbato y glutatión

Para la extracción y cuantificación de AA total (AA reducido + DHA), AA 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 AA 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 FeCl₃ 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 AA que siguió el mismo procedimiento anterior. Los resultados obtenidos se utilizaron para cuantificar la concentración de AA total, mientras que la cuantificación de AA reducido se realizó de igual forma que el procedimiento anterior sustituyendo 0.1 mL de DTT por 0.1 mL de H₂O₂ destilada. Finalmente, la concentración de DHA se dedujo de la diferencia entre AA total y AA reducido.

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 x 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.

II.1.2.2.3. Determinación de las enzimas antioxidantes

II.1.2.2.3.1. 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). La extracción se realizó homogenizando 1.5 g de hojas de lechuga en 5 mL de un buffer Heppes-CIH 50 mM pH 7.6 que contenía 0.1 mM EDTA- Na_2 . Seguidamente, el homogeneizado se centrifugó a 11000 rpm a 4 °C

durante 10 min. Para la cuantificación de la actividad SOD se emplearon 5 mL de una mezcla de reacción que contenía 50 mM Na₂CO₃ (pH 10), 13 mM de metionina, 0.025% (v/v) de Triton X-100, 63 µM de riboflavina y una alícuota de extracto enzimático. Esta mezcla fue iluminada con un PPFD de 380 µmol⁻²s⁻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) min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, donde una unidad es la cantidad de dicha enzima requerida para causar la inhibición del 50 % de la reducción del NBT.

II.1.2.2.3.2. Catalasa

La actividad CAT se determinó midiendo el consumo de H₂O₂ a 240 nm durante 5 min a 25°C (Nakano y Asada, 1981; Rao et al., 1997). Para la extracción de esta enzima se tomó una cantidad aproximada de 1.5 g de material vegetal y se homogeneizó con 5 mL de buffer Heppes-ClH 25 mM pH 7.8. El extracto vegetal resultante fue filtrado y centrifugado a 11.500 rpm a 4°C durante 20 min. El sobrenadante obtenido fue utilizado para medir la actividad CAT. 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 H₂O₂ y extracto enzimático.

II.1.2.2.3.3 Ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa

El ensayo de la enzima APX se realizó de acuerdo a Rao et al. (1996). Para la extracción de la enzima, 1.5 g de material vegetal fue homogeneizado con 5 mL de buffer fosfato potásico (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) 100 mM pH 7.5 que contenía 1 mM de EDTA- Na_2 . El extracto resultante fue filtrado y centrifugado a 12.000 rpm durante 20 min. La cualificación de la actividad de esta enzima se realizó mediante el cambio en la absorbancia a 290 nm durante 3 min de una mezcla de reacción (3.75 mL) compuesta por 100 mM de buffer fosfato potásico (pH 7.5), 0.5 mM de AA, 0.2 mM de H_2O_2 y 0.75 mL de extracto enzimático.

El ensayo de la enzima GR se realizó de acuerdo a Rao et al. (1996) y se utilizó el mismo extracto enzimático que para la enzima APX. 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 Na_2 -EDTA, 0.2 mM de NADPH, 0.5 mM de GSSG y 0.75 mL de extracto enzimático.

II.1.2.2.3.4. Monodehidroascorbato reductasa y dehidroascorbato reductasa

La extracción de las enzimas MDHAR y DHAR se realizó mediante una homogenización de 0.2 g de material vegetal en el siguiente buffer de extracción: 100 mM tampón fosfato potásico pH 7.0, 0.1 mM EDTA- Na_2 , 1 mM PhenylMethaneSulfonyl Fluoride (PMSF), 1 mL Tritón-X-100 al 0.5% y PVPP al

5% (w/v). Después se procedió a la centrifugación de las muestras a 9500 rpm durante 20 min.

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 AA, 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 $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

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 $7.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.1.2.2.3.5. L-Galactosa deshidrogenasa

La actividad 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 $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

II.1.2.2.4. Cuantificación de las proteínas de extractos enzimáticos

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

II.1.3. Resultados y discusión

El H_2O_2 es una molécula señal que interviene en numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos (Álvarez et al., 1998; Potikha et al., 1999; Melillo et al., 2006). De este modo es generada a niveles basales en el normal funcionamiento del metabolismo celular, principalmente durante la fotosíntesis y fotorrespiración (Li et al., 2009). Se puede producir un incremento en los niveles de H_2O_2 frente a una amplia gama de estreses bióticos y abióticos y, aunque se trata de una molécula menos reactiva que O_2^- , en presencia de metales de transición reducidos como el Fe^{2+} puede dar lugar a la formación de OH^\cdot . Por ello, el H_2O_2 es una de las causas por las que se puede producir la peroxidación de lípidos (Blokhina et al., 2003, Rios et al., 2009). Los análisis foliares mostraron una menor concentración de H_2O_2 en aquellas plantas tratadas con I^- (Fig. 1, $P < 0.001$), encontrándose la mínima concentración en el tratamiento $80 \mu\text{M I}^-$. Sin embargo, los tratamientos con IO_3^- produjeron un

incremento de la concentración de esta ROS respecto a las plantas control (Fig. 1, $P < 0.001$), presentándose el máximo valor en la dosis 80 μM de IO_3^- .

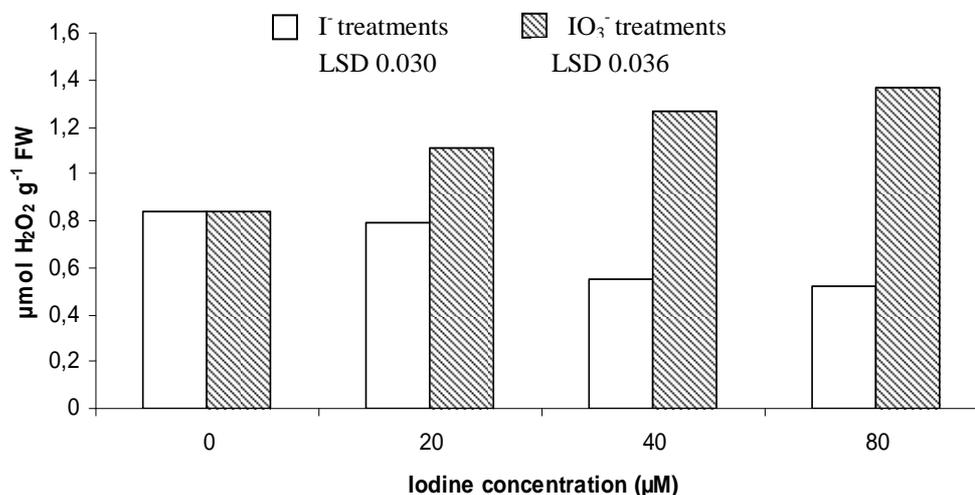


Figura 1. Influencia de la aplicación de diferentes formas y dosis de yodo sobre la concentración foliar de H_2O_2 .

Para combatir el estrés oxidativo en cloroplastos y otros orgánulos es imprescindible que existan elevadas concentraciones de antioxidantes como ácido ascórbico y glutatión (Mittler, 2002). Los datos mostraron que la aplicación de ambas formas de yodo produjo un incremento en la concentración de AA reducido, especialmente cuando el tratamiento aplicado era 80 μM de I^- (Tabla 1). En el caso del DHA podemos observar que de nuevo ambos tratamientos produjeron un incremento del ascorbato oxidado, encontrándose el máximo valor en la dosis 80 μM de I^- (Tabla 1). En relación al AA total, los datos mostraron un incremento de este compuesto paralelo al incremento de la concentración de yodo en la solución, siendo más elevado en el caso de la aplicación de I^- (Tabla 1). Cabe destacar que la aplicación de este elemento traza produjo un incremento de la forma reducida del AA, que es

considerada como la más importante porque además de poseer una gran capacidad de donar electrones en un amplio rango de reacciones enzimáticas y no enzimáticas, es capaz de detoxificar directamente los radicales 1O_2 , $O_2^{\cdot-}$ y $\cdot OH$ (Ahmad et al., 2008). Este hecho hace que adquiera una gran relevancia en la lucha frente el estrés oxidativo, aportando un incremento de la tolerancia de las plantas frente a diferentes tipos de estrés (Blokhina et al., 2002; Stevens et al., 2008).

Tabla 1. Influencia de la aplicación de diferentes formas y dosis de yodo sobre la concentración foliar de las distintas formas de ascorbato.

Tratamientos Dosis (μM)	AA reducido		DHA		AA total	
	I ⁻	IO ₃ ⁻	I ⁻	IO ₃ ⁻	I ⁻	IO ₃ ⁻
0	10.7	10.7	1.34	1.34	12.0	12.0
20	12.7	13.3	2.54	2.56	15.3	15.9
40	13.5	11.0	2.67	3.18	16.2	14.2
80	17.0	12.3	6.16	2.32	23.2	14.7
P-valor	***	***	*	*	**	***
LSD	1.97	0.27	4.28	0.11	5.53	1.04
Análisis de varianza						
Dosis (D)	***		NS		***	
Formas (F)	***		NS		*	
D x F	***		NS		**	
LSD	0.94		2.03		2.59	

Formas de AA expresadas en $\mu g g^{-1}$ peso fresco (PF)

Los niveles de significancia son representados como: NS: (no significativo) $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$

Además, este antioxidante posee un valor agronómico añadido por los beneficios nutricionales que aporta su consumo, considerándose un parámetro postcosecha relevante en la calidad nutricional de los productos vegetales destinados al consumo humano (Malacrida et al., 2006).

Tabla 2. Influencia de la aplicación de diferentes formas y dosis de yodo sobre la concentración foliar de las distintas formas de glutatión.

Tratamientos Dosis (μM)	GSH reducido		GSSG		GSH total	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	1.26	1.26	4.47	4.47	5.73	5.73
20	1.17	0.50	4.27	4.39	5.44	4.90
40	1.53	0.32	4.30	4.42	5.83	4.75
80	0.60	0.39	5.82	5.11	6.42	5.50
P-valor	***	***	***	***	***	***
LSD	0.28	0.20	0.23	0.21	0.20	0.17

Análisis de varianza			
Dosis (D)	***	***	***
Formas (F)	***	*	***
D x F	***	***	***
LSD	0.12	0.14	0.12

Formas de GSH expresadas en $\text{mM g}^{-1} \text{PF}$

Los niveles de significancia son representados como: NS: (no significativo) $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$

El GSH es un tripeptido de secuencia L glutamil-L-cisteinil-glicina. Interviene en la regeneración del AA ya que esta molécula actúa como donador de electrones de la DHAR para el mantenimiento del pool del AA reducido. En el presente estudio, tan sólo la aplicación de $80\mu\text{M}$ de I^- produjo una disminución de la concentración de GSH reducido (Tabla 2). Sin embargo, en todos los tratamientos con IO_3^- la concentración de este compuesto reducido disminuyó significativamente respecto a las plantas control (Tabla 2). Al mismo tiempo, la aplicación de ambas formas de yodo produjo un incremento de GSSG cuando la dosis aplicada era $80\mu\text{M}$ (Tabla 2). Así, la concentración de GSH total se vio incrementada con la aplicación de $80\mu\text{M}$ de I^- , mientras que disminuyó ligeramente tras la aplicación de cualquier dosis de IO_3^- (Tabla 2).

Para controlar los niveles de ROS y proteger a las células del daño oxidativo, las plantas poseen un conjunto de enzimas detoxificadoras y un sistema de regeneración del AA. De todas ellas, las más eficientes eliminando estos radicales son la SOD, APX y CAT ya que su acción combinada neutraliza el daño producido por $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 transformándolos en H_2O y una molécula de O_2 (Scandalios, 1997). La Fig. 2 mostró que en todos los tratamientos la aplicación de I^- produjo una disminución de la actividad SOD ($P < 0.001$), mientras que los tratamientos con IO_3^- produjeron un incremento de esta actividad enzimática cuando la dosis aplicada era igual o superior a $40 \mu M$ ($P < 0.001$).

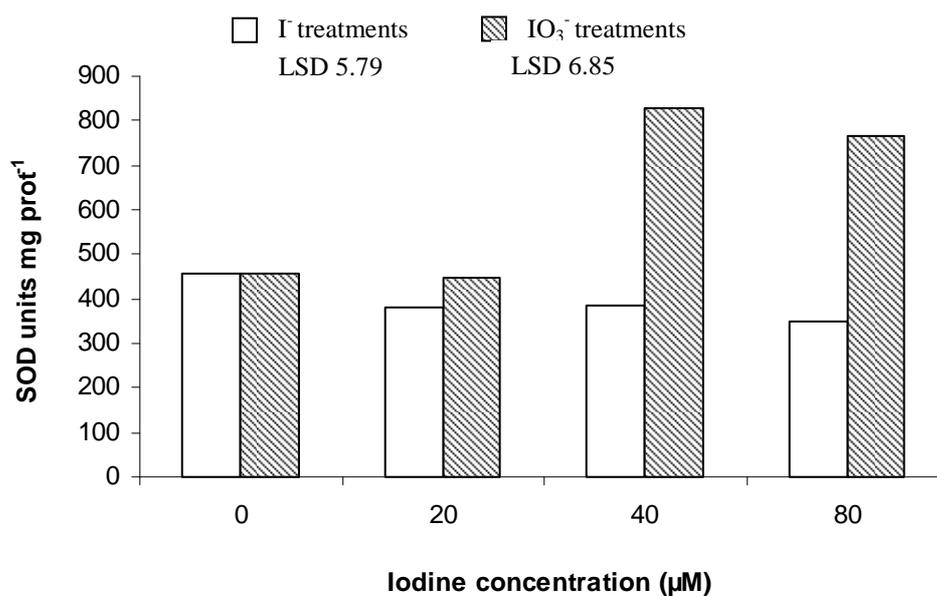


Figura 2. Influencia de la aplicación de diferentes formas y dosis de yodo sobre la actividad foliar SOD.

La actividad APX únicamente se vio afectada cuando los tratamientos aplicados eran en forma de IO_3^- , encontrando un incremento de esta actividad enzimática a lo largo de todas las dosis utilizadas (Fig. 3; $I^- P > 0.05$, $IO_3^- P < 0.01$). Además, la actividad CAT incremento con la aplicación de ambas formas

de yodo, encontrando el máximo valor en la dosis 80 μ M de IO_3^- (Fig. 4; I^- $P < 0.001$, IO_3^- $P < 0.001$).

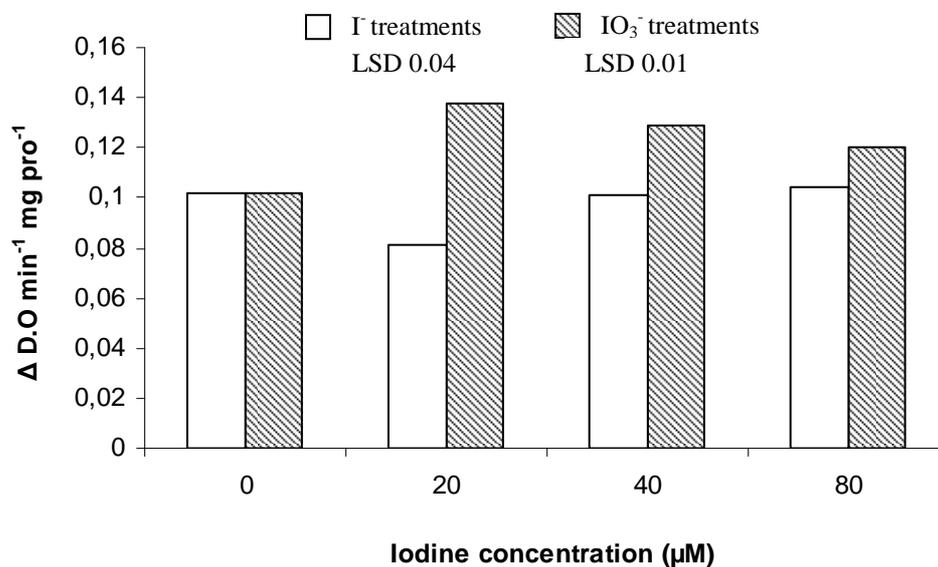


Figura 3. Influencia de la aplicación de diferentes formas y dosis de yodo sobre la actividad foliar APX.

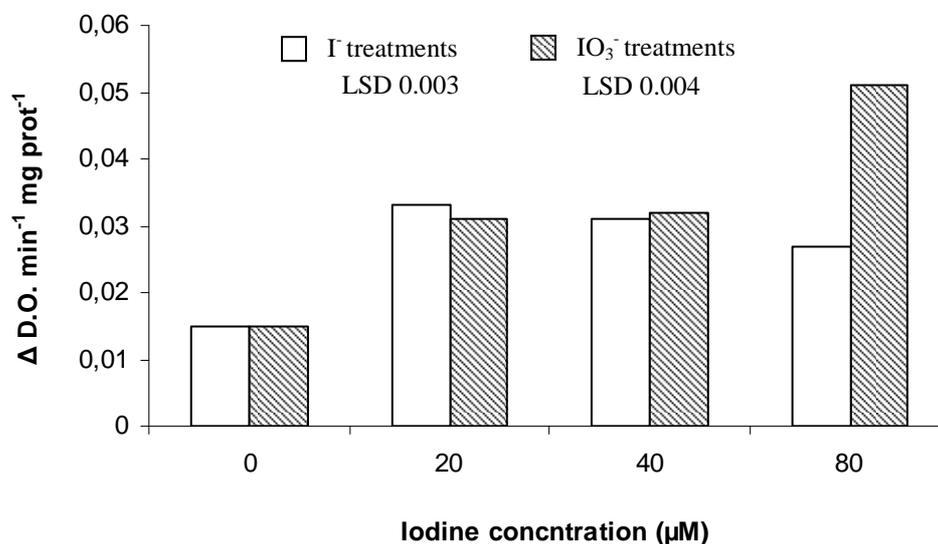


Figura 4. Influencia de la aplicación de diferentes formas y dosis de yodo sobre la actividad foliar CAT.

Numerosos estudios han demostrado que ante un estrés ambiental el incremento de la actividad APX normalmente va acompañado de un incremento

de las actividades SOD y CAT (Shigeoka et al., 2002). Sin embargo, en este caso los tratamientos con I^- no afectaron a la actividad APX (Fig. 3). Asimismo tanto el incremento de la actividad CAT (Fig.4) como la disminución de la actividad SOD (Fig.2) quedan reflejadas en la menor concentración de H_2O_2 (Fig. 1) de las plantas de lechuga sometidas a los distintos tratamientos con I^- . Este hecho puede estar generando una acumulación de $O_2^{\cdot -}$ ya que este radical no es transformado en H_2O_2 y no puede ser detoxificado vía APX, lo que podría explicar en parte el efecto fitotóxico de la aplicación de elevadas dosis de I^- . Por otra parte, en los tratamientos con IO_3^- si se pudo observar un incremento conjunto de las actividades SOD, APX y CAT (Figs. 2, 3 y 4) lo que estaría indicando en parte una correcta eliminación de las ROS. En estos tratamientos el incremento del H_2O_2 (Fig. 1) además de ser explicado por el incremento de la actividad SOD, también puede atribuirse a la generación de esta molécula en el desarrollo de otros procesos fisiológicos como la fotorrespiración, β -oxidación de ácidos grasos y fotosíntesis entre otras (Mittler, 2002).

El reciclado del AA es muy importante dado el papel que juega tanto en la repuesta a los diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos como en el incremento de la tolerancia de los cultivos a estas condiciones adversas (Stevens et al., 2008). En este estudio la actividad regeneradora MDHAR se vio incrementada tras la aplicación de ambas formas de yodo (Tabla 3). Sin embargo, mientras que la aplicación de I^- no tuvo efecto sobre la actividad DHAR (Tabla 3), la aplicación de IO_3^- incrementó esta actividad enzimática

(Tabla 3) respecto a las plantas control. Del mismo modo, la aplicación de yodo incrementó la actividad GR (Tabla 3) únicamente cuando los tratamientos aplicados eran iguales o superiores a 40 μM de IO_3^- (Tabla 3).

Tabla 3. Influencia de la aplicación de diferentes formas y dosis de yodo sobre las actividades foliares dehidroascorbato reductasa, monodehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa

Tratamientos Dosis (μM)	MDHAR		DHAR		GR	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	0.59	0.59	0.84	0.84	$1.17 \cdot 10^{-4}$	$1.17 \cdot 10^{-4}$
20	1.13	0.62	0.85	0.94	$1.03 \cdot 10^{-4}$	$1.14 \cdot 10^{-4}$
40	1.02	0.82	0.86	1.06	$9.76 \cdot 10^{-5}$	$1.29 \cdot 10^{-4}$
80	1.05	0.80	0.74	1.13	$9.91 \cdot 10^{-5}$	$1.67 \cdot 10^{-4}$
P-valor	**	**	NS	***	NS	*
LSD	0.24	0.01	0.10	0.06	$4.33 \cdot 10^{-5}$	$3.48 \cdot 10^{-5}$
Análisis de varianza						
Dosis (D)	***		**		NS	
Formas (F)	***		***		**	
D x F	**		***		NS	
LSD	0.12		0.05		$2.55 \cdot 10^{-5}$	

Actividades enzimáticas MDHAR, DHAR y GR expresadas como $\Delta\text{D.O. min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$
 Los niveles de significancia son representados como: NS: (no significativo) $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$

Además del beneficio aportado a las plantas, desde el punto de vista nutricional la biosíntesis del ácido ascórbico en los vegetales adquiere una gran relevancia. Esta vitamina se produce x la vía D-manosa/L-galactosa, siendo el precursor de este antioxidante el L-galactono-1,4,lactona y la enzima encargada de su formación la L-galactona deshidrogenasa (L-Gal DH) (Ishikawa y Shigeoka, 2008). La actividad biosintética L-Gal DH incrementó tras la aplicación de ambas formas de yodo, siendo más elevada en el caso de la aplicación de I^- . (Fig. 5; $\text{I}^- P < 0.001$, $\text{IO}_3^- P < 0.05$)

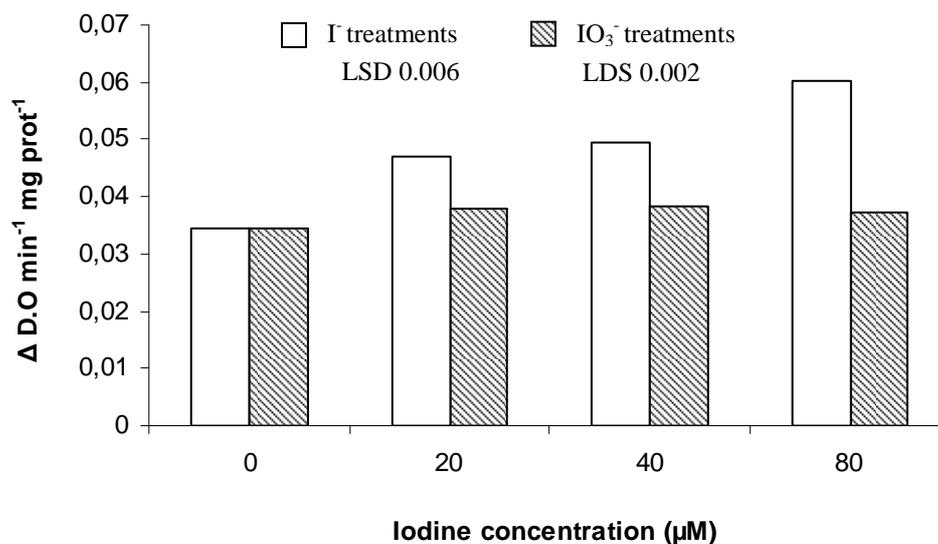


Figura 5. Influencia de la aplicación de diferentes formas y dosis de yodo sobre la actividad foliar L-GalDH.

