

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA EVOLUCION EN EL TIEMPO
DE ALGUNOS PARAMETROS BIOQUIMICOS
EN PLANTAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L),
CULTIVADAS CON DISTINTOS NIVELES
DE BORO

MARIA VICTORIA GOMEZ RODRIGUEZ



TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA 1984





UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO
DE FISILOGIA VEGETAL

T 10/74

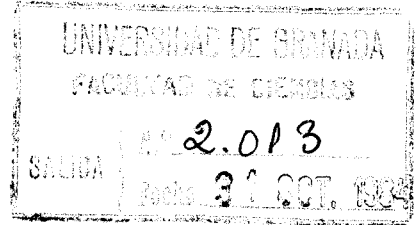
La Tesis Doctoral "Estudio de la evolución en el tiempo de algunos parámetros bioquímicos en plantas de girasol (*Helianthus annuus*, L.) cultivadas con distintos niveles de Boro", dirigida por Dña. Carmen Alvarez-Tinaut, fué defendida por M^a Victoria Gómez Rodríguez el día 29 de Septiembre de 1984, ante el tribunal compuesto por D. Fermín Sánchez de Medina Contreras, D. Juan Segura García del Río, Dña. Carmen Alvarez-Tinaut, D. Angel Matilla Carro y D. Juan Pedro Donaire Navarro, obteniendo la calificación de Sobresaliente "Cum laude".



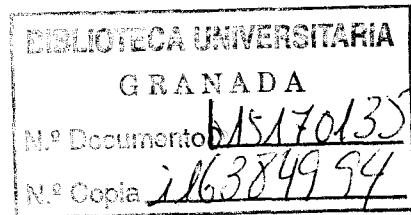
CANADA

(No. 20.1467)

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIO DE LA EVOLUCION EN EL TIEMPO DE ALGUNOS PARAMETROS BIOQUIMICOS
EN PLANTAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus*, L.) CULTIVADAS CON DISTINTOS
NIVELES DE BORO.



Memoria presentada por la Licencia-
da en Ciencias Biológicas M^a Victoria Gó-
mez Rodriguez para aspirar al grado de -
Doctor.

Fdo.: M^a Victoria Gómez Rodríguez.

La Directora de la Tesis

Fdo.: M^a del Carmen Alvarez Tinaut
Catedrática de Fisiología Vegetal

A Vicente, Carmen, Carmen,
Paco y Esther M^a; mi familia.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la Caja General de Ahorros y Monte de Piedad de Granada (de la que además fui becaria durante dos años), tras haber sido premiado el Proyecto: "Estudio fisiológico y bioquímico del girasol en condiciones de falta y exceso de boro, nutriente especialmente importante para la cosecha", en la VI Convocatoria de Premios de Investigación y Aplicaciones Técnicas; modalidad de Investigación Biológica.

Mi más sincero agradecimiento para
M^a del Carmen Alvarez-Tinaut, Directora de la
presente Memoria; Juan de Dios Luna del Castillo,
por su paciente labor de dirección en el tratamiento
estadístico de los datos; Luís M^a Romero Monreal,
"mineralizador incansable"; Lili Hernández "hábil
mecnógrafa"; José Luís Delgado y Paco Herrera,
a quienes de vez en cuando capturé para "echar
una mano"; Antonio Luís Extremera, gracias al
cual pude ultracentrifugar; al Departamento de
Bioquímica, del que tomé prestados innumerables
accesorios y aparatos; y para todos aquellos que
durante estos años me alentaron en la realización
del trabajo.

I N D I C E

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
OBJETIVOS Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO.....	13
1.- INTRODUCCION.....	17
1.1.- El boro en el suelo y su disponibilidad para la planta.....	17
1.2.- Absorción de boro por las plantas.....	18
1.3.- Distribución del boro en las plantas.....	19
1.4.- El boro como elemento esencial para las plantas superiores e inferiores.....	20
1.5.- Importancia de la nutrición de boro para los cultivos de girasol.....	21
1.6.- Funciones del boro en el metabolismo vegetal.....	23
1.6.1.- Hipótesis generales propuestas.....	23
1.6.2.- Efecto del boro sobre el crecimiento vegetativo.....	24
1.6.3.- Acción del boro sobre el transporte y metabolismo de los azúcares.....	26
1.6.4.- Efectos sobre la germinación del polen.....	27
1.6.5.- Efectos sobre el metabolismo respiratorio y fotosintético.....	27
1.6.6.- Efectos sobre el metabolismo proteico.....	28
1.6.7.- Efectos sobre la biosíntesis de la pared celular.....	29
1.6.8.- Efectos sobre el metabolismo fenólico y biosíntesis de lignina.....	30
1.6.9.- Efectos sobre el contenido de auxinas y el metabolismo auxínico.....	31
1.6.10.- Efectos sobre el metabolismo de las gibberelinas.....	32
1.6.11.- Efectos sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos.....	34
1.6.12.- Actuación del boro como regulador de actividades enzimáticas.....	36

	<u>Pág.</u>
1.6.12.1.- Relación B-actividad catalasa.....	37
1.6.12.2.- Relación B-actividad peroxidásica...	37
1.6.12.3.- Relación B-actividad ácido indolacé- tico oxidasa.....	38
1.6.12.4.- Relación B-actividad polifenol oxida sa.....	43
1.6.12.5.- Relación B-actividades glucosa-6-P- deshidrogenasa y 6-P-gluconato-deshi drogenasa.....	50
1.6.12.6.- Relación B-actividad fenilalanina - amonioliasa.....	52
1.6.12.7.- Biosíntesis de ent-kaureno, precursor de gibérelinas, a partir de ácido me valónico.....	56
1.6.12.8.- Resumen final del papel del B en las actividades enzimáticas.....	59
1.6.13.- Actuación del B sobre la funcionalidad de las - membranas vegetales.....	61
2.- MATERIAL Y METODOS.....	66
2.1.- Material vegetal.....	66
2.2.- Cultivo.....	66
2.2.1.- Germinación.....	66
2.2.2.- Cultivo hidropónico en solución nutritiva - completa y equilibrada.....	67
2.2.2.1.- Solución nutritiva base.....	67
2.2.2.2.- Dispositivo de cultivo.....	67
2.2.2.3.- Condiciones ambientales del culti- vo.....	68
2.2.3.- Cultivo hidropónico en soluciones nutritivas diferenciales.....	68
2.2.3.1.- Diseño experimental.....	68
2.3.- Recolección del material vegetal.....	69

	<u>Pág.</u>
2.4.- Experiencias previas.....	69
2.4.1.- Comprobación del correcto funcionamiento de la metodología del cultivo y preparación de las hojas, así como del diseño experimental.....	69
2.4.2.- Medida espectrofotométrica del enzima AIA-oxidasa.....	70
2.4.3.- Técnicas relacionadas con la determinación de giberelinas, puestas a punto en Nijmegen (1981).	71
2.4.3.1.- Actividad sintetizadora de ent-kaureno, precursor de las giberelinas, a partir de mevalonato marcado.....	71
2.4.3.1.1.- Técnica original para Phorbis nil).....	72
2.4.3.1.2.- Pruebas realizadas para la adaptación de esta técnica al girasol.....	73
2.4.3.1.2.1.- Actividad sintetizadora de ent-kaureno en los distintos órganos del girasol.....	73
2.4.3.1.2.2.- Determinación de la relación óptima peso fresco/tampón en la homogeneización.....	73
2.4.3.1.2.3.- Efecto de la congelación del material.....	73
2.4.3.2.- Extracción y cuantificación del nivel de giberelinas endógenas presentes en los tejidos.....	74
2.4.3.2.1.- Técnica original (para Phorbis nil).....	74
2.4.3.2.1.1.- Extracción de giberelinas.....	74
2.4.3.2.1.2.- Purificación.....	75
2.4.3.2.1.3.- Identificación de giberelinas mediante el paso por HPLC.....	75

	<u>Pág.</u>
2.4.3.2.1.4.- Bioensayo.....	76
2.4.3.2.2.- Pruebas realizadas con nuestro material vege- tal.....	77
2.5.- 1ª Experiencia.....	79
2.5.1.- Toma de muestras.....	79
2.5.2.- Determinación de las actividades enzimáticas catalasa (1.11.1.6) peroxidasa (1.11.1.7) y AIA-oxidasa.....	79
2.5.2.1.- Infiltración.....	79
2.5.2.2.- Congelación del material vegetal.	80
2.5.2.3.- Preparación de los extractos enzi- máticos.....	80
2.5.2.4.- Medida de la actividad peroxidasa.	80
2.5.2.5.- Medida de la actividad catalasa..	80
2.5.2.6.- Medida de la actividad AIA-oxidasa.	81
2.6.- 2ª Experiencia.....	82
2.6.1.- Toma de muestras.....	82
2.6.2.- Medida de la actividad polifenol oxidasa...	82
2.6.2.1.- Preparación de los extractos enzi- máticos.....	82
2.6.2.2.- Medida espectrofotométrica de la actividad PPO.....	82
2.6.3.- Medida del contenido en o-difenoles.....	83
2.7.- 3ª Experiencia.....	83
2.7.1.- Toma de muestras.....	84
2.7.2.- Medida de las actividades glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-P-gluconato-deshidrogena- sa.....	84
2.7.2.1.- Preparación de los extractos enzi- máticos.....	84
2.7.2.2.- Medida de la actividad glucosa-6- P- deshidrogenasa	84

	<u>Pág.</u>
2.7.2.3.- Medida de la actividad 6-P-glucosato-deshidrogenasa.....	85
2.7.3.- Medida del contenido en o-difenoles de las hojas.....	85
2.8.- 4ª Experiencia.....	85
2.8.1.- Toma de muestras.....	85
2.8.2.- Preparación de los extractos enzimáticos...	86
2.8.3.- Medida de la actividad fenilalanina-amonioliasa.....	86
2.8.4.- Medida del contenido de o-difenoles en hoja.	87
2.9.- 5ª Experiencia.....	87
2.9.1.- Toma de muestras.....	87
2.9.2.- Preparación de los extractos enzimáticos...	88
2.9.3.- Medida de la biosíntesis de ent-kaureno....	88
2.9.4.- Determinación del contenido de giberelinas solubles.....	89
2.9.4.1.- Extracción y purificación de giberelinas.....	89
2.9.4.2.- Medida del contenido de giberelinas a través de bioensayo.....	90
2.10.- Determinación del contenido proteico de los extractos enzimáticos.....	90
2.11.- Determinaciones analíticas.....	91
2.11.1.- Determinaciones de Cu, Fe, Mn y Zn.....	91
2.11.2.- Determinación del boro.....	91
2.12.- Método estadístico aplicado al estudio de los resultados obtenidos.....	92
3.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	95
Tablas y figuras.....	96
3.1.- Expresión de los resultados.....	226
3.2.- Toma de muestras.....	226

3.3.- Justificación e interpretación de las distintas etapas del análisis estadístico.....	227
3.4.- Efecto de la infiltración o adición de B "in vitro" sobre los parámetros bioquímicos medidos.....	229
3.5.- Estudios de los parámetros relacionados con el metabolismo fenólico en las hojas.....	231
3.5.1.- Actividad peroxidásica.....	231
3.5.2.- Actividad catalasa.....	232
3.5.3.- Actividad AIA-oxidasa.....	234
3.5.4.- Actividad polifenol-oxidasa y contenido de o-difenoles.....	235
3.5.5.- Actividades glucosa-6P-deshidrogenasa, 6P-gluconato-deshidrogenasa y contenido de o-difenoles.....	240
3.5.6.- Actividad fenilalanina-amonioliasa (PAL) y contenido de o-difenoles.....	248
3.5.7.- Contenido de o-difenoles medidos en la 2ª, 3ª y 4ª experiencias.....	252
3.6.- Contenido proteico de los extractos de hojas.....	252
3.7.- Contenido de microelementos en las hojas.....	255
3.7.1.- Contenido de B.....	255
3.7.2.- Contenido de Cu, Fe, Mn y Zn.....	256
3.8.- Parámetros relacionados con la actividad giberelínica en la parte superior del tallo.....	257
3.8.1.- Biosíntesis de ent-kaureno a partir de mevalonato marcado.....	257
3.8.2.- Actividad giberelínica.....	257
4.- CONCLUSIONES.....	261
5.- BIBLIOGRAFIA.....	267
Fe de erratas.....	276

OBJETIVOS Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO

OBJETIVOS Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO

El cultivo de girasol se está extendiendo progresivamente en España, y muy especialmente en Andalucía, donde está adquiriendo una importancia económica creciente, no sólo por su aceite (el 3º en el consumo humano mundial, sólo después del de soja y cacahuate), sino también por otras aplicaciones de enorme interés agropecuario en nuestra región. Así, los residuos de la obtención del aceite o "tortas" se usan como alimento del ganado, compitiendo ventajosamente con la "torta" de soja (en la cual España es deficitaria) por la presencia de metionina y otros aminoácidos esenciales.

Además de por la obtención de tan importantes productos, el cultivo de girasol en Andalucía presenta otras interesantes aplicaciones agrícolas. Así, en los cultivos de secano, tan frecuentes en nuestra región, sirve como cultivo rotatorio con los cereales, por la gran profundidad de sus raíces, que exploran capas de terreno a las que no llegan las de aquellos. También, en los suelos que se ponen en regadío por primera vez, y que lógicamente son fuertemente deficitarios en materia orgánica, un cultivo de girasol, para abonado en verde puede ser de enorme utilidad. En efecto, el girasol puede crecer en terreno empobrecido, por su profundo sistema radical, lo que convierte en una buena planta "colonizadora", una vez obtenida suficiente cantidad de cosecha verde, se procede a enterrarla, suministrando abonado nitrogenado y riego, calculándose que una labor de este tipo equivale a una estercoladura de 25.000 kg/ha.

El cultivo de girasol presenta numerosos problemas. Uno de los mas frecuentes que continuamente origina consultas por parte de los cultivadores, es el problema de la nutrición de Boro, micronutriente que afecta de manera muy decisiva a la cosecha debido a la especial esensibilidad de esta planta tanto a la deficiencia como a la toxicidad del elemento, de manera

que el margen de concentraciones que permite un crecimiento y desarrollo normales es particularmente estrecho. Tanto es así, que esta planta se usa como indicadora de la deficiencia de B en otros cultivos (SAUCHELLI, 1969 y HUDAK, 1974), por ser la primera que muestra síntomas. Lo mismo ocurre en condiciones de toxicidad.

Las condiciones ambientales y del suelo que provocan deficiencia y toxicidad de B no son en absoluto infrecuentes en las zonas de cultivo de girasol en nuestra región. Así, la deficiencia se da con frecuencia en regiones húmedas o de regadío, tanto en suelos ácidos con poca materia orgánica, como con exceso de arcilla o de materia orgánica, mientras que la toxicidad es típica del cultivo de secano, sobre todo en regiones áridas o semiáridas.

El efecto de una nutrición anormal de B en girasol, como hemos indicado antes, es siempre una drástica reducción de la cosecha. La(s) causa(s) metabólicas de este efecto no son conocidas, y hasta que no se esclarezcan totalmente no podremos resolver el problema de la manera más satisfactoria para el cultivo que nos ocupa. El objetivo primordial de este trabajo es, por tanto, aclarar al menos algunos aspectos del papel metabólico del B en las plantas de girasol. En este sentido, nuestra investigación está planteada como un estudio de la variación en el tiempo de varios parámetros que, de acuerdo con la bibliografía consultada, podrían verse influenciados por los niveles de B, dichos parámetros bioquímicos, se determinan en la parte aérea de plantas de girasol adultas, cultivadas con niveles deficiente, normal y tóxico de B. La evolución en el tiempo de estos parámetros en las plantas con deficiencia o toxicidad de B, con respecto a las normales, nos dará información en primer lugar acerca de qué procesos metabólicos son los que se encuentran relacionados con el elemento, y en segundo lugar, cuáles de estos procesos están bajo control del B en la planta, que serán aquellos en que se detecte una alteración mas temprana, y una estrecha dependencia de los niveles de B.

En la bibliografía consultada como después veremos, existe una gran confusión respecto a las acciones metabólicas del B, y especialmente respecto a la distinción entre acciones que pueden ser atribuídas primariamente al elemento, y efectos claramente secundarios, que serían consecuencia de dichas alteraciones primarias.

Finalmente, una interesante aplicación adicional de nuestros resultados sería, si encontramos que alguno de los parámetros bioquímicos determinados en las hojas cumple las condiciones necesarias para, una vez standardizadas para análisis de rutina, ser propuesto como medio de detección precoz de la deficiencia o toxicidad de B en los cultivos, ya que ello permitiría actuar antes de que los daños a la cosecha sean irreparables. La utilización de parámetros bioquímicos como indicadores de la nutrición de los cultivos ha sido impulsada por un grupo de nutriólogos israelíes (BAR-AKIVA, 1971), y en la actualidad es práctica ámpliamente usada para el control nutricional de varios micronutrientes. Sin embargo, debido a la falta de información clara sobre el papel metabólico del B, no se ha propuesto hasta la fecha ningún parámetro bioquímico para el control de la nutrición de este elemento.

1.- INTRODUCCION



1.- INTRODUCCION

El especial interés que los investigadores dedican al papel del Boro en el metabolismo vegetal radica en el hecho de que es el único elemento esencial para las plantas superiores que no interviene en el metabolismo animal.

La esencialidad del B para las plantas superiores se demostró por primera vez en 1910. Actualmente, las investigaciones sobre este elemento se han centrado en la búsqueda del papel fisiológico o bioquímico que el B desempeña en el crecimiento y desarrollo vegetales. Los esfuerzos se han dirigido en dos sentidos: por una parte, el estudio de las acciones del B en el metabolismo vegetal, y por otro, el estudio de los cambios morfológicos y/o fisiológicos en plantas cultivadas en un medio carente de B.

1.1.- El boro en el suelo y su disponibilidad para las plantas.- El B se encuentra en el suelo principalmente en forma de turmalina (borosilicato de flúor). Sin embargo, en esta forma el B no está disponible para las plantas, debido a que es insoluble. El B está también presente en otros silicatos y se libera en forma de boratos de Ca, Mg y Na que, al ser solubles en la solución del suelo, constituyen las formas inorgánicas de B, absorbibles por las plantas.

Una considerable proporción del contenido de B en suelos está en forma orgánica. Los boratos son adsorbidos por el humus, dando lugar a complejos que, en muchos casos, constituyen la principal reserva de B disponible para las plantas. El B es liberado paulatinamente de estos complejos por la acción de los microorganismos del suelo. Estos mismos microorganismos compiten con las plantas por el B asimilable, captando el B inorgánico e incorporándolo a su organismo, de donde, tras su muerte, se liberará, quedando de nuevo disponible para las plantas. La cantidad de B asimilable de un suelo depende de factores de tipo: edáfico - atmosférico y agrícola. Entre ellos podemos mencionar: pH y humedad del suelo, contenido de arcilla, encalado, contenido y estado de la materia orgánica, materiales de B presentes en el suelo e impurezas de los fertilizantes empleados.

Veamos en qué sentido actúa cada uno de los factores mencionados:

pH.- En suelos alcalinos, los minerales de la arcilla forman complejos con el B y lo retienen. En general, los suelos arcillosos y alcalinos suelen dar lugar a la aparición de deficiencias de B en los cultivos.

Humedad del suelo.- El B asimilable es fácilmente arrastrado por el agua de lluvia o de riego hasta las capas profundas del suelo.

Encalado.- Se sabe que la práctica del encalado (adición de cal apagada al suelo) da lugar a la aparición de síntomas de deficiencia de B en los cultivos. Si estos suelos son además arenosos, contienen poca materia orgánica y las lluvias son regulares, la posibilidad de que se presenten deficiencias de B aumenta.

Tipo de minerales del suelo.- Los suelos con minerales procedentes de rocas ígneas y las areniscas, apenas contienen B asimilable a diferencia de los suelos procedentes de rocas sedimentarias.

Resumiendo, se podrán producir deficiencias de B, bien en regiones húmedas sobre suelos ácidos y pobres en materia orgánica, bien en regiones de pluviosidad intermedia, sobre suelos alcalinos, calcáreos o con un gran contenido en materia orgánica ó arcilla.

Por el contrario, se han encontrado síntomas de toxicidad de B en cultivos sobre suelos áridos donde las sales solubles de B se pueden acumular.

1.2.- Absorción de boro por las plantas.- Parece generalmente aceptada (TANAKA, 1967; BINGHAM et al., 1970) la hipótesis de que el B es absorbido pasivamente hasta el espacio libre, donde puede formar complejos con polisacáridos. Sin embargo, BOWEN (1968) demostró que una fracción del B absorbido estaba regulada metabólicamente en un proceso mediado por un transportador. Esta absorción activa no se producía a 2°C (BOWEN y NISSEN, 1976).

OERTLI y GRGUREVIC (1975) encontraron que a pH superior a 6 la absorción de B disminuye a medida que aumenta el pH, siendo este descenso paralelo a la disminución de BO_3H_3 no disociado. Esto hace pensar que el B es absorbido por la planta en esta forma.

Los resultados obtenidos por THELLIER et al., (1979) en trabajos con B marcado, pueden traducirse en un modelo con 4 compartimentos que contienen B: 1. El espacio libre conteniendo monoésteres de borato fácilmente disociables. 2. Citoplasma. 3. Vacuola y 4. Diésteres de borato estables en las paredes celulares.

Por último, RAVEN (1980) propone un modelo en el que la regulación de la distribución de B en la célula depende más del nivel de B intracelular que del BO_3H_3 libre; la distribución dentro de las células depende de la penetración pasiva, el transporte activo, y la formación de cis-dioles.

1.3.- Distribución del boro en las plantas.- El hecho de que uno de los primeros síntomas que aparecen durante la deficiencia de B sea la distorsión del crecimiento apical, ha llevado a los investigadores a concluir que la reutilización del B desde las partes más viejas a las más jóvenes de la planta es nula o prácticamente nula. SKOK (1958) observó que cerca del 50% del contenido de B se encontraba en la fase sobrenadante obtenida tras homogeneización y centrifugación. Cuando las plantas mostraban evidentes signos de deficiencia de B, la porción dializable de B (el B libre) se reducía a cero. Esto indica que la pequeña fracción que puede reutilizarse es aquella que se encuentra en la porción dializable de la fracción sobrenadante.

La ausencia de redistribución del B desde las hojas más viejas a las más jóvenes ha sido explicada de distinto modo por los diversos autores. Mientras que según KOHL y OERTLI (1961) el B queda inmovilizado en las hojas debido a que no puede ser transportado por el floema, este último autor junto con RICHARDSON (1980), y a partir de sus trabajos con lirio, concluyó que el B realmente puede ser transportado por el floema de la hoja, pero vuelve al xilema a nivel de la misma hoja o del peciolo. y en este caso vuelve a la hoja a través de la corriente transpiratoria.

Por último, CHAMEL et al., a la vista de los resultados obtenidos empleando B marcado y espectrometría de masas, sugieren la existencia de un pequeño transporte de B a partir de las hojas debido a la formación de complejos con polisacáridos.

1.4.- El boro como elemento esencial para las plantas superiores e inferiores.- Se ha demostrado que tanto Monocotiledóneas como Dicotiledóneas y Gimnospermas requieren para su normal crecimiento y desarrollo la presencia de B en el medio de cultivo.

Dentro de las Monocotiledóneas, podemos establecer dos grupos en función de su susceptibilidad a la deficiencia de B. El primer grupo, en el que están incluidos maíz, caña de azúcar, cebada y posiblemente otras plantas, responden a la deficiencia de B sufriendo en primer lugar una reducción del crecimiento vegetativo, y finalmente la muerte. El segundo grupo, que incluye trigo, avena y centeno entre otras, sólo presentan síntomas de deficiencia en la etapa reproductiva.

Las Dicotiledóneas también presentan variaciones en cuanto al nivel de B requerido.

Por lo que respecta a las plantas inferiores, según SHKOL'NIK y MAEVSKAYA (1977) los hongos no requieren la presencia de B en el medio de cultivo; algunos helechos muestran respuesta al B tanto en el crecimiento vegetativo como en el desarrollo de las estructuras reproductoras (DUGGER, 1983). En cuanto a las algas, aunque se ha hablado de una estimulación en el crecimiento de algas como *Chlorella vulgaris*, por la presencia de B, GERLOFF (1968) demostró que no existía un requerimiento de este elemento para el crecimiento de las algas en general. Sin embargo, como excepción, las diatomeas requieren la presencia de B no sólo para el crecimiento, sino también para la división celular (LEWIN and CHEN, 1967).

Por último, y dentro del Reino Procariota, algunas bacterias como *Azotobacter chroococcum* requieren B, en este caso para la fijación de Nitrógeno. Y el alga verde-azulada *Nostoc mucorum* muestra también una respuesta en su crecimiento frente a la presencia de B en el medio.

1.5.- Importancia de la nutrición de boro para los cultivos de girasol.- El girasol es una planta extremadamente sensible a las condiciones de deficiencia y toxicidad de B. Esta sensibilidad da lugar a que el margen de concentraciones de este elemento que produce crecimiento y desarrollo normales de la planta, sea particularmente estrecho. Es por esto que el girasol se suele utilizar como planta indicadora para detectar precozmente la deficiencia de este elemento en otros cultivos (SAUCHELLI, 1969; HUDAK, 1974), ya que si disminuye la cantidad de B disponible es la primera que muestra síntomas de deficiencia. Esto mismo ocurre también en caso de toxicidad.

Los síntomas de deficiencia de B en girasol han sido descritos por JIMENEZ LUCENA (1974) y son, por orden de aparición según progresa la deficiencia, los que seguidamente pasamos a enumerar:

- Clorosis progresiva en hojas terminales.
- Aparición de pigmentación de color marrón a partir de las hojas inferiores para extenderse más tarde al resto de la planta.
- Deformación de las hojas hasta presentar un aspecto marchito y falta de succulencia.
- Aparición, en las hojas terminales, de una especie de fieltro blanco que se oscurece progresivamente y deforma la zona, particularmente el ápice.
- Necrosis y muerte de las hojas afectadas por la deficiencia, así como del ápice caulinar.

Por lo que respecta a los síntomas de toxicidad de B, y dada la dificultad con la que este elemento se transporta a través de la planta, se presentan primero en las hojas más viejas y se caracterizan por la aparición de manchas necróticas redondeadas, de color y consistencia cenicientos, dispuestas en los márgenes y ápices de la hoja (ALVAREZ TINAUT, 1972). Estas manchas aparecen, rodeadas de halos cloróticos. A medida que progresa la toxicidad las hojas (primero las más viejas) caen totalmente secas. En los casos más graves, la necrosis afecta también a los tallos y la planta se seca por completo.

Se ha hecho una interesante observación acerca de la toxicidad de B: al parecer, las plantas jóvenes se adaptan por tiempo limitado a las altas concentraciones de B, cosa que no ocurre en plantas más viejas

Las consecuencias finales de estas alteraciones nutricionales se manifiestan en el rendimiento de la cosecha. El déficit de B se traduce en una drástica reducción de la cantidad de materia verde así como de la producción de semillas, y consecuentemente del volumen de aceite extraíble (J.L. Delgado y Alvarez-Tinaut, comunicación personal). Cuando la deficiencia de B ha tenido lugar en la etapa de crecimiento rápido, se produce una detención radical del crecimiento vegetativo, dando como resultado la producción de plantas bajas, de entrenudos cortos, gruesos y especialmente frágiles. Esto último, debido al aumento del contenido de agua. En el último estadio de la deficiencia, la yema terminal se necrosa y seca. En plantas monocaulinares, como es el caso del girasol, en las que la yema terminal de crecimiento se transforma en la única yema floral cuando se alcanza la floración, los daños provocados por la falta de B repercuten de modo especial en la formación y desarrollo de la flor. Las flores pueden no llegar a formarse o bien sufrir malformaciones más o menos graves algunas de las cuales pueden dar lugar a esterilidad.

Una acción del B particularmente importante para la cosecha, se da a nivel de la germinación del polen: la falta de B inhibe el desarrollo del tubo polínico y consecuentemente impide la fecundación.

Dado que el B es un nutriente esencial en el período de fructificación, si la planta está sometida a una deficiencia de este elemento, los pocos frutos que se hayan formado no se desarrollarán.

No hemos encontrado referencias bibliográficas sobre el efecto de los niveles anormales de B sobre la cantidad y calidad del aceite girasol, aunque se sabe que influye en la composición de otros aceites vegetales.

La deficiencia de B se ha asociado también con un bajo contenido de proteínas en todos los órganos de la planta.

La "torta" de girasol, que es el residuo que queda tras la extracción del aceite, tiene un alto contenido proteico por lo que se utiliza en la alimentación del ganado, y es, después del aceite, el producto más importante que se obtiene a partir de esta planta. Resulta por tanto, de especial interés, estudiar las variaciones de este parámetro en función de la nutrición de B.

1.6.- Funciones del boro en el metabolismo vegetal.

1.6.1.- Hipótesis generales propuestas.- Si bien está claramente demostrada la esencialidad del B para las plantas superiores, no se puede precisar, por el momento, cual es su papel - exacto en el metabolismo vegetal, aunque sí se ha demostrado una correlación entre ciertas actividades fisiológicas y bioquímicas y el contenido de B en los tejidos. Resumiremos los papeles más importantes atribuidos al B en el metabolismo vegetal:

- Transporte de sustancias orgánicas en la planta.
- Reacciones enzimáticas.
- Metabolismo de los reguladores del crecimiento.
- División y maduración celular.
- Metabolismo de los ácidos nucleicos.
- Proteínosíntesis.
- Biosíntesis de sustancias fenólicas.
- Modificación de las propiedades de las membranas.
- Metabolismo de la pared celular.
- Floración y fructificación.

El amplio abanico de alteraciones bioquímicas asociadas con niveles anormales de B hace pensar más en efectos secundarios que en la acción primaria de este elemento (PARR y LOUGHMAN, 1983).

Para DUGGER (1983) el efecto primario del B es la regulación de diversas reacciones enzimáticas y esta regulación metabólica se produce gracias a la capacidad que este elemento tiene para formar complejos con compuestos que contienen grupos OH^- .

Si estos compuestos son sustratos o productos de reacciones enzimáticas, se puede producir una activación o una inhibición de la vía metabólica en la que actúan. Esta alteración puede dar lugar a su vez, a un cambio en la concentración de ciertos metabolitos o bien impedir que se lleven a cabo ciertas reacciones. El resultado final es la alteración del crecimiento y desarrollo de la planta.

A continuación mostramos un esquema propuesto por este autor para explicar la secuencia de actuaciones del B en distintos procesos de la planta sobre los que se han observado alteraciones frente a condiciones de deficiencia o toxicidad de B (Fig. 1).

A lo largo de la presente introducción, trataremos de modo somero aquellas acciones del B sobre las cuales no incide específicamente nuestro trabajo, y entraremos más en detalle en aquellas otras relacionadas directamente con nuestra investigación, es decir, regulación de sistemas enzimáticos, metabolismo de auxinas, giberelinas y compuestos fenólicos.

1.6.2.- Efecto del B sobre el crecimiento vegetativo.

Las más recientes investigaciones se han dirigido al estudio detallado del efecto de la deficiencia de B sobre el crecimiento de la raíz.

KOUCHI y KUMAZAWA (1975) y LOVATT et al., (1981) encontraron que el primer efecto de la deficiencia de B era una rápida detención de la elongación de la raíz. Posteriormente se producían otros efectos tales como oscurecimiento y engrosamiento anormal de las raíces y aparición de gran cantidad de raíces secundarias. En el caso de que no se le suministre B a la planta tras la aparición de las raíces secundarias éstas verán también detenido su crecimiento.

La detención del crecimiento de la raíz en condiciones de deficiencia de B ha sido descrita por otros muchos autores tales como: SKOK (1958), ALBERT (1975), COHEN y LEPPER (1977). Sin embargo, mientras que para algunos de ellos (COHEN y LEPPER, 1977; HIRSCH et al., 1982) esta detención se debe a un efecto sobre la división celular y no sobre la elongación de estas células, para otros, tales como TORSSELL, 1956 y BIRNBAUN et al., 1974, ocurriría justo lo contrario, es decir, la deficiencia de B alteraría la elongación pero no la división celular. Por último, KOUCHI

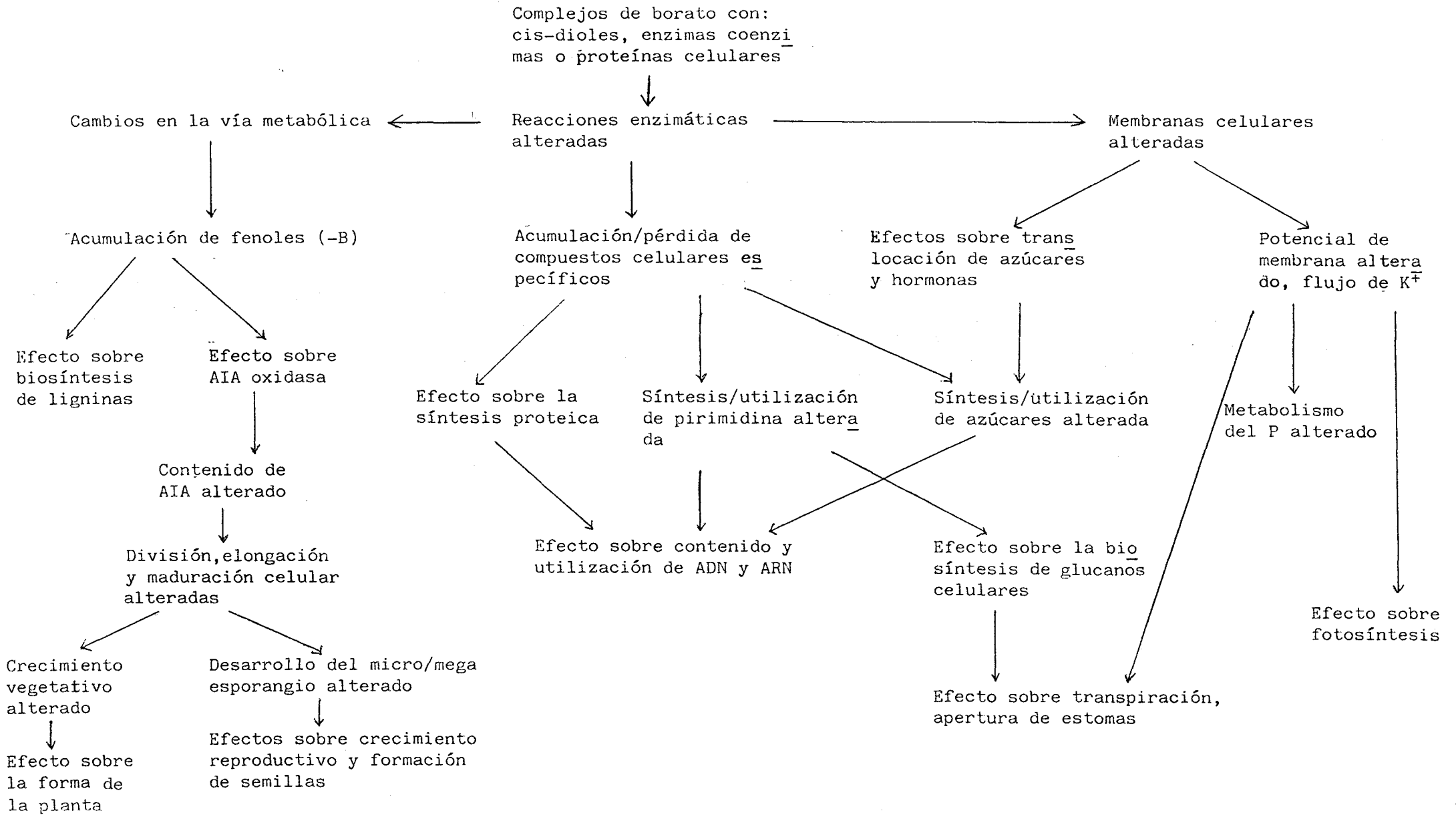


Fig. 1. Hipotética secuencia de efectos, respuestas y alteraciones metabólicas en las plantas, influenciadas por el B (DUGGER, 1983).

y KUMAZAWA (1975), encuentran inhibidas tanto la división como la elongación celular.

Por lo que respecta al efecto del B sobre la diferenciación y maduración celular, las opiniones se dividen entre aquellas que piensan que la deficiencia de B conduce a una acumulación de células indiferenciadas (KROSING, 1978) y los que describen, por el contrario, un incremento en la maduración y diferenciación de las células próximas al ápice.

En relación con estos efectos sobre la división, elongación y diferenciación celular, hay que destacar que se han postulado hipótesis implicando al ác. bórico en la formación y funcionamiento de las subs. celulares, así como en la biosíntesis de polisacáridos de la pared celular, que serán discutidas con detalle más adelante.

1.6.3.- Acción del B sobre el transporte y metabolismo de los azúcares.- Se ha postulado (GAUCH y DUGGER, 1954), en base a estudios sobre absorción y translocación de azúcares marcados con ^{14}C y aplicados exógenamente a plantas, que el B pudiera formar complejos con estos azúcares y facilitar de este modo su transporte. Efectivamente, si junto con los azúcares se aplican boratos, se amplía la distribución de estos compuestos.

Sin embargo, otros autores han observado también una mayor distribución de los azúcares sintetizados en plantas cultivadas con un nivel de B suficiente, en comparación con las cultivadas con deficiencia de este elemento, sin que por ello acepten la teoría de la formación de complejos transportadores B-azúcares. Vamos a considerar algunas de las hipótesis alternativas propuestas.

Según DUGGER (1973), el B estimula la absorción y/o el movimiento de los azúcares, probablemente a través de una acción indirecta, bien sobre su transporte a larga distancia, bien debido a que el B juega un papel esencial en la biosíntesis de auxinas.

LEE et al., (1966) en trabajos sobre plantas de girasol cultivadas en solución deficiente y normal de B, comprobaron que al cabo de unos 30-60 minutos de la aplicación de $^{14}\text{CO}_2$, el descenso, a lo largo del tallo, de los fotosintetizados que habían incorporado

el ^{14}C era menor en las plantas deficientes en B que en las normales. Sin embargo, no hubo diferencias en cuanto a la cantidad total de compuestos marcados en las plantas.

El hecho de que el contenido de azúcares aumente en las plantas con deficiencia de B, así como la respuesta frente a este elemento observado en algunas reacciones enzimáticas de interconversión de carbohidratos, ha conducido a la hipótesis de que el B actúa más a nivel del metabolismo de estas sustancias que en su translocación.

1.6.4.- Efectos sobre la germinación del polen.-

Las primeras revisiones que relacionan al B con la germinación del polen incluyen efectos sobre:

- Crecimiento del tubo polínico.
- Regulación de la ruptura de los granos de polen, como consecuencia de la "toma de agua no regulada".
- La posibilidad de que el B del tejido estigmático tenga influencia sobre el crecimiento del tubo polínico y sobre la compatibilidad en la fertilización cruzada.

Según la bibliografía actual, el papel del B en la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico se ha concretado un poco más, siendo probablemente uno ó más de los que se exponen a continuación:

- Facilitar la absorción y metabolismo de los azúcares.
- Incrementar la respiración.
- Estar involucrado en la biosíntesis de la pared del tubo polínico. En este caso, parece que el papel del B es específico y no está relacionado ni con la absorción de azúcares ni con la respiración, sino con la síntesis de las unidades D-galacturonosil de la pectina.

1.6.5.- Efectos sobre el metabolismo respiratorio y fotosintético.- La deficiencia de B en plantas da lugar a un

incremento en el contenido de almidón y otros hidratos de carbono así como a un aumento de la respiración tisular. Sin embargo, cuando los síntomas de deficiencia se agudizan, la respiración de las plantas deficientes disminuye con respecto a las normales.

Parece que la deficiencia de B produce un descenso en el cociente entre el sustrato metabolizado vía glucólisis y el metabolizado por la vía de las pentosas-fosfato, debido a una aceleración de este último (EICHHORN y AUGSTEN, 1974; SHKOL'NIK, 1974; SHKOL'NIK y MAEVSKAYA, 1977). La descripción más detallada de los efectos que produce sobre esta vía metabólica se hará más adelante.

Por lo que respecta a la influencia del nivel de B sobre la fotosíntesis, la bibliografía es escasa. En general, en tejidos fuertemente deficientes en B, la fotosíntesis disminuye. No obstante, AUGSTEN y EICHHORN (1976) observaron un incremento en *Wolffia arrizha* cultivada en condiciones de deficiencia de B. Estos mismos fueron los resultados obtenidos por SMITH y DUGGER (1980) en *Cylindrotheca fusiformis*, cultivada en un medio carente de B.

1.6.6.- Efectos sobre el metabolismo proteico.-

La deficiencia de B está generalmente asociada a un bajo contenido proteico en las plantas (DEL RIO et al., 1978; KHANDUJA, 1976; PILLAR, 1973). Este hecho parece deberse a una ralentización de la proteinosíntesis, debido a que el déficit de B altera los componentes estructurales que le sirven de soporte. En efecto, SHERSTNEV (1974) observó, en trabajos con guisante y girasol, que en los tejidos con deficiencia de B se produce una menor incorporación de aminoácidos a los ribosomas, consecuencia al parecer, de la degradación del ARN-ribosómico.

Para KOGE (1978), el menor crecimiento de las raíces de plantas de tomate, producido en condiciones de deficiencia de B, se explica en parte por una reducción de la síntesis proteica.

Según COHEN (1979), las raíces de guisante incorporan menos leucina a las proteínas tras haber sido transferidas a condiciones de deficiencia de B. Esto indicaría que se necesita un aporte continuo de B para la síntesis de proteínas.

A la vista de algunos trabajos como los de SHKOL'NIK, 1969 se puede pensar que no sólo se ve alterada la cantidad total de proteínas sino también la especificidad.

Sin embargo, DAVE y KANNAN (1981) han publicado que el contenido de proteínas solubles en agua en cotiledones de plantas de haba cultivadas con deficiencia de B es mayor que en los de plantas cultivadas con B en el medio de cultivo.

1.6.7.- Efectos sobre la biosíntesis de la pared celular.- Existe una clara relación entre la síntesis de elementos de formación de la pared celular y la disponibilidad de B (AUGSTEN y EICHHORN, 1976). En algunos casos, la falta de B conduce a una reactivación de la síntesis pectínica y/o aumento del contenido de pectina y celulosa, con una reducción simultánea de la cantidad de galactanos. Posiblemente la síntesis de galactanos se vea especialmente bloqueada en ausencia de B, o bien se estimula la síntesis de todos los polisacáridos, a excepción del galactano.

Es de destacar, que los hongos *Penicillium glaucum* y *Aspergillus niger*, que presentan un crecimiento normal en ausencia de B, no sintetizan pectina sino un poliurónido de ácido galacturónico.

En la planta objeto de nuestro estudio, el girasol, se ha observado que, a medida que se desarrolla la deficiencia de B, las paredes de las células del mesófilo de las hojas se engrosan y toman un aspecto rugoso. Asimismo, la estructura microfibrilar de la pared celular aparece más desorganizada en las plantas cultivadas con deficiencia de B

La incorporación de ^{14}C -glucosa en las paredes celulares - de los ápices de raíces de girasol es mayor en condiciones de deficiencia de B que bajo un nivel normal de este elemento (TIMASHOV 1977), quizás debido a que el aumento de la diferenciación tisular da lugar a una inhibición de la elongación de la raíz.

Según SHIVE y BARNETT (1973), la falta de B da lugar a un incremento en el contenido de hidroxiprolina en la pared de las células de la raíz, lo que relacionaría al B con la extensina, o proteína de la pared. Sin embargo, esta observación no se ha visto corroborada tras los trabajos de TROITSKAYA et al., (1975).

1.6.8.- Efectos sobre el metabolismo fenólico y biosíntesis de lignina.- Según LEE y ARONOFF (1967) cuando la deficiencia de B está avanzada se produce una acumulación de fenoles en la planta. El modo de actuación del B consistiría en la formación de un complejo 6-fosfogluconato-borato. Este complejo secuestraría el P-gluconato y por tanto inhibiría la descarboxilación oxidativa del mismo por el enzima 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (enzima clave del ciclo de las pentosas fosfato). En ausencia de B, y por tanto, del complejo, el enzima operaría a mayor velocidad, conduciendo finalmente a un aumento del contenido en fenoles, ya que éstos se forman a partir de eritrosa-P, producto formado en la citada vía de las pentosas-P. Además, muchos de los fenoles acumulados pueden formar complejos con el B, con lo que disminuiría aún más el borato disponible para la formación del complejo con el 6-P-gluconato. Como consecuencia, se desencadenaría un sistema autocatalítico de producción de fenoles en exceso, que sería el causante de la necrosis de los tejidos (DEAR y ARONOFF, 1965).

La alteración del contenido en fenoles parece ser, además cualitativa, y afecta principalmente a los orto-difenoles, y dentro de éstos el ácido cafeico (cuyo contenido es el que más aumenta en hojas de girasol deficientes en B (LEE y ARONOFF, 1967) al menos en los primeros estadios de la deficiencia, ya que cuando ésta se prolonga, la cantidad de fenoles de la hoja de girasol decrece de nuevo hasta un nivel inferior al de las plantas normales.

Siguiendo con estas modificaciones cualitativas del contenido fenólico, hemos de decir que en deficiencia de B, pueden incluso aparecer ciertos compuestos que no se encuentran en las plantas normales. Es el caso de la escopolina (WATANABE et al., 1964); 5- β -D-glucósido del ácido gentísico (SHKOL'NIK e IL'INSKAYA) y el 5- β -D-glucosil 2,5-dihidroxibenzoico, en girasol.

La deficiencia de B causa también un incremento del contenido de flavonol, flavononas y flavonol-3-glucósidos (SHKOL'NIK y ABYSHEVA, 1975).

Se ha propuesto que la deficiencia de B conduciría a un aumento del contenido de AIA en la raíz, y que ello se debería a que el sistema AIA-oxidasa se ve inhibido por la acumulación

de compuestos difenólicos. En los tejidos normales, el borato forma complejos con los fenoles y no se produciría la inhibición de la AIA oxidasa. No obstante, según HIRSCH et al., (1982), los cambios en los niveles endógenos de AIA no responden a los predichos por esta hipótesis, sobre todo si éste fuera el efecto primario básico de la deficiencia de B, aunque no se descarta un efecto secundario en este sentido.

Para LEWIS (1980), la acción primaria del B estaría ligada a la biosíntesis de la lignina y la diferenciación del xilema, a través de la regulación de las actividades hidroxilasa y oxidasa de las fenolasas implicadas en la biosíntesis y posterior oxidación de los ácidos cafeico e hidroxiferúlico, para dar las quinonas cuya polimerización da origen a la lignina. A este respecto hemos de resaltar el hecho de que uno de los efectos más regularmente observados en las plantas deficientes en B es una acumulación de lignina en los tejidos de sostén.

1.6.9.- Efectos sobre el contenido de auxinas y el metabolismo auxínico.- Según lo descrito en la bibliografía, la deficiencia de B se ha postulado que podría actuar sobre el contenido y metabolismo de las auxinas a dos niveles:

a) Provocando un incremento en el contenido endógeno de auxinas.

b) A través de la alteración de la actividad AIA-oxidasa.

a) Por lo que respecta a la modificación del contenido de auxinas en planta, COKE y WITTINGTON (1968) observaron que la característica reducción del crecimiento de la raíz, provocada por la deficiencia de B, podía ser reproducida por la presencia de niveles supraóptimos de AIA. Para SHKOL'NIK (1974) el papel fisiológico del B se puede explicar en términos de acumulación de auxinas y compuestos fenólicos bajo la deficiencia de este elemento.

No obstante, según SMIRNOV et al., (1977) la deficiencia de B no está asociada a una acumulación tóxica de AIA (en plántulas de girasol, especie sensible a la falta de B, se produce de hecho un descenso en el nivel de la hormona libre, mientras que en la

raíz hay un aumento de las auxinas ligadas) sino a una acumulación de fenoles oxidados. Además, los cambios ultraestructurales producidos por el déficit de B son diferentes a los causados por el tratamiento con AIA (HIRSCH y TORREY, 1980); por todo ello, no parece que el B sea el determinante del nivel endógeno de AIA.

Por último, HIRSCH et al., (1982) han concluido que los primeros síntomas de deficiencia de B no pueden ser explicados por cambios en la concentración endógena de AIA.

b) Por lo que respecta a la intervención del B en la regulación de la actividad AIA-oxidasa, la idea es que la deficiencia de B reduce dicha actividad probablemente de modo indirecto a través del aumento en el contenido de sustancias fenólicas, algunas de las cuales (los difenoles) actúan como inhibidores del sistema (KRUPNIKOVA et al., 1975). Otros investigadores como YAMANOUCHI et al., (1975) han encontrado que la inhibición tan sólo se produce a nivel de los tallos, mientras que en las raíces hay una activación.

BOHNSACK y ALBERT (1977) probaron que, en condiciones de falta de B, el crecimiento radicular de la calabaza se inhibía antes de que se hubiera podido detectar un cambio en la actividad AIA-oxidasa, la cual cambiaba mucho más tardíamente. No obstante, estos mismos autores, ratificaron la idea de que el déficit de B iba ligado a un alto nivel endógeno de AIA, aunque su opinión era que este hecho no era consecuencia de la inhibición de la AIA-oxidasa, sino que más bien ocurría a la inversa: los altos niveles de AIA daban lugar a una activación del enzima.

1.6.10.- Efectos sobre el metabolismo de las giberelinas.- Aunque los trabajos que relacionan el B con las giberelinas son escasos, parecen existir pruebas que indican que este elemento participa de modo directo o indirecto en el metabolismo de las giberelinas.

En general, el B refuerza los efectos provocados por los reguladores del crecimiento. IVANOVA (1968) encontró un efecto sinérgico entre B y giberelinas en el crecimiento de coleoptilos

de trigo y tallo de guisante, y la magnitud de la respuesta variaba con la concentración de hormona.

También se han realizado experiencias de germinación de semillas tratadas con micronutrientes (entre ellos B) y giberelinas, obteniéndose un gran incremento de la germinación (STEPANOV y NANDIN; 1963). Sin embargo, un reciente trabajo de JIMENEZ et al., (1982) describe una inhibición de la germinación de semillas de cebada tras imbibición con soluciones de B de más de 100 ppm, que puede ser parcialmente contrarrestada por el tratamiento con giberelinas (100 ppm). Esto podría estar de acuerdo con el hecho de que el aporte de giberelinas reduce los efectos del exceso de B (PEN'KOV, 1965). La conclusión más general en este campo es que, en monocotiledóneas, el B presenta un efecto específico sobre la ruptura del estado de reposo de las semillas, y la estimulación de su germinación. El mayor efecto se obtiene con la presencia simultánea de B y giberelinas, pero los resultados parecen indicar que ambos actúan a través de mecanismos en parte independientes (CRESSWELL y NELSON, 1973), o bien, que el B puede estar implicado en la biosíntesis de giberelinas.

Otro proceso en el que parecen interaccionar B y giberelinas es la formación y lignificación de los vasos del xilema. SKOK (1968), observó que la proliferación del xilema ocasionada por la aplicación de giberelinas se reducía al eliminar el B de la solución; su conclusión era que el B está directamente implicado, junto con las giberelinas, en la formación del xilema. El efecto sería un engrosamiento de los tallos, que no debería tener relación con la inhibición, por el B, de la elongación de los mismos.

Como se ve, no existen hipótesis concretas respecto a cuál podría ser el punto de conexión, a nivel molecular, entre la acción del B y las giberelinas. Sin embargo, en semillas en germinación y en plántulas, que es donde estas hormonas tienen un papel regulador más importante, la función de las giberelinas se ha relacionado con la activación de enzimas clave, ya preexistentes, que están compartimentados o bien inactivados por hallarse ligados a membranas. A la vista de la creciente importancia que los más recientes trabajos asignan al B en la formación y funcionamiento

to de las membranas ésta podría ser la clave para comprender las interacciones B-giberelinas.

1.6.11.- Efectos sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos.- En resultado más general obtenido en los estudios sobre la relación entre B y ácidos nucleicos, es un descenso en el contenido de estos últimos, fundamentalmente ARN, en plantas deficientes en B (ALBERT, 1965; SHKOL'NIK, 1969; CRESSWELL y NELSON, 1973).

Durante los años sesenta, el equipo de SHKOL'NIK observó un descenso en el contenido de ácidos nucleicos en plantas sometidas a deficiencia de B. Si a las plantas se les suministraba este elemento al aparecer los primeros síntomas de deficiencia, se podía ver un aumento del contenido de ácidos nucleicos.

Otros autores han realizado experimentos en los que se conseguía evitar la aparición de síntomas visuales de deficiencia de B en plantas cultivadas en ausencia de este elemento si se adicionaban ácidos nucleicos al medio de cultivo.

Los efectos pormenorizados que produce la deficiencia de B sobre los ácidos nucleicos pueden resumirse en los siguientes puntos:

a) Inhibición de la biosíntesis y estimulación de la degradación de ácidos nucleicos, especialmente de ARN ribosómico (KEVRESAN et al., 1977, en trabajos con girasol). El aporte de B a plantas deficientes puede estimular la captación de P^{32} y aumentar el contenido de ADN y ARN, especialmente en hojas jóvenes (TIMASHOV, 1970). Igualmente, una adición de B, en condiciones de deficiencia, puede elevar el contenido de ARN en los ribosomas y cloroplastos (VLASJUK, 1971).

No obstante, parece que el descenso en el contenido de ARN tiene lugar en estadios avanzados de deficiencia, ya que CORY y FINCH (1967) observaron un aumento en la incorporación de P^{32} a las 4 horas de haber retirado el B del medio de cultivo. Igualmente CHAPMAN y JACKSON (1974) observaron en raíces de plántulas de *Phaseolus vulgaris*, un incremento de la incorporación de precursor-

res radiactivos al ARN, durante los primeros estadios de la deficiencia de B (aunque sin que se produjera aumento alguno en el contenido total de ARN) y antes de que se presentaran cambios morfológicos, aumentara la actividad ARNasa y como consecuencia descendiera el nivel de ARN. El contenido de ADN disminuía al poner las plantas en condiciones de deficiencia de B.

b) Reducción de la biosíntesis proteica sin que por ello varíe el grado de incorporación de los aminoácidos al ARN de transferencia por lo que el déficit de B no modifica la actividad enzimática que regula esta incorporación. Sin embargo, sí se produce un descenso en la incorporación de estos aminoácidos al ARN ribosómico, debido a una degradación de éste (SHERSTNEV, 1974).

c) Aumento de la actividad ribonucleasa (SHERSTNEV y RAZUMOVA, 1965). Puesto que esta actividad se ha sugerido que está localizada en las membranas celulares, el incremento de la ARNasa asociado a la deficiencia de B indicaría para INDRAVADAN y SESHADRI (1980) una alteración de la permeabilidad de la membrana debido a una degradación del ARN ligado a las membranas.

d) Reducción de la síntesis de ADN, debido a un descenso en la incorporación de timidina. El contenido de ADN sólo recobra su nivel normal si se suministra B poco tiempo después de que aparezca la reducción de la síntesis del ADN (COHEN y ALBERT, 1974). En efecto, raíces deficientes en B, después de 20 horas sin sintetizar ADN, muestran una recuperación de la síntesis a las 9 h de haberseles añadido B.

Sin embargo, la recuperación no siempre es posible. Así, MOORE e HIRSH (1982) transfirieron raíces de girasol a un medio deficiente en B, observando que la incorporación de timidina a los precursores del ADN se mantenía al mismo nivel 3 días después.

e) Desorganización parcial de la estructura de la cromatina (SHERSTNEV, 1974).

BIRNBAUN et al., (1977), trabajando con óvulos de algodón cultivados in vitro en un medio carente de B, observaron una semejanza entre los síntomas provocados por la deficiencia

de B y los que resultaban de la sustitución del uracilo por un análogo, el 6-azauracilo. En ambos casos, los síntomas desaparecían al adicionar uracilo al cultivo. Esto les llevó a pensar que la deficiencia de B podía estar relacionada con una reducción de la actividad de la vía biosintética que conduce a la formación de pirimidina. Sin embargo, usando análogos de las bases de los nucleósidos y observando la respuesta de los cultivos de óvulos, los mismos autores llegaron a la conclusión de que los síntomas de deficiencia de B observados no están relacionados con la biosíntesis de ácidos nucleicos, sino con una inhibición de la síntesis de UDP-glucosa.

Recientemente LOVATT et al., (1981) han comprobado que, en efecto, la acción del B en el metabolismo de los ácidos nucleicos no está relacionada con el metabolismo de la pirimidina, ya que la biosíntesis de novo de este sustrato metabólico no desciende hasta pasadas 30 h de colocar los cultivos en medio exento de B, y la regulación de la vía a través de su inhibición por el producto final y del catabolismo de la pirimidina, es igual tanto en presencia como en ausencia de B.

1.6.12.- Actuación del boro como regulador de actividades enzimáticas.- En general, se considera que el B no forma parte de la molécula de ningún enzima vegetal. Sólo existe una referencia al respecto, la de UEHARA et al., (1974), que encontraron B en la ácido fosfatasa purificada a partir de remolacha azucarera.

Al no actuar como componente de la molécula proteica enzimática, se han propuesto varios mecanismos para explicar el efecto del B sobre las actividades enzimáticas:

- a) Formación de complejos con polihidroxidos que actúan como sustratos o coenzimas.
- b) Inhibición/activación enzimática en virtud de su naturaleza iónica.
- c) Inhibición/activación enzimática a través de mecanismos desconocidos.

1.6.12.1.- Relación B-actividad catalasa.-

Se ha postulado que la catalasa podría ser un enzima relacionado con la cantidad de fenoles en la planta, ya que el H_2O_2 que ella reduce es a su vez el aceptor de electrones en las reacciones catalizadas por peroxidasas. Estas peroxidasas oxidan, entre otras, las sustancias de carácter fenólico.

Para que este esquema fuese válido, tendría que detectarse una actividad catalásica elevada, junto con una acumulación de fenoles, en las plantas deficientes en boro. Sin embargo, la bibliografía existente respecto a la relación entre actividad catalasa y el estado nutritivo de B es escasa y confusa, refiriéndose en ocasiones a experiencias de campo y no de invernadero; así, AL'SHEVSKII (1975), tras aplicar B al suelo, detectó una disminución de la actividad catalásica, mientras que, en aplicaciones foliares, VIKTOROV (1975) observó, por el contrario, un incremento de la actividad de este enzima.

El trabajo más claro y reciente en este campo es el de AGARWALA et al., (1981), que, en plantas de maíz cultivadas con distintos niveles de boro, observaron que la actividad catalasa de los granos de polen disminuía en condiciones de deficiencia de este elemento, haciéndose además, más visible el efecto a medida que avanzaba el proceso de maduración de los granos. Es decir, cuanto más maduros eran los granos de polen más fuerte era la diferencia entre la actividad catalasa del polen procedente de plantas cultivadas con un nivel normal de B y la del procedente de plantas deficientes en B. No se ha estudiado la trascendencia ni el significado de este hecho en la maduración del polen, ni si se trata de un efecto primario o secundario..

1.6.12.2.- Relación B-actividad peroxidasa.-

También en este apartado los resultados obtenidos son contradictorios. Así DUTTA y MacILRAITH (1964) observaron que la deficiencia de B provocaba un descenso de la actividad peroxidásica en girasol, tanto en callus de tallo como en cultivos de tejidos, y DOLYA (1971) consiguió una elevación de dicha actividad, en plántulas de remolacha azucarera, cuando las semillas habían sido previamente tratadas con B.

Sin embargo, otros autores han detectado efectos contrarios. Así, NASON et al., (1954) encontraron que la deficiencia de B daba lugar a un incremento de la actividad peroxidasa en hojas de tomate. Otros autores han obtenido resultados semejantes, como es el caso de PARISH (1969) en trabajos con ápices y raíces de *Vicia faba* y PACHECO et al., (1977) en hojas de *Vigna sinensis*. ALSHEVSKII observó que las aplicaciones de B a cultivos de lúpulo daban lugar a un descenso de la actividad peroxidasa.

Para PARISH (1969), el ácido bórico facilita "in vitro" la unión, mediante enlace iónico, de la peroxidasa soluble a la pared celular y postula que este hecho sería una de las funciones primarias del B en la planta. SHIVE y BARNETT (1973) mostraron que los hipocotilos de plántulas de girasol deficientes en B tenían más peroxidasa ligada covalentemente a las paredes celulares que los de las plantas control. Estos mismos autores estudiaron la actividad peroxidásica en distintas fracciones (paredes celulares intactas, porción insoluble de la pared celular, porción soluble de la pared celular y citoplasma) de hipocotilos de plántulas de girasol tanto en condiciones de deficiencia de B como normales, observando que en todos y cada uno de los casos la actividad aumentaba en condiciones de deficiencia de B. Sin embargo, el hecho de que se produzcan elevaciones de la actividad peroxidásica debido a otras muchas circunstancias, de etiología muy diversa (la presencia de etileno ó la senescencia) les lleva a concluir que este incremento debe ser entendido como un fenómeno general que se produce cuando el metabolismo de la planta sufre alguna alteración y, por tanto, no se debe considerar como el resultado de un efecto singular de la deficiencia de B.

Una conclusión semejante podría extraerse también para el caso de la catalasa, íntimamente ligada a la peroxidasa, como indicábamos en el apartado anterior.

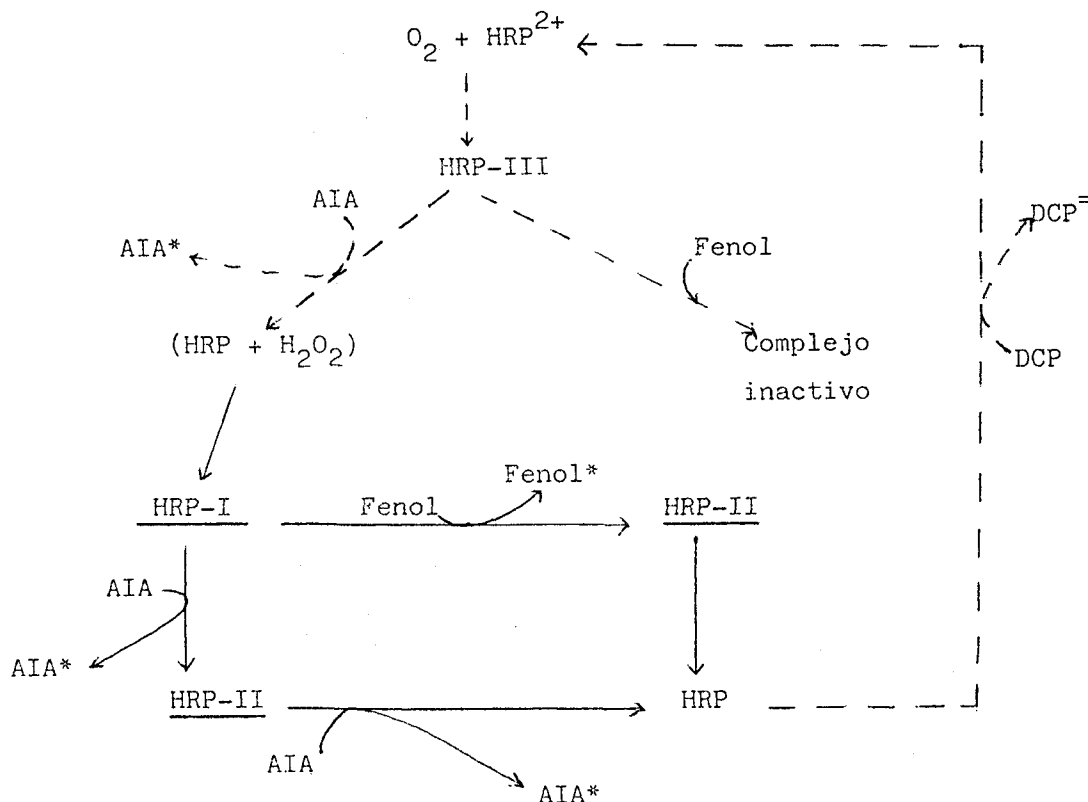
1.6.12.3.- Relación B-actividad ácido indolacético oxidasa.- Existen datos contradictorios acerca de la existencia de una molécula enzimática que oxide específicamente el AIA.

