

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



RESPUESTA DE ALGUNOS PROCESOS METABÓLICOS EN
PLANTAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L. var. Tennessee 86)
ANTE LA APLICACIÓN CONJUNTA DE B Y Ca

JUAN MANUEL RUIZ SÁEZ
TESIS DOCTORAL

GRANADA, JUNIO 1999

Juan Manuel Ruiz Sáez
98/99



Biblioteca Universitaria de Granada



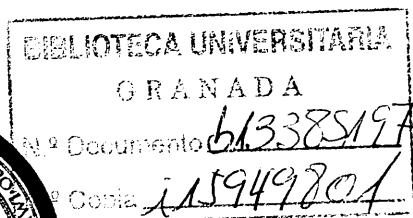
01090644

~~T 3/2~~
T 3/2

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ...11/6/99.....
ENTRADA NUM. 2003.....

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

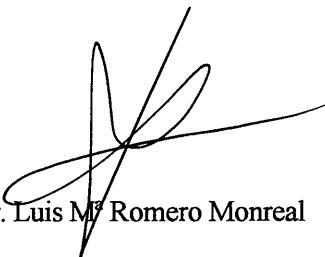


**RESPUESTA DE ALGUNOS PROCESOS METABÓLICOS EN PLANTAS DE
TABACO (*Nicotiana tabacum* L. var. Tennessee 86) ANTE LA APLICACIÓN
CONJUNTA DE B Y Ca**

JUAN MANUEL RUIZ SÁEZ
TESIS DOCTORAL

GRANADA, JUNIO 1999

El presente trabajo de investigación titulado: "**Respuesta de algunos procesos metabólicos en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. Tennessee 86) ante la aplicación conjunta de B y Ca**", para aspirar al Grado de Doctor en Biología que presenta el Licenciado D. Juan Manuel Ruiz Sáez, ha sido realizado en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante el periodo de tiempo comprendido entre 1996-1999 y bajo la dirección del Profesor Dr. Luis M^a Romero Monreal.



Dr. Luis M^a Romero Monreal

Director de la Tesis Doctoral

Profesor Titular de la Universidad de Granada

D. Juan Manuel Ruiz Sáez



Aspirante al Grado de Doctor

GRANADA, JUNIO 1999

A mis Padres

A María

Quisiera expresar mi sincera gratitud:

En primer lugar al Dr. Luis Romero Monreal como director, puesto que ha sabido dejarme la suficiente libertad en la realización de este trabajo como para aprender de mis propios errores y saber apreciar la necesidad de sus conocimientos adquiridos a través de tanto años de experiencia, y como amigo por mostrarme su sinceridad y confianza en mi persona. Solamente espero que después de esta etapa de mi vida mantengamos una relación igual de fructífera tanto en el plano profesional como en el personal. Ha sido y será siempre un maestro y un entrañable amigo.

A la Dra. Inmaculada López-Cantarero Ballesteros por estar siempre a mi lado ofreciéndome toda su ayuda y su confianza plena en mi trabajo y en mi persona.

Al Dr. José María Ramos por compartir conmigo parte de sus amplios conocimientos estadísticos.

A todos los profesores y componentes del Departamento de Biología Vegetal por hacerme entender que formo parte de este Departamento.

A mis compañeros, y sobre todo amigos Gema, Grego, Rosa, Diego, Mourad, Pablo, Esteban, Luis y Jorge, pertenecientes al grupo de investigación de Nutrición Vegetal, del que formo parte, por su disposición y muestras de apoyo durante la realización de la parte experimental y teórica del este trabajo. A todos gracias y espero que siga el buen rollo.

A María, que ha vivido todos los momentos, tanto los buenos como los malos, expresándome siempre su apoyo e ilusión en mi trabajo. Gracias por tantos años de compañía y por darme esperanza en el futuro.

A mis Padres Juan Manuel y Conchi, por su cariño y por creer en mi, y a mis hermanos José, Conchi y Paco, y resto de mi familia más querida por su interés y ánimos en todo momento. Gracias de corazón.

A mis amigos Pedro, Pablo, Salvador, Paco, Juan, Carolina, Maria, Firas, Rafa, Francisco y Juanma, por soportar también ellos este trabajo y por obligarme en muchas ocasiones a desconectar.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo I. Influencia de la aplicación de B y Ca sobre su absorción y distribución en plantas de tabaco.

I. Introducción.

I.1. Absorción del B por las plantas.

I.1.1. Generalidades.

I.1.2. Mecanismos de absorción del B.

I.2. Movilidad y acumulación del B en las plantas.

I.2.1. Generalidades.

I.2.2. Dinámica del B en especies con baja movilidad de B.

I.2.3. Dinámica del B en especies con elevada movilidad de B.

I.3. Estudio de la relación B-pectinas.

I.4. El Ca en las plantas.

I.4.1. Generalidades.

I.4.2. Transportadores que intervienen en la entrada hacia el citoplasma del Ca.

I.4.3. Transportadores que intervienen en la salida del Ca del citoplasma.

I.4.4. Distribución del Ca celular.

I.4.5. Movilidad del Ca en las plantas.

I.4.6. Estudio de la relación Ca-pectinas.

I.5. Generalidades sobre la interacción B-Ca.

II. Objetivos.

III. Material y Métodos.

III.1. Diseño experimental.

III.2. Muestreo de las plantas.

III.3. Análisis de las plantas.

III.4. Análisis estadístico.

IV. Resultados.

V. Discusión.

V.1. Distribución y concentración del B.

V.2. Distribución y concentración del Ca.

V.3. Caracterización y concentración de pectinas.

V.4. Concentraciones de B y Ca en las distintas fracciones de pectinas.

VI. Conclusiones.

VII. Referencias.

Capítulo II. Influencia de la aplicación de B y Ca sobre el metabolismo de los compuestos fenólicos en plantas de tabaco.

I. Introducción.

I.1. Bioactividad de los fenoles en plantas superiores.

I.1.1. Generalidades.

I.1.2. Síntesis de los compuestos fenólicos.

I.1.3. Oxidación de los compuestos fenólicos.

I.1.4. Funciones de los fenoles bajo condiciones de estrés.

I.1.5. Interacciones fisiológicas de los fenoles.

- I.2. Papel del B en el metabolismo de los fenoles.
- I.3. Papel del Ca en el metabolismo de los fenoles.

II. Objetivos.

III. Material y Métodos.

- III.1. Diseño experimental.
- III.2. Muestreo de las plantas.
- III.3. Análisis de las plantas.
- III.4. Análisis estadístico.

IV. Resultados.

V. Discusión.

VI. Conclusiones.

VII. Referencias.

Capítulo III. Influencia de la aplicación de B y Ca sobre la asimilación de nitratos en plantas de tabaco.

I. Introducción.

- I.1. Generalidades sobre el metabolismo nitrogenado.
 - I.1.1. Absorción de NO_3^- . Mecanismos de transporte.
 - I.1.2. Translocación de NO_3^- .
 - I.1.3. Asimilación de NO_3^- . Enzimas involucradas.
 - I.1.4. Regulación del metabolismo nitrogenado.
- I.2. Papel del B en los procesos de asimilación de NO_3^- .
- I.3. Papel del Ca en los procesos de asimilación de NO_3^- .

II. Objetivos.

III. Material y Métodos.

- III.1. Diseño experimental.
- III.2. Muestreo de las plantas.
- III.3. Análisis de las plantas.
- III.4. Análisis estadístico.

IV. Resultados.

V. Discusión.

VI. Conclusiones.

VII. Referencias.

Capítulo IV. Efecto de la aplicación de B y Ca sobre el metabolismo del P en raíces y en hojas de plantas de tabaco.

I. Introducción.

- I.1. Generalidades.
 - I.1.1. Absorción de P y su regulación.
 - I.1.2. Translocación y distribución del P en la planta.
 - I.1.3. Bioindicadores del P.
- I.2. Influencia del B sobre el metabolismo del P.
- I.3. Influencia del Ca sobre el metabolismo del P.

II. Objetivos.

III. Material y Métodos.

- III.1. Diseño experimental.
- III.2. Muestreo de las plantas.
- III.3. Análisis de las plantas.
- III.4. Análisis estadístico.
- IV. Resultados.
- V. Discusión.
- VI. Conclusiones.
- VII. Referencias.

Capítulo V. Efecto de la aplicación de B y Ca sobre la distribución y concentración de los cationes K^+ , Mg^{2+} , y Ca^{2+} en plantas de tabaco. Utilización de la actividad piruvato kinasa como posible bioindicador.

- I. Introducción.
 - I.1. Influencia del B sobre la concentración de los cationes K^+ , Mg^{2+} , y Ca^{2+} .
 - I.2. Influencia del Ca sobre la concentración de los cationes K^+ , Mg^{2+} , y Ca^{2+} .
 - I.3. Actividad piruvato kinasa.
- II. Objetivos.
- III. Material y Métodos.
 - III.1. Diseño experimental.
 - III.2. Muestreo de las plantas.
 - III.3. Análisis de las plantas.
 - III.4. Análisis estadístico.
- IV. Resultados.
- V. Discusión.
- VI. Conclusiones.
- VII. Referencias.

Capítulo VI. Influencia de la aplicación de B y Ca sobre los factores que afectan a la producción y distribución de la biomasa en plantas de tabaco.

- I. Introducción.
 - I.1. Nutrición vegetal, biomasa y su distribución en la planta.
 - I.1.1. Generalidades.
 - I.1.2. Factores nutricionales que afectan a la producción de biomasa y a su distribución en plantas de tabaco.
- II. Objetivos.
- III. Material y Métodos.
 - III.1. Diseño experimental.
 - III.2. Muestreo de las plantas.
 - III.3. Análisis de las plantas.
 - III.4. Análisis estadístico.
- IV. Resultados.
 - IV.1. Producción de biomasa y su distribución en plantas de tabaco.
 - IV.2. Factores determinantes en la producción de biomasa.
- V. Discusión.
 - V.1. Producción de biomasa y su distribución en plantas de tabaco.
- VI. Conclusiones.
- VII. Referencias.

1917

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

CAPITULO I. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE B Y Ca SOBRE SU ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN EN PLANTAS DE TABACO

I. Introducción

I.1. Absorción del B por las plantas.

I.1.1. Generalidades

I.1.2. Mecanismos de absorción del B.

I.1.2.1. Propiedades del ácido bórico.

I.1.2.2. ¿Es la absorción de B pasiva o activa?

I.1.2.3. Factores que afectan a la absorción del B.

I.2. Movilidad y acumulación del B en las plantas.

I.2.1. Generalidades.

I.2.2. Dinámica del B en especies con baja movilidad de B.

I.2.2.1. Resultados en contra de la retranslocación del B.

I.2.2.2. Resultados a favor de la retranslocación del B.

I.2.3. Dinámica del B en especies con elevada movilidad de B.

I.2.3.1. Distribución de B en los tejidos de las plantas.

I.2.3.2. Dependencia de la movilidad del B por el floema.

I.2.3.3. Distribución de los polialcoholes en plantas superiores.

I.3. Estudio de la relación B-pectinas.

I.4. El Ca en las plantas.

I.4.1. Generalidades.

I.4.2. Transportadores que intervienen en la entrada hacia el citoplasma del Ca.

I.4.3. Transportadores que intervienen en la salida del Ca del citoplasma.

I.4.4. Distribución del Ca celular.

I.4.5. Movilidad del Ca en las plantas.

I.4.6. Estudio de la relación Ca-Pectinas.

I.5. Generalidades sobre la interacción B-Ca.

II. Objetivos

III. Material y métodos.

III.1. Diseño experimental.

III.2. Muestreo de las plantas.

III.3. Análisis de las plantas.

III.4. Análisis estadístico.

IV. Resultados.

V. Discusión.

V.1. Distribución y concentración del B.

V.2. Distribución y concentración del Ca.

V.3. Caracterización y concentración de pectinas.

V.4. Concentraciones de B y Ca en las distintas fracciones de pectinas.

VI. Conclusiones

VII. Referencias

I. Introducción.

I.1. Absorción del B por las plantas.

I.1.1. Generalidades.

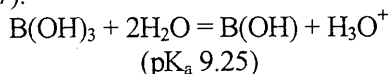
El boro (B) es absorbido de la solución del suelo principalmente como ácido bórico no disociado. Consideraciones teóricas predicen que el ácido bórico no disociado debe de ser permeable a través de la membrana. De acuerdo con esto, recientes investigaciones muestran que la absorción radicular del B se realiza de forma pasiva, y no por medio de procesos metabólicos (Hu y Brown, 1997).

Por lo tanto, y teniendo en cuenta estas consideraciones, la absorción de B es inicialmente determinada por la concentración de B existente en el medio de cultivo, y seguidamente por la razón de transpiración de la planta. Sin embargo, existen investigaciones en las cuales se comprueba que las distintas especies vegetales pueden mostrar diferencias significativas en cuanto a la absorción y acumulación de B, incluso cuando éstas crecen bajo las mismas condiciones ambientales (Hu y Brown, 1997).

I.1.2. Mecanismos de absorción del B.

I.1.2.1. Propiedades del ácido bórico.

El ácido bórico es un ácido muy débil en soluciones acuosas, y su actividad como ácido parece estar relacionada a la aceptación de iones oxidrilo y no a la donación de iones hidroxilo, de acuerdo con la siguiente reacción (Hu y Brown, 1997):



Por lo tanto, en suelos débilmente ácidos o neutros, el B se encuentra principalmente

con ácido bórico no disociado (Raven, 1980).