En definitiva y considerando nuestros resultados podemos observar que la respuesta frente al estrés oxidativo es variable y depende de la forma de aplicación del yodo. En el caso de su aplicación bajo la forma de I^- se produjo una disminución de la actividad SOD (Fig. 2), lo que estaría provocando una acumulación de $O_2^{\cdot -}$ que llegaría a ser perjudicial en el caso del aporte de la concentración $80\mu M$. Posiblemente la acumulación de este radical sea la causa del aumento de la peroxidación de lípidos encontrada en el desarrollo de nuestra experiencia previa (Blasco et al., 2008) y de la disminución de la biomasa de las plantas de lechuga tratadas con $80\mu M$ de I^- (Ver Bloque I, Tabla 1). Para compensar esta situación, la planta reacciona incrementando su capacidad antioxidante a través de un aumento en la actividad CAT (Fig. 4) y las concentraciones totales de AA (Tabla 1) y GSH (Tabla 2). Posiblemente en estas plantas el AA estaría detoxificando directamente el radical $O_2^{\cdot -}$ (Ahmad et al., 2008), lo que generaría un aumento de sus formas oxidadas, como el DHA

(Tabla 1), sin que hubiese un aumento de la actividad APX (Fig. 3). Este hecho también explicaría el incremento de la actividad MDHAR (Tabla 3) que junto con la elevada actividad L-GalDH (Fig. 5) estaría dando lugar un importante pool de AA en las plantas de lechuga tratadas con I⁻. Sin embargo este mecanismo parece no ser muy eficaz a elevadas dosis puesto que existe peroxidación de lípidos (Ver Bloque I, Tabla 1) y reducción de biomasa en los tratamientos 80 µM de I⁻ (Ver Bloque I, Tabla 1).

Por otra parte, la aplicación de IO₃⁻ provoca un incremento de las principales enzimas detoxificadoras de los ROS como son la SOD (Fig. 2), APX (Fig. 3) y CAT (Fig. 4). Asimismo, también se produjo un incremento de la concentración de AA y de todas las enzimas del ciclo Halliwell-Asada implicadas en su regeneración. Estos datos ratifican la no fitotoxicidad de la aplicación de IO₃⁻ ya que no se observó ni peroxidación de lípidos (Ver Bloque I, Tabla 1) ni reducción de la biomasa (Ver Bloque I, Tabla 1). Finalmente, y aunque sería necesario el desarrollo de experiencias complementarias, nuestros resultados sugieren que gracias a la inducción del sistema antioxidante la aplicación de yodo en forma de IO₃⁻ podría ser una estrategia eficaz para mejorar la respuesta de las plantas ante diferentes tipos de estrés.

II.1.4. References

- Ahmad P, Sarwat M, Sharma S .2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signalling in plants. *Journal of Plant Biology* 51: 167-173.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxido dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Biology* 53: 1331-1341.
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C. 1998. Reactive oxigen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant inmunity. *Cell* 92: 773-784.
- Arora A, Sairam RK, Srivastaba CG. 2002. Oxidative stress and oxidative system in plants. *Current Science* 82: 1227-1238.
- Assada K. 1999. The water cicle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601-639.
- Beyer WF, Fridovitch I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161: 559–566.
- Blasco B, Ríos JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L. 2008. Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology* 152: 289-299.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxigen 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.
- Cao XY, Jiang XM, Kareem A, Dou ZZ, Rakeman MA, Zhang ML. 1994. Iodination of irrigation waters as a method of supplying iodine to a several iodine-deficient population in Xinjiang, China. *Lancet* 344: 107-109.
- Eraslan F, Inal A, Gunes A, Alpaslan M. 2007. Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combine salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 113: 120-128.
- Fedoroff N. 2006. Redox regulatory mechanisms in cellular stress response. *Annals of Botany* 98: 289-300.
- 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.
- Foyer CH, Fletcher JM. 2001. Plant antioxidants: colour me healthy. *Biologist* 48: 115-120.
- Foyer CH, Noctor G. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplast, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.

- 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.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutase occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309–314.
- Giovannoni JJ. 2007. Completing a pathway to plant vitamin C synthesis. *Proceedings of National Academy of Science of USA* 104: 9109-9110.
- 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.
- Ishikawa T, Shigeoka S. 2008. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organism. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 72: 1143-1154.
- Jaleel CA, Riadh K, Gopi R, Manivannan P, Inès J, Al-Juburi HJ, Chang-Xing Z, Hong-Bo, S. 2009. Antioxidant defense response: physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. *Acta Physiology Plantarum* 31: 427-436.
- Karpinski S, Muhlenbock P. 2007. Genetic, molecular an physiological mechanism controlling cell death, defenses and antioxidant network in response to abiotic and biotic stresses in plants. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 146: 60-66.
- Kunert KJ, Foyer CH. 1993. Thiol/disulphide exchange in plants. In *The Netherlands SPB Academic Publishing*.

- Li S-W, Xu L, Xu S, Feng H, An L. 2009. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 65: 63-71.
- Malacrida C, Valle E, Boggio S. 2006. Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. *Physiologia Plantarum* 127: 10-18.
- Mc Dermott JH. 2000. Antioxidant nutrients: current dietary recommendations and research update. *Journal of American Pharm Assoc* 40: 785-799.
- Mehlhorn H, Lelandais M, Korth HG, Foyer CH. 1996. Ascorbate is the natural substrate for plants peroxidases. *FEBS Letters* 378: 203-206.
- Melillo MT, Leonetti P, Bongiovanni M, Astagnone SP, Bleve ZT. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytologist* 170: 501-512.
- Mittler M. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405- 410.
- 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.
- Mullineaux PM, Karpinski S, Baker NR. 2006. Spatial dependence for hydrogen peroxide- directed signalling in light-stressed plants. *Plant Physiology* 14: 346-350.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology* 22: 867–880.

- Potikha TS, Collins CC, Johnson DI, Delmer DP, Levine A. 1999. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiology* 119: 849-858.
- 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.
- Rios JJ, Blasco B, Cervilla LM, Rosales MA, Sanchez-Rodriguez E, Romero L, Ruiz JM. 2009. Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology* 154: 107-116.
- Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot J-P. 2008. The role of glutathione in photosynthetic organism: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylthionin. *Annual Review of Plant Biology* 59: 143-166.
- Sang HL, Ahsan N, Lee KW, Kin DH, Lee DG, Kwak SS, Kwon SI, Kim TH, Lee BH. 2007. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology* 64: 1626-1638.
- Scandalios JG. 1997. Molecular genetics of SOD in plants. In *Col Spring Harbor Laboratory Press Col Spring Harbor*.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Taomi M, Miyagawa Y, Takeda T, Tabata Y, Yoshimura K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305-1319.

- Smirnoff N. 2000a. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58.
- Smirnoff M. 2000b. AA: metabolism and functions of a multi faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 229-235.
- Srivalli B, Chinnusamy V, Khanna-Chopra R. 2003. Antioxidants defense in response to abiotic stress in plants. *Journal of Plant Biology* 30: 121-139.
- Stevens R, Page D, Gouble B, Garchery C, Zarmir D, Causse M. 2008. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant Cell Environment* 31: 1086-1096.
- Stohr C, Stremlau S. 2006. Formation and possible roles of nitric oxide in plants roots. *Journal of Experimental Botany* 57: 463- 470.
- Trümper S, Follmann H, Häberlein I. 1994. A novel dehydroascorbate reductase form spinach chloroplast homologous to plant trypsin inhibitor. *FEBS Letters* 352: 159-162.
- Wells WW, Xu DP, Yang I, Rocque PA. 1990. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulphide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *Journal of Biological Chemistry* 265: 15361-15364.
- Yu Q, Osborne L, Rengel Z. 1999. Micronutrient deficiency changes activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco plants. *Journal of Plant Nutrition* 21: 1427-1437.
- Zhu Y-G, Huang Y-Z, Hu Y, Liu Y-X. 2003. Iodine uptake by spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants grown in solution culture: effects of iodine species and solution concentrations. *Environment International* 29: 33-37.

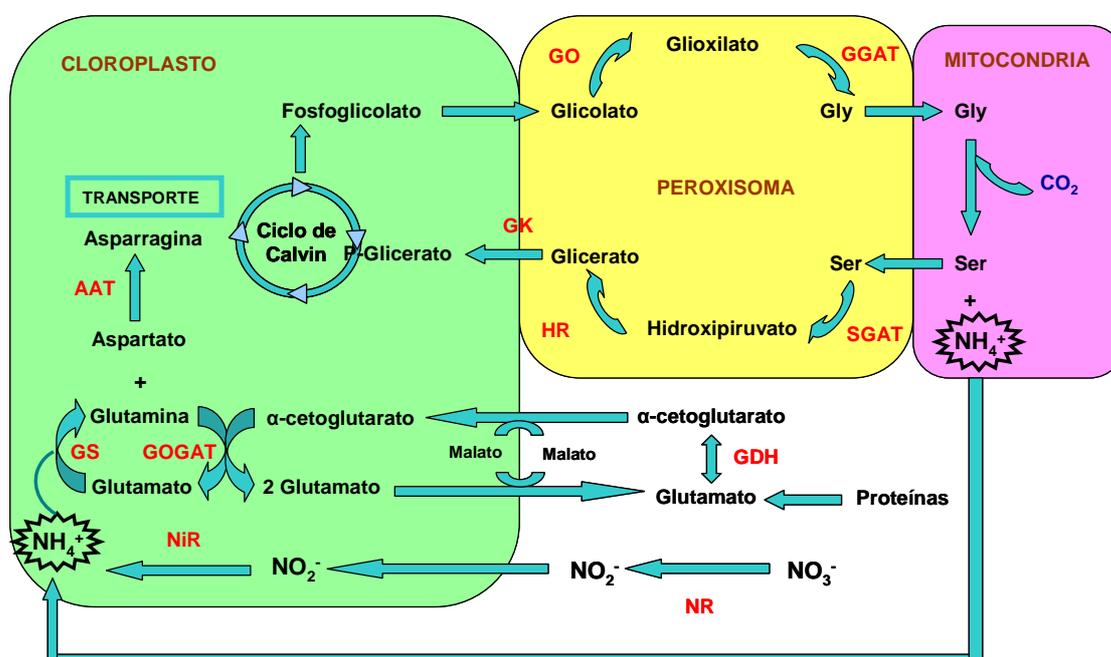
BLOQUE II CAPÍTULO 2

ALTERACIONES EN EL METABOLISMO NITROGENADO Y FOTORRESPIRACIÓN INDUCIDOS POR LA BIOFORTIFICACIÓN CON YODO PLANTAS DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA L. VAR. LONGIFOLIA*)

II.2.1. Introducción

En el suelo podemos encontrar el N bajo distintas formas siendo el NO_3^- la más biodisponible y asimilada por las plantas (von Wiren et al., 1997; Lea y Azevedo 2006). Éste es absorbido mediante transportadores específicos situados en las células de la raíz. Posteriormente es translocado, en su mayoría, a la parte aérea mediante la corriente de transpiración, almacenado en la vacuola y/o reducido a productos de asimilación como ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas que son requeridos para la síntesis de biomasa (Ruiz y Romero, 1999). El primer paso en la reducción del NO_3^- es catalizado por la Nitrato Reductasa (NR) que da lugar a la formación de nitrito (NO_2^-), el cual por la acción de la Nitrito Reductasa (NiR) será reducido a amonio (NH_4^+) (Esquema 1) (Miller y Smith, 1996). El NH_4^+ es rápidamente incorporado a moléculas orgánicas gracias a la acción conjunta de las enzimas Glutamina Sintetasa (GS) y Glutamato sintasa (GOGAT) (Esquema 1). La reacción catalizada por la GS constituye la principal ruta de incorporación de N inorgánico a glutamato para formar una molécula de glutamina. Posteriormente la GOGAT es la encargada de transferir el grupo amino de la glutamina al 2-oxoglutarato produciéndose dos moléculas de glutamato. Una de estas moléculas será la

encargada de regenerar el ciclo GS/GOGAT y la otra estará disponible para la síntesis de aminoácidos y diferentes compuestos nitrogenados. Esta vía adquiere un gran valor ya que la glutamina y el glutamato producidos son los donadores para la biosíntesis de compuestos tan importantes como clorofilas, nucleótidos, poliaminas, aminoácidos y alcaloides (Lea y Ireland, 1999; Harrison et al., 2004).



Esquema 1. Asimilación de NO_3^- y fotorrespiración en plantas

En las plantas existen otras vías metabólicas por la que se genera NH_4^+ como la biosíntesis de fenilpropanoides, catabolismo de los aminoácidos y principalmente la fotorrespiración (Esquema 1). Este proceso puede llegar a producir 20 veces más NH_4^+ que el generado en la reducción de NO_3^- por lo que, especialmente en plantas C_3 , se le ha llegado a considerar la mayor

fuente suministro de este catión (Canvin, 1990; Hirel y Lea, 2001). La fotorrespiración se inicia en el cloroplasto por la acción como oxigenasa de la enzima bifuncional Ribulosa -1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), la cual produce una molécula de glicerato-3-fosfato (3-PGA) y glicolato-2-fosfato (2-PG). Este 2-PG es hidrolizado por la fosfoglicolato fosfatasa a glicolato que es transportado al peroxisoma y es oxidado a glioxilato por la glicolato oxidasa (GO). El glioxilato gracias a la reacción catalizada por la glutamato:glioxilato aminotransferasa (GGAT) es transaminado a glicina (Gly) que posteriormente es transportada a la mitocondria. A continuación la Gly es transformada en serina (Ser) por la acción de las enzimas glicina decarboxilasa y serina hidroximetiltransferasa. La Ser formada en la mitocondria es transportada al peroxisoma donde es convertida por la acción de la serina:glioxilato aminotransferasa (SGAT) en hidroxipiruvato, el cual es reducido a glicerato por la hidroxipiruvato reductasa (HPR). Finalmente, el glicerato pasa al cloroplasto donde es fosforilado por la glicerato kinasa para dar una molécula de 3-PGA que entrará en el ciclo de Calvin (Esquema 1) (Wingler et al., 2000).

En el paso de Gly a Ser son liberados CO_2 y NH_4^+ que puede ser fitotóxico para las plantas, por lo que ha de ser incorporado por la acción GS/GOGAT a compuestos orgánicos. Esta liberación e incorporación simultánea de NH_4^+ hace que el ciclo GS/GOGAT se convierta en un nexo de unión entre el metabolismo del N y la fotorrespiración. Además, la glutamato deshidrogenasa (GDH) es una enzima muy activa en presencia de elevadas cantidades de NH_4^+ , y constituye otra posible vía de retirada de este catión ya que cataliza la

reacción reversible de 2-oxoglutarato y NH_4^+ a glutamato (Esquema 1). Recientemente se ha generado un gran debate sobre esta doble función fisiológica debido a que se ha encontrado que la GDH muestra una baja K_m para el NH_4^+ , por lo que parece improbable que actuase en el sentido de la biosíntesis. Del mismo modo se ha observado que esta enzima participa en la asimilación de N en presencia de la GS cuando la concentración de NH_4^+ es elevada (Loulakakis et al., 1994; Harrison et al., 2000; Robinson, 2001; Frechilla et al., 2002).

La fotorrespiración ha sido considerada como un proceso basura debido a que en el transcurso de este metabolismo se libera aproximadamente el 25% del CO_2 fijado (Wingler et al., 2000; Igarashi et al., 2006). Esto puede conducirnos a tener una idea equivocada sobre este proceso, ya que este CO_2 fotorrespiratorio puede ser refijado bien en el cloroplasto por la rubisco o bien en el citosol por la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC). Además, la supresión de la fotorrespiración tiene efectos negativos sobre las plantas ya que se ha observado que se produce una disminución en la tasa de asimilación de CO_2 , un pobre crecimiento vegetal y alteraciones en la estructura cloroplastidial. Asimismo, también se le atribuyen ciertos beneficios ya que es fuente de sustratos para otros procesos, otorga protección frente a la fotoinhibición e incrementa la protección frente a distintos tipos de estrés (Shi-Wei et al., 2007).

La lechuga es el principal vegetal consumido a través de ensaladas en Europa. Desafortunadamente este vegetal tiene tendencia de a acumular grandes

cantidades de NO_3^- , lo que supone un hecho indeseable ya que se incrementan los riesgos para la salud humana que conlleva la ingesta de grandes cantidades de este anión. Además, está siendo sometido a numerosos programas de biofortificación con yodo que puede estar afectando a la fisiología de la planta y a su calidad nutricional (Blasco et al., 2008), por lo que estudios de cómo estos elementos traza afectan al desarrollo de los cultivos se hacen necesarios (Comisión of European Communities, 2001; Lawlor, 2002). Por ello, y debido al papel tan importante que juegan en el crecimiento de los cultivos el metabolismo nitrogenado y la fotorrespiración el objetivo de nuestro trabajo fue el estudio de ambos procesos en plantas sometidas a biofortificación con yodo.

II.2.2. Material y Métodos

Tanto las condiciones de cultivo, los tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico son iguales a los descritos en el Bloque I.

II.2.2.1. Muestreo del Material Vegetal

Parte aérea de plantas de lechuga fueron muestreadas a los 66 días después de la germinación de las plantas. Una parte de este material vegetal tras cuantificar el peso fresco (PF) fue secado mediante liofilización para calcular el peso seco (PS), y concentración de NO_3^- , NH_4^+ y N orgánico y total. El resto del material vegetal fue congelado en N líquido y usado para el análisis de:

aminoácidos y proteínas solubles, ser, gly, malato, α -cetoglutarato, actividades NR, NiR, GS, GOGAT, aspartato aminotransferasa (AAT), GO, GGAT, SGAT, HPR, GDH y catalasa (CAT).

II.2.2.2. Análisis del Material Vegetal

II.2.2.2.1. Determinación de las distintas formas de N

La concentración de N orgánico 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. 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). 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). Finalmente, el N total corresponde a la suma de las concentraciones de N orgánico y NO_3^- .

II.2.2.2.2. Determinación de aminoácidos y proteínas solubles

Los aminoácidos y proteínas solubles se determinaron después de una homogenización del material vegetal en buffer 50 mM KH_2PO_4 pH 7.0 y posterior centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante resultante se usó para la determinación de los aminoácidos solubles mediante el método de la ninhidrina (Yemm y Cocking, 1955), frente a una curva patrón de glicina. La cantidad de proteínas solubles se midió utilizando el reactivo de Bradford (Bradford, 1976) usando BSA como estándar.

II.2.2.2.3. Determinación de los metabolitos de la fotorrespiración

Los niveles de Ser, Gly, malato y α -cetoglutarato fueron analizados en el UC Davis Genome Center, California, USA. El ensayo para el análisis de estos metabolitos se realizó siguiendo el método de Weckwerth et al. (2004) y Fiehn (2006).

II.2.2.2.4. Extracción y ensayos de las enzimas del metabolismo nitrogenado y fotorrespiración

II.2.2.2.4.1. Nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa

Una cantidad de hojas fueron homogenizadas en 7,5 ml de tampón 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5 que contenía 2 mM de EDTA, caseína 1,5%, 2 mM de DTT y 1% de PVPP. Posteriormente el homogeneizado fue filtrado y centrifugado a 15000 rpm durante 20 min. El extracto resultante fue utilizado para los ensayos de las actividades enzimáticas NR, NiR, GOGAT y GDH (Groat y Vance, 1981; Kaiser y Lewis, 1984; Lillo, 1984; Singh y Srivastava, 1986)

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).

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.

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.

II.2.2.2.4.2. Glutamina sintetasa y aspartato aminotransferasa

La extracción para estas enzimas se basó en la maceración de 1 g de material vegetal fresco en 6 ml de buffer 100mM Maleico-KOH pH 6,8 que contenía 100 mM de sacarosa, β - mercaptoetanol al 2% y etilenglicol al 20%. El homogeneizado resultante se filtró y centrifugó a 15.000 rpm durante 20 min (Kaiser y Lewis, 1984; Gonzalez et al., 1995).

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).

La actividad AAT fue analizada espectrofotométricamente a 340 nm usando el método de Gonzalez et al. (1995) mediante el descenso de absorbancia durante 3 min. La mezcla de reacción utilizada consistió en un buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8), 4 mM Cl_2Mg , 10 mM ácido aspártico y extracto enzimático.

II.2.2.2.4.3. Glicolato oxidasa

Para la determinación de la actividad GO, 0.25 g de hojas de lechuga fueron homogenizadas con PVPP y 1 mL de un buffer 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) con 0.01% Triton X-100 y 5 mM DTT. El homogenado resultante fue centrifugado a 15.000 rpm durante 20 min y utilizado para el ensayo de la actividad GO (Feierabend y Beevers, 1972). La mezcla de reacción estaba formada por un buffer 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.009% Triton X-100, 3.3 mM fenilhidrazina-HCl (pH 6.8), 50 μl de extracto enzimático y 5 mM ácido glicólico que fue

utilizado para iniciar la reacción. La actividad GO fue determinada mediante la formación de glioxilato-fenilhidrazina a 340 nm.

II.2.2.2.4.4. Glutamato:glioxilato aminotransferasa, serina:glioxilato aminotransferasa e hidroxipiruvato reductasa

Para la extracción de las enzimas GGAT, SGAT y HR hojas de lechuga fueron homogenizadas en un buffer 100 mM Tris-HCl (pH 7.3) con 0.1% Triton X-100 y 10 mM DTT. El homogenado resultante fue centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min y utilizado para el ensayo de las actividades enzimáticas (Hoder y Rej, 1983).

La actividad GGAT fue cuantificada mediante la reducción de 2-oxoglutarato por NADH en una reacción realizada por la enzima GDH. La mezcla de reacción del ensayo esta compuesta por 100 mM Tris-HCl (pH 7.3), 20 mM glutamato, 1 mM glioxilato, 0.18 mM NADH, 0.11 mM piridoxal-5-fosfato, 83 mM NH₄Cl y 0.3 U GDH, todo ello en un volumen final de 0.6 mL (Igarashi et al., 2006).

La actividad SGAT fue medida por la tasa de formación de glicina a partir de glioxilato. La mezcla de reacción de 6 mL de volumen final consistía en 100 mM Tris-HCl (pH 7.3), 5 mM serina, 1 mM glioxilato, 0.11 mM piridoxal-5-fosfato, 83 mM NH₄Cl y 0.3 U GDH. Transcurridos 20 min de incubación la reacción fue

parada por la adición de etanol y el calentamiento de la mezcla a 80°C (Yemm y Cocking, 1955).