GALSTON y BAKER (1951) proponen que la AIA-oxidasa es en realidad una combinación de dos enzimas: una oxigenasa

que produce peróxido de hidrógeno a partir de un sustrato desconocido, y una peroxidasa que después utiliza el oxígeno del peróxido para oxidar al AIA.

Para KENTEN y MANN (1955) en la oxidación de la auxina no toma parte ningún otro enzima que no sea la peroxidasa. Este mecanismo difiere del anterior en que no se necesita ningún enzima para producir H_2O_2 sino que la peroxidasa, en presencia de Mn^{2+} y fenoles, que sirven como fuente fisiológica de peróxido, oxidaría al AIA. Los resultados obtenidos en 1975 por ZURHAL y MACHACKOVA en trigo les llevó a concluir que el mecanismo de oxidación del AIA y de los compuestos fenólicos por acción de la peroxidasa era el mismo. La peroxidasa no oxidaba al AIA en presencia de H_2O_2 exógeno y ausencia de cofactor, sino que era necesaria la presencia de un cofactor fenólico para la formación de H_2O_2 .

GELINAS (1973) propuso un modelo para la oxidación del AIA por acción de la peroxidasa de rábano (HRP). Este enzima tendría dos centros activos de unión enzima-sustrato: uno para la fijación del H_2O_2 y otra para la del donador de electrones. El modelo es el siguiente:



Los subrayados indican los puntos en los que los inhibidores fenólicos y el AIA pueden competir por el centro activo de HRP al que se une el donador de electrones.

En presencia de H_2O_2 exógeno, la reacción comienza a partir de (HRP + H_2O_2) y las reacciones marcadas con líneas discontinuas son relativamente poco importantes.

En ausencia de H_2O_2 exógeno el O_2 se combina con la peroxidasa.

El signo * indica la presencia de radicales libres.

Sin embargo, no todos los autores coinciden en atribuir la oxidación del ácido indolacético a la peroxidasa y para algunos de ellos existe un enzima específico encargado de llevarlo a cabo. Lo más probable es que algunas especies vegetales posean, en efecto, un enzima específico, mientras que en otras la degradación se lleve a cabo por acción de la peroxidasa, de manera inespecífica.

VALPUESTA (1977) describe el aislamiento y estudio de uno de estos enzimas AIA-oxidasa específico, en hoja de olivo. Este enzima está desprovisto de actividad peroxidásica, pudiéndose afirmar que no se trata de una peroxidasa con actividad AIA-oxidasa, ya que era fuertemente inhibido por la presencia de H_2O_2 a concentraciones catalíticas, mientras que la peroxidasa se activaría de modo acusado por la presencia de este compuesto. La acción negativa del H_2O_2 sobre la AIA-oxidasa pudiera deberse a un ataque no específico de los grupos -SH- de la proteína.

En hojas de cebada, la actividad peroxidasa y la β -AIA-oxidasa se deben a la actuación de un mismo enzima (FRIC, 1971).

En Prunus, una preparación de peroxidasa del tejido floemático presentaba las mismas propiedades catalíticas en la degradación del AIA que una preparación comercial de peroxidasa de rábano (GEBHARDT, K., 1982). Los monofenoles activaban la reacción de modo más efectivo que los cofactores inorgánicos, pero se oxidaban también en el curso de la reacción. La presencia simultánea de H_2O_2 y monofenoles aceleró la actuación de la peroxidasa tanto sobre el AIA como sobre los mismos monofenoles.

Es indiscutible la influencia que las sustancias fenólicas tienen sobre la actividad AIA oxidasa. Sin embargo, el efecto que causan va a depender de factores como: grupo al que pertenezcan estos fenoles; concentración, localización, especie vegetal, etc.

En extractos de raíz de maíz, se necesita la presencia de Mn^{2+} y de 2,4-diclorofenol para que se lleve a cabo la oxidación del ácido indolacético. Aparte de estos requerimientos la resorcina y el pirogalol actúan como activadores, mientras que quinol, pirocatecol, floroglucinol y los ácidos cafeico ferúlico y clorogénico inhiben la actividad. La actuación del ácido p-cumárico depende de la concentración a la que se halle: a bajas concentraciones activa la AIA-oxidasa y cuando su contenido es alto, actúa como inhibidor (PSENAKOVA et al., 1971).

En raíces de lenteja, y en ensayos in vitro, el ácido cafeico actúa como inhibidor y el ácido p-cumárico como activador (TAFURI et al., 1972).

En extractos de raíz de remolacha azucarera, los ácidos cafeico y clorogénico estimulan la actividad AIA-oxidasa a bajas concentraciones (0,10 a 0,55 nmoles/ml) mientras que tienen un efecto opuesto cuando se encuentran en concentraciones elevadas (0,6 a 5,7 nmoles/ml) (IMBERT y WILSON, 1972).

VOLYNETS y PAL'CHENK (1973) proponen una secuencia de fenoles de fuerza inhibidora decreciente sobre la actividad AIA-oxidasa de hojas de altramuz en la que el ácido clorogénico representa un valor máximo y el ácido salicílico el mínimo: ac. clorogénico > ac. cafeico > luteolina > esculetina > kaempferol > ac. cinnámico > ac. ferúlico > ac. salicílico.

Las investigaciones realizadas en hojas de olivo por VALPUESTA (1977) en relación con el papel activador o inhibidor de diferentes ácidos fenólicos frente al enzima puro, demuestran que los monofenoles son activadores siempre que en su cadena lateral no presenten una función no saturada, ya que en este caso su comportamiento es indiferente. Por el contrario, los difenoles se comportan como inhibidores. En el caso de los ácidos cafeico y clorogénico esta inhibición es no competitiva.

Una vez hecha esta introducción acerca de la actividad enzimática AIA-oxidasa y sus distintas modalidades en las diferentes especies, podemos hablar de su posible relación con el Boro.

Ya vimos anteriormente en el apartado 1.6.9., que la deficiencia de B pudiera modificar indirectamente la actividad AIA-oxidasa, a través del aumento del contenido fenólico de la planta, ya que como hemos visto, algunos fenoles actúan como inhibidores del sistema.

PARISH (1968) propuso que la activación de la AIA-oxidasa por el B podría deberse a que este elemento favoreciera la formación de H_2O_2 , que en muchos casos actúa como cofactor del sistema.

En trabajos con ápices de raíz de calabaza, BOHNSACK y ALBERT (1977) obtuvieron un aumento de la actividad AIA-oxidasa a las 24 h de haber transferido de los ápices a una solución carente de B (-B). Si a las 12 h de permanencia en la solución -B se les trasvasaba a una solución +B la actividad descendía hasta alcanzar niveles comparables a los de las plantas que habían permanecido todo el tiempo en solución +B.

Los efectos observados por estos mismos autores tras la aplicación de AIA a plantas cultivadas en medio +B, son los mismos que muestran los ápices transferidos a una solución -B. Su conclusión fué que los síntomas de deficiencia de B pueden resultar de la presencia de niveles endógenos supraóptimos de AIA, que a su vez, inducirían un incremento de la actividad AIA-oxidasa.

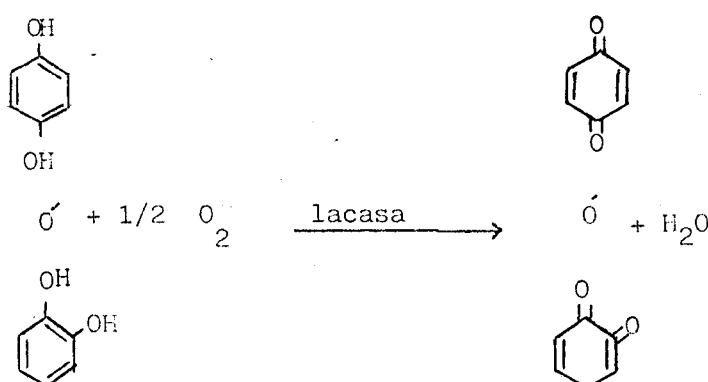
HIRSCH et al., (1982) en trabajos con raíces de girasol cultivadas en presencia y en ausencia de B encuentran una similitud entre los cambios morfológicos provocados por la deficiencia de B y los debidos a la presencia de niveles endógenos supraóptimos de AIA. Sin embargo, los niveles endógenos de AIA en raíces normales y raíces -B eran similares, y por tanto los síntomas tempranos de deficiencia de B no estaban correlacionados con altos niveles de AIA endógeno.

Para estos autores, la presencia de niveles altos de auxina endógena en el girasol es una respuesta secundaria,

y concluyen que la deficiencia de B no actúa primariamente sobre los niveles de auxina sino que es en las alteraciones específicas de las membranas celulares, y los receptores hormonales asociados a ellas, donde se debe buscar el papel primario del B en las plantas. La modificación de la relación auxina-receptor alteraría la respuesta hormonal, sin afectar el nivel de la hormona.

1.6.12.4.- Relación B-actividad polifenol oxidasa.- En general, el término polifenol oxidasa incluye dos categorías de enzimas (MAYER y HAREL, 1979):

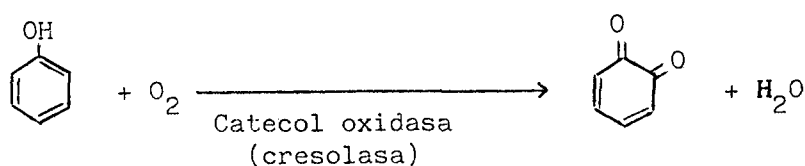
a) Lacasa ó p-difenol: oxígeno oxidorreductasa (E.C. 1.10.3.2). Todas las lacasas descritas catalizan la reacción:



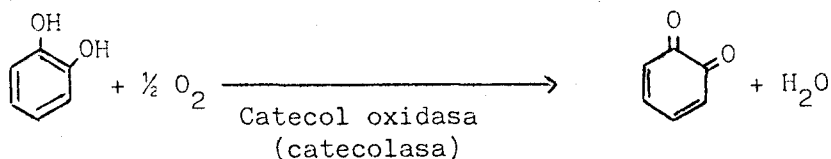
Como vemos, la actividad lacasa actúa también sobre o-difenoles.

b) Catecol oxidasa u o-difenol oxígeno oxidorreductasa (E.C. 1.10.3.1): es un enzima que contiene cobre y cataliza dos reacciones diferentes:

(1) Actividad Cresolasa. cataliza la inserción de un oxígeno en posición "orto" respecto a un grupo hidroxilo preexistente. Generalmente, esta inserción va seguida de una oxidación del difenol a la correspondiente quinona.



(2) Actividad Catecolasa. Cataliza la oxidación, con pérdida de hidrógeno, de un o-difenol.



Mientras que algunos autores sugieren que ambas funciones, catecolasa y cresolasa, están catalizadas por un único centro activo, otros implican la participación de dos centros ya sea en una misma molécula, ya sea en moléculas diferentes.

Muchas preparaciones de catecol oxidasa de plantas carecen de actividad cresolasa, aunque es difícil dilucidar si es porque el enzima de estas plantas no posee tal actividad, o se debe a que no está presente en la forma nativa, ya que es muy conocida la labilidad de la actividad cresolasa, que parece deberse a un cambio en la estructura de la proteína durante su purificación.

A raíz del descubrimiento de las diferentes actividades, la nomenclatura ha sido revisada, de modo que catecolasa y lacasa se consideran como un único enzima con dos actividades diferentes, habiéndosele dado el nombre de monofenol monooxigenasa (EC. 1.14.18.1), aunque en la bibliografía se conserva el de polifenol oxidasa (PPO) que es el que utilizaremos nosotros.

Como se puede observar, si bien tanto lacasa como catecol oxidasa pueden oxidar o-difenoles, lo que distingue la actividad lacasa es su capacidad para oxidar, además, p-difenoles.

JUDEL (1975) aisló la polifenol oxidasa (PPO) de girasol a partir de los cotiledones. El enzima purificado, a juzgar por la especificidad de sustrato, se trataba de una o-difenol-oxidasa, ya que carecía de capacidad para oxidar tanto monofenoles como meta o para-difenoles. Esto indicaría que la actividad lacasa no está presente en el girasol y que en esta especie hay tan sólo una fenoloxidasa, (catecol oxidasa), con actividad catecolasa pero no cresolasa.

Antes de hablar de la relación B-catecol oxidasa, mencionaremos algunas propiedades del enzima.

a) Localización: Contrariamente a lo que ocurre con las lacasas, las catecol-oxidasas no parecen estar restringidas a ninguna parte especial de la planta, ya que su presencia ha sido detectada en una gran variedad de órganos y tejidos vegetales.

El nivel de las catecol oxidasas cambia a menudo de modo notable durante el desarrollo de la planta y se puede ver considerablemente afectado por las condiciones de crecimiento. En el girasol, y en condiciones normales de crecimiento, la actividad polifenol oxidasa alcanza un valor máximo durante el período de crecimiento rápido y decrece continuamente con la edad. Por lo que se refiere a las distintas partes de la planta, el máximo de actividad se encontró en los cotiledones, para ir disminuyendo a medida que se eleva el punto de inserción de la hoja (JUDEL, 1972).

Salvo algunos casos de hongos, la catecol oxidasa es un enzima intracelular. Se ha demostrado la presencia del enzima en gran variedad de fracciones celulares y también en organelas, donde puede estar fuertemente unida a las membranas, y en la fracción soluble de los homogenados.

Inicialmente se puso en duda la unión de la catecol oxidasa a las membranas celulares, explicándose el hecho de su aparente ligamiento en base a alteraciones provocadas por la presencia de fenoles en el medio de extracción (LI y BONNER, 1947). Sin embargo, posteriormente el peso de la evidencia aportada por autores como KATO et al., (1976), que han demostrado que al menos parte de la actividad permanece localizada en porciones particuladas incluso cuando se han eliminado los fenoles del medio, permite confirmar la amplia presencia de catecol oxidasas unidas a membranas, concretamente en las laminillas del cloroplasto, así como en las mitocondrias e incluso peroxisomas y microsomas.

Al igual que ocurría con la actividad, también la fuerza de la unión de las catecol-oxidasas a las membranas parece variar con el tipo de tejido y con la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta.

Se ha descrito la existencia de una compartimentación de los sustratos fenólicos del enzima, tanto entre células (MACE 1963) como dentro de una misma célula (ROBERTS, 1952). La relación de esta compartimentación de sustratos con la localización del enzima no se ha explicado.

b) Inhibición: por lo que respecta a la inhibición de la actividad catecol oxidasa, existen principalmente dos tipos de inhibidores:

- Aquellos que interaccionan con el cobre del enzima. Algunos de ellos actúan de modo competitivo respecto al oxígeno y de modo no competitivo respecto al sustrato fenólico.

- Aquellos que interaccionan con el lugar de unión del sustrato fenólico. Algunos de ellos actúan de modo inverso a como lo hacen los del grupo anterior, es decir, competitivamente respecto al sustrato fenólico y de modo no competitivo respecto al oxígeno.

De especial interés para nuestro trabajo son las inhibiciones provocadas por cisteína, polivinilpirrolidona (PVP) y borato.

Generalmente se acepta que la cisteína actúa a través del grupo -SH de su molécula y que reacciona con el cobre del enzima (SUZUKI, 1959).

La PVP no sólo adsorbe los fenoles (se utiliza ampliamente para proteger los enzimas vegetales de una posible inactivación por los fenoles y sus productos de oxidación) sino que también actúa como inhibidor de la actividad catecol oxidasa. HULME et al., (1964) sugirieron que, inhibía el enzima al unirse al complejo catecol oxidasa-sustrato, probablemente a la parte fenólica.

WESER (1968) describió una inhibición de la actividad catecol-oxidasa por borato.

c) Latencia y activación: KENTEN (1958), en sus trabajos con Vicia faba fué el primer autor que estudió los fenómenos de latencia y activación de las catecol oxidasas vegetales. La activación se consiguió a través de una breve exposición a ácidos (pH 3-3,5) o álcalis (pH 11,5) o por incubación con sulfato amónico a pH



5, interpretándose que se había eliminado una proteína inhibidora que se suponía estaba ligada al enzima. La activación conseguida por acción de detergentes aniónicos se explicó en base a la unión de estos compuestos a grupos catiónicos del enzima, lo que daba igualmente como resultado una disociación del complejo enzima-inhibidor.

Desde entonces se han sugerido otras explicaciones diferentes al problema de la latencia y activación del enzima. Así, SWAN et al., interpretan los efectos activadores de los detergentes, ácidos y álcalis o urea como resultado de cambios conformacionales más que de fenómenos de disociación o agregación. SATO y HASEGAWA (1976) explican la latencia de la catecol oxidasa de cloroplastos de espinaca, en base a la combinación del enzima con un inhibidor difusible.

En cloroplastos de remolacha azucarera, se puede conseguir una activación de la catecol oxidasa ligada a membranas por acción de detergentes y sin que tenga lugar una solubilización del enzima (MAYER, 1965). (MAYER, 1966) llevó a cabo una activación que incluía solubilización a través de agua saturada con butanol, y proteólisis parcial con tripsina o carboxipeptidasa. Sin embargo, para TOLBERT (1973) la activación producida por tratamiento con tripsina no se debía a la acción proteolítica de este enzima, ya que también tenía lugar con preparaciones de tripsina desnaturalizada.

En algunos casos, como en tejidos de remolacha azucarera incubados, el aumento de actividad catecol oxidasa observado no se produce en presencia de inhibidores de la síntesis proteica, por lo que se puede pensar que esta elevación de la actividad se debe a una síntesis "de novo" del enzima (HYODO y URITANI, 1966).

c) Función: Por lo que respecta a la función de las catecol oxidasas en las plantas superiores resumiremos los papeles fisiológicos que se han asignado a estos enzimas:

- Síntesis de o-difenoles. La sugerencia de que las catecol oxidasas pudieran intervenir en la síntesis de estos compuestos se basa en la capacidad que muchas de ellas presentan para oxidar monofenoles a las correspondientes o-diquinonas (act. cresolasa).

- Transporte de electrones en la respiración vegetal insensible al cianuro. Los difenoles serían oxidados a quinonas y en ese proceso se produciría la reducción no enzimática de algún compuesto celular, un nucleótido por ejemplo. RICH y BONNER (1977) han demostrado que los ácidos hidroxánicos sustituidos inhiben fuertemente la catecol oxidasa de hongos y se sabe que estos ácidos son inhibidores de la respiración insensible al cianuro, o vía alternativa de transferencia de electrones, por lo que la catecol oxidasa podría tener alguna función en esta vía, al menos en ciertas fracciones celulares tales como las mitocondrias.

- Regulación del crecimiento vegetal. GORDON y PALEG (1961) demostraron que las quinonas pueden interaccionar con el triptófano para formar en última instancia AIA, aunque sugieren que la reacción se produce tan sólo en tejidos lesionados. También se ha demostrado que, en extractos vegetales, la catecol oxidasa puede catalizar la destrucción de la auxina (BRIGGS y RAY, 1956).

Sin embargo, parece que la influencia de la catecol oxidasa a la hora de determinar la concentración de auxina "in vivo", es bastante limitada, cuando no dudosa.

- Oxidación de fenoles. Las sustancias fenólicas, que actúan como sustratos de la catecol oxidasa, están separadas del enzima bien sea en el interior de células especiales, bien sea en la vacuola. Es una observación general, que la actividad del enzima y la cantidad de posibles sustratos no cambia conjuntamente. A menudo una aumenta, y la otra desciende. Resulta obvio, por tanto, que la catecol oxidasa no está involucrada en la oxidación del total de compuestos fenólicos presentes en los tejidos intactos y es posible que en estos últimos, el sustrato normal sea tan sólo una pequeña fracción de los fenoles totales.

Por el momento, y con los procedimientos analíticos actuales, que tan sólo nos dan idea del contenido total de fenoles sin que se pueda distinguir la localización subcelular, no es posible comprobar la veracidad de la hipótesis expuesta.

- Empardecimiento de los tejidos vegetales tras lesiones, fundamentalmente de origen mecánico. Tras lesiones de este tipo

desaparece la separación entre fenoles y catecol oxidasa, de modo que cierta cantidad de enzima que permanecía en estado latente se ve activada. Quizás esta elevación de la catecol oxidasa puede conducir a una curación de las heridas o bien prevenir o reducir infecciones, fundamentalmente de hongos.

Una vez que hemos tratado los aspectos generales de la polifenol oxidasa (PPO), que, recordemos, en el caso del girasol sólo actúa sobre los o-difenoles, es decir, sólo presenta actividad catecolasa pero no lacasa ni cresolasa, podemos pasar a estudiar la influencia del B sobre esta actividad enzimática.

Contrariamente a lo que ocurre con otras actividades enzimáticas ya estudiadas, los datos acerca del efecto del B sobre la PPO, parecen estar de acuerdo en asignar al B un papel depresor de esta actividad.

GOPAL (1970) comunicó un descenso temporal de la actividad PPO como consecuencia de un exceso de B. Esto sería un efecto indirecto debido a un descenso del nivel de Cu asociado a la toxicidad de B, y que lógicamente tendría influencia sobre aquellos enzimas que, como la PPO, contienen Cu en su molécula.

ALSHEVSKII et al., (1975) en trabajos con hojas de lúpulo, obtuvieron una reducción de la actividad PPO tras aplicar B a los cultivos.

En plantas de *Vigna sinensis* cultivadas en medio B- (sin B) y B+(con B) la actividad PPO de las hojas es mayor en aquellas plantas cultivadas en medio B- (PACHECO et al., 1977).

El grupo de SHKOL'NIK (1981) ha observado, que en condiciones de deficiencia de B la actividad PPO aumenta en plantas como girasol, tomate, guisante y maíz que son muy sensibles a la falta de B, pero no en trigo y sorgo. De estos resultados concluyen que la muerte de las plantas más sensibles frente a deficiencias de B está relacionada con la acumulación de productos de la oxidación de fenoles, formados como resultado de la elevación de la actividad PPO.

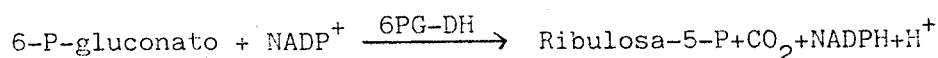
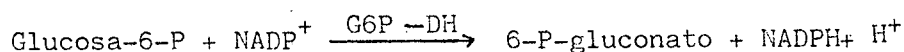
En el sorgo, también sensible al B, la muerte de la planta no puede explicarse del mismo modo, ya que no se observa

una actividad PPO elevada y podría ser el resultado de la acumulación de inhibidores del crecimiento, de carácter fenólico o no.

La resistencia del trigo a la deficiencia de B, resultaría de la baja actividad PPO observada y del bajo contenido en inhibidores fenólicos del crecimiento que esta planta presenta en tales condiciones.

NASON et al., (1952) a partir de trabajos in vitro, concluyeron que el B puede formar complejos con los sustratos de la PPO, reduciendo de este modo su actividad. Sin embargo, consideraron que la elevación de la actividad PPO no es un síntoma específico de la deficiencia de B, ya que carencias de Zn, Fe, Mn y Mo, conducen a un resultado similar.

1.6.12.5.- Relación B-actividades glucosa-6-P-deshidrogenasa y 6-P-gluconato-deshidrogenasa.- La glucosa-6-P-deshidrogenasa (G6P-DH) y la 6-P-gluconato deshidrogenasa (6PG-DH)) son los dos primeros enzimas del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (OPP), y llevan a cabo las siguientes reacciones:



Este ciclo, tradicionalmente considerado como exclusivamente citoplasmático, se ha comprobado que también está presente, completo, en el cloroplasto.

En el citoplasma, el OPP proporciona la eritrosa-4-fosfato que se utilizará en la vía del ácido shikímico, que es la fuente de fenoles en las células vegetales. Esta vía comienza con el fosfoenolpiruvato procedente de la glucólisis y la eritrosa-4-fosfato del OPP, y conduce en última instancia a la formación de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina), AIA, ácidos fenólicos y, a través de su oxidación, a lignina.

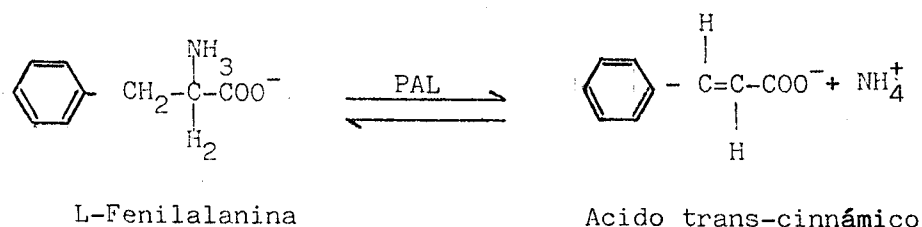
Si se comparan ambas enzimas en sus versiones cloroplastidial y citoplasmática se observa que presentan características muy similares, si no idénticas (ANDERSON y DUGGAN, 1976). La G-6P-DH cloroplastidial se ha detectado en 2 fracciones de cloroplastos de guisante: estromática y ligada a membranas tilacoidales (BEN-BASSAT y ANDERSON, 1981). También se ha comprobado que esta G6P-DH cloroplastidial es inactivada por acción de la luz (ANDERSON, 1979), y que esta inactivación va ligada a la liberación del enzima de las membranas tilacoidales. En la oscuridad, el enzima vuelve a unirse de nuevo a las membranas tilacoidales y recupera su actividad. No se sabe si este comportamiento de ligamiento a membranas puede tener un paralelo en el enzima citoplasmático.

En cuanto a la posible relación del B con estos enzimas, REED (1974) fué el primero en detectar una acumulación de fenoles en distintas dicotiledóneas durante la deficiencia de B. La explicación, según LEE y ARONOFF (1967) (como ya vimos en el apartado 1.6.8) estaría en que el B ejercería un importante papel en el reparto de sustrato entre la vía glucolítica y el OPP, produciendo como resultado final una mayor o menor cantidad de compuestos fenólicos en las células. El modo de actuación del B consistiría en la formación de un complejo 6-P-gluconato-borato que inhibiría la actividad de la 6PG-DH. En ausencia de B, y por tanto del complejo, el enzima operaría a mayor velocidad, dando como resultado la acumulación de compuestos fenólicos. Por otra parte, muchos de los fenoles formarían también compuestos con el B, disminuyendo aún más de este modo, el borato disponible para la formación del complejo con el 6-P-gluconato. En efecto, AL-QUADAN et al., (1981) asignan a los ácidos ferúlico, p-cumárico y cafeico una acción inhibidora sobre la 6PG-DH que depende de la concentración de ácido 6-P-glucónico efecto que se hace más patente cuando se usan niveles bajos de este sustrato.

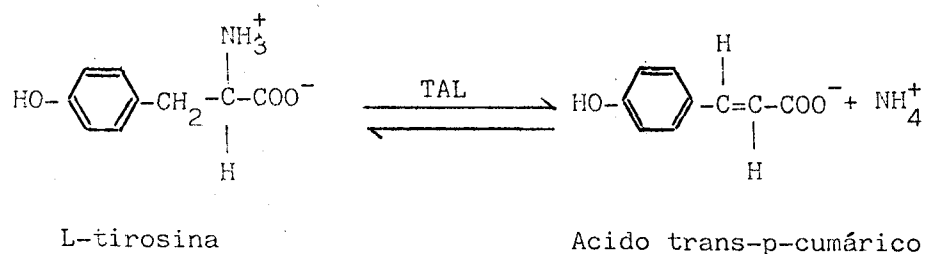
La 6-P-gluconato deshidrogenasa no es el único enzima del OPP que ve afectada su actividad por la ausencia de B. SHKOL'NIK y IL'INSKAYA describieron en 1975 una activación del enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa asociada a deficiencia de B, que conducía a una aceleración de la vía oxidativa de las pentosas fosfato y

finalmente a una acumulación de fenoles, algunos de los cuales actuaban como inhibidores del crecimiento. Según experiencias llevadas a cabo por ALVAREZ-TINAUT y DONAIRE, la incubación de extractos crudos de hoja de girasol con B inhiben "in vitro", la actividad glucosa-6-P-deshidrogenasa de estos extractos.

1.6.12.6.- Relación B-actividad fenilalanina amonio-liasa.- Fenilalanina amonio-liasa (PAL) es el enzima que cataliza el paso de L-fenilalanina a ácido trans-cinnámico.



En muchas plantas, especialmente céspedes y ciertos hongos, y también en girasol (RUIS y KINDL, 1971), este enzima puede utilizar la L-tirosina como sustrato para dar ácido trans-p-cumárico (actividad tirosina-amonio-liasa, TAL).



La actividad PAL parece estar restringida al reino vegetal, ya que no se ha encontrado en animales. Su importancia radica en la posición clave que ocupa en el metabolismo fenólico, ya que desvía el aminoácido fenilalanina de la síntesis de proteínas hacia la de compuestos fenólicos, a través de la vía del ácido shikímico.

Por lo que respecta a la localización celular del enzima, además de en el citoplasma se ha demostrado su presencia en plastidios, mitocondrias y microcuerpos celulares. En el caso concreto del girasol, las fracciones subcelulares en las que se

ha encontrado actividad PAL son peroxisomas (RUIS y KINDL, 1971) y membranas tilacoidales (LÖFFELHARDT et al., 1973). Según HANSON y HAVIR (1981), en el proceso de ruptura de las células y/o de los orgánulos celulares, aunque una porción de la actividad PAL permanece unida a las microsomas y a los tilacoides, la mayor parte se libera; si bien se desconoce la naturaleza de la asociación, es posible que antes de la ruptura la mayoría del "enzima soluble" estuviera en realidad unido a las membranas.

Factores que controlan la síntesis de PAL (Zucker, 1972).- En plántulas de muchas especies, la síntesis de PAL está controlada por el fitocromo, pero en otras puede sin embargo, no depender de la luz o bien presentar una respuesta HIR con luz azul. En el primer caso, es decir, cuando existe un control por parte del fitocromo, éste no tiene lugar en todos los tejidos de la plántula. Así, en raíces, la síntesis de PAL no está controlada por este fotorreceptor. Por el momento, el único tejido no procedente de plántula en el que se ha observado una regulación de la síntesis de PAL a través del fitocromo, es el de tubérculo de "alcachofa de jerusalén".

Contrariamente a lo que ocurre en las plántulas etioladas, la síntesis de PAL en los tejidos verdes está a menudo controlada por reacciones fotosintéticas. Otras radiaciones no luminosas, que pueden inducir la síntesis de PAL son la luz ultravioleta y las radiaciones gamma.

Se ha demostrado que hormonas tales como giberelinas, ác. abscísico, etileno y kinetina, influyen en la inducción del PAL. Esto ha de estar en relación con el hecho de que, en algunos sistemas sensibles a la luz, se requiera una excisión del tejido para que tenga lugar la inducción.

Relación entre inducción de PAL y biosíntesis fenólica.- En muchos sistemas de inducción, se puede observar la existencia de una correlación entre síntesis de PAL y aparición en el tejido de compuestos fenólicos cuyo esqueleto carbonado deriva total o parcialmente de la fenilalanina. La correlación entre síntesis

de PAL y fitoalexinas isoflavonoides en legumbres proporcionan una interesante relación funcional. Las fitoalexinas son sustancias de origen vegetal y generalmente de naturaleza fenólica que tienen acción fungicida y son sintetizadas por la planta en respuesta a una infección fúngica. La inducción de la síntesis de PAL y la consiguiente lignificación de las superficies fracturadas en tubérculos de patata (por efecto de la oxidación y polimerización de los fenoles sintetizados) es también otro mecanismo de defensa.

A pesar de lo dicho anteriormente, no siempre se puede establecer una correlación entre inducción de PAL y biosíntesis de fenoles. Así, en plántulas de pepinillo, la inducción de la síntesis del enzima que se produce en respuesta a bajas temperaturas, no conduce a un aumento paralelo de la producción de fenoles debido quizás a que la temperatura limite las etapas subsiguientes de la biosíntesis fenólica. En tejido de eucalipto se da la situación inversa: existen niveles elevados de compuestos fenólicos coincidiendo con un bajo nivel de actividad PAL. Estos hechos han conducido a la búsqueda de vías alternativas de biosíntesis de fenoles en las que no intervenga el PAL.

Estudio del proceso de inducción.- El proceso de inducción incluye al menos dos de las tres etapas que a continuación mencionamos:

- a) Síntesis de PAL.
- b) Regulación de la síntesis.
- c) Inactivación del enzima.

Mientras que los dos primeros procesos parecen tener lugar en todos los fenómenos de inducción de PAL estudiados, la inactivación no siempre ocurre.

a) Síntesis de PAL. En las plantas superiores, no se han identificado las sustancias que inducen la síntesis de PAL, aunque se han encontrado ciertos compuestos estimuladores en cotiledones de plántulas. En hongos, la síntesis de PAL puede ser inducida por la presencia de su sustrato, L-fenilalanina.

La existencia de un período de retardo de varias horas entre la inducción de la síntesis y la aparición de moléculas del enzima, la sensibilidad que algunos sistemas de inducción muestran frente a la actinomicina D, y la superinducción obtenida con "agentes intercalantes", sugieren que la inducción requiere la síntesis de ARNm. Este hecho, junto con la posible existencia de un operón para la biosíntesis fenólica está en consonancia con la teoría de que el fitocromo actuaría a nivel de la activación genética en la inducción del PAL.

b) Represión de la síntesis de PAL.- Puesto que el ácido cinnámico y los productos fenólicos que de él derivan inhiben la síntesis de PAL, se ha propuesto que, al acumularse en los tejidos como consecuencia de la inducción del enzima, actuarían como represores naturales de la síntesis. Así, en plántulas de pepinillo, cuando la temperatura de inducción baja de 32 a 12°C, descende el grado de síntesis de PAL a la vez que aumenta el tiempo necesario para que la actividad alcance su valor máximo. En estas condiciones, disminuye la acumulación de fenoles. Esta relación inversa entre la duración del período de síntesis de PAL que sigue a la inducción y el grado de acumulación de los fenoles en los tejidos es la que lleva a la conclusión de que estas sustancias, cuando alcanzan altas concentraciones, pueden servir como represores de la síntesis de PAL.

c) Inactivación de PAL.- El rápido descenso de la actividad PAL, que se produce en algunos tejidos en la etapa final del proceso de inducción, y que puede ser también provocado mediante cambios en las condiciones de iluminación (usualmente mediante transferencia del tejido a la oscuridad), hace pensar que la inactivación forma parte del proceso de inducción.

La inactivación tiene lugar cuando se ha producido un elevado nivel de PAL en el tejido y se cree que implica la inducción de la síntesis de una proteína inactivadora, ya que no se produce en presencia de cicloheximida, inhibidor de la proteínosíntesis. CREASY, 1976 ha extraído a partir de hojas de girasol un sistema inactivador de la fenilalanina amonio lasa (SI-PAL), que a su vez se ve inhibido por la presencia de D-fenilalanina. El tejido

fresco contiene un bajo nivel de SI-PAL. pero el tratamiento con sacarosa e iluminación hace que aumente, y que se mantenga tras el tratamiento con agua en la oscuridad.

Los únicos datos de que disponemos acerca de la relación entre actividad PAL y B son los que derivan de los trabajos del equipo del Dr. SHKOL'NIK (1980). Según estos autores en las plantas, que, como calabaza, haba y maíz, son muy sensibles a la falta de B, se produce en condiciones de deficiencia de este elemento una elevación de la actividad fenilalanina amonio-liasa, que se hace más patente, en el caso concreto de la calabaza, a medida que se agrava la deficiencia de B. Por el contrario, en trigo, y avena, plantas poco sensibles a la nutrición de B, la actividad PAL no se ve modificada por el déficit de este elemento.

En los casos en los que se produce un aumento de la actividad PAL como consecuencia de la falta de B, se elevaría el contenido total de fenoles. El mismo equipo, encontró un comportamiento parecido al descrito para PAL en el caso de la glucosa -6-P-deshidrogenasa, enzima clave de la vía de las pentosas fosfato (Aptdo., 1.6.12.5.). Por tanto, y según SHKOL'NIK y su equipo, el incremento del contenido fenólico producido en condiciones de deficiencia de B sería consecuencia tanto de la estimulación del ciclo oxidativo de las pentosas fosfatos (OPP), como de un aumento de la actividad PAL.

1.6.12.7.- Biosíntesis de ent-kaureno, precursor de giberelinas, a partir de ácido mevalónico.- Ya hemos hablado anteriormente de la relación del B con el metabolismo de las giberelinas. El ent-kaureno es un intermediario clave de la biosíntesis de estas hormonas, y parece existir una buena correlación entre la capacidad de síntesis de ent-kaureno "in vitro" y los niveles de giberelinas endógenos "in vivo" (BARENDSE, 1980). Es por eso que consideramos interesante el estudio simultáneo de la síntesis de ent-kaureno a partir de ácido mevalónico y la cantidad de giberelinas presentes en plantas de girasol sometidas a condiciones de deficiencia o toxicidad de B.

La biosíntesis de ent-kaureno a partir de ^{14}C -mevalonato se ha demostrado en extractos de una gran variedad de tejidos

vegetales, como son el endospermo de *Marah macrocarpus* (GRAEBE et al., 1965) y *Marah oreganus* (COOLBAUGH y HAMILTON, 1976); frutos inmaduros, semillas, ápices de tallo y cotiledones de *Pisum sativum* (ANDERSON y MOORE, 1967); semillas en formación, ápices de tallo y hojas de *Pharbitis nil* (BARENDSE y MOORE, 1979) etc. Finalmente, SHEN-MILLER y WEST (1982) han comprobado la existencia de actividad kaureno-sintetasa en extractos crudos de plántulas de girasol cultivadas en la oscuridad.

Existen dos actividades catalíticas asociadas con la kaureno-sintetasa:

Actividad A: Ciclación del geranil-geranil-pirofosfato - (ver Fig. 2).

Actividad B: Ciclación del copalil-pirofosfato a entkaureno.

Los extractos de girasol antes mencionados presentaban una buena actividad B mientras que tenían una muy baja o incluso nula actividad AB. Este último hecho pudiera explicarse por la presencia de factores inhibidores en el extracto crudo, ya que éste actúa como potente inhibidor de la actividad AB kaureno sintetasa de endospermo de *Marah macrocarpus*. Asimismo, parece existir un factor(es) dializable(s) en el extracto crudo de girasol que dificulta su propia actividad B.

A continuación mostramos el esquema de la biosíntesis de giberelinas dado por el Dr. BARENDSE (1980). (Fig. 2).

COMUN A AMBAS VIAS

VIA EXTRACLOROPLASTIDIAL

VIA CLOROPLASTIDIAL

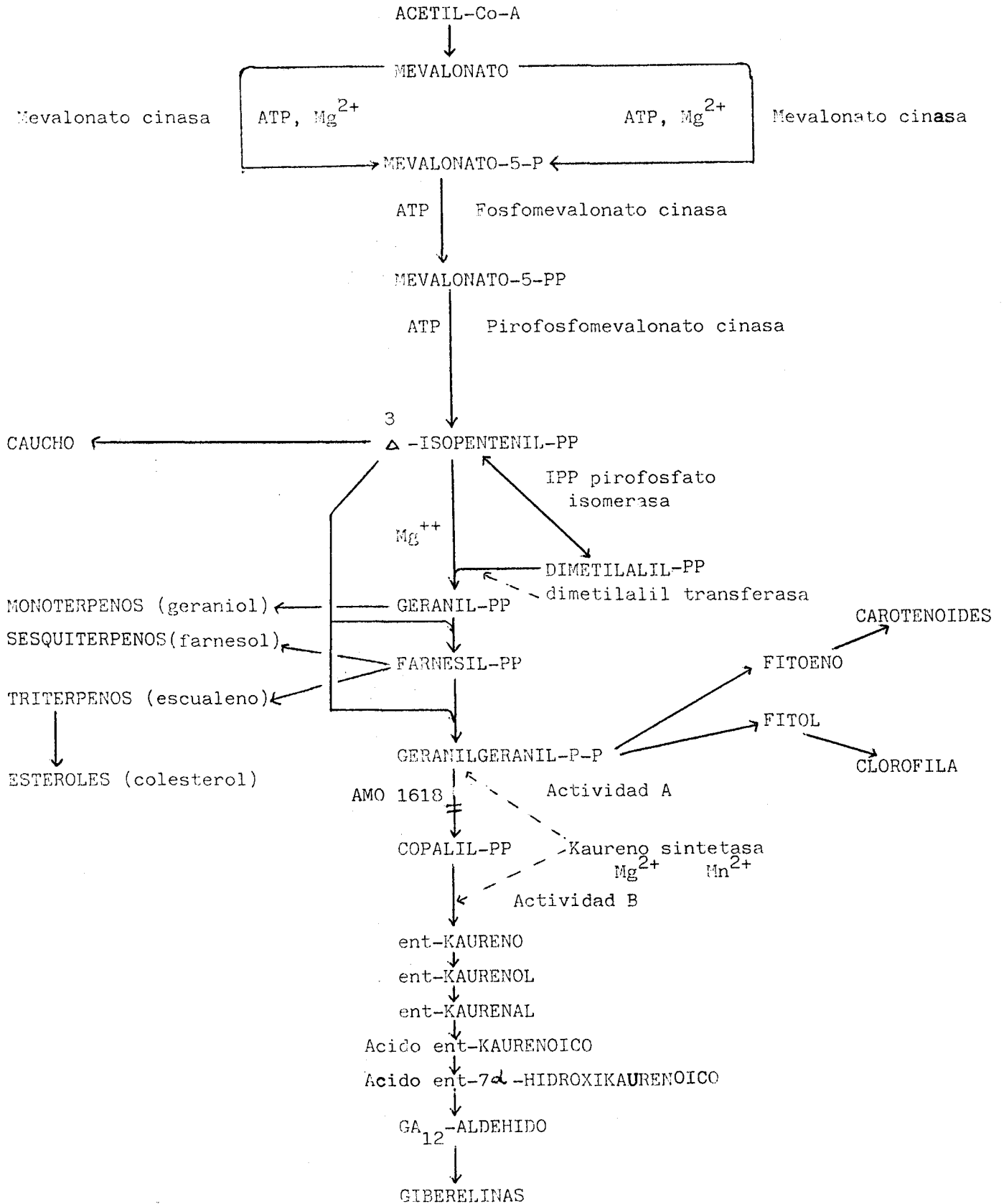


Fig. 2.- Biosíntesis de giberelinas a partir de ácido mevalónico (BARENDSE, 1980).

1.6.12.8.- Resumen final del papel del B en las actividades enzimáticas.- Como resumen de lo ya expuesto acerca del posible papel del B como modulador de actividad enzimática, presentamos a continuación un esquema de las vías metabólicas en las que se ha descrito una intervención de este elemento (Fig. 3).

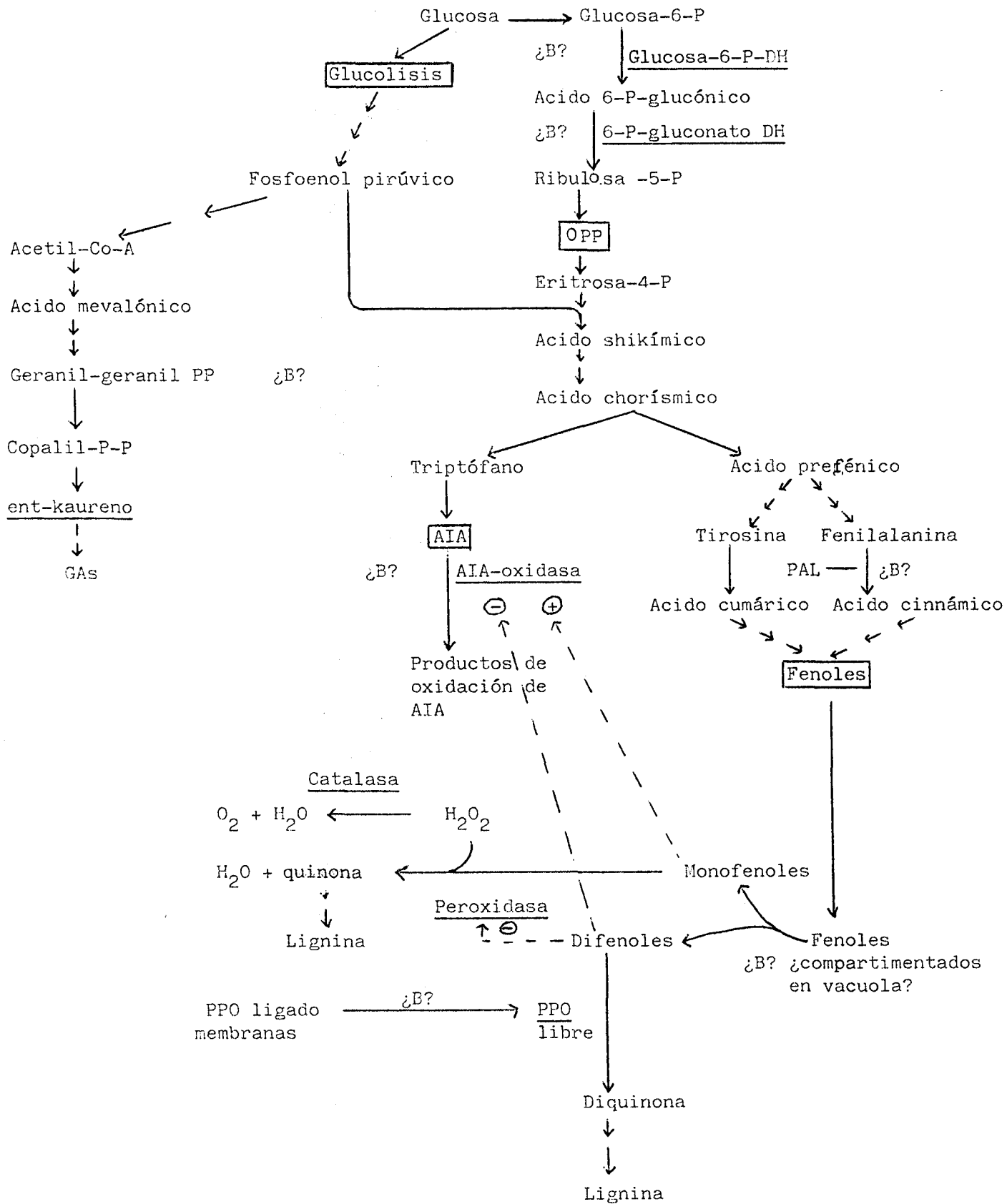


Fig. 3.- Pasos metabólicos en los que se ha descrito una posible intervención del B.

1.6.13.- Actuación de B sobre la funcionalidad de las membranas vegetales.- El papel de las membranas biológicas como barrera física de separación inter e intracelular, al tiempo que su íntima relación con procesos vitales de capital importancia (control y transporte de nutrientes, cadena respiratoria, fotosíntesis), ha determinado un gran interés hacia el estudio de los procesos de formación de las mismas a partir de sus constituyentes proteicos y lipídicos, así como de su funcionalidad. En relación con el B, TANADA (1983) ha observado la formación de complejos entre el borato y componentes de membranas, a través de los cuales el B influiría de manera decisiva en la regulación de reacciones enzimáticas, bien por ligamiento o liberación de enzimas o sustratos, bien por compartimentación de los mismos.

PARR y LOUGHMAN (1983) en su reciente revisión sobre el B y la funcionalidad de las membranas en las plantas, resumen las posibles interacciones en los siguientes aspectos:

- a) Transporte de iones.
- b) Interacciones con auxinas.
- c) Interacciones con fenoles.
- d) Configuración de las membranas.

a) Transporte de iones.- Las medidas del potencial electroquímico de las membranas apoyan la idea de que el B juega un papel en el transporte de membrana. Así, el borato provoca en *Nitella symcarpa* una hiperpolarización del plasmalema en presencia de K^+ y una despolarización en presencia de Na^+ , lo que sugiere que el B altera la permeabilidad selectiva al Na^+/K^+ en relación con el Cl^- , sin alterar la discriminación entre los cationes (VOROB'EV y PELKHANOV 1973). En el mismo sentido apuntan las experiencias de TANADA (1974), quien comprobó que la adición de ácido bórico a hipocotilos excindidos de alubias deficientes en B alteraba el campo bioeléctrico generado por la luz roja.

El trabajo de ROBERTSON y LOUGHMAN (1974) demostró que la reducción de la capacidad de absorción de fosfato observada en los primeros estadios de la deficiencia de B en habas silvestres (cuando aún no habían aparecido cambios ni morfológicos ni ultraestructurales), se podía revertir casi completamente al adicionar ác. bórico durante una hora.

POLLARD et al., (1977) ampliaron este trabajo al estudiar la absorción de Rb^+ , Cl^- y $H_2PO_4^-$ por raíces de maíz, girasol y haba silvestre cultivadas en soluciones con y sin B; observaron que en todos los casos, la reducción de la capacidad de absorción de iones, (que oscilaba entre el 50 y el 70% de las plantas normales) era el primer síntoma detectable de la deficiencia de B. En este mismo trabajo comprobaron además un efecto sorprendente; aquellas plantas que habían crecido con suficiente B, todavía respondían a la presencia de B durante el período de absorción de iones, lo que implicaba que las plantas consideradas como normales en cuanto a la nutrición de B, estaban operando tan sólo a 2/3 de su potencial máximo de absorción de iones a menos que el B estuviera presente durante dicha absorción.

Finalmente destacaremos que el B estimula la absorción tanto de moléculas con carga eléctrica (auxinas) como sin ella (algunos azúcares) (COKE y WHITTINGTON, 1968; TURNOWSKA-STARCK, 1960).

b) **Interacciones con las auxinas.**- Puesto que se sabe que tanto auxinas como fenoles afectan al transporte de membrana, sería posible que los efectos de la deficiencia de B sobre el transporte de iones se debiera al aumento de estos compuestos provocado por la deficiencia de B, como hemos discutido en apartados anteriores.

Las auxinas dan lugar a un incremento de la absorción de iones en los tejidos del tallo, mientras que en el caso de las raíces, tanto auxinas como fenoles producen una inhibición. Sin embargo, en el corto espacio de tiempo necesario para que aparezca la reducción del transporte de iones en raíces con deficiencia de B, no existen pruebas de que se produzca una elevación de la concentración de auxinas y/o fenoles suficiente como para alcanzar niveles que actúen como inhibidores del transporte iónico.

Además, si bien en ciertos casos la deficiencia de B conduce a alteraciones en el transporte iónico similares a las obtenidas por la adición de AIA, en otros, los resultados no son homólogos. Así ocurre en el caso del aumento de la capacidad de absorción de fosfato que sigue a la excisión de ápices de raíz de maíz, seguido de incubación en medio fresco ("efecto de lavado"); mientras que el AIA deprime esta absorción, la deficiencia de B afecta muy débilmente al fenómeno (LEONARD y HANSON, 1972).

Interacciones con fenoles.- De los resultados obtenidos por PARR y LOGUHMANN (1983) en su trabajo sobre la absorción de fosfatos por raíces de maíz, se deduce que los efectos provocados por altos niveles de fenoles, ácido salicílico y ácido p-cumárico, son similares a los provocados por la deficiencia de B. Al cabo de 4 días, sólo ha provocado un aumento del 5-15% en el contenido de fenoles endógenos, lo que no parece que sea suficiente para dar lugar a cambios en el funcionamiento de las membranas y, por otra parte, tampoco tiene lugar una mayor liberación de compuestos fenólicos, ni un pardeamiento de los tejidos, lo que sugiere que no hay cambios en la compartimentación de estas sustancias durante estos primeros estadios de la deficiencia de B.

Según POLLARD et al., (1977), a medida que avanza la deficiencia de B, descienden tanto la absorción de Rb^+ como la actividad ATPasa estimulada por K^+ , y ambas pueden ser restauradas por la adición de B. El análisis de las preparaciones de enzima ligado a membranas que se utilizaron en estos experimentos contenían unos niveles muy bajos de fenoles, por lo que no parece que estos compuestos estén relacionados con la respuesta.

En resumen, la deficiencia de B conduce, a largo plazo a un fuerte incremento de las concentraciones de auxinas y fenoles, y esto ha llevado a gran número de autores a especular que el papel central del B está relacionado con el control de los niveles de estos dos grupos de compuestos. Sin embargo, bajo el punto de vista de Parr y Loughman, y a la vista de los resultados que hemos mencionado, el efecto primario del B sobre el funcionamiento de las membranas tiene que ser más directo que el ocasionado por la elevación de los niveles de auxinas y fenoles en los tejidos.

d) **Configuración de las membranas.**- El boro pudiera interaccionar directamente con la membrana, a través de la formación de complejos con los componentes glucoproteicos y glucolipídicos, que mantendrían la membrana en su conformación óptima y de máxima eficiencia. Esta afirmación viene apoyada por los resultados de experiencias de cinética de transporte en raíces con y sin B, experiencias con liposomas y estudios NMR.

Si el B está realmente formando complejos con los componentes de la membrana indicados, la homogeneidad de la misma

se vería alterada al agregarse estos complejos en dominios específicos que presentarían propiedades específicas, como sugieren LINDEN et al., (1973); o bien, al cambiar el empaquetamiento lipídico y, por consiguiente, la fluidez de la membrana (WOLFE, 1978). Otra posible interpretación de la acción del B sería que la formación de complejos entre el borato y los azúcares hicieran cambiar las cargas de la superficie de la membrana, y en consecuencia, su capacidad de transporte.

Las diferencias en la composición química de las membranas vegetales respecto a las animales (sobre todo en cuanto a la presencia de los fitosteroles, glucoglicerolipídicos y fitoesfingosina, exclusivos de membranas vegetales) justificarían el hecho de que sólo los vegetales superiores tengan un requerimiento esencial de B, y no los animales.

No hay duda de que la hipótesis de una acción primaria del B ligada a las membranas es por el momento la más atractiva, y en este sentido se dirigirán nuestras investigaciones en el futuro.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.- MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo consta de cinco experiencias (más una experiencia previa de tanteo de diversos aspectos metodológicos) en los que se midieron las actividades enzimáticas: catalasa, peroxidasa, ácido indolacético oxidasa, polifenol oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fenilalanina-amonió-liasa y biosíntesis de Ent-kaureno. Asimismo, se determinó el contenido en orto-difenoles (en tres de las cinco experiencias); proteínas y micronutrientes (en todas y cada una de las experiencias) y por último el contenido en giberelinas solubles (última experiencia).

2.1.- Material vegetal.- La planta empleada fué el girasol (*Helianthus annuus*, L.) del tipo "pipa de aceite" de la variedad 1+S-105-C(=HK-1) Cms 234 x RHA 274.

La elección del girasol para nuestro trabajo se debe a su interés económico en nuestra región, unido a su gran sensibilidad respecto a los niveles de B, tanto en el margen de deficiencia como en el de toxicidad, hasta el punto de que normalmente se utiliza como indicador biológico del contenido en B asimilable de un suelo en el que se desarrolla cualquier otro tipo de cultivo (Hudak, 1974). Ambos motivos han hecho que sea nuestro material de experimentación desde hace tiempo.

2.2.- Cultivo.- Se realizó de acuerdo con las tres etapas que a continuación detallamos:

2.2.1.- Germinación de las plántulas en semillero. Para la siembra se distribuyeron las semillas en bateas de plástico que contenían perlita humedecida, de modo que estuvieran en buenas condiciones de humedad y aireación. Las bateas se mantuvieron en la oscuridad cubiertas con una lámina de plástico hasta que emergieron las plántulas y, una vez desplegados los cotiledones, se destaparon, reponiéndose las pérdidas de humedad con agua destilada.

Este período de cultivo en semillas duró hasta que las plantas alcanzaron un tamaño suficiente para ser manipuladas sin riesgo, lo que abarcó un período de unos 15 días.

2.2.2.- Cultivo hidropónico en solución nutritiva completa y equilibrada (con una concentración óptima de B de 0,5 ppm). El objeto de este primer período consiste en permitir que las plantas alcancen un tamaño suficiente para ser sometidas a los diferentes tratamientos de B (que provocan alteraciones en el crecimiento) y obtener así material suficiente para las diferentes determinaciones.

Se escogieron plantas con un desarrollo semejante y se transplataron a una solución nutritiva completa. La duración de este período osciló entre 15 y 20 días.

2.2.2.1.- Solución nutritiva base.- La solución nutritiva fué adecuada a las necesidades del girasol y ajustada a pH 5,5 según la técnica de Steiner (1961). La composición era la siguiente:

		MACROELEMENTOS					
		N	P	S	K	Ca	Mg
(meq/l)		11.54	3.82	3.82	6.21	9.32	3.89

		MICROELEMENTOS					
		Fe	B	Mn	Cu	Zn	Mo
(ppm)		6	0,5	1	0,1	0,1	0,02

La solución nutritiva así preparada presentada las siguientes características:

Relación aniones/cationes= 1.00052

pH.....= 5,5

2.2.2.2.- Dispositivo de cultivo.- Para el cultivo hidropónico se utilizaron cubos de plástico negro de 10 l de capacidad, a los que se adaptó un sistema de aireación. En cada uno de ellos (12 en total) se cultivaron diez plantas.

La solución nutritiva se renovaba cuando se producía un cambio de pH de \pm 0,5 unidades.

2.2.2.3.- Condiciones ambientales del cultivo.-

Las experiencias se llevaron a cabo en una cámara de cultivo en la que se controlaron: temperatura, humedad relativa y duración del fotoperíodo de acuerdo con el siguiente esquema:

	Temperatura	Humedad relativa
Diurna	25 \pm 3°C	70%
Nocturna	20 \pm 3°C	70%

El fotoperíodo fué de 15h luz/9h de oscuridad.

2.2.3.- Cultivo hidropónico en soluciones nutritivas diferenciales.- Durante este período, las plantas crecieron en soluciones nutritivas cuya composición difería de la empleada en la etapa anterior en cuanto a la concentración de B. Se utilizaron 3 niveles diferentes: uno deficiente, Tto. I (0,05 ppm en las primeras experiencias, y 0,00 ppm en las últimas); uno normal, Tto. II (0,50 ppm); y uno tóxico, Tto. III (5,00 ppm).

2.2.3.1.- Diseño experimental.- De cada uno de los tratamientos se hicieron 4 repeticiones, lo que hace un total de 12 cubos, cada uno de los cuales, como ya hemos dicho anteriormente, contenía 10 plantas. Estos cubos se repartieron en la cámara de cultivo formando 4 bloques al azar en cada uno de los cuales estaban representados todos y cada uno de los tratamientos según el siguiente esquema:

	<u>Bloques</u>			
	1º	2º	3º	4º
	1	4	11	8
<u>Nº de cubo</u>	10	6	5	2
	7	9	3	12

Tto. I: cubos Nº 1,2,3 y 4.

Tto. II: Nº 5,6,7 y 8.

Tto. III: cubos Nº 9,10,11 y 12.

Los bloques se establecieron en función de la posición de los cubos respecto a la fuente de iluminación de la cámara de cultivo, ya que la distribución de las bombillas incandescentes, en filas, establece un ligero gradiente en bandas. Este gradiente

es muy poco importante, pero al ser la luz del rojo largo morfogenéticamente muy activa, hemos distribuido los cubos de modo que se anule, escogiendo el diseño de bloques al azar, de manera que el grado de iluminación de los 3 cubos de cada bloque era el mismo, y difería del que tenían los cubos pertenecientes a los otros 3 bloques.

2.3.- Recolección del material vegetal.- Con el fin de estudiar la evolución en el tiempo de las actividades enzimáticas, así como del resto de los parámetros bioquímicos de que consta el presente trabajo, en cada una de las 5 experiencias se realizaron 5 tomas de muestra a los: 0, 7, 14, 21 y 28 días, a partir del momento en que se pusieron las plantas en soluciones diferenciales de B. En cada recogida se tomó una muestra de cada uno de los 12 botes de cultivo, y cada muestra procedía de 2 plantas.

2.4.- Experiencias previas.- Estas experiencias se realizaron con la idea de dilucidar algunos aspectos de la metodología a utilizar, en lo referente a los siguientes aspectos:

2.4.1.- Comprobación del correcto funcionamiento de la metodología del cultivo y preparación de las hojas, así como del diseño experimental.- Con tales objetivos se realizó una experiencia completa en la que se midieron las actividades catalasa y peroxidasa así como el contenido proteico de los extractos (por el método de Lowry, 1951).

Las condiciones experimentales en que se realizó esta experiencia diferían de las expuestas en el aptdo. 2.2 en los siguientes puntos:

a) Se usaron 4 niveles de B (0,05; 0,10; 0,5 y 3,0 ppm), cada uno repetido 3 veces.

b) Recogidas: Se hicieron también 5 recogidas, pero a los 0, 2, 5, 15 y 23 días de haber puesto las plantas en soluciones diferenciales.

c) Incubación de las hojas tras su infiltración con H₂O y con B (ver descripción de la técnica de infiltración más adelante, aptdo. 2.5.2.1.).

Al objeto de permitir que los enzimas posiblemente afectados por la falta de B puedan incorporar el procedente de la infiltración, las hojas enteras infiltradas se dejaron incubar durante 24 h en la cámara de cultivo, con el fotoperíodo de la experiencia, metidas en frascos de vidrio transparente, cerrados. Para evitar que las hojas se secaran, éstas se dispusieron, dentro del bote, sobre una rejilla de plástico, y en el fondo se colocaron discos de papel de filtro humedecido.

En la última recogida, se hicieron medidas además, en hojas intactas, sin infiltrar ni incubar, al objeto de comprobar el efecto que tales tratamientos ejercen sobre los parámetros medidos.

De los resultados obtenidos en esta experiencia, y que serán discutidos en el apartado correspondiente, se extrajeron una serie de conclusiones que aconsejaban cambiar algunos aspectos de la metodología seguida en esta experiencia por la que seguimos en el resto de las experiencias.

Estos cambios se concretan en los siguientes puntos:

a) Diseño experiemtnal con 3 Ttos. de Boro (deficiente, normal y tóxico) y 4 repeticiones.

b) Recogidas a los 0, 7, 14, 21 y 28 días desde la puesta de las plantas en soluciones diferenciales.

c) Infiltración, pero no incubación de las hojas.

d) Expresión de los resultados de actividades enzimáticas referidos a g p. fresco, y no en actividad específica.