Otra propiedad del ácido bórico, que también puede influir en su absorción radicular, es la propiedad o habilidad para formar complejos del tipo cis-diol con distintas moléculas orgánicas. Por ejemplo, en apio el B presente en los exudados floemáticos se presenta prácticamente formando complejos B-manitol (Hu et al., 1997).

Existen un gran número de compuestos biológicos que pueden formar complejos con el B, tanto en el citoplasma como en la pared celular. Entre estos compuestos destacar los azúcares y sus derivadas, los fenoles, los ácidos orgánicos y algunos polímeros (Raven, 1980). La formación de complejos entre el B y compuestos como: sorbitol, manitol, glicerol, ribosa, fructosa y nicotiamida-adenina-dinucleotido, son ejemplos que se han podido comprobar en distintos trabajos como los de Loomis y Durst (1992) y Hu et al. (1997). Además de la formación de estos complejos, recientemente se ha caracterizado en la pared celular el complejo B-rhamnogalacturano (Ishii y Matsunaga, 1996).

La presencia de cantidades significativas de complejos de B en la pared celular podría tener un efecto determinante sobre la absorción de B, si ésta dependiera solamente del gradiente de concentración del ácido bórico existente a través de la membrana (Hu y Brown, 1997). En relación a este aspecto, Raven (1980) sugirió que la cantidad de B total en el tejido podría exceder a la cantidad de B libre existente en el medio de cultivo, debido posiblemente a la formación de complejos de B.

I.1.2.2. ¿Es la absorción de B activa o pasiva?

Como describiremos a continuación existe bastante controversia en relación a la naturaleza de la absorción radicular de B, puesto que existen distintas investigaciones que defienden la naturaleza activa de este proceso, mientras que otras defienden la naturaleza pasiva de la absorción del B.

Bingham et al. (1970) realizaron los primeros estudios de absorción de B en raíces de cebada. Con una concentración de B de 0.93 mM y en un periodo de absorción de 4h, Bingham et al. encontraron que la absorción de B mostraba una fuerte dependencia del pH dentro de un rango alcalino. Análisis del efecto del pH sobre la proporción de $B(OH)_3$ y $B(OH)$ en el medio de cultivo reveló que la absorción de B por las raíces de cebada fue principalmente en forma de $B(OH)_3$ independientemente del pH. En un tiempo de estudio de 1 a 24h, estos autores no encontraron ninguna acumulación radicular de B, y además no encontraron una acumulación de B en contra de un gradiente de concentración. Por otro lado, cuando se transferían las raíces a una solución de sulfato cálcico, aproximadamente el 95% del B inicialmente absorbido por las raíces se perdía o era excretado hacia la solución del sulfato cálcico. A pH 6.0., cambios en la temperatura de la solución de 10 a 30 C, cambios en la composición de sales (Ca o K), y variaciones en la adición de KCN o 2,4-dinitrofenol fracasaron en ejercer alguna influencia sobre la absorción de B. Estos resultados, condujeron a Bingham et al. (1970) a concluir que la absorción de B era un proceso no-metabólico que actuaba en respuesta a un gradiente de concentración, además de indicar que la forma del ácido bórico no disociado era

más favorable en la absorción de B.

Wilders y Neales (1971) utilizando tejidos de zanahoria y remolacha sugirieron que la absorción de B era un proceso activo, ya que ésta era inhibida por factores como la anoxia, las bajas temperaturas y la adición de 2,4-dinitrofenol. Por otro lado, el contenido de B en estos tejidos, después de un periodo de absorción en una solución de B de 0.1 mM, era completamente liberado a una solución libre de B sugiriendo este comportamiento la existencia de procesos tipo difusión, es decir pasivos. Por lo tanto, Wilders y Neales (1971) concluyeron que existían dos componentes en la absorción de B: una difusión pasiva de $B(OH)_3$, y un transporte activo del ion $B(OH)$.

Bowen y Nissen (1977) usaron raíces de cebada en estudios de absorción de B bajo periodos cortos de tiempo. Los rangos de concentración que utilizaron fueron de 0.2 a 5 mM, y ellos no encontraron una acumulación de B en contra de un gradiente de concentración después de 5h de absorción. Sin embargo, cuando estos autores estudiaron la absorción de B en función de un rango de concentración externa de 0.05 a 13.3 mM, observaron que los datos resultantes podrían describirse por una serie de fases separadas por saltos, los cuales ocurrían a unas concentraciones de B de 0.16, 0.20, 0.47, 0.55 y 8 mM respectivamente. Basándose en estos resultados, Bowen y Nissen (1977) indicaron que la absorción de B en cebada se producía por un proceso activo, ya que es compatible con el concepto de absorción multifásica. Además, para apoyar estos argumentos, Bowen y Nissen (1977) reportaron que la absorción de B, a partir de una solución externa con una concentración de este micronutriente de 1 mM, era fuertemente dependiente de la temperatura en un rango de 3 a 47 C, y

Los propios autores reconocen que, aunque la correlación entre las estabilidades de los quelatos y sus espectros es evidente, no se puede encontrar una explicación satisfactoria de los hechos experimentales tomando en consideración sólo los factores citados, ya que en la bibliografía existen algunas discrepancias, como la señalada por Freeman y White (30), para los cuales la magnitud de la intensidad de fluorescencia de estos mismos quelatos obliga a aceptar el orden de estabilidad $Al > Ga > In$, que no concuerda con el de Kirby.

Hemos visto hasta aquí que la variación del pH del medio hace variar el grado de formación de los complejos metálicos obtenidos, el orden de estabilidad de los mismos y como consecuencia de la complejación, la tonalidad del color. Los espectros de absorción varían y gracias a esta variación con el pH ha sido posible calcular las constantes de disociación de los colorantes y las de estabilidad de los complejos, según las técnicas espectrofotométricas habituales. Por otro lado, hemos de tener en cuenta el efecto de los puentes de hidrogeno intramoleculares, que ejercen una acción importante sobre los equilibrios protolíticos del grupo hidroxilo en los azocolorantes.

Así, Stamm (31), ha investigado este efecto, observando que los compuestos que poseen un grupo hidroxilo en posición orto respecto al grupo azo presentan una constante de disociación ácida considerablemente menor que los que lo tienen en posición para.

Este hecho se explica satisfactoriamente, aceptando la formación de un puente de hidrogeno entre el grupo OH - en posición orto y un átomo de nitrógeno del grupo azo, puente que no se puede formar en los compuestos para, y que evidentemente dificulta la disociación del grupo OH.

además era inhibida por inhibidores metabólicos incluyendo el 2,4-dinitrofenol, azida, cianuro-sódico, y arsenato, entre otros.

Theillier et al. (1979) condujeron un estudio de flujo de $B(OH)_3$ utilizando isótopos ^{10}B y ^{11}B . Después de un periodo de absorción en una solución de ^{10}B , las plantas fueron transferidas a una solución de ^{11}B o a una solución de agua pura con el fin de determinar la cinética de eflujo. Los resultados sugirieron que existen cuatro compartimentos diferentes en las células en relación al B: espacio libre, citoplasma, vacuola y pared celular. En cada uno de estos compartimentos el contenido en B era mucho mayor que el de la solución externa. Los autores demostraron que estos resultados no se podían interpretar como una evidencia de la existencia de un mecanismo activo en la absorción de B, sino que era atribuido probablemente a la formación de complejos borato mono- o di-ester en los distintos compartimentos celulares.

Usando isótopos estables de B, Brown y Hu (1994) reportaron que la absorción de B era lineal dentro de un rango elevado de concentración de este micronutriente (0-0.2 mM o 0.2-10 mM) en cultivos de células de tabaco y en raíces de girasoles y de calabaza. Además, no encontraron ningún tipo de cinética de saturación en la absorción de B, y ésta no era inhibida ni por la acción de inhibidores metabólicos, ni por bajas ($2^{\circ}C$) y altas ($47^{\circ}C$) temperaturas.

En estas experiencias, la incorporación de ^{11}B durante el pretratamiento no era desplazado por el ^{10}B , sugiriendo que el B puede ser incorporado dentro de ciertos complejos en la célula (Brown y Hu, 1994). Finalmente, Brown y Hu (1994) en estudios sobre el eflujo de B en células de tabaco, encontraron que el eflujo de B se

completaba en 1 min después de haber transferido el cultivo a una solución libre de B. Los autores indicaron que ésta rápida salida de B probablemente representaba al B situado en el apoplasto, por lo tanto concluyeron que la absorción del B es un proceso no metabólico controlado por la formación de complejos de B en el citoplasma y pared celular.

En definitiva, y teniendo en cuenta éstos y otros resultados expuestos en la revisión de Hu y Brown (1997), existen bastantes evidencias que soportan y defienden que los procesos de absorción del B no son metabólicos. Finalmente, Hu y Brown (1997) proponen que la absorción de B puede ser explicada por una difusión pasiva de ácido bórico, seguida de una rápida formación de complejos de B en el citoplasma y en la pared celular. La disminución de ácido bórico libre en la célula por la formación de estos complejos, permitiría una mayor absorción de B desde la solución externa, conllevando a que la concentración de B en los tejidos de la planta exceda a la concentración de este elemento de la solución externa.

I.1.2.3. Factores que afectan a la absorción de B.

La absorción de B por las raíces de las plantas es afectada por varios factores medioambientales, tanto edáficos como no edáficos. Entre los factores edáficos más comunes destacar: el contenido inicial de B, el pH del suelo, el tipo de iones presentes en la solución del suelo, el contenido en materia orgánica, la cantidad y tipo de minerales, y finalmente el contenido hídrico del suelo (Keren et al., 1985).

Entre los factores edáficos, el pH es la variable más determinante en la absorción del B (Gupta, 1979). En general, la

absorción de B disminuye con el incremento del pH edáfico debido principalmente a dos razones. En primer lugar, un valor de pH inferior a 7.0 da lugar a que sea la forma $B(OH)^3$ la que predomine en el medio, siendo la afinidad de la arcilla por esta forma de B muy baja por lo que la cantidad de B adsorbido al suelo es mínima. Cuando el pH aumenta, la forma $B(OH)$ incrementa respecto a la forma $B(OH)_3$, aumentándose también la cantidad de B adsorbido por el suelo, puesto que la arcilla presente en éste muestra una gran afinidad por la forma $B(OH)$ (Keren y Bingham, 1985). En segundo lugar, Oertli y Grgurevic (1975) encontraron que la absorción radicular de B disminuía con el incremento de pH, lo que estaba correlacionado con la disminución de la forma $B(OH)_3$, demostrándose de esta manera que es esta forma del B la más disponible y accesible para las plantas.

En condiciones no edáficas, la transpiración parece ser el factor más determinante en la absorción del B. A través de la transpiración, otros factores como son la humedad relativa, la temperatura y la intensidad luminosa también alteran a la absorción del B (Hu y Brown, 1997). Por ejemplo, Bowen (1972) estudiando las variables que afectaban a la absorción de B en caña de azúcar, encontraron que el incremento de la intensidad luminosa aumentaba la absorción de B, mientras que la disminución de la humedad relativa incrementaba la absorción de B. Similarmente, un incremento de la temperatura aérea conllevaba a un aumento de la absorción del B incluso permaneciendo constante la humedad relativa. Finalmente, y cuando otros factores ambientales fueron constantes, un incremento en la temperatura radicular

daba lugar a un aumento en la absorción del B. Resultados similares a los que acabamos de describir han sido también descritos por Oertli (1994).

Como indicábamos al inicio, todos estos factores que afectan a la absorción del B pueden ser explicados por cambios en la transpiración (Raven, 1980). Por ejemplo, una reducción en la humedad relativa incrementa la transpiración, resultando por lo tanto en un incremento de la absorción de B. Por otro lado, aumentos de la temperatura crean un déficit de vapor de agua, lo que da lugar a incremento de la transpiración, resultando en un aumento proporcional de la absorción de B. La intensidad luminosa muestra un efecto similar que el incremento de la temperatura o la disminución de la humedad, y por lo tanto el resultado es un aumento en la absorción de B.

Sin embargo, los incrementos observados en la absorción del B al aumentar la temperatura radicular no pueden ser explicados a través de la transpiración. En determinados casos no se presentan relaciones simples entre la transpiración y la absorción del B. Por ejemplo, estudios entre genotipos con diferencias en cuanto a su sensibilidad a la toxicidad del B demuestran que la transpiración no es esencial para la absorción (Huang y Graham, 1990).

1.2. Movilidad del B en las plantas.

1.2.1. Generalidades.

La existencia de desordenes nutricionales en relación al B sugieren que, en la mayoría de los casos, la deficiencia de este micronutriente en plantas sea de naturaleza fisiológica implicando a la movilidad de este elemento entre las distintas partes de la planta.

Mientras que existen muy pocas dudas en relación a que el B es translocado vía xilema hacia los lugares de mayor pérdida de agua (fuente), encontramos gran controversia sobre el papel que desempeña el floema en suministrar B a los distintos lugares donde no se produce realmente una pérdida importante de agua (sumidero) (Brown y Shelp, 1997).

I.2.2. Dinámica del B en especies vegetales con baja movilidad del B.

I.2.2.1. Resultados en contra de la retranslocación del B.