La actividad HR fue analizada mediante la oxidación de NADH a 340 nm, siendo la mezcla de reacción 100 mM Tris-HCl (pH 7.3), 5 mM hidroxipiruvato y 0.18 mM NADH (Igarashi et al., 2006).

II.2.2.2.4.5. Catalasa

La actividad CAT se determinó midiendo el consumo de H₂O₂ 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 H₂O₂ y extracto enzimático.

II.2.3. Resultados y discusión

II.2.3.1. Producción de NH₄⁺: Reducción del NO₃⁻ y fotorrespiración.

El N es el elemento más abundante en los tejidos vegetales representado el 2% del peso seco de la planta. Este puede pasar a la cadena trófica en forma de NO₃⁻ y NH₄⁺ mayoritariamente (Miller y Cramer, 2004), siendo factores que afectan en gran medida a la calidad, crecimiento y desarrollo de las plantas de lechuga (Abu-Rayyan et al., 2004; Niu et al., 2007). En la tabla 1 podemos observar que ante la aplicación de I, el cultivo se comporta de manera diferente

dependiendo de la forma empleada. Los tratamientos con I^- a dosis iguales o superiores a $20 \mu\text{M}$ producen una disminución en la concentración de NO_3^- . Este hecho, puede suponer una mejora de la calidad nutricional de las plantas a través de la disminución de su ingesta, especialmente si se consumen de forma habitual vegetales que tienen tendencia a acumular grandes cantidades de este nutriente, como es el caso de la lechuga. Por otra parte, la aplicación de IO_3^- no presentó ningún efecto sobre la acumulación foliar de NO_3^- por lo que su aplicación no produjo ninguna variación en la calidad de estas plantas respecto a los tratamientos control.

Uno de los mayores limitantes en la asimilación de NO_3^- es la actividad NR. Esta enzima se localiza en el citosol y está regulada por diversos factores como luz/oscuridad, concentración de NO_3^- y productos finales de asimilación (Mackintosh y Meek, 2001; Miller y Cramer, 2004). Una vez llevada a cabo su función catalítica y formado el NO_2^- , que es muy tóxico para las plantas, actúa la NiR dando lugar a la formación de NH_4^+ . Esta enzima se localiza en el estroma del cloroplasto y su regulación es muy similar a la de la NR, interviniendo además los productos finales glutamina y asparragina (Vicentz et al., 1993).

Tabla 1. Respuesta de la reducción de NO_3^- y concentración de NH_4^+ en hojas de plantas lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

Tratamientos Dosis (μM)	NO_3^-		NR		NiR		NH_4^+	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	89.2	89.2	16.3	16.3	1.62	1.62	2.31	2.31
20	58.0	81.6	12.9	29.5	1.45	3.71	2.07	2.05
40	56.7	88.2	9.71	24.7	1.06	3.34	2.23	2.19
80	52.0	93.1	9.31	24.3	1.44	3.43	2.26	2.29
<i>P</i> -valor	***	NS	*	**	NS	NS	NS	NS
LSD	4.89	10.9	6.46	3.52	1.95	2.68	0.29	0.28
Análisis de varianza								
Dosis (D)	***		*		NS		NS	
Formas (F)	***		***		*		NS	
D x F	***		**		*		NS	
LSD	5.53		3.38		1.52		0.19	

Concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ expresadas en mg g^{-1} PS; Actividad nitrato reductasa (NR) expresada como $\text{mM NO}_2^- \text{mg prot}^{-1} \text{min}^{-1}$; Actividad nitrito reductasa (NiR) expresada como $\text{mM NO}_2^- \text{mg prot}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

Los análisis foliares mostraron que los tratamientos a dosis iguales o superiores a $40 \mu\text{M}$ de I^- disminuyeron de forma significativa la actividad NR (Tabla 1). En cambio, la aplicación de IO_3^- produjo un comportamiento inverso en el cultivo, incrementando la actividad NR de todos los tratamientos empleados en nuestra experiencia, especialmente en $20 \mu\text{M}$, (Tabla 1). Por otra parte, la actividad NiR no se vio afectada por la aplicación de yodo (Tabla 1). La aplicación de I^- según nuestros resultados podría estar generando una disminución en la absorción de NO_3^- ya que disminuye tanto la concentración de este anión como la actividad NR, sobre todo en los tratamientos con $80 \mu\text{M}$ (Tabla 1). Por el contrario, los tratamientos con IO_3^- inducen una mayor reducción de los NO_3^- debido a un incremento de la actividad NR (Tabla 1), aunque tal hecho no se ve reflejado en la concentración foliar de este anión ya

que permanece constante. Esto se podría deber a que el IO_3^- también podría inducir una mayor absorción de NO_3^- , lo cual estimula la actividad NR y por lo tanto su utilización. De este modo se podría explicar por qué los niveles de NO_3^- en los distintos tratamientos con IO_3^- son similares a los de las plantas control (Tabla 1). Asimismo, la enzima NiR no se ve afectada por ninguno de los tratamientos debido posiblemente a que se trata de una enzima constitutiva que modifica su grado de expresión dependiendo de los niveles de NO_2^- existentes en el medio (Heldt, 2005).

En general, las plantas no tienden a acumular grandes cantidades de NH_4^+ , ya que puede provocar síntomas de toxicidad como clorosis de las hojas maduras, enrollamiento de los bordes y aparición de zonas necróticas. Estos síntomas posiblemente son debidos a problemas con el balance del pH, desajuste de la relación cation:anión y/o agotamiento de la energía debido al eflujo del ión (Lea y Acebedo, 2006). En esta experiencia se observó que la aplicación de yodo no tuvo efecto significativo sobre la concentración foliar de NH_4^+ de las plantas de lechuga (Tabla 1).

El NH_4^+ no sólo procede de la reducción del NO_3^- , también es generado cuando existen elevadas tasas de fotorrespiración debido a la oxidación de la glicina (Hirel et al., 2007). Para ello, en primer lugar actúa la GO formando glioxilato. En este paso los electrones son transferidos al O_2 dando lugar a la formación de H_2O_2 que posteriormente será detoxificado por la CAT. En nuestra experiencia la actividad GO tan sólo se vio afectada en plantas tratadas con 20

μM de IO_3^- , observándose un incremento significativo respecto a las plantas control (Tabla 2.). Sin embargo, la actividad CAT incrementó de forma significativa tras la aplicación de ambas formas de yodo para todos los tratamientos, siendo ligeramente mayor al aplicar $80 \mu\text{M}$ de IO_3^- (Tabla 2). El incremento de la actividad CAT sin que exista incremento de la actividad GO tras la aplicación de I^- , puede ser debido a que H_2O_2 se esta continuamente generando durante el crecimiento normal de las plantas. Este compuesto se obtiene por ejemplo, en el proceso de transporte de electrones durante la fotosíntesis y respiración, en la conversión de ácidos grasos a succinato e incluso formado espontáneamente por las especies reactivas de oxígeno (ROS) $\text{O}_2^{\cdot-}$ y HO_2^{\cdot} (Blokhina et al., 2003; Laloi et al., 2004; Li et al., 2009).

Tabla 2. Respuesta de algunas enzimas de la fotorrespiración en hojas de plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

Tratamientos Dosis (μM)	GO		CAT		GGAT		SGAT		HR	
	I^-	IO_3^-								
0	14.0	14.0	0.015	0.015	0.17	0.17	69.5	69.5	53.7	53.7
20	10.9	18.9	0.037	0.027	0.20	0.22	65.6	72.5	28.7	52.5
40	12.0	12.1	0.026	0.027	0.59	0.44	65.7	65.5	38.4	53.2
80	13.1	14.1	0.027	0.051	0.42	0.34	64.9	70.6	45.1	61.4
<i>P-valor</i>	NS	***	*	**	***	*	NS	NS	***	**
LSD	3.12	1.93	0,010	0,009	0.14	0.15	10.2	6.24	8.23	3.55
Análisis de varianza										
Dosis (D)	***		***		***		NS		***	
Formas (F)	***		NS		NS		NS		***	
D x F	***		**		*		NS		***	
LSD	1.06		0.007		0.09		5.50		4.12	

Actividades glicolato oxidasa (GO), catalase (CAT), glutamato:glicoxilato aminotransferasa (GGAT) e hidroxipiruvato reductasa (HR) fueron expresadas como Δ D.O. $\text{min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$; Actividad serina:glicoxilato aminotransferasa (SGAT) fue expresada como $\mu\text{M gly mg prot}^{-1} \text{seg}^{-1}$.

Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

La GGAT es la enzima encargada de la formación de Gly, aminoácido que posteriormente es oxidado en la membrana interna de la mitocondria produciendo la liberación de CO_2 , grandes cantidades de NH_4^+ y Ser. Se ha observado que existe una elevada relación directamente proporcional muy estrecha entre la cantidad de Ser y la actividad GGAT, siendo esta relación más significativa que con la Gly a pesar de ser su producto final directo (Igarashi et al., 2006). Como se muestra en la Tabla 2 la aplicación de ambas formas de yodo a dosis iguales o superiores a $40 \mu\text{M}$ genera un incremento de la actividad GGAT. De forma paralela, la aplicación de yodo a dosis iguales o superiores a $40 \mu\text{M}$ produjo un incremento de la Ser 3 veces superior respecto a las plantas control (Fig. 1, $P < 0.001$).

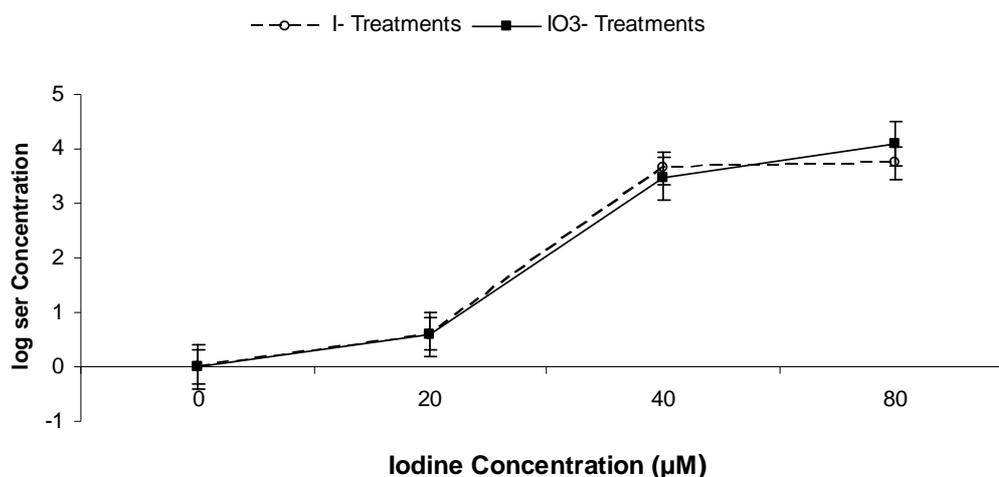


Figura 1. Niveles de Ser en hojas de plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

La SGAT es una enzima que se encuentra “en exceso” bajo condiciones normales de crecimiento por lo que puede ejercer un control apreciable sobre la fotorespiración bajo condiciones de estrés (Wingler et al., 2000). El

hidroxipiruvato formado tras su acción es transformado por la HR en ácido glicérico que entrará a formar parte del Ciclo de Calvin como ácido 3 fosfoglicérico, completándose así el ciclo de la oxidación fotorespiratoria del carbono. Los datos de nuestra investigación mostraron que la aplicación de yodo no tuvo efecto significativo sobre la actividad SGAT respecto a las plantas control (Tabla 2). Por el contrario, los tratamientos con I^- produjeron una disminución de la actividad HR (Tabla 2), mientras que la aplicación de $80 \mu M$ de IO_3^- produjo una estimulación de esta actividad enzimática, y por lo tanto de la formación de ácido glicérico (Tabla 2).

II.2.3.2. Incorporación de NH_4^+ y productos de asimilación.

Durante el crecimiento y desarrollo vegetal el N se moviliza entre distintos metabolitos, e incluso entre diferentes órganos y es transportado por un número limitado de compuestos de transporte. La GS constituye la principal vía de asimilación y reasimilación de NH_4^+ . Esta enzima muestra una elevada afinidad por este catión por lo que lo incorpora de forma muy eficiente a compuestos orgánicos (Mifflin y Habash, 2002). La reacción catalizada por la GS es dependiente de la disponibilidad de glutamato. La transferencia del grupo amida a esqueletos carbonados para producir glutamato la lleva a cabo la GOGAT, enzima se encuentra en estrecha relación con el metabolismo del carbono a través del α -cetoglutarato (Hodges, 2002). En esta experiencia tanto los tratamientos con I^- como los tratamientos con IO_3^- produjeron un incremento significativo de la actividad GS (Tabla 3). Respecto a la actividad GOGAT se

observó que la aplicación de yodo no tuvo efecto significativo sobre esta enzima (Tabla 3). En el caso de los tratamientos con IO_3^- , la inducción de la GS puede explicar que a pesar de la elevada actividad de la vía de reducción de los NO_3^- y la fotorrespiración, (Tablas 1 y 2) no se produzca un incremento en la concentración de NH_4^+ (Tabla 1), ya que este catión está siendo retirado e incorporado a glutamato vía GS/GOGAT. Además se ha comprobado que plantas con una elevada actividad GS son más tolerantes al NH_4^+ (Cruz et al., 2006).

Tabla 3. Respuesta de las enzimas responsables de la asimilación de NH_4^+ en hojas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

Tratamientos Dosis (μM)	GS		GOGAT		AAT	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	16.3	16.3	4.66	4.66	1.35	1.35
20	28.2	18.3	3.42	3.62	2.95	3.36
40	27.9	19.1	5.49	3.63	4.56	2.28
80	24.5	20.0	6.50	5.89	7.58	1.78
<i>P-valor</i>	*	**	NS	NS	***	**
LSD	5.90	1.10	3.51	2.56	0.57	0.77

Análisis de varianza			
Dosis (D)	***	NS	***
Formas (F)	***	NS	***
D x F	**	NS	***
LSD	2.88	1.99	0.44

Actividad glutamina sintetasa (GS) expresada como μM glutamilhidroxamato mg prot^{-1} ; Actividad glutamato sintasa (GOGAT) y aspartato aminotransferasa (AAT) expresadas como $\Delta \text{D.O. min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$. Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

La disponibilidad de esqueletos carbonados en forma de α -cetoglutarato es imprescindible para garantizar la asimilación de NH_4^+ y el correcto funcionamiento de la GOGAT. Este α -cetoglutarato procede principalmente de

la respiración de los azúcares y las reacciones de transaminación de los aminoácidos (Hodges, 2002). Nuestros análisis indicaron que la concentración de α -cetoglutarato fue de 2 a 3 veces superior respecto a las plantas control (Fig. 2, $P < 0.001$) en los tratamientos 40 μM y 80 μM de I^- . Sin embargo, para todos los tratamientos con IO_3^- esta concentración era 2-3 veces superior a las plantas control (Fig. 2, $P < 0.001$).

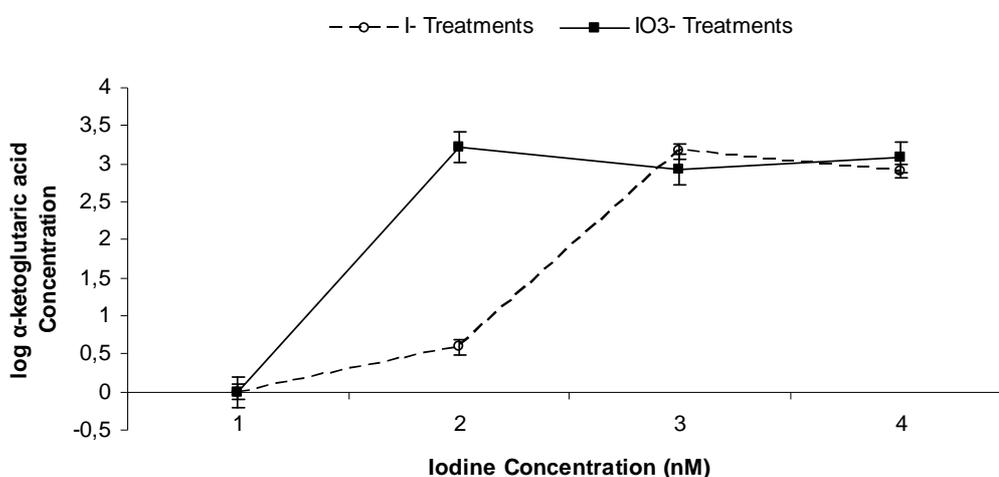


Figura 2. Niveles de α -cetoglutarato en hojas de plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

El α -cetoglutarato es producido en numerosos compartimentos celulares y es transportado al interior del cloroplasto para incorporarse al ciclo GS/GOGAT mediante un antiporte con malato (Hodges, 2002). Los datos mostraron que los tratamientos iguales o superiores a 40 μM de I^- poseían una concentración de malato 4 veces mayor respecto a las plantas control (Fig. 3, $P < 0.001$). Además, todos los tratamientos con IO_3^- mostraron una concentración 4 veces superior a los tratamientos control (Fig. 3, $P < 0.001$). En definitiva, podemos

observar que existe un incremento paralelo de malato y α -cetoglutarato para todos los tratamientos con yodo examinados.

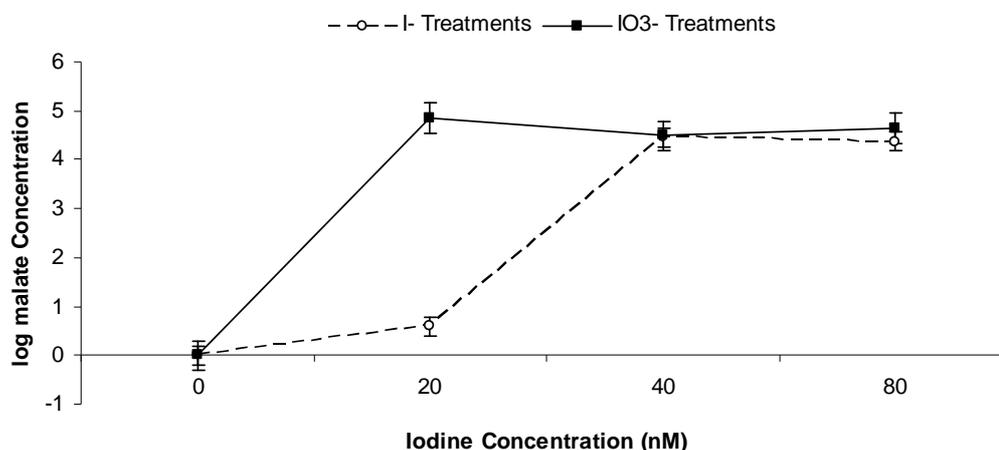


Figura 3. Niveles de malato en hojas de plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

Por otra parte, la AAT cataliza la transformación de glutamato y oxalacetato en aspartato y α -cetoglutarato, por lo que además de generar aminoácidos de transporte para removilizar el N también es una fuente de esqueletos carbonados para el ciclo GS/GOGAT. Para todos los tratamientos con I^- se produjo un incremento significativo de la actividad AAT que fue mucho más acentuado en la dosis 80 μ M (Tabla 3). Por otra parte, los tratamientos con IO_3^- también produjeron un incremento de esta actividad enzimática cuando la dosis aplicada fue de 20 μ M (Tabla 3).

La GDH cataliza la reacción reversible en la cual el α -cetoglutarato y el NH_4^+ pueden originar glutamato o este puede ser reciclado a sus dos moléculas

constituyentes. Ha sido descrita como una enzima que confiere resistencia frente a distintos tipos de estrés, además es particularmente activa en presencia de grandes cantidades de NH_4^+ en la célula (Cruz et al., 2006). La actividad GDH tuvo un comportamiento inverso dependiente de la forma de I aplicada. Así, los tratamientos con I^- produjeron un incremento de la actividad GDH, observándose el valor más elevado en la dosis 80 μM (Fig. 4, $P < 0.001$). Sin embargo, los tratamientos con IO_3^- mostraron una disminución de la actividad GDH en dosis iguales o superiores a 40 μM (Fig. 4, $P < 0.01$). En este caso el incremento de la actividad GDH coincide con la aplicación de I^- , que es la forma química del I más biodisponible y fitotóxica para las plantas, por lo que en cierto modo podría corroborarse su papel protector frente al estrés.

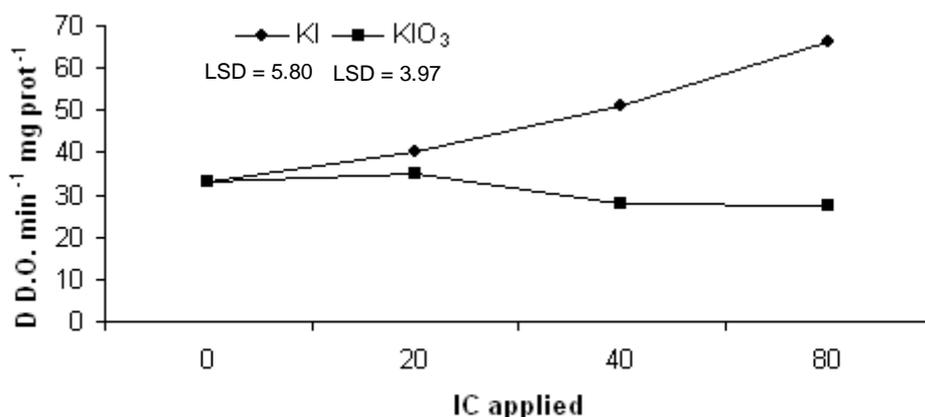


Figura 4. Actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) en hojas de plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

El resultado de la incorporación de NH_4^+ se puede cuantificar con el análisis del N orgánico, ya que esta forma es generalmente producto de la asimilación de los NO_3^- y lo conforman principalmente aminoácidos y proteínas

estructurales, funcionales y de almacenamiento. Además de este parámetro, el N total está constituido por la suma de los NO_3^- y N orgánico y es considerado un parámetro determinante para conocer el estatus nutricional de N de las plantas (Ruiz y Romero 1999). Los tratamientos con I^- produjeron una disminución significativa únicamente cuando los tratamientos aplicados fueron iguales o superiores a $40 \mu\text{M}$ de I^- (Fig. 5, $P < 0.05$). Del mismo modo, el N total sufrió una reducción significativa cuando el tratamiento aplicado fue I^- , aunque en este caso esta disminución se produjo para todas las dosis aplicadas y encontrándose el mínimo valor en la dosis $80 \mu\text{M}$ de I^- (Fig. 5, $P < 0.001$). Sin embargo, ni el N orgánico ni el N total se vieron afectados por la aplicación de IO_3^- (Fig. 6, $P > 0.05$). Que el N total disminuya a lo largo de todos los tratamientos con I^- ya que se ha de tener en cuenta que la concentración de NO_3^- disminuyó de forma paralela al N total y que este parámetro es el resultado de la suma de las formas orgánicas e inorgánicas del N.