2.4.2.- Medida espectrofotométrica del enzima AIA-oxidasa.- La medida espectrofotométrica de esta actividad ha sido cuidadosamente estudiada en nuestros extractos, a través de una serie de pruebas tendentes a aclarar las características y requerimientos del enzima de girasol, ya que parecen ser diferentes en distintas especies vegetales, tanto en su forma de actuación (los productos de oxidación suelen ser diferentes) como de requerimientos. Partiendo de una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 3ml, 50µl de una solución al 0.58% v/v de Tritón X-100; 100 µl de extracto, 1 µmol DCP (diclorofenol), 1µmol de Mn^{2+} (como Cl_2Mn), y 3 µmoles de AIA en tampón fosfato 30mM

pH= 5.6, medido frente a un blanco sin AIA, estudiamos la reacción con los siguientes resultados:

a) En primer lugar, estudiamos los cambios de Absorbancia provocados por la reacción a distintas longitudes de onda, mediante barridos consecutivos, observándose que los mayores cambios se producían a 252nm, donde existe un máximo correspondiente al anillo indólico.

b) igualmente observamos que, en la zona de $\lambda = 320\text{nm}$, aparecía una fuerte actividad, que interpretamos como correspondiente al enzima difenol-oxidasa (DPO), lo que en efecto se ratificó al desaparecer dicha actividad con la adición de cisteína al medio de reacción (que es inhibidor de la DPO-Walker 1980)-.

c) Finalmente, debido a la baja actividad que mostraban los extractos, y por analogía con el comportamiento de otras oxidasas, decidimos añadir iones Fe^{2+} a la mezcla de reacción, observándose un fuerte incremento de la actividad enzimática, medida a 252nm. Dado que, según la bibliografía, los iones Fe^{2+} pueden producir la oxidación no enzimática del AIA, se procedió a hacer una prueba utilizando la misma mezcla de reacción, con iones Fe^{2+} , pero en ausencia de exto. enzimático. La prueba dió como resultado una débil actividad, muy inferior a la que ocurría en presencia del enzima, por lo que el efecto de los iones Fe^{2+} parece ser sobre la actuación del enzima.

2.4.3.- Técnicas relacionadas con la determinación de giberelinas, puestas a punto en Nijmegen (1981).- Las técnicas que se han puesto a punto en Nijmegen comprenden 2 aspectos:

1º) Estimación de la biosíntesis de giberelinas por tejidos vegetales, a través de la determinación de la biosíntesis de un precursor, el ent-kaureno, a partir de mevalonato marcado.

2º) Estimación del nivel de giberelinas endógenas en los tejidos, por medio de su extracción, purificación, separación y posterior bioensayo.

2.4.3.1.- Actividad sintetizadora - de ent-kaureno, precursor de las giberelinas, a partir de mevalonato marcado.- La puesta a punto de esta metodología comprendía también

su adaptación a nuestro material vegetal, el girasol, ya que en el Laboratorio del Dr. Barendse trabajan con *Pharbitis nil*.

2.4.3.1.1.- Técnica original (para *Pharbitis nil*).

- Homogeneización de la muestra:

- 5g material vegetal + 5 ml tampón fosfato, 0.1M, pH: 7,1, conteniendo: DTT (Ditiotreitol) 3mg/ml + 1g PVPPD (Polivinil-pirrolidona insoluble).

- Centrifugación a 17.500g y 4° C durante 15 min.

- Ultracentrifugación a 105.000g y 4°C durante 2h.

El sobrenadante se toma como fuente de enzima.

- Mezcla de reacción (se hace por triplicado).

Tubo N°	ATP (20mM)	Cl ₂ Mg/Cl ₂ Mn (40mM/40mM)	Glicerol puro	Farnesol puro	Extracto enzimático	¹⁴ C-mevalonato 0,1 µCi/1µl
1	100µl	200µl	100µl	-	1ml	10µl
2	"	"	"	-	"	"
3	"	"	"	10µl	"	"

- Incubación, en baño de agua a 30°C durante 2h.

- Extracción del ¹⁴C-ent-kaureno, mediante la adición de 3ml de mezcla de acetona: benzeno (1:2 v/v), seguido de agitación y centrifugación a 3.000 r.p.m., recogiendo la capa superior. La extracción se repite 2 veces más.

- Evaporación de los extractos, (al vacío y Tª ambiente), hasta tota desecación.

- Reextracción del residuo seco con 100µl de acetona.

- Cromatografía del extracto acetónico del apartado anterior sobre capa fina de silicagel 60 de 0,25mm, utilizando n-hexano como líquido de desarrollo. Sobre cada placa se aplican 10µl de ¹⁴C-ent-kaureno patrón, para identificación de las manchas. Las manchas se visualizan usando una radiocromatocámara

- Cuantificación de la radioactividad.- Las manchas correspondientes al ent-kaureno se raspan y recogen en viales de conteo de 6ml y se les adiciona 0,5ml de Lumasolve + 5.0ml de Lipoluma.

Finalmente se mide la radioactividad con un contador de centelleo líquido.

- El contenido proteico de los extractos enzimáticos se mide por el método de Bradford, usando albúmina bovina como patrón.

- Los resultados de la incorporación de mevalonato marcado a ent-kaureno se expresa en d.p.m./mg de proteína.

2.4.3.1.2.- Pruebas realizadas para adaptación de esta técnica al girasol.- Se utilizaron plantas de girasol, germinadas en vermiculita y transplantadas a los 10 días a macetas con suelo. Se tomaron muestras desde los 3 a los 40 días desde la germinación.

2.4.3.1.2.1.- Actividad sintetizada de ent-kaureno en los distintos órganos del girasol.- Se realizaron medidas en las siguientes partes de la planta: hojas, tallos, raíces y tallos + raíces.

Simultáneamente se probó el efecto de la adición de farnesol en la mezcla de reacción, ya que en el material original (Pharbitis nil) se encontró que estimulaba marcadamente la actividad de los extractos.

Se obtuvieron los resultados que se reúnen en la Tabla 6.

2.4.3.1.2.2.- Determinación de la relación óptima p.fresco/tampón en la homogeneización.- Se ensayó la actividad de los extractos obtenidos con relación 1:1, 1:2 y 1:4 p.fresco/vol. tampón.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

2.4.3.1.2.3.- Se han hecho también pruebas sobre el efecto de la congelación del material sobre la actividad enzimática. Sin embargo, los resultados son contradictorios y habrán de repetirse para obtener conclusiones fiables. De todas formas, sí que puede decirse que la congelación no anula la actividad enzimática.

2.4.3.1.3.- Las conclusiones que se extrajeron de estas pruebas, y que condicionaron nuestra metodología en la 4ª experiencia son las siguientes:

En las pruebas de adaptación al girasol de la técnica de medida de la actividad sintetizadora de ent-kaureno en extractos vegetales, reunidos en las Tablas 5 y 6, la metodología original, para ser aplicada en nuestro material, debe ser modificada en los siguientes aspectos:

a) La adición de farnesol en la mezcla de reacción, si bien en algunos casos dá lugar a un incremento de la actividad (mucho menor que la observada en *Pharbitis nil*), no es suficiente para justificar el encarecimiento que conlleva su utilización (Tabla 6). Por tanto, prescindiremos de él en nuestras determinaciones.

b) La actividad más alta se consiguió utilizando como material vegetal los tallos de las plantas, mientras que en las hojas la actividad sintetizadora era despreciable. Las raíces mostraban una actividad inferior a la de los tallos, pero todavía suficientemente elevada.

c) La relación p.fresco/tampón en los extractos puede rebajarse a 1:4 si se usan tallos, ya que en este material la actividad prácticamente se mantiene. Sin embargo, no se descarta que con el sistema de raíces haya que usar una concentración superior.

2.4.3.2.- Extracción y cuantificación del nivel de giberelinas endógenas presentes en los tejidos.- La técnica comprende los siguiente pasos: extracción con disolventes de las giberelinas, purificación de los extractos, identificación de las distintas giberelinas por HPLC, y cuantificación mediante bioensayos.

2.4.3.2.1.- Técnica original (para *Pharbitis nil*).

2.4.3.2.1.1.- Extracción - de giberelinas.

- Homogeneización:

50g de semillas de Pharbitis Nil + 100ml de metanol puro, se homogeneizan en un Sorvall Omni-mixer.

- Filtración a través de papel de filtro Selecta de 24 cm de diámetro.

- Reextracción del residuo, por agitación con 100ml de metanol en cámara fría durante toda la noche.

- Los extractos se reúnen y se evaporan en rotavapor a 30°C hasta vol. de 15ml.

2.4.3.2.1.2.- Purificación del extracto bruto, haciéndolo pasar a través de cartuchos Sep-Pak C₁₈ con una jeringa de 10ml.

- El extracto purificado se concentra en rotavapor a 30°C hasta vol. final de 5ml.

- Paso de nuevo por cartucho Sep-Pak C₁₈.

- De nuevo evaporación en rotavapor hasta sequedad.

2.4.3.2.1.3.- Identificación de giberelinas mediante el paso por HPLC.- Las giberelinas presentes en la muestra purificada se separan por cromatografía líquida de alta presión, usando una columna µBondapack C¹⁸ y un flujo de fase móvil de 2,0ml/min., según la siguiente metodología:

- Pinchar 5µl de una solución de 1µg/µl de patrones de giberelinas puras, cuya presencia está demostrada en la muestra (GA₃, GA₄ y GA₇ en Pharbitis).

- Lavar el sistema con metanol, elevando la presión a 3.0-4.0 ml/min.

- Pinchar 200µl de la muestra.

El pH de la fase móvil con la que se cromatografía la muestra es variable con el tiempo y se establece mediante un gradiente de 2 soluciones, previamente filtradas por millipore de 0.5µm de poro:

Solución A: Metanol al 30% en agua con tampón fosfato 0,01M; pH 2.5.

Solución B: Metanol al 30% en agua con tampón fosfato 0,01M; pH 7.5.

La composición de la solución de partida es Sol. A al 100%, y la final Sol.B al 100%, siendo los puntos intermedios una mezcla de las dos soluciones, variable con el tiempo, de manera que se establece un gradiente de pH. Las distintas GAS quedan separadas, detectándose su presencia con un detector espectrofotométrico, a $\lambda = 206\text{nm}$.

Se realizó la cromatografía en 30 min., recolectándose 30 fracciones de 1 min. cada una. Las fracciones se evaporan en rotavapor y se redisuelven en 1ml de etanol al 10%.

2.4.3.2.1.4.- Bioensayo.- Dada la gran actividad de estas hormonas, que pueden ejercer acciones fisiológicas a concentraciones no detectables por los métodos físicos, la mejor manera de establecer la cuantificación de su nivel en tejidos es llevar a cabo tests biológicos, en los que se mide una determinada acción fisiológica específica de la hormona.

Los bioensayos pueden hacerse de la muestra total purificada, así como de las fracciones recolectadas del cromatógrafo; en este 2º caso tendremos la actividad de cada una de las giberelinas separadas.

El bioensayo usado para giberelinas es el de arroz enano Tan-ginbozu (Murakami, Y., 1968), que comprende los siguientes pasos:

- Imbibición de las semillas en agua a 30°C e iluminación constante con tubo fluorescente grow-lux durante 24 h.
- Cambio del agua a las 24 h manteniéndolas en el agua nueva otras 24.
- Siembra en agar al 0,65%.
- A las 48h, las plantas fueron tratadas con las diferentes fracciones procedentes del HPLC, previamente disueltas en solución etanólica al 10%. La aplicación se hizo a razón de 1 μl /planta, en forma de gota sobre el ápice. Cada fracción era aplicada a 7 plantas.
- A los 7 días se realizaron las medidas de la longitud del 1^{er} entrenudo de las plántulas, comparándola con la de las

plantas tratadas con una curva patrón de GA_3 , a las siguientes concentraciones: $10^{-7}M$; $10^{-6}M$; $10^{-5}M$ y $10^{-4}M$, así como un blanco de agua destilada. Los resultados significativos de las 30 fracciones cromatográficas del exto. de Phorbis, están reunidos en la Tabla 7.

2.4.3.2.2.- Pruebas realizadas con nuestro material vegetal (girasol).- Revisada la bibliografía, no hemos podido encontrar referencias en las que se identifiquen las giberelinas presentes en el girasol, de los 54 tipos que se han descrito hasta el momento. Esta circunstancia condicionó las pruebas que se llevaron a cabo para adaptar las técnicas descritas a nuestro material vegetal. En efecto, como ya hemos indicado, es esencial el conocimiento de las GAs presentes en muestra para la identificación de las mismas por HPLC, ya que han de pincharse previamente en el cromatógrafo los patrones correspondientes, para la identificación de los picos de la muestra y la consecuente valoración de la correcta separación de dichos picos. Por tanto, la identificación de los tipos GAs presente en el girasol sería un trabajo necesariamente previo al nuestro, ya que nosotros pretendemos ver la relación existente entre el nivel de B y los niveles de las distintas GAs presentes en el girasol. Sin embargo, la identificación de las giberelinas de girasol, supondría todo un año de investigación, así como un presupuesto (en patrones de GAs) y aparataje (espectrografía de masas) que no es posible por el momento, y que será el objeto de una investigación futura. A la vista de estos condicionantes, hemos optado por una adaptación de la técnica a nuestras necesidades, en la cual, aunque no podamos identificar el cambio provocado por el B en los niveles de cada GA, por HPLC, ya que por el momento no es posible, sí que podemos cuantificar el cambio en el nivel total de GAs.

De acuerdo con esto, la técnica puesta a punto en Nijmegen, que utilizaremos en nuestras experiencias presenta variantes respecto de la original, en los puntos que a continuación indicamos:

- Se parte de 20g de parte aérea (hojas y tallos) del último entrenudo de plantas de girasol de 35 días.

- La extracción se llevó a cabo según la técnica original ya descrita.

- Los pasos de purificación se reforzaron, al objeto de obtener un extracto que pudiera usarse directamente, en bioensayos. Así, la muestra se pasó varias veces a través de cartuchos Sep-Pak C₁₈ hasta conseguir su clarificación. A continuación, se sometió a congelación a -20°C para conseguir una precipitación de impurezas; se pasó de nuevo a través de un cartucho Sep-Pak C₁₈, evaporándose en rotavapor hasta desecación total. El residuo seco se extrajo con acetona (10ml aproximadamente), pasando el extracto acetónico nuevamente a través de Sep-Pak. De nuevo evaporación en rotavapor hasta sequedad, y por último, redisolución del residuo en 0,5ml de etanol al 10% en agua bidestilada.

- Bioensayo.- Del extracto purificado se hicieron 4 diluciones, utilizando para ello etanol al 10% en agua bidestilada. Estas diluciones fueron: 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16.

La determinación de la actividad giberelínica, tanto en extracto como en las 4 diluciones mencionadas, se llevó a cabo a través del bioensayo de arroz enano Tam-ginbozu que ya ha sido descrito, con los resultados que se exponen en la Tabla 8.

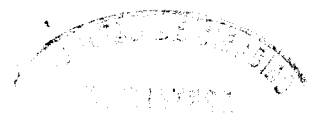
Las conclusiones que se extrajeron de todas estas pruebas, y que condicionaron nuestra metodología en la 4ª experiencia son las siguientes:

La técnica de cuantificación del nivel de GAS en girasol ha sufrido modificaciones respecto a la original, en los siguientes puntos:

a) Se refuerzan los pasos de purificación de los extractos, para que puedan ser usados directamente en el bioensayo, por medio del cual se cuantificará el nivel total de giberelinas en la planta.

b) En los bioensayos se habrá de utilizar el extracto final sin diluir, ya que las diluciones no dan actividad significativa, como puede observarse en la Tabla 8.

c) Por el momento no podemos cuantificar individualmente los cambios de los distintos tipos de giberelinas presentes en la planta.



2.5.- 1ª Experiencia.

En esta primera experiencia se estudió la evolución en el tiempo de las actividades enzimáticas catalasa, peroxidasa y ácido indolacético oxidasa (AIA-oxidasa).

El nivel deficiente de B (Tto. I) fué de 0,05 ppm de B en la solución nutritiva.

2.5.1.- Toma de muestras.- Se hicieron 5 recogidas de material vegetal a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de la puesta de las plantas en soluciones diferenciales de Boro. En cada una de estas recogidas, se tomaron las hojas de dos de las plantas de cada uno de los cubos de cultivo. Las hojas de cada muestra se mezclaron y se dividieron en 3 posiciones:

Una de ellas se reservó para la determinación de microelementos (ver aptdo. 2.11).

Las otras dos porciones se utilizaron para las medidas de actividad enzimática.

2.5.2.- Determinación de las actividades enzimáticas catalasa, (1.11.1.6) peroxidasa (1.11.1.7) y AIA-oxidasa.

2.5.2.1.- Infiltración: Una de las porciones de la muestra de hojas intactas se infiltró con 100 ml de agua destilada y la otra con 100 ml de tampón borato, B = 15,4 ppm (la concentración de B en hojas frescas normales), a pH 7,0. En ambos casos, la infiltración se realizó colocando las hojas sobre la solución, con el envés hacia abajo, y aplicando vacío durante 10 minutos con el fin de forzar la penetración de la solución en la hoja.

El objeto de la infiltración de una solución de B es el de comprobar si los efectos sobre las actividades enzimáticas en estudio, posiblemente alteradas por los distintos tratamientos, pueden revertir al nivel de las plantas normales por la adición de B, como ya hemos indicado.

Las hojas correspondientes al tratamiento tóxico de B no recibieron infiltración con tampón borato, ya que en dicho tratamiento se suministra a la planta un nivel de B superior

al normal. Por tanto, en este caso, hubo una sola muestra de hojas infiltradas con agua destilada.

2.5.2.2.- Congelación del material vegetal.-

Introducción en bolsas de plástico a -30°C , hasta el momento de su utilización. Previamente se había comprobado que tal tratamiento no alteraba sustancialmente las actividades enzimáticas consideradas.

2.5.2.3.- Preparación de los extractos

enzimáticos.- 5 gramos de hojas se homogeneizaron en un Sorvall omni-mixer con tampón fosfato 50mM, pH 7.5 al que previamente se había adicionado Cl_2K 0.4mM, $\text{S}_2\text{O}_5\text{Na}_2$ 10mM y polivinil polipirrolidona (PVPPD) al 1.5% p/v. La relación final del extracto fué de 1:3. El extracto crudo se filtró a través de gasa y se centrifugó a 15.000g durante 15 minutos, utilizándose el sobrenadante como fuente de enzima.

2.5.2.4.- Medida de la actividad peroxidasa.-

Se midió según el método espectrofotométrico de Worthington Biochem. Corp. (1967), basado en la medida de la quinona coloreada (que absorbe a 460nm) resultante de la oxidación de la o-dianisidina* en presencia de H_2O_2 . La mezcla de reacción contenía en un vol. final de 3,06ml: 50 μl de una solución al 0.58% v/v de Tritón X-100; 10 μl de extracto; 2,94 μmoles H_2O_2 , y 52 μmoles o-dianisidina, todo ello en tampón fosfato 67mM, pH 6.0.

Las medidas se realizaron frente a un blanco en que el extracto fué sustituido por igual volumen de tampón de reacción. La medida se hizo a 30°C , en espectrofotómetro de doble haz Hitachi 100-80, tomándose como medida la diferencia de Absorbancia, a 460nm, entre el $t= 65$ seg y el $t= 20$ seg, ya que en este intervalo Absorbancia/min. es constante. Cada muestra se midió 3 veces, calculándose el valor medio de las 3 medidas.

Los resultados se expresaron como $\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \text{g p.fresco}$.

2.5.2.5.- Medida de la actividad catalásica.-

Se procedió de acuerdo con el método espectrofotométrico de Lück (1965) modificado por Tolbert et al., (1969), en el que se mide *Fórmula de la o-dianisidina; 3,3-dimetoxi-bencidina.

la disminución de la absorbancia a 240nm de una solución de H_2O_2 que es descompuesta por la catalasa. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 3.07 ml; 50 μ l de una solución al 0.58% v/v de Tritón X-100; 200 μ l de extracto; y 39 μ moles H_2O_2 , todo ello - en tampón fosfato 67mM, pH 7.0. Las medidas se realizaron a 30°C, en un espectrofotómetro de doble haz Hitachi 100-80, frente a un blanco en que el sustrato (H_2O_2) era sustituido por igual volumen de tampón de reacción. Se tomó como medida la diferencia de Absorbancia, a 240nm, entre $t= 110$ seg y $t= 50$ seg. Cada muestra se repitió tres veces y se calculó la media.

Los resultados se expresaron como μ moles H_2O_2 /min. x g. p. fresco.

2.5.2.6.- Medida de la actividad AIA-oxidasa.- De acuerdo con los resultados de las pruebas realizadas en la experiencia previa, la medida de la actividad AIA-oxidasa se realizó finalmente midiendo la desaparición del grupo indólico (a 252nm) en presencia de iones Fe^{2+} y Mn^{2+} , y DCP*, - como cofactores coadyuvantes en la destrucción del AIA por el enzima. En la mezcla se incluye cisteína para evitar la actuación del enzima PPO* sobre el DCP**, lo que destruiría uno de los cofactores esenciales.

La mezcla de reacción contenía, en un vol. final de 3ml: 50 μ l de una sol. al 0,58% v/v de tritón X-100; 100 μ l extracto enzimático; 1 μ mol DCP; 1.5 μ mles cisteína; 1 μ mol Fe^{2+} (SO_4Fe); 0.5 μ mol Mn^{2+} (Cl_2Mn); 3 μ mol AIA en tampón fosfato 30mM, pH 5.6.

Las medidas se hicieron a 30°C y $\lambda = 252$ nm, frente a un blanco que carecía de AIA. Cada 2 ó 3 medidas se introducía una prueba en la que se medía el efecto de los iones Fe^{2+} y Mn^{2+} sobre la oxidación del AIA, en una mezcla de reacción que carecía de extracto enzimático. Al final de cada tanda de medidas se obtuvo una medida de todas las determinaciones del efecto de los iones sobre el AIA, restándose de cada una de las actividades enzimáticas medidas.

Cada muestra se midió tres veces, calculándose la media de las 3 medidas.

**DCP= 2,4, diclorofenol.

* PPO= Polifenol oxidasa.

La Actividad enzimática se expresó como Δ Abs/min. x g p.fresco.

2.6.- 2ª Experiencia.

En esta segunda experiencia se estudió la evolución en el tiempo de la actividad enzimática polifenol oxidasa (PPO) (1.10.3.1), así como el contenido en ác. orto-difenólicos (o-difenoles).

El nivel deficiente de B (tratamiento I) fué de 0,05 ppm de B en la solución nutritiva.

2.6.1.- Toma de muestras.- Fué igual a la descrita en el apartado 2.5.1. de la primera experiencia.

2.6.2.- Medida de la actividad polifenol oxidasa.- La infiltración se llevó a cabo como se ha descrito en 2.5.2.1. y el material vegetal fué igualmente congelado (Aptdo. 2.5.2.2).

2.6.2.1.- Preparación de los extractos enzimáticos.- 5g de hojas se homogeneizaron con 50ml de tampón fosfato 100mM, pH 7.0, al que se había adicionado PVPP al 1,5%. (Relación final del exto. 1:10).

El exto. crudo se filtró a través de gasa y se centrifugó a 15.000 g durante 15 min., y el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

2.6.2.2.- Medida de la actividad PPO.- Se midió según el método espectrofotométrico de Varda Kahn (1975), que está basado en la medida de la desaparición del ác. cafeico, a 370nm, por oxidación enzimática del mismo. La mezcla de reacción contenía, en un vol. final de 3,05ml: 50 μ l de una solución al 0,58% v/v de tritón X-100; 50 μ l extracto; 30 μ moles ác. cafeico, todo ello en el tampón fosfato de homogeneización.

Se midió la diferencia de absorbancia, a 30°C y 370nm, frente a un blanco en el que el extracto enzimático había sido sustituido por un volumen igual de tampón. Se tomó como medida la diferencia de Absorbancia entre $t= 135s$ y $t= 75s$, expresándose los resultados como Δ Abs./min. x g p.fresco. Se hicieron 3 medidas de cada muestra y se halló el valor medio.

2.6.3.- Medida del contenido en o-difenoles.-

La extracción de la fracción fenólica se realizó según el método de Bligh y Egdwyer (1959): 5g de hojas desnervadas se homogeneizaron durante 1 min. a velocidad máxima en Sorvall omni-mixer, con 10ml metanol frío. Se añadieron 5ml de cloroformo frío y se homogeneizaron durante 1min. a vel. máxima. Se añadieron otros 5ml de cloroformo y se repitió 1min. de homogeneización. Por último, se añadieron 5ml de H₂O salada al 1%, y se homogeneizó de nuevo durante 1min.

El extracto así obtenido se filtró a través de gasa y se centrifugó a 3.000g durante 10 min. para separar las fracciones. En el tubo de la centrífuga se separaron 2 capas: la inferior, clorofórmica, llevaba disueltos los lípidos, mientras la superior, metanólica, llevaba disueltas las sustancias hidrosolubles de bajo peso molecular, entre las que se encuentran los ácidos fenólicos. En cuanto a las proteínas, que podrían interferir con la medida de los ác. fenólicos, quedan precipitadas por el ClNa adicionado, formando una capa claramente distinguible en la superficie de separación de las fases metanólica y clorofórmica. La ausencia de proteínas en la fracción metanólica fué confirmada realizando unas pruebas de determinación de proteínas en estos extractos metanólicos, por el método de Bradford (1976) (usado en todas nuestras determinaciones proteínicas, ya que es el único que no presenta interferencias con los compuestos fenólicos). Las medidas proteicas en estos extractos entraban dentro del margen de error del método, por lo que pueden considerarse exentos de proteínas.

La medida de o-difenoles en los extractos metanólicos se realizó por el método de Pèsez et al., (1966), en el que a 1ml de extracto se añaden 0.5ml de SO₄H₂ 1N y 1,5ml Mo₇O₂₄(NH₄)₆ al 10% p/v, midiéndose la absorbancia a 360nm tras 30 min., de desarrollo del color. Las medidas se hicieron frente a una curva patrón de ác. cafeico, y el contenido en o-difenoles se expresó como µg de ác. cafeico g p. fresco de hoja.

2.7.- 3ª Experiencia.

En esta tercera experiencia se midió la evolución en el tiempo de las actividades enzimáticas glucosa-6-fosfato-

deshidrogenasa (1.1.1.49) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (1.1.1.44) y como el contenido de o-difenoles en hoja. Así, el nivel deficiente de B (tratamiento I) fué de 0,05 ppm de B en la solución nutritiva.

2.7.1.- Toma de muestras.- Se realizó como se ha descrito en el aptdo. 2.5.1.

En este caso las hojas se homogeneizaron en fresco, ya que se comprobó que la congelación reducía drásticamente ambas actividades enzimáticas.

2.7.2.- medida de las actividades glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa.- La infiltración se realizó como previamente se ha descrito en el aptdo. 2.5.2.1.

2.7.2.1.- Preparación de los extractos enzimáticos.- 5g de hojas frescas se homogeneizaron con 20ml de tampón Tris-ClH 50mM, pH 7.2, al que se había adicionado $S_2O_5Na_2$ 10mM y PVPP al 1.5% (Relación final del extracto 1:4).

El extracto se filtró a través de gasa, se centrifugó a 15.000g durante 15 min., y el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

2.7.2.2.- Medida de la actividad glucosa-6P-deshidrogenasa.- Se realizó espectrofotométricamente, según el método de Kornberg y Horecker (1955), basado en la medida de la aparición de $NADPH_2$ en el medio (incremento de la absorbancia a 340nm).

La mezcla de reacción contenía, en un vol. final de 1,5ml: 650µl de extracto; 7,5µmoles SO_4Mg ; 0.5 µmoles $NADP^+$ y 1.5µmoles de glucosa-6P, todo ello en tampón glicil-glicina 100mM, pH 8. Las medidas se realizaron a 30°C, en un espectrofotómetro de doble haz Hitachi 100-80, frente a un blanco en que el sustrato (glucosa-6P) se sustituyó por igual volumen de tampón de reacción. Se tomó como medida la diferencia en Absorbancia, a 340nm, entre $t= 120$ seg y $t= 60$ seg.

La medida de cada muestra se repitió 3 veces, y los resultados se expresaron como nmoles de $NADPH_2$ /min x g. p. fresco de hoja.

2.7.2.3.- Medida de la actividad 6-P-gluconato deshidrogenasa.- Se realizó espectrofotométricamente, midiendo como en el caso anterior, la aparición de NADPH_2^+ en el medio (incremento de absorbancia a 340nm). La mezcla de reacción fué tomada de Lee y Aronoff (1967), modificada por nosotros, y contenía, en un vol. final de 1.5 ml: 400 μl extracto; 5 μmoles $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$; 0.75 μmoles NADP y 7.5 μmoles ác. 6P-glucónico, todo ello en tampón - Hepes 50mM, pH 7.55. Las medidas se realizaron a 30°C, en un espectrofotómetro de doble haz Hitachi 100-80, frente a un blanco en el que el sustrato (ác. 6P-glucónico) había sido sustituido por igual volumen de tampón de reacción. Se tomó como medida el incremento en la absorbancia, a 340nm, entre $t= 120$ seg y $t= 60$ seg.

Cada muestra fué medida por triplicado, y los resultados se expresaron como $\text{nmoles NADPH}_2^+/\text{min} \times \text{g p. fresco de hoja}$.

2.7.3.- Medida del contenido en o-difenoles de las hojas.- Con objeto de correlacionar las actividades enzimáticas descritas con el contenido en fenoles de las hojas, ya que estos enzimas están implicados en su biosíntesis, se repitió la medida de o-difenoles en las mismas hojas. El procedimiento de extracción y medida son idénticos a los descritos en el apartado 2.6.3.

2.8.- 4ª Experiencia.

En esta cuarta experiencia se midió la evolución en el tiempo de la actividad enzimática fenilalanina amonioliasa, (4.3.1.5) así como el contenido de o-difenoles en hoja (al objeto de correlacionar ambos, ya que este enzima interviene también en su biosíntesis.

En esta experiencia el nivel deficiente de B (tratamiento I) fué de 0 ppm de B en la solución nutritiva.

2.8.1.- Toma de muestras.- Una vez cortadas las hojas de dos plantas de cada uno de los cubos, se dividieron en tres porciones: una de ellas se secó en estufa y se utilizó para las determinaciones de microelementos; otra porción se congeló y se utilizó para la determinación del contenido en o-difenoles; y por último, una tercera porción se utilizó para la medida de la actividad fenilalanina amonioliasa.

En la presente experiencia, y dado que en ninguna de las experiencias anteriores se habían encontrado diferencias significativas de actividad enzimática entre las hojas infiltradas con agua destilada y las infiltradas con una solución de boro, no se llevó a cabo el proceso de infiltración; pero sin embargo, en cada uno de los extractos determinamos la actividad enzimática en mezclas de reacción sin adición de B y con adición de solución de Boro, de manera que la concentración final de elemento, en la mezcla de reacción, quedara en 16,7 ppm, concentración considerada como la normal existente en la hoja fresca.

2.8.2.- Preparación de los extractos enzimáticos.-

Se llevó a cabo según el método de Shkol'nik, M. Ya y col. (1980): 3g de hoja fresca se homogeneizaron con 25 ml de acetona fría (-25°C). El homogenado se filtró a través de un embudo de placa porosa del nº 3 y se lavó con 425 ml de acetona fría. El polvo resultante se secó y se guardó en congelador a -25°C hasta su utilización.

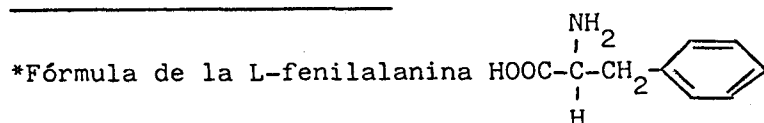
El extracto enzimático se obtuvo manteniendo en agitación durante 1h y en baño frío 0,2g de polvos de acetona en 30ml de tampón Tris-ClH 0,1M y pH 8,8 al que se había adicionado glutation reducido 0,1mM. El extracto se filtró a través de gasa y se centrifugó a 15.000g durante 15 min. en una centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

2.8.3.- Medida de la actividad fenilalanina amonioliasa.-

Se llevó a cabo según el método espectrofotométrico de Tyuterev y col., (1976) que mide el incremento de absorbancia a una longitud de onda de 290nm, por la formación de ácido transcinnámico a partir de la fenilalanina.

La actividad fenilalanina-amonioliasa de cada uno de los extractos se midió, por triplicado, en dos condiciones diferentes:

a) Adicionando B a la mezcla de reacción. Esta mezcla contenía en un volumen final de 3ml: 0,9 ml de tampón Tris-ClH 0,1M pH 8,8; 40µmoles de L-fenilalanina*; 16,7 ppm de B. Las medidas se realizaron a 35°C en un espectrofotómetro de doble



haz Hitachi 100-80, frente a un blanco en el que la L-fenilalanina se había sustituido por un volumen igual de tampón. Se tomó como medida el incremento de absorbancia entre $t=60$ min y $t=0$.

b) Sin adicionar B a la mezcla de reacción. La composición de la mezcla fué la misma que en a) pero sustituyendo el B por un volumen igual de tampón.

Los resultados se expresaron como unidades de actividad/gramo de peso fresco, definiéndose 1 unidad de actividad fenilalanina-amonio-liasa como la cantidad de enzima que da lugar a un incremento de absorbancia de 0,01 en 1h a 35°C y 290nm.

2.8.4.- Medida del contenido de o-difenoles en hoja.- Se llevó a cabo según el método descrito en el aptdo. 2.6.3.

2.9.- 5ª Experiencia.

En esta experiencia se estudió la evolución en el tiempo de la biosíntesis de ent-kaureno a partir de C^{14} -mevalonato, así como la del contenido de giberelinas solubles.

Al igual que en la 4ª experiencia, el nivel deficiente de B en la solución nutritiva fué de 0 ppm de B.

2.9.1. Toma de muestras.- En esta experiencia no se utilizó como material vegetal las hojas de girasol, sino los 20cm superiores del tallo ya que, tras haber realizado, en la experiencia previa, pruebas con hojas, raíces y tallos, observamos que la actividad era máxima en la parte superior de estos últimos.

Cada muestra comprendía la porción superior del tallo de dos plantas de cada tubo de cultivo.

Una vez recolectados los tallos en cada una de las 5 recogidas se trocearon y se dividieron en dos porciones, una de ellas para la determinación enzimática y la otra para la extracción de giberelinas solubles. Ambas se congelaron a -25°C hasta su utilización. Las hojas se utilizaron para la determinación del contenido de micronutrientes.

En este caso, y al igual que en la 4ª experiencia no se hizo infiltración, sino que para cada muestra se midió la biosíntesis de ent-kaureno en mezclas de reacción con y sin B.

2.9.2.- Preparación de los extractos enzimáticos.-

5g de tallos se homogeneizaron con 20 ml de tampón fosfato 0,1M pH 7,1 al que se había adicionado DL-ditiotreitol 2mM y PVPP al 2% p/v.

El homogenado se filtró a través de gasa y se centrifugó a 15.000g durante 15 min., y el sobrenadante se centrifugó de nuevo, esta vez a 105.000g y durante 2 h. Este último sobrenadante se utilizó como extracto enzimático.

2.9.3.- Medida de la biosíntesis de ent-kaureno.-

Mientras que en las muestras correspondientes a los tratamientos deficiente y normal se midió la biosíntesis de ent-kaureno en mezclas de reacción con y sin adición de B, en las del tratamiento tóxico se midió tan solo en mezclas a las que no se había añadido B.

El método de medida seguido fué el de Barendse y More (1979), que consta de las siguientes etapas:

a) Incubación, en una mezcla de reacción que contenía: 1ml de extracto, 100µl de ATP (10µmoles), 200µl de Mn^{++}/Mg^{++} (8µmoles), 100µl de glicerol, 100µl de tampón fosfato 0,1M pH 7,1 y 10µl de sal DBED del DL-2 ^{14}C ácido mevalónico (0,0175 µmoles: 1µCi).

En aquellos casos en los que la mezcla de reacción contenía B, se sustituyeron 50µl de tampón por 50µl de una solución de 500 ppm de BO_3H_3 en tampón (B en la mezcla= 16,7 ppm).

Las incubaciones se llevaron a cabo, por duplicado, durante 2 h a 30°C.

b) Extracción del ent-kaureno formado: Transcurrido el período de incubación, la reacción se detuvo adicionando 3ml de una mezcla de acetona: benceno (1:2 v/v) a la mezcla de reacción. Tras agitación y centrifugación para separar las dos capas formadas, se extrajo la capa superior con ayuda de una pipeta Pasteur. Esta extracción se repitió 2 veces más.

c) Evaporación de los extractos de acetona: benceno hasta sequedad con ayuda de un rotavapor.

d) Adición de 200µl de acetona al residuo seco para redissolver el ¹⁴C ent-kaureno formado.

e) Aplicación en capa fina en placas de silicagel 60 de 0,25mm de espesor y desarrollo en n-hexano. En cada placa se aplicó un patrón de ent-kaureno radiactivo puro.

f) Raspado de las placas en las zonas correspondientes al ent-kaureno radiactivo. Este silicagel se colocó en viales de conteo a las que se añadió 10ml de líquido de centelleo.

El líquido de centelleo se componía de tolueno con 4g de PPO* + 0,05g de **POPOP/1.

Los viales se contaron en un analizador de centelleo líquido marca Beckman.

Los resultados se expresaron como dpm/g p. fresco.

2.9.4.- Determinación del contenido de giberelinas solubles.- Como ya hemos señalado anteriormente, y con el fin de correlacionar el contenido de giberelinas solubles con la biosíntesis de su precursor, ent-kaureno, estas hormonas se extrajeron a partir de los 20cm superiores de los tallos de girasol.

2.9.4.1.- Extracción y purificación de giberelinas.- Se siguió el método de Barendse et al., (1980) con algunas modificaciones, dadas por este mismo autor en comunicación personal.

Entre 1,5 y 5g de tallo congelado se homogeneizaron en un Sorvall omni mixer con 50ml de metanol. Tras filtración a través de papel, el residuo se reextrajo con otros 50ml de metanol y se mantuvo en agitación durante la noche. Posteriormente se volvió a filtrar a través de papel y el filtrado combinado (aproximadamente 100ml) se concentró en rotavapor hasta unos 15ml.

Este concentrado se purificó haciéndolo pasar a través de un cartucho Sep-Pak C₁₈ (Waters associated), que retiene los compuestos apolares. El filtrado fué evaporado de nuevo hasta un volumen de unos 5ml y se volvió a pasar a través de otro cartucho

*PPO-2,5difeniloxazol**POPOP-2,2-p-fenilen-bis (5-feniloxazol).

Sep-Pak C₁₈. Finalmente se evaporó hasta sequedad, por liofilización.

2.9.4.2.- Medida del contenido de giberelinas a través de bioensayo.- Se siguió el método de Murakami (1968).

Los extractos se redisolviéron en 200µl de etanol al 10% en agua. A partir de estos extractos se prepararon 2 diluciones: 1/2, 1/4 con el fin de estudiar la dilución idónea para realizar el bioensayo.

Para el bioensayo se utilizaron semillas de arroz enano del tipo Tan-ginbozu, suministradas por el Dr. Takeshi Omura.

Estas semillas se imbibieron durante dos días en agua destilada (a las 24h se cambió el agua) en una cámara iluminada y a 30⁺1°C. Una vez germinadas las semillas, se sembraron en bateas de plástico que contenían agar al 0,65% en hileras de 7. Estas bateas se mantuvieron durante 48h, en cámara en las condiciones ya descritas. Pasado este tiempo, las semillas se trataron con los diferentes extractos. Se utilizaron 4 hileras de semillas para cada muestra (1 hilera para cada una de las 4 diluciones) y dentro de cada hilera se seleccionaron 5 semillas a cada una de las cuales se aplicó 1µl de extracto en la base de la priemra hoja.

A los 5 días de la aplicación del tratamiento se midió la longitud del tallo entre la base de la primera hoja y la de la segunda. La longitud medida se comparó con una curva patrón de concentraciones de GA₃ entre 10⁻⁷ y 10⁻⁴M. La actividad gibere_línica se expresó como porcentaje de incremento respecto al tratamien_{to} en blanco (etanol al 10% en agua).

2.10.- Determinación del contenido proteico de los extractos enzimáticos.- En las cinco experiencias ya descritas se determinó el contenido de proteínas de los extractos vegetales que se utilizaron para la medida de las actividades enzimáticas.

El método seguido fué el de Bradford (1976). Este ensayo presenta la ventaja de no estar sometido a las interferencias que en otros métodos causan los fenoles, sustancias muy abundantes en extractos vegetales.

En este método se utiliza tan solo un reactivo: solución concentrada de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad laboratories), que se utiliza diluída 5 veces con agua destilada y filtrado a través de Whatman nº 1.

A 100µl de muestras aproximadamente diluídas se añadieron 5ml de reactivo diluído y se midió la absorbancia a 595nm, en un espectrofotómetro de doble haz frente a un blanco preparado con 100µl de tampón. El contenido de proteínas (en µg/ml) se determinó interpolando los valores de absorbancia en una curva patrón preparada con albúmina bovina en concentraciones de 200 a 1000 µg/ml):

Finalmente, los resultados de contenido proteico se expresaron como mg de proteínas/gramo de peso fresco.

2.11.- Determinaciones analíticas.

2.11.1.- Determinaciones de Cu, Fe, Mn y Zn.-

Para el análisis de estos microelementos se partió de un mineralizado clorhídrico de las cenizas del material vegetal, según el método propuesto por C.I.E.T.D.F. (1969), complementado con el trabajo de Pinta (1973), determinándose en él cada uno de estos microelementos por espectrometría de Absorción atómica, a las siguientes longitudes de onda:

Mn	2795A
Zn	2601 "
Cu	3247 "
Fe	2483 "

Se utilizó llama de aire-acetileno en todos los casos.

2.11.2.- Determinación del Boro.- El B fué determinado por fotometría, a partir del mismo mineralizado que los otros elementos, midiendo el cambio de absorción a 410nm, tras la formación de un complejo con la Azometina-II (Lachica, 1977). En todas las manipulaciones se utilizó papel de filtro lavado con ClH para eliminar la contaminación de B de este material.

2.12.- Método estadístico aplicado al estudio de los resultados obtenidos.- Se realizó el tipo de estudio estadístico que detallamos a continuación.

Análisis I-a. Se realizó el análisis del diseño factorial de cuatro factores. Dichos factores eran: tratamientos de B: nivel deficiente 0,05 ppm ó 0,00 ppm según los casos, normal (0,5 ppm) y tóxico (5 ppm); tiempo de permanencia en soluciones diferenciales de B: 0, 7, 14, 21 y 28 días; infiltración: hojas infiltradas, hojas sin infiltrar; bloques: cuatro.

De los cuatro factores con los que se trabajaba, tres, eran de efectos fijos (dosis, tiempo e infiltración) y el cuarto (bloques) era de efectos aleatorios.

Este análisis se realizó por dos razones: a) con objeto de ver si la infiltración con boro hacía variar los niveles del parámetro en estudio; b) para estudiar las variaciones que provocaban los otros dos factores de efectos fijos y ver si existía contradicción en el análisis para estos factores que se realizaba en el análisis I-b.

En este análisis nunca se encontraron diferencias entre la infiltración o no, y además los resultados para los otros factores no entraban en contradicción en los del análisis I-b, por lo que en esta etapa nunca se pasó de la tabla del análisis de la varianza y de la observación de las medias.

Análisis I-b. Se realizó el análisis de un diseño factorial de 3 factores tratamientos de B: 0,05 ppm ó 0,00 ppm, según los casos (deficientes), 0,5 ppm (normal) y 5 (tóxico); tiempo: 0,7, 14, 21 y 28 días; bloques: 4 bloques aleatorios.

Este análisis (que es el principal de todos los hechos) se realizó con objeto de ver si los factores tratamientos y tiempo afectaban o no al nivel medio del parámetro en estudio, así como para ver si los distintos niveles de uno afectaban de igual forma a las medias para cada uno de los niveles del otro, es decir, para ver si existía interacción entre ambos factores o no.

En 1^{er} lugar, se realizó la tabla del análisis de la varianza, y a partir de ella se concluía la existencia o no de significación para los factores, así como de la interacción entre ambos. Si no existían diferencias significativas para los factores ni tampoco interacción, el estudio se concluía afirmando que ambos factores no influenciaban el parámetro, y que esa falta de influencia era para todos los niveles de un factor dentro de cada uno de los niveles del otro.

Cuando la influencia de uno o de los dos factores era significativa pero no así la interacción se realizó un estudio pormenorizado de las diferencias entre las medias de los niveles del factor o factores. Este estudio se realizó en la mayoría de los casos de dos maneras distintas que permitían matizar aspectos diferentes. Así, se hicieron las comparaciones de medias por el método de secuencia o de Newman-Kents, buscando las significaciones en la tabla de la t de Tukey. Se hizo también un estudio de la curva de respuesta para los diferentes niveles del factor mediante contrastes ortogonales que nos permitían afirmar si la curva de respuesta era de primer grado o superior. Este último estudio tenía sentido realizarlo para el factor tiempo en la escala original, ya que sus niveles estaban aquí espaciados, y para el factor dosis en la escala logarítmica, escala en la que los niveles estaban equiespaciados. En los casos en los que la dosis deficiente era de 0 ppm y no de 0,05 ppm este estudio no es correcto pues los polinomios ortogonales clásicos (que son los usados en este caso) no valen para niveles no equiespaciados.

Cuando la interacción dió significativa, y uno o los dos factores también, se realizó el mismo estudio que antes pero ahora particularizado para cada uno de los niveles de uno de los factores. Es decir, variación entre los niveles de un factor para todos y cada uno de los niveles del otro.

Análisis II. Con objeto de cuantificar y evidenciar mejor las diferencias encontradas en el Análisis I-b se realizó el estudio de la comparación entre tratamientos y entre tiempos de la relación (%) con respecto al tiempo 0 de cada uno de los tiempos Dicho estudio se realizó mediante un análisis del diseño

con tres factores: Ttos. de B (con los mismos niveles de antes)% tiempos, con los niveles 7, 14, 21, 28 y Bloques (4). En caso de significación se realizaba el mismo estudio descrito para el Análisis I-b.

Análisis III. Este análisis es análogo al II pero calculando la relación, para todos los tiempos, de los Ttos. deficiente y tóxico con respecto al normal. Queda entonces un diseño factorial de tres factores: Ttos. de B (2 niveles, deficiente y tóxico); tiempos (7, 14, 21 y 28) y bloques (4). Dicho análisis, salvo las excepciones hechas es absolutamente análogo en su realización al II.

Análisis IV. Para determinadas parejas de parámetros, se pretendía saber si existía correlación. Como el esquema en el que estaban dispuestas las parejas de observaciones eran en el fondo de bloques aleatorios para estudiar si existía relación lineal entre ambas variables se realizó un contraste de hipótesis para la pendiente de regresión común, siguiendo el esquema de tal contraste en un análisis de covarianza para bloques aleatorios. Este contraste se basa en la suposición de que para todos los tratamientos las pendientes de las líneas de regresión son las mismas. Observando esto en las diferentes tablas, no se encontraron grandes diferencias entre tales pendientes. Realizado el contraste al que nos referíamos antes (contraste que se hace a partir de la fila de error) se calculó el coeficiente de correlación a partir de tal fila y la altura de la línea de regresión de la manera clásica, a partir de los datos totales. Este estudio se realizó con el objeto de calcular el coeficiente de correlación y dar la ecuación de la línea de regresión en los casos en que el coeficiente de correlación era significativamente distinto de cero.

3.- RESULTADOS Y DISCUSION

TABLAS Y GRAFICAS

Tiempo en sol.diferencial (días)	Tratamientos (ppm de B en solución)																			
	B= 0,05 ppm					B= 0,1 ppm					B= 0,5 ppm					B= 3 ppm				
	0	2	5	15	23	0	2	5	15	23	0	2	5	15	23	0	2	5	15	23
Infiltradas con B	14,55	14,40	14,40	20,81	13,17	17,36	15,73	16,07	26,29	12,09	18,96	15,64	13,89	17,76	9,41	-	-	-	-	-
Infiltradas con H ₂ O	13,15	15,80	16,79	22,23	13,86	18,26	15,03	15,36	27,84	11,10	19,08	13,45	11,99	18,03	10,26	14,94	17,09	15,60	13,11	12,99
X (Inf.B= inf. H ₂ O)	13,85	15,10	15,60	21,52	13,52	17,81	15,38	15,72	27,07	11,60	19,02	14,55	12,94	17,90	9,84	14,94	17,09	15,60	13,11	12,99

Análisis Estadístico

	Evolución con el t ² (inf.B=inf.H ₂ O)						
	Ttos. de B	Inf.B	inf.H ₂ O	B=0,05ppm	B=0,1ppm	B=0,5ppm	B= 3ppm
N.P.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	N.S.	N.S.
M.D.S.	10%	-	-	-	7,51	-	-
	5%	-	-	-	9,31	-	-
	1%	-	-	-	13,54	-	-

Tabla 1.- Experiencia previa.

PEROXIDASA: Evolución en el tiempo de la actividad específica (Δ D.O./min. x mg proteína) de los extractos enzimáticos de hoja de girasol en cada uno de los cuatro tratamientos. Los datos representan la media de tres repeticiones.

Tratamientos (ppm B en solución)

Tiempo en sol.diferencial (días)	B= 0,05ppm					B= 0,1ppm					B= 0,5ppm					B= 3ppm				
	0	2	5	15	23	0	2	5	15	23	0	2	5	15	23	0	2	5	15	23
Infiltradas con B	4,83	4,34	4,87	8,13	3,18	4,70	4,79	5,73	7,69	3,35	4,44	4,25	5,60	5,52	3,29	-	-	-	-	-
Infiltradas con H ₂ O	5,27	4,65	4,40	5,32	2,09	4,83	5,14	5,41	6,19	2,10	4,39	4,74	5,27	5,90	3,23	4,77	4,52	5,35	6,61	2,63
\bar{X} (Inf.B= inf. H ₂ O)	5,06	4,49	4,63	6,81	2,63	4,76	4,97	5,57	6,94	2,76	4,42	4,50	5,44	5,71	3,26	4,77	4,52	5,35	6,61	2,63

Análisis estadístico

		Evolución con el t ² (inf.B=inf.H ₂ O)						
		Ttos. B	Inf.B	inf.H ₂ O	B=0,05ppm	B=0,1ppm	B= 0,5ppm	B= 3 ppm
N.P.		N.S.	N.S.		P<0,05	P<0,05	N.S.	P<0,01
	10%	-	-		1,60	1,60	-	1,29
M.D.S.	5%	-	-		1,98	1,99	-	1,60
	1%	-	-		2,83	2,89	-	2,32

Tabla 2.- Experiencia previa.

CATALASA: Evolución en el tiempo de la actividad específica (umoles de H₂O₂ destruidos/min. x mg de proteína) de los extractos enzimáticos de hoja de girasol en cada uno de los cuatro tratamientos.

Los datos representan la media de tres repeticiones.

Tratamientos (ppm de B en solución)

Tiempo en sol.diferencial (días)	B= 0,05ppm					B= 0,1ppm					B= 0,5ppm					B= 3ppm				
	0	2	5	15	23	0	2	5	15	23	0	2	5	15	23	0	2	5	15	23
Infiltradas con B	1,638	1,975	1,787	1,831	3,867	1,734	1,788	1,724	2,100	4,033	1,917	1,579	1,528	2,095	3,672	-	-	-	-	-
Infiltradas con H ₂ O	1,737	1,791	1,806	2,567	4,258	1,623	1,630	1,665	2,119	4,189	1,936	1,630	1,487	2,344	3,887	1,715	1,719	1,829	1,933	4,128
\bar{X} (Inf.B= inf. H ₂ O)	1,688	1,885	1,798	2,199	4,063	1,679	1,710	1,695	2,110	4,111	1,927	1,680	1,503	2,220	3,780	1,715	1,719	1,829	1,933	4,128

Análisis Estadístico

	Ttos. B	Inf.B	inf.H ₂ O	Evolución con el t ² (inf.B= inf. H ₂ O)			
				B=0,05ppm	B=0,1ppm	B=0,5ppm	B= 3ppm
N.P.	N.S.		N.S.	P<0,001	P<0,001	P<0,0001	P<0,001
10%	-		-	0,60	0,39	0,27	0,65
5%	-		-	0,75	0,48	0,38	0,81
M.D.S. 1%	-		-	1,03	0,70	0,49	1,18
1%	-		-	1,64	1,05	0,74	1,77

Tabla 3.- Experiencia previa.

CONTENIDO PROTEICO. Evolución en el tiempo del contenido proteico (mg/ml de extracto) de los extractos enzimáticos de hoja de girasol que se utilizaron para la determinación de las actividades catalásica y peroxidásica en cada uno de los cuatro tratamientos. Los datos representan la media de tres repeticiones.

	Tratamientos (ppm de B)								
	0,05		0,10		0,50		3,00		
	S.I.	I _{H₂O}	S.I.	I _{H₂O}	S.I.	I _{H₂O}	S.I.	I _{H₂O}	
Peroxidasas (Δ D.O./min.x mg prot.)	15,65	13,68	10,38	11,10	6,99	10,25	14,21	12,99	N.S.
Catalasa $\frac{\mu\text{moles H}_2\text{O destr.}}{\text{min. x mg prot.}}$	3,80	2,09	3,07	2,16	4,21	3,23	2,10	2,63	P<0,0
Contenido proteico (mg/ml de ext.)	2,60	4,29	3,06	4,19	2,54	3,89	2,86	4,13	P<0,0

M. D. S.

	10%	5%	2%	1%	1%
Catalasa (S.I.-H ₂ O)	0,81	0,99	1,21	1,38	1,91
Contenido proteico (S.I.-H ₂ O)	0,66	0,80	0,98	1,12	1,55

Tabla 4.- Experiencia previa.

Comparación entre las actividades catalásica y peroxidásica así como contenido proteico entre extractos procedentes de hojas no infiltradas e infiltradas con H₂O. Todas ellas corresponden a la 5ª recogida (23 días en solución diferencial). Los datos representan la media de 3 repeticiones.

S.I. .- Hojas sin infiltrar.

I_{H₂O} .- Infiltradas con H₂O.

Relación del extracto (p/v)

Edad	1:1	1:2	1:4
30 días	16,137	15,629	-
40 días	23,227	17,826	22,232

Tabla 5.- Experiencia previa.

C¹⁴ ent-kaureno extraído de incubaciones llevadas a cabo con extractos procedentes del 1º y 2º entrenudos del tallo. En todas las zonas el material vegetal estaba congelado. Los resultados se expresan como dpm/mg de proteína en el extracto y representan la media de 3 repeticiones.

	Días	Sin farnesol	Con farnesol
Cotiledones y ½cm de tallo	4	7,55	25,51
	5	1,58	4,99
Cotiledones	7	14,44	10,20
Tallos	5	6,131	10,300
Tallos y Raíces	7	2,313	2,792
Apices de	7	2,220	1,429
Tallo	18	2,761	2,340
Raíces	18	222	124
Hojas	18	7,31	11,20

Tabla 6.- Experiencia previa.

Medidas del C¹⁴ ent-kaureno extraído en distintas partes de la planta y en diferentes momentos tras la germinación de las semillas. El extracto utilizado tenía una relación 1:1 (p/v) y los resultados se expresan como dpm/mg proteína. Media de dos repeticiones.

Curva patrón de ácido giberélico

Concentración Molar	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
% elongación respecto al blanco	124,40	145,83	243,45	364,29

Nº fracción	% respecto al blanco	Concentr. (M)	Nº fracción	% respecto al blanco	Concentr. (M)
1	118,45	$10^{-6,86}$	17	118,45	$10^{-6,85}$
3	117,86	$10^{-6,86}$	18	113,69	$10^{-6,91}$
*4	149,40	$10^{-6,44}$	19	116,67	$10^{-6,86}$
*5	125,60	$10^{-6,76}$	*20	123,21	$10^{-6,80}$
6	116,67	$10^{-6,86}$	21	111,31	$10^{-6,95}$
7	111,31	$10^{-6,92}$	22	103,93	$10^{-6,98}$
8	111,90	$10^{-6,92}$	23	111,31	$10^{-6,92}$
9	112,50	$10^{-6,92}$	*24	130,36	$10^{-6,48}$
10	111,31	$10^{-6,92}$	25	108,93	$10^{-6,98}$
11	113,69	$10^{-6,91}$	26	113,10	$10^{-6,92}$
12	114,83	$10^{-6,90}$	27	120,83	$10^{-6,84}$
13	116,67	$10^{-6,86}$	28	111,31	$10^{-6,92}$
14	122,62	$10^{-6,92}$	29	119,64	$10^{-6,84}$
15	113,10	$10^{-6,92}$	*30	127,38	$10^{-6,76}$
16	116,07	$10^{-6,88}$			

* Picos de máxima actividad giberelínica.

Tabla 7.- Experiencia previa.

Resultados del bioensayo de arroz enano Tan-ginzobu utilizando como material vegetal semillas de Pharbitis nil. Los datos representan la media de 7 repeticiones.

<u>Patrones</u>		<u>Muestras</u>		
Concentración (M)	% respecto al blanco	Diluciones	% respecto al blanco	Concentración en el extracto (M)
10^{-7}	116,7	1/16	114,0	$10^{-6,72}$
10^{-6}	164,5	1/8	107,0	$10^{-6,98}$
10^{-5}	265,1	1/4	106,5	$10^{-6,98}$
10^{-4}	345,7	1/2	110,2	$10^{-6,95}$
		1	140,3	$10^{-6,58}$

Tabla 8.- Experiencia previa.

Resultados del bioensayo de arroz enano Tan-ginzobu utilizando como material vegetal plantas de girasol. Los resultados representan la media de 10 repeticiones.

Tabla 9.- 1ª Experiencia: Actividad peroxidásica en hojas (Δ D.O. 460nm/min x g p. fresco hoja.). (*): H: Hojas infiltradas con agua destilada; B= hojas infiltradas con B (15 ppm).

Días	B= 0,05 ppm										B= 0,5 ppm										B= 5 ppm				
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H(*)	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	H
I	23	28	60	48	290	442	75	70	63	65	30	38	88	95	54	69	92	110	68	85	23	89	80	73	82
II	29	36	118	108	282	263	59	50	70	70	47	46	74	54	83	103	58	80	104	130	80	55	66	62	291
III	27	19	63	60	83	79	68	75	161	167	37	49	34	45	227	197	131	185	81	74	29	41	101	98	106
IV	26	26	174	210	124	85	446	256	155	158	174	163	66	47	63	51	83	98	76	81	32	70	58	62	84

Análisis de la Varianza para la actividad peroxidásica.

- I.- a) Considerando sólo los Ttos. deficiente y normal (infiltradas con Boro): No existen diferencias significativas entre la actividad de hojas infiltradas con agua e infiltradas con B.
- b) Considerando los tres tratamientos, no existen diferencias significativas ni entre los tratamientos ni entre las recogidas.

Tabla 9.- (Cont.).

Análisis de la varianza para la actividad peroxidasa.

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	19956,3683	9978,1842	1,87	N.S.
Tiempos	4	49043,8052	12260,9513	2,30	N.S.
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	43128,9301	5391,1162	1,01	N.S.
Bloques	3	9881,5421	3293,8474		
Error	42	223611,8524	5324,0917		

Tabla 10.- 1ª Experiencia: Actividad catalasa en hojas (μ moles H_2O_2 destruidos) min. g p. fresco hoja). (*)H: hojas infiltradas con agua; B= hojas infiltradas con solución de B (15 ppm).

Días	B= 0,05 ppm										B= 0,5 ppm										B= 5 ppm				
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H(*)	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	
I	0,87	0,66	2,44	3,55	3,68	3,97	3,11	3,11	4,83	5,05	1,74	2,48	3,15	3,44	2,90	3,56	4,64	3,88	4,80	5,13	0,79	1,12	3,39	5,34	6,54
II	1,70	1,61	2,15	2,69	5,09	3,89	3,97	4,35	6,09	6,58	1,49	1,41	2,98	3,23	4,31	4,26	4,76	3,56	5,84	4,80	2,48	2,77	4,26	4,18	6,83
III	2,36	1,70	2,40	2,19	3,31	4,26	2,86	3,31	6,21	6,50	2,40	6,50	2,65	2,40	6,02	3,15	4,35	4,51	6,67	6,09	1,90	3,52	4,64	4,39	6,33
IV	1,04	1,28	4,47	4,31	3,85	4,10	4,89	4,47	6,13	6,09	2,24	1,57	2,69	2,90	2,69	2,90	4,35	4,97	7,16	6,54	1,86	3,02	4,43	4,89	5,13
\bar{X}	1,49		2,87		3,98		3,71		5,82		1,97		2,87		3,23		4,53		6,12		1,76	2,61	4,18	4,70	6,21

Tabla 10.- (Cont.).

Análisis de la varianza para la actividad catalasa.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	1,0156	0,5078	1,06	N.S.
Tiempos	4	127,0348	31,7587	66,37	P < 0,001
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	4,2120	0,5265	1,10	N.S.
Bloques	3	4,1500	1,3833		
.....					
Error	42	20,0987	0,4785		

Tabla 10.- (Cont.).

Análisis de Varianza para la actividad Catalasa.

I.-a) Considerando solo los tratamientos deficiente y normal (que habían sido infiltrados con boro).

No existen diferencias significativas entre las actividades de las hojas infiltradas con boro y las infiltradas con agua.

b) Considerando los tres tratamientos.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	P<0,001
Tratamientos	--
Interacción	
Tiempos-tratamientos	--

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en solución diferencial).

	0	7	14	21
7	P<0,001	-	-	-
14	P<0,001	P<0,001	-	-
21	P<0,001	P<0,001	P<0,01	-
28	P<0,001	P<0,001	P<0,01	P<0,01

II.- Considerando el tiempo 0 como valor 100.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	P<0,01
Tratamientos	P<0,05
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	--

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en solución diferencial de B).

	7	14	21
14	N.S.	-	-
21	P<0,05	N.S.	-
28	P<0,01	P<0,05	N.S.

Nivel de significación entre los distintos tratamientos de B (expresados como ppm de B en solución).

	0,05	0,5	5
0,5	P<0,05	-	-
5	N.S.	N.S.	-

III.- Considerando el tratamientos normal (0,5 ppm de B) como valor 100, no existen diferencias significativas ni entre los tiempos ni entre los tratamientos.