Como acabamos de indicar, una vez el B es translocado vía xilema hacia las hojas maduras, éste y según las investigaciones tradicionales es acumulado en estos órganos. Los resultados que indican que el B no es retranslocado vía floema hacia otros órganos de la planta son los siguientes:

(i) una concentración de B en las hojas maduras superior a la del exudado del floema (Shelp et al., 1996),

(ii) los síntomas de deficiencia del B en la parte aérea típicamente ocurren en los tejidos meristemáticos, mientras que los síntomas de toxicidad se muestran inicialmente en los márgenes de las hojas maduras (Marschner, 1995; Oertli, 1994; Shelp et al., 1995),

(iii) en plantas jóvenes de calabaza y tomate, los síntomas de deficiencia de B se desarrollan rápidamente cuando el suministro de éste es interrumpido, lo que nos indica una mínima removilización del B procedente de las hojas maduras (Hu y Brown, 1994).

Estos datos son las bases para considerar al B históricamente como un elemento inmóvil, lo que no excluye la posibilidad de que el este micronutriente pueda ser

retranslocado vía floema (Brown y Shelp, 1997).

I.2.2.2. Resultados a favor de la retranslocación vía floema del B.

Se ha comprobado en distintas experiencias que la concentración de B disminuye acropetamente cuando las plantas crecen bajo niveles de B adecuados. Sin embargo, en plantas deficientes de B, este gradiente desde las hojas maduras a las jóvenes desaparece (Shelp et al., 1992; Marentes et al., 1996).

Shelp y colaboradores, han indicado en distintos trabajos que los cocientes entre las concentraciones de B de los sumideros en desarrollo y las de las hojas maduras eran superiores en plantas limitantes de B, en relación a los obtenidos en plantas con un suministro adecuado de este micronutriente (Shelp et al., 1989; Shelp, 1988; Shelp y Shattuck, 1987a,b).

Las pruebas sobre la retranslocación del B vía floema se deben principalmente a una disminución de la concentración de B en las hojas maduras de distintas plantas, y a la no variación de la concentración de este elemento en distintos frutos cuando las plantas eran sometidas a una deficiencia de B (Campbell et al., 1975; Shelp, 1988; Liu et al., 1993).

I.2.3. Dinámica del B en especies vegetales con elevada movilidad de B.

Recientemente, se ha probado que el B exhibe una rápida y significativa movilidad por el floema en especies en las cuales el sorbitol es el principal producto fotosintético (Brown y Hu, 1996). Estos autores sugieren que el B muestra una elevada movilidad por floema en aquellas especies cuyos productos fotosintéticos principales son el sorbitol, manitol o

dulcitol, debido a que estos polialcoholes pueden formar complejos con el B. Posteriormente, esta hipótesis ha sido verificada por Hu et al. (1997), ya que estos autores han aislado y caracterizado distintos complejos B-polialcoholes en plantas de apio y melocotonero.

I.2.3.1. Distribución de B en los tejidos de las plantas.

Distintas pruebas sobre la movilidad del B por el floema pueden ser encontradas a través de la distribución del B entre los diferentes órganos de la planta. Por ejemplo, en un cultivo de Pistacho las concentraciones más elevadas de B se presentaron en las hojas, mientras que las mínimas se encontraron en los frutos. Por el contrario, en un cultivo de almendros, bajos las misma condiciones que el anterior, las máximas concentraciones de este micronutriente se dieron en el fruto mientras que las mínimas en las hojas (Brown y Shelp, 1997).

La distribución del B en arboles de pistacho nos indica por lo tanto la limitación en la movilidad por el floema de este elemento, mientras que el B es claramente móvil a través del floema en árboles de almendro. Al igual que en ésta última especie, existen otras que por medio del análisis de la distribución del B nos muestran la movilidad de este elemento por el floema, como son: manzano y peral (Crandall et al., 1981), albaricoque (Dye et al., 1983) y olivo (Delgado et al., 1994).

Por otro lado, la concentración de B en hojas de distintas edades también nos puede indicar la movilidad del B. Las mayores concentraciones de B en las hojas maduras en comparación con las mínimas de las hojas jóvenes sugieren la inmovilidad del B, mientras que concentraciones superiores de B en hojas jóvenes indican una movilidad de este

elemento a través del floema (Brown y Shelp, 1997). Por último, si las concentraciones de B en frutos o tejidos apicales son similares a las concentraciones de hojas maduras, esto también es síntoma de una elevada movilidad de B (van Goor y van Lune, 1980).

I.2.3.2. Dependencia de la movilidad del B por el floema.

Brown y Hu (1996) propusieron que la movilidad del B a través del floema depende de la especie vegetal estudiada. Makkee et al. (1985) fueron los primeros investigadores que propusieron que la aparente movilidad del B en distintos arboles frutales, era consecuencia del uso del sorbitol como principal fotosintato translocado por el floema en estas especies.

Para comprobar la hipótesis realizada por estos autores, Brown y Hu (1996) compararon la movilidad del B por el floema entre especies en las cuales el sorbitol es el fotosintato predominante (manzano, almendro y nectarina), y especies en las cuales la síntesis de sorbitol es mínima (pistacho y nogal). En las especies ricas en sorbitol, el ^{10}B aplicado foliamente es rápidamente translocado desde las hojas tratadas a los frutos adyacentes, mientras que en las especies pobres en sorbitol no se encontraron pruebas suficientes de la retranslocación del B en las hojas tratadas, presentándose en estas incrementos de las concentraciones de B del orden de 200 a 500%.

Estos resultados sugieren, según Brown y Hu (1996), que la movilidad floemática del B es independiente de como se aplique este micronutriente al medio de cultivo. Además, estos resultados también

muestran la distribución o retranslocación del B en especies ricas en sorbitol, mientras que en especies pobres en este producto fotosintético este hecho no se produce.

Por lo tanto, el B parece ser móvil a través del floema en todas las especies que utilizan al sorbitol como principal fotosintato en el suministro de carbohidratos hacia los sumideros. Además, también se ha sugerido que el B es móvil por el floema en aquellas especies en las que se forman complejos B-polialcoholes, como B-manitol y B-dulcitol (Brown y Hu, 1996; Hu et al., 1997). Más concretamente, Hu et al. (1997) han caracterizado los posibles complejos solubles de B con distintos polialcoholes, explicando así el mecanismo de la movilidad del B a través del floema en especies como apio y melocotonero. En apio, el principal complejo es manitol-B-manitol, mientras que en árboles de melocotón los complejos que se presentan son sorbitol-B-sorbitol, fructosa-B-fructosa o sorbitol-B-fructosa.

I.2.3.3. Distribución de los polialcoholes en plantas superiores.

Dentro de los polialcoholes, el sorbitol es característico de la familia Rosácea, incluyendo géneros con gran importancia económica como *Malus*, *Pyrus* y *Prunus*, donde la cantidad de este polialcohol corresponde al 60-90% del carbón total exportado por las hojas (Loescher, 1987). El manitol se encuentra en importantes miembros de las familias Scrophulariaceae, Apiaceae, Rubiaceae y Oleaceae (Boune, 1958), mientras que el dulcitol se presenta en algunas especies de las familias Lauraceae y Celastraceae (Boune, 1958).

Por otro lado, distintas investigaciones

indican que la producción de estos polialcoholes puede ser afectada por factores medioambientales y fenológicos, lo que conllevaría también una variación en la movilidad del B por el floema. Delgado et al. (1994) sugiere que el B aplicado foliarmente a olivos es retranslocado de las hojas solamente en determinados periodos del año. Esto puede ser interpretado por medio de que el manitol no siempre es el principal fotosintato sintetizado y utilizado en los procesos de translocación, o que el manitol en el olivo puede ser convertido a otro azúcar para ser cargado en el floema. Recientemente, se ha demostrado que la staquiosa, y no el manitol, es el principal fotosintato translocado por el floema en el olivo (Flora y Madore, 1993).

I.3. Estudio de la relación B-pectinas.

Inicialmente, Schmucker (1933, 1934) sugirió la existencia de una cerrada relación entre el B y las pectinas en tubos polínicos en crecimiento. Investigaciones posteriores realizadas por Matoh et al. (1992) y por Hu y Brown (1994), en plantas de calabaza y de tabaco, confirman las primeras conclusiones de Schmucker indicando que bajo condiciones limitantes de B, éste representa en la pared celular el 95-98% del B celular encontrándose la mayoría de este micronutriente asociado a pectinas.

Uno de los papeles que se le atribuyen a los complejos de la pared celular B-pectinas es el de justificar las diferencias en los requerimientos de este micronutriente entre las distintas especies vegetales (Tanaka, 1967; Loomis y Durst, 1992; Matoh, 1997). Por ejemplo, generalmente las plantas monocotiledoneas contienen pequeñas cantidades de pectinas en la pared celular

(Darvill et al., 1980), y por lo tanto esto podría explicar sus bajos requerimientos en B (3-10 $\mu\text{g B p.s.}$) (Jones et al., 1991). Por el contrario, las dicotiledoneas se caracterizan por presentar grandes contenidos de polisacaridos pectínicos (Darvill et al., 1980), y por requerir cantidades de B superiores a las de las monocotiledoneas (20-50 $\mu\text{g B p.s.}$) (Jones et al., 1991).

La relación entre las pectinas de la pared celular y la concentración de B, fue inicialmente descrita por Yamauchi (1971), el cual encontró una relación positiva entre el B y las protopectinas (pectinas insolubles en agua) en 33 especies. Gran parte de las investigaciones a este respecto sugieren que la formación de complejos de B en la pared celular de las plantas influyen de forma significativa en la absorción radicular de este elemento (Shelp, 1993; Brown y Hu, 1994; Hu y Brown, 1997). Además, se ha observado diferencias en el cociente entre la cantidad soluble de B y la insoluble en numerosas especies, disminuyendo la fracción soluble de B drásticamente cuando las plantas son deficientes en este micronutriente (McIlrath, 1965). Estos resultados indican que la formación de complejos insolubles de B esta asociado con la expresión de los síntomas característicos de la deficiencia de B. Finalmente, tanto los resultados de Matoh et al. (1993) como los de Hu y Brown (1994) muestran que la principal forma de B insoluble en las plantas es el complejo B-pectinas.

Todas estas relaciones entre el B y las pectinas de la pared celular, así como las funciones atribuidas a los complejos B-pectinas han sido verificadas en el trabajo de Hu et al. (1996). En este trabajo se analizo la correlación entre el B y el contenidos en pectinas en 40 especies con distintos requerimientos de este

micronutriente crecidas bajo condiciones óptimas y deficientes en B. Los resultados de este trabajo muestran una correlación significativa y positiva entre el B y el contenido en pectinas en todas las especies estudiadas. Por otro lado, estos autores concluyen indicando que la deficiencia de B no altera el metabolismo de las pectinas, pero sin embargo conlleva a una disminución drástica de la fracción B soluble mientras que incrementa la fracción de B insoluble o asociada a las pectinas de la pared celular. Finalmente, Hu et al. (1996) demuestra que: (i) las especies con altos contenidos en pectinas requieren una mayor cantidad de B para la formación de la pared celular, y que (ii) las pectinas forman complejos con el B reduciéndose la disponibilidad de este micronutriente para ejercer funciones metabólicas en las plantas.

1.4. El Ca en las plantas.

1.4.1. Generalidades.

El calcio (Ca) como catión divalente estabiliza las biomembranas, influyendo tanto en sus propiedades fisico-químicas como en sus funciones. La importancia del Ca en las membranas se refleja, por ejemplo, en una mayor salida de solutos de bajo peso molecular en aquellas raíces deficientes en Ca, además de producirse una disminución de la selectividad en la absorción iónica cuando esta ausente este nutriente en la solución externa (Matsumoto, 1988).

En cuanto a la absorción del Ca, ésta es predominante en las zonas apicales de las raíces en relación a la que se produce en la zona basal (Haüssling et al., 1988). La regulación tanto de la absorción como de la distribución celular del Ca es esencial para el crecimiento y desarrollo de las

plantas, por lo que la regulación celular del Ca ha sido recientemente sujeta a varias revisiones (Bush, 1993; Chanson, 1993; Bush, 1995).

La concentración de Ca en el citoplasma es extremadamente baja, y además se mantiene en un rango de 0.1-0.2 μM (Evans et al., 1991). El mantenimiento de estas bajas concentraciones de Ca en el citoplasma son esenciales por varias razones: (i) prevención de la precipitación de Pi (ii) y de la existencia de competencia con el Mg, y (iii) prerequisite para que el Ca actúe como mensajero secundario (Evans et al., 1991; Marschner, 1995). Un ejemplo de la importancia del mantenimiento del bajo nivel de Ca citoplasmático los podemos observar en la actividad de ciertas enzimas. La enzima citoplasmática fructosa-1,6-bisfosfatasa, que regula la síntesis de sacarosa, es influenciada por la concentración de Ca en el citoplasma, ya que una concentración de 1 μM inhibe la actividad de esta enzima incluso en presencia de concentración de Mg cien veces superiores a las de Ca (Marschner, 1995).

La función del Ca como segundo mensajero esta basada en la baja concentración de Ca libre citoplasmático (Trewavas y Gilroy, 1991). Señales medioambientales pueden activar la entrada de Ca, y por lo tanto incrementar la concentración de Ca libre en el citoplasma. Estos incrementos de Ca en el citoplasma son inducidos por ejemplo por el ácido abscísico (Tester, 1990), por el ácido indolacético (Felle, 1988), por la luz (Roblin et al., 1989), por la infección de patógenos (Atkinson et al., 1990), y por distintos tipos de estrés (Rincon y Hauson, 1986). Posiblemente, muchas de estas señales medioambientales inducen una despolarización de la membrana plasmática activando de esta forma los

canales de Ca e incrementándose por lo tanto la concentración de Ca libre (Minorsky y Spanswick, 1989).