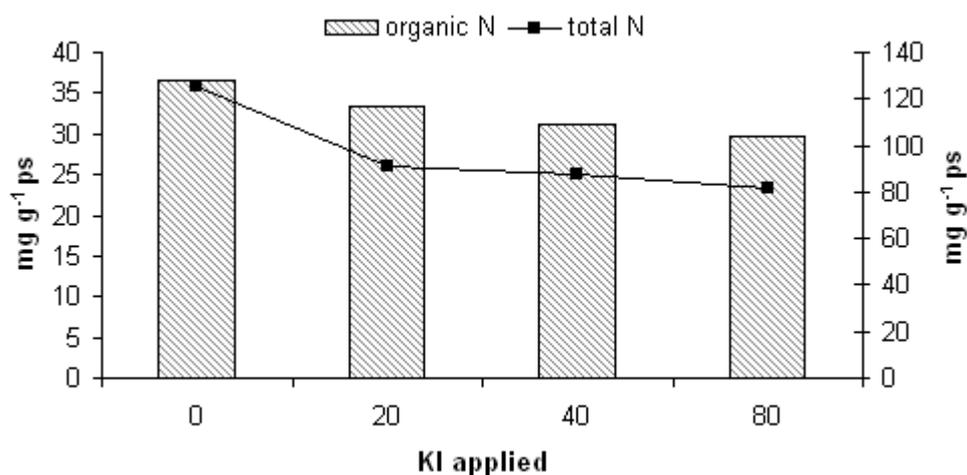


Figura 5. Concentraciones de N orgánico y total en hojas de plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis de I^- .

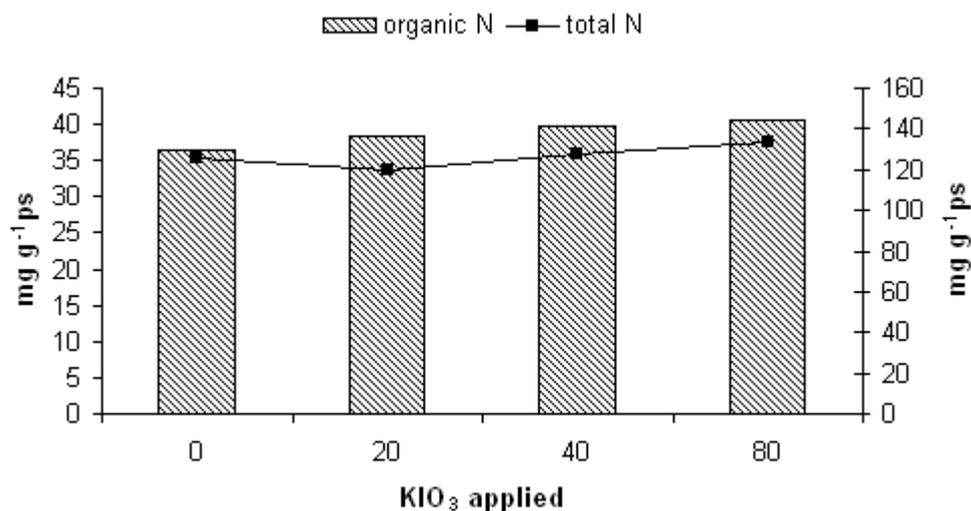


Figura 6. Concentraciones de N orgánico y total en hojas de plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis de IO₃⁻.

Generalmente los compuestos nitrogenados de alto y bajo peso molecular, como los aminoácidos y las proteínas son el principal producto de la asimilación de NO₃⁻ (Barneix y Causin, 1996), aunque para ser más precisos, estos compuestos son el resultado de la asimilación de NH₄⁺, sea cual sea el proceso metabólico del que procede la fuente nitrogenada. La concentración de aminoácidos no se vio afectada por la aplicación de I (Tabla 4). No obstante, la concentración de proteínas sufrió un incremento significativo únicamente en los tratamientos con IO₃⁻, alcanzando su máximo valor en la dosis 80 μM (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de aminoácidos y proteínas solubles en hojas de plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

Tratamientos Dosis (μM)	Aminoácidos		Proteínas	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	0.25	0.25	9.35	9.35
20	0.28	0.25	9.50	10.8
40	0.23	0.22	9.11	10.6
80	0.25	0.28	9.76	13.8
<i>P-valor</i>	NS.	NS	NS	***
LSD	0.03	0.03	0.54	1.24

Análisis de varianza		
Dosis (D)	*	***
Formas (F)	NS	***
D x F	NS	***
LSD	0.02	0.44

Concentración de aminoácidos y proteínas solubles expresada como mg g^{-1} PF. Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

El efecto del yodo en las plantas depende en gran medida de la especie vegetal (Ehling 1928). En este caso, la aplicación de I^- puede estar generando un efecto fitotóxico sobre el crecimiento de nuestras plantas, que puede ser debido a un exceso de acumulación de este elemento traza en la parte aérea (ver Bloque I, Fig. 1), puesto que el yodo puede sufrir una oxidación intracelular a I_2 lo cual puede inhibir el proceso fotosintético (Mynet y Wain 1973). Ante esta situación de estrés que se produce especialmente en los tratamientos con $80 \mu\text{M}$ de I^- , la planta de lechuga puede estar respondiendo con una remobilización de aminoácidos hacia las partes jóvenes, como indica el incremento de la actividad AAT (Tabla 3). Estos aminoácidos de transporte posteriormente son vertidos al floema, lo que explicaría la no existencia de un incremento de la concentración de aminoácidos en las hojas maduras analizadas en nuestra experiencia (Tabla 4). Asimismo, los tratamientos con I^- ,

especialmente en las dosis 80 μM , produjeron una reducción de la concentración de N orgánico (Fig. 5) que tampoco se vio reflejada en una disminución de proteínas (Tabla 4). Este hecho puede ser debido a que la fuente nitrogenada para la síntesis de estos aminoácidos no procede de la degradación de proteínas, sino que puede proceder de la fotorrespiración, a través del incremento de la actividad GGAT (Tabla 2), o incluso de la actividad GDH (Fig. 4). El NH_4^+ generado por estas vías metabólicas sería rápidamente asimilado gracias al incremento de la actividad GS que sufren estas plantas (Tabla 3). Además, la disminución de la actividad HR está impidiendo la incorporación de esqueletos carbonados procedentes de la fotorrespiración al ciclo de Calvin, lo que junto con la inhibición de la actividad NR podrían ser algunas de las causas por la que el I⁻ ejerce su efecto fitotóxico sobre las plantas.

En cuanto a la aplicación de IO_3^- , esta forma química produce un incremento de la biomasa (ver Bloque I, Tabla 1), debido en parte a que esta forma química no afecta al estatus nitrogenado del cultivo (NO_3^- , N orgánico y total) (Tabla 1 y Fig. 6). Al mismo tiempo, se produce un incremento de la vía de reducción de los NO_3^- (Tabla 1) y un ligero incremento de la actividad GGAT (Tabla 2) acompañado de una disminución de la GDH (Fig. 4). En consecuencia se genera una gran cantidad de NH_4^+ que es rápidamente incorporado a una molécula de glutamato por la GS, evitándose así una acumulación excesiva de este catión (Tabla 1). Esta elevada asimilación de amonio puede estar siendo derivada tanto a la síntesis de aminoácidos de transporte hacia las pares

jóvenes (en 20 y 40 $\mu\text{M IO}_3^-$) (Tabla 3) como a la síntesis de proteínas en hojas maduras, especialmente en 80 $\mu\text{M IO}_3^-$, como queda reflejado en los datos de nuestra experiencia (Tabla 4). Además, los tratamientos con IO_3^- incrementaron la actividad HR (Tabla 2), permitiendo un correcto estado fisiológico vegetal. De este modo se ve reforzada la posibilidad de considerar la HR como un posible punto sensible a la aplicación de I.

En conclusión, la aplicación de cada una de las formas de yodo utilizadas en este experimento produce un comportamiento diferencial del cultivo. La aplicación de I^- a dosis iguales o inferiores a 40 μM produce una inhibición de la absorción de NO_3^- sin que se vea afectada la producción de biomasa. Este hecho puede suponer un incremento de la calidad nutricional de las plantas de lechuga, ya que de esta forma se reduciría la ingesta de NO_3^- a través del consumo de este vegetal. Asimismo, la aplicación de 80 μM de I^- provoca un estrés en la planta que en este caso, queda reflejado en la disminución de la biomasa (ver Bloque I, Tabla 1) y en general, del estatus nitrogenado de la planta. Este hecho es debido al grave efecto fitotóxico que esta dosis ejerce sobre las plantas de lechuga, debido fundamentalmente a una disminución de la actividad NR y HR. Por otra parte, la aplicación de IO_3^- dio como resultado una mayor producción de la parte comestible, a través de la estimulación de la actividad NR, especialmente en 20 μM , y del incremento del ciclo GS/GOGAT, principalmente a dosis iguales o superiores a 40 μM . Además, la aplicación de esta forma de yodo produce un incremento y una optimización del proceso foterrespiratorio. Finalmente, esta situación puede resultar interesante desde el

punto de vista agronómico, ya que se podría reducir el aporte de fertilizantes nitrogenados y en consecuencia se abaratarían costes económicos derivados de la aplicación en exceso de este tipo de fertilizantes.

II.2.4. Referencias

- Abu-Rayyan A, Kharawish BH, Al-Ismaïl K. 2004. Nitrate content in lettuce (*Lactuca sativa* L) heads in relation to plant spacing, nitrogen form and irrigation level. *Journal of the Science for Food and Agriculture* 84: 931-936.
- Baethgen WE, Alley MM. 1989. A manual colorimetric procedure of measuring ammonium nitrogen in soil and plant. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 20: 961-969.
- Barneix AJ, Causin HF. 1996. The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *Journal of Plant Physiology* 149: 358-362.
- Blasco B, Ríos JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L. 2008. Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology* 152: 289-299.
- Blokhina O, Virolainen E, Kurt U. 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.

- Canvin DT. 1990. Photorespiration and CO₂-concentrating mechanisms. In: Denis DT and Turpin DH eds. Plant physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Langman Scientific. Technical Press, Singapore, 153-173.
- Cataldo DA, Haroon M, Schreder LE, Young VL. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Communication in Soil Science and Plant Analysis 6: 71-80.
- Commission of European Communities. 2001. Commission regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (text with EEA relevance). Official Journal of the European Communities L77, (16 March 2001): 1-13.
- Cruz C, Bio AFM, Dominguez-Valdivia MD, Aparicio-Tejo PM, Lamsfus C, Martins-Loução MA, 2006. How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? Planta 223: 1068-1080.
- Ehling L. 1928. Über die quellen der pflanzlichen jodversorgung. Dissertation, Technische Hochschule, Stuttgart.
- Feierabend J, Beevers H. 1972. Developmental studies on microbodies in wheat leaves. I. Conditions influencing enzyme development. Plant Physiology 49: 28-32.
- Fiehn O. 2006 Metabolite Profiling in Arabidopsis. In: Arabidopsis Protocols 2nd edition. Salinas J, Sanchez-Serrano JJ (eds.), Methods in Molecular Biology ser., Humana Press, Totowa NJ, 439-447.

- Frechilla S, Lasa B, Aleu M, Juanarena N, Lamsfus C, Aparicio-Tejo PM. 2002. Short-term ammonium supply stimulates glutamate dehydrogenase activity and alternative pathway respiration in roots of pea plants. *Journal of Plant Physiology* 159: 811-818.
- Gonzalez EM, Gordon AJ, James CL, Arrese-Igor C. 1995. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *Journal of Experimental Botany* 26: 1515- 1523.
- Groat RG, Vance CP. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 67: 1198–1203.
- Hageman RH, Hucklesby DP. 1971. Nitrate reductase. *Methods in Enzymology* 23: 497-503.
- Harrison J, Hirel B, Limami MA. 2004. Variation in nitrate uptake and assimilation between two ecotypes of *Lotus japonicus* and their recombinant inbred lines. *Physiologia Plantarum* 120: 124-131.
- Harrison J, Brugiere N, Philipson B, Ferrario-Mery S, Becker T, Limami A, Hirel B. 2000. Manipulating the pathway of ammonia assimilation through genetic engineering and breeding. Consequences of plant physiology and plant development. In: Martins-Loução MA, Lips SH eds. Nitrogen in a sustainable ecosystem. Blackhuys Publishers, Leiden, 89-101.
- Heldt, H. W. 2005. Nitrate assimilation is essential for the synthesis of organic matter. *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press. Burlington MA. USA

- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58: 2369-2387.
- Hirel B, Lea PJ. 2001. Ammonia assimilation. In: eds Lea PJ, Morot-Goudry JF. *Plant Nitrogen*. Springer-Verlag, Heidelberg, 79-99.
- Hodges M. 2002. Enzyme reductancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of Experimental Botany* 53: 905-916.
- Hoder M, Rej R. 1983. Alanine aminotransferase. In *Methods of enzymatic analysis*. Vol 3. Eds Bergmeyer, HU, Bergmeyer J and Graßl M. Weinheim: Verlag chemie, 444-456.
- Igarashi D, Tsuchida H, Miyako M, Oshumi C. 2006. Glutamate:Gloxilate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. *Plant Physiology* 142: 901-910.
- 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.
- Krom MD. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: study of a modified berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* 105: 305-316.
- Laloi C, Apel K, Danon A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 323-328.

- Lawlor DW. 2002. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany* 53: 773-787.
- Lea PJ, Azevedo RA. 2006. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology* 149: 243-247.
- Lea PJ, Ireland RJ. 1999. Nitrogen metabolism in higher plants. In: Singh BK ed. *Plant aminoacids: Biochemistry and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1-47.
- Li S-W, Xuea L, Xub S, Fengb H, An L. 2009. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 65: 63-71.
- 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.
- Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA, Kanellis AK. 1994. Regulation of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase isoforms in avocado fruit during development and ripening. *Plant Physiology* 106: 217-222.
- Mackintosh C, Meek SEM. 2001. Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cellular and Molecular Life Science* 58: 205-214.
- Miffling BJ, Habash ZD. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* 53: 979-987.

- Miller AJ, Smith SJ. 1996. Nitrate transport and compartmentation. *Journal Experimental Botany* 47: 843-854.
- Miller JA, Cramer MD. 2004. Root and nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 274: 1-36.
- Mynet A, Wain RL. 1973. Herbicidal action for iodine: effect on chlorophyll content and photosynthesis in dwarf bean *Phaseolus vulgaris*. *Weed Research* 13: 101-109.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology* 22: 867–880.
- Niu J, Chen F, Mi M, Li C, Zhang F. 2007. Transpiration and nitrogen uptake and flow in two maize (*Zea mays* L.) inbred lines as affected by nitrogen supply. *Annals of Botany* 99: 153-160.
- 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.
- Robinson D. 2001. Root proliferation, nitrate inflow and their carbon costs during nitrogen capture by competing plants. *Plant and Soil* 232: 41-50.
- Ruiz JM, Romero L. 1999: Cucumber yield and nitrogen metabolism in response to nitrogen supply. *Scientia Horticulturae* 82: 309-316.
- Shi-Wei G, Yi Z, Ying-Xu G, Yong L, Qi-Rong S. 2007. New insights in to the nitrogen from effect on photosynthesis and photorespiration. *Phedosphere* 17: 601-610.

- 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.
- Vicentz M, Moureaux T, Leydecker MT, Vaucheret H, Caboche M. 1993. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves in nitrogen and carbon metabolism. *Plant Journal* 3: 315-324.
- von Wiren NS, Gazzarrini W, Frommer B. 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil* 196: 191-199.
- Wallsgrave RM, Lea PJ, Mifflin BJ. 1979. Distribution of enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiology* 63: 232-236.
- Weckwerth W, Wenzel K, Fiehn O. 2004. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics* 4: 78-83.
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 355: 1517-1529.
- Yemm EW, Cocking EC. 1955. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst* 80: 209-213.

BLOQUE II CAPÍTULO 3

INFLUENCIA DE LA BIOFORTIFICACIÓN CON YODO SOBRE LA EFICIENCIA EN EL USO DE NITRÓGENO DE PLANTAS DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA* L. VAR. *LONGIFOLIA*)

II.3.1. Introducción

La agricultura juega un papel fundamental en la nutrición humana ya que es la principal fuente de todos los nutrientes requeridos para el mantenimiento de un buen estado de salud. Por otra parte, la agricultura se encuentra dominada por la producción, ya que en las últimas décadas se ha experimentado una rápida explosión demográfica que ha generado una creciente necesidad de incrementar los productos vegetales destinados al consumo humano. Todo ello ha de hacerse sin que haya una expansión de los terrenos de cultivo, pues en la actualidad la agricultura ocupa la mayoría de los terrenos fértiles de la tierra y usa gran parte de los recursos como agua y fertilizantes necesarios para su mantenimiento (Lawlor, 2002; Kmiecik et al., 2004). Esta gran demanda de productos vegetales ha generado una situación en la que la aplicación en exceso de los fertilizantes se ha convertido en una práctica agronómica habitual, especialmente en el caso de los fertilizantes nitrogenados debido al papel fundamental que juega este elemento en la producción de biomasa (Lea y Azevedo, 2006).

El nitrógeno (N) es un factor determinante en la producción de los cultivos, siendo esta totalmente dependiente de la cantidad de elemento disponible en

el medio (Lea y Azevedo, 2006). Este nutriente lo podemos encontrar bajo distintas formas entre las que se incluyen el nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y nitrógeno orgánico, siendo las más absorbidas por las plantas y por tanto más usadas en la agricultura, sus formas inorgánicas (von Wiren et al., 1997).

El NO_3^- es absorbido por la raíz de las plantas, translocado a la parte aérea mediante la corriente de transpiración, almacenado en la vacuola y/o transformado en productos de asimilación como aminoácidos y proteínas que son requeridos para la síntesis de biomasa. Sin embargo, su acumulación foliar puede ser un problema para los cultivos lo cual se produce cuando tanto la aplicación como la capacidad de absorción de NO_3^- excede la demanda requerida para el crecimiento vegetal (Ruiz y Romero 1999; Prasad y Chetty, 2008). Asimismo, existen numerosos factores que afectan a esta acumulación como son la textura del suelo, tipo de fertilizante y época de fertilización, tiempo de duración e intensidad de la luz, estación del cultivo y especie vegetal (Escobar-Gutierrez et al., 2002; Pavlou et al., 2007).

Debido a que la agricultura se ha visto dominada por la producción y dado el papel decisivo del N en este aspecto, el uso ineficiente de fertilizantes nitrogenados se ha incrementado notablemente en las últimas décadas generándose así una situación grave de contaminación ambiental (Gastal y Lemaire, 2002; Hirel et al., 2007). El impacto más frecuente generado por un mal uso de los fertilizantes nitrogenados es el lixiviado de los NO_3^- a acuíferos subterráneos, lo cual provoca una eutrofización de ecosistemas dulceacuícolas

y marinos. Además, se generan óxidos de nitrógeno gaseosos que pueden alcanzar la troposfera y reaccionar con el ozono produciéndose emisiones tóxicas de amonio (London, 2005; Beman et al., 2005).

Por otra parte, el NO_3^- también supone un riesgo para la salud humana ya que al ser ingerido es transformado rápidamente en nitrito y compuestos *N*-nitrosos. Estas formas son tóxicas y pueden generar graves patologías como la methaemoglobinemia o síndrome del bebé azul o como un incremento del riesgo de padecer cáncer al transformarse los nitritos en nitrosaminas (Mensinga et al., 2003). Del mismo modo, también se ha descrito una interferencia entre el NO_3^- y la absorción de yodo por parte del tiroides produciéndose una hipertrofia de esta glándula y por tanto una disfunción hormonal (Van Manen et al., 1994).

Estos riesgos se ven acentuados si tenemos en cuenta que los vegetales únicamente son capaces de convertir en producto destinado al consumo humano entre el 30-40% del nitrógeno aplicado (Raun y Johnson, 1999), produciéndose posteriormente una acumulación de este anión principalmente en las hojas afectando a la calidad nutricional de los cultivos (Santamaría et al., 1999).

Podemos encontrar un gran número de especies vegetales que poseen tendencia a acumular grandes cantidades de NO_3^- como es el caso de la lechuga, espinacas, acelgas entre otros (MAFF 1998). La lechuga es el primer

productor internacional cultivado y comercializado para la producción de ensaladas (Abu-Rayyan et al., 2004) por lo que su contenido en NO_3^- esta estrechamente regulado por la ley. El comité para la alimentación y agricultura de la Unión Europea (“Joint Expert Committee of the Food and Agriculture” (JECFA) and the European Commission’s Scientific Committee on Food (SCF)) han determinado una cantidad aceptable de ingesta de NO_3^- de 0-3.7 mg kg^{-1} de peso corporal por día (Speijers y van den Brandt, 2003). Por otro lado, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de America (EPA) ha estimado una dosis límite de referencia para el NO_3^- de 7.0 mg $\text{NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ de peso corporal por día (Mensinga et al., 2003).

Además de la contaminación ambiental por NO_3^- y el riesgo que su exceso supone para la salud humana, hemos de añadir el coste económico que supone el uso de los fertilizantes nitrogenados. Una forma de paliar todos estos inconvenientes es el uso de cultivares con una elevada eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE). Al mismo tiempo la utilización de estos cultivares tiene un elevado interés comercial, ya que pueden generar una mayor producción bien con un menor aporte de N o bien en medios de cultivo donde este elemento sea limitante (Svečnjak y Rengel, 2006). El NUE se define como la producción del product cosechable (biomasa)/ disponibilidad del N en el suelo (o aplicación de N al suelo). El NUE es dividido en dos procesos: eficiencia de absorción, definida como la habilidad de la planta en tomar N del suelo, y eficiencia en la utilización, que es la habilidad de la planta en transferir el N a la parte aérea (Lea y Azevedo, 2006; Ruiz et al., 2006).

A pesar de la efectividad que muestran los programas de biofortificación con yodo (Cao et al., 1994; Zhu et al., 2003; Blasco et al., 2008), ninguno de los trabajos disponibles en la bibliografía analizan si este elemento traza influye sobre los procesos fisiológicos básicos de la plantas, máxime cuando existen evidencias de que la aplicación en exceso de este elemento provoca fitotoxicidad en plantas (Zhu et al., 2003; Blasco et al., 2008). En definitiva, y debido a que tanto la absorción como la utilización del N están determinadas por procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas (Lawlor, 2002; Gastal y Lemaire, 2002), el objetivo de este trabajo fue comprobar si el NUE se ve afectado por la aplicación de diferentes dosis y formas de yodo.

II.3.2. Material y Métodos

Tanto las condiciones de cultivo, los tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico son iguales a los descritos en el Bloque I.

II.3.2.1. Muestreo del Material Vegetal

Raíces y parte aérea de plantas de lechuga fueron muestreadas a los 66 días después de la germinación de las plantas. Una parte de este material vegetal tras cuantificar el peso fresco (PF) fue secado mediante liofilización para calcular el peso seco (PS) y la concentración de NO_3^- y N orgánico.

II.3.2.2. Análisis del Material Vegetal

II.3.2.2.1. Parámetros de eficiencia en el uso del nitrógeno

II.3.2.2.3.1. Acumulación total de N (TNA)

El TNA se calculó usando la concentración de N total (TNC) y el peso seco total de las hojas, mediante la fórmula: $TNA = TNC \times ps \text{ foliar}$ (Sorgona et al., 2006).