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$

*** $P < 0,001$

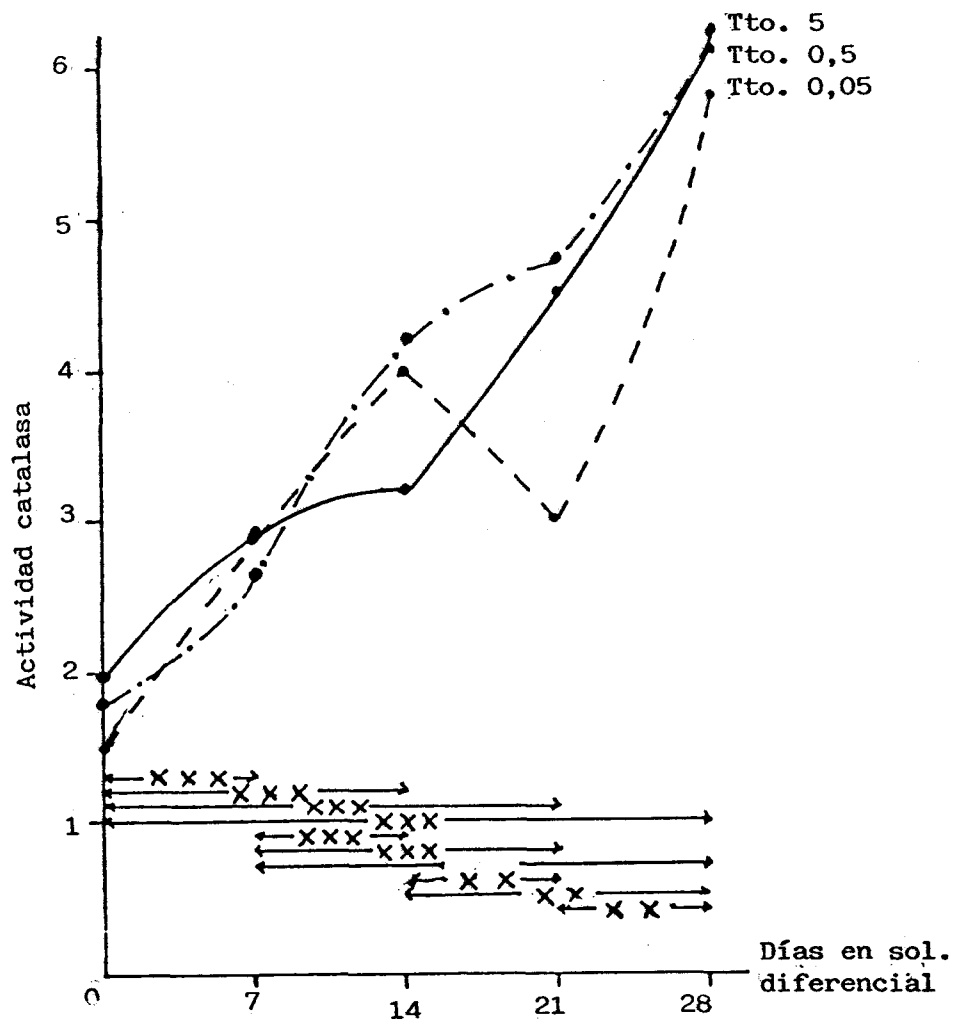


Fig. I.- Evolución en el tiempo de la actividad catalasa ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$ destruidos/min. x g p.f.) para cada uno de los tres tratamientos.

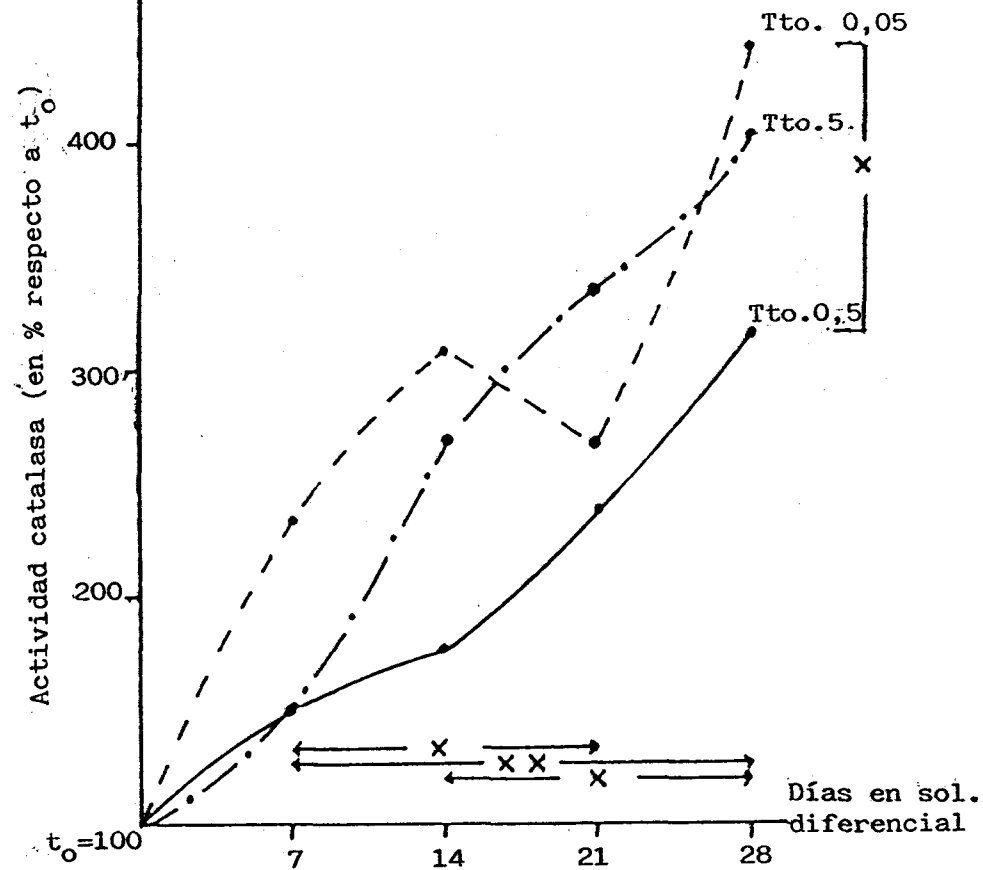


Fig. II.- Evolución en el tiempo de la actividad catalasa de las hojas, expresada como % de la actividad que existía en el momento de pasarlas a sol. diferenciales (1ª recogida: $t_0 = 100$).

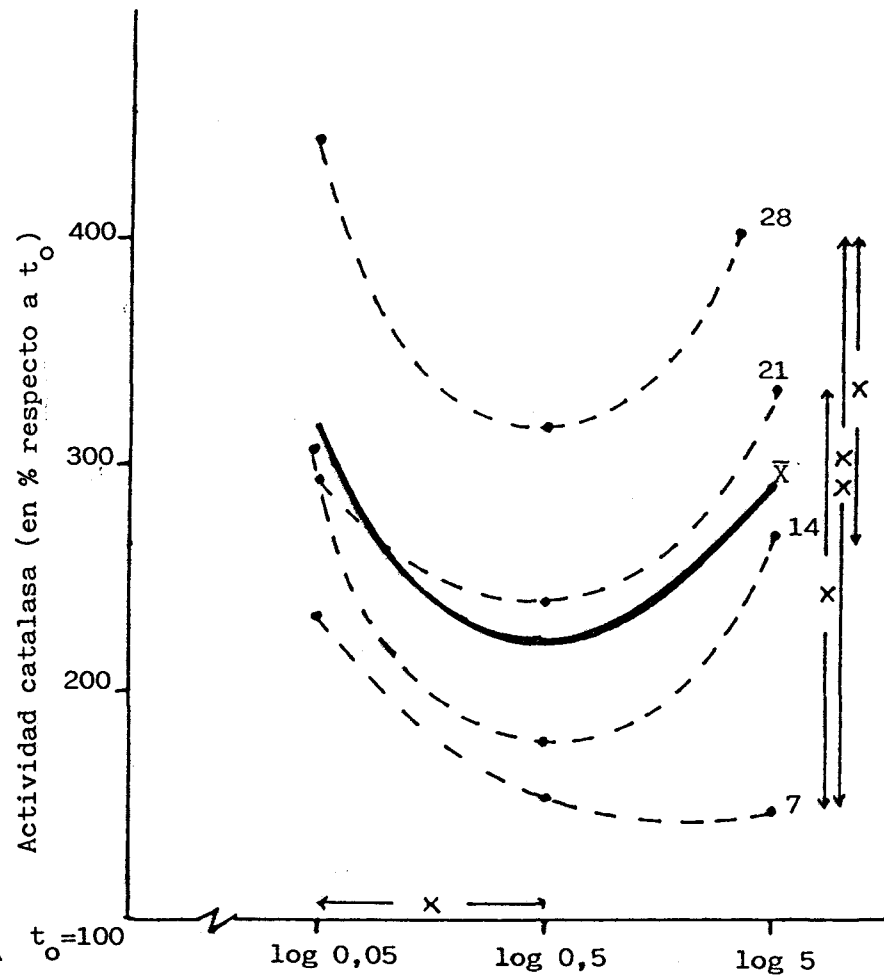


Fig. III.- Efecto de los Ttos. de B (log de la concentración de B en la sol. nutritiva), sobre la actividad catalasa en las hojas de cada una de las recogidas (% de la actividad en la 1ª recogida - $t_0 = 100$).

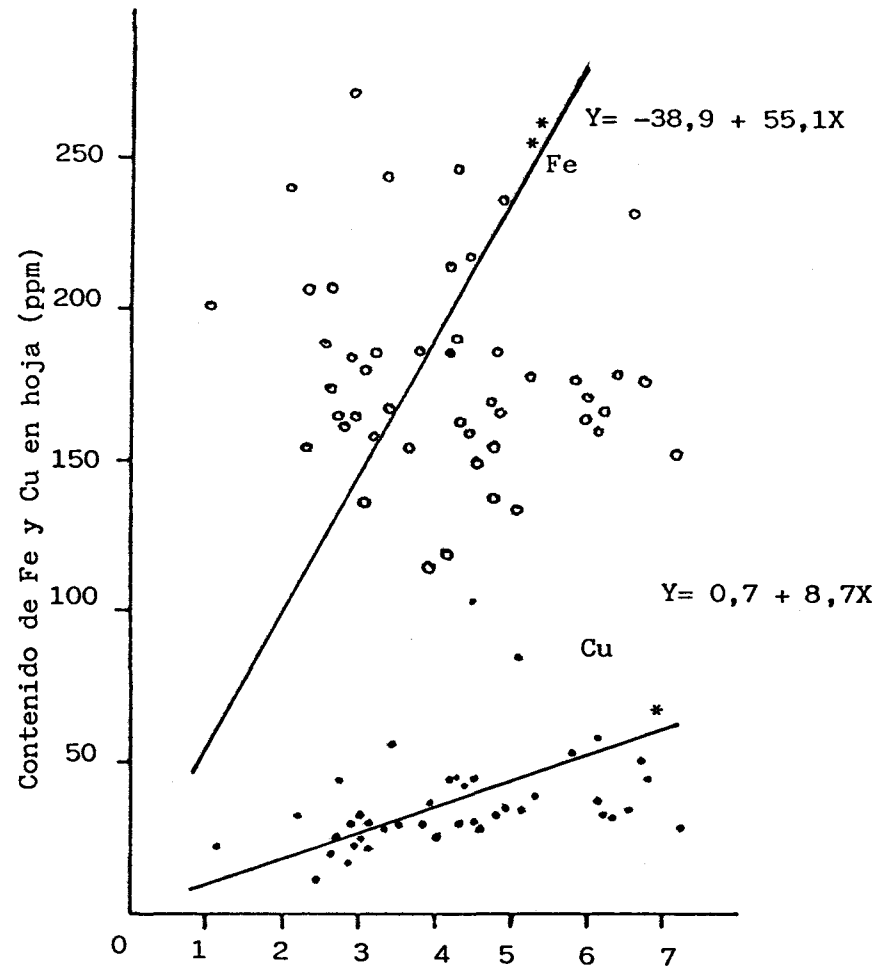


Fig. IV.- Rectas de regresión Act. catalasa en hoja ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$ destruido/min. x g p.f.)- Fe (ppm en hoja) y Act. catalasa en hoja- Cu (ppm en hoja).

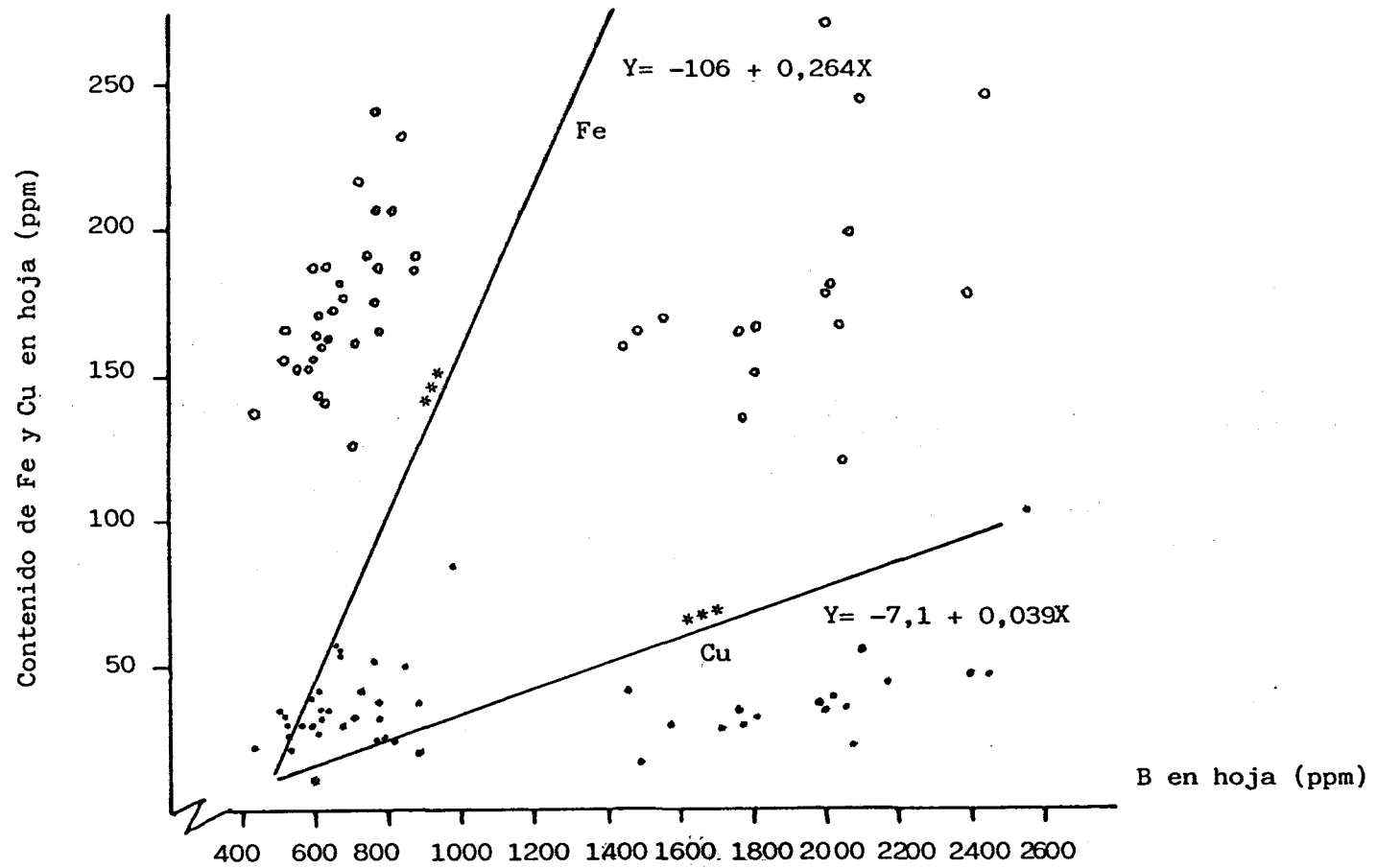


Fig. V.- Rectas de regresión B-Fe (ppm en hoja) y B-Cu (ppm en hoja).

Tabla 11.- 1ª Experiencia: Actividad AIA-oxidasa en hojas (Δ D.O. 252nm/min. g p. fresco hoja): (*) H: hojas infiltradas con agua; B: hojas infiltradas con solución de B (15 ppm).

Días	B= 0,05 ppm										B= 0,5 ppm										B= 5 ppm				
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H(*)	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	
I	3,06	2,69	3,33	3,66	3,03	3,45	2,58	3,12	3,39	2,78	2,20	2,40	3,45	2,65	3,42	2,67	2,91	2,71	2,61	3,87	2,51	4,53	2,13	3,39	3,18
II	5,67	3,81	3,81	2,74	3,93	3,18	3,30	2,73	4,71	3,96	2,41	2,15	2,99	3,45	3,93	3,48	2,46	3,54	4,02	3,81	2,63	4,11	2,46	3,39	4,50
III	2,56	2,98	2,69	2,99	3,33	4,08	3,60	4,11	3,84	4,29	2,69	2,36	3,75	3,12	2,96	2,52	3,54	2,25	2,94	2,58	3,51	3,65	3,42	3,72	3,90
IV	2,93	2,81	2,90	3,36	3,09	3,42	3,14	3,03	2,49	3,48	2,11	3,03	3,45	4,26	3,48	2,88	2,73	3,15	2,43	3,84	2,27	3,90	2,64	3,96	4,29
\bar{X}	3,56		3,18		3,35		3,14		3,61		2,35		3,41		3,45		2,91		3,00		2,73	4,05	2,66	3,62	3,97

Tabla 11.- (Cont.).

Análisis de la varianza para la actividad ácido indolacético-oxidasa.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	1,7508	0,8754	2,27	N.S.
Tiempos	4	3,7281	0,9320	2,42	N.S.
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	7,2903	1,8226	2,37	P < 0,001
Bloques	3	3,3973	1,1324		
Error	42	16,1665	0,3849		

Tabla 11.- (Cont.).

Análisis de la Varianza para la actividad AIA-oxidasa.

I.-a) Considerando solo los tratamientos deficiente y normal (que habían sido infiltrados con boro):

No existen diferencias significativas entre las actividades de las hojas infiltradas con boro y las infiltradas con agua.

b) Considerando los tres tratamientos:

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	-
<u>Tratamientos</u>	-
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempo-tratamientos</u>	P<0,001

Estudio de la interacción tiempos (días de permanencia en solución diferencial de B)-tratamientos (ppm de B en solución).

<u>Tratamientos</u>	<u>0,05</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>
<u>Tiempos</u>			
<u>0-14</u>	-	P<0,05	-
<u>7-14</u>	-	-	P<0,05

II.- Considerando el tiempo 0 como valor 100.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	N.S.
<u>Tratamientos</u>	P<0,001
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	N.S.

Nivel de significación entre los diferentes tratamientos de B (expresados como ppm de B en solución).

	<u>0,05</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>
<u>0,5</u>	P<0,01	-	-
<u>5</u>	P<0,01	N.S.	-

III.- Considerando el tratamiento normal (0,5 ppm de B) como valor 100. No hay diferencias significativas ni entre tiempo ni entre tratamientos.

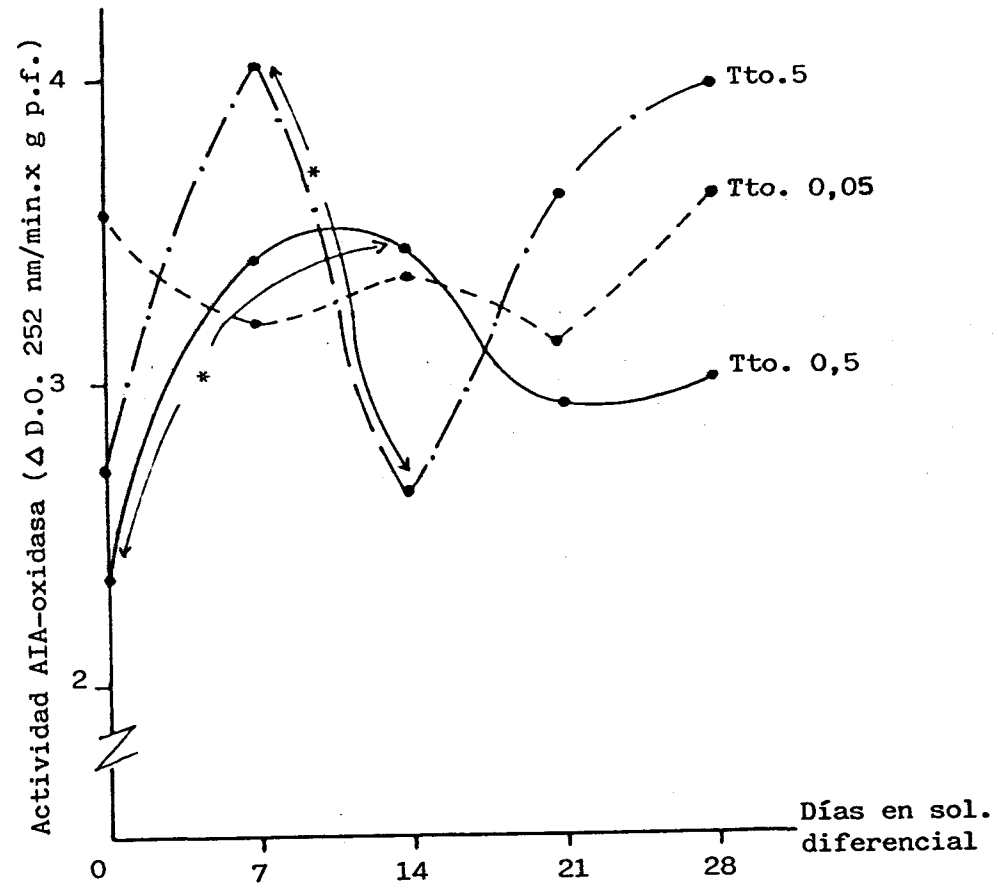


Fig. VI.- Evolución en el tiempo de la actividad AIA-oxidasa en las hojas para cada uno de los tratamientos.

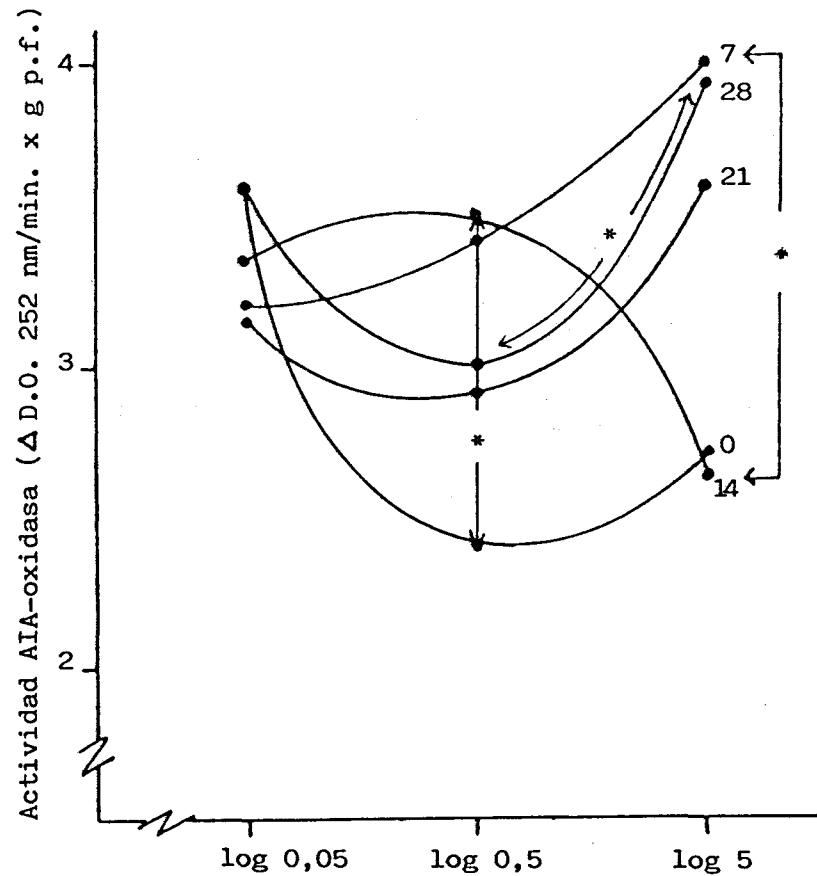


Fig. VII.- Efecto de los Ttos. de B (log de la concentración de B en la solución nutritiva) sobre la actividad AIA oxidasa en hoja según los días de permanencia en sol. diferencial (interacción Tiempo-Ttos.).

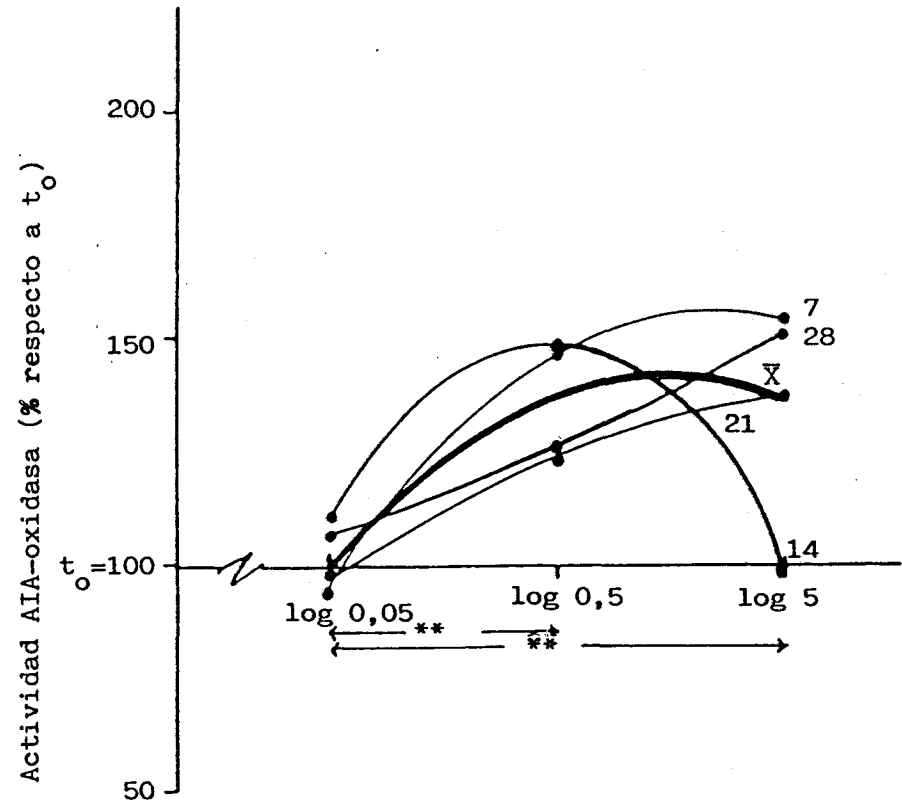


Fig. VIII.- Efecto de los Ttos. de B (log de la concentración de B en la sol. nutritiva) sobre la actividad AIA-oxidasa en las hojas de cada una de las recogidas (% respecto a la actividad existente en la 1ª recogida- $t_0 = 100$).

Tabla 12.- 2ª Experiencia: Actividad polifenol oxidasa (PPO) en hojas (Δ D.O. 370 nm/min. g p. fresco). (*) H: hojas infiltradas con agua destilada; B: hojas infiltradas con solución de B (15 ppm).

Días	B= 0,05 ppm										B= 0,5 ppm										B= 5 ppm				
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H(*)	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	H
I	20,6	19,0	20,6	22,6	21,0	21,6	19,6	18,8	21,2	18,6	18,2	17,6	33,1	33,5	22,2	21,6	23,8	23,8	20,0	17,6	24,8	35,0	20,8	31,2	29,2
II	12,6	15,4	29,0	24,4	17,6	18,0	16,8	20,6	19,0	17,2	19,8	19,4	23,4	22,8	24,6	23,2	27,6	28,4	16,8	18,0	24,2	53,3	29,2	24,2	18,8
III	26,0	25,4	21,2	22,6	22,2	23,8	20,2	22,4	19,6	17,6	19,8	19,4	21,4	22,8	24,4	25,0	30,6	31,0	19,2	19,4	17,2	29,6	22,4	33,8	21,6
IV	15,4	14,8	27,8	26,8	26,4	27,8	14,4	14,0	18,6	21,8	23,2	21,8	20,0	27,6	16,0	14,6	19,8	22,6	22,2	21,4	22,0	37,2	29,2	29,0	21,6
\bar{X}	18,7	18,7	24,7	24,1	21,8	22,8	17,7	19,0	19,6	18,8	20,3	19,6	24,5	26,7	21,8	21,1	25,5	26,5	19,6	19,1	22,0	38,8	25,4	29,6	22,8

Tabla 12.- (Cont.).

Análisis de la varianza para la actividad polifenol-oxidasa.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	566,293	283,1465	12,68	P < 0,001
Tiempos	4	632,206	158,0515	6,80	P < 0,001
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	347,596	43,4495	1,87	N.S.
Bloques	3	13,542	4,514		
Error	42	976,343	23,2463		

Tabla 12.- (Cont.).

Análisis de la Varianza para la actividad PPO.

I.-a) Considerando solo los tratamientos deficiente y normal (que habían sido infiltrados con boro).

b) Considerando los tres tratamientos.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	<u>--</u>

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en solución diferencial de B).

	0	7	14	21
7	P<0,001	-	-	-
14	P<0,05	P<0,01	-	-
21	P<0,01	P<0,01	N.S.	-
28	N.S.	P<0,001	P<0,05	P<0,01

Nivel de significación entre los diferentes tratamientos (expresados como ppm de B en solución).

	0,05	0,5	5
0,5	0,10>P>0,05	-	-
5	P<0,001	P<0,001	-

II.-Considerando el tiempo 0 como valor 100. No existen diferencias significativas entre los tratamiento de B ni entre las distintas recogidas.

III.-Considerando el tratamiento normal (0,5 ppm de B) como 100.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	<u>-</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>P 0,001</u>
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	<u>-</u>

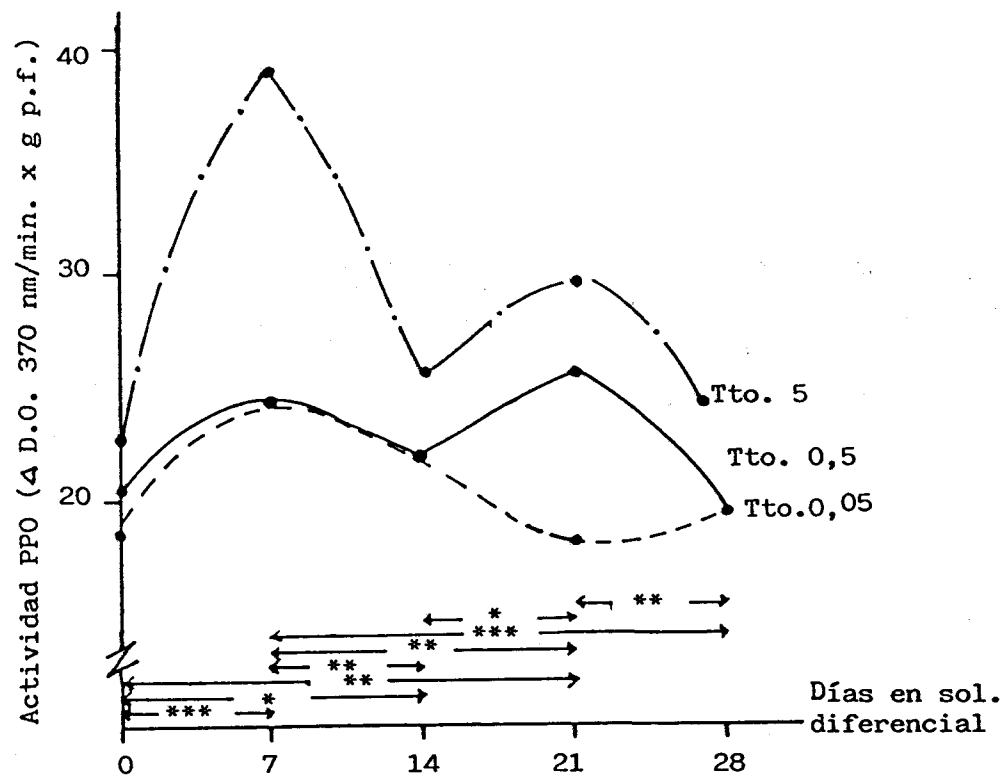


Fig. IX.- Evolución de la actividad polifenol oxidasa (PPO) en hojas con el tiempo de permanencia en soluciones diferenciales de B para cada uno de los tratamientos.

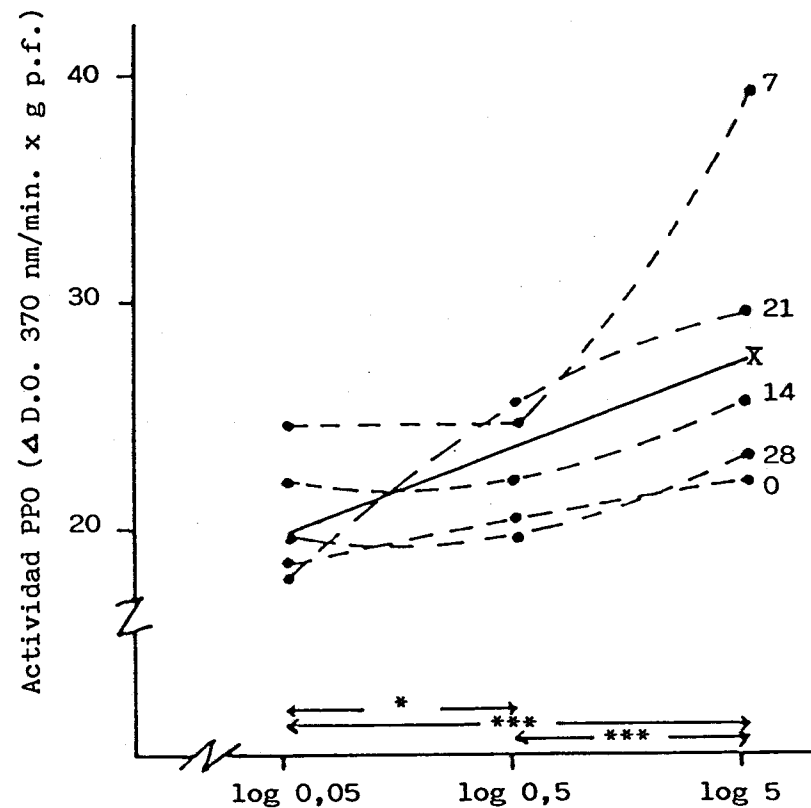


Fig. X.- Efecto de los Ttos. de B (expresados como log de la concentración de B en la solución nutritiva) sobre la actividad PPO de las hojas en las diferentes recogidas.

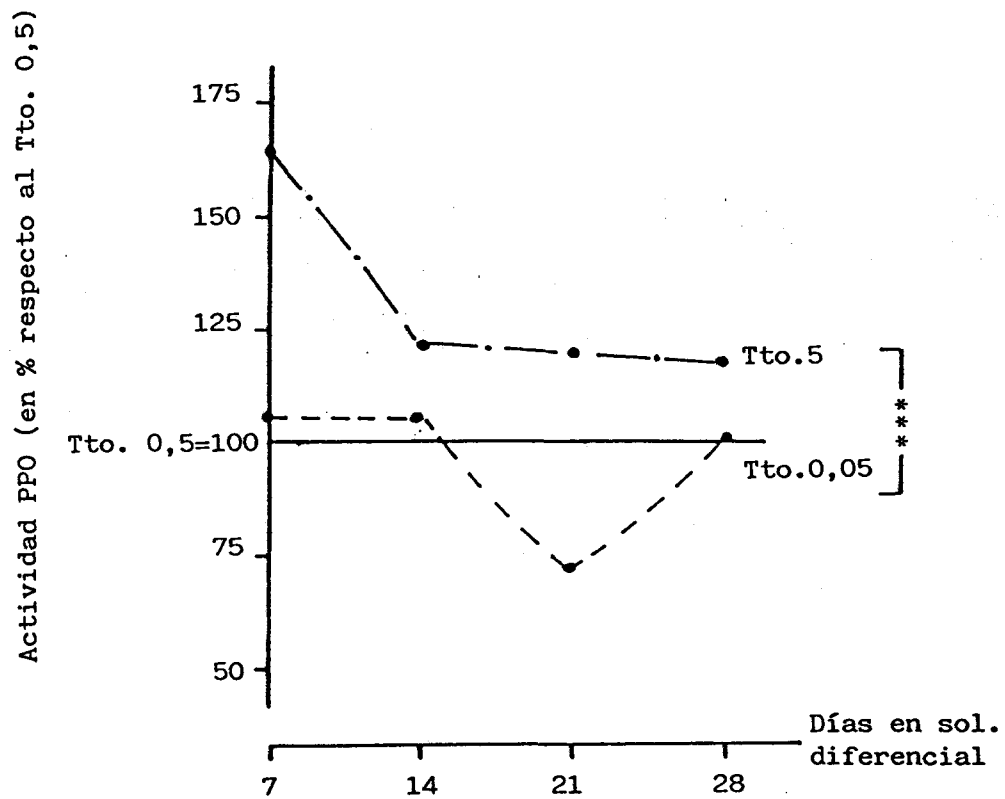


Fig. XI.- Evolución, con el tiempo de permanencia en soluciones diferenciales, de la actividad PPO en hojas de los tratamientos deficiente (B= 0,05 ppm) y tóxico (B= 5 ppm) frente al normal (B= 0,5 ppm) que se toma como línea basal Tto. 0,5=100).

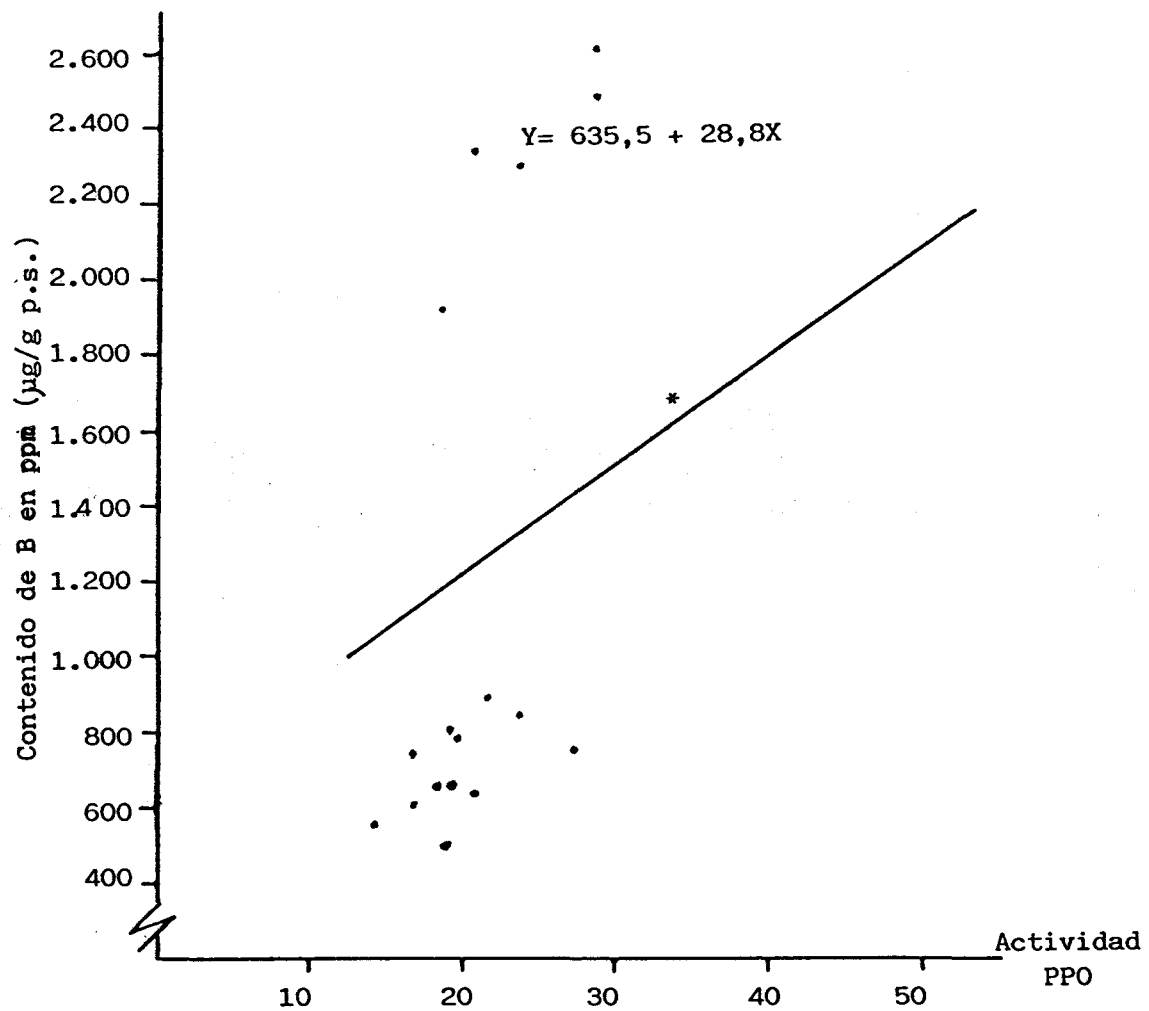


Fig. XII.- Recta de regresión actividad PPO en hojas (Δ D.O. 370 nm/min. g. p.f.)- Contenido de B en hojas (ppm)

Tabla 13.- Contenido en o-difenoles de la 2ª experiencia, como μg ác. cafeico/g p. fresco.

Repeticiones	Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
		0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
I		59,82	70,87	69,22	95,07	77,22	63,26	78,76	58,56	106,91	111,36	38,41	59,73	72,92	104,41	91,50
II		51,92	79,40	78,06	100,47	98,97	64,64	69,86	80,25	94,04	98,60	56,74	113,31	61,35	90,18	127,71
III		62,34	59,96	69,60	112,26	104,82	48,42	85,14	73,60	95,22	74,73	58,40	51,80	127,31	101,92	114,39
IV		57,17	62,67	76,70	88,41	119,33	56,21	87,13	84,98	91,84	87,81	37,01	72,53	88,88	97,68	110,76
\bar{X}		57,81	68,23	73,40	99,06	100,09	58,13	80,22	74,34	97,00	93,16	47,64	74,34	87,62	98,55	111,09

Tabla 13 .- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de o-difenoles en las hojas utilizadas para medir actividad polifenol oxidasa (2ª Experiencia).

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	190,39	95,20	0,46	N.S.
Tiempos	4	17584,68	4396,17	21,27	P < 0,001
<u>Interacción</u>					
Tiempos-tratamientos	8	1552,32	194,04	0,94	N.S.
Bloques	3	420,49	140,16		
.....					
Error	42	8680,18	206,67		

Tabla 13.- (Cont.).

Análisis de Varianza para el contenido en o-difenoles en la 2ª experiencia.

I.-

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>-</u>
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	<u>-</u>

Nivel de significación entre las distintas recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en solución diferencial de B).

	0	7	14	21
7	P<0,01	-	-	-
14	P<0,01	N.S.	-	-
21	P<0,01	N.S.	N.S.	-
28	P<0,01	N.S.	N.S.	N.S.

II.- Considerando el tiempo 0 como valor 100.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	<u>-</u>

Nivel de significación entre las distintas recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	7	14	21
14	P<0,01	-	-
21	P<0,01	P<0,05	-
28	P<0,01	P<0,05	N.S.

Nivel de significación entre los tratamientos de B (ppm de B en solución).

	0,05	0,5	5
0,5	N.S.	-	-
5	P<0,001	P<0,001	-

III.- Considerando el tratamiento normal (0,5 ppm de B en solución) como valor 100. No existen diferencias significativas ni entre los tratamientos de B ni entre las distintas recogidas.

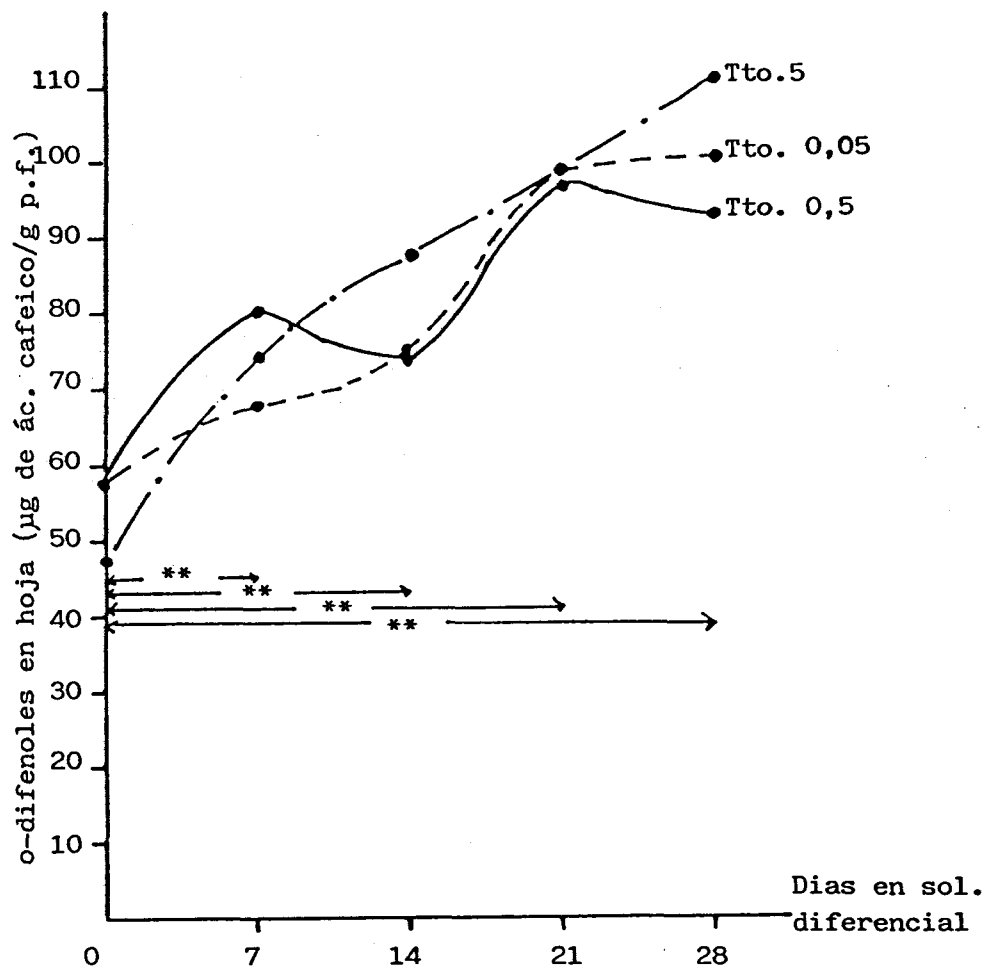


Fig. XIII.- Evolución en el tiempo del contenido de o-difenoles en las hojas utilizadas para la determinación de la actividad PPO para cada uno de los Ttos. de B.

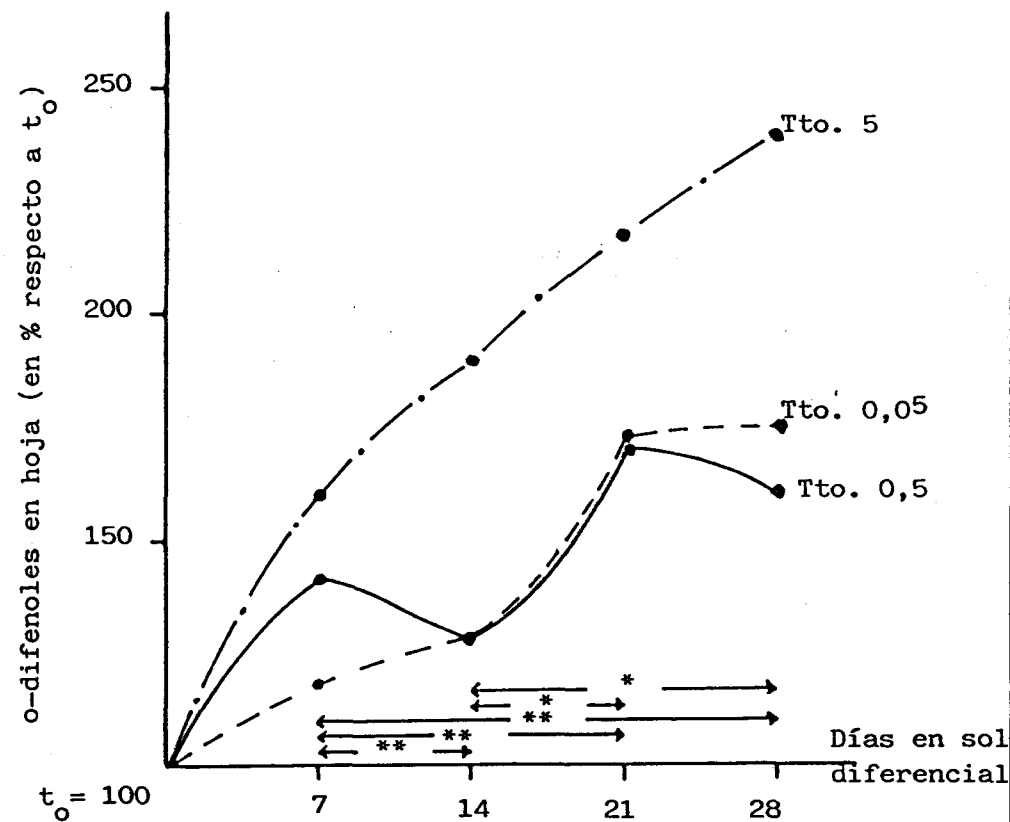


Fig. XIV.- Evolución en el tiempo del contenido de o-difenoles en hoja (expresada como % del que existía al pasar las plantas a soluciones diferenciales de B (1ª recogida: $t_0 = 100$)).

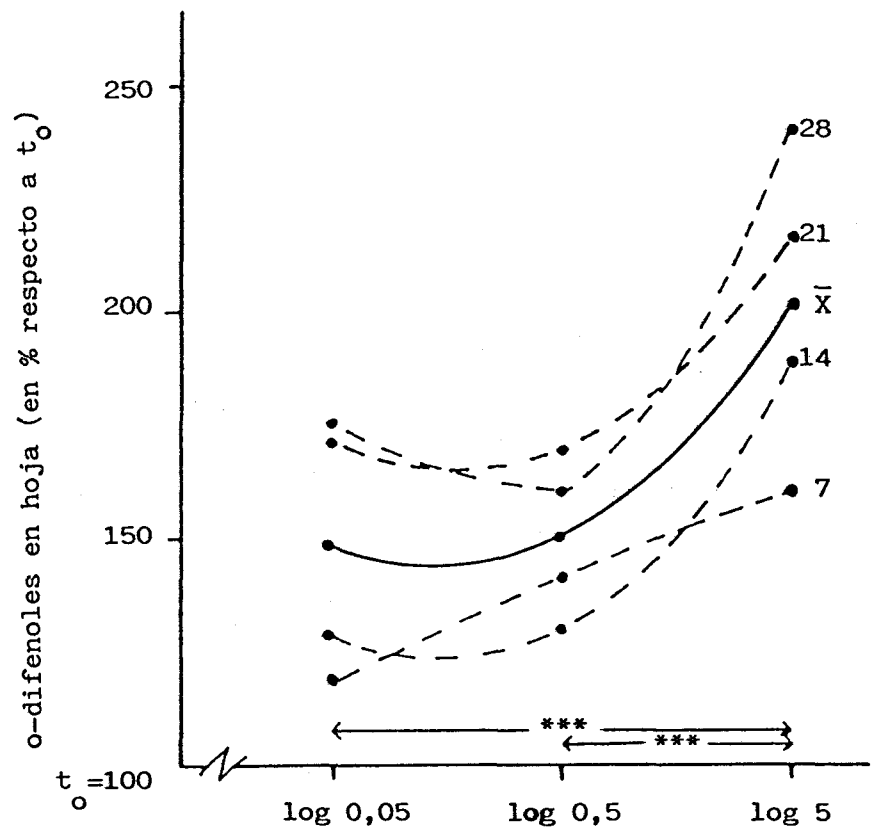


Fig. XV.- Efecto de los Ttos. de B (log de la concentración de B en la solución nutritiva) sobre el contenido de o-difenoles en las hojas de cada una de las re co gi das (% del existente en la 1ª recogida: $t_o=100$)

Tabla 14- 3ª Experiencia: Actividad glucosa 6P-deshidrogenasa en hojas (nmoles NADPH_2^+ /min. g p.fresco hoja). (*) H: hojas infiltradas con agua destilada; B: hojas infiltradas con sol. de Boro (15 ppm).

Días	B= 0,05 ppm										B= 0,5 ppm										B= 5 ppm				
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H(*)	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	
I	212	184	269	239	245	263	485	403	336	336	174	187	288	334	197	269	497	514	307	354	150	187	380	514	316
II	144	156	191	165	342	322	444	421	149	210	151	128	184	168	199	193	395	392	231	254	211	246	345	468	430
III	284	195	306	352	292	280	284	284	391	372	260	223	174	203	239	269	324	132	285	323	187	186	301	362	400
IV	270	285	248	226	309	340	380	430	323	304	197	212	187	187	310	292	324	310	328	342	197	303	435	371	420
\bar{X}	228		254		297		398		300		196		208		236		385		288		186	231	365	429	392

Tabla 14.- (Cont.).

Análisis de la varianza para la actividad glucosa-6-P-deshidrogenasa.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	33706,4	16853,2	4,31	P < 0,001
Tiempos	4	305209,0	76302,3	19,51	P < 0,001
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	37221,5	4656,4	1,19	N.S.
Bloques	3	10243,7	3414,6		
Error	42	164265,3	3911,1		

Tabla 14.- (Cont.).

Análisis de Varianza para la actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

I.-a)-Considerando solo los tratamientos deficiente y normal (que habían sido infiltrados con boro).

No existen diferencias significativas entre las actividades de las hojas infiltradas con B y las infiltradas con agua.

b) Considerando los tres tratamientos.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	<u>-</u>

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como n° de días de permanencia en solución diferencial de B).

	<u>0</u>	<u>7</u>	<u>14</u>	<u>21</u>
<u>7</u>	<u>N.S.</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>14</u>	<u>P<0,001</u>	<u>P<0,01</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>21</u>	<u>P<0,001</u>	<u>P<0,001</u>	<u>P<0,001</u>	
<u>28</u>	<u>P<0,001</u>	<u>P<0,001</u>	<u>N.S.</u>	<u>P<0,01</u>

Nivel de significación entre los diferentes tratamientos de B (ppm de B en solución).

	<u>0,05</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>
<u>0,5</u>	<u>P<0,05</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>5</u>	<u>P<0,05</u>	<u>P<0,01</u>	<u>-</u>

Tabla 14.- (Cont.).

II.-Considerando el tiempo 0 como valor 100.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>P<0,01</u>
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	<u>-</u>

Nivel de significación entre las distintas recogidas (expresadas como nº de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	<u>7</u>	<u>14</u>	<u>21</u>
<u>14</u>	<u>P<0,05</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>21</u>	<u>P<0,001</u>	<u>P<0,01</u>	<u>-</u>
<u>28</u>	<u>P<0,05</u>	<u>N.S.</u>	<u>P<0,01</u>

Nivel de significación entre los tratamientos de B (ppm de B en solución).

	<u>0,05</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>
<u>0,5</u>	<u>N.S.</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>5</u>	<u>P<0,01</u>	<u>P<0,01</u>	<u>-</u>

III.- Considerando el tratamiento normal (0,5 ppm de B en solución) como valor 100: No existen diferencias significativas ni entre los tratamiento de B ni entre las recogidas hechas a lo largo del tiempo.

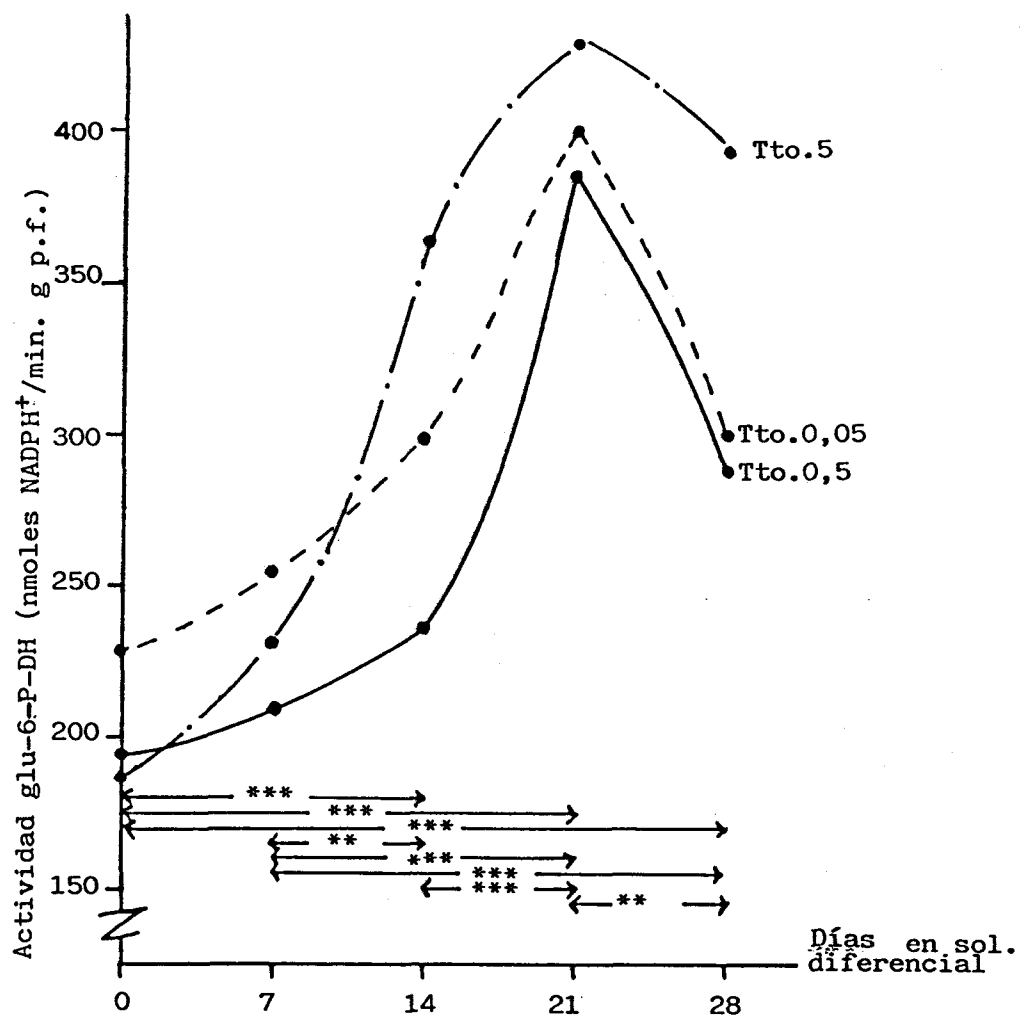


Fig. XVI.- Evolución en el tiempo de la act. glucosa-6-P-deshidrogenasa en hoja para cada uno de los tres Ttos. de B.

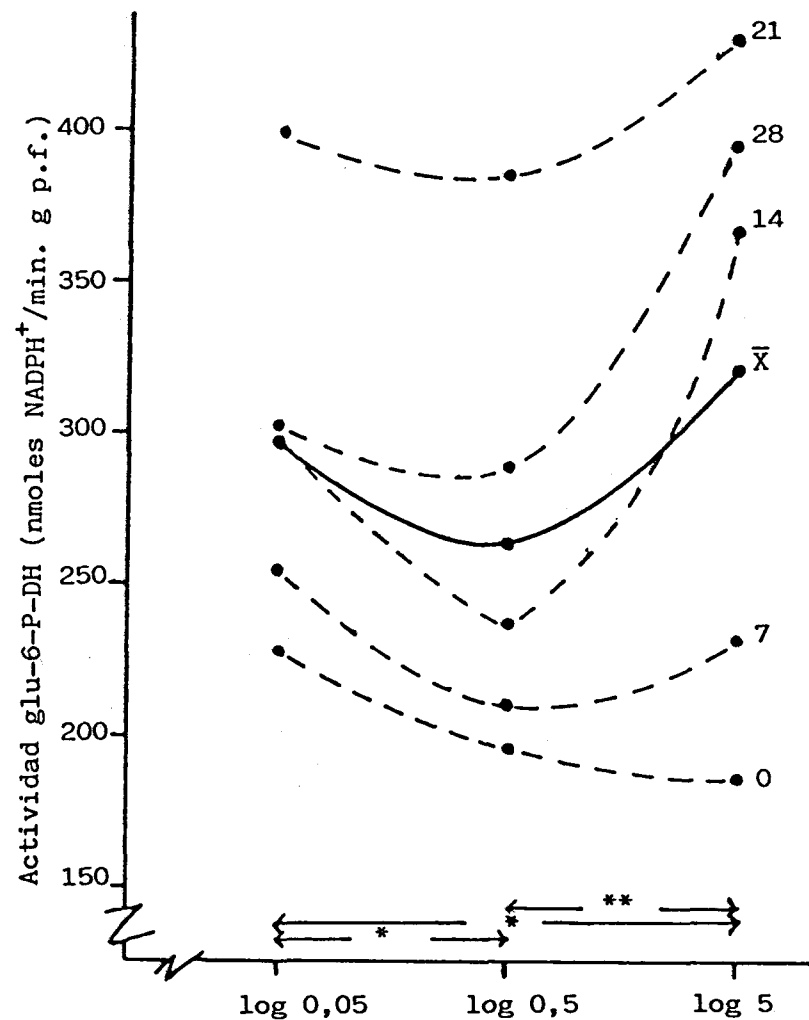


Fig. XVII.- Efecto de los Ttos. de B (expresados como el log de la concentración de B en la solución nutritiva) en cada una de las recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

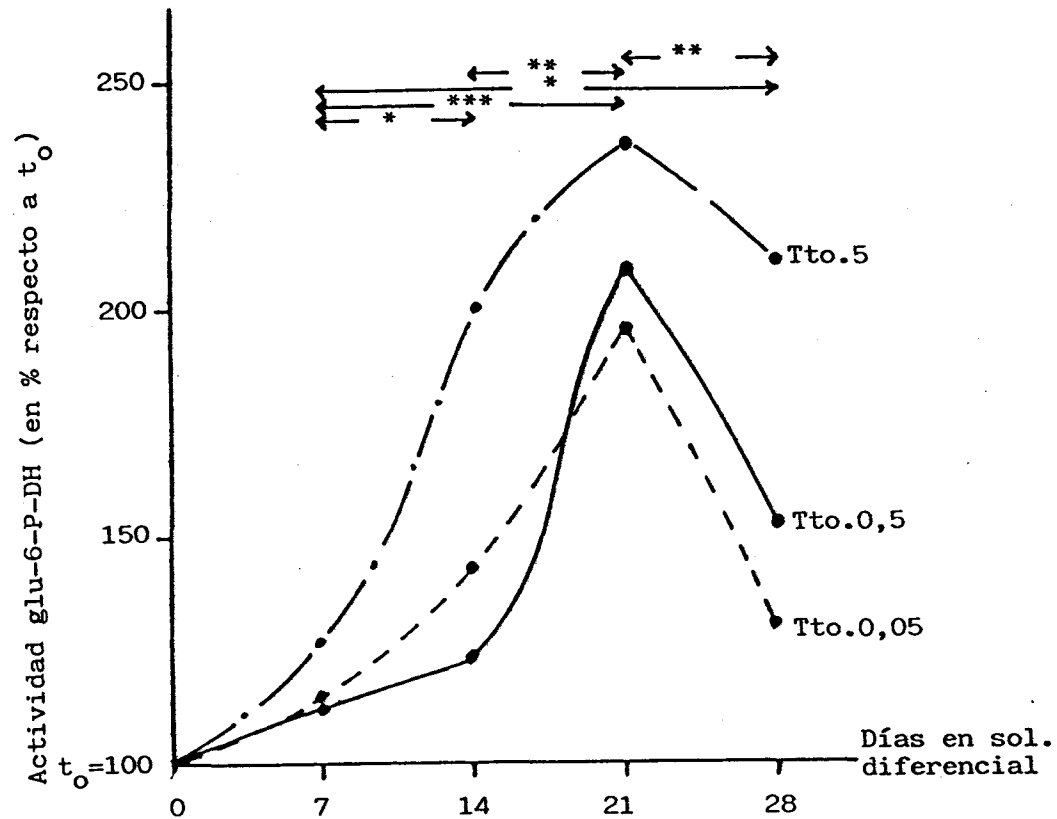


Fig. XVIII.- Evolución en el tiempo de la actividad glucosa-6-P-DH en hoja para cada uno de los tres Ttos., expresada como % de la que existía en el momento de pasar las plantas a soluciones diferenciales (1ª recogida: $t_0 = 100$).