En el citoplasma la acción del Ca como segundo mensajero, cuando aumenta su concentración en el citoplasma, se realiza bien directamente por la estimulación de kinasas, las cuales fosforilan a otras enzimas (Roberts y Harmon, 1992), o bien de forma indirecta por la unión del Ca a proteínas llamada calmodulinas (Roberts y Harmon, 1992). La unión del Ca a las calmodulinas da lugar a un cambio en la conformación y actividad de éstas, produciéndose la activación de un gran número de enzimas (NAD kinasas, Ca-ATPasa...) que son dependientes de la calmodulina.

Finalmente, la regulación del bajo nivel citoplasmático de Ca se debe a distintos transportadores de membrana, los cuales bien introducen Ca al citoplasma o a distintos órganos celulares, o bien lo excretan al espacio intercelular (Evans et al., 1991).

I.4.2. Transportadores que intervienen en la entrada hacia el citoplasma del Ca.

La principal ruta de entrada de Ca a las células se realiza a través de los llamados "canales de Ca" (Bush, 1995). La rapidez de la entrada de Ca por estos canales, junto con los sensores de éstos que determina el estado de apertura o cierre, permiten el control sobre la cinética de entrada de Ca (Hille, 1992). Los canales de Ca en las células animales son muy diversos, tanto en su localización intracelular como en los estímulos que conducen a la apertura o cierre de los mismos (Tsien y Tsien, 1990).

Considerando las condiciones que determinan la apertura o cierre de los canales se reconocen 5 clases de canales de Ca (Tsien y Tsien, 1990). Tres de estos

canales - "voltage-operated canals", "second-messenger operated canals", y "stretch-operated canals" - han sido identificados en las plantas. Como sus nombre indican, la apertura de estos canales depende de estímulos eléctricos, de la concentración de IP_3 , y de las tensiones de la membrana, respectivamente. Por lo tanto, la entrada de Ca al citoplasma podría ser inducida por un rango de estímulos que afectan a la polarización de la membrana, actividad fosfolipasa o cambios de turgor (Bush, 1993).

Por otro lado, en la membrana plasmática se ha comprobado que la entrada de Ca se puede producir por canales no selectivos, y a través de canales de K (Schroeder y Hagiwara, 1990; Fairley-Grenot y Assmann, 1992). Éstas son posiblemente unas de las principales rutas de entrada de Ca por medio de la membrana plasmática, puesto que se ha comprobado que tanto el K como el Ca extracelular muestran un efecto antagónico sobre el Ca citoplasmático (Felle, 1991).

I.4.3. Transportadores que intervienen en la salida del Ca del citoplasma.

La actividad de los transportadores de Ca que catalizan la salida de este catión desde el citoplasma ha sido caracterizada en distintas membranas celulares, y en distintos tipos de células. Se han encontrado tres tipos de transportadores que difieren en su localización intracelular, así como en el tipo de energía utilizada en la realización del transporte (Evans et al., 1991; Bush, 1993; Chanson, 1993; Bush, 1995). Los tres tipos de transportadores son los siguientes: (i) P-ATPasa (llamadas también Ca-ATPasa, EC 3.6.1.38) localizadas en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático, y posiblemente también en la membrana del

cloroplasto; (ii) transportadores Ca/nH (V-ATPasa EC 3.6.1.3, y H-ATPasa EC 3.6.1.1) localizados principalmente en el tonoplasto, los cuales introducen Ca citoplasmático a la vacuola a través de la salida hacia el citoplasma de H^+ ; y finalmente (iii) canales asociados al cloroplasto y posiblemente a la membrana mitocondrial. Aunque la mayoría de las células de las plantas probablemente contienen estos tipos de transportadores de Ca, pueden diferenciarse en relación a la abundancia de cada tipo de transportador

Entre estos transportadores, Ca-ATPasas muestran la mayor afinidad al Ca produciendo su extrusión directa desde el citoplasma al espacio intercelular, o bien al retículo endoplasmático (Evans et al., 1991). Debido a la afinidad por el Ca de estos transportadores han sido propuestos como principales responsables en la regulación del Ca citoplasmático (Evans et al., 1991). Sin embargo, se ha comprobado que el resto de transportadores, con menor afinidad al Ca, pueden jugar un papel esencial en el control del Ca citoplasmático durante periodos o situaciones donde el Ca citoplasmático incrementa (Miller et al., 1990; Felle, 1991).

Estudios realizados con el propósito de diferenciar bioquímicamente a los distintos tipos de Ca-ATPasas han mostrado que difieren en su estimulación por lípidos, cationes o calmodulina, y además por su sensibilidad a ser inhibidos por el vanadato o por el eritrosin B (Evans et al., 1991). Por ejemplo, en células de zanahoria existen dos tipos de Ca-ATPasa en la membrana del retículo endoplasmático: una es estimulada por la calmodulina mientras que la otra muestra un comportamiento contrario (Hsieh et al., 1991).

I.4.4. Distribución del Ca celular.

Elevados gradientes electroquímicos para el Ca podemos encontrar a través de la membrana plasmática, tonoplasto, y posiblemente en el retículo endoplasmático. Los gradientes que se generan a través de estos orgánulos permanecen generalmente estables. Por el contrario, gradientes más bajos parecen existir entre el citoplasma, plastos y mitocondrias (Bush, 1995), aunque estos últimos pueden variar durante las actividades fotosintéticas (Miller y Sanders, 1987) y respiratorias (Rizzuto et al., 1992) de la célula. Los gradientes o niveles del Ca citoplasmático son importantes para el funcionamiento normal de la célula, tanto a nivel de transducción como a nivel de procesos metabólicos.

I.4.4.1. Membrana plasmática.

Los mayores gradientes para el Ca normalmente existen a través de la membrana plasmática. En células no estimuladas, el Ca citoplasmático es mantenido a 10^{-7} M, mientras que los niveles de Ca apoplástico son generalmente del orden de 10^{-4} a 10^{-3} (Bjorkman y Cleland, 1991; Harker y Venis, 1991). Sin embargo, el Ca extracelular y el citosólico están en equilibrio debido a que elevadas concentraciones de éste último están unidos a polisacaridos, lípidos, y proteínas de las membranas (Harker y Venis, 1991).

I.4.4.2. Vacuola.

Los distintos estudios que se han realizado recientemente no han modificado la visión de que la vacuola es el principal orgánulo de almacenamiento del Ca (Reid

y Smith, 1992; Bush, 1995), siendo la concentración vacuolar de Ca aproximadamente de 10^{-3} M.

La gran mayoría del Ca que atraviesa por la membrana plasmática pasa posteriormente por la membrana tonoplastica hacia la vacuola, incluso en células no estimuladas (Reid y Smith, 1992).

I.4.4.3. Retículo endoplasmático.

El retículo endoplasmático, al igual que la vacuola, es un orgánulo donde se acumula gran cantidad de Ca, siendo la concentración aproximadamente de 3 a 4 μ M (Bush et al., 1989; Bush, 1995). El mantenimiento de la concentración de Ca en este orgánulo parece ser que se debe a un equilibrio entre los procesos de salida y los de entrada de Ca.

I.4.4.4. Plastos y Mitocondrias.

Los cloroplastos y las mitocondrias contienen concentraciones milimolares de Ca, estando la mayoría de éste unido con fosfatos o lípidos de membrana (Kreimer et al., 1988; Bush, 1995). Un incremento en la concentración de Ca en los cloroplastos y en las mitocondrias se produce como resultado de la fotosíntesis (Kreimer et al., 1988) y de la respiración (Dieter y Marmé, 1983).

I.4.4.5. Núcleo.

Los niveles de Ca en el núcleo son similares a los del citoplasma debido posiblemente a que los poros nucleares permiten la difusión del Ca (Bachs et al., 1992). Sin embargo, recientemente se ha indicado la posibilidad de que la regulación del Ca nuclear se deba a la actuación de bombas de Ca y de IP_3 (Bachs et al., 1992).

I.4.5. Movilidad del Ca en las plantas.

Después de la absorción radicular o entrada de Ca a las células apicales radiculares se produce el transporte radial de este catión principalmente a través de la ruta simplástica, produciéndose posteriormente su liberación al xilema (Marschner, 1995). En el caso concreto del Ca, frecuentemente existe una estrecha correlación entre la distribución del Ca y la razón de transpiración en las distintas partes de la parte aérea de la planta. Por ejemplo, se encuentran normalmente bajas concentraciones de Ca en órganos como los frutos (< 0.3%) con baja transpiración, en comparación con las concentraciones existentes en las hojas de la misma planta (3-5%) (Marschner, 1995).

Por otro lado, algunos trabajos ponen de manifiesto que el Ca se encuentra de forma mayoritaria en la parte aérea, y más específicamente en las hojas maduras en relación al nivel inferior existente en las raíces (Ganmore-Neuman y Davidov, 1993; Bharti et al., 1996; Ruiz et al., 1999).

Con respecto a su movilidad por el floema, existe una clasificación tradicional que define a los distintos nutrientes como móviles, de movilidad intermedia y de baja movilidad o inmóviles por el floema, perteneciendo el Ca a este último grupo (Jeschke y Pate, 1991; Marschner, 1995).

I.4.6. Estudio de la relación Ca-Pectinas.

En las hojas de las plantas que reciben altos niveles de Ca durante el crecimiento, existe una elevada proporción de este elemento que se encuentra unido a las pectinas como pectato cálcico. La unión de Ca a las pectinas es esencial para la resistencia de la pared celular y de los distintos tejidos de la planta (Marschner,

1995; Rihouey et al., 1995). El Ca es considerado como un factor determinante en la regulación de la hidrólisis de la pared celular, ya que controla la actividad de ciertas enzimas, tales como la poligalacturonasa, de tal forma que en tejidos deficientes en Ca la actividad poligalacturonasa incrementa produciéndose la desintegración de la pared celular (Rushing y Huber, 1990).

Por otro lado, Jauneau et al. (1994) mostró que la unión de Ca a las pectinas reduce la actividad poligalacturonasa en la pared celular. La explicación a este hecho se basa en que el Ca al unirse a las pectinas reduce o disminuye el acceso a la pared celular de estas enzimas hidrolíticas.

I.5. Generalidades sobre la interacción B-Ca.

El B parece jugar un papel importante en el transporte de nutrientes a través de la membrana plasmática. Por ejemplo, los primeros trabajos pusieron de manifiesto que la deficiencia de B reducía la absorción de P en *Vicia faba* (Robertson y Loughman, 1974) y en *Helianthus annuus* (Godbach, 1985), además de reducir también la absorción de Mn y Zn en plantas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Ohki, 1975). En cebada (*Hordeum vulgare* L.) la aplicación de B en el suelo incremento las concentraciones de N y Na, pero redujo a su vez las de los cationes Ca y Mg (Singh y Singh, 1984). Por el contrario, en plantas de alfalfa el suministro de B al suelo no afecto a las concentraciones de Ca y Mg en los distintos tejidos de la planta (Singh y Singh, 1984). Por otro lado, un análisis de los niveles foliares de nutrientes en caña de azúcar mostró que los niveles de B eran correlacionados positivamente con los de Ca (Bowen, 1981). Finalmente, Yamauchi

(1986) indicó que la deficiencia de B inducía a una disminución de la cantidad de Ca asociado a las pectinas en hojas de tomate.

Con respecto al efecto del Ca sobre el B, elevadas concentraciones edáficas de este catión conllevan a una deficiencia de B, inducida posiblemente por un aumento del pH edáfico producido por el CaSO_4 , y no por la acción directa del Ca (Gupta, 1979; Gupta y Macleod, 1981).

Como acabamos de describir, existe bastante controversia en cuanto a la relación B-Ca. Incluso entre la misma planta, Mozafar (1989) observó un sinergismo entre el B y el Ca en la parte aérea y un antagonismo en la raíz. Estudios más recientes en rosales, nos muestran que el aumento de la concentración de B en la solución nutritiva favorecen tanto la absorción como la translocación de Ca hacia la parte aérea, produciéndose por lo tanto un incremento foliar de la concentración de Ca (Ganmore-Neumann y Davidov, 1993).

Similares resultados a los anteriores han sido descritos por Bonilla et al. (1995) en cianobacterias *Anabaena* y *Synechococcus*, donde además de verse favorecida la absorción de Ca por el B, éste último era requerido para el crecimiento normal de la cianobacterias bajo unas condiciones de cultivo con mínimos niveles de Ca. Finalmente, Mühling et al. (1998) observaron como el Ca apoplástico incrementaba del orden de 3 veces en raíces de *Vicia faba*, transcurridos solamente 20 min después de haber transferido las plantas a una solución nutritiva sin B. Por el contrario, la adición de B (10 μM) inhibía el incremento del Ca apoplástico en segundos. Este trabajo, y al igual que el de Goldbach et al. (1991), sugieren que la deficiencia de B reduce la unión de Ca a la membrana plasmática, ya

que los lugares de unión de Ca a la membrana son complejos formados por ésteres de B con compuestos polihidroxi. En definitiva, estos trabajos achacan los efectos de la deficiencia del B al deterioro de la integridad de la membrana plasmática.