II.3.2.2.3.2. Eficiencia en la absorción de N (NUpE)

El NupE se calculó mediante la siguiente fórmula: $NupE = TNA / PS \text{ radicular}$ (Siddiqui y Glass, 1981).

II.3.2.2.3.3. Eficiencia en la utilización del N (NUtE)

El NUtE se calculó mediante la siguiente ecuación: $NUtE = PS \text{ parte aérea} / TNA$ (Elliot y Läuchli, 1985).

II.3.3. Resultados y discusión

Aunque factores como la temperatura y intensidad de luz afectan tanto al crecimiento y desarrollo como a la calidad de la lechuga, el N es el elemento determinante en la producción vegetal (Abu-Rayyan et al., 2004; Niu et al.,

2007). Por ello, la determinación de la concentración de NO_3^- , N orgánico y N total son medidas frecuentes para precisar si es necesaria la aplicación de fertilizantes nitrogenados ya que están estrechamente relacionadas con los requerimientos fisiológicos de las plantas (Lawlor, 2002).

El NO_3^- es un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas puesto que interviene en la síntesis de proteínas para la formación de material vegetal y en el mantenimiento del potencial osmótico celular (Seginer, 2003). Sin embargo, su acumulación excesiva puede ser un grave problema desde un punto de vista nutricional especialmente en cultivos como la lechuga. Así, el nivel máximo permitido para que sea permitida la comercialización de las plantas de lechuga es de 4500 mg kg^{-1} PF (Santamaría, 2006). En nuestro trabajo observamos que independientemente de los tratamientos aplicados de yodo la concentración foliar de NO_3^- no supero el límite permitido de 4500 mg kg^{-1} PF (ver Bloque II, Capítulo 2 Tabla 1). En cuanto al efecto de los tratamientos encontramos que la aplicación de I^- a dosis iguales o superiores a $40 \mu\text{M}$ dio lugar a una disminución de los niveles foliar de NO_3^- respecto a las plantas control (ver Bloque II, Capítulo 2 Tabla 1), mientras que los tratamientos con IO_3^- no produjeron alteraciones significativas en la concentración foliar de este nutriente respecto a plantas control (ver Bloque II, Capítulo 2 Tabla 1).

Por otra parte, el N orgánico es generalmente producto de la asimilación de los NO_3^- y lo conforman principalmente aminoácidos y proteínas estructurales, funcionales y de almacenamiento. En último lugar, como el nitrógeno total

(TNC) lo componen la suma de las formas orgánicas e inorgánicas del N es un parámetro determinante para conocer el estatus nutricional de las plantas (Ruiz y Romero, 1999). Nuestros resultados nos muestran diferencias significativas disminuyéndose la concentración de N orgánico y de TNC a dosis iguales o superiores a 40 μM de I^- (ver Bloque II, Capítulo 2 Figs. 5 y 6). Sin embargo, y como ocurría en el caso de los NO_3^- , los tratamientos con IO_3^- no mostraron diferencias significativas respecto a las plantas control ni en la concentración de N orgánico ni en el TNC (ver Bloque II, Capítulo 2 Figs. 5 y 6).

A la luz de los datos obtenidos, podemos advertir un efecto diferencial del yodo dependiente de la forma en la que se aplique. De este modo, los tratamientos con I^- parecen producir un bloqueo en la absorción de NO_3^- afectando tanto al N orgánico como al TNC, mientras que los tratamientos con IO_3^- parecen no afectar a la concentración de las distintas formas nitrogenadas de las plantas. Un incremento en la producción con un menor aporte de N puede lograrse a través del empleo de vegetales que posean un uso de este elemento optimizado. Para realizar con mayor exactitud la selección de cultivares más eficientes se ha de tener en cuenta que la eficiencia en el uso de nutrientes puede ser definida (i) en términos agronómicos, como la producción total de biomasa por unidad de nutriente aplicado al medio, (ii) y en términos fisiológicos, como la producción total de biomasa por unidad de nutriente absorbido, (iii) y en términos de eficiencia de absorción, como la cantidad de nutriente absorbida por biomasa o longitud radicular (Elliot y Läuchli, 1985; Balingar et al., 1990). Con el fin de estudiar el efecto de la aplicación de yodo

sobre el NUE en nuestro estudio analizamos los parámetros TNA, NUpE y NUtE (Tabla 1), que son utilizados de forma general en este tipo de trabajos (Balingar et al., 1990; Ruiz y Romero, 1999; Ruiz et al., 2006; Sorgona et al., 2006).

Tabla 1. Influencia de la distintas dosis y formas de yodo sobre algunos indicadores del NUE de plantas de lechuga.

Tratamientos Dosis (μM)	TNA		NUpE		NUtE	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	380.4	380.4	798.5	798.3	0.024	0.024
20	260.5	451.3	737.3	1124.3	0.031	0.031
40	262.6	454.4	710.7	1174.5	0.033	0.027
80	192.1	450.6	519.5	1185.6	0.028	0.025
<i>P-valor</i>	***	**	**	**	***	***
LSD	38.0	40.5	70.6	144.1	0.02	0.01
Análisis de varianza						
Dosis (D)	***		***		*	
Formas (F)	**		*		***	
D x F	***		***		*	
LSD	14.7		69.3		0.001	

Acumulación Total de N (TNA) fue expresada en mg N; Eficiencia en la absorción de N (NUpE) fue expresada como $\text{g}^2 \text{PS mg}^{-1} \text{N}$; Eficiencia en la Utilización de N (NUtE) fue expresada como $\text{mg N g}^{-1} \text{PS}$.

Los niveles de significancia son representados como: NS: (no significativo) $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$

En esta experiencia se pudo observar que mientras la aplicación de I^- producía una disminución en el TNA, los tratamientos con IO_3^- causaban un incremento en el contenido de N a dosis iguales o superiores a $20 \mu\text{M}$ (Tabla 1). Por otra parte, en los tratamientos con I^- y especialmente en la dosis $80\mu\text{M}$, se produjo una disminución en el NUpE (Tabla 1). Al contrario, la aplicación de IO_3^- causó un incremento en la eficiencia de absorción en todas las dosis aplicadas (Tabla 1). Finalmente, al examinar el NUtE observamos que tanto la aplicación de I^-

como la de IO_3^- produjo un aumento significativo en la utilización de N respecto a las plantas control (Tabla 1).

Tras llevar a cabo un análisis del conjunto de los parámetros analizados en este trabajo comprobamos que ante la aplicación de una concentración constante de N al medio de cultivo, la adición de I^- provoca una disminución de la absorción, concentración y contenido foliar de este elemento. Este hecho ocasiono una reducción de la biomasa tan sólo en la dosis 80 μM de I^- (Ver Bloque I, Tabla 1) debido a que posiblemente en dosis inferiores a 80 μM existió una mayor removilización y utilización de los NO_3^- disponibles. Sin embargo, los tratamientos con IO_3^- incrementaron de forma significativa todos los aspectos relativos al NUE sin incrementar la concentración de N en la planta viéndose también reflejado en un incremento de la biomasa en dosis iguales o inferiores a 40 μM (Ver Bloque I, Tabla 1).

Tanto la absorción como la utilización del N por parte de los cultivos es ampliamente variable. Por ello, es esencial llevar a cabo estudios agronómicos y fisiológicos de la respuesta de las plantas al N ya que de este modo conseguiremos un mejor entendimiento del NUE lo que nos proporcionara una poderosa herramienta para la selección de cultivares eficientes. Considerando que en la actualidad se están llevando a cabo gran cantidad de programas de biofortificación con elementos traza resulta esencial estudiar como la aplicación de estos elementos afecta a la fisiología de la planta, y en especial al NUE en cultivos como la lechuga. Para nuestro conocimiento este es el primer trabajo

que estudia el efecto de la aplicación de yodo sobre el NUE en plantas de lechuga y creemos que los resultados aportados además de ser novedosos podrían resultar muy beneficiosos. Nuestros resultados indican que la aplicación de IO_3^- en dosis iguales o inferiores a $40 \mu\text{M}$ puede ser una forma de obtener una mayor producción y calidad vegetal con un menor aporte de fertilizantes nitrogenados, ya que se ven incrementados todos los aspectos relativos a la eficiencia en el uso del nitrógeno. Además, la posible reducción en la fertilización N por la aplicación de IO_3^- se verá reflejada tanto en la disminución del impacto ambiental como en una reducción en los costes económicos derivados de la aplicación de este tipo de fertilizantes.

II.3.4. Referencias

- Abu-Rayyan A, Kharawish BH, Al-Ismael K. 2004. Nitrate content in lettuce (*Lactuca sativa* L) heads in relation to plant spacing, nitrogen form and irrigation level. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 931-936.
- Baethgen WE, Alley MM. 1989. A manual colorimetric procedure of measuring ammonium nitrogen in soil and plant. *Communications of Soil Science and Plant Analysis* 20: 961-969.
- Baligar CV, Duncan RR, Fageria NK. 1990. Soil-plant interactions on nutrient use efficiency in plants. In: Balingar VC, Duncan RR (Eds.), *Crops as enhancers of nutrient use*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 351-373.

- Beman JM, Arrigo KR, Matson PA. 2005. Agricultural runoff fuels large phytoplankton blooms in vulnerable areas of the ocean. *Nature* 434: 211-214.
- Blasco B, Rios JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L. 2008. Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology* 152: 289-299.
- Cao XY, Jiang XM, Kareem A, Dou ZZ, Rakeman MA, Zhang ML. 1994. Iodination of irrigation waters as a method of supplying iodine to a several iodine-deficient population in Xinjiang, China. *Lancet* 344: 107-109.
- Cataldo DA, Haroon M, Schreder LE, Young VL. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications of Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80.
- Elliot GC, Läuchli A. 1985. Phosphorus efficiency and phosphate – iron interactions in maize. *Agronomy Journal* 77: 399-403.
- Escobar-Gutierrez AJ, Burns IG, Lee A, Edmondson RN. 2002. Screening lettuce cultivars for low nitrate content during summer and winter production. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77: 232-237.
- Gastal F, Lemaire G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* 53: 789-799.

- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58: 2369-2387.
- Kmiecik W, Lisiewska Z, Slupski J. 2004. Effects of freezing and storage of frozen products on the content of nitrate, nitrites and oxalates in dill (*Anethum graveolens* L.). *Food Chemistry* 86: 105-111.
- Lawlor DW. 2002. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany* 53: 773-787.
- Lea PJ, Azevedo RA. 2006. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology* 149: 243-247.
- London JG. 2005. Nitrogen studies fertilizes fears of pollution. *Nature* 433: 791.
- MAFF: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1998. 1997/8 UK monitoring programme of nitrate in lettuce and spinach, food surveillance information sheet n° 154 August 1998 London
- Mensinga TT, Speijers JGA, Meulenbelt J. 2003. Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicology Review* 14: 576-584.
- Niu J, Chen F, Mi G, Li C, Zhang F. 2007. Transpiration and nitrogen uptake and flow in two maize (*Zea mays* L.) inbred lines as affected by nitrogen supply. *Annals of Botany* 99: 153-160.

- Pavlou GC, Ehalotis CD, Kawadias VA. 2007. Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. *Scientia Horticulturae* 111: 319-325.
- Prasad S, Chetty AA. 2008. Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. *Food Chemistry* 106: 772-780.
- Raun WR, Johnson GV. 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agronomy Journal* 91: 357-363.
- Ruiz JM, Romero L. 1999. Cucumber yield and nitrogen metabolism in response to nitrogen supply. *Scientia Horticulturae* 82: 309-316.
- 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.
- Santamaría P, Elia A, Serio F, Todario E. 1999. A survey of nitrate and oxalate content in retail fresh vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1882-1888.
- Santamaría P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 10-17.
- Seginer I. 2003. A dynamic model for nitrogen-stressed lettuce. *Annals of Botany* 91: 623-635.
- Siddiqi MY, Glass AD. 1981. Utilization index: A modified phosphorus nutrition of eight forms of two clover species, *Trifolium ambiguum* and *Trifolium repens*. *Journal of Plant Nutrition* 4: 289-302.

- Sorgona A, Abenavoli MR, Gringeri PG, Cacco G. 2006. A comparison of nitrogen use efficiency definitions in Citrus rootstocks. *Scientia Horticulturae* 109: 389-393.
- Speijers GJA, van den Brandt PA. 2003. Nitrate and potential endogenous formation of N-nitroso compounds. WHO Food Additives Series 50. Available at <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je06.htm>.
- Svecnjak Z, Rengel Z. 2006. Nitrogen utilization efficiency in canola cultivars at grain harvest. *Plant and Soil* 283: 299-307.
- Van Manen JMS, van Dijk A, Mulder K, Baets MH, Menheere PCA, van der Heide D, Mertens PLJM, Kleinjans JCS. 1994. Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid. *Toxicological Letters* 72: 365-374.
- von Wiren N, Gazzarrini S, Frommer WB. 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil* 196: 191-199.
- Wolf B. 1982. A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrient status. *Communications of Soil Science and Plant Analysis* 13: 1035-1059.
- Zhu Y-G, Huang Y-Z, Hu Y, Liu Y-X. 2003. Iodine uptake by spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants grown in solution culture: effects of iodine species and solution concentrations. *Environmental International* 29: 33-37.

BLOQUE II CAPÍTULO 4

FOTOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE AZÚCARES DE PLANTAS DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA* L. VAR. *LONGIFOLIA*) SOMETIDAS A BIOFORTIFICACIÓN CON YODO

II.4.1. Introducción

El medio ambiente cambiante obliga a las plantas a realizar continuas adaptaciones a su entorno para sobrevivir, desarrollarse y propagarse. Su elevada capacidad de adaptación es debida a los reajustes morfológicos y fisiológicos que los vegetales son capaces de realizar tanto en su arquitectura como funcionamiento interno (De Pinheiro y Marcelis, 2000; Rook et al., 2006). Además, esta variación de los factores ambientales influye de forma significativa en el crecimiento vegetal, afectando por tanto a la producción y calidad de los cultivos (Zhou et al., 2009).

La fotosíntesis es el proceso básico que conduce al crecimiento de las plantas y que puede ser definido como la construcción de estructuras vegetales (metabólicas o no) desde fuentes tanto endógenas como exógenas. De este modo, la fotosíntesis se convierte en uno de los procesos metabólicos de mayor importancia fisiológica e interés agronómico debido a su implicación en la productividad vegetal (Van Iersel, 2003; Magaña et al., 2009). Este proceso fisiológico no es completamente eficiente, ya que del total de la energía solar incidente tan sólo el 45% puede ser absorbido por el aparato fotosintético. Asimismo, debido a la separación de la estructura fotosintética en dos

fotosistemas, únicamente dos terceras partes de la energía luminosa absorbida puede ser almacenada en energía química, lo que supone una eficiencia de conversión energética final del 30%. Además, otro factor a tener en cuenta es que la capacidad fotosintética máxima varía con la especie vegetal (Melis, 2009). Por ello, en las últimas décadas se han tratado de aplicar buenas prácticas agronómicas en los campos de cultivo, con el fin de crear las condiciones óptimas que permitan una mejora del proceso fotosintético vegetal. Este hecho, unido a que la agricultura se ve fuertemente influenciada por la creciente necesidad de una elevada producción vegetal, justifica el uso masivo de fertilizantes generando una innecesaria situación de contaminación ambiental con graves consecuencias para nuestro medio ambiente (Gastal y Lemaire, 2002; Hirel et al., 2007).

En la actualidad, el creciente conocimiento de la biología molecular, bioquímica y fisiología vegetal conducen a un intento de incrementar el proceso fotosintético mediante la manipulación de los propios metabolismos de la planta. Para ello, se intenta encontrar los mecanismos claves a través de los cuales se pueda ver realmente incrementada la fotosíntesis (Paul et al., 2001). En este sentido se han abierto dos vías de investigación principales, una de ellas trata de localizar las enzimas clave que controlan la tasa fotosintética y la otra pretende regular el cociente fotosíntesis-fotorrespiración. Esta última parece ser una vía de investigación prometedora ya que esta relación determina la productividad fotosintética de los cultivos (Mert, 1989; Ogren, 2003).

Durante la fotosíntesis aunque el carbono asimilado en hojas puede tener otros usos dentro y fuera del cloroplasto, la mayor parte de este elemento es finalmente convertido en azúcares solubles (Champigny, 1985). Estos compuestos, principalmente glucosa, fructosa y sacarosa, son una fuente de carbono que se encuentra ampliamente extendida en la vida de las células eucariotas, y juegan un papel fundamental en la estructura y función de la célula (Hirabayashi, 1996).

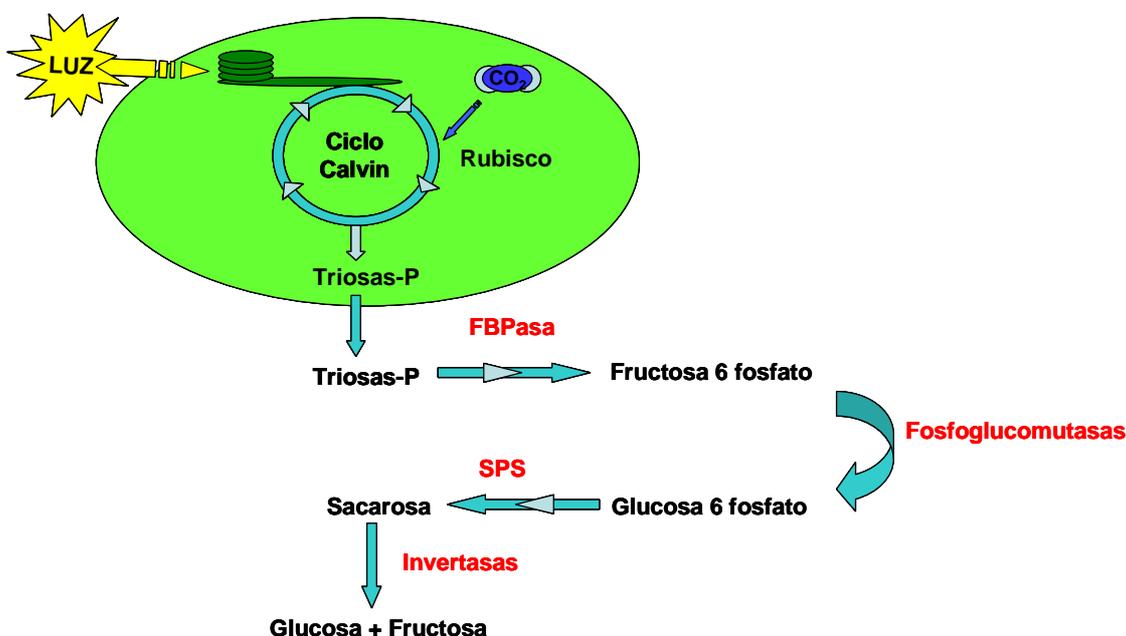
En organismos fotosintéticos, especialmente en plantas superiores, la sacarosa y todas las enzimas y proteínas relacionadas con su procesamiento, juegan un papel central entre fotosíntesis y crecimiento (Salerno y Curatti, 2003; Couée et al. 2006). Por ello, las plantas mantienen un balance del carbono asimilado entre almacenamiento y crecimiento. Aunque ciertamente, este carbono fotosintético es fijado únicamente en presencia de luz, tanto el crecimiento como el mantenimiento de las funciones fisiológicas se producen durante todo el ciclo día-noche (Walter et al., 2002; Nouze y Maloof 2006). Este hecho es posible gracias a que la tasa de asimilación durante el periodo de luz, permite una acumulación y almacenamiento de carbono en la hoja, que posteriormente, será removilizado para suplir las demandas de carbono requeridas durante la noche (Smith y Stitt 2007). Estas demandas de carbono por parte de los sumideros (hojas jóvenes en formación en el caso de la lechuga), junto con la luz y estado redox, son los factores que gobiernan la tasa fotosintética (Couée et al., 2006). Cuando existe una gran utilización de hidratos de carbono solubles debida a un crecimiento rápido, la tasa fotosintética es elevada,

mientras que la acumulación estos compuestos en hojas se encuentran negativamente relacionados con la fotosíntesis (Layne y Flore, 1995; McCormick et al., 2008; Magaña et al., 2009). De este modo, la acumulación de azúcares regula negativamente tanto la expresión de los genes de la fotosíntesis como los del ciclo de Calvin (Koch, 1996; Rolland et al., 2002).

Por otra parte, la optimización de la asimilación del carbono fotosintético, además de los azúcares como señal, requiere la coordinación de distintos componentes como por ejemplo, la activación de enzimas, el mantenimiento de los niveles de metabolitos y un correcto estatus redox en la célula (Raghavendra y Padmasree, 2003). Así, durante el proceso fotosintético se generan energía (ATP) y poder reductor (NADPH) que serán consumidos durante los procesos de asimilación, transporte y conversión del carbono atmosférico en sacarosa en el citosol (Esquema 1). Además, este elemento es asimilado gracias a la reacción catalizada por la Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, también conocida como Rubisco, que forma el 3-fosfoglicerato. Este compuesto sufre varias transformaciones en el Ciclo de Calvin-Benson, dando como resultado la regeneración de su sustrato principal y la formación de triosas fosfato que serán transportadas en su mayoría al citosol (Esquema 1) (Champigny, 1985).

Las triosas fosfato dihidroxiacetona fosfato y fosfogliceraldehído, por la acción de una aldolasa dan lugar a la formación de fructosa 1,6-bisfosfato, que gracias a la enzima gluconeogénica fructosa 1,6 bisfosfatasa (FBPasa) es convertida

en fructosa 6-fosfato (Esquema 1). La formación de UDP-glucosa desde la fructosa 6-fosfato consiste en tres pasos catalizados por un grupo de enzimas conocidas como fosfoglucomutasas. En esta reacción se encuentra favorecida la formación de UDP-glucosa debido a que existe una continua eliminación de pirofosfato del medio (Esquema 1) (Preiss, 1982; Champigny, 1985). Posteriormente, la formación de sacarosa se produce mediante la acción secuencial de dos enzimas, entre las que destaca la sacarosa fosfato sintasa (SPS) por ser uno de los puntos clave de regulación del ciclo de los azúcares (Esquema 1). Finalmente, la degradación de la sacarosa se puede producir bien por la reacción reversible de la SPS o bien por la acción de las invertasas ácida (apoplasto y vacuola) y neutra (citosol y vacuola) (Esquema 1) (Harbron et al., 1981; Rosales et al., 2006).



Esquema 1. Fotosíntesis y metabolismo de los azúcares en plantas

Cuando las plantas son expuestas a distintos tipos de estrés uno de los procesos más sensibles a estas condiciones adversas es la fotosíntesis, afectándose principalmente el funcionamiento del fotosistema II (Cruz et al., 2005). En este sentido, en un programa de biofortificación con yodo la aplicación de este elemento traza ha de hacerse con mucha precaución, ya que una vez absorbido este elemento puede darse una oxidación intracelular a I_2 , que produce una inhibición del proceso fotosintético (Mynet y Wain, 1973). Además de este hecho, el efecto fitotóxico del yodo produce una disminución de la biomasa que puede dar lugar a la pérdida de productividad de los cultivos (Blasco et al. 2008). Por ello, y debido a la necesidad del desarrollo de nuevas experiencias que relacionen la implicación de los programas de biofortificación con yodo en la fisiología de los cultivos, el objetivo de este trabajo fue el estudio de la fotosíntesis en plantas de lechuga sometidas a un programa de biofortificación con distintas dosis y formas de este elemento traza.