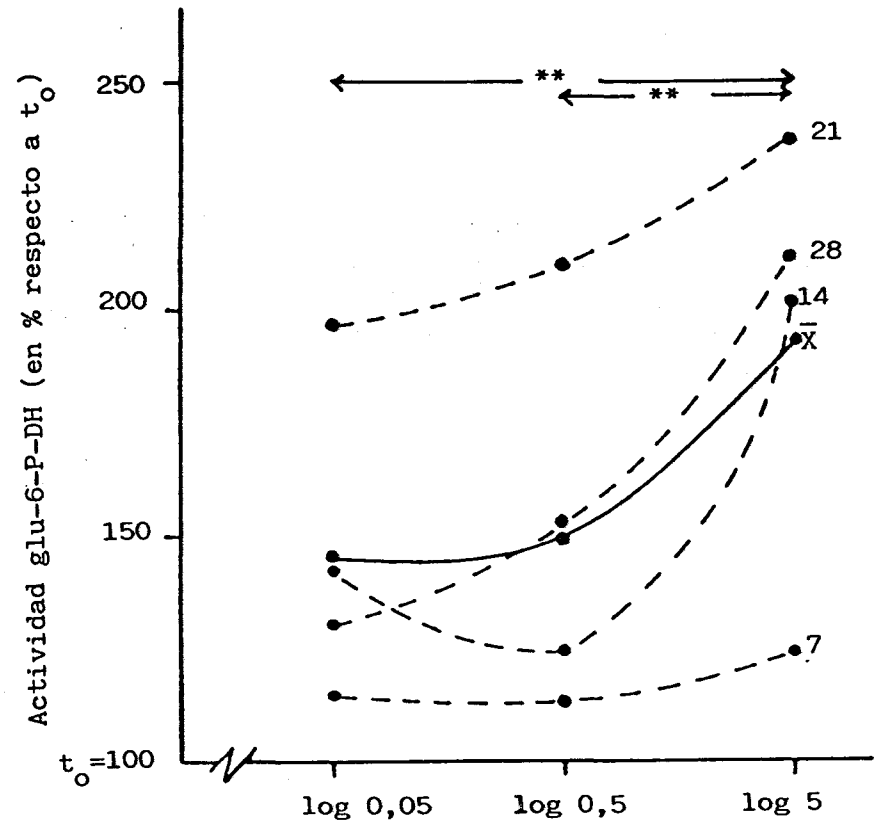


Fig. XIX.- Efecto de los Ttos. de B (log de la concentración de B en la solución nutritiva) sobre la actividad glucosa-6-P-deshidrogenasa en hoja, para cada una de las recogidas (expresada en % respecto a la existente en la 1ª recogida: $t_0 = 100$).

Tabla 15.- 3ª Experiencia: Actividad 6-P-gluconato-deshidrogenasa en hojas (n moles NADPH₂⁺/min. g p. fresco hoja). (*) H: hojas infiltradas con agua destilada; B: hojas infiltradas con sol. de Boro (15 ppm).

Días	B= 0,05 ppm										B= 0,5 ppm										B= 5 ppm				
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H(*)	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	H
I	497	453	531	465	574	588	531	497	690	722	429	444	617	649	405	470	651	680	766	818	400	405	552	559	792
II	374	357	424	391	584	523	518	511	558	605	412	388	474	446	429	444	475	480	637	681	485	528	656	605	874
III	367	357	603	600	523	492	441	461	830	825	451	451	456	506	475	492	644	504	622	608	386	456	567	644	796
IV	528	547	487	480	506	545	627	670	661	666	395	441	434	451	470	485	557	562	685	743	388	586	673	598	767
\bar{X}	442		511		547		529		685		422		495		445		607		678		415	494	612	602	807

Tabla 15.- (Cont.)

Análisis de Varianza para la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

I.a) Considerando solo los tratamientos deficiente y normal (que habían sido infiltradas con B):

No existen diferencias significativas entre las actividades de las hojas infiltradas con B y las infiltradas con agua.

b) Considerando los tres tratamientos

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	P<0,001
Tratamientos	P<0,05
Interacción Tiempos-tratamientos	P<0,05

Estudio de la interacción Tiempos x Tratamientos:

Nivel de significación entre los tratamientos de B (ppm de B en solución) según el tiempo de permanencia en solución diferencial.

	0,05-0,5	0,5-5	0,05-5
0	N.S.	N.S.	N.S.
7	N.S.	N.S.	N.S.
14	P<0,001	P<0,001	P<0,01
21	P<0,01	N.S.	P<0,01
28	N.S.	P<0,001	P<0,001

Nivel de significación entre las recogidas (nº de días en solución diferencial) según el tratamiento de B (ppm de B en solución).

	0,05	0,5	5
0-7	P<0,01	P<0,01	P<0,01
0-14	P<0,001	N.S.	P<0,001
0-21	P<0,01	P<0,001	P<0,001
0-28	P<0,001	P<0,001	P<0,001
7-14	P<0,05	P<0,01	P<0,001
7-21	N.S.	P<0,001	P<0,001
7-28	P<0,001	P<0,001	P<0,001
14-21	N.S.	P<0,001	N.S.
14-28	P<0,001	P<0,001	P<0,001
21-28	P<0,001	P<0,001	P<0,001

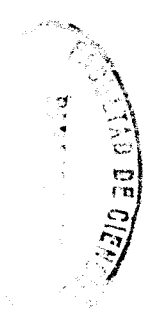


Tabla 15.- (Cont.).

Análisis de la varianza para la actividad 6-P-gluconato-deshidrogenasa.

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	35022	17511	3,70	P < 0,05
Tiempos	4	586943	146735	31,04	P < 0,001
<u>Interacción</u>					
Tiempos-tratamientos	8	81646	10205	2,16	P < 0,05
Bloques	3	7223	2407		
Error	42	198575	4227		

Tabla 15.- (Cont.).

II.-Considerando el tiempo 0 como valor 100.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>P<0,01</u>
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	<u>-</u>

Nivel de significación entre las recogidas, expresadas como tiempo de permanencia en soluciones diferenciales de B.

	<u>7</u>	<u>14</u>	<u>21</u>
<u>14</u>	<u>N.S.</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>21</u>	<u>N.S.</u>	<u>N.S.</u>	<u>-</u>
<u>28</u>	<u>P<0,001</u>	<u>P<0,01</u>	<u>P<0,01</u>

Nivel de significación entre los tratamientos (ppm de B en solución).

	<u>0,05</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>
<u>0,5</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>5</u>	<u>P<0,05</u>	<u>P<0,05</u>	<u>-</u>

III.-Considerando el tratamiento normal (0,5 ppm de B en solución) como valor 100:

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	<u>P<0,01</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>-</u>
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	<u>-</u>

Nivel de significación entre las distintas recogidas, expresadas como n° de días de permanencia en solución diferencial de B.

	<u>7</u>	<u>14</u>	<u>21</u>
<u>14</u>	<u>P<0,01</u>	<u>-</u>	
<u>21</u>	<u>N.S.</u>	<u>P<0,01</u>	<u>-</u>
<u>28</u>	<u>N.S.</u>	<u>P<0,05</u>	<u>N.S.</u>

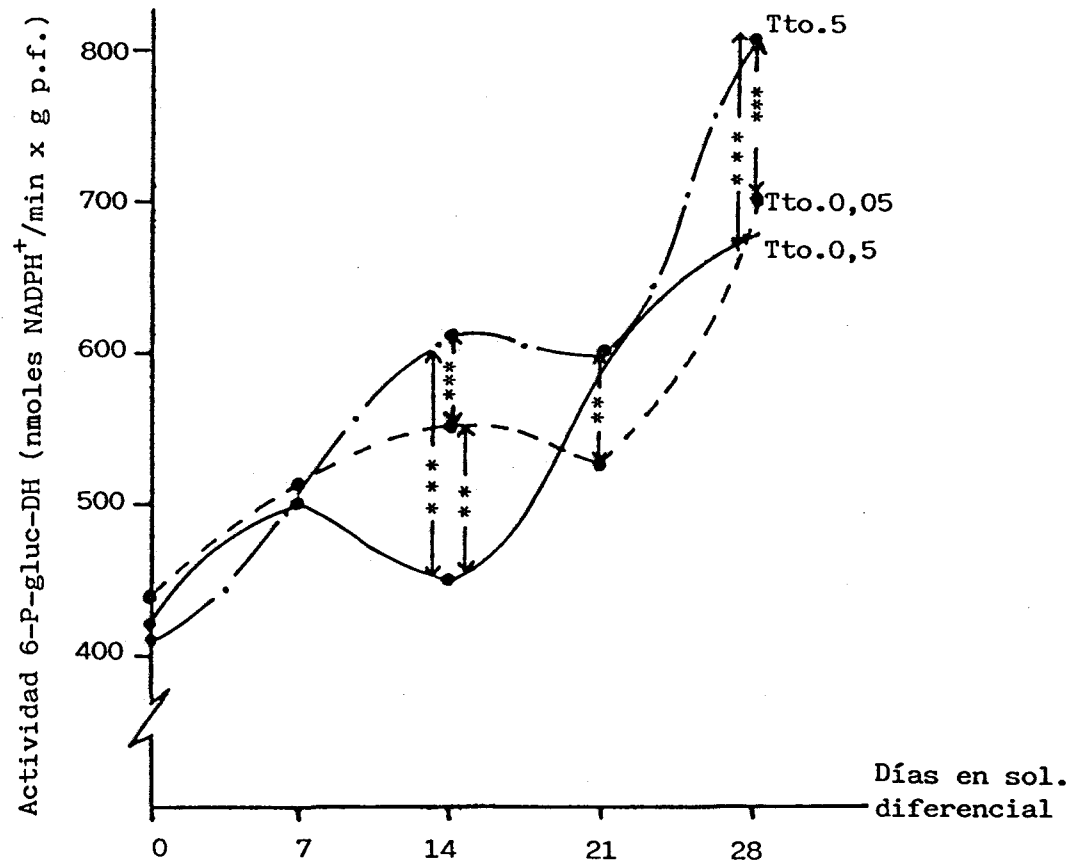


Fig. XX.- Evolución en el tiempo de la actividad 6-P-gluconato deshidrogenasa en hoja, para cada uno de los tres tratamientos.

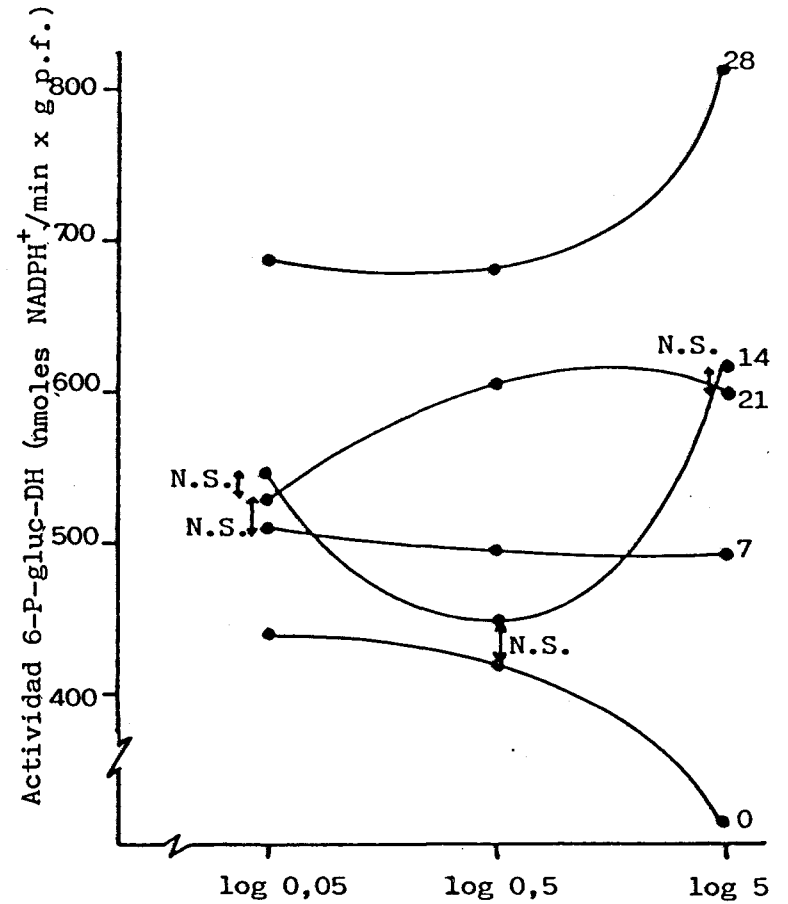


Fig. XXI.- Efecto de los Ttos. (log de la concentración de B en la sol. nutritiva) sobre la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en hoja, según el nº de días de permanencia de la planta en soluciones diferenciales de B.

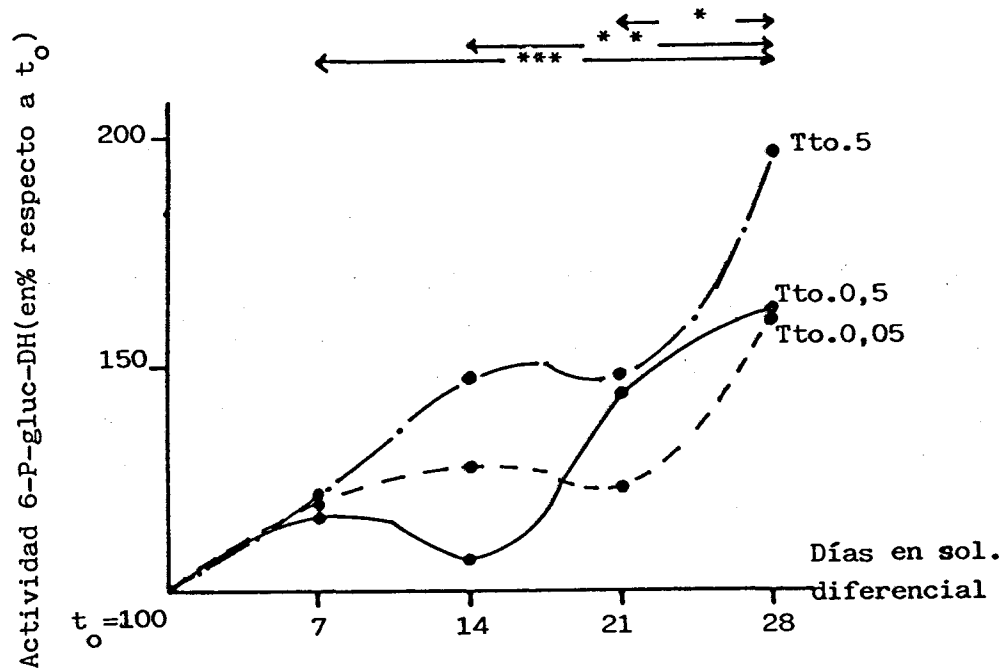


Fig. XXII.- Evolución en el tiempo de la actividad 6-P-gluconato-DH en hoja, expresada como % de la que existía en el momento de pasar las plantas a sol. diferenciales, (1ª recogida: $t_0 = 100$).

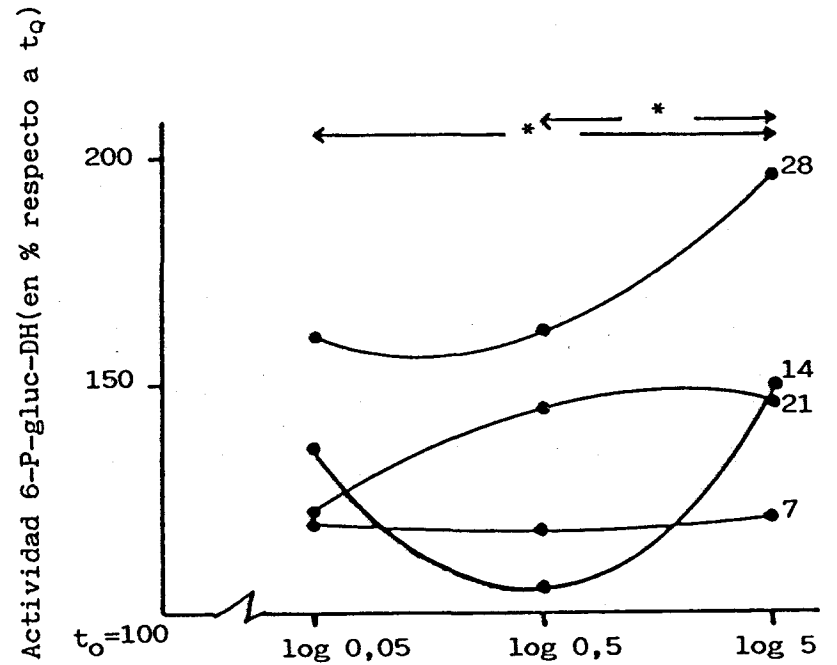


Fig. XXIII.- Efecto de los Ttos. de B (log de la concentración de B en la sol. nutritiva) sobre la actividad 6-P-gluconato-DH en hoja, para cada una de las recogidas (% respecto a la actividad existente en la 1ª recogida $t_0 = 100$).

Actividad 6-P-gluc-DH (en % respecto a Tto.0,5)

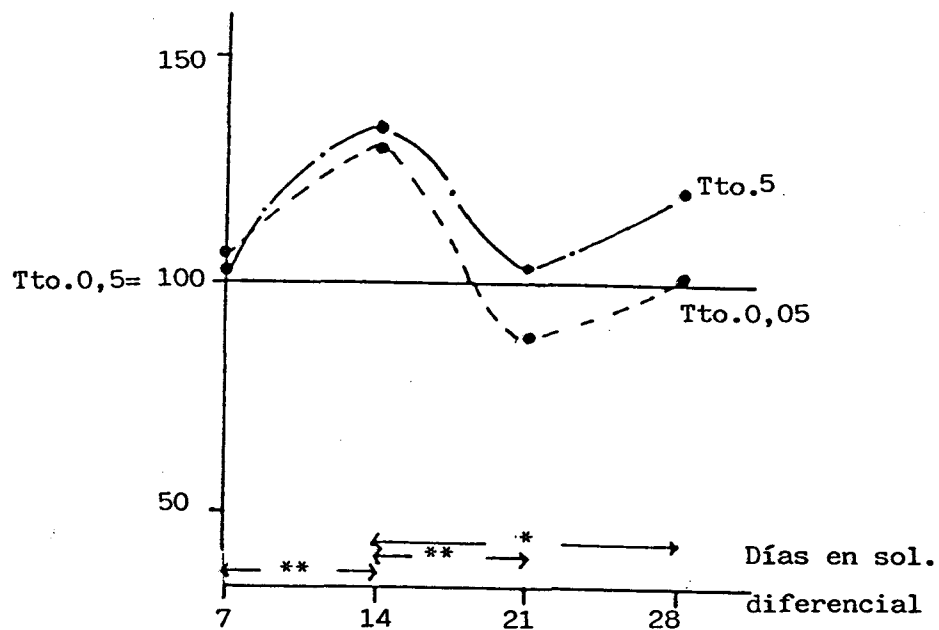


Fig. XXIV.- Evolución, con el tiempo de permanencia en soluciones diferenciales, de la actividad 6-P-gluconato deshidrogenasa en las hojas de los Ttos. deficiente (B=0,05 ppm) y tóxico (B= 5 ppm) frente al normal (B= 0,5 ppm), que se toma como línea basal Tto. 0,5= 100.

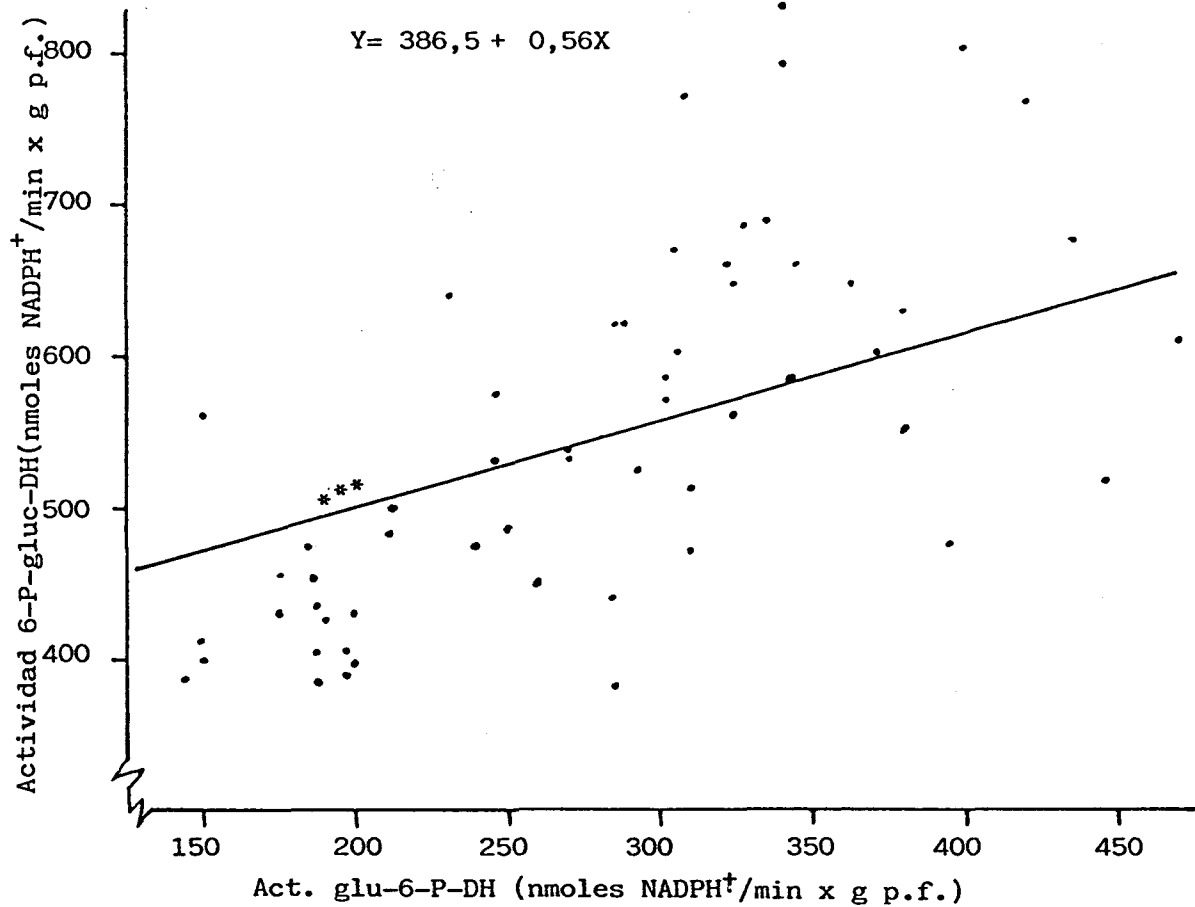


Fig. XXV.- Recta de regresión actividad glucosa-6-P-deshidrogenasa. Actividad 6-P-gluconato-deshidrogenasa (ambas en hoja).

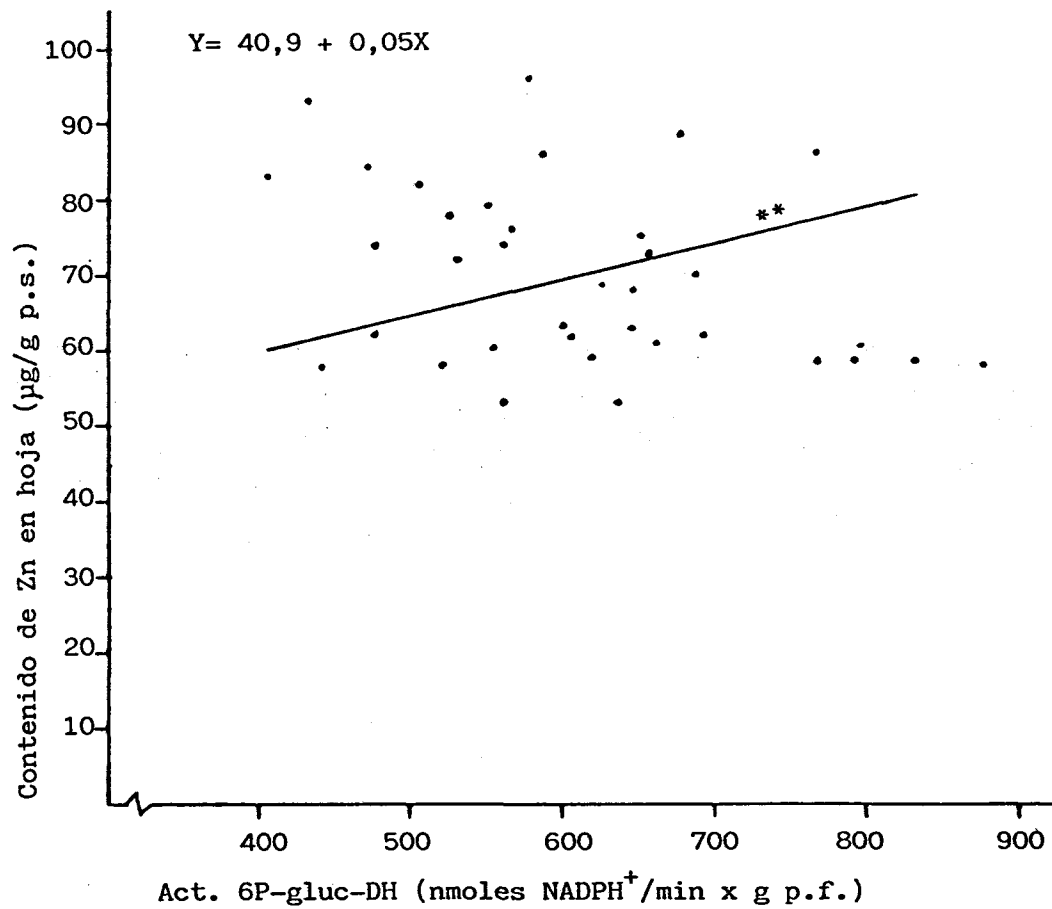


Fig. XXVI.- Recta de regresión Act. 6P gluc-DH. Contenido de Zn (ambos en hoja).

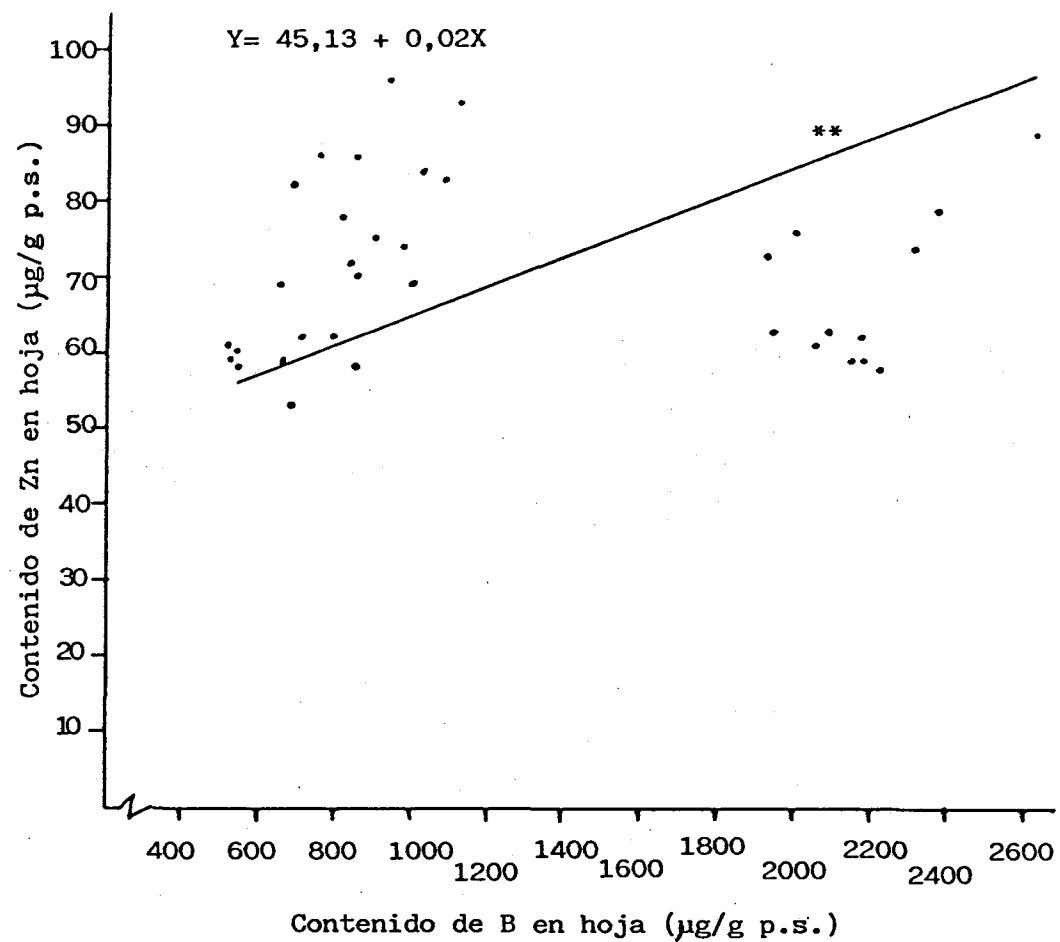


Fig. XXVII.- Recta de regresión contenido de B-Contenido de Zn (en las hojas de las plantas utilizadas para medir act. 6P-gluc-DH y glu-6P-DH).

Tabla 16.- Contenido en o-difenoles de la 3ª experiencia, como μg ác. cafeico/g p. fresco hoja.

Repeticiones	Días	B= 0,05 ppm					B = 0,5 ppm					B= 5 ppm				
		0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
I		46	120	136	136	173	74	178	123	149	236	84	95	155	141	224
II		88	94	276	126	145	65	59	103	113	163	69	127	157	197	264
III		23	146	101	163	303	136	113	105	175	234	71	167	164	160	240
IV		119	87	114	237	183	114	147	136	150	275	83	127	150	159	258
\bar{X}		69	112	157	167	201	97	124	117	147	227	77	127	157	164	247

Tabla 16.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de o-difenoles en las hojas utilizadas para medir las actividades glucosa-6-P-DH y 6-P-gluconato-DH (3ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	2279	1139	0,68	N.S.
Tiempos	4	134443	33611	19,97	P < 0,001
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	9349	1169	0,69	N.S.
Bloques	3	4644	1548		
Error	42	70693	1683		

Tabla 16.- (Cont.).

Análisis de Varianza para el contenido en o-difenoles en la 3ª experiencia.

I.-

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	<u>P<0,001</u>
<u>Tratamientos</u>	<u>-</u>
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-tratamientos</u>	<u>-</u>

Nivel de significación entre las recogidas, expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B.

	0	7	14	21
7	P<0,05	-	-	-
14	P<0,01	N.S.	-	-
21	P<0,01	P<0,05	N.S.	-
28	P<0,001	P<0,001	P<0,01	P<0,01

II.- Considerando el tiempo 0 como valor 100. No existen diferencias significativas ni entre las diferentes recogidas ni entre los tratamientos de B.

III.- Considerando el tratamiento normal (0,5 ppm de B en solución) como valor 100.

No existen diferencias significativas ni entre las recogidas ni entre los tratamientos de B.

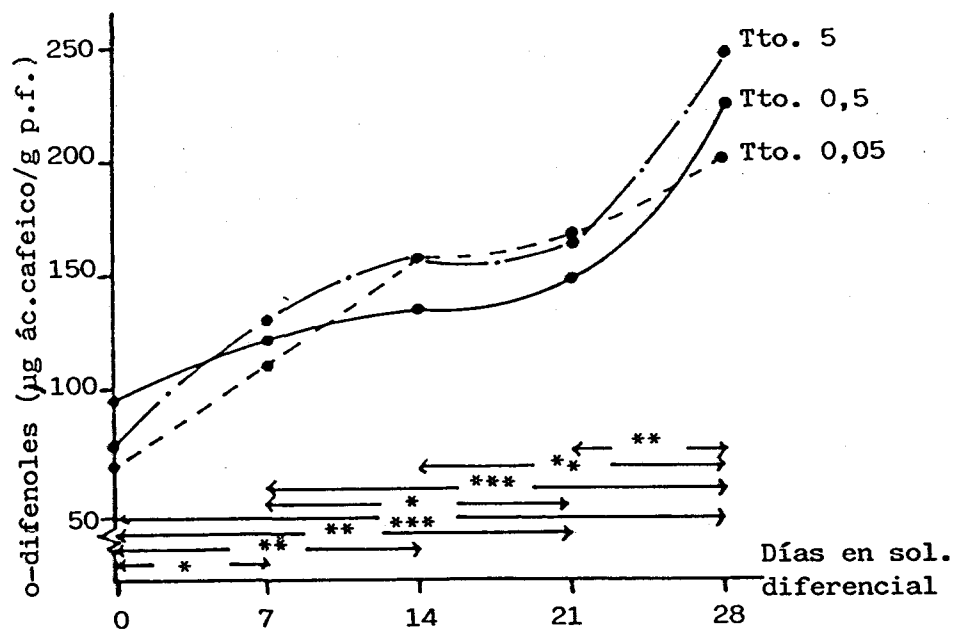


Fig. XXVIII.- Evolución en el tiempo, para cada uno de los tres Ttos., del contenido de o-difenoles en las hojas utilizadas para la determinación de las actividades glu-6-P-DH y 6-P-gluc-DH.

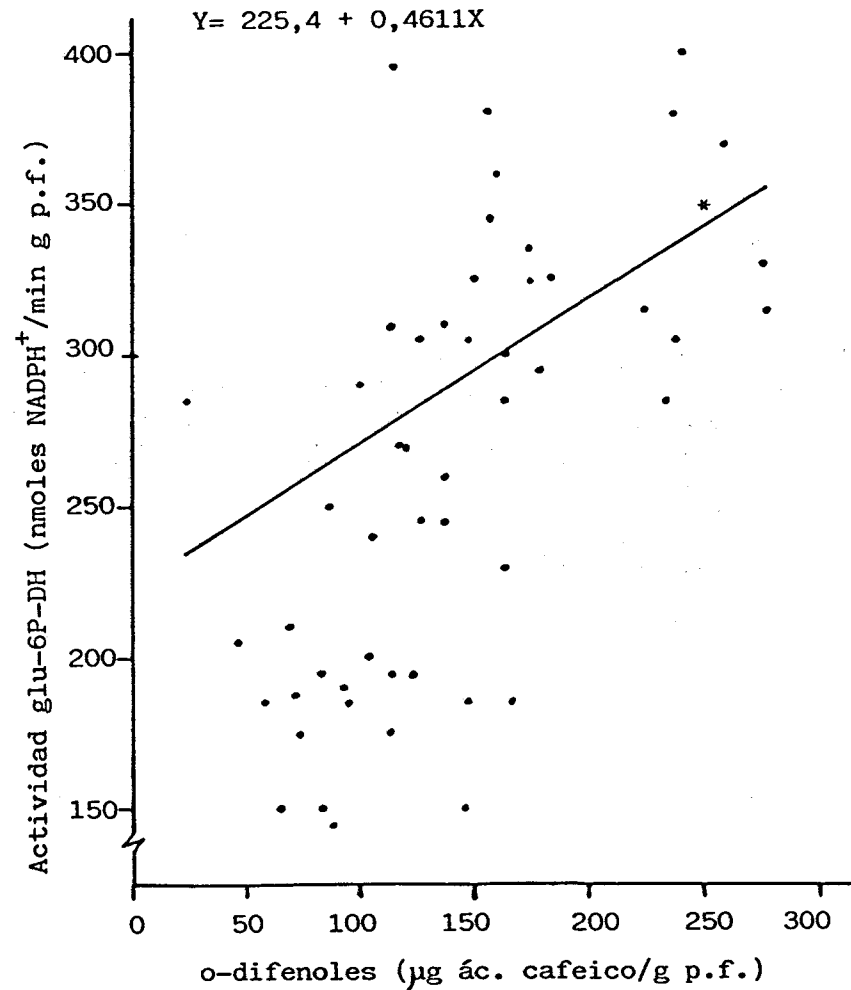


Fig. XXIX.- Recta de regresión contenido de o-difenoles-Actividad glucosa-6-P-deshidrogenasa (ambos en hoja).

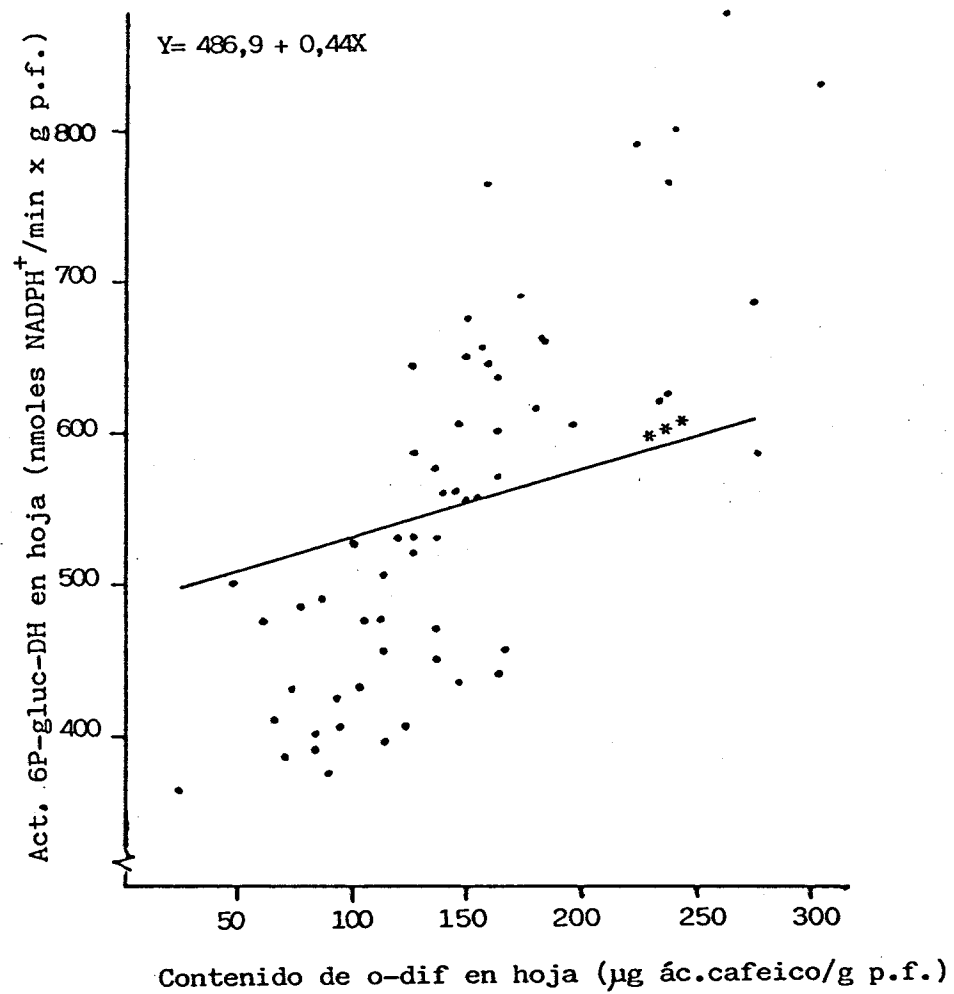


Fig. XXX.- Recta de regresión contenido de o-difenoles-Actividad 6P-gluconato-deshidrogenasa (ambas en hoja).

Tabla 17.- 4ª Experiencia: Actividad fenilalanina amonio-liasa en hojas (unidades/g peso fresco). (*) B adicionando B a la mezcla de reacción.

Días	B= 0,00 ppm				B= 0,5 ppm				B= 5 ppm			
	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
Rep.	H (*)B	H B	H B	H B	H B	H B	H B	H B	H B	H B	H B	H B
I	52,3 46,7	61,4 59,2	94,9 92,1	39,5 47,0	18,1 44,3	38,0 68,8	74,6 59,6	35,4 60,7	30,2 36,7	101,1 123,3	110,0 93,5	121,6 73,5
II	38,1 36,2	84,6 62,2	47,0 60,1	45,9 64,3	19,6 60,9	61,0 26,8	34,1 63,0	61,6 33,6	26,8 48,7	93,1 61,2	84,8 45,2	53,5 67,8
III	51,7 45,2	65,2 92,8	84,2 87,0	53,2 31,9	106,2 97,8	76,2 92,0	59,2 61,7	95,9 49,6	70,5 79,6	122,1 87,6	73,2 67,3	63,2 79,8
IV	41,3 52,6	43,4 21,7	100,0 76,3	25,6 51,3	67,1 88,8	59,4 45,7	36,7 96,9	47,6 52,9	37,2 64,5	56,7 51,8	73,4 82,5	67,0 83,8
\bar{X}	45,8 45,2	63,6 59,0	81,6 78,9	41,1 48,6	52,7 72,9	58,6 58,3	51,1 70,3	60,1 49,2	44,2 57,4	93,3 81,0	85,3 72,1	76,3 76,2

Tabla 17.- (Cont.)

Análisis de la varianza para la actividad fenilalanina amonio-liasa.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	4377,58	2188,79	5,31	P < 0,01
Tiempos	3	6441,33	2147,11	5,20	P < 0,01
Interacción					
Tiempos-tratamientos	6	6958,74	1159,79	2,81	P < 0,05
B(+) - B(-)	1	55,41	55,41	0,13	N.S.
Interacción					
Ttos.-(B(+) - B(-))	2	383,63	191,82	0,47	N.S.
Interacción					
Tiempos (B(+) - B(-))	3	1007,98	335,99	0,81	N.S.
Interacción					
Ttos.-tiempos -(B(+) -B(-))	6	1687,50	281,25	0,68	N.S.
Bloques	3	6043,49	2014,50		
Error	69	28474,58	412,68		

Tabla 17.- (Cont.)

Análisis de Varianza para la actividad Fenilalanina amonio-liasa.

I.

a) No existen diferencias entre las actividades enzimáticas obtenidas adicionando B a la mezcla de reacción y sin adicionar.

b)

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	P<0,01
Tratamientos	P<0,01
Interacción	P<0,05
Tiempos-tratamientos	

Estudio de la interacción entre tiempo (días de permanencia en solución diferencial de B) y Tratamientos (ppm de B en solución).

Tiempos	7	14	21	28
<u>Tratamientos</u>				
0,00-0,50	-	-	-	-
0,50-5,00	-	P<0,05	-	P<0,01
0,00-5,00	-	P<0,05	-	P<0,01

	7-14	7-21	7-28	14-21	14-28	21-28
0,00	-	P<0,01	-	-	-	P<0,05
0,5	-	-	-	-	-	-
5	P<0,01	P<0,05	P<0,05	-	-	-

III. Considerando el tratamiento normal (0,5 ppm de B) como valor 100.

No hay diferencias significativas ni entre tiempos ni entre tratamientos.

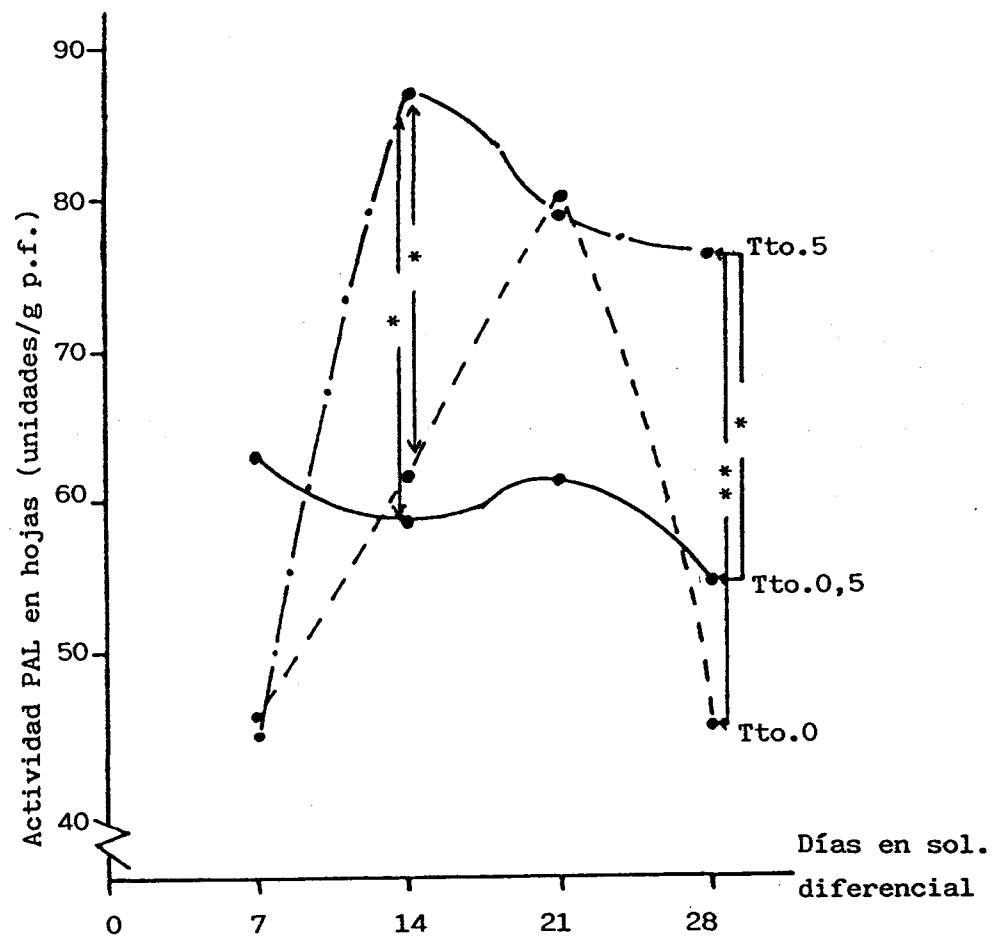


Fig. XXXI.- Evolución en el tiempo de la actividad fenilalanina amonio-liasa en hojas para cada uno de los tratamientos.

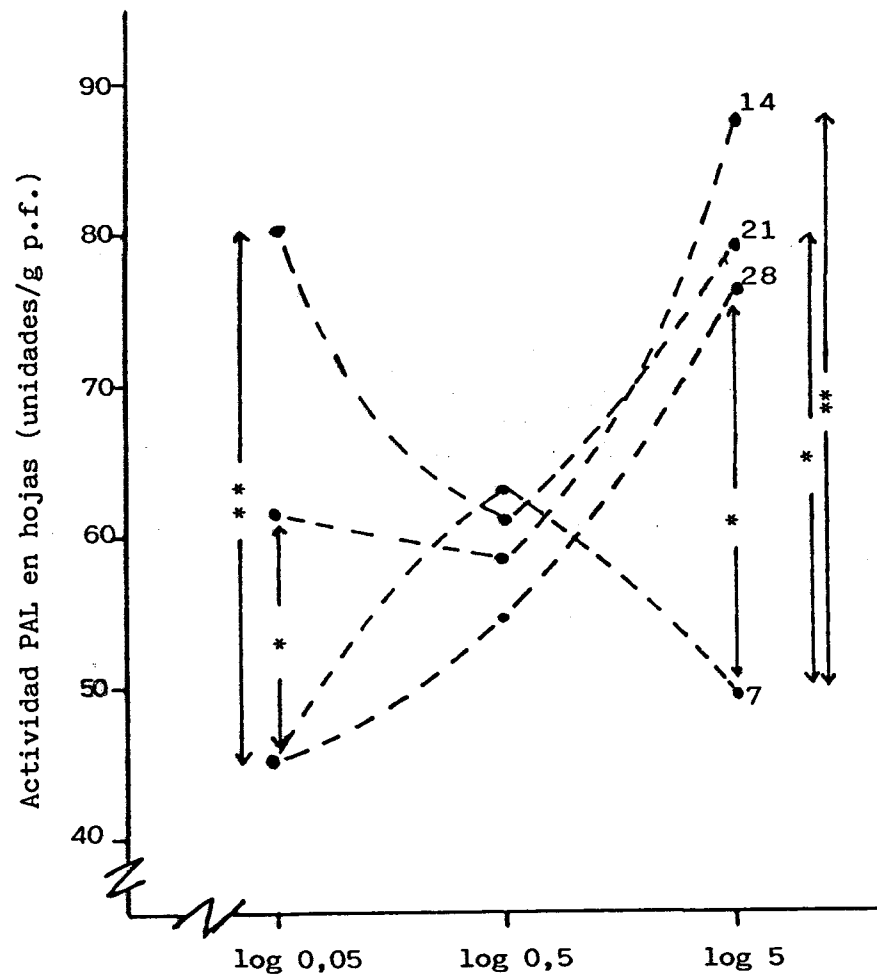


Fig. XXXII.- Efecto de los Ttos. (log de la concentración de B en la sol. nutritiva) sobre la actividad fenilalanina amonio-liasa en hojas según el nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B.

Tabla 18.- 4ª Experiencia. Contenido de o-difenoles en hojas (expresado como μg de ácido cafeico/g p.fresco).

Días	B= 0,00 ppm					B = 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
I	203	207	146	257	404	145	188	140	222	219	148	219	166	188	239
II	176	220	174	311	609	190	201	142	184	243	192	208	214	207	236
III	243	205	148	290	662	227	375	208	216	207	225	335	202	237	213
IV	237	186	154	198	339	265	240	183	235	167	202	273	154	278	267
\bar{X}	215	205	156	264	504	207	251	168	214	209	192	259	184	228	239

Tabla 18.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de o-difenoles en las hojas utilizadas para medir actividad PAL (4ª Experiencia).

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	39152,90	19576,43	7,11	P < 0,001
Tiempos	4	143781,70	35945,43	13,06	P < 0,001
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	186043,13	23255,39	8,45	P < 0,001
Bloques	3	28334,85	9444,95		
Error	42	115596,40	2752,30		

Tabla 18.- (Cont.)

II) Considerando el tiempo 0 como valor 100.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
Tiempos	P<0,001
Tratamientos	P<0,05
Interacción	
Tiempos-tratamientos	P<0,01

<u>Tiempos</u>	<u>7</u>	<u>14</u>	<u>21</u>	<u>28</u>
<u>Tratamientos</u>				
0,00-0,50	-	-	-	P<0,01
0,50-5,00	-	-	-	-
0,00-5,00	-	-	-	P<0,01

	<u>7-14</u>	<u>7-21</u>	<u>7-28</u>	<u>14-21</u>	<u>14-28</u>	<u>21-28</u>
0	-	-	P<0,001	-	P<0,001	P<0,001
0,5	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-

III) Considerando el tratamiento normal (0,5 ppm de B) como valor 100.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	P<0,01

<u>Tiempos</u>	<u>0</u>	<u>7</u>	<u>14</u>	<u>21</u>	<u>28</u>
<u>Tratamientos</u>					
0,00-5,00	-	-	-	-	P<0,001

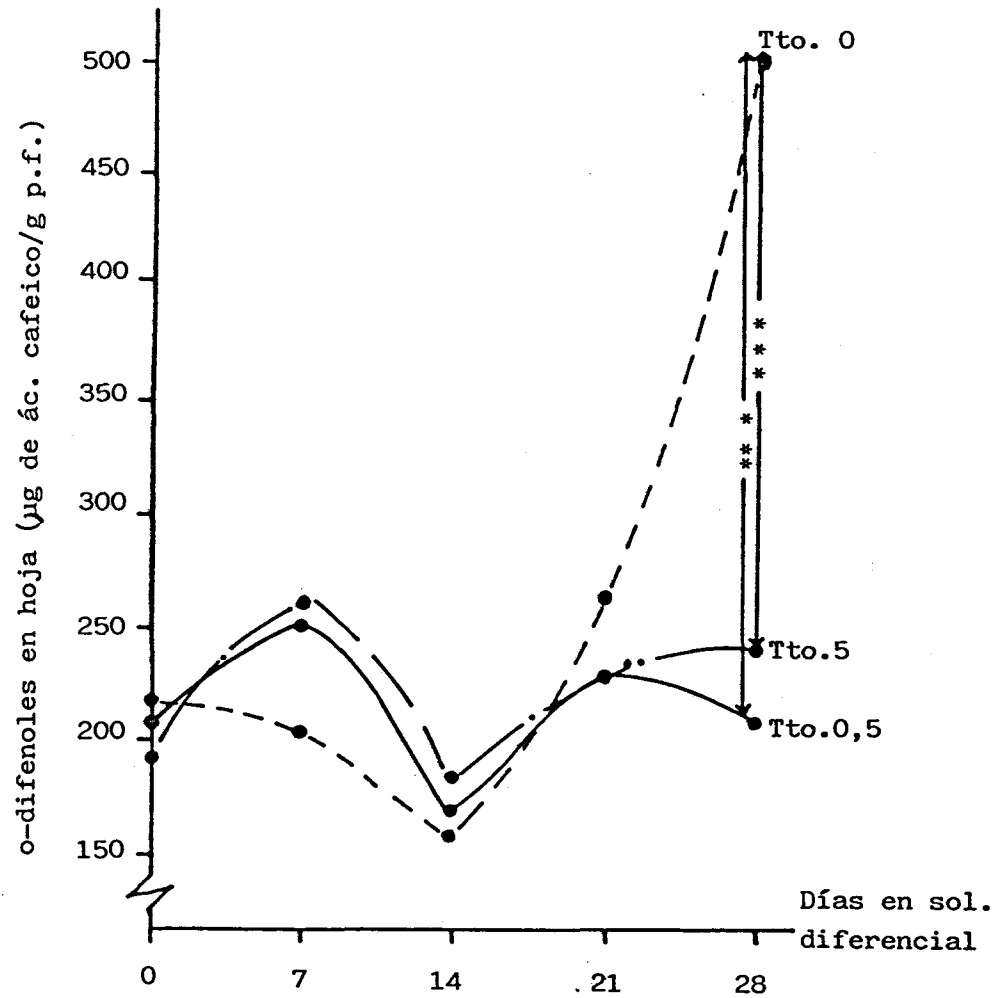


Fig. XXXIII.- Evolución en el tiempo del contenido de o-difenoles en las hojas utilizadas para la determinación de la actividad PAL, para cada uno de los tratamientos de B.

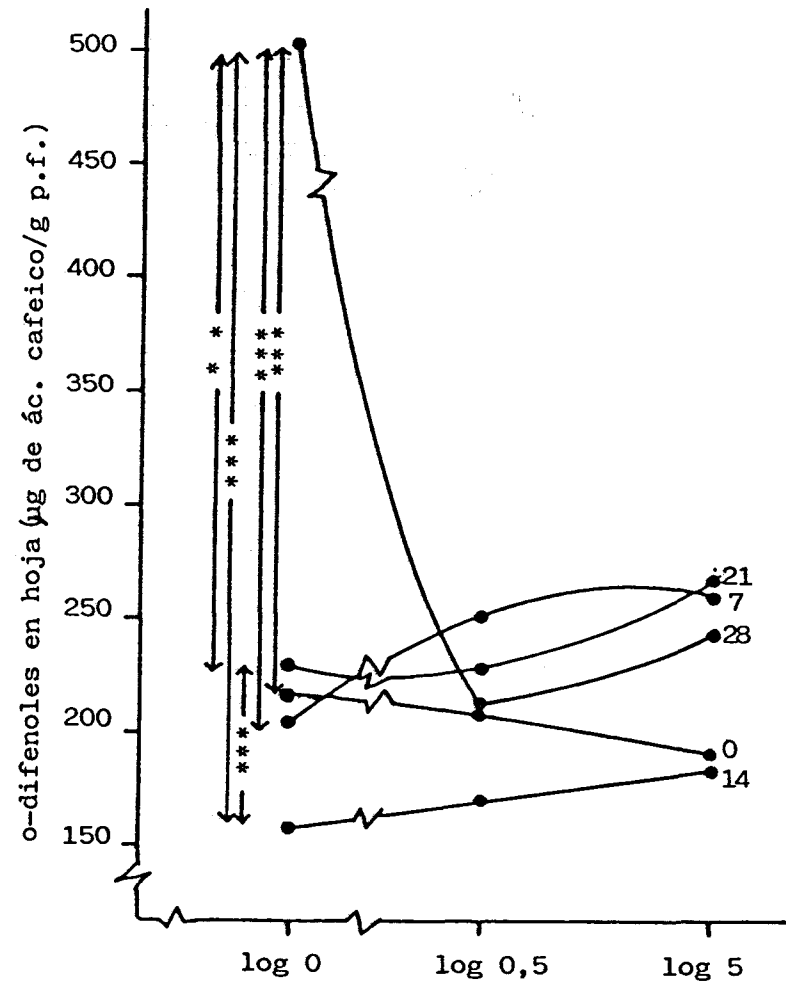


Fig. XXXIV.- Efecto de los Ttos. (log de la concentración de B en la solución nutritiva) sobre el contenido de o-difenoles en las hojas utilizadas para medir actividad PAL, para cada una de las recogidas.

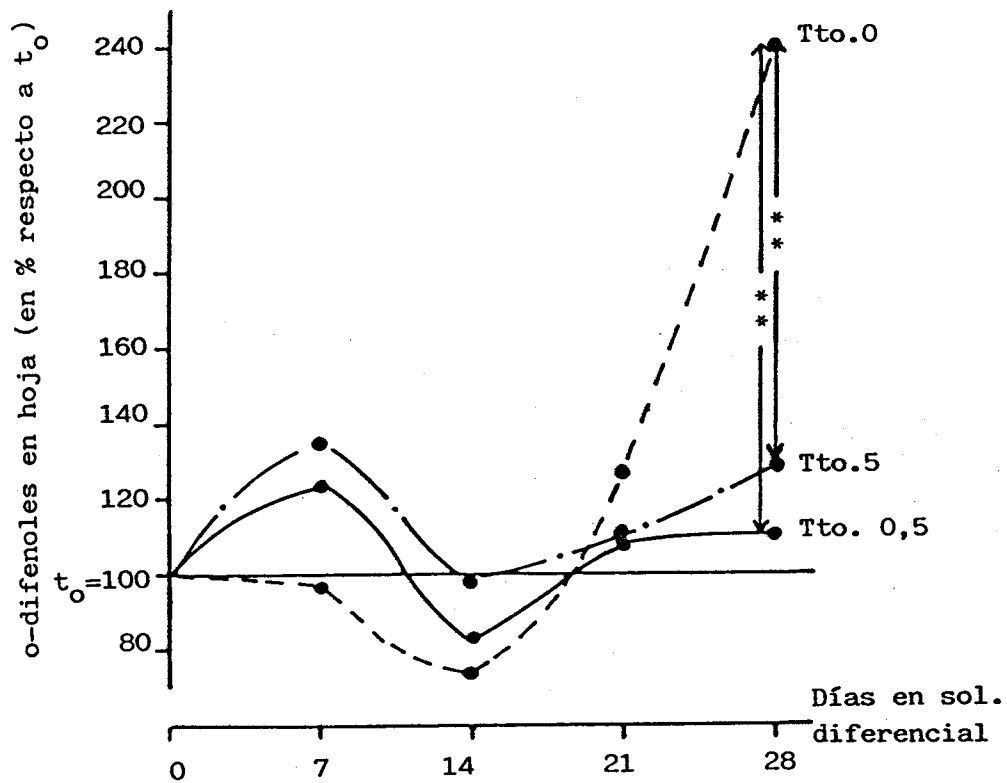


Fig. XXXV.- Evolución en el tiempo del contenido de o-difenoles en las hojas utilizadas para medir actividad PAL (expresada como % del que existía al pasar las plantas a soluciones diferenciales de B (1ª recogida: $t_o = 100$)).

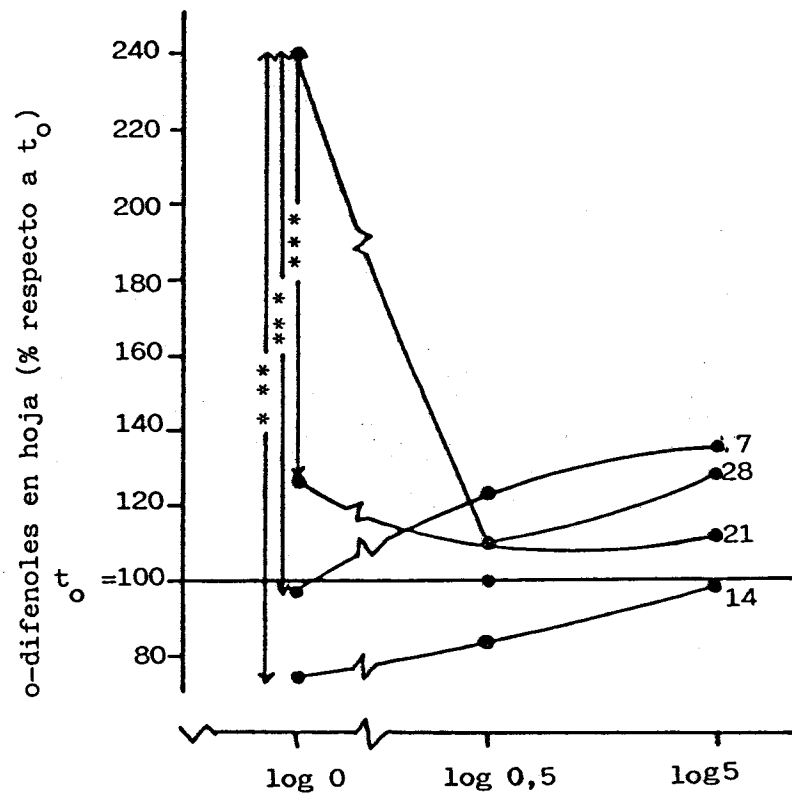


Fig. XXXVI.- Efecto de los Ttos. (log de la concentración de B en la solución nutritiva) sobre el contenido de o-difenoles en las hojas utilizadas para medir actividad PAL (expresada como % del que existía al pasar las plantas a soluciones diferenciales de B (1ª recogida: $t_o = 100$)).