II. Objetivos.

Los objetivos de este capítulo fueron comprobar los efectos que ejercen los distintos tratamientos de B y de Ca y su interacción sobre:

(i) la distribución y concentración de estos elementos, así como intentar determinar por medio de estos parámetros la influencia de los distintos tratamientos sobre su absorción,

(ii) la caracterización y concentración de pectinas tanto en raíces como en hojas de plantas de tabaco,

(iii) y finalmente, sobre las concentraciones de B y Ca ligadas a pectinas, dada la característica común que muestran estos nutrientes en relación a su unión o la formación de complejos con las pectinas.

III. Material y métodos.

III.1. Diseño experimental.

Semillas de *Nicotina tabacum* var. Tennessee 86 fueron germinadas en los semilleros Saliplant S.A. (Carchuna, Granada). Las plántulas crecieron en semilleros formados por 250 células (3x3x6) rellenas cada una de una mezcla de turba y perlita, y distribuyéndose una plántula por célula. Las plántulas permanecieron en el semillero durante un periodo de 45 días.

Tras este periodo de tiempo, las plántulas fueron transferidas a una cámara de cultivo del Departamento de Biología Vegetal (Facultad de Ciencias, Universidad de Granada). Las condiciones ambientales en la cámara de cultivo fueron controladas con una humedad relativa del 60-80%, temperatura 30-20°C (día-noche), y fotoperiodo de 16-8 h (día-noche). Las plantas crecieron en macetas individuales (7 cm de diámetro superior y 32 cm de altura) de un volumen de 1.25 L rellenas completamente de vermiculita. Durante un mes (desde el día 45 después de la germinación hasta el día 75) y antes de iniciar los tratamientos experimentales, todas las plantas recibieron la siguiente solución nutritiva: 6 mM KNO₃, 2 mM NaH₂PO₄, 1.25 mM CaCl₂ 2H₂O, 1.25 mM MgSO₄, 5 µM Fe-EDDHA, 2 µM MnSO₄ H₂O, 1 µM ZnSO₄ 7H₂O, 0.25 µM CuSO₄ 5H₂O, 0.1 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O, y 5 µM H₃BO₃. La solución nutritiva fue renovada cada 3 días, desechándose la solución sobrante y lavando la vermiculita de cada maceta por medio de la adición de agua bidestilada (Millipore RX-21). El pH de la solución nutritiva durante los 3 días vario mínimamente, estando siempre comprendida en el rango de 5.5-6.0.

A los 75 días después de la germinación, se

aplicaron las distintas combinaciones de B y Ca, dando lugar a 9 tratamientos resultado de combinar 3 dosis de B (B₁: 5 µM H₃BO₃; B₂: 10 µM H₃BO₃; B₃: 20 µM H₃BO₃) con 3 dosis de Ca (Ca₁: 1.25 mM CaCl₂ 2H₂O; Ca₂: 2.5 mM CaCl₂ 2H₂O; Ca₃: 5 mM CaCl₂ 2H₂O). El diseño experimental consistió en la distribución al azar de los distintos tratamientos y de sus repeticiones. Cada tratamiento presentaba 3 repeticiones con 6 plantas tratadas por repetición.

III.2. Muestreo de las plantas.

Se realizaron dos muestreos, muestreando al azar 3 plantas de cada repetición en cada uno de los muestreos. El primer muestreo se realizó a los 105 días después de la germinación, donde todas las plantas habían sobrepasado el estado foliar 20 (> 20 nodos). El segundo muestreo se realizó a los 120 d después de la germinación y las plantas habían sobrepasado el estado foliar 25 (> 25 nodos). Las hojas que se utilizaron para los análisis en el primer muestreo fueron las correspondientes a los nodos comprendidos entre el 15 y 18, mientras que en el segundo muestreo se utilizaron las comprendidas entre el nodo 19 y el nodo 22. Todas estas hojas presentaron una longitud superior a 10 cm, siendo todas ellas hojas maduras (McDaniel, 1996). Según este autor, en *Nicotiana tabacum* las hojas comprendidas entre los nodos 15 y 25 generalmente son hojas maduras si muestran una longitud superior a 10 cm, además de representar a la fase de madurez de la planta ya que son éstas las que determinan el comienzo de la fase de floración (McDaniel, 1996).

Una vez muestreado el material vegetal, tanto hojas como raíces, éste fue lavado tres veces con agua bidestilada (Millipore

RX-21) tras haber sido limpiado el material vegetal previamente con un detergente no iónico al 1% (Wolf, 1982). Tras la limpieza del material vegetal, éste fue dividido en 2 submuestras: una de ellas considerada como "material fresco" en la cual se realizó los análisis principalmente de las actividades enzimáticas, y la otra considerada como "material seco" que fue transferida a una estufa de aire forzado a 70°C durante 24 h, y tras su molienda fue guardada en bolsas de plástico para el posterior análisis principalmente de los nutrientes.

III.3. Análisis de las plantas.

III.3.1. Determinación del B y del Ca en sus formas totales.

Una cantidad de material seco y molido (0.15 g) fue sometida a una mineralización con H_2SO_4 12N y H_2O_2 al 30% libre de P (Wolf, 1982). Del mineralizado resultante, y tras la adición de 20-ml de H_2O bidestilada (Millipore RX-21), se tomó una alícuota para determinar el B y el Ca en sus formas totales.

En la determinación del B total se siguió el método de la azometina- H^+ propuesto por Wolf (1974). A 0.5-ml del mineralizado se le añadió 1-ml de solución enmascarante [Acetato Amónico (650 mM) + Ácido Acético al 99% (12.5% (v/v) + EDTA (35 mM) + Ácido Tioglicólico (0.6% v/v)] y 0.5-ml de solución de azometina [Azometina- H^+ (21.2 mM) + Ácido Ascorbico (113 mM)]. La mezcla se agitó y transcurridas 2h se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de A_{410} , frente a una curva patrón de B (0-10 ppm de B). La concentración de B fue expresada como $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.

El Ca total fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica

(Hocking y Pate, 1977). El Ca puede formar compuestos difícilmente atomizables en la llama, pudiendo estar sujeta su determinación a errores por la formación de compuestos refractarios. La adición de lantano, usando una llama de aire-acetileno, subsana este inconveniente y permite una medida exacta del Ca (Pinta, 1973). Por lo tanto, a 0.1-ml del mineralizado se le añadió 10-ml de una solución de lantano al 0.003%, y el Ca fue determinado como indicábamos anteriormente. La concentración de Ca total fue expresada como mg g^{-1} p.s.

III.3.2. Determinación del B y del Ca en sus formas disponibles o solubles.

La concentración de B disponible se cuantificó a partir de una extracción del material seco y molido (0.2 g) en 10-ml de HCl 1N. Del extracto resultante se tomó 0.1-ml de alícuota y se determinó el B mediante el método explicado anteriormente, propuesto por Wolf (1974). La concentración de B disponible fue expresada como $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.

El Ca en su forma disponible fue analizado a partir de una extracción acuosa de 0.2 g de material seco y molido en 10-ml de agua bidestilada (Millipore RX-21). El Ca disponible fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1974), siguiendo el método descrito para la forma total. La concentración de Ca disponible fue expresada como mg g^{-1} p.s.

III.3.3. Determinación de las concentraciones de pectinas.

El método utilizado en la extracción de las pectinas fue el propuesto por Malis-Arad et al. (1983) y por Roe y Bruenmer (1981). A 0.5 g de material vegetal seco y

molido se le añadió 2.5-ml de etanol al 96%, y tras su agitación se centrifugo a 7000 rpm durante 10 min. El sobrenadante resultante (S1) se paso a tubos de centrifuga, mientras que el residuo (R1) obtenido tras la primera centrifugación se le volvió a añadir 2.5-ml de etanol al 96%. Esta última mezcla (R1+etanol) se centrifugo a 7000 rpm durante 10 min. Seguidamente, el sobrenadante resultante de ésta última centrifugación (S2) se mezcló con el S1, desechándose el residuo resultante de ésta centrifugación (R2). La unión S1+S2 es donde se encuentran las pectinas totales, y a partir del cual se realizo la determinación de pectinas de las diferentes fracciones:

- Pectinas solubles en agua. A la mezcla resultante de S1+S2 se la adiciono 1-ml de agua bidestilada (Millipore RX-21), y tras una centrifugación a 7000 rpm durante 10 min, en el sobrenadante resultante se cuantifico las pectinas contenidas en esta fracción.

- Pectinas solubles en oxalato amónico. Al residuo obtenido de la centrifugación anterior se la añadieron 5-ml de oxalato amónico al 0.75% (p/v). Tras una centrifugación a 7000 rpm durante 10 min, en el sobrenadante resultante se cuantifico la concentración de pectinas correspondiente a esta fracción.

- Pectinas solubles en hidróxido sódico. Finalmente, al residuo de la centrifugación anterior se le añadió 5-ml de NaOH 0.05N, y se centrifugo a 7000 rpm durante 10 min, realizándose la cuantificación de las pectinas de esta fracción en el sobrenadante resultante.

La cuantificación de las pectinas en sus distintas fracciones se realizo utilizando el método propuesto por Rouse y Atkins (1955). Un volumen de 0.25-ml de alícuota procedente de cada sobrenadante se le añadió 0.25-ml de agua bidestilada

(Millipore RX-21) y 5-ml de H₂SO₄ al 96%. Esta mezcla se agito y seguidamente se incubo durante 10 min en un baño de agua a 50 C.

Una vez enfriada la mezcla se adiciono 0.5-ml de carbazol al 0.15% (p/v) (0.15 g/100-ml de etanol al 96%), y se realizo la lectura pasados 20 min a una longitud de onda de A₅₄₅, frente a una curva patrón de ácido galacturónico. La concentración de pectinas, tanto en las distintas fracciones como en su forma total (resultante de la suma de las concentraciones de pectinas en las distintas fracciones), fue expresada como µg de ácido galacturónico g⁻¹ p.s.

III.3.4. Determinación de B y Ca en las distintas fracciones de pectinas.

De los sobrenadantes a partir de los cuales se cuantifica las distintas fracciones de pectinas, se tomo 3-ml de alícuota y se realizo su secado a 300 C. El residuo obtenido se sometió a un proceso de mineralización con 1-ml de H₂SO₄ 12N y H₂O₂ al 30% libre de P (Wolf, 1982).

Del mineralizado (1-ml de H₂SO₄ 12N + 4-ml H₂O) de cada fracción se determino el B siguiendo la metodología de Wolf (1974), y el Ca por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977). La concentración de B en cada fracción de pectinas fue expresada como µg g⁻¹ p.s., y la de Ca como mg g⁻¹ p.s.

III.4. Análisis estadístico.

Se utilizo un análisis múltiple de varianza, con el fin de determinar sobre las variables dependientes los efectos tanto individuales del B y del Ca como el de la interacción BCa. Los datos mostrados corresponden a las medias obtenidas entre los dos muestreos, siendo n = 6. Las diferencias entre tratamientos se

compararon utilizando el Test de LSD a un nivel de probabilidad de 0.05. Cuando fue necesario se realizo un análisis de regresión simple con el fin de determinar las relaciones entre las variables estudiadas. Los niveles de significación son representados como $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), y $P > 0.05$ (ns, no significativo).

IV. Resultados.

En raíces, las concentraciones de B total y B disponible fueron afectadas significativamente por los efectos individuales tanto del B como del Ca. El incremento en la aplicación de B dio lugar a un aumento proporcional tanto del B total ($P < 0.001$; $F = 124.5$) como del B soluble ($P < 0.001$; $F = 41.19$), presentándose las máximas concentraciones en el tratamiento B3 (Tabla 1a). En cuanto al efecto individual del Ca, este fue contrario al que produjo el B, puesto que el incremento en los tratamientos de Ca conllevó a disminuciones en las concentraciones de B total ($P < 0.001$; $F = 289.10$) y disponible ($P < 0.001$; $F = 377.26$), encontrándose las mínimas concentraciones en Ca3 (Tabla 1a).

TABLA 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de sus formas totales y disponibles.

	Bt	Bd	Cat	Cad
B ₁	38.1	2.55	11.6	2.01
B ₂	44.0	2.76	16.6	2.27
B ₃	54.4	3.03	20.1	2.98
LSD	1.11	0.08	0.73	0.10
Ca ₁	59.1	3.53	12.0	1.63
Ca ₂	43.2	2.71	15.3	2.17
Ca ₃	34.2	2.09	21.0	3.46
LSD	1.11	0.08	0.73	0.10

B total (Bt) y disponible (Bd) en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.
 Ca total (Cat) y disponible (Cad) en mg g^{-1} p.s.

En relación a la interacción BCa, esta no se produjo en el B total ($P > 0.05$; $F = 5.41$), predominando los efectos individuales del B y del Ca (Tablas 1b y 1c). Por el contrario, y en el B disponible ($P < 0.05$; $F = 13.99$), la interacción que se produjo fue del Ca sobre el efecto individual del B. En este caso, cuando los distintos tratamientos de B se aplicaron con la dosis Ca3 no se

reflejo el efecto individual del B sobre el B disponible (Tabla 1b). Finalmente, el B no influyó estadísticamente sobre el efecto individual del Ca (Tabla 1c).