II.4.2. Material y métodos

Tanto las condiciones de cultivo, los tratamientos, diseño experimental, muestreo del material vegetal y análisis estadístico son iguales a los descritos en el Bloque I.

II.4.2.1. Muestreo del material vegetal

Parte aérea de plantas de lechuga fueron muestreadas a los 66 días después de la germinación de las plantas. Antes de la realización del muestreo en hojas intactas se analizó en fresco: clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*), fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y eficiencia en el uso del agua (WUE). Tras el análisis de estos parámetros se procedió al muestreo vegetal. Una parte de este material vegetal tras cuantificar el peso fresco (PF) fue secado mediante liofilización para calcular el peso seco (PS). El resto del material vegetal fue congelado en N líquido y usado para el análisis de glucosa, fructosa, sacarosa and y las actividades enzimáticas FBPasa, SPS, invertasa ácida e invertasa neutra.

II.4.2.2. Análisis del Material Vegetal

II.4.2.2.1. Análisis de los parámetros fotosintéticos

Las medidas fueron realizadas en hojas maduras totalmente expandidas de cada una de las plantas en todos los tratamientos de yodo usando el aparato de medida Li-COR 6400.

II.4.2.2.1.1. Tasa fotosintética neta, transpiración y conductancia estomática

Los parámetros analizados: Tasa fotosintética neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y conductancia estomática de CO_2 ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), se determinaron en un ambiente de CO_2 a una concentración de $300 \mu\text{mol mol}^{-1}$, a una temperatura de $26/30 \text{ }^\circ\text{C}$ y con una densidad de flujo de fotones de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

II.4.2.2.1.2. Eficiencia en el uso del agua

El WUE fue calculado como el cociente entre la tasa fotosintética neta y la tasa de transpiración, y fue expresada como mmol CO_2 asimilado $\text{mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ transpirada (Nieva et al., 1999)

II.4.2.2.1.3. Pigmentos fotosintéticos

La extracción de pigmentos fotosintéticos en hojas se realizó tomando 0.15 g de material fresco en 10 ml de etanol. La concentración de Chl a y b fue determinada espectrofotometría usando las longitudes de onda 664.2 y 648.6 nm . Las concentraciones de estos pigmentos expresadas en mg g PF^{-1} fueron obtenidas siguiendo las ecuaciones de Wellburn (1994).

II.4.2.2.2. Metabolismo de los azúcares

II.4.2.2.2.1. Análisis de los azúcares solubles

La extracción y cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa se llevó a cabo empleando un kit enzimático (Roche Biopharm, Francia) basado en la formación de NADPH a 340 nm.

II.4.2.2.2.2. Enzimas de síntesis y degradación de sacarosa

II.4.2.2.2.2.1. Actividad fructosa 1,6-bifosfatasa

La enzima FBPassa fue extraída de acuerdo con el método descrito por Holaday et al. (1992). La mezcla de reacción utilizada en los ensayos consistía en un tampon Hepes-HCl (50 mM, pH 7.6), MgCl₂ (5 mM), fructosa 6-fosfato (0.25 mM), β-mercaptoethanol (10 mM), KF (10 mM) y 100 μL of extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubo a 25°C durante 10 min en oscuridad. Posteriormente se adicionó ácido tricloroacético (TCA) al 30% para detener la reacción. The Pi liberado fue analizado siguiendo el método de Geladopoulos et al. (1991).

II.4.2.2.2.2. Actividad sacarosa fosfato sintasa

La extracción de la enzima SPS se realizó homogenizando 1 g de material vegetal en 5 mL de tampón Hepes-NaOH 50 mM a pH 7.5, el cuál contenía 5 mM MgCl₂, 1 mM Na-EDTA, 2.5 mM DTT, 0.5 mg mL⁻¹ BSA y Triton X-100 al 0.05% (v/v), de acuerdo con el método propuesto por Hubbard et al. (1989). El homogenizado se filtró y se centrifugó a 11500 rpm durante 10 min. El extracto resultante se usó para la determinación de la actividad enzimática y de las proteínas solubles, las cuáles fueron medidas siguiendo el método de Bradford (1976). La actividad SPS fue determinada en una mezcla de reacción que contenía 50 mM Hepes-NaOH pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 25 mM Fructosa, 25 mM UDP-Glucosa, y extracto vegetal, siguiendo el método realizado por Cheikh y Brenner (1992). El contenido de sacarosa se determinó según el método de antrona descrito por Van Handel (1968).

II.4.2.2.2.3. Actividad invertasa ácida y neutra

Las invertasas catalizan la reacción hidrolítica de la sacarosa originando glucosa y fructosa. Tanto la invertasa ácida como la neutra fueron extraídas mediante la homogenización de 1 g de material vegetal en 5 mL de tampón fosfato potásico 0.2 M a pH 7.0 que contenía 20 mM mercaptoetanol, siguiendo el método de Hubbard et al. (1989). Para la determinación de la invertasa ácida se preparó una mezcla de reacción que contenía: 0.6 mL de tampón acetato sódico 0.1 M a pH 4.5, 0.2 mL de sacarosa 0.75 M y 0.02 mL de extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó en oscuridad a 37 °C durante 30

min. La reacción se detuvo por adición de 1 mL de una solución que contenía: 1 g de ácido dinitrosalicílico, 0.1 g de fenol, 0.05 g de sulfito sódico y 1 g de NaOH, preparado de acuerdo al método de Miller (1959). Las muestras se incubaron durante 5 min en un baño de agua a 100°C y se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se le agregó 1 mL de Sal de Rochelle (tartrato sódico potásico tetrahidrato) al 40% y se leyó la absorbancia a 575 nm frente a una curva patrón de glucosa.

Para la determinación de la invertasa neutra se siguió el mismo proceso que en la invertasa ácida, excepto que el tampón acetato sódico fue sustituido por tampón fosfato-citrato 0.1 M a pH 7.0 (Hubbard et al., 1989). La actividad de ambas invertasas se expresó como $\mu\text{mol glucosa mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

II.4.3. Resultados y discusión

La conversión eficiente de energía solar en crecimiento a través de la fotosíntesis es una relación ampliamente estudiada en cultivos como la lechuga, que es considerado el principal cultivo de consumo foliar (De Pinheiro et al., 2000; Broadley et al., 2000). Además su producción también se puede ver influenciada por la adición de elementos traza que son utilizados en los programas de biofortificación. En el caso de la aplicación de yodo este elemento puede estimular el desarrollo vegetativo de numerosas especies vegetales, viéndose favorecido un incremento de la producción de este tipo de cultivos (Brost Pauwels, 1961). Como detallábamos en el bloque I (Ver Bloque

I, Tabla 1), la aplicación de I^- produjo una disminución significativa de la biomasa cuando la dosis aplicada era de 80 μM . Sin embargo, los tratamientos con IO_3^- revelaron un incremento de la biomasa respecto a las plantas control, encontrándose el máximo valor al aplicar una dosis igual a 20 μM .

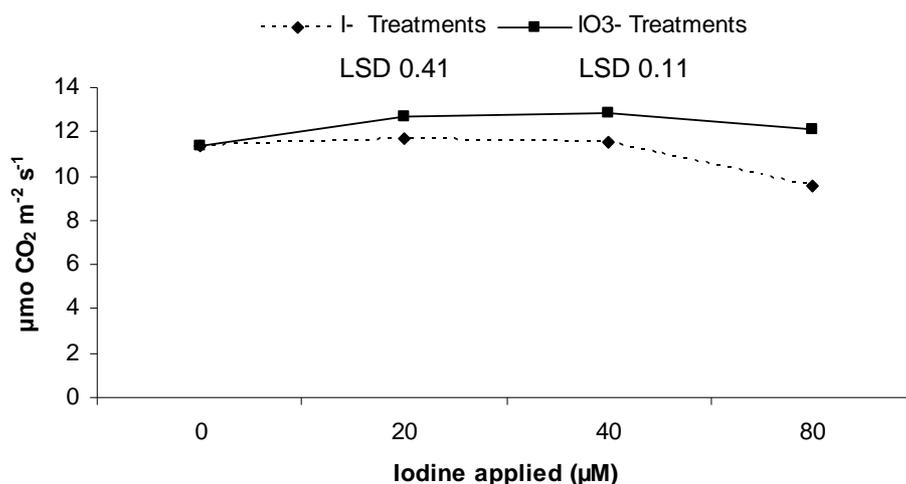


Figura 1. Tasa fotosintética neta en plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo

De forma paralela a la biomasa, la tasa fotosintética disminuyó de forma significativa en los tratamientos 80 μM de I^- (Fig 1, $P < 0.001$), e incrementó tras la aplicación de cualquier dosis de IO_3^- (Fig 1, $P < 0.001$). Por lo tanto, podemos observar que mientras que en los tratamientos más elevados de I^- se produce una disminución tanto de la biomasa como del proceso fotosintético, el IO_3^- en todas sus dosis genera un incremento de ambos parámetros. Por ello, la fotosíntesis puede presentarse como un indicador fiable y eficaz del efecto que este elemento traza puede llegar a ejercer sobre las plantas cuando es aplicado bajo las distintas formas y dosis.

Tabla 1. Contenido en clorofilas en hojas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

Tratamientos Dosis (μM)	Chl a		Chl b		Chl a/b	
	I ⁻	IO ₃ ⁻	I ⁻	IO ₃ ⁻	I ⁻	IO ₃ ⁻
0	0.93	0.93	0.90	0.90	1.03	1.03
20	0.89	0.94	0.70	0.82	1.26	1.15
40	0.93	0.91	0.79	0.84	1.19	1.10
80	0.91	1.08	0.79	1.04	1.15	1.04
<i>P</i> -valor	NS	*	*	*	NS	NS
LSD	0.09	0.04	0.08	0.10	0.18	0.23
Análisis de varianza						
Dosis (D)	*		**		NS	
Formas (F)	*		**		NS	
D x F	*		*		NS	
LSD	0.06		0.07		0.14	

Concentraciones de clorofila expresadas como mg g PF^{-1}

Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

El contenido en Chl a de plantas de lechuga tratadas con I⁻ no varió de forma significativa respecto a las plantas control (Tabla 1). Sin embargo, en plantas tratadas con IO₃⁻ la cantidad de este pigmento fotosintético incrementó de forma significativa cuando la dosis aplicada era igual a 80 μM (Tabla 1). Por otra parte, el contenido en Chl b de las plantas tratadas con yodo disminuyó levemente respecto a las plantas control cuando la forma aplicada era I⁻ (Tabla 1) mientras que supuso un incremento en la cantidad de este pigmento cuando se aplicó IO₃⁻ a una concentración igual a 80 μM (Tabla 1). El ratio Chl a/b no se vio afectado por ninguno de los tratamientos de yodo aplicados (Tabla 1).

Para que se produzca un incremento en la producción vegetal, además de una gran tasa fotosintética se requiere una elevada tasa de fijación de CO₂ atmosférico que se consigue mediante un incremento de la conductancia

estomática. Inevitablemente, esta apertura de los estomas conlleva una pérdida de vapor de agua por parte de la planta que se conoce con el nombre de transpiración (Blum, 2009). Teniendo en cuenta este proceso de intercambio de gases, la eficiencia en el uso del agua (WUE) puede definirse como consumo de agua necesario para que las plantas puedan incorporar a su biomasa una determinada cantidad de carbono atmosférico (Rauphael et al., 2008).

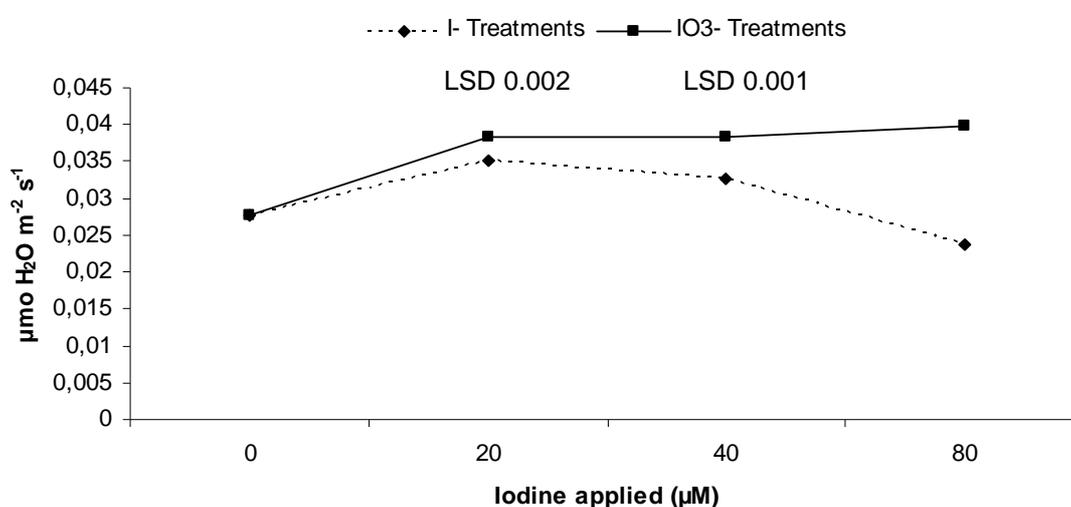


Figura 2. Conductancia estomática en hojas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo

Los datos experimentales mostraron que los tratamientos con I^- produjeron un incremento de la conductancia estomática en las dosis 20 y 40 μM (Fig. 2, $P < 0.001$) y una ligera disminución de esta cuando la dosis aplicada era 80 μM (Fig. 2). Por otra parte, los tratamientos con IO_3^- produjeron un incremento de la apertura de los estomas para todas las dosis empleadas en este estudio (Fig. 2, $P < 0.001$). Consecuentemente, mientras que los tratamientos con I^-

incrementaron la tasa de transpiración únicamente cuando las dosis aplicadas eran 20 y 40 μM (Fig. 3, $P < 0.001$), todos los tratamientos con IO_3^- produjeron un incremento significativo de este proceso fisiológico (Fig. 3, $P < 0.001$). Respecto al WUE, la aplicación de yodo produjo una disminución significativa de este parámetro en todas las dosis y formas aplicadas (Fig 4, $P < 0.001$), siendo más acusada en el caso de la aplicación de IO_3^- (Fig. 4).

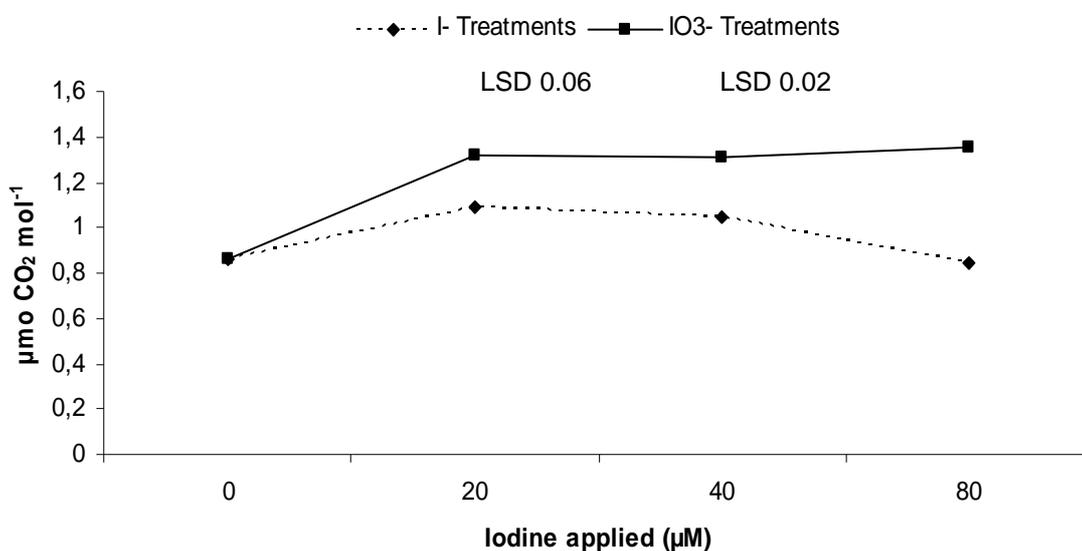


Figura 3. Tasa de transpiración en hojas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo

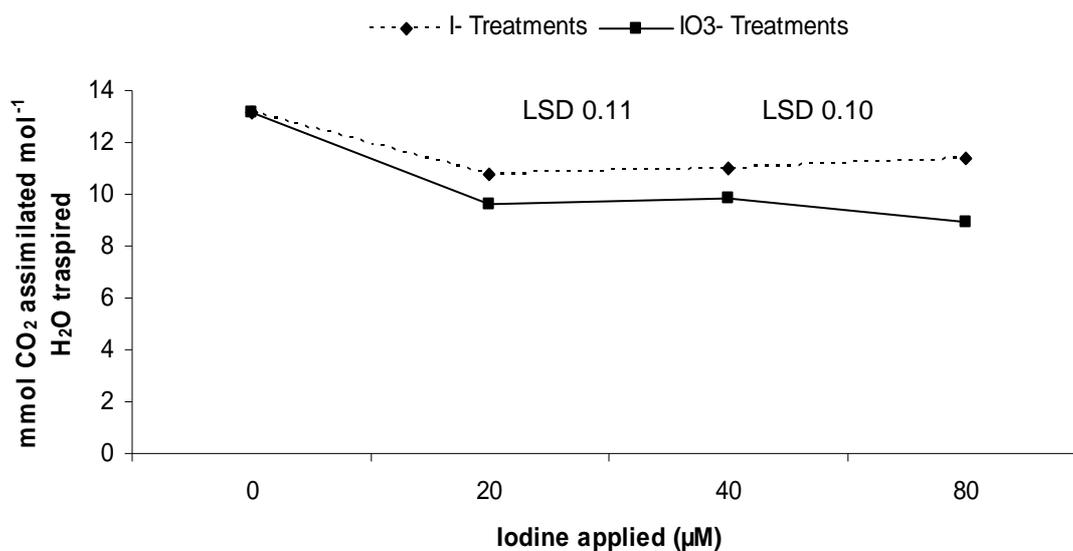


Figura 4. Eficiencia en el uso de agua (WUE) en plantas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo

En el caso de los tratamientos con I⁻ a dosis de 20 y 40 µM, podemos observar que aunque existe un sutil incremento en la fotosíntesis (Fig. 1), una mayor conductancia estomática (Fig. 2) y transpiración (Fig. 3) respecto a las plantas control no es suficiente para que se traduzca en un incremento de la biomasa (ver Bloque I, Tabla 1). Sin embargo, en el caso de la aplicación de la dosis 80 µM de I⁻, la disminución de la tasa fotosintética (Fig. 1) si se encuentra asociada tanto a una disminución de la biomasa (ver Bloque I, Tabla 1) como a los parámetros conductancia estomática (Fig. 2) y transpiración (Fig. 3), demostrándose de nuevo que la aplicación de este elemento a elevadas dosis ejerce un efecto fitotóxico sobre la fisiología de las plantas. Este hecho se ve reforzado porque, como sucede con distintos elementos contaminantes, el I₂ puede afectar a la fotosíntesis siendo el fotosistema II el punto más sensible de de este proceso (Mynet y Wine, 1973; Ait Ali et al., 2006). Por otra parte, todos

los tratamientos con IO_3^- produjeron un incremento de la biomasa (Ver Bloque I, Tabla 1) posiblemente gracias a la elevada tasa fotosintética (Fig. 1), conductancia estomática (Fig. 2) y transpiración (Fig. 3) que poseían estas plantas de lechuga respecto a las plantas control.

La acumulación de azúcares solubles esta directamente relacionada con la fotosíntesis y han sido identificados como la mayor fuente de carbono de las plantas (Magaña et al., 2009), además juegan un papel fundamental en el correcto funcionamiento de la vida celular (Couée et al., 2006). De entre estos hidratos de carbono, la fructosa y la glucosa son los compuestos a través de los cuales se va a formar la sacarosa, que es la principal forma en la que el carbono fotosintético es translocado desde la hoja hacia los sumideros y estructuras en formación (Zrenner et al., 1996). Los datos representados en la tabla 2 mostraron que los tratamientos con I^- provocaron un incremento en la concentración de fructosa 6-P cuando la dosis aplicada era superior o igual a $40 \mu\text{M}$. Asimismo, los tratamientos con IO_3^- no causaron ninguna alteración de este azúcar respecto a las plantas control. Por otra parte, los tratamientos con I^- produjeron un incremento de la concentración de glucosa 6-P cuando las dosis aplicadas fueron 20 y $40 \mu\text{M}$ (Tabla 2). De nuevo, los tratamientos con IO_3^- no tuvieron ningún efecto sobre el cultivo de lechuga (Tabla 2). Al examinar la concentración de sacarosa se pudo observar que la aplicación de yodo no tuvo ningún efecto sobre este azúcar soluble.

Tabla 2. Concentración de azúcares solubles en hojas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

Tratamientos Dosis (μM)	Fructosa-6-P		Glucosa-6-P		Sacarosa	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	5.50	5.50	4.60	4.60	14.2	14.2
20	6.79	4.05	6.33	4.31	17.5	13.6
40	7.82	4.10	6.04	4.50	15.3	13.1
80	9.85	4.34	4.71	4.81	12.5	13.0
<i>P-valor</i>	***	NS	**	NS	NS	NS
LSD	0.63	2.00	1.03	1.39	2.82	1.95
Análisis de varianza						
Dosis (D)	**		**		NS	
Formas (F)	***		*		*	
D x F	***		NS		NS	
LSD	1.18		1.27		1.87	

Concentraciones de azúcares expresadas como mg g PF^{-1}

Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

En la vía de formación de sacarosa la FBPasa y SPS son los puntos clave de control de este proceso. La FBPasa cataliza la primera reacción irreversible en la síntesis de sacarosa y juega un papel muy importante en el control de los niveles de triosas fosfato en el citoplasma, además su acción se encuentra influenciada tanto por la cantidad de sustrato como de producto final (Stitt et al., 1981). Del mismo modo, la actividad SPS se ve inhibida por la concentración de sacarosa en el medio, aunque su sensibilidad a este producto final varía dependiendo de la especie vegetal considerada. Incluso, como en el caso de la espinaca, puede llegar a no ejercer ningún efecto sobre su actividad biosintética (Champigny, 1985; Foyer et al., 1983). En esta experiencia, todos los tratamientos con I^- produjeron un incremento de la actividad FBPasa (Tabla 3) respecto a las plantas control. Por el contrario, la aplicación de IO_3^- no tuvo ningún efecto sobre las plantas de lechuga usadas en nuestra experiencia

(Tabla 3). Asimismo, la actividad SPS se vio incrementada de forma significativa únicamente cuando el yodo se aplicaba en dosis 20 y 40 μM y bajo la forma de I^- (Tabla 3).

Tabla 3. Respuesta del metabolismo de los azúcares en hojas de plantas lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de yodo.