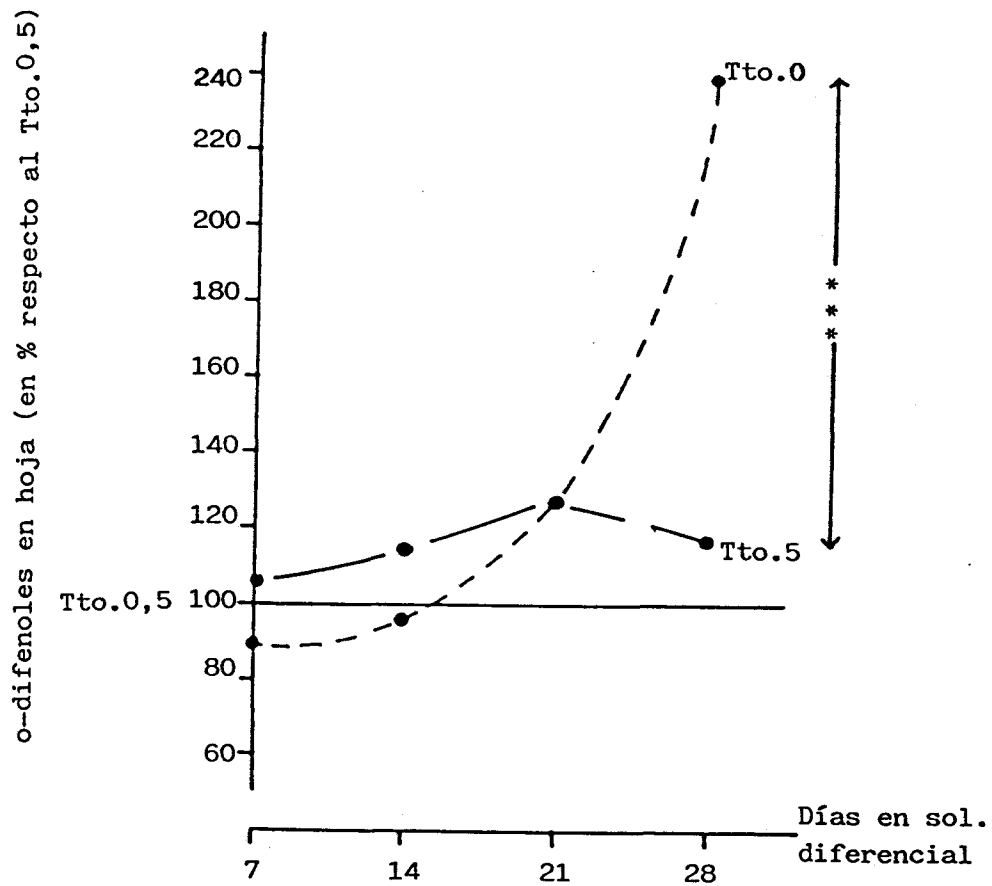


Fig. XXXVII.- Evolución, con el tiempo de permanencia en soluciones diferenciales, del contenido de o-difenoles (en las hojas utilizadas para medir actividad PAL) para los Ttos. deficiente (B= 0 ppm) y tóxico (B= 5 ppm) frente al normal (B= 0,5 ppm) que se toma como línea basal Tto. 0,5= 100 .

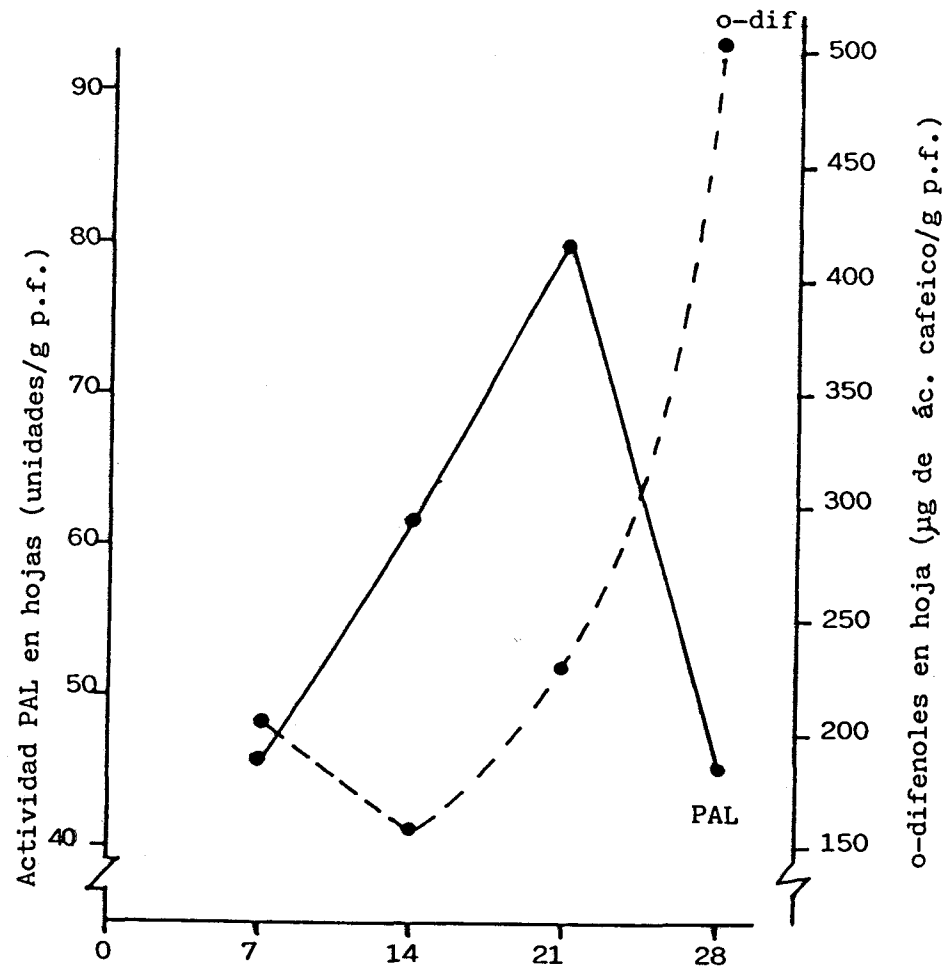


Fig. XXXVIII.- Comparación entre la evolución de la actividad PAL, en función del tiempo de permanencia en soluciones diferenciales de B, y la del contenido de o-difenoles en el Tto. deficiente (0 ppm de B en solución).

Tabla 19.- 5ª Experiencia. Biosíntesis de ^{14}C -ent-kaureno a partir de ^{14}C -ácido mevalónico en tallos. (Expresado como dpm/g.p. fresco). (*) B: Adicionando B a la mezcla de reacción.

Días	B= 0,00 ppm										B= 0,5 ppm										B= 5 ppm				
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H	(*)B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	H
I	744	2500	6150	2560	456	0	902	1420	20	112	2442	224	2420	774	832	1078	2638	2740	778	1474	855	2726	6338	2638	0
II	3820	1204	870	1976	0	0	530	428	6534	438	531	2409	104	380	2536	6182	626	234	704	1830	897	1384	36	3402	2234
III	4335	9853	296	202	1222	0	1206	860	0	0	1796	-	36	-	0	918	6204	3446	582	536	-	2968	194	5996	986
IV	9080	578	5266	4920	0	1388	140	462	8556	2738	550	9940	1962	272	0	556	1019	-	2486	986	2756	6574	332	7968	484

Tabla 20.- 5ª Experiencia. Actividad giberelínica en los 20 cm superiores del tallo medida a través del bioensayo del arroz enano "Tan ginbozu". Los resultados se expresan como % de incremento en elongación respecto al blanco.

Días	B= 0,00 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
I	105,0	106,2	105,0	107,1	108,6	93,7	90,3	109,3	117,9	114,3	88,9	102,9	112,9	107,1	107,1
II	101,4	111,1	105,7	108,5	108,6	102,8	104,2	107,1	114,3	101,4	87,5	130,7	100,0	106,7	117,1
III	105,6	107,5	110,0	116,4	105,7	92,4	100,0	112,1	115,0	114,3	94,4	98,6	116,4	102,9	124,3
IV	106,9	102,1	112,9	121,4	116,4	99,3	104,2	107,1	130,7	100,0	104,2	101,4	108,6	105,7	112,9
\bar{X}	104,7	106,7	108,4	113,4	109,8	97,1	99,7	108,9	119,5	107,5	93,8	108,4	109,5	105,6	115,4

Tabla 20.- (Cont.).

Análisis de la varianza para la actividad giberélica.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	58,1330	29,0665	0,63	N.S.
Tiempos	4	1544,6916	386,1729	8,42	$P < 10^{-4}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	886,3225	110,7903	2,42	$P < 0,05$
Bloques	3	115,2169	38,4056		
Error	42	1925,3870	45,8425		

Tabla 20.- (Cont.).

II.-

Considerando la actividad giberelínica en el tiempo 0 como valor 100.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	-
Tratamientos	P<0,01
Interacción	-
Tratamientos-Tiempo	-

Nivel de Significación entre los distintos tratamien-
tos (expresados como ppm de B en solución diferencial).

	0,00	0,50
0,50	P<0,05	-
5,00	P<0,01	N.S.

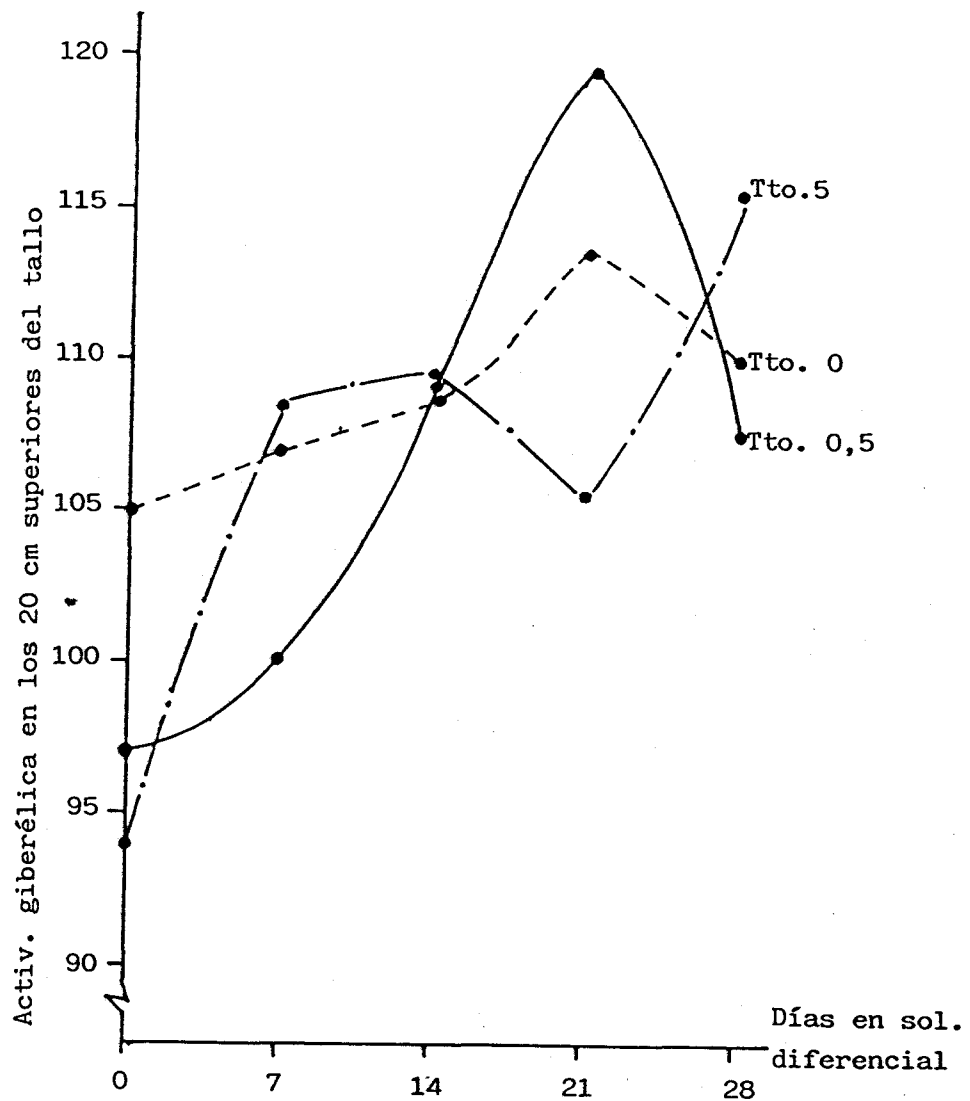


Fig. XLVI.- Evolución en el tiempo, para cada uno de los tres Ttos., de la actividad giberélica en los 20 cm superiores del tallo (expresada como % de incremento en elongación respecto al blanco).

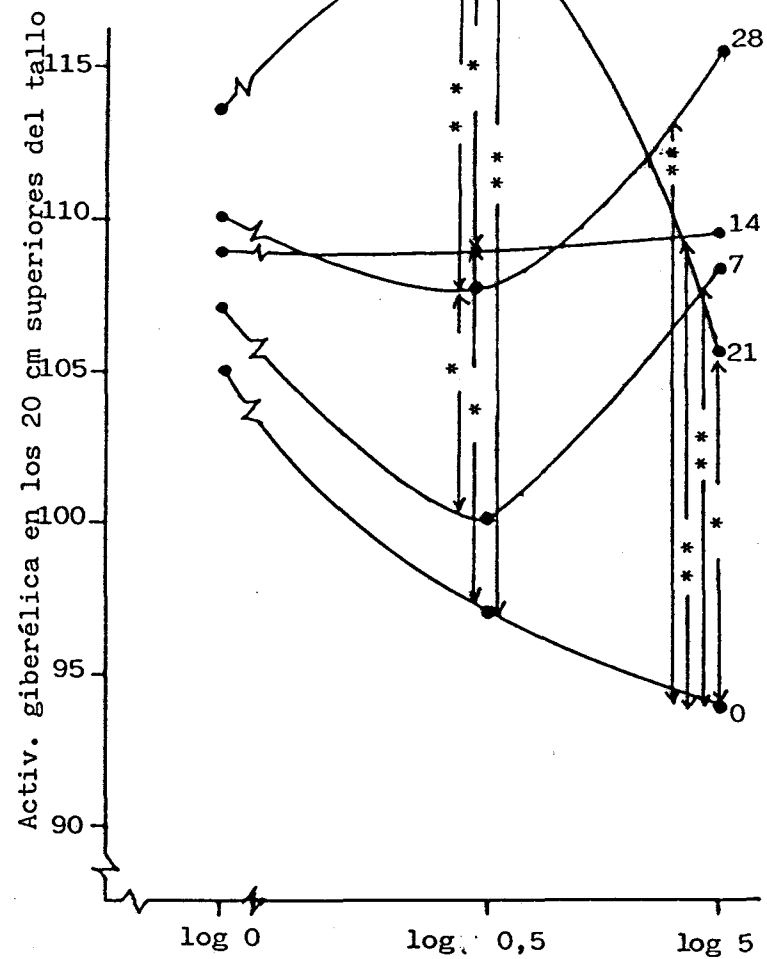


Fig. XLVII.- Efecto de los Ttos. (log de la concentración de B en la sol. nutritiva) sobre la actividad giberélica en los 20 cm superiores del tallo (expresada como % de incremento en elongación respecto al blanco) en cada una de las recogidas.

Activ. giberélica en los 20 cm superiores del tallo (en % respecto a t_0).

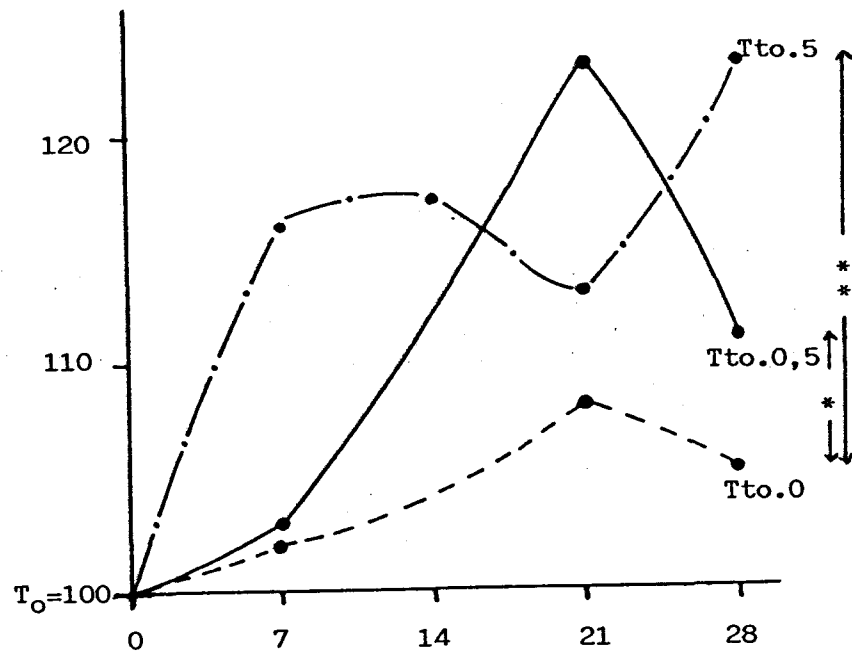


Fig. XLVIII.- Evolución en el tiempo de la actividad giberélica en los 20 cm superiores del tallo (en % respecto a la existente en la 1ª recogida. $t_0 = 100$)

Tabla 21.- 1ª Experiencia. Concentración de proteínas (expresada como mg proteína/g de peso fresco. *Hojas infiltradas con H₂O. **Hojas infiltradas con B.

Días	B= 0,05 ppm										B= 0,5 ppm										B= 5 ppm				
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H *	B**	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	H
I	2,28	2,34	1,22	1,89	1,87	2,44	1,25	1,69	3,90	4,09	2,24	2,39	1,98	1,93	1,25	1,60	2,04	0,48	4,44	4,52	0,98	0,89	1,82	2,71	3,69
II	2,21	2,01	1,17	1,41	2,57	1,73	2,79	2,93	3,13	3,71	1,47	1,43	1,93	2,05	2,98	2,17	2,37	1,46	2,98	1,96	2,29	1,32	2,54	1,42	6,20
III	2,10	2,07	1,94	1,41	1,83	2,47	1,09	1,29	6,47	6,52	2,93	3,08	1,68	1,57	2,48	1,48	1,65	2,00	4,34	5,19	2,15	1,68	2,75	2,21	3,68
IV	1,99	1,66	2,35	2,14	1,82	2,14	2,23	2,02	5,62	5,52	2,19	1,83	1,74	1,72	1,76	1,71	1,95	3,24	4,90	3,77	3,09	1,39	2,57	1,94	4,15
\bar{X}	2,15	2,02	1,67	1,71	2,02	2,20	1,84	1,98	4,78	4,96	2,21	2,18	1,83	1,82	2,12	1,74	2,00	1,80	4,17	3,86	2,13	1,32	2,42	2,07	4,43

Tabla 21.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de proteínas en las hojas utilizadas para medir las actividades: catalasa, peroxidasa y AIA-oxidasa (1ª Experiencia).

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	0,0072	0,0037	0,007	N.S.
Tiempos	4	61,4724	15,3681	29,49	$P < 10^{-6}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	1,7734	0,2217	0,43	N.S.
Bloques	3	2,0611	0,6870		
Error	42	21,8855	0,5211		

Tabla 21.- Cont.

Análisis de Varianza para la concentración de proteínas en hoja (1ª Experiencia).

I.-

a) Considerando sólo los tratamientos deficiente y normal (que habían sido infiltrados con B).

No existen diferencias significativas entre el contenido proteico de las hojas infiltradas con B y las infiltradas con H₂O.

b) Considerando los tres tratamientos.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-6}$
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-tratamientos	-

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en solución diferencial de B).

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	N.S.	N.S.	-	-
21	N.S.	N.S.	N.S.	-
28	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

Tabla 21.- (Cont.).

II.- Considerando el tiempo 0 como valor 100.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-4}$
Tratamientos	-
Interacción	-
Tiempos-tratamientos	

Nivel de significación entre las distintas recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	7	14	21
14	N.S.	-	-
21	N.S.	N.S.	-
28	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$

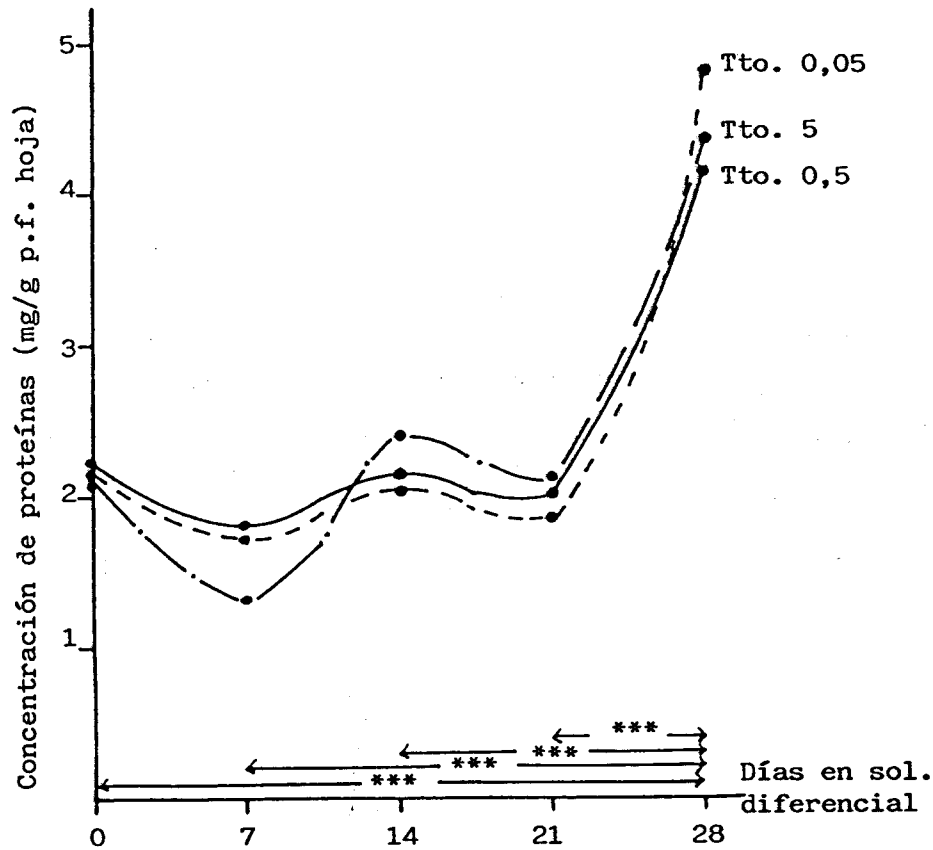


Fig. XXXIX.- Evolución en el tiempo, para cada uno de los Ttos., de la concentración de proteínas en los extractos utilizados para medir las actividades: catalasa, peroxidasa y AIA-oxidasa (1ª Experiencia).

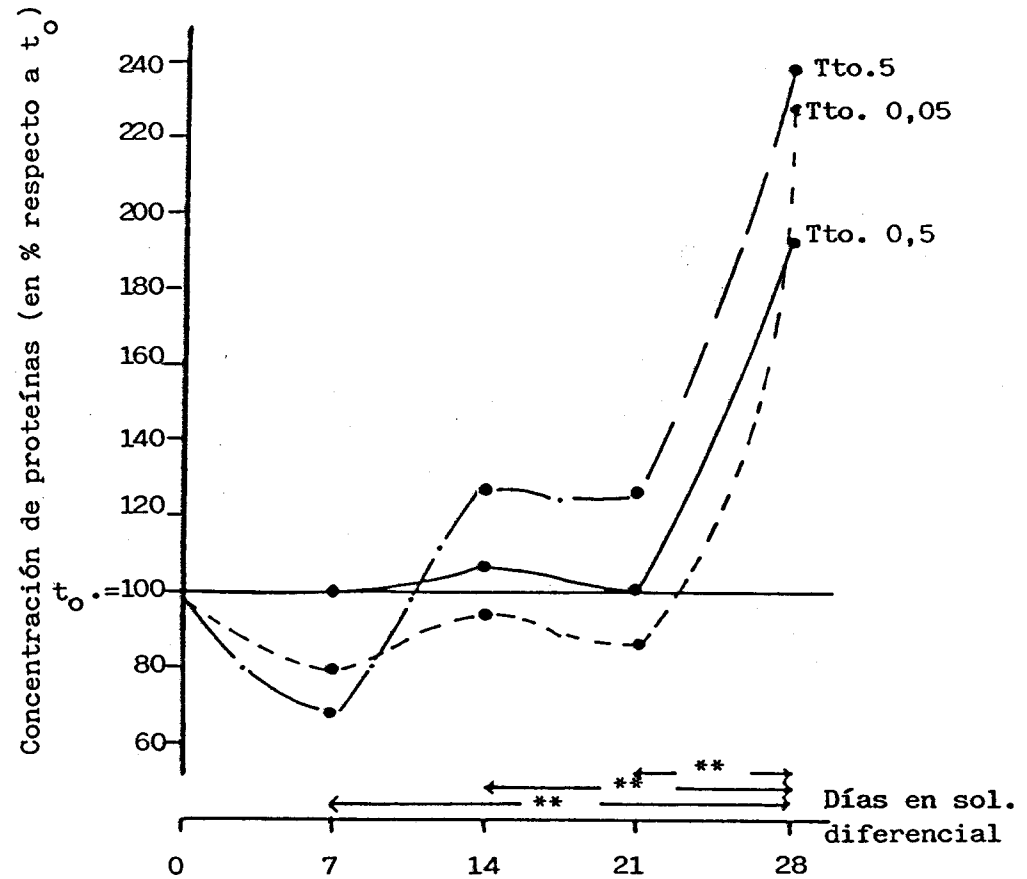


Fig. XL.- Evolución en el tiempo, para cada uno de los Ttos., de la concentración de proteínas de los extractos de la 1ª Experiencia (% respecto a la concentración en la 1ª recogida, $t_0 = 100$).

Tabla 22.- 2ª Experiencia. Concentración de proteínas (expresada como mg proteína/g de peso fresco. *Hojas infiltradas con H₂O destilada. **Hojas infiltradas con B.

Días	B= 0,05ppm										B= 0,5 ppm										B= 5 ppm				
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H*	B**	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	H
I	1,51	1,61	1,23	1,09	1,66	1,57	1,55	1,75	1,67	1,83	1,51	1,58	0,78	0,83	1,51	1,47	1,33	1,59	2,27	2,10	1,69	3,27	1,67	1,61	2,47
II	1,39	1,54	0,99	0,99	0,60	0,64	1,54	1,55	1,73	1,83	1,45	1,39	1,19	1,17	1,70	1,52	1,76	1,80	1,91	2,09	1,54	1,69	1,54	1,80	2,67
III	1,13	1,11	1,19	0,95	1,31	1,61	0,87	0,86	1,83	1,86	1,35	1,49	1,24	1,21	1,47	1,47	2,05	2,03	1,99	1,94	1,40	1,05	0,87	1,69	2,31
IV	1,00	1,36	0,91	1,26	0,42	0,48	1,50	1,67	1,69	1,78	1,63	1,74	1,26	1,23	0,71	0,67	1,58	1,51	1,58	2,13	1,67	2,44	1,77	1,82	2,41
\bar{X}	1,26	1,41	1,08	1,07	1,00	1,08	1,37	1,46	1,73	1,83	1,49	1,55	1,12	1,11	1,35	1,28	1,68	1,73	1,94	2,07	1,58	2,11	1,46	1,73	2,47

Tabla 22.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de proteínas en las hojas utilizadas para medir actividad PPO (2ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	3,4536	1,7268	12,76	$P < 10^{-4}$
Tiempos	4	4,1969	1,0492	7,76	$P < 10^{-4}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	1,4353	0,1794	1,33	N.S.
Bloques	3	0,6112	0,2037		
Error	42	5,6823	0,1353		

Tabla 22.- (Cont.)

Análisis de varianza para la concentración de proteínas en hoja (2ª Experiencia).

I.-

a) Considerando sólo los tratamientos deficiente y normal (que habían sido infiltrados con B).

No existen diferencias significativas entre el contenido proteico de las hojas infiltradas con B y las infiltradas con H₂O.

b) Considerando los tres tratamientos.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-4}$
Tratamientos	$P < 10^{-4}$
Interacción Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre las diferentes recogidas.

	0	7	14	21
7	N.S.	-	-	-
14	N.S.	N.S.	-	-
21	N.S.	N.S.	-	-
28	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$

Nivel de significación entre los tratamientos de B - (ppm B en solución).

	0,05	0,50	5,00
0,05	-	-	-
0,50	N.S.	-	-
5,00	$P < 0,01$	$P < 0,01$	-

Tabla 22.- (Cont.)

II. Considerando el tiempo 0 como valor 100.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
Tiempos	-
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

III.- Considerando el tratamiento normal (0,5 ppm de B) como valor 100

Nivel de Significación entre los tratamientos de B (ppm en solución).

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
Tiempos	-
Tratamientos	P<0,01
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

	<u>0,05</u>
5	<u>P<0,01</u>

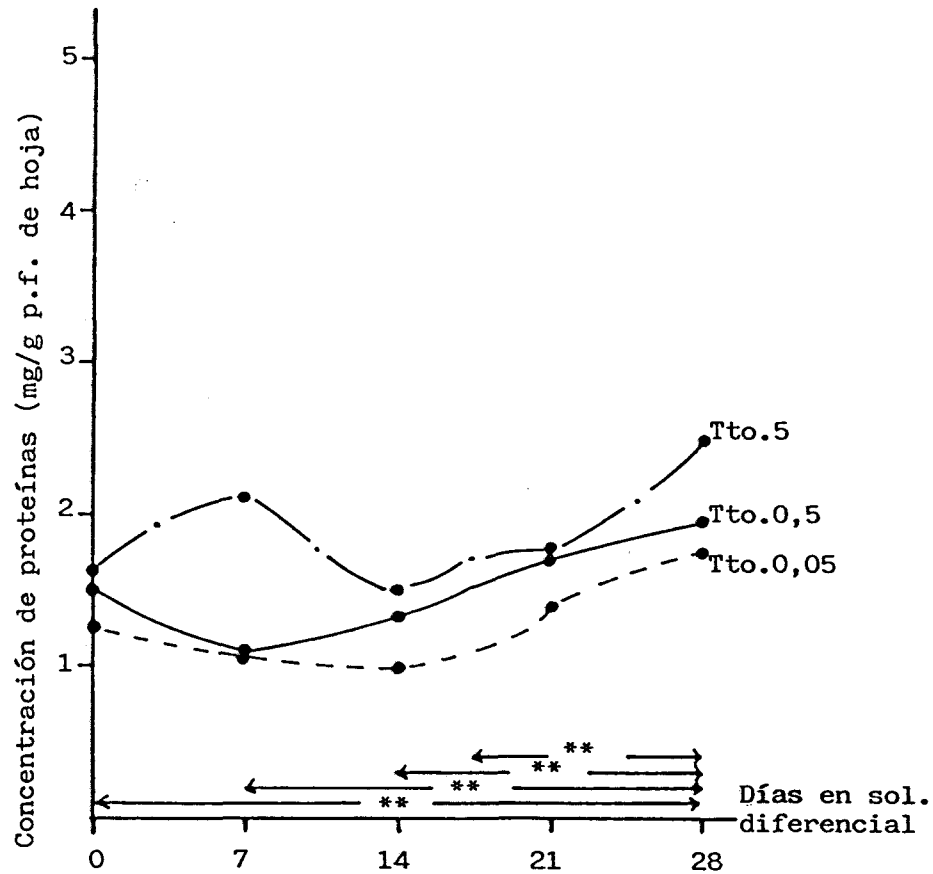


Fig. XLI.- Evolución en el tiempo, para cada uno de los Ttos., de la concentración de proteínas en los extractos utilizados para medir actividad PPO (2ª experiencia).

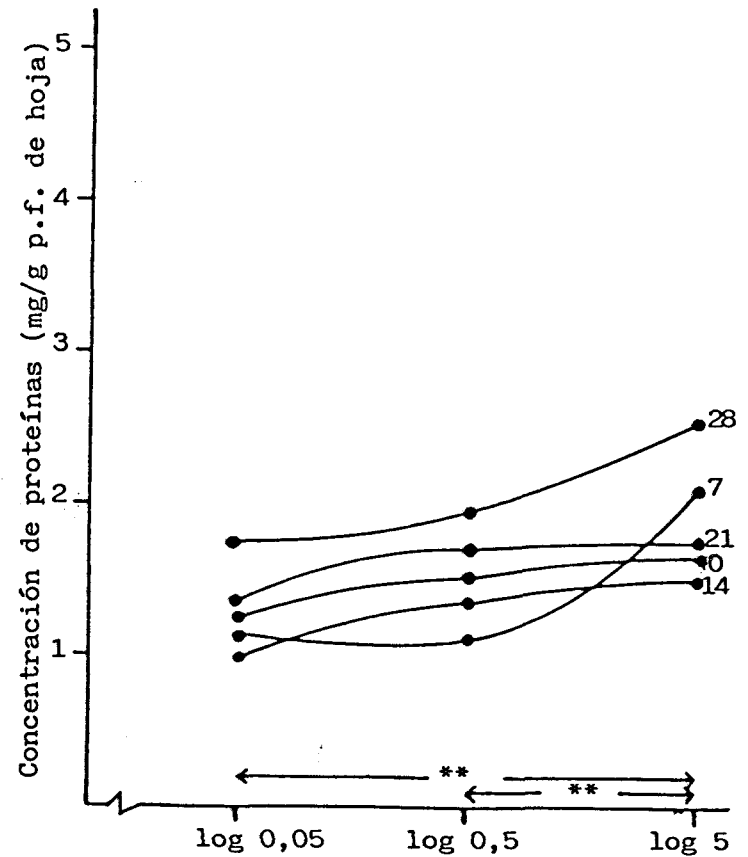


Fig. XLII.- Efectos de los Ttos. (expresados como log de la concentración de B en la sol. nutritiva) sobre la concentración de proteínas en los extractos de la 2ª experiencia.

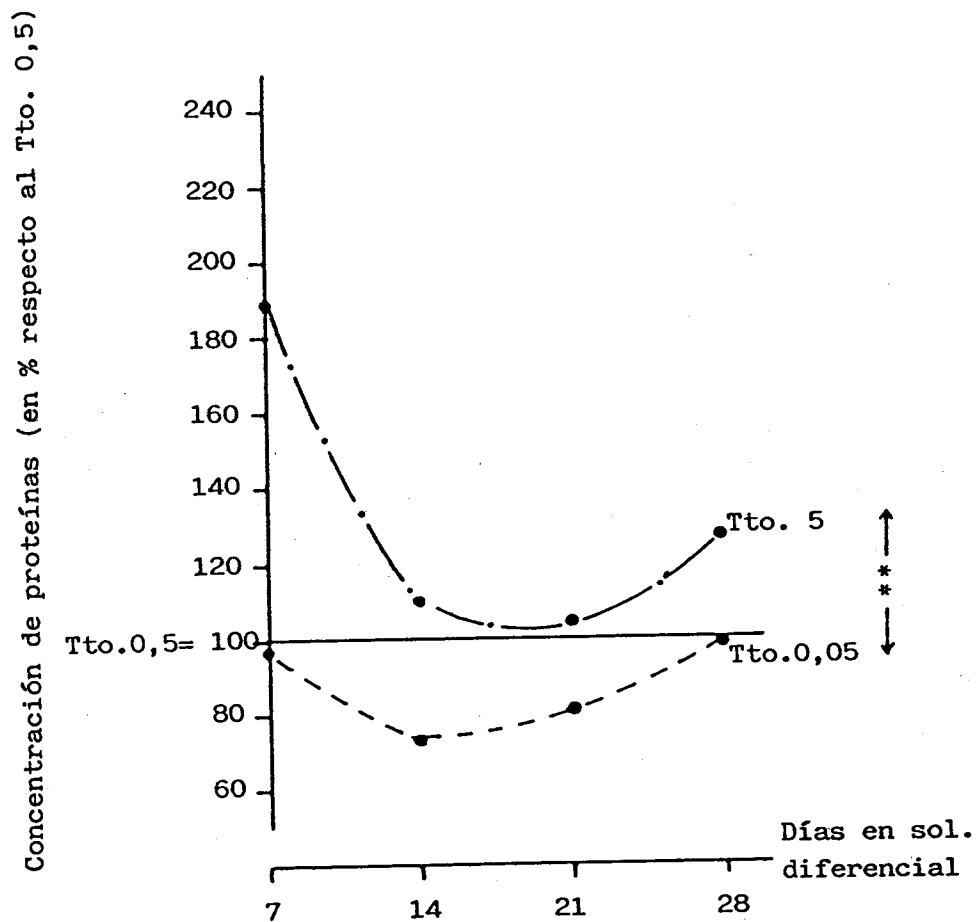


Fig. XLIII.- Evolución, con el tiempo de permanencia en sol. diferenciales, de la concentración de proteínas en los extractos de la 2ª Experiencia para los Ttos. deficiente (B= 0,05 ppm) y tóxico (B= 5 ppm) frente al normal (B= 0,5 ppm) que se toma como línea basal. Tto. 0,5= 100.

Tabla 23.- 3ª Experiencia. Concentración de proteínas (expresada como mg proteína/g de peso fresco. *Hojas infiltradas con H₂O destilada. **Hojas infiltradas con B.

Días	B= 0,05 ppm								B= 0,5 ppm								B= 5 ppm								
	0		7		14		21		28		0		7		14		21		28		0	7	14	21	28
	H*	B**	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B	H	H	H	H	
I	2,61	2,34	3,74	3,52	2,84	2,78	3,12	2,88	4,91	5,11	2,22	2,24	3,27	3,66	2,32	2,25	3,51	3,24	4,02	4,02	2,36	3,05	2,77	3,64	4,24
II	2,20	2,12	3,75	3,60	2,80	2,71	3,52	2,82	4,22	4,55	2,18	2,15	3,56	3,19	2,52	2,49	3,63	3,39	4,34	4,51	2,45	3,63	3,06	3,56	5,41
III	2,24	2,07	4,54	3,84	2,71	2,78	3,07	3,21	5,16	5,40	2,54	2,33	3,98	4,24	2,88	3,14	3,52	3,32	4,70	5,03	2,25	3,88	2,56	3,42	3,79
IV	2,41	2,48	3,89	3,80	2,70	2,86	3,10	3,68	4,62	4,51	2,15	2,34	3,77	3,62	2,95	3,07	3,84	3,87	4,99	4,08	2,30	4,26	2,92	3,66	5,56
\bar{X}	2,37	2,25	3,98	3,69	2,76	2,78	3,20	3,15	4,73	4,89	2,27	2,27	3,65	3,68	2,67	2,74	3,63	3,46	4,51	4,41	2,34	3,71	2,83	3,57	4,75

Tabla 23.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de proteínas en las hojas utilizadas para medir actividades glucosa-6-P-DH y 6-P-gluconato-DH (3ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	0,0918	0,0459	0,39	N.S.
Tiempos	4	39,7832	9,9458	83,83	$P < 10^{-6}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	0,7932	0,0992	0,84	N.S.
Bloques	3	0,6824	0,2274		
Error	42	4,9829	0,1186		

Tabla 23.- (Cont.).

Análisis de Varianza para el contenido proteico de las hojas de la 3ª Experiencia.

I.-

a) Comparando el tratamiento normal y deficiente (en los que las hojas habían sido infiltradas con B).

No hay diferencias significativas entre el contenido proteico de las hojas infiltradas con B y las infiltradas con H₂O.

b) Considerando los tres tratamientos.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-6}$
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-tratamientos	-

Nivel de significación entre las recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	0	7	14	21
7	$P < 0,001$	-	-	-
14	$P < 0,01$	$P < 0,001$	-	-
21	$P < 0,001$	$P < 0,01$	$P < 0,01$	-
28	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

Tabla 23.- (cont.).

II.-

Considerando el contenido proteico de las hojas en la primera recogida (nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B= 0) como valor 100.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-5}$
Tratamientos	-
Interacción	-
Tiempos-tratamientos	-

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresados como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	7	14	21
14	$P < 0,001$	-	-
21	N.S.	$P < 0,01$	-
28	$P < 0,01$	$P < 0,001$	$P < 0,01$

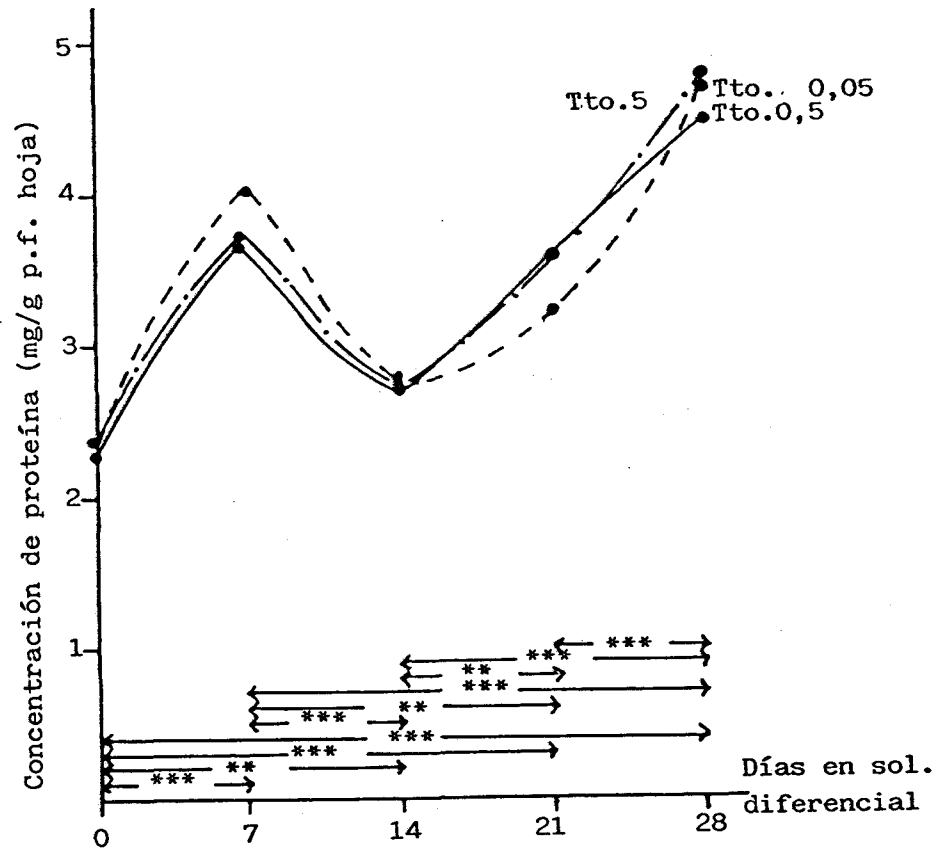


Fig. XLIV.- Evolución en el tiempo, para cada uno de los Ttos., de la concentración proteica de los extractos utilizados para medir las actividades glu-6P-DH y 6P-gluc-DH (3ª Experiencia).

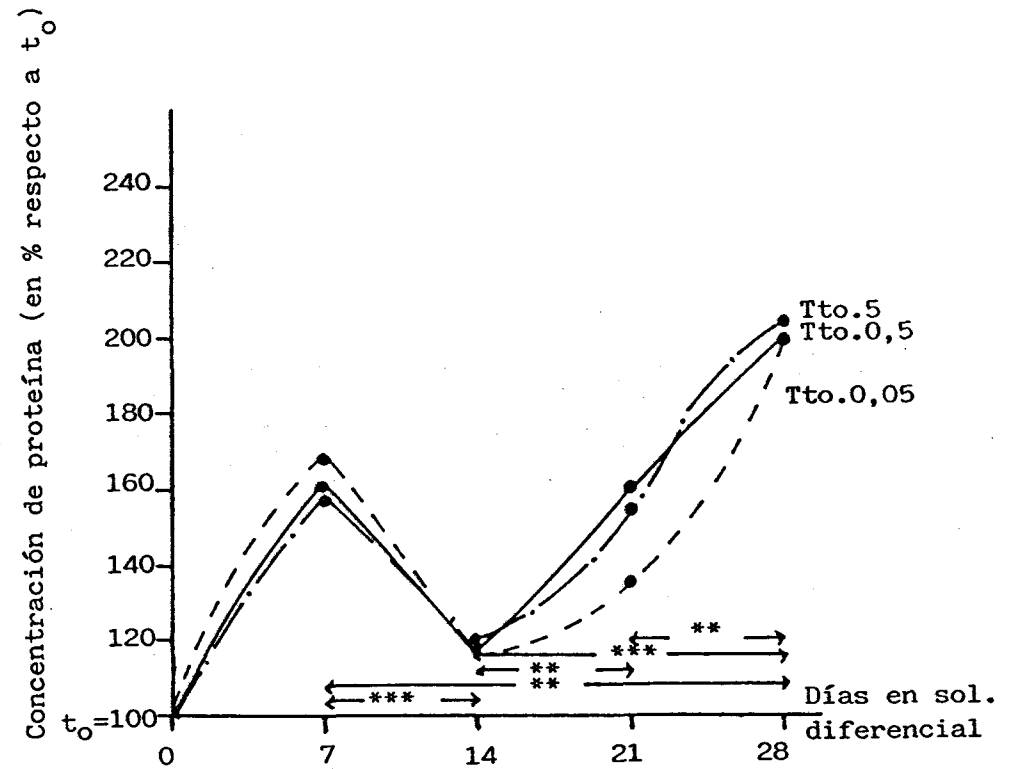


Fig. XLV.- Evolución en el tiempo, para cada uno de los Ttos., de la concentración de proteínas de los extractos de la 3ª experiencia (% respecto a la concentración en la 1ª recogida $t_0=100$).

Tabla 24.- 1ª Experiencia. Contenido de B en hojas, expresado como ppm ($\mu\text{g B/g}$ de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	825	528	438	512	2854	680	527	729	589	896	2082	2102	2028	2010
II	-	779	984	519	654	1529	624	785	610	673	306	1498	1781	2168	2405
III	-	602	611	595	709	1046	890	510	626	850	1160	1574	1725	2448	1824
IV	1368	2555	870	633	787	-	770	787	767	572	756	1993	1454	2058	1768
\bar{X}	1368	1190	748	546	666	1810	741	652	683	671	780	1787	1768	2176	2002

Análisis de la varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	-
Tratamientos	P<0,001
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre los diferentes tratamientos (expresados como ppm de B en solución).

	0,05	0,5
0,5	-	-
5	P<0,01	P<0,001

Tabla 24.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de B en las hojas utilizadas para la medida de las actividades: catalasa, peroxidasa y AIA-oxidasa (1ª Experiencia).

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	15333676,0616	7666838,0308	72,61	P < 0,001
Tiempos	3	211105,3807	70368,4585	0,67	N.S.
Interacción					
Tiempos-tratamientos	6	1202353,1807	200392,1968	1,90	N.S.
Bloques	3	228800,0456	76266,6819		
Error	33	3484258,1549	105583,5805		

Tabla 25.- 1ª Experiencia. Contenido de Cu en hojas, expresado como ppm (μg de Cu/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	24	30	23	32	108	29	22	41	39	24	23	56	40	35
II	-	32	85	25	58	46	32	44	42	54	6	18	30	45	45
III	-	11	28	29	33	34	20	32	35	50	41	30	30	45	32
IV	41	104	38	35	37	-	25	45	52	29	20	37	43	36	35
\bar{X}	41	43	45	28	40	63	27	36	43	43	23	27	40	42	37

Análisis de la Varianza.

<u>Diferencias entre:</u>	<u>Significación</u>
<u>Tiempos</u>	-
<u>Tratamientos</u>	-
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-Tratamientos</u>	-

Tabla 37.- 3ª Experiencia. Contenido de Mn en hojas, expresado como ppm (μg de Mn/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	382	298	330	-	-	380	315	335	-	117	334	282	282
II	-	-	358	278	244	-	-	418	304	256	-	356	319	272	246
III	-	-	298	316	233	-	-	326	286	264	-	369	302	297	268
IV	-	-	311	351	260	-	-	349	251	297	-	393	354	285	156
\bar{X}	-	-	337	311	267	-	-	368	289	288	-	309	327	284	238

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-4}$
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre las distintas recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	-	-	-	-
21	-	-	$P < 0,01$	-
28	-	-	$P < 0,001$	-

Tabla 36.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Fe, en las hojas utilizadas para la medida de las actividades: glu-6-P-DH y 6-P-gluc-DH (3ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	426,4909	213,2454	0,08	N.S.
Tiempos	2	86515,6912	43257,8456	16,29	$P < 10^{-4}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	4	20667,6174	5166,9043	1,95	N.S.
Bloques	3	29589,3261	9863,1087		
Error	24	63731,2198	2655,4675		

Tabla 36.- 3ª Experiencia. Contenido de Fe en hojas, expresado como ppm (μg de Fe/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	309	189	265	-	-	398	201	290	-	107	415	247	244
II	-	-	300	193	141	-	-	406	167	178	-	344	253	235	171
III	-	-	239	264	172	-	-	238	180	121	-	340	255	206	182
IV	-	-	256	328	177	-	-	298	140	297	-	366	351	206	161
\bar{X}	-	-	276	244	189	-	-	335	172	222	-	289	319	224	190

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-4}$
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	-	-	-	-
21	-	-	$P < 0,01$	-
28	-	-	$P < 0,01$	-

Tabla 35 .- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Cu en las hojas utilizadas para la medida de las actividades: glu-6-P-DH y 6-P-gluc-DH (3ª Experiencia).

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	977,3411	488,6706	2,36	N.S.
Tiempos	2	17352,7431	8676,3716	41,97	P<0,001
Interacción					
Tiempos-tratamientos	4	1491,0875	372,7719	1,80	N.S.
Bloques	3	2397,0420	799,0140		
Error	24	4961,7247	206,7385		

Tabla 35.- 3ª Experiencia. Contenido de Cu en hojas, expresado como ppm (μg de Cu/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	110	56	70	-	-	130	70	70	-	39	98	57	56
II	-	-	82	41	28	-	-	139	53	38	-	124	76	48	38
III	-	-	71	66	42	-	-	82	44	53	-	126	87	49	38
IV	-	-	79	82	40	-	-	100	36	71	-	138	115	47	34
\bar{x}	-	-	86	61	45	-	-	113	51	58	-	107	94	50	42

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre	Significación
Tiempos	$P < 0,001$
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (Expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	-	-	-	-
21	-	-	$P < 0,001$	-
28	-	-	$P < 0,001$	-

Tabla 34.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de B en las hojas utilizadas para la medida de las actividades:
glu-6-P-DH y 6-P-glu-DH (3ª Experiencia).

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	16083459,2030	8041729,6015	371,36	$P < 10^{-6}$
Tiempos	2	212766,1602	106383,0801	4,92	$P < 0,05$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	4	158162,3989	39540,5997	1,83	N.S.
Bloques	3	309833,5585	103277,8528		
Error	24	519710,7852	21654,6161		

Tabla 34.- 3ª Experiencia. Contenido de B en hojas, expresado como ppm (μg de B/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	934	832	790	-	-	1083	896	846	-	528	2371	2314	2176
II	-	-	753	537	396	-	-	1120	706	677	-	1546	1934	2172	2222
III	-	-	809	827	528	-	-	769	649	655	-	1768	1992	1942	2028
IV	-	-	684	1004	516	-	-	1026	537	870	-	1959	2617	2286	2150
\bar{X}	-	-	795	800	558	-	-	1000	697	762	-	1450	2229	2229	2144

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 0,05$
Tratamientos	$P < 10^{-6}$
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en solución diferencial de B)

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	-	-	-	-
21	-	-	-	-
28	-	-	$P < 0,01$	-

Nivel de significación entre los diferentes tratamientos de B (expresados como ppm de B en solución).

	0,05	0,5
0,5	-	-
5	$P < 0,001$	$P < 0,001$

Tabla 33 .- 2ª Experiencia. Contenido de Zn en hojas, expresado como ppm (μg de Zn/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	-	51	58	-	-	-	67	53	-	-	-	80	72
II	-	-	-	62	59	-	-	-	59	60	-	-	-	67	62
III	-	-	-	-	-	-	-	-	74	68	-	-	-	71	71
IV	-	-	-	64	66	-	-	-	67	64	-	-	-	64	53
\bar{X}	-	-	-	59	61	-	-	-	67	61	-	-	-	71	65

Tabla 32.- 2ª Experiencia. Contenido de Mn en hojas, expresado como ppm (μg de Mn/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	-	259	243	-	-	-	306	228	-	-	-	286	245
II	-	-	-	245	226	-	-	-	230	255	-	-	-	279	232
III	-	-	-	-	-	-	-	-	287	238	-	-	-	261	270
IV	-	-	-	286	242	-	-	-	269	248	-	-	-	268	221
\bar{X}	-	-	-	263	237	-	-	-	273	242	-	-	-	274	242

Tabla 31.- 2ª Experiencia. Contenido de Fe en hojas, expresado como ppm (μg de Fe/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	-	167	180	-	-	-	267	163	-	-	-	241	244
II	-	-	-	191	176	-	-	-	190	189	-	-	-	227	178
III	-	-	-	-	-	-	-	-	255	161	-	-	-	206	198
IV	-	-	-	244	182	-	-	-	196	227	-	-	-	202	179
\bar{X}	-	-	-	201	179	-	-	-	227	185	-	-	-	219	200

Tabla 30.- 2ª Experiencia. Contenido de Cu en hojas, expresado como ppm (μg de Cu/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	-	32	50	-	-	-	55	34	-	-	-	55	65
II	-	-	-	32	39	-	-	-	42	48	-	-	-	48	39
III	-	-	-	-	-	-	-	-	58	37	-	-	-	45	51
IV	-	-	-	46	60	-	-	-	52	55	-	-	-	43	45
\bar{X}	-	-	-	37	50	-	-	-	52	44	-	-	-	48	50

Tabla 29.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de B en las hojas utilizadas para la medida de la actividad PPO (2ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	11979278,2565	5989639,1283	331,17	P < 0,001
Tiempos	1	62892,6059	62892,6059	3,47	N.S.
Interacción					
Tiempos-tratamientos	2	123326,9150	61663,4575	3,41	N.S.
Bloques	2	178001,1582	89,5791		
Error	10	180863,8846	18086,3885		

Tabla 29.- 2ª Experiencia. Contenido de B en hojas, expresado como ppm (μg de B/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	-	645	619	-	-	-	831	779	-	-	-	2864	2441
II	-	-	-	594	488	-	-	-	753	738	-	-	-	2290	1915
III	-	-	-	-	-	-	-	-	947	628	-	-	-	2344	2446
IV	-	-	-	548	643	-	-	-	789	885	-	-	-	2616	2358
\bar{X}	-	-	-	596	583	-	-	-	830	756	-	-	-	2529	2290

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
<u>Tiempos</u>	-
<u>Tratamientos</u>	P<0,001
<u>Interacción</u>	
<u>Tiempos-Tratamientos</u>	-

Nivel de significación entre los diferentes tratamientos (expresados como ppm de B en la solución nutritiva).

	0,05	0,5
0,5	P<0,05	-
5	P<0,001	P<0,001

Tabla 28.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Zn en las hojas utilizadas para la medida de las actividades: catalasa, peroxidasa y AIA-oxidasa (1ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	566,7936	283,3968	0,92	N.S.
Tiempos	3	7102,8898	2367,6299	7,68	$P < 0,001$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	6	1659,6607	276,6101	0,90	N.S.
Bloques	3	1488,5948	496,1983		
Error	33	10177,0039	308,3941		

Tabla 28.- 1ª Experiencia. Contenido de Zn en hojas, expresado como ppm (μg de Zn/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	62	43	44	38	205	66	49	48	53	73	81	66	56	49
II	-	87	66	52	43	136	63	77	51	52	34	65	60	50	57
III	-	66	62	55	54	98	72	52	53	48	100	64	57	64	42
IV	91	181	64	64	63	-	78	71	49	39	70	77	55	51	41
\bar{X}	91	99	59	54	50	146	70	62	50	48	69	72	60	55	47

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	P<0,001
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en solución diferencial de B).

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	-	P<0,05	-	-
21	-	P<0,01	-	-
28	-	P<0,01	-	-

Tabla 27.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Mn en las hojas utilizadas para la medida de las actividades: catalasa, peroxidasa y AIA-oxidasa (1ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	3060,1778	1530,0889	0,61	N.S.
Tiempos	3	49026,9918	16342,3306	6,49	P < 001
Interacción					
Tiempos-tratamientos	6	8879,2439	1479,8749	0,59	N.S.
Bloques	3	10610,7305	3536,9102		
Error	33	83120,6000	2518,8061		

Tabla 27.- 1ª Experiencia. Contenido de Mn en hojas, expresado como ppm (μg de Mn/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	204	197	188	158	675	233	185	196	204	280	269	233	218	199
II	-	299	224	230	224	430	240	256	189	237	106	242	231	229	192
III	-	228	229	236	183	309	298	192	189	217	354	244	234	208	189
IV	329	545	257	195	213	-	266	270	204	181	271	285	185	211	155
\bar{X}	329	319	227	212	195	471	259	226	195	210	253	260	221	217	184

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 0,01$
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en solución diferencial de B).

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	-	$P < 0,05$	-	-
21	-	$P < 0,01$	-	-
28	-	$P < 0,01$	-	-

Tabla 26.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Fe en las hojas utilizadas para la medida de las actividades: ca talasa, peroxidasa y AIA-oxidaa (1ª Experiencia).

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	17949,7556	8974,8778	1,02	N.S.
Tiempos	3	40825,7460	13608,5820	1,54	N.S.
Interacción					
Tiempos-tratamientos	6	54399,5347	9066,5891	1,03	N.S.
Bloques	3	25340,6402	8446,8800		
.....					
Error	33	291771,8965	8841,5726		

Tabla 26.- 1ª Experiencia. Contenido de Fe en hojas, expresado como ppm (μg de Fe/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	207	155	137	138	729	183	139	217	154	273	201	246	180	179
II	-	241	321	166	172	389	164	187	171	178	81	165	165	120	177
III	-	155	160	188	160	335	190	141	162	233	354	169	150	247	168
IV	365	790	188	187	164	-	175	208	191	153	229	272	160	168	136
\bar{X}	365	348	206	170	159	484	178	169	185	180	234	202	180	179	165

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	-
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Tabla 25.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Cu en las hojas utilizadas para la medida de las actividades: cata-
lasa, peroxidasa y AIA-oxidasa (1ª Experiencia).

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	65,5352	32,7676	0,13	N.S.
Tiempos	3	512,7342	170,9114	0,68	N.S.
Interacción					
Tiempos-tratamientos	6	1402,4332	233,7389	1,84	N.S.
Bloques	3	1392,5410	464,1803		
Error	33	8320,0058	252,1214		

Tabla 37.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Mn en las hojas utilizadas para la medida de las actividades: glu-6-P-DH y 6-P-gluc-DH (3ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	6416,0542	3208,0271	2,83	N.S.
Tiempos	2	39146,5309	19573,2654	17,24	$P < 10^{-4}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	4	3895,2742	973,8185	0,86	N.S.
Bloques	3	8424,5113	2808,1704		
Error	24	27244,1214	1135,1717		

Tabla 38.- 3ª Experiencia. Contenido de Zn en hojas, expresado como ppm (μg de Zn/g de peso seco).

Días	B= 0,05 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	-	96	72	62	-	-	83	75	86	-	28	79	74	59
II	-	-	86	58	53	-	-	93	62	53	-	90	73	62	58
III	-	-	78	58	59	-	-	74	68	59	-	80	76	63	61
IV	-	-	82	69	61	-	-	84	60	70	-	100	89	63	59
\bar{X}	-	-	86	64	59	-	-	84	66	67	-	75	79	66	59

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-6}$
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre las distintas recogidas - (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	-	-	-	-
21	-	-	$P < 0,001$	-
28	-	-	$P < 0,001$	-

Tabla 38.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Zn en las hojas utilizadas para la medida de las actividades: glu-6-P-DH y 6-P-gluc-DH (3ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	977,3411	488,6706	2,36	N.S.
Tiempos	2	17352,7431	8676,3716	41,97	$P < 10^{-6}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	4	1491,0875	372,7719	1,80	N.S.
Bloques	3	2397,0420	799,0140		
Error	24	4961,7247	206,7385		

Tabla 39.- 4ª Experiencia. Contenido de B en hojas, expresado como ppm (μg de B/g de peso seco).

Días	B= 0,00 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	-	897	579	379	391	-	729	1217	700	574	-	2401	2079	2006	1975
II	-	824	441	514	394	-	765	804	803	729	-	2098	1762	1979	1432
III	-	898	353	558	328	-	862	704	652	553	-	2026	2290	2090	2104
IV	-	906	437	550	382	-	1236	732	779	754	-	1717	2337	2299	2840
\bar{X}	-	881	453	500	374	-	898	864	734	653	-	2061	2117	2094	2088

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	-
Tratamientos	$P < 10^{-6}$
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre los diferentes tratamientos de B (expresados como ppm de B en solución).

	0,00	0,5
0,5	$P < 0,05$	-
5	$P < 0,001$	$P < 0,001$

Tabla 39.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de B en las hojas utilizadas para la medida de la actividad PAL
(4ª Experiencia).

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Media de cuadrados</u>	<u>F. exp.</u>	<u>Significación</u>
Tratamientos	2	21955501,7350	10977750,8675	214,09	$P < 10^{-6}$
Tiempos	3	371076,6452	123692,2151	2,41	N.S.
<u>Interacción</u>					
Tiempos-tratamientos	6	403356,8603	67226,1434	1,31	N.S.
Bloques	3	256205,6553	85401,8851		
Error	33	1692103,5617	51275,8655		

Tabla 40.- 4ª Experiencia. Contenido de Cu en hojas, expresado como ppm (μg de Cu/g de peso seco).

Días	B= 0,00 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	96	88	59	43	41	115	59	82	52	28	146	115	41	26	33
II	140	83	41	36	25	104	67	42	31	26	125	97	33	24	32
III	109	100	38	61	30	105	72	60	42	25	79	107	47	38	22
IV	104	110	48	38	22	191	110	51	56	20	433	68	45	57	40
\bar{x}	112	95	47	45	30	129	77	59	45	25	196	97	42	36	32

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-5}$
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre las diferentes recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	0	7	14	21
7	$P < 0,01$	-	-	-
14	$P < 0,01$	$P < 0,05$	-	-
21	$P < 0,01$	$P < 0,05$	-	-
28	$P < 0,01$	$P < 0,01$	-	-

Tabla 40.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Cu en las hojas utilizadas para la medida de la actividad PAL (4ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	2686,4462	1343,2231	0,71	N.S.
Tiempos	4	108379,2450	27094,8112	14,22	$P < 10^{-5}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	14856,7021	1857,0878	0,98	N.S.
Bloques	3	10096,0508	3365,3503		
Error	42	80018,7635	1905,2087		

Tabla 41.- 4ª Experiencia. Contenido de Fe en hojas, expresado como ppm (μg de Fe/g de peso seco).

Días	B= 0,00 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	380	245	220	145	159	378	227	279	163	147	527	374	164	146	179
II	524	290	158	168	135	358	260	173	166	157	441	294	149	137	139
III	350	319	157	131	143	366	252	188	140	124	232	289	222	162	140
IV	351	335	157	176	139	689	338	199	171	131	1560	246	175	133	195
\bar{X}	401	297	173	155	144	448	269	210	160	140	690	301	178	145	163

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-5}$
Tratamientos	-
Interacción	-
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre cada una de las recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	0	7	14	21
7	$P < 0,01$	-	-	-
14	$P < 0,001$	-	-	-
21	$P < 0,01$	-	-	-
28	$P < 0,01$	-	-	-

Tabla 41.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Fe en las hojas utilizadas para la medida de la actividad PAL (4ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	42323,0376	21161,5188	0,83	N.S.
Tiempos	4	1127230,5060	281807,6265	11,05	$P < 10^{-5}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	157323,4869	19665,4359	0,77	N.S.
Bloques	3	121090,8461	40363,6154		
Error	42	1071105,4994	25502,5119		

Tabla 42.- 4ª Experiencia. Contenido de Mn en hojas, expresado como ppm (μg de Mn/g de peso seco).