TABLA 1b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de B y Ca en sus formas totales y disponibles: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Bt	Bd	Cat	Cad
Ca ₁ B ₁	48.9	3.10	7.38	1.27
B ₂	58.6	3.43	13.2	1.56
B ₃	69.8	4.07	15.6	2.05
Ca ₂ B ₁	35.5	2.48	10.9	1.78
B ₂	40.5	2.77	15.6	1.96
B ₃	53.7	2.89	19.4	2.78
Ca ₃ B ₁	29.8	2.07	16.6	2.99
B ₂	32.9	2.07	21.1	3.28
B ₃	39.8	2.12	25.4	4.10
LSD	2.67	0.11	1.26	0.17

B total (Bt) y disponible (Bd) en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.
 Ca total (Cat) y disponible (Cad) en mg g^{-1} p.s.

Con respecto a las concentraciones de Ca total y disponible en las raíces, el aumento en la aplicación de B supuso un incremento proporcional en las concentraciones de ambas formas de Ca (Ca total, $P < 0.001$, $F = 276.59$; Ca disponible, $P < 0.001$, $F = 180.02$), presentándose las máximas concentraciones en B3 (Tabla 1a). El efecto del Ca fue similar al de B, incrementando proporcionalmente las concentraciones radiculares de Ca total ($P < 0.001$; $F = 318.23$) y Ca disponible ($P < 0.001$; $F = 696.67$) (Tabla 1a).

En cuanto a la interacción BCa, no se reflejo ningún tipo de interacción ni en el Ca total ($P > 0.05$; $F = 1.28$) ni en el Ca disponible ($P > 0.05$; $F = 4.49$), predominando los efectos individuales descritos anteriormente (Tablas 1b y 1c).

TABLA 1c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de B y Ca en sus formas totales y disponibles: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Bt	Bd	Cat	Cad
B ₁ Ca ₁	48.9	3.10	7.38	1.27
Ca ₂	35.5	2.48	10.9	1.78
Ca ₃	29.8	2.07	16.6	2.99
B ₂ Ca ₁	58.6	3.43	13.2	1.56
Ca ₂	40.5	2.77	15.6	1.96
Ca ₃	32.9	2.07	21.1	3.28
B ₃ Ca ₁	69.8	4.07	15.6	2.05
Ca ₂	53.7	2.89	19.4	2.78
Ca ₃	39.8	2.12	25.4	4.10
LSD	2.67	0.11	1.26	0.17

B total (Bt) y disponible (Bd) en µg g⁻¹ p.s.

Ca total (Cat) y disponible (Cad) en mg g⁻¹ p.s.

En las tablas 2, están representados los contenidos radiculares de las distintas fracciones de pectinas (solubles en agua, solubles en hidróxido sódico y solubles en oxalato amónico), al igual que el contenido total resultante de la suma de las tres fracciones.

Como podemos observar en las tablas 2a, 2b y 2c, ni los efectos individuales del B y del Ca, ni la interacción BCa ejercieron algún tipo de influencia estadísticamente significativa sobre ninguna de la fracciones de pectinas estudiadas en nuestra experiencia (**B**: Pct.I, P> 0.05, F= 5.58; Pct.II, P> 0.05, F= 1.23; Pct.III, P> 0.05, F= 2.44; Pct.t, P> 0.05, F= 4.46; **Ca**: Pct.I, P> 0.05, F= 4.73; Pct.II, P> 0.05, F= 0.57; Pct.III, P> 0.05, F= 4.04; Pct.t, P> 0.05, F= 1.47; **BCa**: Pct.I, P> 0.05, F= 1.34; Pct.II, P> 0.05, F= 0.89; Pct.III, P> 0.05, F= 5.87; Pct.t, P> 0.05, F= 0.58).

TABLA 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de las distintas fracciones de pectinas.

	Pct.I	Pct.II	Pct.III	Pct.t
B ₁	1978.9	915.1	875.2	3769.2
B ₂	1963.5	898.7	871.4	3733.7
B ₃	1995.1	931.0	874.6	3800.7
LSD	40.2	36.1	15.6	75.3
Ca ₁	1982.6	908.1	871.3	3762.1
Ca ₂	1968.9	919.2	881.2	3769.3
Ca ₃	1985.9	917.6	868.7	3772.2
LSD	40.2	36.1	15.6	75.3

Pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y pectinas totales (Pct.t) expresadas en µg de ácido galacturónico g⁻¹ p.s.

TABLA 2b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Pct.I	Pct.II	Pct.III	Pct.t
Ca ₁ B ₁	1964.5	894.1	874.2	3732.8
B ₂	1978.4	894.3	865.6	3738.3
B ₃	2005.1	935.9	874.3	3815.3
Ca ₂ B ₁	1964.5	926.5	875.6	3766.6
B ₂	1966.6	905.5	884.1	3756.2
B ₃	1975.7	925.4	883.8	3785.0
Ca ₃ B ₁	2007.6	924.6	875.9	3808.2
B ₂	1945.5	896.3	864.4	3706.5
B ₃	2004.6	931.8	865.6	3802.0
LSD	74.2	53.2	32.1	114.2

Pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y pectinas totales (Pct.t) expresadas en µg de ácido galacturónico g⁻¹ p.s.

TABLA 2c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Pct.I	Pct.II	Pct.III	Pct.t
B ₁ Ca ₁	1964.5	894.1	874.2	3732.8
Ca ₂	1964.5	926.5	875.6	3766.6
Ca ₃	2007.6	924.6	875.9	3808.2
B ₂ Ca ₁	1978.4	894.3	865.6	3738.3
Ca ₂	1966.6	905.5	884.1	3756.2
Ca ₃	1945.5	896.3	864.6	3706.5
B ₃ Ca ₁	2005.1	935.9	874.3	3815.3
Ca ₂	1975.7	925.4	883.8	3785.0
Ca ₃	2004.6	931.8	865.6	3802.0
LSD	74.2	53.2	32.1	114.2

Pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y pectinas totales (Pct.t) expresadas en µg de ácido galacturónico g⁻¹ p.s.

En relación a la concentración radicular de B presente en cada una de las fracciones de pectinas, indicar que la aplicación de los distintos tratamientos de B no dieron lugar a diferencias estadísticas (Pct.I, P> 0.05, F= 0.035; Pct.II, P> 0.05, F= 2.47; Pct.III, P> 0.05, F= 3.99; Pct.t, P> 0.05, F= 1.84) (Tabla 3a).

TABLA 3a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de B en las distintas fracciones de pectinas.

	B-Pct.I	B-Pct.II	B-Pct.III	B-Pct.t
B ₁	7.96	3.69	7.59	20.1
B ₂	7.94	4.04	7.65	20.2
B ₃	7.97	4.38	7.65	20.1
LSD	0.19	0.15	0.14	0.26
Ca ₁	7.92	4.34	7.58	20.4
Ca ₂	7.95	4.04	7.64	20.3
Ca ₃	8.01	3.73	7.68	19.7
LSD	0.19	0.15	0.14	0.26

Concentraciones de B en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en µg g⁻¹ p.s.

Por el contrario, el efecto individual del Ca consistió en una disminución en el contenido de B de las pectinas solubles en hidróxido sódico y de las pectinas totales, a medida que se incrementaba la aplicación de este macronutriente al medio de cultivo (Pct.I, P> 0.05, F= 8.61; Pct.II, P< 0.001, F= 96.72; Pct.III, P> 0.05, F= 6.95; Pct.t, P< 0.05, F= 24.89), presentándose las mínimas concentraciones en el tratamiento Ca₃ (Tabla 3a).

TABLA 3b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de B en las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	B-Pct.I	B-Pct.II	B-Pct.III	B-Pct.t
Ca ₁ B ₁	7.96	4.01	7.45	20.3
B ₂	7.87	4.32	7.67	20.5
B ₃	7.93	4.69	7.62	20.5
Ca ₂ B ₁	7.89	3.72	7.71	20.2
B ₂	8.01	4.03	7.53	20.3
B ₃	7.96	4.37	7.67	20.3
Ca ₃ B ₁	8.07	3.33	7.62	20.0
B ₂	7.94	3.77	7.74	19.7
B ₃	8.01	4.09	7.68	19.3
LSD	0.32	0.26	0.33	0.56

Concentraciones de B en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en µg g⁻¹ p.s.

En cuanto a la interacción BCa (Pct.I, P> 0.05, F= 7.74; Pct.II, P< 0.001, F= 129.43; Pct.III, P> 0.05, F= 9.56; Pct.t, P< 0.01, F= 43.66), esta fue significativa estadísticamente debido a la influencia que ejerció el Ca variando el efecto individual del B en la fracción soluble en hidróxido sódico y en las pectinas totales (Tabla 3b), puesto que en general el B no influyó de ninguna manera sobre el efecto individual del Ca (Tabla 3c).

En la tabla 3b podemos observar que cuando los distintos tratamientos de B se

aplicaron con Ca₃, se produjo una disminución de la concentración de B en las pectinas solubles en hidróxido sódico y en las pectinas totales, no reflejándose por lo tanto el efecto individual del B.

TABLA 3c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de B en las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	B-Pct.I	B-Pct.II	B-Pct.III	B-Pct.t
B ₁ Ca ₁	7.96	4.01	7.45	20.3
Ca ₂	7.86	3.72	7.71	20.2
Ca ₃	8.07	3.33	7.62	20.0
B ₂ Ca ₁	7.87	4.32	7.67	20.5
Ca ₂	8.01	4.03	7.53	20.3
Ca ₃	7.94	3.77	7.74	20.0
B ₃ Ca ₁	7.93	4.69	7.62	20.5
Ca ₂	7.96	4.37	7.67	20.3
Ca ₃	8.01	4.09	7.68	19.3
LSD	0.32	0.26	0.33	0.56

Concentraciones de B en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.

Finalmente, en raíces estudiamos la concentración de Ca en las distintas fracciones de pectinas. Como podemos observar en la tabla 4a, los efectos individuales del B y del Ca no fueron significativos sobre la concentración de Ca en las pectinas solubles en agua (**B**: $P > 0.05$, $F = 9.69$; **Ca**: $P > 0.05$, $F = 13.44$), así como en las pectinas solubles en oxalato amónico (**B**: $P > 0.05$, $F = 11.31$; **Ca**: $P > 0.05$, $F = 8.56$). Por el contrario, el incremento en la aplicación de B y de Ca al medio de cultivo dio lugar al aumento proporcional de la concentración de Ca presente en las pectinas solubles en hidróxido sódico (**B**: $P < 0.001$, $F = 213.31$; **Ca**: $P < 0.001$, $F = 180.31$) y en las pectinas totales (**B**: $P < 0.001$, $F = 70.99$; **Ca**: $P < 0.001$; $F = 62.13$), presentándose en ambas

las máximas concentraciones de Ca en los tratamientos B₃ y Ca₃ (Tabla 4a).

TABLA 4a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de Ca en las distintas fracciones de pectinas.

	Ca-Pct.I	Ca-Pct.II	Ca-Pct.III	Ca-Pct.t
B ₁	1.41	4.97	1.27	7.63
B ₂	1.40	8.52	1.33	11.3
B ₃	1.36	11.0	1.28	13.7
LSD	0.09	0.32	0.08	0.56
Ca ₁	1.35	5.55	1.30	8.30
Ca ₂	1.39	7.85	1.25	10.4
Ca ₃	1.42	11.1	1.33	13.9
LSD	0.09	0.32	0.08	0.56

Concentraciones de Ca en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en mg g^{-1} p.s.

Por último, y como podemos observar en las tablas 4b y 4c, predominaron los efectos individuales del B y del Ca, no presentándose por lo tanto ningún tipo de interacción BCa (Pct.I, $P > 0.05$, $F = 3.13$; Pct.II, $P > 0.05$, $F = 11.30$; Pct.III, $P > 0.05$, $F = 10.81$; Pct.t, $P > 0.05$, $F = 4.76$).

TABLA 4b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de Ca en las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Ca-Pct.I	Ca-Pct.II	Ca-Pct.III	Ca-Pct.t
Ca ₁ B ₁	1.39	2.43	1.30	5.12
B ₂	1.32	6.25	1.34	8.91
B ₃	1.35	7.98	1.25	10.6
Ca ₂ B ₁	1.41	4.64	1.18	7.23
B ₂	1.42	8.17	1.36	11.0
B ₃	1.36	10.7	1.22	13.3
Ca ₃ B ₁	1.42	7.85	1.33	10.6
B ₂	1.46	11.1	1.29	13.9
B ₃	1.39	14.4	1.37	17.1
LSD	0.17	1.12	0.19	1.43

Concentraciones de Ca en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en mg g^{-1} p.s.

TABLA 4c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de Ca en las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Ca-Pct.I	Ca-Pct.II	Ca-Pct.III	Ca-Pct.t
B ₁ Ca ₁	1.39	2.43	1.30	5.12
Ca ₂	1.41	4.64	1.18	7.23
Ca ₃	1.42	7.85	1.33	10.6
B ₂ Ca ₁	1.32	6.25	1.34	8.91
Ca ₂	1.42	8.17	1.36	11.0
Ca ₃	1.36	11.1	1.29	13.9
B ₃ Ca ₁	1.42	7.98	1.25	10.6
Ca ₂	1.46	10.7	1.22	13.3
Ca ₃	1.39	14.4	1.37	17.1
LSD	0.17	1.12	0.19	1.43

Concentraciones de Ca en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en mg g⁻¹ p.s.