Tratamientos Dosis (μM)	FBPasa		SPS		IA		IN	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	256	256	191	191	308	308	660	660
20	327	221	260	195	323	358	611	651
40	339	232	234	190	327	357	614	656
80	362	249	187	191	331	431	640	803
<i>P</i> -valor	***	NS	***	NS	NS	*	NS	**
LSD	26.7	38.5	5.74	5.49	45.4	50.1	50.9	62.5

Análisis de varianza				
Dosis (D)	***	***	*	*
Formas (F)	***	***	*	**
D x F	***	***	NS	*
LSD	29.4	5.56	41.5	58.5

Actividad fructosa 1,6-bifosfatasa expresada como $\text{mg Pi mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Actividad sacarosa fosfato sintasa (SPS) expresada como $\text{mM sacarosa mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Actividad invertasa ácida (IA) e invertasa alcalina expresadas como $\mu\text{mol glucosa mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$.

Los niveles de significancia son representados como $P > 0.05$: NS (no significativo), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

Entre los factores que regulan la concentración de sacarosa en los tejidos vegetales encontramos las enzimas conocidas como invertasas. Existen dos tipos de invertasas, la ácida, que posee una actividad máxima a un pH de entre 5 y 5.5 y la neutra, cuya actividad máxima se desarrolla a un pH de 7. Ambas degradan la sacarosa y la transforman en sus compuestos constituyentes, glucosa y fructosa (Rosales et al., 2006; William et al., 2007). Los resultados presentados en la tabla 3 mostraron que las actividades invertasa ácida y neutra se comportaron de forma paralela, de modo que los tratamientos con I^-

no afectaron a estas actividades enzimáticas (Tabla 3). Sin embargo, la aplicación de 80 μM de IO_3^- produjo un incremento de estas actividades enzimáticas (Tabla 3), siendo más acusada en el caso de la actividad invertasa neutra.

Aunque existe un fino balance entre asimilación, almacenamiento y uso del carbono para la formación de biomasa, no tenemos un amplio conocimiento acerca del funcionamiento de este proceso (Smith et al., 2007), máxime cuando las plantas son sometidas a tratamientos tan novedosos como los programas de biofortificación con yodo. Bajo una visión global, en el caso de la aplicación de las dosis 20 y 40 μM de I^- pudimos observar no sólo un incremento en la ruta de biosíntesis de sacarosa (Tablas 2 y 3), metabolito que posiblemente esté siendo removilizado, sino también un ligero incremento en los parámetros relacionados con la fotosíntesis (Figs. 1 y 2). Todos estos hechos no se tradujeron en un incremento de la biomasa (ver Bloque I, Tabla 1) posiblemente porque bien la planta está almacenando el carbono fotosintético en forma de almidón en el cloroplasto (Lee et al., 2008) o bien porque lo está desviando hacia el mantenimiento o mejora de otras funciones fisiológicas que requieren la intervención de azúcares solubles. Además, al aplicar estos tratamientos con I^- , paralelamente a la conductancia estomática se produce un incremento de la tasa de transpiración por lo que la WUE de las plantas se ve disminuida respecto a las plantas control (Fig. 4). En el caso de la dosis 80 μM de I^- , la vía de síntesis de la sacarosa no se vio afectada por la disminución de la fotosíntesis (Fig. 1) y la conductancia estomática (Fig. 2). En este caso, la no

variación de la síntesis de azúcares puede ser debido a que las plantas estén utilizando sus reservas de almidón para suplir la falta de fijación de carbono fotosintético a través de la fotosíntesis. Consecuentemente, el cierre estomático generado por la aplicación de $80 \mu\text{M}$ de I^- genera una disminución de la transpiración (Fig. 3) que se traduce en un aumento en la WUE (Fig. 4). Por otra parte, la aplicación de IO_3^- en nuestra experiencia no tuvo efecto sobre la vía de formación de sacarosa (Tablas 2 y 3) respecto a las plantas control. Sin embargo, en este caso si se observó un notable incremento tanto de los parámetros relacionados con la fotosíntesis (Figs. 1 y 2) como de la biomasa (ver Bloque I, Tabla 1) A pesar del incremento de estos parámetros, el uso IO_3^- supuso una disminución en la WUE por la elevada conductancia estomática de las plantas de lechuga.

Finalmente, este comportamiento diferencial del cultivo frente a la aplicación de ambas formas de este elemento traza, sugiere que en futuros programas de biofortificación sería recomendable la aplicación de IO_3^- siempre y cuando no existan condiciones hídricas limitantes en el medio de cultivo, ya que existe una optimización del proceso fotosintético y un incremento de la producción del cultivo.

II.4.4. Referencias

- Ait Ali N, Dewez D, Yves Robidoux P. 2006. Photosynthetic parameters as indicators of trinitrotoluene (TNT) inhibitory effect: change in chlorophyll a fluorescence induction upon exposure of *Lactuca sativa* to TNT. *Ecotoxicology* 15: 437-441.
- Blasco B, Ríos JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L. 2008. Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology* 152: 289-299.
- Blum A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crop Research* 112: 119-123.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Broadley MR, Escobar-Gutierrez AJ, Burns A, Burns IG. 2000. What are the effects of nitrogen deficiency on growth components of lettuce? *New Phytologist* 147: 519-526.
- Brost Pauwels GWFH. 1961. Iodine as a micronutrient for plants. *Plant and Soil* 4: 377-392.
- Champigny ML. 1985. Regulation of photosynthetic carbon assimilation at the cellular level: a review. *Photosynthesis Research* 6: 273-286.

- Cheikh N, Brenner ML. 1992. Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves. *Plant Physiology* 100: 1230–1237.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, Amrani AE. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 449-459.
- Cruz JA, Avenso TJ, Kanazawa A, Takizawa K, Edwards GE, Kramer DM. 2005. Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 56: 396-406.
- De Pinheiro-Henriques AR, Marcelis FM. 2000. Regulation of growth at steady-state nitrogen nutrition in lettuce (*Lactuca sativa* L.): Interactive effects of nitrogen and irradiance. *Annals of Botany* 86: 1073-1080.
- Foyer C, Rowell J, Walker D. 1983. The effect of sucrose on the rate of *de novo* sucrose biosynthesis in leaf protoplast from spinach wheat and barley. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 220: 232-238.
- Gastal F, Lemaire G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* 53: 789-799.
- Geladopoulos TP, Sotiroudis TG, Evangelopoulos AE. 1991. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Analytical Biochemistry* 192: 112-116.
- Harbron S, Foyer C, Walker D. 1981. The purification and properties of sucrose-phosphate synthetase from spinach leaves: the involvement of this enzyme and sucrose biphosphatase in the regulation of sucrose biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 212: 237-246.

- Hirabayashi J. 1996. On the origin of elementary hexoses. *Quarterly Review of Biology* 71: 365-380.
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58: 2369-2387.
- Holaday SA, Martindale W, Alred R, Brooks AL, Leegood RC. 1992. Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. *Plant Physiology* 98: 1105-1114.
- Hubbard NL, Huber SC, Pharr DM. 1989. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Physiology* 91: 1527-1534.
- Kooch KE. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540.
- Layne DR, Flore JA. 1995. End-product inhibition of photosynthesis in *Prunus cerasus* L. in response to whole-plant source-sink manipulation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 583-599.
- Lee SK, Jeon JS, Börnke F, Voll L, Cho JI, Goh CH, Jeong SW, Park YI, Kim SJ, Choi SB, Miyao A, Hirochika H, An G, Cho MH, Bhoo SH, Sonnewald U, Hahn TR. 2008. Loss of cytosolic fructose-1,6-biphosphatase limits photosynthetic sucrose synthesis and causes severe growth retardations in rice (*Oyiza sativa*). *Plant Cell and Environment* 31:1851-1863.

- Magaña RH, Adamowicz S, Pagès L. 2009. Changes in nitrogen and carbon resource status and use for growth in young plants of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Annals of Botany* 103: 1025-1037.
- McCormick JA, Cramer MD, Watt DA. 2008. Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. *J Plant Physiology* 165: 1817-1829.
- Melis A. 2009. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science* 177: 272-280.
- Mert HH. 1989. Photosynthesis and photorespiration in two cultivars of cotton under salt stress. *Biologia Plantarum* 31: 413-414.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Mynet A, Wain RL. 1973. Herbicidal action for iodine: effect on chlorophyll content and photosynthesis in dwarf bean *Phaseolus vulgaris*. *Weed Research* 13: 101-109.
- Nieva FJJ, Castellanos EM, Figueroa ME, Gil F. 1999. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of C₃ and C₄ salt marsh species. *Photosynthetica* 36: 397-406.
- Nouze K, Maloof J. 2006. Diurnal regulation of plant growth. *Plant Cell and Environment* 29: 396-408.
- Ogren LW. 2003. Affixing the O₂ to rubisco: discovering the source of photorespiratory glycolate and its regulation. *Photosynthesis Research* 76: 53-63.

- Paul M, Pellny T, Goodijn O. 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends in Plant Science* 6:197-200.
- Preiss J. 1982. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 431-454.
- Raghavendra AS, Padmasree K. 2003. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends in Plant Science* 8: 546-554.
- Rauphael Y, Cardarelli M, Rea E, Colla G. 2008. The influence of irrigation system and nutrient solution concentration on potted geranium production under various conditions of radiation and temperature *Scientia Horticulturae* 118: 328-337.
- Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signalling in plants. *Plant Cell (Supplement)*: S185-S205.
- Rook F, Hadingham SA, Li Y, Bevan MW. 2006. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell and Environment* 29: 426-434.
- 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.
- Salerno GL, Curatti L. 2003. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why? *Trends in Plant Science* 8: 63-69.
- Smith AM, Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell and Environment* 30: 1126-1149.

- Stitt M, Herzog B, Heldt HW. 1984. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. I. Coordination of CO₂ fixation and sucrose synthesis. *Plant Physiology* 75: 548-553.
- Van Handel E. 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry* 22: 280-283.
- Van Iersel MW. 2003. Carbon use efficiency depends on growth respiration, maintenance respiration, and relative growth rate. A case study with lettuce. *Plant Cell and Environment* 26: 1441-1449.
- Walter A, Spies H, Terjung S, Küsters R, Kirchessener, Schurr R. 2002. Spatio-temporal dynamics of expansion growth in roots: automatic quantification of diurnal course and temperature by digital image sequence processing *Journal of Experimental Botany* 53: 689-698.
- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometer of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313.
- William W, Adams III, Amy MW, Mueh KE, Amiard V, Turgeon R, Ebbert V, Logan BA, Combs AF, Demming-Adams B. 2007. Photosynthetic acclimation in the context of structural constraints to carbon export from leaves *Photosynthesis Research* 94: 455-466.
- Zhou YH, Zhang YY, Zhao X, Yu HJ, Shi K, Yu JQ. 2009. Impact of light variation on development of photoprotection, antioxidants and nutritional value in *Lactuca sativa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5494-5500.

Zrenner R, Krause PK, Aple P, Sonnewald U. 1996. Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *Plant Journal* 9: 671-681.

BLOQUE II CAPÍTULO 5

ESTADO NUTRICIONAL EN PLANTAS DE LECHUGA: (*LACTUCA SATIVA* L. VAR. LONGIFOLIA): EFECTO DE LA BIOFORTIFICACIÓN CON YODO

II.5.1. Introducción

Desde hace 150 años, los científicos han estudiado la nutrición vegetal con el fin de conocer los procesos de absorción, acumulación, transporte y funcionalidad de los distintos elementos químicos necesarios para el crecimiento de las plantas. De estos estudios se ha obtenido mucha información sobre el crecimiento y la composición de las plantas en respuesta a los distintos medios de cultivos, los programas de fertilización a emplear en las distintas zonas agrícolas, así como las distintas concentraciones de dichos elementos en las soluciones nutritivas para las diferentes plantas. Un nutriente mineral se define como un elemento químico necesario para el crecimiento y reproducción de las distintas especies vegetales. El término elemento esencial es comúnmente usado para la identificación de los nutrientes vegetales. Por consiguiente, para que un elemento sea un nutriente debe cumplir ciertos criterios. El principal criterio, es que el elemento sea requerido por la planta para poder completar su ciclo de vida. En segundo lugar, que dicho elemento no pueda ser sustituido por otro y en tercer lugar, que todas las plantas lo requieran para su desarrollo (Epstein y Bloom, 2005).

El primero de los criterios enunciados, fue el que estableció la esencialidad de los distintos nutrientes, e incluye la propiedad de que el elemento tiene un efecto directo sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. El segundo de los criterios establece que el papel de los elementos es único en la fisiología o metabolismo de las plantas, de manera que ningún otro elemento es capaz de sustituirlo en todas sus funciones. Por ejemplo, el manganeso (Mn) puede sustituir al magnesio (Mg), en algunas de sus funciones pero no en todas. El tercero se refiere a que la esencialidad es universal entre todas plantas (Arnon y Stout, 1939; Marschner, 1995).

De los 92 elementos que han sido identificados en la tierra, actualmente se consideran 17 los elementos esenciales para las plantas. El carbono (C), el oxígeno (O₂) y el hidrógeno (H₂) son tomados principalmente del agua y el aire. Los 14 restantes como son el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), Mg, azufre (S), hierro (Fe), Mn, cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo), cloro (Cl) y níquel (Ni), son obtenidos del suelo o la solución nutritiva. Dichos nutrientes son clasificados según los requerimientos de las plantas, es decir, los elementos que son requeridos en cantidades considerables son los macronutrientes, los cuales son acumulados en cantidades iguales o superiores a 0,1% del peso seco de la planta. Los elementos requeridos en pequeñas cantidades por las plantas son los micronutrientes, y generalmente son acumulados en cantidades inferiores al 0,01 % del peso seco de la planta. El crecimiento y desarrollo de las plantas depende de la disponibilidad y adquisición de estos nutrientes por lo que las plantas han creado una serie de

mecanismos para asegurar su presencia. Además de los nutrientes esenciales encontramos los llamados elementos beneficiosos los cuales ayudan o promueven el crecimiento en algunas plantas. Entre los elementos beneficiosos incluir hasta el momento el sodio (Na), cobalto (Co), aluminio (Al), selenio (Se) y silice (Si) (Salt et al., 2008).

El conocimiento de los mecanismos que gobiernan la absorción, distribución, acumulación y funciones fisiológicas de estos nutrientes esenciales en las plantas, así como su regulación por factores genéticos y medioambientales es lo que se denomina en la actualidad como “ionome”, y su estudio resulta esencial para lograr un crecimiento óptimo de las plantas. Por ejemplo, tanto los excesos como deficiencias de macro- y micronutrientes tienen un efecto muy serio sobre el metabolismo de las plantas, afectándose el tipo y cantidad de metabolitos. En plantas con valor agrícola este hecho suele ser importante desde un punto de vista económico y nutricional ya que afecta tanto a la producción como a la calidad de los productos agrícolas, por lo que es necesario evitar estos desequilibrios nutricionales y conocer las distintas interacciones entre los elementos iónicos esenciales con el fin de mantener una producción adecuada en las plantas (Williams y Salt, 2009). Por lo tanto, es imprescindible estudiar las relaciones existentes entre el yodo y los distintos nutrientes esenciales con el fin de realizar con éxito programas de biofortificación con este elemento traza sobre los diferentes cultivos. Sin embargo, y a pesar de esta importancia, los trabajos al respecto son muy escasos. En este capítulo observamos que la aplicación de elevadas dosis de I⁻

produce un mayor desequilibrio nutricional que la aplicación de IO_3^- en plantas de lechuga

II.5.2. Material y métodos

Tanto las condiciones de cultivo, los tratamientos, diseño experimental, muestreo del material vegetal y análisis estadístico son iguales a los descritos en el Bloque I.

II.5.2.1. Muestreo del material vegetal

La parte aérea de plantas de lechuga fue muestreada a las 66 días después de la germinación de las plantas. Una parte de este material vegetal tras cuantificar el peso fresco (PF) fue secado mediante liofilización para calcular el peso seco (PS) y para la determinación contenido en macronutrientes totales (Ca, Mg, P, K, N y S) y micronutrientes totales (Fe, Mn, Cu, Zn, B y Cl).

II.5.2.2. Análisis del material vegetal

II.5.2.2.1. Determinación de los nutrientes minerales

Para la extracción de N, P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, B y Cu se procedió a una mineralización por “vía húmeda” de las muestras vegetales, siguiendo el procedimiento propuesto por Wolf (1982). Para ello se pesó entre 0,15 g de

hojas de lechuga liofilizadas, los cuales fueron sometidos al proceso de mineralización con H_2SO_4 12 N y H_2O_2 al 30% libre de P, y a una temperatura que varió entre los 275 y los 300°C. A partir del mineralizado resultante, y tras la adición de 20 ml de H_2O desionizada, se llevó a cabo la determinación de los nutrientes minerales anteriormente citados.

Para la determinación del S total, 25 mg de muestra liofilizada fueron mineralizado con 2,5 ml de ácido nítrico al 69% y 2,5 ml de ácido perclórico al 60% y 1 ml de H_2O_2 libre de P en un baño de arena. A partir del mineralizado resultante, y tras la adición de 20 ml de H_2O desionizada, se llevó a cabo la determinación del S.

II.5.2.2.1.1. Determinación de N

Para la cuantificación de la concentración de N total se siguió el método de Cataldo et al. (1975). Se tomó 0,1 ml de alícuota del mineralizado y se le añadió 1 ml de Reactivo 1 que consistió en salicilato al 8,5 % y nitroprusiato sódico al 0,06 %. A continuación se le adicionó 1 ml de Reactivo 2 consistente en hidroxido sódico al 4% y dicloroisocianurato sódico al 0,62 %. Transcurridos 45 min. se procedió a la lectura de la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 630 nm frente a una curva patrón de NH_4^+ .

II.5.2.2.1.2. Determinación de P

En la determinación del P total se usó el método colorimétrico del nitrovanadomolibdico (Hogue et al., 1970). A 0,1 ml del mineralizado se le añadieron 3,9 ml de H₂O desionizada y 6 ml del reactivo de fósforo (agua desionizada, molibdato-amónico, vanadato-amónico y ácido nítrico). Las muestras se agitaron y se esperó 60 min. Pasado ese tiempo se procedió a su lectura a una longitud de onda de 430 nm, frente a una curva patrón de K₂HPO₄ que estaba en iguales condiciones que las muestras problema.

II.5.2.2.1.3. Determinación de S

Del mineralizado se tomaron alícuotas de 1 ml a las que se le adicionaron 4 ml de cloruro bórico al 8% junto a 1 ml de goma de acacia al 25%. Los tubos fueron agitados, y se procedió a la lectura de la tramitancia a 420 nm frente a una curva patrón de sulfatos en el espectrofotómetro (Novozamsky y Vaneck, 1977).

II.5.2.2.1.4. Determinación de K, Ca y Mg

La concentración de K se analizó mediante fometría de llama (Lachica et al., 1973), mientras que el Mg y Ca fueron cuantificados por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977). Para ello, en un tubo de ensayo se puso 0,1 ml del mineralizado y se le añadió 10 ml de H₂O desionizada que

contenía óxido de lantano. El K se cuantificó directamente en la disolución anterior por fotometría de llama (Lachica et al., 1973). El Mg y Ca total fueron cuantificados directamente en la dilución anterior por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977), en espectrofotómetro Perkin-Elmer mod. 5100, equipado con: sistema de inyección Perkin-Elmer Fias-100, automuestreador Perkin-Elmer AS-90, y con lámparas de cátodo hueco de los distintos elementos, y con llama aire-acetileno. Los valores obtenidos se interpolaron frente a sus curvas patrón correspondientes analizadas bajo las mismas condiciones.

II.5.2.2.1.5. Determinación de Cu, Fe, Mn, Zn

Los micronutrientes Cu, Fe, Mn y Zn en su forma total, fueron determinados por espectrofotometría de absorción atómica directamente del mineralizado (Hocking y Pate, 1977).

II.5.2.2.1.6. Determinación de B

El B total se determinó por el método colorimétrico de azometina-H (Wolf, 1982). Para ello, se tomó 1 ml del mineralizado, al que se le añadieron 2 ml de solución enmascarante. La mezcla se agitó y a continuación se añadió azometina-H 0.9 %, preparada en el momento de la determinación y que contenía un 2 % de ácido ascórbico. Tras una agitación se dejó reposar 2 horas a 20 °C para el desarrollo de color. Pasado este tiempo, se determinó la

concentración de B total a una absorbancia de 410 nm frente a curva patrón de B.

II.5.2.2.1.7. Determinación de Cl

Finalmente, la determinación de Cl se llevó a cabo a partir de una extracción acuosa, según el método propuesto por Cataldo et al. (1975) con ligeras modificaciones. 0,1 g de hoja de lechuga liofilizada y junto a 10 ml de H₂O desionizada se sometieron a agitación vuelta-vuelta durante 120 min., y seguidamente la mezcla se filtro con papel Whatman nº 4. La cuantificación de Cl se realizó siguiendo el método de Diatloff y Rengel (2001), basado en el desplazamiento del biocianato por el ión cloruro, que en presencia de Fe³⁺ forma el complejo coloreado tiocianato férrico. Para ello se realizó una mezcla de reacción que contenía 0,25 ml procedente de la extracción acuosa, 2 ml de 50 mM de Fe(NO₃)₃·9H₂O y finalmente 0,25 ml de una solución saturada de tiocianato de mercurio II [Hg(SCN)₂] al 75%. Las muestras se agitaron vigorosamente y después de 15 min se procedió a su lectura a una longitud de onda de 460 nm frente a una curva patrón de KCl (0,1 - 10 mM).

II.5.3. Resultados y discusión

La comparación de los resultados del análisis foliar con la norma o referencia se viene realizando de distintas maneras. Algunas implican una mera comparación entre concentraciones de un solo elemento, pero otras utilizan

relaciones entre dos elementos o, incluso, son multicomponentes. Al primer tipo pertenecen los métodos tradicionales del nivel crítico y de intervalo de suficiencia, y al segundo el método del Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación (DRIS).

El método del nivel crítico se basa en la comparación de la concentración de un nutriente, obtenida mediante análisis foliar, con un valor de referencia que se denomina nivel crítico, y que normalmente supone el 90% del máximo de cosecha en peso seco. El problema es que los valores de referencia no son universales y, en consecuencia, no pueden aplicarse directamente a los mismos cultivos de distintas zonas geográficas. Por lo tanto parece más lógico y realista utilizar un intervalo de valores de referencia, en lugar de un valor aislado. El método del intervalo de suficiencia o rango óptimo es el más extendido y tiene la misma base que el nivel crítico, pero aquí el dato analítico se compara con un intervalo de concentraciones del nutriente en el que no se aprecia una reducción en la producción o la cosecha. Finalmente, el DRIS se basa en la recogida del mayor número posible de datos respecto a los contenidos de nutrientes minerales en planta, y el uso de esos datos para calcular relaciones óptimas entre nutrientes (índices nutritivos o relaciones normalizadas, ej. N/P, N/K...) e intervalos de suficiencia. Estos índices o rangos de nutrientes calculados por el método DRIS son menos sensibles a los cambios que se producen durante la maduración de la hoja y la ontogénesis, pero dependen en cierto grado de la localización ya que se tiene en cuenta los factores edafoclimáticos (Mills y Benton Jones, 1996).