Días	B= 0,00 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I		249	248	224	187		260	301	234	222		293	221	187	209
II		278	250	204	186		274	238	224	222		277	215	210	173
III		258	218	209	190		283	223	221	194		317	236	228	238
IV		285	209	209	202		331	255	233	230		292	225	204	247
\bar{X}		268	231	212	191		287	254	228	217		295	224	207	217

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-5}$
Tratamientos	$P < 0,05$
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre cada una de las recogidas (expresadas como nº de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	-	$P < 0,01$	-	-
21	-	$P < 0,001$	$P < 0,01$	-
28	-	$P < 0,001$	$P < 0,05$	-

Nivel de significación entre los tratamientos (expresados como ppm de B en la solución nutritiva).

	0,00	0,5
0,5	$P < 0,05$	-
5	-	-

Tabla 42.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Mn en las hojas utilizadas para la medida de la actividad PAL (4ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	3591,6704	1795,8352	4,33	$P < 0,05$
Tiempos	3	40791,8172	13597,2724	32,76	$P < 10^{-5}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	6	2668,3286	444,7214	1,07	N.S.
Bloques	3	1246,0197	415,3399		
Error	33	13698,8821	415,1176		

Tabla 43.- 4ª Experiencia. Contenido de Zn en hojas, expresado como ppm (μg de Zn/g de peso seco).

Días	B= 0,00 ppm					B= 0,5 ppm					B= 5 ppm				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Rep.															
I	75	63	65	50	44	70	58	75	51	56	82	77	50	49	53
II	82	69	51	46	49	76	64	59	49	50	71	66	50	55	51
III	77	69	58	52	49	79	74	60	46	53	49	93	58	58	53
IV	69	76	55	56	42	130	63	58	60	51	199	64	53	53	64
\bar{X}	76	69	57	51	46	89	65	63	52	53	100	75	53	54	55

Análisis de la Varianza.

Diferencias entre:	Significación
Tiempos	$P < 10^{-4}$
Tratamientos	-
Interacción	
Tiempos-Tratamientos	-

Nivel de significación entre cada una de las recogidas - (expresadas como n° de días de permanencia en soluciones diferenciales de B).

	0	7	14	21
7	-	-	-	-
14	$P < 0,01$	-	-	-
21	$P < 0,01$	-	-	-
28	$P < 0,01$	-	-	-

Tabla 43.- (Cont.).

Análisis de la varianza para el contenido de Zn en las hojas utilizadas para la medida de la actividad PAL (4ª Experiencia).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F. exp.	Significación
Tratamientos	2	573,0341	286,5170	0,77	N.S.
Tiempos	4	11574,7347	2893,6837	7,73	$P < 10^{-4}$
Interacción					
Tiempos-tratamientos	8	1248,9223	156,1153	0,42	N.S.
Bloques	3	1707,8894	569,2965		
Error	42	15714,2669	374,1492		

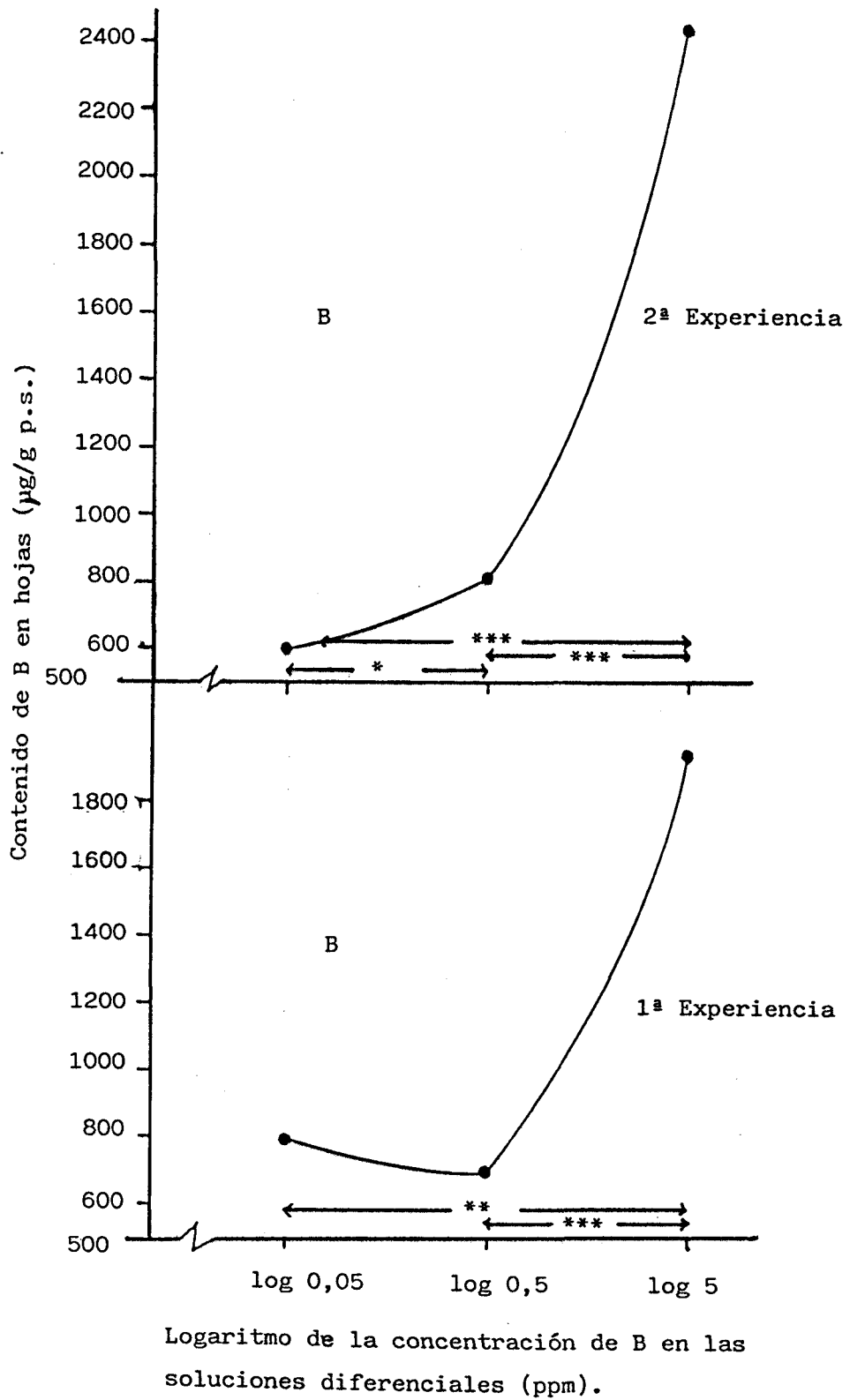


Fig. XLIX.- Contenido de B en hojas (ppm) en función de la concentración de B en las soluciones diferenciales.

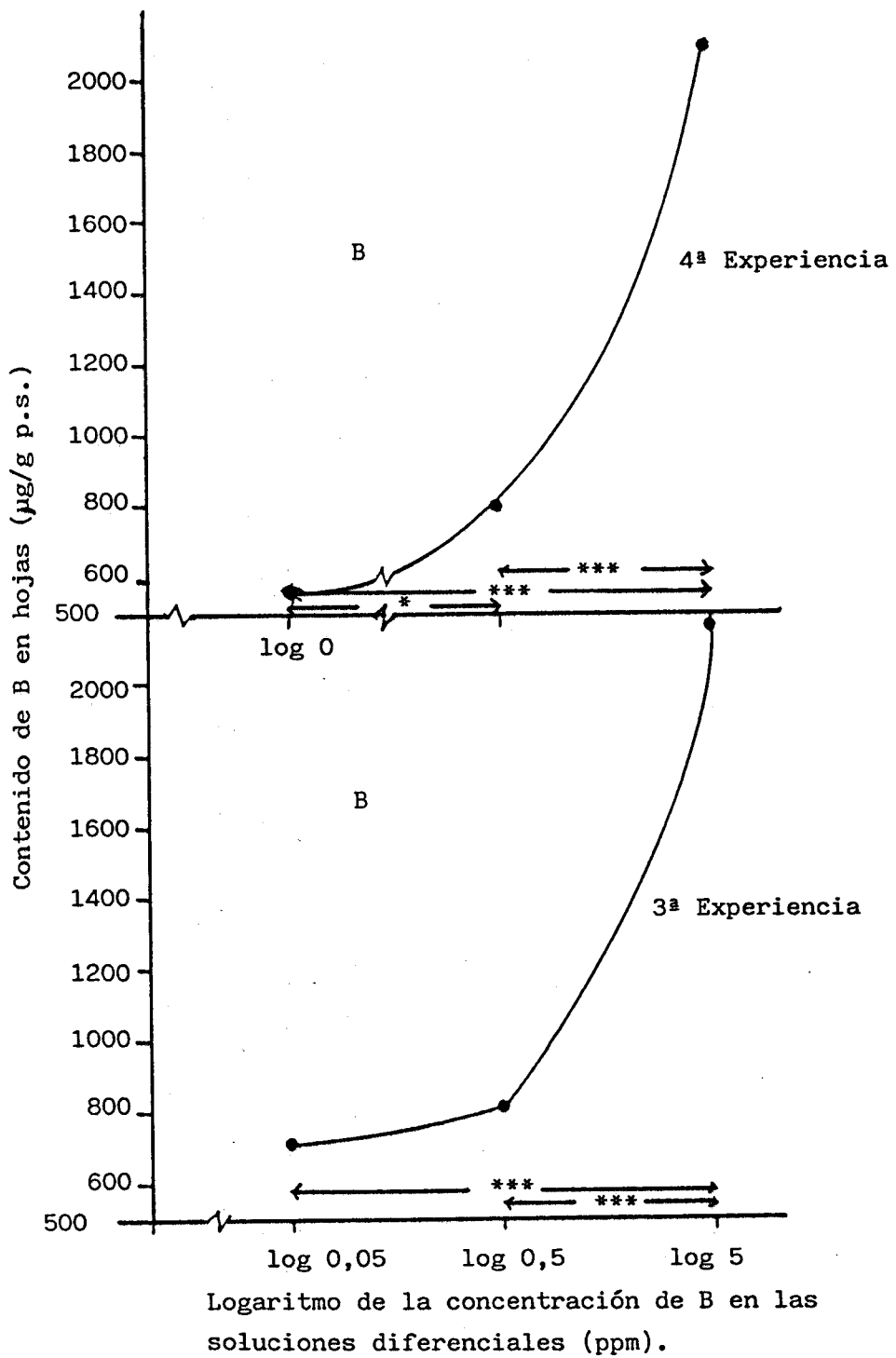


Fig. XLIX.- Contenido de B en hojas (ppm) en función de la concentración de B en las soluciones diferenciales.

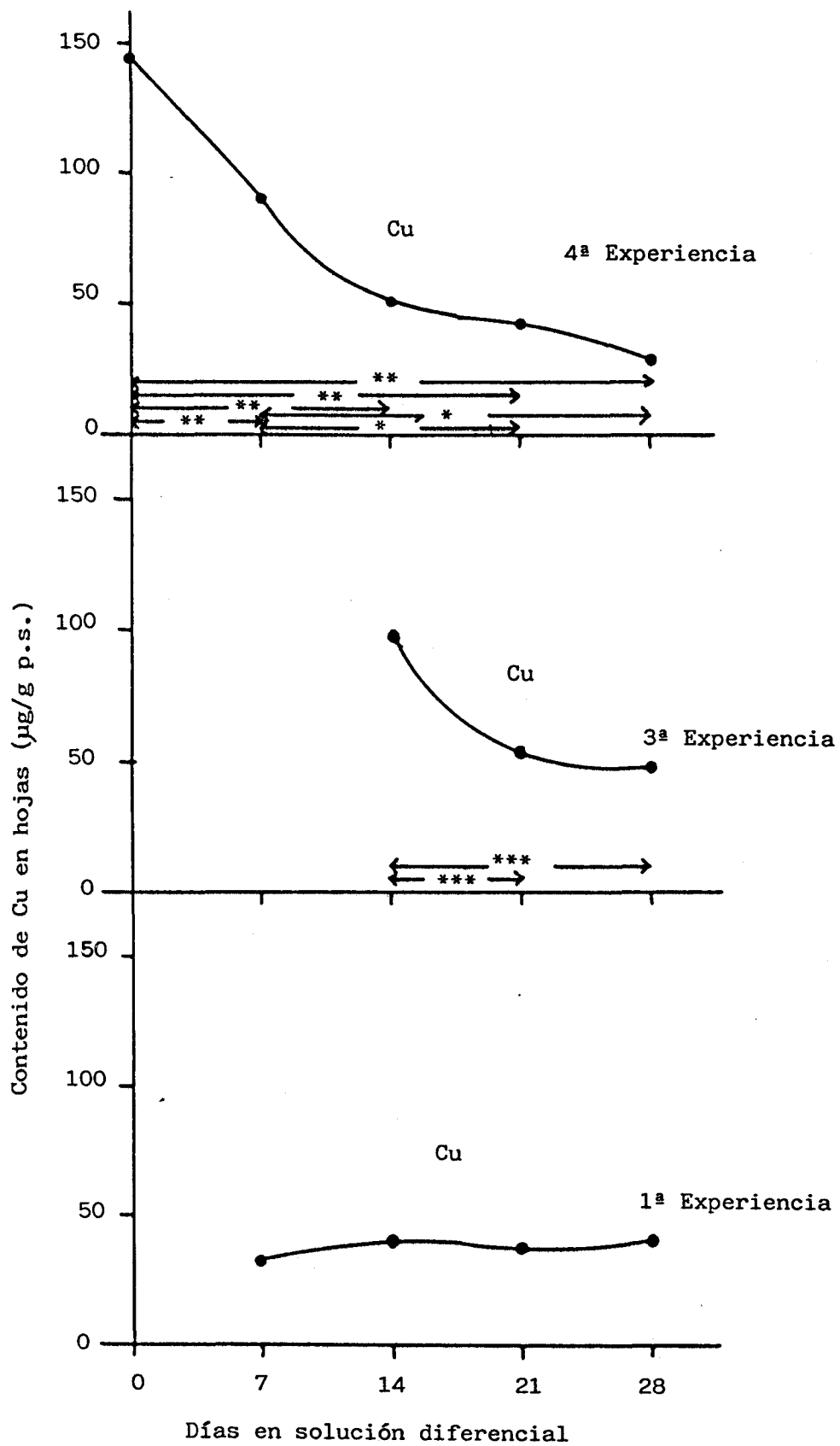


Fig. L.- Evolución, según el tiempo de permanencia de las plantas en soluciones diferenciales de B, del contenido de Cu en hoja.

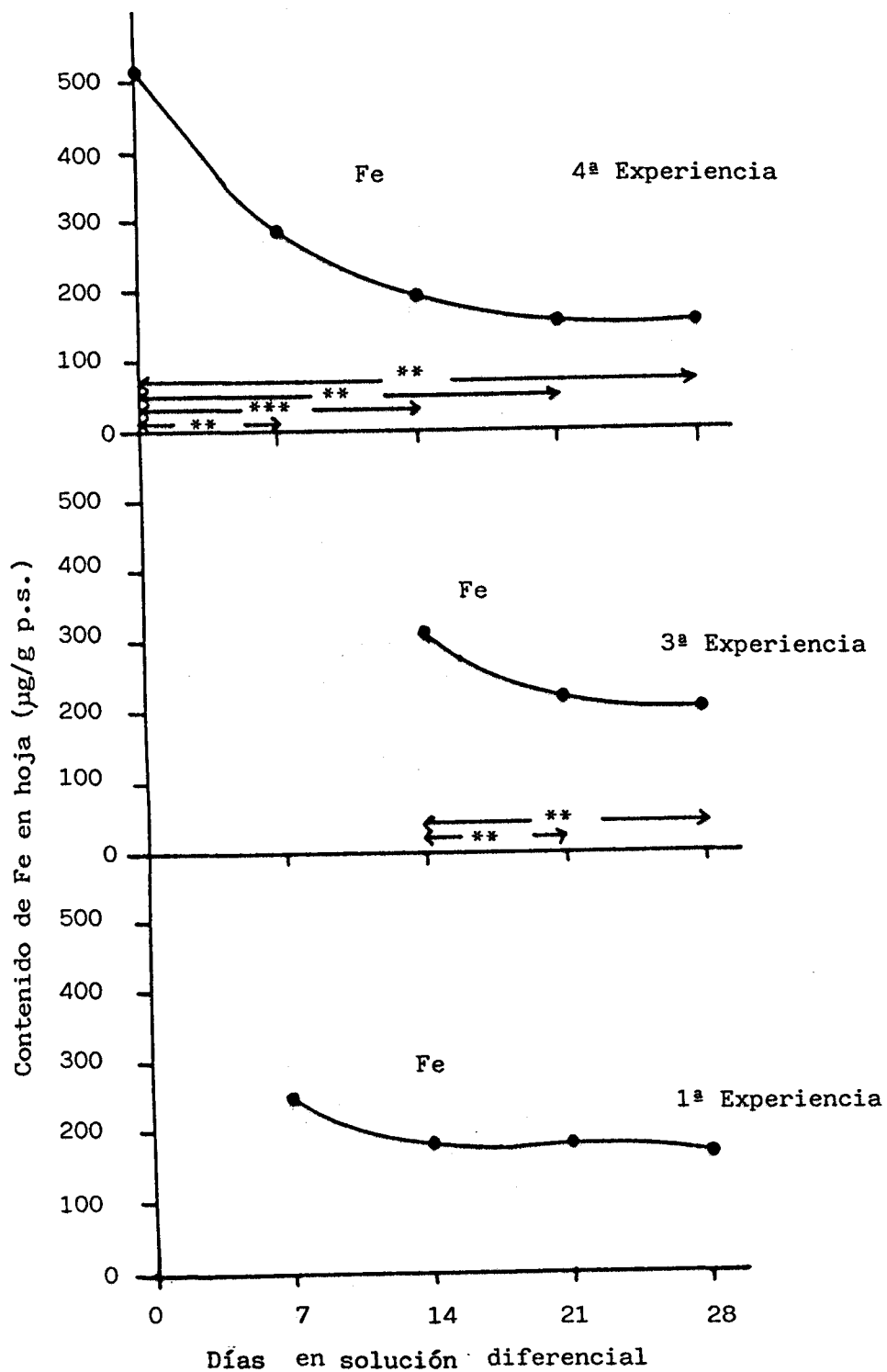


Fig. LI .- Evolución, según el tiempo de permanencia de las plantas en soluciones diferenciales de B, del contenido de Fe en hoja.

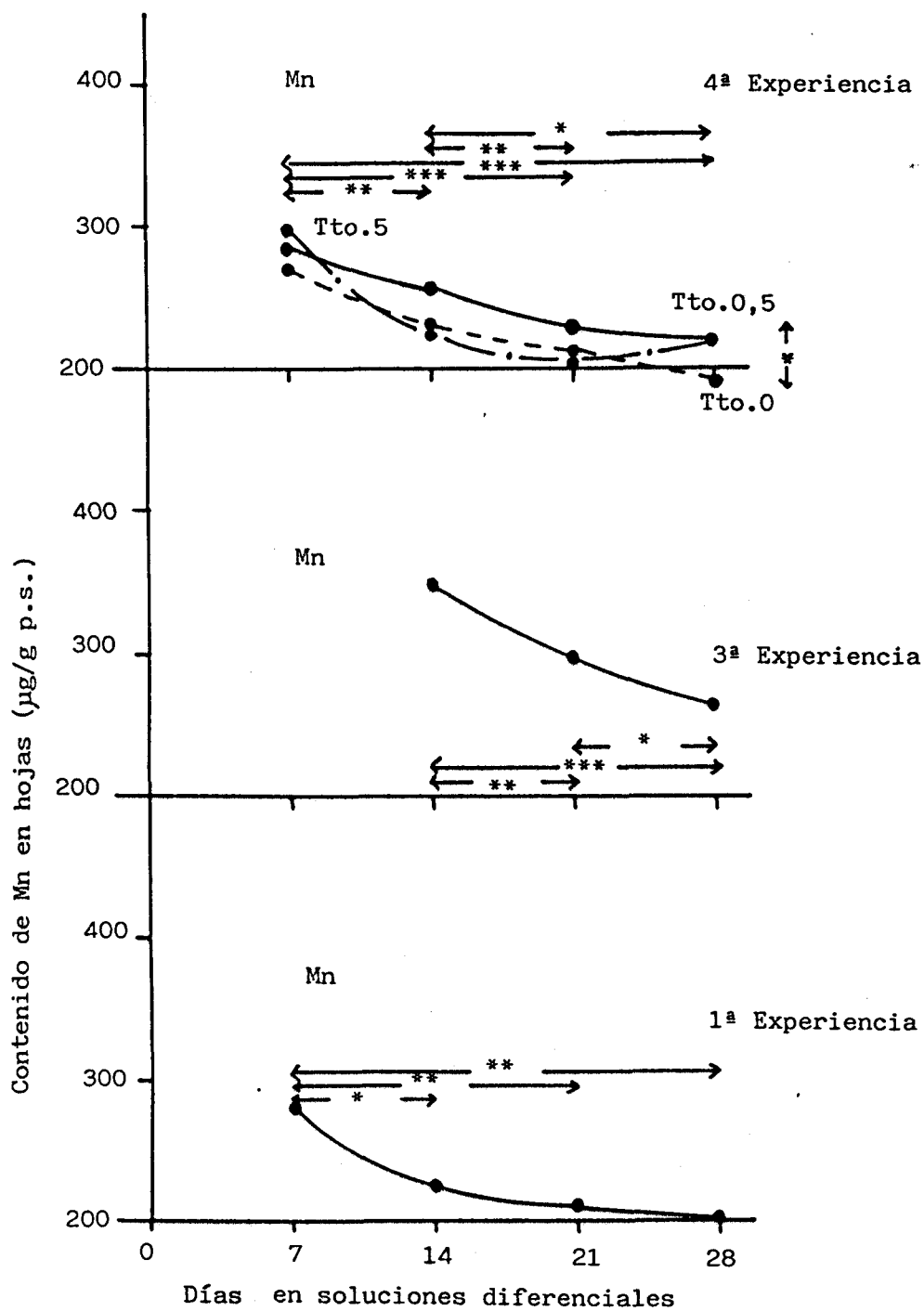


Fig. LII .- Evolución, según el tiempo de permanencia de las plantas en soluciones diferenciales de B, del contenido de Mn en hoja.

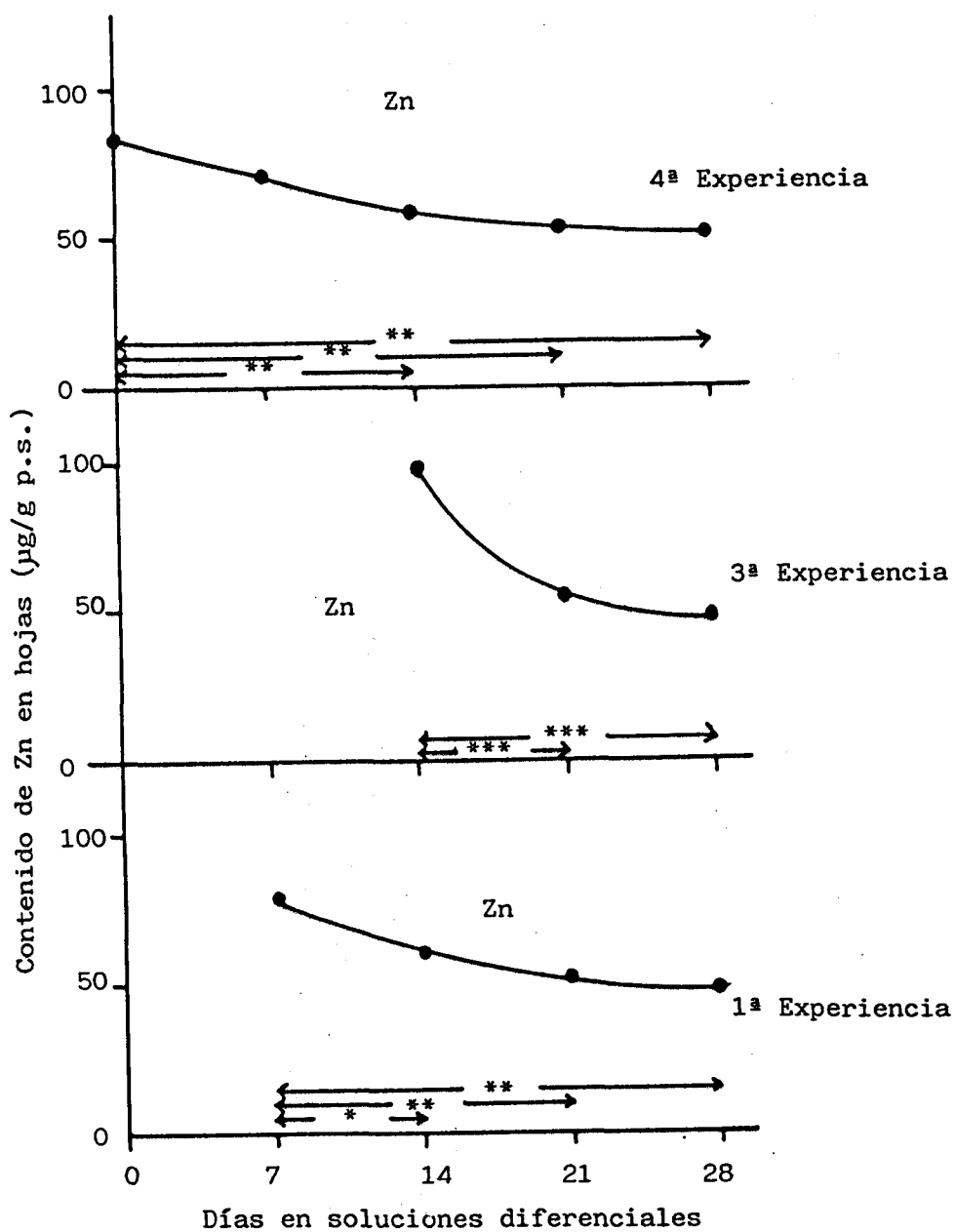


Fig. LIII .- Evolución, según el tiempo de permanencia de las plantas en soluciones diferenciales de B, del contenido de Zn en las hojas.

Tabla 44.- (Cont.).

2ª Experiencia.

Correlación	g.l.	F. exp.	Signif.	r
Act. PPO-B en hoja	1;9	7,49	P < 0,05	0,6739
Act. PPO-Cu en hoja	1;9	0,29	N.S.	0,1757
Act. PPO-Fe en hoja	1;9	0,09	N.S.	0,1013
Act. PPO-Mn en hoja	1;9	2,48	N.S.	-0,4645
Act. PPO-Zn en hoja	1;9	0,12	N.S.	0,1138
Act. PPO-proteína en extracto	1;41	0,06	N.S.	-0,0391
o-difenoles-B en hoja	1;9	0,17	N.S.	-0,1358
o-difenoles-Act. PPO	1;41	1,34	N.S.	0,1776

3ª Experiencia

Correlación	g.l.	F. exp.	Signif.	r
Act. glu-6P-DH-B en hoja	1;23	1,22	N.S.	0,2242
Act. glu-6P-DH-Cu en hoja	1;23	0,04	N.S.	-0,0396
Act. glu-6P-DH-Fe en hoja	1;23	0,25	N.S.	-0,1035
Act. glu-6P-DH-Mn en hoja	1;23	0,38	N.S.	-0,1282
Act. glu-6P-DH-Zn en hoja	1;23	2,32	N.S.	0,3029
Act. glu-6P-DH-proteína en extracto	1;41	8,30	P < 0,01	0,4104
Act. 6P-glu-DH-B en hoja	1;23	0,26	N.S.	0,1057
Act. 6P-glu-DH-Cu en hoja	1;23	1,06	N.S.	0,3360
Act. 6P-glu-DH-Fe en hoja	1;23	0,94	N.S.	0,1985
Act. 6P-glu-DH-Mn en hoja	1;23	2,31	N.S.	0,3021
Act. 6P-glu-DH-Zn en hoja	1;23	8,16	P < 0,01	0,5117

Tabla 44.- (Cont.)

3ª Experiencia

Correlación	g.l.	F. exp.	Signif.	r
B en hoja-Zn en hoja	1;23	6,12	P < 0,01	0,4584
Act. glu-6P-DH-Act.6P-gluc-DH	1,41	14,57	P < 0,001	0,5120
Act. 6P-gluc-DH-proteína en extracto	1;41	4,88	P < 0,05	0,3259
o-difenoles-B en hoja	1;23	1,29	N.S.	0,2307
o-difenoles-Act. glu-6P-DH	1;41	4,13	P < 0,05	0,5025
o-difenoles-Act. 6P-gluc-DH	1,41	17,08	P < 0,001	0,5423

4ª Experiencia

Correlaciones	g.l.	F. exp.	Signif.	r
Act. PAL-B en hoja	1;32	0,12	N.S.	-0,0607
Act. PAL-Cu en hoja	1;32	0,01	N.S.	0,0096
Act. PAL-Fe en hoja	1;32	0,01	N.S.	0,0077
Act. PAL-Mn en hoja	1;32	0,08	N.S.	0,0113
Act. PAL-Zn en hoja	1;32	0,17	N.S.	0,0851
o-difenoles-B en hoja	1;41	0,35	N.S.	0,0918
o-difenoles-Act. PAL	1;32	3,00	N.S.	0,2928

3.- RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.- Expresión de los resultados.- Como puede observarse en cada caso particular, todos los resultados, incluidos los de actividades enzimáticas, se han referido a gramo de peso fresco de hoja recién cortada, justificando esta decisión en base a las siguientes circunstancias que se dan en nuestro material:

a) Puesto que nuestras experiencias se han realizado en cámara de cultivo, con la humedad estrictamente controlada, y sin posibilidad de déficit hídrico en las raíces (el cultivo es hidropónico), y ya que la toma de muestras siempre se realizó a la misma hora, creemos que el peso fresco de las hojas recién cortadas no está incluido por cambios transitorios en el contenido hídrico de las plantas, convirtiéndose en un parámetro de referencia muy adecuado.

b) El hecho de referir las actividades enzimáticas a gramo de peso fresco nos posibilita la correcta comparación con otros parámetros que necesariamente han de expresarse en esta forma, como es el contenido de o-difenoles.

c) Como podrá comprobarse cuando discutamos los contenidos proteicos de los extractos, éstos varían muy significativamente sólo frente al tiempo, ya que con la edad de la hoja aumenta sobre todo el contenido de enzimas fotosintéticos. Estas grandes variaciones enmascaran las que se deben a los Ttos. de B, que no son tan acusadas, por lo que la influencia del tiempo es la única que se pone de manifiesto en las medidas que incluyan el contenido proteico (actividad específica).

3.2.- Toma de muestras.- Todas las tomas de muestra, en las distintas recogidas y experiencias, se realizaron teniendo especial cuidado de que las plantas estuvieran aproximadamente en el mismo momento del fotoperiodo: el correspondiente a la "tarde", según el régimen fotoperiódico de la cámara de cultivo. De acuerdo con los últimos descubrimientos respecto a la influencia

de los ritmos endógenos sobre ciertas medidas de parámetros bioquímicos y fisiológicos de las plantas, es absolutamente crucial realizar dichas medidas en la misma fase del ritmo endógeno, ya que se han detectado grandes diferencias en los mismos parámetros medidos en diferentes momentos del día y de la noche.

3.3.- Justificación e interpretación de las distintas etapas del análisis estadístico.- Como ya consideramos en el Apto. 2.12., el análisis estadístico de los datos se realizó siguiendo 3 etapas:

I) Análisis de la varianza de los datos directos, tal como se exponen en las respectivas tablas.

II) Análisis de la varianza de los datos referidos al punto de partida de la experiencia, t_0 (1ª recogida), que se toma con línea basal o testigo de tiempo ($t_0 = 100$).

III) Análisis de la varianza de los datos referidos al tratamiento normal de B, que se toma como línea basal o testigo de tratamientos ($Tto. 0,5 = 100$).

I) En las tablas de datos directos se estudian las variaciones de los diferentes parámetros frente a las variables de tiempo y Ttos. de B. Naturalmente son la base de todo el trabajo, no continuándose las demás etapas del análisis estadístico si no hay significación frente a ninguna de las variables.

En estas tablas se incluyen los datos de la 1ª recogida (t_0) como testigo de tiempo, ya que esta recogida tuvo lugar justo antes de que las plantas se pasaran a soluciones diferenciales de B, de manera que las variaciones que aparecen en ella representan la variabilidad de nuestras plantas en el punto de partida de la experiencia. En estas tablas, por tanto, pueden observarse claramente las diferencias entre esta 1ª recogida y las demás, cosa que es tan fácil de considerar en los siguientes del análisis estadístico. Así podemos detectar efectos tempranos, que pueden ser atribuidos a posibles acciones primarias del B.

II) La existencia del testigo de tiempo, o punto de partida de nuestra experiencia (t_0) hace interesante la elaboración de los datos de manera que se expresen en % de la 1ª recogida (t_0), que se hace 100 dentro de cada bloque y Tto., quedando expresados los datos en % del testigo de tiempo. Las significaciones obtenidas en este 2º paso del análisis corresponden, por tanto, a las diferencias entre los % de los datos respecto a la basal de tiempo, teniendo la ventaja de que ahora existe un punto de partida único e igual para toda la experiencia ($t_0 = 100$), eliminando así el efecto de la variabilidad de las plantas en el punto de partida.

Cuando en las tablas de datos directos existían interacciones significativas, o estaban cerca de serlo, el efecto de los Ttos. se hace más patente, observándose una mayor significación frente a este factor. Por ello, creemos que esta forma de expresión ayuda a aclarar y favorece la interpretación de los valores directos, muy especialmente cuando aparecen interacciones entre factores.

En algunos casos el aumento de variabilidad inevitable que lleva consigo la elaboración de los datos, junto con el hecho de que, en estos casos, las oscilaciones de la actividad son exactamente en el mismo sentido en todas las recogidas, hace que disminuya o se anule la significación.

III) En la siguiente etapa, se realiza una operación similar a la anterior pero refiriendo en este caso los datos al testigo de Ttos. El Tto. $0,5$, que se hace 100, y se comparan los % con respecto a él de los otros Ttos. eliminando el tiempo 0 (puesto que era el instante en el que todavía no habían actuado los Ttos.) y buscándose diferencias entre los Ttos. y recogidas. Esas diferencias deberían aparecer más patentes en el factor Ttos., pues normalmente el Tto. tóxico es presumible que actúe de manera diferente (en distinto sentido) al deficiente, con lo que las diferencias entre ambos Ttos. respecto al normal aparecen más claramente. Sin embargo, cuando el Tto. deficiente y el tóxico se comporten de manera semejante (en el mismo sentido y aproximadamente en igual magnitud), las diferencias entre Ttos. no aparecerán significativas en estos cuadros.

Igual que indicábamos en el caso anterior, la elaboración de los datos aumenta la variabilidad y, junto con la pérdida de grados de libertad, hace que estos cuadros sólo aparezcan significativos aquellos efectos que sean realmente muy acusados.

IV) Por último, se han ensayado correlaciones entre los parámetros que consideramos presumiblemente relacionados dentro de cada experiencia, de acuerdo con la bibliografía consultada; asimismo, estudiamos la correlación de cada parámetro con los contenidos de microelementos en las hojas, al objeto de detectar posibles efectos de estos nutrientes, y en el caso de que tales correlaciones se confirmaran, se analizó la correlación entre el contenido del elemento en cuestión y el contenido de B en las hojas, por si se trataba de un efecto indirecto de los niveles de B. Por último, hemos estudiado las correlaciones entre las actividades enzimáticas y el contenido proteico de los extractos en que fueron medidas.

3.4.- Efecto de la infiltración o adición de boro "in vitro" sobre los parámetros bioquímicos medidos.- El primer hecho general que puede observarse en nuestros datos, es que, en ningún caso se han encontrado variaciones significativas entre las medidas realizadas en los extractos de hojas deficientes y normales con y sin adición de tampón borato (B = 15 ppm en peso fresco, aproximadamente la concentración de este elemento en las hojas fisiológicamente normales), bien adicionándolo mediante infiltración de las hojas inmediatamente antes de su homogeneización (1ª, 2ª y 3ª experiencias), bien directamente a la mezcla de reacción (4ª y 5ª experiencias). Pensamos que este hecho contradice la idea, defendida por Lee et al., (1976) de que la acción del B sobre determinadas reacciones enzimáticas se produce simplemente por una interacción directa con los sustratos, mediante la formación de complejos. Si tal hipótesis fuera cierta, los efectos provocados por la deficiencia de B podrían corregirse por la adición de B "in vitro", ya que la formación de complejos con sustratos solubles, por tratarse de una reacción química, en un efecto inmediato que ocurrirá en cuanto se pongan en contacto ambas sustancias en la mezcla de reacción. Por el contrario, nuestros

resultados parecen indicar que la alteración de determinadas reacciones enzimáticas, provocada por la deficiencia de B, se debe a acontecimientos ocurridos durante el cultivo en dichas condiciones, y que han afectado bien a la cantidad de enzima activo, bien a la de cofactores que intervienen en la reacción. Es decir, de acuerdo con nuestros resultados, los cambios producidos por la falta de B "in vivo", durante el cultivo, modifican las actividades enzimáticas a través de un efecto a largo plazo, que seguramente implica alteraciones de estructuras celulares o proceso metabólicos complejos que no son inmediatamente recuperables por la adición de B "in vitro".

De entre las acciones propuestas para el B en el metabolismo vegetal, revisadas en el capítulo de Introducción, cumplirían la condición anteriormente expuesta las siguientes:

a) Actuación a nivel de las membranas celulares, en la formación de las cuales se ha postulado que intervendría el B, bien como constituyente de la misma membrana (formando complejos con componentes de la misma), bien modulando la biosíntesis de dichos componentes. En ambos casos, los cambios en la composición de las membranas, además de otros efectos, alterarían las relaciones entre éstas y los enzimas a ellas ligados, lo que se traduciría en cambios de actividad, sobre todo si dicha asociación determina su activación o inactivación. Este tipo de efectos podrían explicar las alteraciones de ciertas actividades enzimáticas por los Ttos. de B en general, y explicarían también porqué la adición de B "in vitro" no corrige los efectos de la deficiencia de B sobre dichas actividades enzimáticas.

b) Actuación a nivel de la proteínosíntesis, que también producirían efectos a largo plazo sobre las actividades enzimáticas, que no serían inmediatamente recuperables mediante la adición de B "in vitro".

En una experiencia previa, intentamos la recuperación de la proteínosíntesis, mediante la incubación de las hojas infiltradas con tampón borato o con agua, comparándolas con las no incubadas (Tabla 4). y realizamos medidas de actividad peroxidasa y catalasa.

Como ya hemos indicado en el apartado de Material y Métodos, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la incubación por sí misma producía un aumento indiscriminado de dichas actividades, enmascarando cualquier efecto provocado por los niveles de B o por la infiltración con B "in vitro". Interpretamos que la incubación introducía una causa de variación no relacionada con los niveles de B, como puede ser el inicio de procesos de senescencia, que suelen producir un estímulo de las actividades oxidásicas en la hoja cortada. Puesto que muchas de las actividades medidas en nuestras experiencias correspondían a enzimas oxidativos, renunciemos a la incubación de las hojas, y por tanto hemos pospuesto el estudio de la actuación del B sobre la recuperación de actividades enzimáticas a través de proteínosíntesis para trabajos posteriores, con un sistema distinto.

3.5.- Estudio de los parámetros relacionados en el metabolismo fenólico en las hojas.- Hemos agrupado en este apartado general todos los enzimas que, de manera más o menos directa, intervienen en el metabolismo de los fenoles. Entre los directamente implicados estarían la glucosa-6P-deshidrogenasa, 6P-gluconato-deshidrogenasa y fenilalanina-amonio-liasa (en la biosíntesis), y polifenol oxidasa y peroxidasa (en la oxidación); la catalasa tiene una relación más indirecta, ya que actúa sobre el H_2O_2 necesaria para la actuación de la peroxidasa. La ácido indol-acético-oxidasa se incluye igualmente por su relación indirecta, ya que se ha descrito que en muchos casos los monofenoles actúan como cofactores necesarios para la actuación del enzima, mientras que los difenoles la inhiben.

También se incluye en este apartado la discusión de los contenidos fenólicos medidos en las correspondientes experiencias.

3.5.1.- Actividad peroxidásica (Tabla 9).- El análisis de la varianza de los valores de actividad peroxidasa no muestra variaciones significativas ni en función de los Ttos., de B ni en función del tiempo.

3.5.2.- Actividad catalasa.- La observación de los datos directos de actividad catalasa (Tabla 10, Fig. I) nos permite decir que existe un claro aumento de la actividad catalasa a lo largo del tiempo, sin que se aprecien diferencias significativas frente a los Ttos. de B. La evolución de la actividad catalasa frente al tiempo es básicamente lineal ($P < 0,001$), aunque con un componente cúbico de baja significación ($P < 0,05$); esto indica que quizás con un mayor número de datos podríamos comprobar si la respuesta se ajusta o no a un polinomio de 3^{er} grado. Por el momento, y puesto que el componente lineal tiene una mayor significación, diremos que la actividad catalasa aumenta con la edad de la planta de manera básicamente lineal.

En las Fig. II y III se representan, frente al tiempo y frente al logaritmo de los Ttos. de B, los valores de actividad catalasa referidos a % de la 1ª recogida (t_0), que se toma como línea basal de tiempo ($t_0 = 100$). Como puede observarse, sigue existiendo un claro incremento con la edad de la planta, pero además, aparece una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el Tto. normal (0,5 ppm) y el deficiente (0,05 ppm), que presenta una actividad superior (mayor pendiente de la recta) al 1º. Como ya hemos discutido anteriormente, en este caso se observa cómo refiriendo los datos a % de la línea basal de tiempo, aparecen diferencias entre Ttos. que no se evidenciaban en el análisis de los datos directos.

En cuanto a la 3ª etapa del análisis estadístico, no se encontraron variaciones significativas entre los datos referidos a % del Tto. normal ($Tto._{0,5} = 100$). Ello indica que los Ttos. deficiente y tóxico tienen un comportamiento semejante frente al normal. Este hecho, que se repite para muchas de las actividades enzimáticas medidas, se explica si pensamos que la actuación del B sobre la modificación de actividades enzimáticas, sea cual sea el/los puntos del metabolismo a través de los cuales se lleve a cabo, ha de implicar la formación de complejos con determinados compuestos; los compuestos formados por el borato pueden ser diferentes, con distinto índice de coordinación, según las cantidades relativas de borato y los otros ligandos implicados. Si sólo un determinado tipo de complejo presenta actividad biológica, tanto la falta como el exceso de B alterarían el índice de coordina-

ción óptimo, y el complejo formado no será adecuado para su funcionamiento normal, lo que dará lugar a la alteración de las actividades enzimáticas relacionadas con dichos complejos.

Hemos estudiado las posibles correlaciones existentes entre la actividad catalasa y el contenido de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn y Zn) en la hoja (Tabla 44, Fig. IV), habiéndose encontrado correlación positiva con el Fe ($P < 0,01$) y Cu ($P < 0,05$), aunque no con el B. Esto último es lógico, teniendo en cuenta que la actividad catalasa varía en el mismo sentido en condiciones de deficiencia y toxicidad, mientras que el contenido de B en los tejidos crece desde la deficiencia a la toxicidad.

A la vista de estos resultados, estudiamos la posible correlación de los contenidos de B en hoja con los de Cu y Fe, (Tabla 44, Fig. V) encontrando una correlación positiva de alta significación ($P < 0,001$) en ambos casos. Sin embargo, el análisis de la varianza del contenido de B, Cu y Fe en hoja (Tablas 24, 25 y 26) muestra variaciones significativas en función de los Ttos. sólo en el caso del B, en el sentido de que el contenido del Tto. tóxico es significativamente mayor que el de los Ttos. deficientes y normal.

La correlación encontrada entre el contenido de Fe y la actividad catalasa es un hecho ya descrito por otros autores (del RIO et al., 1978; WEINSTEIN y ROBBINS, 1955) y ha sido interpretada como una relación causa-efecto cuya base fisiológica reside en el hecho de que la catalasa es un metaloenzima cuyo grupo prostético en la mayoría de los casos es hémico, es decir, que el Fe forma parte integrante de su molécula (KEILIN y HARTREE, 1945). Sin embargo, esto no es general, ya que también, en algunas especies vegetales, se ha descrito catalasa con Mn, e igualmente se ha descrito actividad catalasa de enzimas artificiales con Cu en la molécula (SIGEL, 1969). A la vista de nuestros resultados, la catalasa de girasol podría ser en su mayor parte enzima férrico, aunque la correlación con el Cu indica que quizás podría existir también una proporción de isoenzima cúprico.

La relación de la actividad catalasa con el B podría ser un efecto indirecto, en el sentido de que el B modificara

la cantidad de Fe y Cu biológicamente activos, y éstos a su vez el nivel de catalasa. Este hecho viene apoyado por las altas correlaciones que se detectan entre los contenidos de B en hoja y los de Fe y Cu; sin embargo, el nivel de B en solución afecta significativamente el contenido de B, pero no los de Fe y CU, lo que parece contradecir el mencionado efecto indirecto. No obstante, como discutiremos detalladamente para el caso del B (Aptdo. 3.7.1), quizás no sean el Fe y Cu totales, sino la cantidad de "elemento biológicamente activo" la que resulte afectada por los niveles de B, traduciéndose en una alteración de la actividad catalasa, ya que los parámetros metabólicos pueden acusar una malnutrición de un microelemento, mientras que aparentemente su contenido en los tejidos es normal, lo que indica que muchas veces el análisis foliar no es una buena medida del estado nutritivo de la planta.

La confirmación del efecto anteriormente mencionado merece un estudio más amplio dado los resultados obtenidos, que sólo podemos considerar como indicativos de la existencia de una acción indirecta del B sobre la actividad catalasa, a través de la modificación del contenido de Fe y Cu biológicamente activos.

3.5.3.- Actividad AIA-oxidasa.- En la Tabla 11 se exponen los datos de actividad AIA-oxidasa en hojas. En ellos se observa la existencia de una interacción tiempo-Ttos. ($P < 0,001$) que se traduce en un aumento de la actividad entre las recogidas 0 y 14, pero tan sólo en las hojas del Tto. normal ($P < 0,05$) y una disminución entre las 7 y 14 en el nivel tóxico ($P < 0,05$, Fig. VI). Desde el punto de vista de los Ttos., sólo se observa un aumento del tóxico respecto al normal, en la última recogida, t_{28} (Fig. VII).

Si expresamos la actividad AIA-oxidasa en función (%) de la que presentaban las plantas en el punto de partida de nuestra experiencia ($t_0 = 100$), desaparece la interacción, con lo que se simplifica la relación del parámetro con las variables de nuestra experiencia. Así, aparecen claras diferencias entre los Ttos. ($P < 0,001$), en el sentido de que el Tto. deficiente

muestra una actividad inferior a la del normal ($P < 0,01$) y a la del tóxico ($P < 0,01$), aunque estos dos no difieren entre sí (Fig. VIII). Estos resultados están de acuerdo con la idea general, comprobada por varios autores (KRUPNIKOVA et al. 1975, YAMANOUCI et al. 1975) de que la deficiencia de B reduce la actividad AIA-oxidasa respecto a la normal, al menos en la parte aérea de la planta, ya que en las raíces existe mayor discusión. La explicación fisiológica que proponen estos investigadores es que se trata de un efecto indirecto, que resulta del aumento del contenido de fenoles (preferentemente difenoles) provocado por la falta de B, hecho ampliamente descrito en la bibliografía; estos difenoles actúan como inhibidores de la actividad AIA-oxidasa en muchos sistemas vegetales.

Desgraciadamente, no hemos podido medir el contenido de difenoles en esta 1ª experiencia debido a la cantidad limitada de material vegetal de que disponíamos.

3.5.4.- Actividad polifenol-oxidasa y contenido de o-difenoles.- Los valores de actividad PPO se reúnen en la Tabla 12. En ellos se puede observar que dicha actividad varía con el tiempo ($P < 0,001$) y con los Ttos. de B ($P < 0,001$), sin que exista interacción entre ambos factores. Esto quiere decir que los 3 Ttos. evolucionen de igual manera frente al tiempo y que, cualquiera que sea la recogida, la relación que existe entre los 3 Ttos., es siempre la misma.

En la Fig. IX hemos representado la evolución en el tiempo de la actividad PPO para cada uno de los 3 Ttos. En ella se observan oscilaciones de la actividad que se adaptan a un polinomio de 4º grado ($P < 0,001$) en el que los términos de 2º y 3^{er} grado también muestran significación ($P < 0,01$ y $P < 0,001$ respectivamente). Resumiendo, la actividad PPO no presenta una variación lineal con el tiempo, sino que evoluciona según un polinomio con un máximo a los 7 días de permanencia de las plantas en soluciones diferenciales. Los 3 Ttos. evolucionan en el tiempo de manera semejante, ya que el descenso que se observa en el t_{21} para el Tto. deficiente es significativo. Las oscilaciones,

que se dan en los 3 Ttos. de B, incluido el normal, podrían ser una manifestación de la homeostasis de óxido-reducción del sistema.

En cuanto al efecto de los Ttos. de B (Fig. X), podemos concluir que la actividad PPO en el Tto. tóxico es siempre superior a la de los Ttos. deficiente y normal ($P < 0,001$ en ambos casos), mientras que la del deficiente es algo inferior a la del normal aunque en el límite de la significación ($0,1 > P > 0,05$). La respuesta de la actividad PPO frente al logaritmo de los niveles de B en solución se adapta a una recta ($P < 0,001$). Esto significa que existe un incremento progresivo de la actividad enzimática desde el nivel deficiente al tóxico, que es proporcional al logaritmo de la concentración de B en el medio. Estos resultados son opuestos a los descritos por otros autores, que describen un aumento de la actividad en condiciones de deficiencia.

Cuando expresamos la actividad PPO en % de la existente en el punto de partida de la experiencia ($t_0 = 100$), no encontramos diferencias significativas ni entre tiempos ni entre Ttos., lo que quiere decir que la evolución en el tiempo es semejante para todos los Ttos., y que la relación que mantiene la actividad enzimática en cada una de las recogidas con la que tenían en el punto de partida (t_0) es estadísticamente igual en todos los casos.

Cuando referimos los datos a % del testigo, o basal de Ttos. ($Tto_{0,5} = 100$), encontramos diferencias muy significativas frente a los Ttos. ($P < 0,001$). Ello nos habla de nuevo de que la variación del Tto. deficiente respecto al normal es más pequeña y de sentido contrario a la del tóxico, o sea, que la deficiencia deprime débilmente, mientras que la toxicidad incrementa fuertemente la actividad PPO.

Hemos calculado las correlaciones entre actividad PPO y el contenido de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn y Zn) en las hojas (Tabla 44), aunque sólo para las dos últimas recogidas (t_{21} y t_{28}), ya que en las demás no fué posible realizar análisis de microelementos por falta de material. En estas dos recogidas, hemos encontrado una correlación positiva ($P < 0,05$) entre la actividad

PPO y el contenido de B en las hojas (Fig. XII). En efecto, si comparamos las Figs. X (actividad PPO y la XLIX (contenido de B en la 2ª experiencia) podemos comprobar que ambas muestran idéntica variación, en magnitud y sentido, respecto a los niveles de B en solución.

Resumiendo, los resultados comentados hasta ahora nos conducen, tomados individualmente y en su conjunto, a la conclusión de que la actividad PPO en hojas es un parámetro correlacionado con el contenido de B en los tejidos, y a su vez ambos dependen de los niveles de B en el medio. Por todo ello, consideramos que la actividad PPO de la fracción soluble de las hojas es un buen parámetro para medir el estado nutritivo de B en la planta, ya que reúne las siguiente condiciones:

a) Guarda una relación sencilla y directa con el nivel de B en el medio (es proporcional al logaritmo de la concentración de B en solución).

b) Está correlacionado con el contenido de elemento en los tejidos.

c) Al no existir interacción tiempo-Ttos., las medidas pueden realizarse en cualquier momento del desarrollo de la planta, y siempre se cumplirá que la actividad enzimática de las plantas deficientes será inferior y la de las tóxicas superior a la de las normales. Este aspecto es absolutamente crucial para la elección de un parámetro como detector del estado nutritivo del elemento, ya que si los Ttos. de B alteraran la evolución de la actividad a lo largo del tiempo (si existiera interacción tiempo-tratamientos) los resultados que se obtuvieran de la comparación entre Ttos. serían diferentes, o incluso contrarios, según el momento en el que se realizaran las pruebas. La mayoría de los parámetros medidos en el presente trabajo, muestran este último comportamiento, como ya iremos viendo, lo que resalta la excepcionalidad de la actividad PPO y justifica nuestra elección.

De todas formas, sería necesario estudiar las variaciones de la actividad PPO con otros factores que no sean los niveles de B, ya que se han descrito varios factores que al parecer alteran también esta actividad, al menos en otras especies vegetales.

Pasamos a considerar la causa fisiológica que da lugar a la dependencia de la actividad PPO de los niveles de B. En 1^{er} lugar, dados los resultados ampliamente discutidos en este apartado, pensamos que esta actividad enzimática podría estar bajo control directo del B en las plantas de girasol, es decir, que se trata de una acción primaria, o al menos muy temprana del elemento. Esta conclusión viene apoyada además, por el hecho de que el efecto de los Ttos. de B se aprecia ya a los 7 días de la aplicación de los Ttos. Según KATO et al., (1976), el PPO está ligado a algunas fracciones membranosas, aunque también existe en la fracción soluble. No está definitivamente aclarado si su activación depende de cambios conformacionales, de la adición o separación de activadores o inhibidores respectivamente o de cambios en las membranas. Esta última posibilidad se ha comprobado en muchos casos, en los que la solubilización lleva aparejada la activación, hecho que incluso se ha detectado en condiciones naturales (frutos en maduración, estados de maduración y envejecimiento de la planta, MAYER y HAREL, 1979). Puesto que una de las opiniones actuales más generalizadas (TANADA, 1979; PARR y LOUGHMAN, 1983) es que el B está implicado en la formación y funcionalidad de las membranas celulares, nuestra hipótesis es que una de las acciones primarias del B en el metabolismo vegetal podría ser la regulación de la actividad PPO a través de la solubilización y consiguiente activación del enzima ligado a membranas; obviamente no descartamos la posibilidad de que el B pueda también actuar sobre la cantidad de enzima soluble, a través de su proteínosíntesis. Nuestras investigaciones actuales en este campo van dirigidas a tratar de comprobar ambas alternativas.

Sobre las mismas hojas utilizadas para medir la actividad PPO, realizamos paralelamente medidas del contenido de o-difenoles, ya que en girasol éstos parecen ser el sustrato exclusivo del enzima, que según JUDEL (1975) carece de actividad cresolasa y lacasa; además, los o-difenoles son la fracción del total de sustancias fenólicas más fuertemente alterada por la deficiencia de B en girasol (DEAR y ARONOFF, 1965). Los resultados del contenido de o-difenoles de las hojas, expresados en ácido cafeico, se

reúnen en la Tabla 13. Como se puede observar, solo existen diferencias significativas entre los tiempos ($P < 0,001$) en el sentido de que el contenido de o-difenoles de la 1ª recogida (t_0), punto de partida de la experiencia, es siempre inferior al de las demás, sin que éstas difieran significativamente unas de otras (Fig. XIII). A pesar de esta falta de significación, se observa claramente una tendencia al aumento progresivo del contenido de o-difenoles a lo largo del tiempo que se pone de manifiesto al expresar los datos en % respecto a la 1ª recogida ($t_0 = 100$), que es en realidad el testigo de tiempo de nuestra experiencia (Fig. XIV). En efecto, aparece una significación frente al tiempo ($P < 0,001$) que se cumple para todas las recogidas excepto para la pareja $t_{21}-t_{28}$. Esta respuesta frente al tiempo es esencialmente lineal ($P < 0,001$); es decir, el contenido en o-difenoles respecto al t_0 aumenta proporcionalmente con la edad de la planta. Además, al referir los datos a t_0 , los Ttos. también son significativamente diferentes ($P < 0,001$) en el sentido de que el Tto. tóxico está siempre significativamente por encima del normal y el deficiente ($P < 0,001$), que son iguales entre sí.

Cuando expresamos los datos en % del Tto. normal ($Tto_{0,5} = 100$) no aparecen diferencias significativas ni frente al tiempo ni frente a los Ttos., lo que quiere decir que el comportamiento de los Ttos. deficiente y tóxico frente al normal es siempre en el mismo sentido.

Hemos ensayado la correlación entre el contenido de o-difenoles y la actividad PPO, obteniendo un resultado negativo. Como ponen de manifiesto varios autores (MACE, 1963; ROBERTS, 1952), aunque los o-difenoles son su sustrato natural, "in vivo" existe una compartimentación inter o intracelular de estos productos, de tal modo, que sólo una fracción del total estaría en contacto con el enzima, y por tanto, correlacionada con su actividad. Desgraciadamente es imposible, por el momento, analizar por separado el contenido de aquellos compartimentos citoplasmáticos especializados en la acumulación de sustancias de reserva y desecho, del tipo vacuola, retículo endoplasmático, etc.

No hemos encontrado tampoco correlación entre el contenido de o-difenoles de las hojas y los de B, Cu, Fe, Mn

y Zn, aunque, como ya hemos indicado anteriormente, esta correlación sólo se ha ensayado en las dos últimas recogidas, ya que sólo en estos casos disponíamos de datos de contenido de microelementos.

3.5.5.- Actividades glucosa-6P-deshidrogenasa, 6P-gluconato-deshidrogenasa y contenido de o-difenoles.- Hasta aquí hemos discutido las actividades enzimáticas relacionadas con la oxidación de fenoles. En este y los siguientes apartados pasamos a considerar actividades enzimáticas relacionadas con su biosíntesis.

Los enzimas medidos en la 3ª experiencia son los dos primeros de la vía oxidativa de las pentosas fosfato (OPP), que es la que aporta sustratos para la biosíntesis de fenoles en las plantas; por su estrecha relación, discutiremos los resultados conjuntamente en este apartado.

En la Tabla 14, se reúnen los datos de actividad glucosa-6P-deshidrogenasa (glu-6P-DH). Como puede observarse, existen diferencias significativas tanto entre tiempos ($P < 0,001$) como entre Ttos. ($P < 0,001$), sin que haya una interacción entre ellos; es decir, los 3 Ttos. evolucionan de igual manera frente al tiempo, y además, cualquiera que sea la recogida, la relación que existe entre los 3 Ttos. es la misma.

La evolución a lo largo del tiempo (Fig. XVI) se manifiesta en una elevación progresiva de la actividad, que alcanza un máximo a los 21 días, para decaer de nuevo a los 28 a un nivel aproximadamente igual al que existía en el t_{14} (no hay diferencias significativas entre t_{14} y t_{28}). La respuesta con el tiempo se ajusta a una recta ($P < 0,001$) con un fuerte componente cuadrático y cúbico ($P < 0,001$), lo que se debe a la bajada en la recogida t_{28} , que es la única que se aparta del comportamiento lineal.

En cuanto al efecto de los Ttos. de B (Fig. XVII), tanto el deficiente como el tóxico provocan un aumento de la actividad glu-6P-DH respecto al normal, siendo más fuerte el efecto de la toxicidad que el de la deficiencia, ya que la significación en este último caso es $P < 0,05$ frente a $P < 0,01$ en el 1º.

Puesto que no hay interacción, al expresar los datos como % del testigo de tiempo ($t_0 = 100$) la significación desciende, tanto frente al tiempo como frente a los Ttos., debido al aumento de variabilidad que conlleva la elaboración de los datos. Así, en el caso del tiempo (Fig. XVIII), se mantienen las diferencias entre las recogidas, pero a un nivel de significación menor. En el caso de los Ttos. (Fig. XIX) desaparece la significación entre el Tto. normal y el deficiente.

Al expresar los datos en % del testigo de Tto. ($Tto_{0,5} = 100$), no se observan diferencias ni frente al tiempo ni frente a los Ttos. Esto se corresponde con el hecho, ya descrito al hablar de los datos directos, de que los Ttos. deficiente y tóxico actúan en el mismo sentido respecto al normal: ambos elevan la actividad enzimática; aunque existen diferencias en la magnitud del efecto de cada Tto. éstas no son lo suficientemente acusadas como para que ello se refleje en esta etapa del análisis estadístico.

No hemos encontrado correlaciones entre la actividad glu-6P-DH y el contenido de micronutrientes en las hojas. En el caso del B, la ausencia de correlación es lógica, ya que las hojas del Tto., deficiente presentan un contenido de B próximo al de las normales (Tabla 34, Fig. XLIX) mientras que la actividad enzimática en las hojas deficientes es superior ($P < 0,05$). De nuevo observamos que, mientras el análisis foliar da resultados aproximadamente normales, algunos parámetros bioquímicos muestran alteraciones apreciables que nos pueden ayudar a detectar la deficiencia moderada de B.

En resumen, se puede concluir que la actividad glu-6P-DH varía a lo largo del tiempo del mismo modo, sea cual sea el Tto. considerado. Esta ausencia de interacción tiempo-Ttos. es una de las condiciones que, como mencionamos al hablar de la actividad PPO, son necesarias para que un parámetro bioquímico pueda ser usado como indicador del estado nutricional de la planta. Sin embargo, la actividad glu-6P-DH no cumple las otras dos condiciones exigidas:

a) No varía proporcionalmente con el nivel de B en el medio (lo que si ocurría en el caso de la actividad PPO),

ya que tanto la deficiencia como la toxicidad estimulan la actividad glu-6P-DH.

b) Consecuentemente con lo anterior, no existe correlación con el nivel de B en la planta. Por tanto, no podemos considerar la actividad glu-6P-DH como un parámetro bioquímico adecuado para el seguimiento del estado nutricional de B en girasol.

La explicación fisiológica de las variaciones de la actividad glu-6P-DH la posponemos para discutirla conjuntamente con la 6P-gluc-DH y el contenido de o-difenoles, ya que, como hemos indicado, los tres parámetros están estrechamente relacionados.

Los resultados de las medidas de actividad 6P-gluconato-desnhidrogenasa (6P-gluc-DH) están reunidos en la Tabla 15. Como puede observarse, existen diferencias significativas del parámetro frente al tiempo ($P < 0,001$) y frente a los Ttos. de B ($P < 0,05$), detectándose también una interacción tiempo-Ttos. ($P < 0,05$), esto significa que el parámetro no evoluciona con el tiempo de igual manera para todos los Ttos., y que por tanto, las diferencias que se encuentran entre éstos, varían según la recogida que se considere.