En hojas y como veremos a continuación, el comportamiento de los todos los parámetros estudiados en este capítulo fue similar al descrito en las raíces. Las concentraciones foliares de B total incrementaron con los distintos tratamientos de B (P < 0.001; F = 813.21), presentándose las máximas concentraciones en B3 y las mínimas en B1 (Tabla 5a). Por el contrario, un aumento en la aplicación de Ca dio lugar a una disminución en las concentraciones foliares de B total (P < 0.001; F = 658.23), encontrándose las mínimas concentraciones en Ca3 (Tabla 5a).

En relación al B disponible, los tratamientos de B no conllevaron a diferencias en la concentraciones de esta forma de B (P > 0.05; F = 1.11) (Tabla 5a), mientras que el efecto individual del Ca sobre el B disponible fue similar al del B total, puesto que las mínimas concentraciones se presentaron en Ca3 y las máximas en Ca1 (P < 0.001; F = 35.30) (Tabla 5a).

En cuanto a las concentraciones foliares de Ca total y Ca disponible, incrementos en la aplicación de B al medio de cultivo dieron lugar a aumentos proporcionales de ambas formas de Ca (Ca total: P < 0.001, F = 501.96; Ca disponible: P < 0.001, F = 845.84), presentándose las máximas concentraciones foliares en B3 (Tabla 5a).

TABLA 5a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de sus formas totales y disponibles.

	Bt	Bd	Cat	Cad
B ₁	39.2	3.68	28.5	3.69
B ₂	53.0	3.80	37.8	5.31
B ₃	69.1	3.70	42.6	6.89
LSD	1.46	0.42	0.91	0.16
Ca ₁	68.6	4.66	26.5	3.25
Ca ₂	50.4	3.66	37.3	5.38
Ca ₃	42.4	2.85	45.0	7.26
LSD	1.46	0.42	0.91	0.16

B total (Bt) y disponible (Bd) en µg g⁻¹ p.s.

Ca total (Cat) y disponible (Cad) en mg g⁻¹ p.s.

Por otro lado, el efecto individual del Ca fue similar al del B, puesto que las máximas concentraciones de Ca total (P < 0.001, F = 838.12) y Ca disponible (P < 0.001; F = 1331.55) se encontraron en Ca3 y las mínimas en Ca1 (Tabla 5a).

Como podemos observar en las tablas 5b y 5c, no se presentó ningún tipo de interacción BCa, predominando por lo tanto los efectos individuales para las distintas formas de B (B total: P > 0.05, F = 10.78; B disponible: P > 0.05, F = 2.01) y de Ca (Ca total: P > 0.05; F = 8.88; Ca disponible: P > 0.05, F = 21.22).

TABLA 5b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de B y Ca en sus formas totales y disponibles: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Bt	Bd	Cat	Cad
Ca ₁ B ₁	53.1	4.54	20.6	2.22
B ₂	68.1	4.69	26.7	3.26
B ₃	84.5	4.77	32.3	4.26
Ca ₂ B ₁	34.2	3.64	27.8	3.68
B ₂	49.3	3.80	40.3	5.23
B ₃	67.7	3.55	43.8	7.23
Ca ₃ B ₁	30.5	2.86	37.0	5.17
B ₂	41.6	2.90	46.4	7.43
B ₃	55.1	2.79	51.6	9.17
LSD	2.53	0.73	1.58	0.27

B total (Bt) y disponible (Bd) en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.
Ca total (Cat) y disponible (Cad) en mg g^{-1} p.s.

TABLA 5c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de B y Ca en sus formas totales y disponibles: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Bt	Bd	Cat	Cad
B ₁ Ca ₁	53.1	4.54	20.6	2.22
Ca ₂	34.2	3.64	27.8	3.68
Ca ₃	30.5	2.86	37.0	5.17
B ₂ Ca ₁	68.1	4.69	26.7	3.26
Ca ₂	49.8	3.80	40.3	5.23
Ca ₃	41.6	2.90	46.4	7.43
B ₃ Ca ₁	84.5	4.77	32.3	4.26
Ca ₂	67.7	3.55	43.8	7.23
Ca ₃	55.1	2.79	51.6	9.17
LSD	2.53	0.73	1.58	0.27

B total (Bt) y disponible (Bd) en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.
Ca total (Cat) y disponible (Cad) en mg g^{-1} p.s.

Al igual que ocurría en raíces, las concentraciones de las distintas fracciones de pectinas así como las pectinas totales, no fueron influenciadas ni por el B (Pct.I, $P > 0.05$, $F = 0.18$; Pct.II, $P > 0.05$, $F = 1.11$; Pct.III, $P > 0.05$, $F = 1.75$; Pct.t, $P > 0.05$, $F = 0.07$) (Tabla 6a), ni por el Ca (Pect_{H₂O}, $P >$

0.05 , $F = 1.18$; Pct.I, $P > 0.05$, $F = 1.06$; Pct.III, $P > 0.05$, $F = 3.53$; Pct.t, $P > 0.05$, $F = 2.85$) (Tabla 6a), ni por la interacción BCa (Pct.I, $P > 0.05$, $F = 1.95$; Pct.II, $P > 0.05$, $F = 1.67$; Pct.III, $P > 0.05$, $F = 2.09$; Pct.t, $P > 0.05$, $F = 1.09$) (Tablas 6b y 6c).

TABLA 6a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de las distintas fracciones de pectinas.

	Pct.I	Pct.II	Pct.III	Pct.t
B ₁	2318.5	1754.2	1685.1	5757.7
B ₂	2338.2	1756.5	1679.8	5774.5
B ₃	2345.4	1729.5	1688.3	5763.2
LSD	91.2	42.8	39.3	92.0
Ca ₁	2299.4	1730.2	1680.0	5709.5
Ca ₂	2369.1	1758.2	1691.4	5818.6
Ca ₃	2333.6	1751.8	1681.8	5767.3
LSD	91.2	42.8	39.3	92.0

Pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y pectinas totales (Pct.t) expresadas en μg de ácido galacturónico g^{-1} p.s.

TABLA 6b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Pct.I	Pct.II	Pct.III	Pct.t
Ca ₁ B ₁	2187.6	1774.6	1684.2	5646.4
B ₂	2344.2	1703.8	1672.4	5720.5
B ₃	2366.3	1712.1	1683.2	5761.7
Ca ₂ B ₁	2410.3	1744.8	1684.7	5839.8
B ₂	2322.4	1785.2	1685.0	5792.7
B ₃	2374.5	1744.5	1704.4	5823.4
Ca ₃ B ₁	2357.6	1743.1	1686.3	5786.9
B ₂	2347.8	1780.6	1681.9	5810.3
B ₃	2295.3	1731.8	1677.4	5704.5
LSD	158.0	98.7	76.1	159.3

Pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y pectinas totales (Pct.t) expresadas en μg de ácido galacturónico g^{-1} p.s.

TABLA 6c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Pct.I	Pct.II	Pct.III	Pct.t
B ₁ Ca ₁	2187.6	1774.6	1684.2	5646.4
Ca ₂	2410.3	1744.8	1684.7	5839.8
Ca ₃	2357.6	1743.1	1686.3	5786.9
B ₂ Ca ₁	2344.2	1703.8	1672.4	5720.5
Ca ₂	2322.4	1785.2	1685.0	5792.7
Ca ₃	2347.8	1780.6	1681.9	5810.3
B ₃ Ca ₁	2366.6	1712.1	1683.2	5761.7
Ca ₂	2374.5	1744.5	1704.4	5823.4
Ca ₃	2295.3	1731.8	1677.4	5704.5
LSD	158.0	98.7	76.1	159.3

Pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y pectinas totales (Pct.t) expresadas en µg de ácido galacturónico g⁻¹ p.s.

En relación a la concentración foliar de B en cada una de las fracciones de pectinas, destacar que ni los efectos individuales del B ni del Ca, ni la interacción B-Ca dieron lugar a variaciones estadísticamente significativas en las pectinas solubles en agua (**B**: P> 0.05, F= 7.05; **Ca**: P> 0.05, F= 4.48; **BCa**: P> 0.05, F= 9.37), y en las solubles en oxalato-amónico (**B**: P> 0.05, F= 6.16; **Ca**: P> 0.05, F= 2.48; **BCa**: P> 0.05, F= 3.83) (Tablas 7a, 7b y 7c).

TABLA 7a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de B en las distintas fracciones de pectinas.

	B-Pct.I	B-Pct.II	B-Pct.III	B-Pct.t
B ₁	9.46	5.02	10.8	25.3
B ₂	9.43	5.28	10.7	25.4
B ₃	9.47	5.58	10.9	26.0
LSD	0.19	0.14	0.26	0.69
Ca ₁	9.49	5.57	10.8	25.8
Ca ₂	9.49	5.31	10.9	25.7
Ca ₃	9.37	5.00	10.8	25.2
LSD	0.19	0.14	0.26	0.69

Concentraciones de B en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en µg g⁻¹ p.s.

Por el contrario, el contenido de B en las pectinas solubles en hidróxido-amónico y el de las pectinas totales, fue influenciado por el efecto individual del B (Pect_{NaOH}: P< 0.001, F= 114.75; Pect_{Total}: P< 0.001, F= 92.57) (Tabla 7a), y por el efecto individual del Ca (Tabla 7a), aunque la interacción B-Ca no mostró ningún tipo de efecto (Pect_{NaOH}: P> 0.05, F= 6.55; Pect_{Total}: P> 0.05, F= 4.71) (Tablas 7b y 7c).

TABLA 7b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliar de B en las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	B-Pct.I	B-Pct.II	B-Pct.III	B-Pct.t
Ca ₁ B ₁	9.55	5.30	10.9	25.7
B ₂	9.45	5.58	10.7	25.7
B ₃	9.46	5.83	10.9	26.2
Ca ₂ B ₁	9.42	5.02	10.8	25.3
B ₂	9.49	5.27	10.8	25.5
B ₃	9.57	5.66	11.0	26.2
Ca ₃ B ₁	9.43	4.75	10.8	25.0
B ₂	9.35	5.01	10.7	25.1
B ₃	9.39	5.24	10.9	25.6
LSD	0.32	0.22	0.47	0.98

Concentraciones de B en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en µg g⁻¹ p.s.

En relación al efecto individual del Ca, el incremento en los tratamientos de este elemento dieron lugar a una disminución gradual de la concentración de B en las pectinas solubles en hidróxido sódico (P< 0.001; F= 126.58) y en las pectinas totales (P< 0.01; F= 57.40), presentándose las mínimas concentraciones en el tratamiento Ca₃ (Tabla 7a).

TABLA 7c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de B en las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	B-Pct.I	B-Pct.II	B-Pct.III	B-Pct.t
B ₁ Ca ₁	9.55	5.30	10.9	25.7
Ca ₂	9.42	5.02	10.8	25.3
Ca ₃	9.43	4.75	10.8	25.0
B ₂ Ca ₁	9.45	5.58	10.7	25.7
Ca ₂	9.49	5.27	10.8	25.5
Ca ₃	9.35	5.01	10.7	25.1
B ₃ Ca ₁	9.46	5.83	10.9	26.2
Ca ₂	9.57	5.66	11.0	26.2
Ca ₃	9.39	5.24	10.9	25.6
LSD	0.32	0.22	0.47	0.98

Concentraciones de B en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.

Finalmente, y al igual que la concentración de B en las distintas fracciones de pectinas, la concentración de Ca en las fracciones de pectinas solubles en agua y solubles en oxalato-amónico no vario ante la aplicación de los distintos tratamientos de B (Pct.I: $P > 0.05$, $F = 9.01$; Pct.II: $P > 0.05$, $F = 15.32$) (Tabla 8a) y de Ca (Pct.I: $P > 0.05$, $F = 11.30$; Pct.II: $P > 0.05$, $F = 3.42$) (Tabla 8a).

TABLA 8a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de Ca en las distintas fracciones de pectinas.

	Ca-Pct.I	Ca-Pct.II	Ca-Pct.III	Ca-Pct.t
B ₁	3.75	13.6	3.51	20.9
B ₂	3.66	18.5	3.65	25.8
B ₃	3.72	21.8	3.68	29.2
LSD	0.23	0.58	0.18	0.68
Ca ₁	3.69	12.0	3.66	19.4
Ca ₂	3.78	18.8	3.52	26.1
Ca ₃	3.65	23.0	3.67	30.4
LSD	0.23	0.58	0.18	0.68

Concentraciones de Ca en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en mg g^{-1} p.s.

Por el contrario, tanto el B como el Ca dieron lugar a incrementos en las concentraciones de Ca de las pectinas solubles en hidróxido sódico (**B**: $P < 0.001$, $F = 411.99$; **Ca**: $P < 0.001$; $F = 751.43$), y en las concentraciones de Ca de las pectinas totales (**B**: $P < 0.001$, $F = 434.89$; **Ca**: $P < 0.001$; $F = 742.25$), presentándose las máximas concentraciones en B₃ y Ca₃ (Tabla 8a).

TABLA 8b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de Ca en las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Ca-Pct.I	Ca-Pct.II	Ca-Pct.III	Ca-Pct.t
Ca ₁ B ₁	3.77	8.54	3.58	15.9
B ₂	3.58	12.7	3.72	20.0
B ₃	3.72	14.8	3.68	22.2
Ca ₂ B ₁	3.83	13.4	3.34	20.5
B ₂	3.77	20.3	3.66	27.8
B ₃	3.75	22.7	3.55	30.0
Ca ₃ B ₁	3.65	18.9	3.62	26.2
B ₂	3.64	22.3	3.57	29.5
B ₃	3.68	27.9	3.81	35.4
LSD	0.44	1.00	0.37	1.25

Concentraciones de Ca en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en mg g^{-1} p.s.