En las siguientes tablas se representan los intervalos de suficiencia realizados para *Lactuca sativa* L. cv. longifolia por distintos autores, los cuales vamos a utilizar como valores de referencia para determinar los posibles efectos de la aplicación yodo sobre el estado nutricional de plantas de lechuga en nuestro experimento.

Tabla 1. Intervalos de suficiencia de macronutrientes realizados en hojas maduras de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L. cv. longifolia)

	N	P	S	K	Ca	Mg
	Rango Óptimo (mg g ⁻¹ p.s.)					
Hartz et al. (2007)	33–48	3.5–7.5	2.0-3.5	29-78	6-11	2.0-4.5
Hochmuth et al. (1991)	35–45	3.5–6.0	2.5-3.5	50-60	20-30	2.5-4.0
Mills y Benton Jones (1996)	35–45	4.5–8.0	≥ 3.0	55-65	20-28	2.5-7.5

Tabla 2. Intervalos de suficiencia de micronutrientes realizados en hojas maduras de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L. cv. longifolia)

	Fe	Cu	Mn	Zn	B	Cl
	Rango Óptimo (µg g ⁻¹ p.s.)					
Hartz et al. (2007)	115-257	5-8.6	45-75	25-73	24-36	Nd
Hochmuth et al. (1991)	50-150	5-10	15-25	20-50	30-45	Nd
Mills y Benton Jones (1996)	50-250	5-20	15-150	20-100	25-60	Nd

En la planta, el N se distribuye en tres grupos: más del 50% se halla en compuestos de elevado peso molecular (proteínas y ácidos nucleicos); el resto, en forma de N orgánico soluble (aminoácidos, amidas, aminos...) y N inorgánico (principalmente iones nitrato y amonio). Además, el N es esencial en la bioquímica de muchos compuestos no-proteicos tales como coenzimas, pigmentos fotosintéticos, metabolitos secundarios y poliaminas. Su contenido

en el total del peso seco de la planta oscila entre el 1.5 y el 5% (Marschner, 1995; Espstein y Bloom, 2005; Salt et al., 2008; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Maathuis, 2009).

En nuestro trabajo la concentración de este macronutriente en hojas fue alterada tanto por las dosis como por la forma de yodo aplicada a la solución nutritiva (Tabla 3). La aplicación de I^- produjo una disminución de la concentración foliar de N especialmente significativa en el tratamiento 80 μM , presentándose en este la mínima concentración (Tabla 3). Por el contrario, y aunque no hubo diferencias significativas respecto a las plantas control, la aplicación de IO_3^- mejoro el estado nutricional de N presentando todas las dosis valores superiores de N a los de las plantas control (Tabla 3). Comparando los datos obtenidos en nuestra investigación con los de referencia reflejados en los rangos óptimos de la tabla 1, comprobamos que excepto la dosis 80 μM I^- el resto de los tratamientos dan lugar a concentraciones de N adecuados para el crecimiento normal de la lechuga (Tabla 3). El estado nutricional de N para cultivos como el tabaco, la espinaca y la lechuga es determinante no solo en la calidad del producto vegetal sino también en la producción (Santamaría et al., 1999; Lea y Azevedo, 2006), por lo que el hecho de que el tratamiento 80 μM de I^- produzca concentraciones de N inferiores a las del rango de óptimo de este nutriente podría explicar la disminución de biomasa de la parte aérea que se observa en las plantas tratadas con esta dosis de I^- (ver Bloque I, Tabla 1). Aunque más estudios hacen falta al respecto, la mayor absorción y acumulación foliar de yodo que se produce en el tratamiento 80 μM de I^- (ver

Bloque I, Fig. 1) resulta fitotóxica y podría alterar los transportadores específicos de NO_3^- en las raíces o interferir en su absorción mediante un antagonismo entre ambos aniones (NO_3^- - I^-), lo que explicaría la mínima concentración foliar que presenta en N en este tratamiento.

En contraste con el N, el P no se encuentra en forma reducida en las plantas, sino que permanece como fosfato, ya sea en forma libre o como un compuesto orgánico, principalmente como éster fosfórico con grupos hidroxilos, o formando enlaces anhídricos ricos en energía, como es el caso del ATP o del ADP. Desempeña, por tanto, un papel clave en la fotosíntesis, en la respiración, y en todo el metabolismo energético. Asimismo, el P tiene un papel estructural importante en muchas moléculas y estructuras celulares, como los enlaces diéster presentes en los ácidos nucleicos y en los fosfolípidos, los cuales son fundamentales en las estructuras membranosas. Finalmente, el papel esencial del P en muchos aspectos del metabolismo celular se refleja por la gran cantidad de P que se acumula en las semillas que se utilizará posteriormente para el desarrollo embrionario, germinación y crecimiento de la plántula (Marschner, 1995; Espstein y Bloom, 2005; Salt et al., 2008; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Maathuis, 2009).

Al igual que el N, la concentración foliar de P vario dependiendo de la dosis y forma aplicada de yodo (Tabla 3). La aplicación de I^- dio lugar a una disminución de las concentraciones de P respecto a la de las plantas control, presentándose la mínima en la dosis 80 μM (Tabla 3). Por el contrario, ninguna

dosis de IO_3^- alteró la concentración foliar de P respecto a la de las plantas control (Tabla 3). En general, la aplicación de IO_3^- mantuvo un estado nutricional de P adecuado para el crecimiento de las plantas, mientras que elevadas dosis de I^- en la solución nutritiva dan lugar a concentraciones de P situadas en el límite inferior del rango óptimo para este nutriente (ver Tabla 1). Por lo tanto, y dado el papel esencial del P en el crecimiento y desarrollo de la planta es posible que la reducción de biomasa observada en el tratamiento 80 μM de I^- (ver Bloque I, Tabla 1) pueda asociarse también a concentraciones bajas de nutriente en estas plantas. Como en el caso de N, aunque más investigación es necesaria, es posible que la aplicación de elevadas dosis de I^- puedan alterar bien los transportadores específicos para la absorción de P o bien se produzcan una interacción antagónica entre ambos aniones.

Otro macronutriente aniónico esencial para las plantas es el S. La mayor parte del S en la planta se encuentra en su forma reducida en los aminoácidos cisteína y metionina. Igualmente, se integra en diversas coenzimas como la tiamina, la biotina y la coenzima A, compuesto este clave en la activación de los ácidos orgánicos y, por tanto, en los procesos de síntesis y degradación de los ácidos grasos y en la respiración celular. Los grupos SH^- , principalmente de la cisteína, son clave en multitud de reacciones enzimáticas, determinando, según su forma (oxidada o reducida), la actividad de éstas. Por otro lado, la producción del tripeptido glutatión a partir de la cisteína tiene una gran importancia en las respuestas de las plantas a condiciones de estrés ya que además actuar en la regeneración del ascorbato también detoxifica

directamente especies reactivas de oxígeno (Marschner, 1995; Espstein y Bloom, 2005; Salt et al., 2008; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Maathuis, 2009).

En nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas en la concentración de S entre las plantas control y los distintos tratamientos de yodo aplicados a la solución nutritiva (Tabla 3). Indicar, que todos los valores de concentración foliar de S están dentro del rango óptimo de este nutriente para las plantas de lechuga (Tabla 1).

Tabla 3. Influencia de las diferentes dosis y formas de yodo sobre la concentración foliar de N, P y S

Tratamientos Dosis (μM)	N		P		S	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	36.6	36.6	5.34	5.34	2.87	2.87
20	33.3	38.6	4.29	5.58	2.94	2.80
40	31.3	39.7	3.99	5.46	2.92	2.79
80	29.8	40.6	3.25	5.25	2.87	2.70
P-valor	*	NS	**	NS	NS	NS
LSD	4.08	3.64	0.72	0.56	0.20	0.23
Análisis de Varianza						
Formas (F)	***		***		NS	
Dosis (D)	NS		**		NS	
F x D	*		**		NS	
LSD	2.51		0.43		0.16	

Concentración de N, P y S expresada en mg g^{-1} PS

Los niveles de significancia son representados de la siguiente forma: NS: (no significativo), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

En la corteza terrestre el contenido en K es alrededor del 2.6%, variando su concentración entre 0.1 y 1 mM. Por esta razón, es bastante inusual que las plantas presenten deficiencia de K aunque su suministro produce un aumento del crecimiento, por lo que normalmente su aplicación en fertilizantes resulta

una práctica común. De hecho, junto con el P y el N, constituye el contenido principal de los fertilizantes de máxima difusión comercial, dada la importancia de estos tres elementos minerales. Su comportamiento, a pesar de su naturaleza catiónica, es muy similar a la que presenta el P y el N: el K se distribuye con suma facilidad de los órganos maduros a los juveniles, dada su solubilidad y su baja afinidad por los ligandos orgánicos, con los que se intercambia fácilmente. El K es el catión más abundante en las plantas, pues puede representar hasta un 10% de su peso seco. Entre las funciones biológicas del K en las plantas destacar: (i) activación de más de 50 sistemas enzimáticos (oxidoreductasas, deshidrogenasas, transferasas, sintetisas y quinasas) destacando los que intervienen en el metabolismo del carbono y del nitrógeno, (ii) mediación en la formación de proteínas, e (iii) interviene de forma clave en los procesos de apertura y cierre estomáticos (Marschner, 1995; Espstein y Bloom, 2005; Salt et al., 2008; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Maathuis, 2009).

El comportamiento del K en nuestro trabajo tras la aplicación de las diferentes dosis y formas de yodo fue similar al descrito para el N y el P (Tabla 3). Excepto los tratamientos de 40 y 80 μM de I^- (Tabla 4), el resto de tratamientos tanto de I^- como de IO_3^- presentaron niveles adecuados dentro del rango óptimo de K (Tabla 1) y sin diferencias significativas respecto a la concentración de plantas control (Tabla 4). Según Hochmuth et al. (1991) los valores de K de los tratamientos 40 y especialmente 80 μM de I^- estarían por debajo de los niveles óptimos de este nutriente para las plantas de lechuga, lo que podría explicar las reducciones que se observan en las plantas tratadas

con 80 μM de I^- de procesos fisiológicos tan importantes como la asimilación del NO_3^- (ver Bloque II, Capítulo 3) y la fotosíntesis (ver Bloque II, Capítulo 4). Posiblemente el exceso de yodo en este tratamiento (80 μM de I^- , ver Bloque I Fig. 1) pueda provocar alteraciones en los transportadores radiculares específicos para el K lo que explicaría la reducción de su concentración foliar en plantas de lechuga.

Tabla 4. Influencia de las diferentes dosis y formas de yodo sobre la concentración foliar de K, Ca y Mg

Tratamientos Dosis (μM)	K		Ca		Mg	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	51.7	51.7	23.4	23.4	2.51	2.51
20	49.2	50.6	24.4	21.7	2.72	2.76
40	42.1	54.3	26.0	22.8	2.65	3.39
80	36.3	46.8	22.8	24.8	2.43	4.66
P-valor	**	NS	NS	NS	NS	**
LSD	8.14	6.12	2.93	1.89	0.37	0.30
Análisis de Varianza						
Formas (F)	**		NS		**	
Dosis (D)	*		NS		*	
F x D	NS		NS		*	
LSD	5.73		2.45		0.29	

Concentración de K, Ca y Mg expresada en mg g^{-1} PS

Los niveles de significancia son representados de la siguiente forma: NS: (no significativo), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

Finalmente, y en relación a los macronutrientes divalentes, el Ca es necesario para la integridad y la funcionalidad de la pared celular y membranas y, además, recientemente se ha visto que está implicado como segundo mensajero en el funcionamiento de algunas hormonas y en respuestas ambientales. Su unión reversible a una pequeña proteína citosólica, la calmodulina, le permite ejercer una importante función como modulador

enzimático y desempeñar un papel fundamental en las señales celulares y en el desarrollo vegetal (Marschner, 1995; Espstein y Bloom, 2005; Salt et al., 2008; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Maathuis, 2009). Por otro lado el Mg, no es casi nunca un factor limitante para las planta salvo en los suelos muy ácidos o arenosos. Aproximadamente el 20% del Mg total de las hojas se encuentra en los cloroplastos, aunque sólo entre el 10 y el 20% se presenta en las moléculas de clorofila formando parte del anillo de protoporfirina. El resto se encuentra localizado en forma iónica soluble en el espacio intratilacoidal y, al iluminarse el cloroplasto, pasa al estroma, donde activa enzimas importantes como la rubisco, la fosfoenol-piruvato carboxilasa y la glutamato sintasa. También interviene en el metabolismo energético de la planta, al formar complejos con el ATP, ya que las ATPasa utilizan como sustrato los complejos Mg-ATP. Incluso la propia fotofosforilación del ATP a partir del ADP necesita Mg. La propiedad que tiene el Mg de establecer uniones tanto iónicas como especialmente, covalentes, hace que el Mg esté presente en procesos claves como la unión y estabilización de las subunidades del ribosoma, y por tanto en la biosíntesis de proteínas, en incluso en la transcripción del mensaje genético por la activación de la RNA polimerasa (Marschner, 1995; Espstein y Bloom, 2005; Salt et al., 2008; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Maathuis, 2009).

En nuestro trabajo la aplicación de yodo solo afecto a la concentración foliar de Mg, cuando este elemento traza fue aplicado como IO_3^- (Tabla 4). En general indicar que los valores obtenidos tanto de Ca como de Mg, independientemente de la dosis y forma aplicada de yodo, entran dentro del rango óptimo de estos

nutrientes para la lechuga (Tablas 1 y 4). Como indicábamos al inicio solamente la aplicación de IO_3^- dio lugar a un aumento en la concentración foliar de Mg, presentándose la máxima concentración en la dosis 80 μM (Tabla 4). Puesto que el Mg es esencial para procesos clave para la planta como la fotosíntesis, síntesis de proteínas y metabolismo energético, el incremento en su concentración por la aplicación de IO_3^- podría favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas de lechuga lo que se refleja en la producción de biomasa de estas plantas (ver Bloque I, Tabla 1).

Los micronutrientes intervienen un gran número de funciones en las plantas, entre las que cabe destacar: biosíntesis de clorofila y de hormonas (etileno, ácido giberélico y ácido jasmónico), transporte de electrones en la fotosíntesis, reacciones de oxido-reducción, producción y detoxificación de especies reactivas de oxígeno, cofactores enzimáticos, osmoprotección, papel estructural en la pared celular, y respuestas de defensa ante patógenos (Marschner, 1995; Epstein y Bloom, 2005; Salt et al., 2008; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Hänsch y Mendel, 2009).

Nuestros datos mostraron que la aplicación de yodo no afectó al estado nutricional de los micronutrientes Cu, Mn, Zn, B y Cl puesto que no existieron diferencias significativas entre la concentración de estos entre plantas control y los diferentes tratamientos con yodo (Tablas 5 y 6). Destacar que todas las concentraciones de estos micronutrientes son adecuadas para el crecimiento óptimo del cultivo de la lechuga. El único micronutriente que fue afectado por

los tratamientos con yodo fue el Fe. Como podemos comprobar en la tabla 5 el aumento en la aplicación de I^- y de IO_3^- dio lugar a un incremento en la concentración foliar de Fe, presentándose la máximas concentraciones en la dosis 80 (Tabla 5). Estos datos nos sugieren que la fertilización con elevadas dosis de yodo mejora el estado nutricional de Fe, especialmente cuando el yodo se aplica como IO_3^- . Posiblemente entre estos dos elementos iónicos exista un sinergismo que favorezca la absorción y acumulación de ambos en la parte aérea.

Tabla 5. Influencia de las diferentes dosis y formas de yodo sobre la concentración foliar de Fe, Cu y Mn.

Tratamientos Dosis (μ M)	Fe		Cu		Mn	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	135	135	7	7	60	60
20	118	140	8	7	56	65
40	120	146	7	7	62	68
80	165	220	7	7	60	64
P-valor	*	**	NS	NS	NS	NS
LSD	22	31	1	1	8	11

Análisis de Varianza			
Formas (F)	**	NS	NS
Dosis (D)	*	NS	NS
F x D	NS	NS	NS
LSD	37	1	10

Concentración de Fe, Cu y Mn expresada en μ g g^{-1} PS

Los niveles de significancia son representados de la siguiente forma: NS: (no significativo), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

Tabla 6. Influencia de las diferentes dosis y formas de yodo sobre la concentración foliar de Zn, B y Cl.

Tratamientos Dosis (μM)	Zn		B		Cl	
	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-	I^-	IO_3^-
0	26	26	33	33	0.59	0.59
20	23	27	33	35	0.60	0.59
40	24	24	31	32	0.55	0.62
80	26	24	36	32	0.60	0.63
P-valor	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LSD	4	3	5	6	0.09	0.11
Análisis de Varianza						
Formas (F)	NS		NS		NS	
Dosis (D)	NS		NS		NS	
F x D	NS		NS		NS	
LSD	4		5		0.08	

Concentración de Zn y B expresada en $\mu\text{g g}^{-1}$ PS; Concentración de Cl expresada en mg g^{-1} PS.

Los niveles de significancia son representados de la siguiente forma: NS: (no significativo), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

En conclusión, y desde un punto de vista nutricional, podemos indicar que la realización de un programa de biofortificación con I^- en plantas de lechuga sería más perjudicial que la fertilización con IO_3^- , especialmente si se aplican al medio de cultivo elevadas dosis de yodo. Concretamente, la aplicación de 80 μM de I^- produce una reducción significativa de los nutrientes N, P y K por debajo de los rangos óptimos establecidos para este cultivo por lo que debido a esta disminución de estos macronutrientes se podría explicar en parte la fitotoxicidad que causa este tratamiento en plantas de lechuga. Por el contrario, la aplicación de IO_3^- supone un mantenimiento óptimo del estado nutricional para la mayoría de los elementos e incluso una mejora de nutrientes tan importantes como el Mg y el Fe.

II.5.4. Referencias

- Arnon DI, Shout PR. 1939. The essentiality of certain elements minute quantity plant with species reference to cooper. *Plant Physiology* 14: 371-375.
- Azcó-Bieto J, Talón M. 2008. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader VL. 1975. Young, rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications of Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80.
- Diatloff E, Rengel Z. 2001. Compilation of simple spectrophotometric techniques for determination of element in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition* 24: 75-86.
- Epstein E, Bloom AJ. 2005. *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*. Sinauer Associates, Inc.
- Hartz TK, Johnstone PR, Williams E, Smith RF. Establishing lettuce leaf nutrient optimum ranges through DRIS analysis. *HortScience* 42: 143-146.
- Hänsch R, Mendel RR. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12: 259-266.
- Hocking PJ, Pate JS. 1977. Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. *Annals of Botany* 41: 1259-1278.
- Hogue E, Wilcow GE, Cantifle DJ. 1970. Effect of soil P on phosphate fraction in tomato leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 95: 174-176.

- Lachica M, Aguilar A, Yañez J. 1973. Análisis Foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín. *Annals of Edaphology and Agrobiology* 32: 1033-1047.
- Lea PJ, Azevedo RA. 2006. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology* 149: 243-247.
- Maathuis FJM. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 250-258.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plant 2nd edition. London. Academic Press.
- Mills HA, Benton Jones JJr. 1996. Plant and analysis handbook II. MicroMacro Publishing, Inc. USA
- Novozamsky I, Vaneck R. 1977. Total sulfur determination in plant material. *Fresenius Zeit Schirftt.* 286: 367-368.
- Salt DE, Baxter I, Lahner B. 2008. Ionomics and the study of the plant ionome. *Annual Review of Plant Biology* 59: 709-733.
- Santamaría, P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 10-17.
- Williams L, Salt DE. 2009. The plant ionome coming into focus. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 247-249.
- Wolf B. 1982. A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrient status. *Communications of Soil Science and Plant Analysis* 13: 1035-1059.

Conclusiones

1. Desde el punto de vista de la calidad nutricional las dosis más apropiadas a aplicar en un cultivo hidropónico son 40 μM de I^- o 80 μM de IO_3^- ya que, además de no causar reducción de la biomasa respecto a las plantas control provocan un incremento de los compuestos antioxidantes de mayor relevancia para los vegetales. Asimismo, estas dosis dan lugar a una acumulación foliar de yodo suficiente como para cubrir las necesidades fisiológicas de este elemento en humanos, garantizándose así la viabilidad del uso del cultivo de lechuga en un programa de biofortificación.
2. La respuesta frente al estrés oxidativo es variable y depende de la forma de aplicación del yodo. En el caso de su aplicación bajo la forma de I^- se produjo una disminución de la actividad SOD estaría provocando una acumulación de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Ante esta situación, la planta incrementó las actividad CAT y las actividades biosintéticas y de regeneración L-GalDH y MDHAR que darían como resultado un importante pool de AA que estaría detoxificando directamente dicho radical. Sin embargo, este mecanismo parece no ser muy eficaz a elevadas dosis puesto que existe peroxidación de lípidos y reducción de biomasa, en los tratamientos de 80 μM de I^- . Por otra parte, la aplicación de IO_3^- provoca un incremento de enzimas detoxificadoras de los ROS y del ciclo de Halliwell- Asada indicando una mejora del sistema antioxidante de las plantas. Aunque sería necesario el desarrollo de experiencias complementarias, estos datos indican que la aplicación de yodo en forma de IO_3^- podría ser una

- estrategia eficaz para mejorar la respuesta de las plantas ante diferentes tipos de estrés.
3. La aplicación de I^- a produce una inhibición de la absorción de NO_3^- sin que se vea afectada la producción de biomasa. Este hecho puede suponer un incremento de la calidad nutricional de las plantas de lechuga, ya que de esta forma se reduciría la ingesta de NO_3^- a través del consumo de este vegetal. Asimismo, la aplicación de IO_3^- dio como resultado una mayor producción de la parte comestible y un incremento y optimización del proceso foterrespiratorio. Finalmente, esta situación puede resultar interesante desde el punto de vista agronómico, ya que se podría reducir el aporte de fertilizantes nitrogenados y en consecuencia se abaratarían costes económicos derivados de la aplicación en exceso de este tipo de fertilizantes.
 4. La aplicación de IO_3^- en dosis iguales o inferiores a $40 \mu M$ puede ser una forma de obtener una mayor producción y calidad vegetal con un menor aporte de fertilizantes nitrogenados, ya que se ven incrementados todos los aspectos relativos a la eficiencia en el uso del nitrógeno. Además, la posible reducción en la fertilización N por la aplicación de IO_3^- se verá reflejada tanto en la disminución del impacto ambiental como en una reducción en los costes económicos derivados de la aplicación de este tipo de fertilizantes.

5. Siempre y cuando no existan condiciones hídricas limitantes en el medio de cultivo, para futuros programas de biofortificación sería recomendable la aplicación de IO_3^- , ya que existe una optimización del proceso fotosintético y un incremento de la producción del cultivo.

6. La aplicación de elevadas dosis de I^- produce una reducción significativa de los nutrientes N, P y K por debajo de los rangos óptimos establecidos para este cultivo, hecho que podría ser una de las causas de la fitotoxicidad de este tratamiento en plantas de lechuga. Por el contrario, la aplicación de IO_3^- supone un mantenimiento óptimo del estado nutricional para la mayoría de los nutrientes e incluso una mejora de elementos tan importantes como el Mg y el Fe.