En cuanto a la evolución en el tiempo (Fig. XX), hemos estudiado la curva de respuesta, comprobando que, en efecto, es diferente para cada Tto. De manera resumida se puede concluir que la respuesta frente al tiempo de la actividad en los Ttos. deficiente y tóxico se ajusta a una recta ($P < 0,001$ en ambos casos para el componente lineal), mientras que en el Tto. normal la respuesta no es sólo lineal ($P < 0,001$), sino que también tiene un componente cuártico ($P < 0,05$), lo que se debe fundamentalmente a que en el día 14 se produce una clara disminución de la actividad. En los Ttos. deficientes y tóxico tal disminución se ha convertido en una meseta, y además se ha retrasado al t_{21} . Hay que destacar la similitud de comportamiento de estos dos Ttos. frente al tiempo, estando siempre el deficiente por debajo del tóxico, pero exactamente con la misma forma de respuesta.

Por lo que respecta a las variaciones frente a los Ttos. (Fig. XXI), podemos observar en 1^{er} lugar, que las diferencias

entre Ttos. comienzan a aparecer en el día 14. A partir de este momento, el Tto. deficiente muestra siempre menor actividad que el tóxico, siendo esta diferencia particularmente acusada en la última recogida (t_{28}); el Tto. normal muestra un comportamiento mas irregular respecto a los otros dos, dando en el t_{14} una actividad inferior a la del deficiente y el tóxico; igual a la del tóxico en el t_{21} e igual a la del deficiente en el t_{28} .

Como sucede siempre que existe una interacción en los datos directos, al expresar la actividad en % del testigo de tiempo ($t_0 = 100$), esta interacción se anula, reforzándose la significación general frente a los Ttos. (que pasa a ser $P < 0,01$). Sin embargo, y al igual que ocurría para la actividad glu-6P-DH, se anula la significación entre el Tto. normal y el deficiente, manteniéndose las diferencias de ambos con el tóxico, que muestra siempre una actividad superior a ambos (Fig. XXIII). En cuanto al tiempo (Fig. XXII), sólo la actividad de la última recogida (t_{28}) aparece como diferente de todas las demás.

Expresando los datos como % del testigo de Ttos. ($Tto_{0,5} = 100$), hay diferencias significativas frente al tiempo, y no frente a los Ttos. La interpretación de estos resultados (Fig. XXIV) se puede resumir en los siguientes puntos:

1º) El que no existan diferencias significativas entre los Ttos. ratifica el hecho, ya discutido, de que la variación de los Ttos. deficiente y tóxico respecto al normal es en el mismo sentido (ambos aumentan la actividad enzimática) y que, aunque existen diferencias en la magnitud del efecto de cada Tto. (muy especialmente en la última recogida de, t_{28} , como ya hemos visto) éstas no son tan elevadas como para reflejarse en esta etapa del análisis estadístico. En este aspecto, el comportamiento de la actividad 6P-gluc-DH es comparable al que observamos en la actividad glu-6P-DH.

2º) El hecho de que existan diferencias significativas frente al tiempo nos dice que los Ttos. deficiente y tóxico difieren del normal básicamente sólo en la recogida t_{14} , momento en el que la actividad de ambos Ttos. es claramente superior a la del normal,

mientras que en las demás recogidas es aproximadamente igual en los tres. La acción de los niveles anormales de B sobre la actividad 6P-gluc-DH, por tanto, parece ser transitoria, ya que sólo se manifiesta claramente en el día 14, anulándose de nuevo a partir de este momento.

No hemos encontrado correlación entre la actividad 6P-gluc-DH y el contenido de B en las hojas, como era de esperar, y por los mismos motivos ya expuestos para el caso de la glu-6P-DH. Las correlaciones sólo se ensayaron en las recogidas 14, 21 y 28, por carecer de material para el análisis foliar en las primeras recogidas.

A la vista de los resultados ampliamente discutidos, hemos de concluir que la actividad 6P-gluc-DH no parece cumplir las condiciones necesarias para servir como parámetro detector de la deficiencia y toxicidad de B, ya que:

a) La diferencia de comportamiento de los Ttos. deficiente y tóxico respecto al normal no es igual a lo largo del tiempo, puesto que sólo se pone claramente de manifiesto en la recogida t_{14} , anulándose en las recogidas posteriores.

b) La toxicidad y la deficiencia de B provocan una alteración de la actividad en el mismo sentido (ambas la estimulan), por lo que la medida de este parámetro no nos permitirá distinguir entre ambas situaciones nutricionales opuestas.

c) En consecuencia con lo anterior, no existe correlación entre las variaciones de la actividad 6P-gluc-DH y el contenido de B en las hojas.

Hemos estudiado las posibles correlaciones de la actividad 6P-gluc-DH con el contenido de los microelementos Cu, Fe, Mn y Zn encontrando una correlación positiva con el contenido de Zn en hoja ($P < 0,01$, Fig. XXVI). Para estudiar las causas de esta correlación, y comprobar si podría deberse a un efecto indirecto de los niveles de B, hemos medido la correlación entre los contenidos de B y Zn, encontrándose correlacionados positivamente, con una significación de $P < 0,01$ (Fig. XXVII). Sin embargo, no parece que esto sea consecuencia de los niveles de B en solución, ya que el Zn no muestra variaciones significativas con los Ttos.

de B (Tabla 38), sino sólo con el tiempo, a muy elevada significación ($P < 10^{-6}$). En cuanto al contenido de B (Tabla 34), que muestra una elevada significación frente a los Ttos. ($P < 10^{-6}$), presenta también variaciones significativas frente al tiempo ($P < 0,05$), y en el mismo sentido que el contenido de Zn (ambos descienden con el tiempo). Nuestra opinión es, por tanto, que son los cambios producidos por la edad de la planta los que hacen que estén positivamente correlacionados los contenidos de Zn y B, y no las variaciones impuestas por los Ttos. En consecuencia, desestimamos la posibilidad de un efecto indirecto de los Ttos. de B sobre la actividad 6P-gluc-DH, a través de la modificación del contenido de Zn, concluyendo que es el tiempo el factor determinante de esta correlación.

No hemos encontrado referencias de que el enzima 6P-gluconato-DH contenga Zn en su molécula, por lo que haría falta una investigación más profunda para comprobar el motivo de la correlación entre esta actividad enzimática y el Zn.

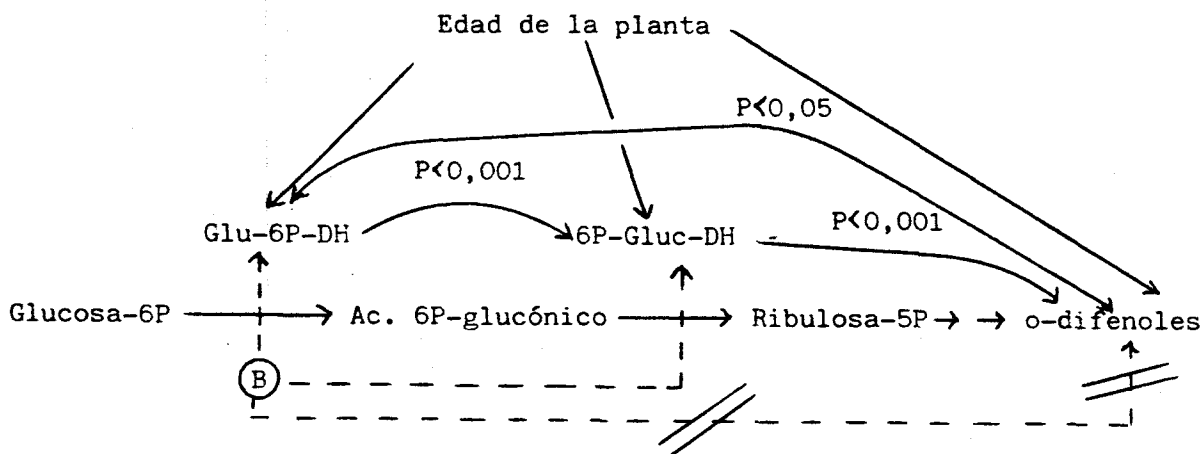
Una vez discutidas las variaciones de las actividades enzimáticas medidas en esta experiencia, pasamos a considerar el contenido de o-difenoles en las mismas hojas, ya que, como revisamos en el aptdo. 1.6.12.5, estos enzimas están implicados en la biosíntesis de fenoles en plantas.

Como puede observarse en la Tabla 16, el contenido de o-difenoles en las hojas de esta 3ª experiencia varía solamente con el tiempo ($P < 0,001$). Si comparamos la curva de evolución de este parámetro (Fig. XXVIII) con la correspondiente de la actividad 6P-gluc-DH (Fig. XX) comprobamos la estrecha similitud en las variaciones con el tiempo de ambos parámetros, que incluso reproducen la misma meseta entre los 14 y 21 días. Esta similitud queda confirmada al comprobar que existe una estrecha correlación positiva ($P < 0,001$) entre la actividad 6P-gluc-DH y el contenido de o-difenoles.

El contenido de o-difenoles está asimismo positivamente correlacionado con el primer enzima del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, la glu-6P-DH aunque a un nivel mínimo de significación ($P < 0,05$). Tanto en uno como en otro caso, el factor tiempo parece ser predominante en el establecimiento de estas correlaciones, ya que los o-difenoles no varían con los Ttos. de B.

Por otra parte, las actividades glu-6P-DH y 6P-gluc-DH están también positiva y estrechamente correlacionadas entre sí ($P < 0,001$); la causa fisiológica de esta correlación es obvia, ya que se encuentran consecutivas en la misma ruta metabólica, y por tanto, el producto de la actuación de la 1ª, es sustrato de la 2ª. En el establecimiento de esta correlación parecen estar implicados tanto el factor tiempo como los Ttos. de B, ya que el comportamiento de ambas actividades frente a los dos factores guarda similitudes, como ya hemos discutido.

La interpretación conjunta de los resultados de las actividades glu-6P-DH, 6P-gluc-DH y contenido de o-difenoles en hojas quedaría resumida en el siguiente esquema, que pasamos a comentar:



De las dos variables de la experiencia, la edad de la planta es un factor que creemos influye en el mismo sentido y aproximadamente la misma intensidad sobre los tres parámetros considerados, ya que, en términos generales los tres muestran un aumento progresivo respecto al tiempo.

En cuanto a la otra variable, los Ttos. de B, nuestros resultados nos inducen a pensar que sólo actuaría de manera directa sobre la actividad del 1^{er} enzima de la vía OPP, la glu-6P-DH, ya que es el único caso en el que se observan diferencias significati

vas entre todos los Ttos. de B, y además la variación se da en el mismo sentido para todas las recogidas, sin que exista interacción tiempos-Ttos. Interpretamos esta respuesta como clara y directamente atribuible a los niveles de B. A partir de este punto, el efecto del B se diluye, y su influencia se hace menos clara. Así, el B altera la actividad 6P-gluc-DH de una manera transitoria y más compleja, apareciendo una interacción tiempo-Ttos., dado que ambos factores adquieren un rango de importancia semejante. Esto estaría de acuerdo con nuestra interpretación de que el efecto del B sobre la actividad 6P-gluc-DH sería indirecto, a través de la modificación de la actividad de la glu-6P-DH, (el enzima que le precede en la cadena), de manera que en el establecimiento de la fuerte correlación existente entre estas dos actividades enzimáticas estarían implicadas simultáneamente las dos variables (Ttos. de B y tiempo).

Cuanto más nos separamos del punto de influencia del B, más se diluye su efecto, de manera que el contenido de o-difenoles ya no muestra variaciones con los niveles de B empleados (se recuerda que en esta experiencia se aplicó un nivel sólo moderadamente deficiente), mientras que el efecto del tiempo se mantiene aproximadamente igual. Por ello, en la correlación 6P-gluc-DH - o-difenoles el factor tiempo pasa a ser predominante, convirtiéndose en el principal responsable de esta correlación, que muestra un alto grado de significación. Por la misma razón, la correlación de la actividad glu-6P-DH con el contenido de o-difenoles muestra una significación mínima, ya que en ella se refleja el hecho de que ambos parámetros están influenciados de diferente manera por las dos variables: en el caso del contenido de o-difenoles, la edad de la planta es el factor predominante, mientras en el caso de la glu-6P-DH lo serían los Ttos. de B.

Nuestra interpretación de los resultados, en cuanto a la influencia de los niveles de B se refiere, discrepa de la opinión de LEE y ARONOFF (1967), ya que según estos investigadores la acción primaria del B se llevaría a cabo a nivel de la actividad 6P-gluc-DH, actuando sobre el sustrato del enzima (6P-gluconato), a través del mecanismo expuesto en los Aptdos. 1.6.12.5 y 1.6.8

del capítulo de Introducción. Nuestra interpretación, sin embargo, no cambiaría las consecuencias últimas de la actuación del B en la vía OPP, ya que se limitan a proponer que la acción principal se llevaría a cabo sobre el 1º y no sobre el 2º enzima del ciclo.

En cuanto a la causa fisiológica de la acción del B sobre la actividad glu-6P-DH, también discrepamos de la hipótesis propuesta por LEE y ARONOFF (1967), que atribuyen el efecto del B a interacciones directas con los sustratos, ya que, como hemos discutido en el Apto. 3.4, esta hipótesis parece poco probable según nuestros resultados. Las dos alternativas que considerábamos mas probables de las propuestas para la acción del B eran acción sobre membranas o sobre la proteínosíntesis.

En el caso de la actividad glu-6P-DH, como ocurría en el de la PPO, hay que destacar que esta actividad enzimática se ha encontrado asociada a diversas fracciones membranosas, con lo que podría, en principio, hacerse extensiva a este caso la hipótesis ya propuesta para la actuación del B sobre la actividad PPO. Sin embargo, mientras la actividad PPO varía en sentido contrario en condiciones de deficiencia y toxicidad de B, la glu-6P-DH varía en el mismo sentido en ambos casos. Por esta razón, pensamos que las variaciones de ambas actividades enzimáticas deben ser consecuencia de diferentes acciones primarias del B.

3.5.6.- Actividad fenilalanina-amonio-liasa (PAL) y contenido de o-difenoles.- A partir de esta experiencia, y dado que en las 3 anteriores el contenido de B en las hojas del nivel deficiente (0,05 ppm) era muy similar al observado en las del normal (0,5 ppm), decidimos someter las plantas a deficiencia extrema (0 ppm). Con esto pretendíamos además detectar el aumento de o-difenoles que en la bibliografía se asocia con la falta de B, y que hasta este momento no habíamos conseguido observar. También pretendíamos comprobar, en girasol, los resultados de SHKOL'NIK et al., (1980) respecto a la acción del B sobre la actividad PAL y estos autores utilizaron 0 ppm de B como Tto. deficiente.

En esta experiencia y en la siguiente prescindimos además de la infiltración de las hojas, sustituyéndola por adición de borato tamponado a la mezcla de reacción, a igual concentración que la utilizada para la infiltración. Como dijimos al principio de este capítulo, no se obtuvieron diferencias significativas entre las medidas realizadas con y sin B.

En la Tabla 17 se reúnen los valores de actividad PAL en las hojas. Como puede observarse, existen diferencias significativas respecto al tiempo ($P < 0,01$) y los Ttos. de B - ($P < 0,01$), con una interacción también significativa ($P < 0,05$) entre ambos factores. Esto significa que la evolución del parámetro a lo largo del tiempo es diferente para cada Tto. (Fig. XXXI y XXXII). Así, mientras la actividad PAL en el Tto. normal no varía significativamente a lo largo del tiempo, en el Tto. deficiente la actividad da un máximo a los 21 días, que es superior a la de los 7 ($P < 0,01$) y 28 días ($P < 0,05$). En el Tto. tóxico, la actividad sufre una fuerte elevación a partir del día 7, en el que es significativamente inferior a la de las demás recogidas. La respuesta se ajusta a una curva cuadrática ($P < 0,01$), con un componente lineal de menor significación ($P < 0,05$), dando el máximo a los 14 días, a partir de los cuales la actividad se mantiene aproximadamente constante.

Considerando diferencias entre Ttos. para cada una de las recogidas, los únicos casos de significación se encuentran a los 14 y 28 días, en el sentido de que el Tto. tóxico muestra en ambas recogidas una actividad PAL superior a la de los Ttos. normal y deficiente, que no difieren entre sí.

Resumiendo, tanto la toxicidad como la deficiencia de B provocan un aumento de la actividad PAL, siendo más temprano el efecto en el caso de la toxicidad, que alcanza el máximo a los 14 días, y algo más tardío en la deficiencia, con máximo a los 21 días. En condiciones de toxicidad, la actividad se mantiene elevada una vez alcanzado el máximo, mientras que en la deficiencia el efecto es transitorio, ya que vuelve a descender en el día 28.

No ha sido posible el estudio de los datos referidos a t_0 , debido a la pérdida del material procedente de la 1ª recogida.

Al expresar la actividad PAL en % del Tto. normal (Tto. $_{0,5} = 100$) no aparecen diferencias significativas, lo que quiere decir que, en general, los Ttos. deficiente y tóxico varían del mismo modo (en el mismo sentido) respecto al normal. En efecto, como ya hemos discutido, tanto la deficiencia como la toxicidad estimulan la actividad PAL, aunque alcanzan el máximo en distinto momento y de manera más o menos transitoria. De nuevo encontramos que la deficiencia y la toxicidad de B provocan efectos semejantes sobre un parámetro bioquímico.

Nuestros resultados coinciden sólo parcialmente con los del equipo de SHKOL'NIK (1980) para plantas sensibles al B, puesto que si bien encontramos una elevación de la actividad PAL en condiciones de deficiencia de B, no hemos observado que esta elevación progrese de modo continuo a lo largo del tiempo, ya que a partir de un determinado momento desciende de nuevo a un nivel inferior al normal, al menos en girasol y bajo nuestras condiciones experimentales.

SHKOL'NIK apunta que la elevación de la actividad PAL sería una de las causas de la acumulación de sustancias fenólicas en condiciones de deficiencia de B. Puesto que en girasol la fracción de o-difenoles es la que se ve más fuertemente afectada por la deficiencia de B (DEAR y ARONOFF, 1965), realizamos paralelamente medidas del contenido de o-difenoles en las hojas. Los resultados de estas medidas se reúnen en la Tabla 18. En ella se encuentran diferencias significativas frente al tiempo ($P < 0,001$) y a los Ttos. ($P < 0,001$), siendo también significativa la interacción entre ambos ($P < 0,001$). Observando las variaciones del parámetro con respecto al tiempo (Fig. XXXIII) y a los Ttos. (Fig. XXXIV) se puede concluir que la única causa de variación está en la recogida t_{28} del Tto. deficiente, en la que las hojas muestran una fuerte acumulación de o-difenoles, superior a cualquier otro tiempo y Tto., y con el más alto grado de significación.

En el mismo resultado comentado anteriormente para los datos directos, se mantiene cuando se expresa el contenido

de o-difenoles en % del testigo de tiempo ($t_0 = 100$), lo que habla de la intensidad de este efecto (Figs. XXXV y XXXVI).

Al expresar los datos en % del testigo de Ttos. (Tto._{0,5} = 100) también aparecen diferencias significativas entre los Ttos. centrándose de nuevo la causa de la variación en el comportamiento opuesto, para t_{28} , entre el Tto. deficiente y el tóxico respecto al normal.

Nuestros resultados en esta experiencia confirman los obtenidos por DEAR y ARONOFF (1965), en el sentido de que la deficiencia de B provoca una acumulación de o-difenoles en hojas de girasol. Sin embargo, el efecto es muy tardío, y, por tanto, no parece probable que la acumulación de fenoles sea determinante de la mayoría de los síntomas de deficiencia, que aparecen mucho más tempranamente. Más bien parece tratarse de un efecto final, consecuencia de la alteración de otros parámetros metabólicos en los que el B influiría de manera más inmediata y directa. Según nuestros resultados, es poco probable que la actividad PAL sea uno de estos parámetros ya que, en las hojas deficientes no se corresponden una actividad PAL progresivamente creciente con una elevación del contenido de o-difenoles. Además, en el t_{28} , coinciden una actividad inferior a la normal con una gran acumulación de o-difenoles, como puede observarse en la Fig. XXXVIII. Este último efecto sí que pudiera relacionar ambos parámetros, aunque no en el sentido que proponen SHKOL'NIK et al., (1980): pensamos que el descenso de la actividad PAL en el t_{28} pudiera deberse a la acumulación de fenoles, pero no creemos que en dicha acumulación haya jugado un papel importante la actividad PAL.

Como era de esperar, no existe correlación entre la actividad PAL y el contenido de o-difenoles de las hojas (Tabla 44). Tampoco hemos encontrado correlaciones entre el contenido de microelementos, (incluido el B) y la actividad PAL ni tampoco entre el contenido de microelementos y el de o-difenoles. Esto no es sorprendente ya que la cantidad de B en las hojas aumenta progresivamente con el nivel de B en solución, mientras que, como ya hemos discutido, ni la actividad PAL ni el contenido de o-difenoles presentan una variación semejante frente a los niveles de B.

3.5.7.- Contenido de o-difenoles, medidos en la 2ª, - 3ª y 4ª experiencias.- Tal como puede observarse en las Figs. XIII, XXVIII y XXXIII, la acumulación de o-difenoles en condiciones de deficiencia de B descrita por otros investigadores (DEAR y ARONOFF, 1965, SHKOL'NIK, 1980) sólo se produce cuando las plantas se cultivan en condiciones de extrema deficiencia (0 ppm de B), como es el caso de la 4ª experiencia (Fig. XXXIII); cuando el nivel de B en solución es moderadamente deficiente (0,05 ppm), como es el caso de la 2ª y 3ª experiencias, no se produce dicho efecto.

El hecho de que se encuentren discrepancias entre el contenido de o-difenoles medidos en las 3 experiencias, no resta credibilidad a las comparaciones y correlaciones que establecemos entre los distintos parámetros medidos en una misma experiencia, ya que los condicionantes que hayan podido actuar, lo han hecho simultáneamente sobre todos los parámetros en ella medidos.

Por último, queremos señalar que en los extractos en los que se midieron los fenoles no existían proteínas que hubieran podido interferir en la medida, ya que se hicieron determinaciones de proteínas (por el método de Bradford, usado en nuestras experiencias), en diferentes muestras de extractos fenólicos escogidos al azar, comprobándose en todos los casos que las lecturas eran semejantes al blanco de la curva patrón de proteínas.

3.6.- Contenido proteico de los extractos de hojas.- En las Tablas 21, 22 y 23 se reúnen los resultados de las medidas de contenido proteico de los extractos enzimáticos utilizados en la 1ª, 2ª y 3ª experiencias. Como puede observarse, en los tres casos existen diferencias altamente significativas de los valores frente al tiempo, produciéndose siempre un incremento en la última recogida (t_{28}) que es significativo frente a todas las demás.

Los resultados de la 2ª experiencia difieren de los de las otras dos ya que existen diferencias significativas en función de los Ttos. en el sentido de que los extractos correspondientes al Tto. tóxico muestran un contenido proteico superior a

de los otros dos ($P < 0,01$ en ambos casos). Cuando expresamos los datos en % de t_0 , el aumento de la variabilidad, junto con el hecho de que no existen interacciones, anula la significación frente al tiempo y frente a los Ttos. Sin embargo, al expresarlos como % del Tto. normal ($Tto_{0,5} = 100$), encontramos diferencias significativas entre los Ttos., lo que significa que el contenido proteico de los extractos de hojas de los Ttos. deficiente y tóxico varían en diferente sentido: la toxicidad aumenta y la deficiencia disminuye el contenido proteico de los extractos.

Tenemos que hacer notar la similitud de comportamiento (frente a los Ttos., que no frente al tiempo) del contenido proteico de estos extractos y la actividad PPO, medida en esos mismos extractos.

No es de extrañar que existan analogías y diferencias entre los contenidos proteicos de las distintas experiencias. Las diferencias provienen del hecho de que, en cada caso, se han utilizado los tampones y aditivos mas adecuados para la extracción y estabilización de los enzimas que iban a medirse en cada experiencia, por lo que las proteínas extraídas no serán exactamente las mismas en cada caso. Las analogías provienen, a nuestro juicio, de que, de todas formas, se extrae una alta proporción de aquellas proteínas que existen en mayor cantidad en las hojas, que son principalmente enzimas fotosintéticos, y muy especialmente la ribulosa-bis-P-carboxilasa, que representa del 40 al 80% de las proteínas de la hoja. Por tanto, las variaciones de este enzima se reflejarán en las del contenido proteico de los extractos y serán la causa de las analogías de comportamiento entre ellos. Sabido es que la cantidad de enzimas en general, y muy especialmente los fotosintéticos, aumenta con la edad de la planta, así que las variaciones en función del tiempo serán las que fundamentalmente se pondrían de manifiesto en el contenido proteico de los extractos. Sin embargo, el efecto del B sobre un determinado tipo de enzimas puede ser lo bastante fuerte como para que las modificaciones se hagan también patentes.

Hemos analizado las posibles correlaciones existentes entre el contenido proteico de los extractos y las actividades

enzimáticas en ellos medidas. Los resultados se reúnen en la Tabla 44, pudiéndose comprobar la existencia de una correlación positiva entre las actividades peroxidasa y catalasa y el contenido proteico de los extractos de la 1ª experiencia ($P < 0,05$ y $P < 0,001$ respectivamente), así como entre las actividades glu-6P-DH y 6P-gluc-DH y el contenido proteico de los extractos de la 3ª experiencia ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente). No están correlacionadas con el contenido proteico de sus correspondientes extractos las actividades AIA-oxidasa (1ª experiencia) y PPO (2ª experiencia).

En la 1ª y 3ª experiencias, como acabamos de describir, sólo el factor tiempo, y no los Ttos. de B, provoca cambios significativos en el contenido de proteínas de los extractos, mientras que las actividades enzimáticas se ven afectadas por ambos factores. Ello nos induce a pensar que las correlaciones descritas se han producido fundamentalmente en base a cambios semejantes de los parámetros implicados en función del tiempo.

El caso de la actividad PPO merece una especial consideración. Esta actividad enzimática no está correlacionada con el contenido proteico de los extractos utilizados para su medida (2ª experiencia), lo que a nuestro parecer se debe a que las variaciones de ambos parámetros frente al tiempo no son semejantes. Sin embargo, como ya hemos indicado antes, las variaciones frente a los Ttos. de B sí que son muy similares (ver Fig. XI y XLIII) aunque ello no se haya traducido en una correlación, ya que el factor tiempo, que actúa sobre otras proteínas del extracto de diferente forma a como lo hace sobre la actividad PPO, anula toda posibilidad de correlación.

El hecho de que el efecto de los Ttos. de B sobre la actividad PPO sea tan semejante al que muestra el contenido proteico de los extractos frente al mismo factor, podría significar que las variaciones de la actividad PPO provocadas por los niveles de B se deben a modificaciones de la cantidad de moléculas de enzima activo en el extracto, provocadas por el B bien a través del control de la liberación del enzima de las membranas, bien a través de la proteinosíntesis.

El hecho de que en los restantes extractos no se observen cambios del contenido proteico en función de los Ttos. de B, no excluye la posibilidad de que varíe la fracción correspondiente a los enzimas medidos, cuya actividad sufre alteraciones por efecto de los Ttos.

3.7.- Contenido de microelementos en las hojas.- Hemos realizado análisis de los microelementos B, Cu, Fe, Mn y Zn en las hojas de las plantas utilizadas en la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª experiencias, principalmente para estudiar su posible correlación con las actividades enzimáticas medidas y detectar así posibles influencias de los microelementos sobre dichas actividades enzimáticas. Desgraciadamente, en algunos casos carecemos de datos de las primeras recogidas, debido a la falta de material vegetal.

A continuación pasamos a considerar por separado los resultados de los análisis de B, ya que es una de las variables en nuestras experiencias.

3.7.1.- Contenido de B.- En las Tablas 24, 29, 34 y 39 se reúnen los datos del contenido de B en las hojas de la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª experiencias, y en la Fig. L aparecen representados estos datos en función de los Ttos. de B, que obviamente es el factor que condiciona las variaciones del contenido del elemento en los tejidos. Como puede observarse, en aquellas experiencias (1ª, 2ª y 3ª) en las que hemos empleado un nivel moderadamente deficiente de B (0,05 ppm) las diferencias de contenido de B en las hojas del Tto. deficiente con respecto al normal o son de muy baja significación, o incluso no existen. Sin embargo, en todos los casos, la curva de respuesta se ajusta a una hipérbola (componente lineal: $P < 0,001$; componente cuadrático: $P < 0,001$); ello indica que los valores de contenido de B aumentan progresivamente desde la deficiencia a la toxicidad, aunque este aumento es pequeño entre el nivel deficiente y normal comparado con el que existe entre éste y el tóxico. Además, las plantas cultivadas con el nivel deficiente de B mostraban claramente síntomas característicos de la deficiencia, como son una clara disminución del crecimiento de la parte aérea, junto con una clorosis y posterior necrosis

de la zona apical. Igualmente, hemos encontrado alteraciones en gran parte de los parámetros bioquímicos medidos en el Tto. deficiente, como ya hemos discutido en los apartados anteriores.

De todo lo anterior podemos deducir que nos encontramos en la típica situación en la que el análisis de planta no da una idea correcta del estado nutritivo de ésta, en el sentido de que el contenido de B parece ser adecuado para la planta, y sin embargo ésta muestra síntomas visuales de malnutrición junto con alteraciones de parámetros metabólicos. Este hecho ha sido comprobado para otros microelementos (del RIO et al., 1978; BAR-AKIVA et al., 1969; O'SULLIVAN, 1970), y en ello se basan los nutriólogos para utilizar ciertos parámetros metabólicos como indicadores del nivel de elemento "biológicamente activo", en lugar del contenido total en los tejidos.

En la 4ª experiencia, en la que utilizamos 0 ppm como Tto. deficiente, sí que existe una clara diferencia entre el contenido de B en las hojas de los tres Ttos., aunque sigue cumpliéndose el hecho de que la diferencia entre el Tto. deficiente y el normal es más pequeña que entre éste y el tóxico.

3.7.2.- Contenidos de Cu, Fe, Mn y Zn.- Los resultados del análisis foliar se reúnen en las Tablas 25-28 (1ª Experiencia); 30-33 (2ª Experiencia); 35-38 (3ª Experiencia) y 40-43 (4ª Experiencia) y están representados gráficamente en las Figs. LI-LIII. No hemos encontrado variaciones de los contenidos de microelementos en función de los Ttos. de B en aquellas experiencias en las que hemos utilizado un Tto. moderadamente deficiente (0,05 ppm). Sin embargo, en la 4ª experiencia, donde el Tto. deficiente empleado era 0 ppm de B, se observa que el contenido de Mn de las hojas deficientes es menor que el de las normales ($P < 0,05$). En trabajos anteriores ya habíamos detectado una interacción B-Mn (ALVAREZ-TINAUT, 1972). Se trate o no de un efecto primario del B, hay que recordar que no hemos encontrado correlación entre el contenido de Mn y la actividad PAL, medida en esta 4ª experiencia, por lo que este efecto no está relacionado con las variaciones encontradas en dicho parámetro.

Por lo que respecta al tiempo, existe, en general, un descenso del contenido de microelementos con la edad de la hoja, que interpretamos se debe al clásico efecto de dilución provocado por el crecimiento.

3.8.- Parámetros relacionados con la actividad giberelínica en la parte superior del tallo.- Se hicieron determinaciones de biosíntesis de ent-kaureno, precursor en la producción de giberelinas por la planta, y que, según BARENDSE (1981), es una buena estimación de la cantidad de giberelinas formadas. Las determinaciones se hicieron sobre los 20 cm superiores del tallo, ya que las pruebas preliminares realizadas (Tablas 5 y 6) habían dado para esta zona los mejores resultados de actividad de toda la parte aérea, mientras que las hojas mostraron una actividad despreciable.

Sobre el mismo material se realizaron medidas de actividad giberelínica, mediante el bioensayo del arroz enano "Tan-ginbozu".

3.8.1.- Biosíntesis de Ent-kaureno a partir de mevalonato marcado.- En la Tabla 19 figuran los datos de las determinaciones de este parámetro. Lo primero que se pone de manifiesto es que las medidas son en general bastante bajas, lo que nos indica que quizás el material escogido no era el adecuado para medir este parámetro, pese a que las pruebas preliminares así lo indicaban. No hay olvidar que estas pruebas fueron realizadas en girasol de pipa de aceite, pero de una variedad diferente a la utilizada en nuestra experiencia.

Las bajas medidas obtenidas, junto con la variabilidad de los datos, nos obligan a pensar que es necesario repetir las determinaciones en diferentes órganos de nuestras plantas, al objeto de seleccionar un material más adecuado para las medidas de este parámetro.

3.8.2.- Actividad giberelínica.- En la Tabla 20 se muestran los datos del bioensayo. Se observa una alta significación

frente al tiempo ($P < 10^{-4}$), pero no frente a los Ttos. de B, siendo también significativa la interacción entre ambos factores ($P < 0,05$). La existencia de esta interacción significa que, frente al tiempo, los 3 Ttos. evolucionan del mismo modo. En efecto, el desglose de la interacción (Fig. XLVI y XLVII) nos dice que, mientras las plantas del Tto. deficiente (0 ppm de B) muestran una actividad giberelínica aproximadamente constante a lo largo del tiempo, ya que no hay diferencias entre ninguna de las recogidas, son las fluctuaciones de los Ttos. normal y tóxico las responsables de la alta significación del parámetro frente al tiempo. Estas fluctuaciones son diferentes en ambos Ttos. Así, el normal muestra un aumento progresivo de la actividad giberelínica, que alcanza un valor máximo a los 21 días, que difiere de todas las demás recogidas. El Tto. tóxico provoca una fuerte elevación de la actividad giberelínica a los 7 días de la puesta en soluciones diferenciales de B, que se mantiene aproximadamente igual hasta el final de la experiencia, ya que sólo hay diferencias significativas entre t_0 y todas las demás recogidas.

Al igual que en otros casos, la existencia de una interacción en los datos directos hace que, cuando expresamos la actividad giberelínica en % del testigo de tiempo ($t_0 = 100$), se anule la significación frente al tiempo y aparezcan diferencias significativas frente a los Ttos. ($P < 0,01$). Las diferencias se establecen con respecto al Tto. deficiente, (Fig. XLVIII), que es inferior a cualquiera de los otros dos, aunque la significación es mayor frente al tóxico ($P < 0,01$) que frente al normal ($P < 0,05$).

Haciendo Tto. $_{0,5} = 100$, no aparecen diferencias significativas ni frente al tiempo ni frente a los tratamientos de B, lo que indica que las diferencias que los tratamientos deficiente y tóxico muestran en su comportamiento frente al normal son demasiado pequeñas para que se manifiesten en esta etapa del análisis estadístico.

En resumen, la deficiencia de B parece reducir la actividad giberelínica de la parte superior del tallo, mientras que la toxicidad no la altera, aunque parece adelantar el momento de la producción máxima.

De todas formas, también las medidas de actividad giberelínica son pequeñas comparadas con las que se obtuvieron en las pruebas preliminares, por lo que, como indicábamos en el caso del -ent-kaureno, pensamos que sería conveniente hacer más pruebas con nuestra variedad de girasol, al objeto de determinar la parte con más actividad giberelínica y, partiendo de una mayor cantidad de muestra, tratar de obtener resultados más acusados antes de extraer conclusiones definitivas. Por la misma razón, no hemos proseguido con los análisis de microelementos, el contenido proteico y las correlaciones de ambos con los parámetros relacionados con las giberelinas.

4.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1ª.- De acuerdo con nuestros resultados, los cambios producidos por la deficiencia de B "in vivo", durante el cultivo, son los responsables de la modificación de las actividades enzimáticas, ya que la adición de B "in vitro" no altera las actividades enzimáticas. En consecuencia, consideramos poco probable la idea de que la acción del B sobre las actividades enzimáticas está basada en la formación de complejos directamente con sustratos enzimáticos, sino que más bien parece ser un efecto a largo plazo, que implicaría alteraciones de estructuras celulares como las membranas o procesos metabólicos complejos (como la proteínosíntesis), no recuperables inmediatamente por la adición de B "in vitro".

2ª.- La actividad peroxidasa de hoja no se altera ni por los tratamientos de B, ni por la edad de la planta.

3ª.- La actividad la catalasa de hoja muestra un aumento básicamente lineal con la edad de la planta. En cuanto a los niveles de B, el tratamiento deficiente estimula la actividad respecto al normal, encontrándose indicios de que la toxicidad actúa en el mismo sentido que la deficiencia. El efecto del B podría ser indirecto, a través del Fe y del Cu, cuyos contenidos en hoja están estrechamente correlacionados con la actividad catalasa.

4ª.- La actividad ác. indol-acético oxidasa de hojas deficientes en B es menor que la de las hojas normales y tóxicas, que no difieren entre sí. Los Ttos. de B alteran, además, la evolución de la actividad a lo largo del tiempo.

5ª.- La deficiencia de B deprime, y la toxicidad incrementa fuertemente la actividad polifenol-oxidasa de hoja, ajustándose la variación a una recta con respecto al logaritmo de la concentración de B en solución. Además, hemos encontrado una correlación positiva entre el contenido de B en las hojas y la actividad PPO. Todo ello, junto con el hecho de que el efecto de los Ttos. de B es muy temprano, apreciándose a los 7 días de su aplicación,

nos induce a pensar que la regulación de la actividad PPO pudiera deberse a una acción primaria del B en girasol.

Por lo que se refiere a la evolución de la actividad PPO con el tiempo, se observan en todos los Ttos. una serie de oscilaciones que interpretamos como una manifestación de la homeostasis de óxido-reducción del sistema.

6ª.-Proponemos que la actividad polifenol-oxidasa en hoja pudiera utilizarse como parámetro indicador de la deficiencia y toxicidad de B en girasol, ya que a nuestro juicio cumple las condiciones necesarias para tal fin, y que están recogidas en la conclusión anterior.

7ª.-No hemos encontrado correlación entre el contenido de o-difenoles y la actividad polifenol-oxidasa de las hojas, lo que está de acuerdo con los resultados de MACE (1963) y ROBERTS (1952). Según estos autores, existiría una compartimentación "in vivo" de estos compuestos, que hace que sólo una fracción del total sea accesible al enzima.

8ª.-La actividad glucosa-6P-deshidrogenasa de hojas aumenta tanto en condiciones de deficiencia como de toxicidad de B, siendo más acusado el efecto en este último caso. En cuanto a la evolución en el tiempo, en todos los Ttos. aumenta progresivamente hasta dar un máximo a los 21 días de tratamiento, decayendo de nuevo a los 28.

9ª.-La actividad 6P-gluconato-deshidrogenasa de hojas aumenta tanto en condiciones de deficiencia como de toxicidad de B, siendo más acusado el efecto en este último caso. Sin embargo, la alteración provocada por los niveles anormales de B parece ser transitoria, ya que sólo se manifiesta claramente a los 14 días de tratamiento. Los Ttos. de B, por tanto, alteran la evolución de la actividad a lo largo del tiempo.

10ª.- Hemos encontrado correlaciones positivas entre el contenido de o-difenoles de las hojas y las actividades glucosa-6P-deshidrogenasa y 6P-gluconato-deshidrogenasa, aunque con diferente significación, existiendo también correlación entre ambas activida-

enzimáticas. Este hecho confirma la directa implicación de ambas actividades en la biosíntesis de o-difenoles a través de la vía oxidativa de las pentosas-fosfato (OPP), propuesta por LEE y ARONOFF (1967). Se propone un esquema para explicar la influencia relativa de las dos variables de la experiencia (tiempo y tratamientos de B) sobre los cambios de estos tres parámetros, concluyéndose que el B sólo actuaría directamente sobre la actividad glucosa-6P-des_hidrogenasa, 1^{er} enzima de la vía oxidativa de las pentosas-fosfato.

11^a.-Los Ttos. de B alteran la evolución en el tiempo de la actividad fenilalanina-amonio-liasa de hojas, de manera que mientras en el tratamiento normal la actividad se mantiene aproximadamente constante, tanto en el tóxico como en el deficiente se produce un aumento de la actividad, siendo el efecto más rápido y mantenido en el 1^{er} caso, y en el 2^o más lento y transitorio.

Creemos que la actividad PAL no es la principal responsable de la acumulación de o-difenoles en condiciones de deficiencia de B.

12^a.-La acumulación de o-difenoles en las hojas como respuesta a la deficiencia de B, repetidamente descrita en la bibliografía, sólo hemos podido detectarla cuando se cultivaron las plantas en condiciones de extrema deficiencia (0,0 ppm de B), y no cuando la deficiencia era moderada (0,05 ppm de B). Esto, junto con el hecho de que se trata de un efecto muy tardío (se manifiesta a los 28 días de haberse aplicado el tratamiento), nos hace dudar de que esta acumulación sea la principal responsable de los síntomas de deficiencia observados en las plantas, como proponen algunos autores, ya que éstos aparecen mucho más tempranamente, y se observan también en condiciones de deficiencia moderada.

13^a.-Los contenidos proteicos de los extractos utilizados para las medidas de actividades enzimáticas varían todos fuertemente con la edad de la planta. En cuanto al efecto de los tratamientos de B, sólo hemos detectado variaciones en el contenido proteico de los extractos de polifenol-oxidasa, siendo éstas semejantes a las que mostraba dicha actividad frente a este factor. Este

hecho estaría de acuerdo con la idea de que la acción del B sobre la actividad PPO podría deberse a un aumento de la cantidad de enzima activo.

14ª.-De todas las actividades enzimáticas medidas, sólo en el caso de la polifenol-oxidasa hemos encontrado que la deficiencia y la toxicidad producen efectos contrarios sobre la actividad; en el resto de los casos, cuando se producen cambios de actividad por efecto de los niveles de B, estos consisten siempre en un aumento de la actividad enzimática tanto en condiciones de deficiencia como de toxicidad.

Pensamos que la influencia del B sobre este 2º grupo de actividades enzimáticas podría realizarse a través de una única acción primaria, mientras que en el caso de la polifenol-oxidasa la acción primaria implicada debe ser otra diferente a la anterior.

15ª.-De acuerdo con nuestros resultados, creemos que la confusión que existe en la bibliografía respecto a la acción del B sobre las actividades enzimáticas se debe al hecho de que el B altera en muchos casos la evolución del parámetro a lo largo del tiempo, de manera que, dependiendo del momento en que se hagan las medidas, se detecta elevación ó disminución respecto al nivel normal de una misma actividad para un mismo tratamiento de B.

16ª.-La toxicidad de B se refleja en el contenido de B en hoja de una manera mucho más clara que la deficiencia. Sin embargo, la deficiencia siempre da lugar una alteración sustancial de la mayoría de los parámetros metabólicos medidos, lo que demuestra la importancia que tiene la utilización de parámetros bioquímicos para la detección de la deficiencia de B, en lugar del análisis foliar.

17ª.-El contenido de los micronutrientes Cu, Fe, Mn y Zn de todas las experiencias desciende con la edad de la hoja, lo que se atribuye al clásico efecto de dilución provocado por el crecimiento.

Con respecto a los Ttos. de B, sólo hemos encontrado una disminución del contenido de Mn en las hojas cultivadas con deficiencia extrema de B.

5.- BIBLIOGRAFIA

5.- BILIOGRAFIA

- Agarwala, S.C.; Sharma, P.N.; Chatterjee, C. y Sharma, C.P. (1981).
J. of Plant Nutr. 3(1-4): 329-36.
- Albert, L.A. (1975). Proc. Int. Plant Prop. Soc. 25: 392-9.
- Albert, L.S. (1965). Pl. Physiol., Lancaster 40, 649-52.
- Al-Quadan, F.; Wender, S.H. y Smith, E.C. (1981). Phytochemistry
20(5): 961-4.
- Al'Shevskii, N.G.; Verzhbitskii, V.I.; Korcheva, L. Kh. (1975).
Nauk Pr.-Ukr. Sil's Kogospod. Akad. 1975. 171, 136-43.
- Alvarez-Tinaut, M.C. (1972). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Alvarez-Tinaut, M.C. y Donaire, J.P. (1978). Abst. de III Reunión
Nac. Soc. Esp. Fis. Veg. Pág. 116.
- Anderson, J.D.; Moore, T.C. (1967). Plant Physiology, 42: 1527-
34.
- Anderson, L.E. (1979) en M. Gibbs, E. Latzko, eds. Encyclopedia
of Plant Physiology. Springer-Verlag. Heidelberg 271: 81.
- Anderson, L.E.; Duggan, J.X. (1976). Plant Physiol. 58: 135-9.
- Augsten, V.H.; Eichhorn, M. (1976). Biochemie und Physiologie
der Borwirkung bei Pflanzen Beider Redaktion eingegangen 15
April 1976. 268-84.
- Bar-Akiva, A.; Lavon, R. y Sagiv, J. (1969). Agrochimica 14:
47-54.
- Bar-Akiva, A. (1971). Recent. Advan. Plant Nutr. Proc. Colloq.
Plant Arnold. Fert. Probl., 1970. 1, 115-42. Ed. by Samish,
Rudolph M. Gordon and Breach: New York, N.Y.
- Barendse, G.W.M.; Moore, T.C. (1979). The tenth interactional
conference of plant growth substances, Madison, Wisconsin:
Abstract nº 117, p. 11.
- Barendse, G.W.M. (1980). Abstracts of lectures and poster demonstra-
tions of the F.E.S.S.P.P. II Congress. Santiago de Compostela.
211-2.

- Barendse, G.W.M.; Van De Werken, P.H. and Takahashi, N. (1980). Journal of chromatography. 198: 449-55.
- Ben-Bassat, D. y Anderson, L.E. (1981). Plant Physiol., 68: 279-83.
- Bingham, F.T.; Elseewi, A.; Oertli, J.J. (1970). Soil Sci. Soc. Am. Proc. 34: 613-7.
- Birnbaum, E.H.; Beasley, C.A. y Dugger, A.C. (1974). Plant Physiol. 54: 931-5.
- Birnbaum, E.H.; Dugger, W.M.Jr.; Beasley, B.C.A. (1977). Plant Physiol. 59: 1034-8.
- Bligh Egdier, W.S. (1959). J. can. Biochem. Biophys. 37: 911-7.
- Bowen, J.E. (1968). Plant Cell. Physiol. 36: 420-4.
- Bowen, J.E.; Nissen, P. (1976). Plant Physiol. 57: 353-7.
- Bligh, Egdier, W.S. (1959). J. Can. Biochem. Biophys. 37: 911-7.
- Bohnsack, Charles, W.; Albert, Luke, S. (1977). Plant Physiol., 59(6), 1047-50.
- Bradford, M.M. (1976). Analitical Biochemistry 72: 248-54.
- Briggs, J.A. y Ray. P.M. (1956). Plant Physiol., 31: 165.
- Cohen, M.S.; Albert, L.S. (1974). Plant Physiol., 54: 766-8.
- Cohen, M.S.; Lepper, R.Jr. (1977). Plant Physiol., 59: 884-7.
- Coke, L. and Whittington, W.J. (1968). J. Exp. Bot., 19, 295-303.
- Comité Inter-Institutos para el estudio de Técnicas Analíticas de Diagnóstico Foliar. (1969). An. Edaf. y Agrobiol., XXVIII (5-6), 409-31.
- Coolbaugh, R.C.; Hamilton, R. (1976). Plant Physiology. 57: 245-8.
- Cory, S. y Finch, I.R. (1967). Phytochemistry, 6: 211-5.
- Creasy, L.L. (1976). Phytochemistry, 15: 673-5.

- Cresswell, C.F.; Nelson, H. (1973). *Ann. Bot.*, 37, 427-38.
- Chamel, A.R.; Andreani, A.M.; Eloy, J.F. (1981). *Plant Physiology*, 67: 457-9.
- Chapman, K.S.R.; Jackson, J.F. (1974). *Phytochemistry*, 13: 1311-8.
- Dave, I.C.; Kannan, S. (1981). *Acta Physiol. Plant.* 3: 27-32.
- Dear, J.; Aronoff, S. (1965). *Plant Physiol.* 40, 458.
- Del Río, L.A.; Gómez, M.; Yañez, J.; Leal, A.; López Gorge, J. (1978). *Plant and Soil*, 49(2): 343-53.
- Dolya, V.S.; Ostrovskii, L.L. (1971). *Sl. Nauch. Tr. Fiziol., Anat. Biokhim. Teknol. Sakh. Svekly* 1971: 338-47.
- Dugger, W.M. (1973). *Adv. Chem. Ser.* 123: 112-29.
- Dugger, W.M. (1983). *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series* vol. 15B Ed. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokio. p. 626-50.
- Dutta, T.R.; MacIlrath, W.J. (1964). *Botan. Gaz.* 125: 89-96.
- Eichhorn, V.M.; Ausgten, H. (1974). *Biochem. Physiol. Pflanz.* 165: 371-85.
- Fric, F. (1971). *Biología (Bratislava)* 26(9): 677-88.
- Galston, A.W. y Baker, R.S. (1951). *Amer. J. Bot.* 38: 190-5.
- Gauch, H.G.; Dugger, W.M. Jr. (1954). The physiological action of boron in higher plants: review and interpretation. *Univ. Maryland AES Bull* 80: 1-43 (Technical).
- Gebhardt, K. (1982). *Plant growth. Regul.* 1(2): 73-84.
- Gelinas, D.A. (1973). *Plant Physiology* 51 (5): 967-72.
- Glass, A.D.M.; Dunlop, J. (1974). *Plant Physiol.* 54, 855-8.
- Gopal, N.H. (1970). *Curr. Sci.* 39: 44-5.
- Gordon, S.A. y Paleg, L.G. (1961). *Plant Physiol.* 36: 838.
- Graebe, J.E.; Dennis, D.T.; Upper, C.D.; West, C.A. (1965). *J. Biol. Chem.* 240: 1847-54.

- Hanson, K.R. y Havir, E.A. (1981). *The Biochemistry of plants*, vol. 7. 577-625. Academic Press, Inc.
- Hirsch, A.; Torrey, J.G. (1980). *Can. J. Bot.* 58: 856-66.
- Hirsch, A.; Pengelly, W.L.; Torrey, J.G. (1982). *Bot. Gaz.* 143: 15-9.
- Hudak, Jan (1974): *Acta Fac. Rerum Nort. Univ. Comenianiae, Physiol. Plant.* 9, 21-9.
- Hulme, A.C.; Jones, J.D. y Wolltorton, L.S.L. (1964). *Nature* 201: 795.
- Hyodo, H. y Uritani, I. (1966). *Agric. Biol. Chem.* 30: 1083.
- Imbert, M.P.; Wilson, L.A. (1972). *Phytochemistry*, 11(9): 2671-6.
- Indravadan Chhelshaner, D.; Seshadri, K. (1980). 2. *Pflanzenphysiol.* 97: 261-3.
- Ivanova, I.A. (1968). *Dokl. Biol. Akad. Nauk* 21(II): 1217-20.
- Jimenez Lucena, F. (1974). *Imbibición de semillas de girasol en soluciones de boro. Tesina de la Universidad de Granada.*
- Jimenez, F.; Montero, F.P.; Muñoz, J. (1982). *Agrochimica* 26(5-6): 544-9.
- Judel, G.K. (1972). *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 131(2): 159-70.
- Judel, G.K. (1975). *Biochem. Physiol. Pflanzen* Bd. 167, s.233-241.
- Kato, C.; Uritani, I.; Saijo, R. y Takeo, T. (1976). *Plant Cell Physiol.* 17, 1045.
- Keilin, D.; Hartree, E.F. (1945). *Biochem. J.* 39: 293.
- Kenten, R.H. (1958). *Biochem. J.* 68: 244.
- Kenten, R.H. y Mann, P.J.G. (1955). *Biochem. J.* 59: 110-21.
- Kevresan, S.; Grujic, S.; Kastori, R.; Kandrak, T. (1977). *Zemljiste Biljka* 26: 57-64.

- Khanduja, S.D.; Balasubrahmanyam, V.R.; Agnihotri, O.P. (1976).
Indian J. Hortic. 33(3-4), 216-19.
- Koge, M. (1978). Nippon Dojo Hiriyogaku Zasshi 49: 194-9.
- Kohl, H.C. y Oertli, J.J. (1961). Distribution of boron in leaves.
Plant Physiology 36: 420-4.
- Kornberg, A. y Horecker (1955). Methods in enzymology. Vol. I.
p. 323.
- Kouchi, H.; Kumazawa, K. (1975). Soil Sci. Plant Nutr. 21: 21-8.
- Kouchi, H.; Kumazawa, K. (1975). Soil Sci. Plant Nutr. 21: 137-50.
- Krosing, M. (1978). Z. Pflanzenernaehr Bodenkd 141: 523-33.
- Krupnikova, T.A.; Smirnov, Yu S.; Shkol'nik, M. Ya. (1975). Fiziol. Biokhim. Kul't. Rast. 7(6), 569-73.
- Lachica, M. (1977). Análisis foliar. Estudio sobre la determinación de boro en plantas con Azometina-H. Comunicación presentada al IV Colloque International sur le controle de l'alimentation des plantes cultivées. Gantes.
- Lee, K.W.; Whittle, C.M.; Dyer, H.J. (1966). Physiol. Plant. 19: 919-24.
- Lee, S. and Aronoff, S. (1967). Nature 10: 778-9.
- Lee, S. and Aronoff, S. (1967). Science 159: 798.
- Leonard, R.T. y Hanson, J.B. (1972). Plant Physiol. 49: 430-5.
- Lewin, J.; Chen, C.H. (1976). Journal of Experimental Botany 27: 916-21.
- Li, P.L. y Bonner, J. (1947). Biochem. J. 41: 105.
- Linden, C.D.; Wright, K.K.; McConnell, H.M. y Fox, C.F. (1973). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2271-5.
- Löffelhardt, W.; Ludwig, B. y Kindl, H. (1973). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1006-12.
- Lovatt, C.J.; Albert, L.S.; Trembley, G.C. (1981). Plant Physiol. 68: 1389-94.

- Lowry, H.O.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Lück, H. (1965). H.U. Bermeger ed., *Methods of enzymatic analysis.* Academic Press, N.Y. 885-894.
- Mace, M.E. (1963). *Physiol. Plant* 16: 915.
- Mayer, A.M. (1965). *Israel J. Botany* 13: 74.
- Mayer, A.M. (1966). *Phytochemistry* 5: 1297.
- Mayer, A.M. y Harel, E. (1979). *Phytochemistry* 18: 193-215.
- Moore, H.M.; Hirsch, H.M. (1983). *Am. J. of Botany.* 70(2): 165-72.
- Murakami, Y. (1968). *Bot. Mag. (Tokyo)* 81: 33-43.
- Nason, A.H.; Olderwurtel, H.A.; Propst, L.M. (1952). *Arch. Biochem. Biophys.* 38: 1-13.
- Oertli, J.J.; Grgurevic, E. (1975). *Agron. J.* 67: 278-80.
- O'Sullivan, M. (1970). *J. Sci. Fd. Agric.* 21: 607-9.
- Pacheco de Aguirre, A.C.; Dantas, J.P.; Fernanda de Moraes, M.; Vianna de Amorin, H. (1977). *Empresa Bras. Requi. Agropecu. Brasilia (Brasil)*, 69(2), 45-9.
- Parish, R.W. (1968). *Enzymologia* 35, 239-52.
- Parish, R.W. (1969). *Z. Pflanzenphysiol.* 60: 211-6.
- Parr, A.J. y Loughman, B.C. (1983). *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* nº 21, p. 87-107. Ed. por D.A. Robb and W.S. Pierpoint. Academic Press.
- Pen'kov, L.A.; Kand, D.; Shkol'nik, M. Ja., (1965). *Bot. Z.* 52, 259-75.
- Pesez, M.; Poiriez, P.; Bartos, J. (1966). *Pratique d'analyse organique colorimetrique.* Massó et Cie. ed. p. 50.
- Pillar, Jozef. (1973). *Ved. Pr. Vyst. Usta. Rasytliunej. Visoby Diestanoch* 11, 151-8.
- Pinta, M. (1973). *Oléagineux*, 28(2), 87-92.

- Pollard, A.S.; Parr, A.J. y Loughman, B.C. (1977). *J. Exp. Bot.* 28: 831-41.
- Psenakova, T.; Kolek, J.; Psenak, M.; Kovacs, P. (1971). *Biologia (Bratislava)*. 26(3), 177-85.
- Reed, H.S. (1947). *Hilgardia* 17: 377.
- Rich, P.R. y Bonner, W.D. Jr. (1977). *Plant Physiol.* 59(supl.) 60, Abstr. 329.
- Roberts, E.A.H. (1952). *J. Sci. Food Agric.* 5: 193.
- Robertson, G.A. y Loughman, B.C. (1974). *New Phytol.* 73: 291-8.
- Ruis, H. y Kindl, H. (1971). *Phytochemistry* 10: 2627-31.
- Sato, M. y Hasegawa, M. (1976). *Phytochemistry* 15, 61.
- Sauchelli, V. (1974). *Trace elements in Agriculture*. Ed. Van Nostrand Reinhold. Comp. New York.
- Sherstnev, E.A. y Razumova, M.V. (1965). *Agrochimica* 9, 348.
- Sherstnev, E.A. (1974). *Biol. Rol. Mikroelem. Ikh Primen Sel'sk. Khoz Med.* Edited by Peive, Ya. V., Khailova, G.F. "Nauka". Moscow, USSR, 263-72.
- Shive, J.B. Jr.; Barnett, N.M. (1973). *Plant Cell Physiol.* 14: 573-83.
- Shkol'nik, M. Ya. (1969). *Usp. Sovrem. Biol.*, 67(1), 3-23.
- Shkol'nik, M. Ya. (1974). *Sov. Plant Physiol.* 21: 140-50.
- Shkol'nik, M. Ya.; Abysheva, L.N. (1975). *Fiziol. Biokhim. Kul't Rast.* 7: 291-7.
- Shkol'nik, M. Ya., Krupnikova, T.A.; Smirnov, Yu.S. (1981). *Fiziol. Rast.* 28(2): 391-7.
- Shkol'nik, M. Ya. e Il'inskaya, N.L. (1975). *Fiziologiya Rastenii* 22(4): 801-5.
- Shkol'nik, M.Ya.; Maevskaya, A.N. (1977). *Bot. Zh.* 10: 1528-40.
- Shkol'nik, M.Ya.; Maevskaya, A.N. and Sergeisichik, A.A. (1980). *Fiziologiya Rastenii.* 27(4): 773-7.

- Sigel, H. (1969). *Angew. Chem. Internatl. Ed.*, 8: 167.
- Skok, J. (1958). *Trace elements*. Edit. por: Lamb C.A., Bentley O.G., Beattie J.M. Academic Press, London, New York.
- Skok, J. (1968). *Plant Physiol.* 43(3): 348-8.
- Smirnov, Y.S.; Krupnikova, T.A.; Shkol'nik, M.Ya. (1977). *Sov. Plant Physiol.* 24: 270-6.
- Smyth, D.A.; Dugger, W.M. (1980). *Plant Physiol.* 66: 692-5.
- Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. (1971). *Métodos estadísticos*. Ed. C.E.C.S.A.
- Steiner, A.A. (1961). *Plant and Soil*, XV(2) 134-54.
- Stepanov, V.I.; Nandin, I. (1963). *Agorlesomelior* 45: 123-7.
- Suzuki, Y. (1959). *Sci. Rep. Tôhoku Univ. Ser. IV (Biol.)* 25: 119.
- Swain, Y.; Mapson, L.W. y Robb, D.A. (1966). *Phytochemistry* 5:469.
- Tafuri, F.; Businelli, M.; Scarponi, L. (1972). *J. Sci. Food Agr.* 23(12): 1417-23.
- Tanada, T. (1983). *Jorunal of Plant Nutrition* 6(9): 743-9.
- Tanaka, H. (1967). *Soil Sci. Plant Nutr.* 13: 77-82.
- Timashov, N.D. (1970). *Fiziol. Rast.* 17: 1004-11.
- Timashov, N.D. (1977). *Vestn Khar'k Univ.* 158: 36-8.
- Tolbert, N.E. (1973). *Plant Physiol.* 51: 234.
- Tolbert, N.E.; Oeser, A.; Yamazakm, R.R.; Hageman, R.H. and Kisaki, T. (1969). *Plant Physiol.* 44: 135-47.
- Torsell, K. (1956). *Physiol. Plant* 9: 652-64.
- Troitskaya, E.A.; Dranik, L.I.; Shkol'nik, M.Ya. (1971). *Fiziol. Rast.* 18(2), 393-6.
- Troitskaya, E.A.; Maevskaya, A.N.; Temp, G.A. (1975). *Fiziol. Rastanii* 22-5: 976-80.
- Turnowska-Starck, Z. (1960). *Acta Soc. Bot. Pol.* 29: 219-47.
- Tyuterev, S.L.; Kudriavtseva, V.P.; Tarlakovskii, S.A.; Ksenzova, E.N. y Guseva, T.A. (1976). *Application of Biochemical Methods in Research on Plant Protection (Procedural Instructions)*. Vres. Inst. Zashchity Rast., LENINGRAD (1976) p. 114.

- Uehara, K.; Fujimoto, S.; Taniguchi, T. (1974). J. Biochem. 75: 627-38.
- Valpuesta Fernández, V. (1977). Tesis Doctoral realizada en el Centro de Edafología y Biología aplicada del Cuarto (Sevilla) del C.S.I.C.
- Varda Kahn (1975). J. Sci. Fd. Agric. 26: 1319-24.
- Viktorov, D.P. (1975). Fiziol. Fiz-Khim. Mekh. Regul. Obmennykh Protsessov Org. 4, 15-19.
- Vlasjuk, P.A. (1971). Fiziol. Biochim. Kul't. Rast. (Kiev) 3: 276-86.
- Vorob'ev, L.N. y Pelkhanov, S.E. (1973). Chem. Abstr. 83, № 53914.
- Weinstein, L.H. y Robbins, W.R. (1955). Plant Physiol. 30: 27-32.
- Walker, J.R.L. (1980). What's New in Plant Physiology. 11(9): 33-6.
- Watanabe, R.; Chorney, W.; Skok, J. y Wender, S. (1964). Phytochemistry 3: 391.
- Weser, U. (1968). Hoppe -Seyler's. Z. Physiol. Chem. 5, 275.
- Wolfe, J. (1978). Plant. Cell and Environment 1: 241-7.
- Worthington Biochemical Corporation. (1967). Freehold, New Jersey (1967 Index Manual I.U.B. Number. 1.11.1.7.).
- Yamanouchi, M.; Tatsumi, T.; Inamasu, Y. (1975). Nippon Dojo-Hiryogaku Zasshi. 46(12): 529-35.
- Zucker, M. (1972). Annual Review of Plant Physiology 23: 133-56.
- Zurhal, Z.; Machackova, I. (1975). Mekh, Deistnya Gerbits Sint. Regul. Rosta Rast. Ikh Jud'ba Biofere, Mater Meyhlsunar. Sim. Stran. Chlnov Sev. 10th. Edited by sokolov M.S. Akad. Nauk SSR Nauchn Tsentr Biol Issled: Pushishino USSR. 2: 109-14.

FE DE ERRATAS.

- Debido a un error en los cálculos, los valores de conten
do de B en hojas aparecen multiplicados por diez.