Por último, en las concentraciones de Ca de todas las fracciones de pectinas estudiadas no se observó ningún tipo de interacción BCa (Pect_{H₂O}: P > 0.05, F = 4.81; Pect_{NaOH}: P > 0.05, F = 13.85; Pect_{Ox-NH₄}: P > 0.05, F = 10.53; Pect_{Total}: P > 0.05, F = 8.95), predominando por lo tanto los efectos individuales de ambos elementos (Tablas 8b y 8c).

TABLA 8c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de Ca en las distintas fracciones de pectinas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Ca-Pct.I	Ca-Pct.II	Ca-Pct.III	Ca-Pct.t
B ₁ Ca ₁	3.77	8.54	3.58	15.9
Ca ₂	3.83	13.4	3.34	20.5
Ca ₃	3.65	18.9	3.62	26.2
B ₂ Ca ₁	3.58	12.7	3.72	20.0
Ca ₂	3.77	20.3	3.66	27.8
Ca ₃	3.64	22.3	3.57	29.5
B ₃ Ca ₁	3.72	14.8	3.68	22.2
Ca ₂	3.75	22.7	3.55	30.0
Ca ₃	3.68	27.9	3.81	35.4
LSD	0.44	1.00	0.37	1.25

Concentraciones de Ca en las pectinas solubles en agua (Pct.I), solubles en hidróxido sódico (Pct.II), solubles en oxalato amónico (Pct.III), y en las pectinas totales (Pct.t) expresadas en mg g⁻¹ p.s.

V. Discusión.

V.1. Concentración y distribución del B.

Como indicábamos en la sección de resultados, las concentraciones de B total y disponible fueron influenciadas positivamente por los distintos tratamientos de B aplicados en nuestra experiencia, presentándose las máximas concentraciones en el tratamiento B3 tanto en raíces (Tabla 1a) como en hojas (Tabla 5a).

Por el contrario, el incremento en la aplicación de Ca dio lugar a una disminución significativa de las concentraciones de B total y disponible tanto en raíces (Tabla 1a) como en hojas (Tabla 5a), encontrándose las mínimas concentraciones en Ca3.

Por lo tanto, y considerando los resultados obtenidos, podemos comprobar la naturaleza pasiva de la absorción del B puesto que un aumento en la aplicación de este micronutriente conlleva a incrementos graduales en las concentraciones de B total, tanto en raíces como en hojas (Hu y Brown, 1997). También destacar que las concentraciones de B total en hojas fueron superiores a las de raíces, independientemente del tratamiento aplicado. Este hecho nos indica que el B absorbido es principalmente translocado vía xilema, y acumulado posteriormente en las hojas maduras o con mayor transpiración (Brown y Shelp, 1997).

La mayoría de las investigaciones sobre la interacción BCa se centran en el efecto del B sobre la absorción y distribución del Ca, mientras que solamente unas pocas estudian el efecto del Ca sobre el B. Varios trabajos han descrito como elevadas concentraciones del ion Ca en el medio de cultivo producían una disminución en la absorción de B, lo cual era explicado por

un aumento del pH provocado, según los autores, por el incremento en la solución nutritiva de SO_4Ca (Gupta, 1979; Gupta y Macleod, 1981). En nuestra experiencia, la disminución en la absorción del B al aumentar la aplicación de Ca al medio de cultivo no se podría explicar por un aumento del pH de la solución nutritiva, puesto que éste varío solamente en un rango de 5.5 a 6.0.

Como describíamos en la introducción, de los muchos factores que afectan a la absorción del B existen dos que pueden ser influenciados por el Ca. En primer lugar, tanto la absorción como los requerimientos de B han sido relacionados por Hu et al. (1996) con el contenido en pectinas de la pared celular, siendo la capacidad de unión del B a estas pectinas esenciales en la aparición de diferencias entre distintas especies vegetales a nivel de absorción y requerimientos de B.

Por lo tanto, considerando la importancia de la unión del B a las pectinas en los procesos de absorción de este micronutriente (Shelp, 1993; Brown y Hu, 1994; Hu et al., 1996; Matoh, 1997; Hu y Brown, 1997), y por otra parte, conociendo que el Ca se caracteriza también por su unión a estos compuestos (Konno et al., 1984; Marschner, 1995), podría aparecer competencia entre estos dos elementos por los sitios de unión a las pectinas. Este hecho provocaría que cuando se incrementara la concentración de Ca en el medio de cultivo (Ca^{3+}), y por lo tanto en la planta, disminuyeran los sitios libres de unión a las pectinas reduciéndose así también la unión de B a las pectinas, y consecuentemente su absorción radicular.

Por otro lado, la absorción de B también puede ser influida por diferencias en la estabilización o permeabilidad de la membrana plasmática y de la pared celular

(Jenkin et al., 1993; Hu y Brown, 1997). Una de las funciones principales del Ca es aumentar la rigidez y estabilización de la membrana plasmática así como de la pared celular, disminuyendo la permeabilidad de éstas (Caldwell y Hang, 1981; Marschner, 1995; Rihouey et al., 1995). Esta bien documentando en la literatura disponible, que la degradación de la pared celular es realizada por la enzima poligalacturonasa, la cual es drásticamente inhibida por elevadas concentraciones de Ca, y más concretamente por la unión de Ca a las pectinas (Konno et al., 1984; Rushing y Huber, 1990; Jauneau et al., 1994). En cuanto a la membrana plasmática, el Ca se une a los grupos fosfato y carboxilatos de los fosfolípidos y proteínas, produciendo un aumento de la estabilidad e integridad de las membranas (Caldwell y Hang, 1981; Marschner, 1995; Rihouey et al., 1995).

Por lo tanto, el incremento de Ca en la planta, derivado de un aumento en la aplicación de este elemento en la solución nutritiva (Ca3), podría producir un aumento en la rigidez de las estructuras celulares citadas anteriormente disminuyéndose así la absorción de B.

En definitiva, estos podrían ser los procesos que explicasen la disminución en las concentraciones radiculares y foliares de B total, provocada por el incremento en la aplicación de Ca.

V.2. Concentración y distribución del Ca.

En cuanto al Ca total y disponible, tanto en raíces (Tabla 1a) como en hojas (Tabla 5a), mostraron incrementos en su concentración a medida que aumentaban las dosis de B y de Ca, presentándose las máximas concentraciones en los tratamientos B3 y Ca3. Destacar también que independientemente de los tratamientos aplicados, las concentraciones

de Ca total en hojas fueron dos veces superiores a las de raíces. Estos datos confirman la relación estrecha que existe entre la distribución del Ca y la razón de transpiración (Marschner, 1995), la cual ha sido comprobada especialmente en plantas de tabaco acumulándose mayoritariamente el Ca en las hojas maduras (Bharti et al., 1996; Ruiz et al., 1998; Ruiz et al., 1999).

Como hemos indicado, el Ca en su forma disponible o acumulado en la vacuola mostró, tanto en raíces (Tabla 1a) como en hojas (Tabla 5a), un comportamiento similar al del Ca total. Este comportamiento es lógico, debido a que el Ca en el citoplasma debe mantenerse a concentraciones muy bajas con el fin de evitar la precipitación del P inorgánico, la competición con el Mg y para cumplir con su función de mensajero secundario (Chanson, 1993; Bush, 1993; Bush, 1995; Marschner, 1995). Por lo tanto, y para impedir que el Ca citoplasmático aumente al incrementar las dosis de Ca en el medio de cultivo, gran parte del Ca absorbido es acumulado en las vacuolas tras su translocación hacia la parte aérea (Bush, 1995).

En definitiva, los resultados obtenidos en nuestra experiencia en relación a los efectos individuales del B y del Ca sobre la concentración y distribución del Ca, están en concordancia con los de Ganmore-Neumann y Davidov (1993). Estos autores estudiaron la influencia de diferentes dosis de B y de Ca sobre la absorción y distribución de Ca. Los resultados descritos por este trabajo muestran como al aumentar las dosis de B y de Ca incrementa de forma proporcional la absorción de Ca, y la concentración de este catión en los distintos órganos de la planta. Además, estos autores observaron como con las dosis más elevadas de B y de Ca la translocación del Ca⁴⁵ aumentaba.

Otros trabajos, como el de Bonilla et al. (1995), también describen esta situación, favoreciéndose la absorción del Ca por el B. Por último, trabajos como los de Goldbach et al. (1991) y Mühling et al. (1998) explican el sinergismo del B sobre el Ca debido al papel estabilizador del B sobre la membrana plasmática y pared celular. Un aumento en la concentración de B parece incrementar o favorecer la unión del Ca a estas estructuras celulares, puesto que el Ca se une a complejos formados por ésteres de B con polihidroxi-compuestos.

V.3. Caracterización y concentración de pectinas.

Como se refleja en las tablas 2 y 6, en raíces y en hojas respectivamente, los tratamientos de B y de Ca no dieron lugar a variaciones en las concentraciones de pectinas.

Hu et al. (1996) observaron como independientemente de los niveles de B aplicados, el contenido de ácido urónico de la pared celular permanecía constante, por lo que estos autores concluyeron que el B no jugaba un papel importante en el metabolismo de las pectinas. Los resultados obtenidos en nuestra experiencia están en concordancia con esta hipótesis, puesto que ninguno de los tratamientos de B produce diferencias en ninguna de las fracciones de pectinas estudiadas, ni en raíces (Tabla 2a) ni en hojas (Tabla 5a).

En cuanto a la relación Ca-contenido en pectinas, la mayoría de los trabajos implican al Ca en la estabilización de estas, principalmente por su papel como inhibidor de la enzima poligalacturonasa, responsable de la degradación de la pared celular (Caldwell y Hang, 1981; Marschner, 1995; Rihouey et al., 1995).

Posiblemente, y debido a que en nuestra experiencia las dosis aplicadas de Ca dieron lugar a concentraciones de Ca adecuadas, no se produzcan variaciones en las concentraciones de pectinas, puesto que la degradación de estas por la enzima se produce bajo condiciones deficientes de Ca (Konno et al., 1984; Rushing y Huber, 1990; Jauneau et al., 1994).

Finalmente, destacar que tanto en raíces como en hojas, la fracción con mayor concentración en pectinas fue la fracción soluble en agua, y que en hojas las concentraciones de pectinas fueron muy superiores a las de raíces (Tablas 2 y 6, respectivamente).

V.4. Concentraciones de B y Ca en las distintas fracciones de pectinas.

Uno de los aspectos comunes que muestran estos nutrientes es su unión o la formación de complejos con las pectinas. Diversas investigaciones ponen de manifiesto que bajo condiciones limitantes de B, la concentración de este nutriente en la pared celular es del 95-98% del total del B celular (Matoh et al., 1992; Hu y Brown, 1994), presentándose la mayoría de este asociado a las pectinas (Hu et al., 1996). Con respecto al Ca, su unión a las pectinas también ha sido demostrada, jugando este catión un papel esencial inhibiendo o disminuyendo la desintegración de la pared celular (Jauneau et al., 1994). Por lo tanto, nuestra intención con el estudio de las concentraciones de B y Ca en las distintas fracciones de pectinas es comprobar la existencia de algún tipo de interacción entre ambos elementos.

Tanto en raíces (Tablas 3 y 4) como en hojas (Tablas 7 y 8), podemos comprobar como las concentraciones de B y Ca en las fracciones de pectinas solubles en agua y solubles en oxalato amónico, no variaron

ante la aplicación de los distintos tratamientos de B y Ca. Por el contrario, fue en las pectinas solubles en hidróxido sódico donde las concentraciones de B y de Ca variaron significativamente. Estos resultados, definen a esta fracción de pectinas como determinante en la aparición de algún tipo de interacción entre el B y el Ca.

En relación a la concentración de B en las pectinas solubles en hidróxido sódico, tanto en raíces (Tabla 3a) como en hojas (Tabla 7a), ésta fue influida por los tratamientos de B y de Ca, aumentándola al incrementar las dosis de B, y disminuyéndola a medida que se aumentaban las dosis de Ca. En cuanto a la concentración de Ca unido a las pectinas solubles en hidróxido sódico, ésta aumento tanto por los tratamientos de B como por los de Ca, en raíces (Tabla 4a) y en hojas (Tabla 8a).

En definitiva, y según los resultados obtenidos podemos concluir que la unión o cantidad de B en las pectinas solubles en hidróxido sódico se ve disminuida por la aplicación de Ca, mientras que la concentración de Ca en esta fracción aumenta al incrementar los tratamientos de B y de Ca. Estos resultados, y las relaciones existentes entre las formas de B y Ca total con las concentraciones de B y Ca unidos a las pectinas solubles en hidróxido sódico, tanto en raíces (B total-BPect_{NaOH}, $r = 0.87$ ***, Ca total-CaPect_{NaOH}, $r = 0.93$ ***) como en hojas (B total-BPect_{NaOH}, $r = 0.95$ ***, Ca total-CaPect_{NaOH}, $r = 0.96$ ***), nos sugieren que la unión del B y del Ca a las pectinas, y especialmente a la fracción soluble en hidróxido sódico, podría ser determinante en la absorción de estos dos nutrientes.

En cuanto a la absorción de B, y como indicábamos al inicio de la discusión, tanto la absorción como los requerimientos de B

han sido relacionados por Hu et al. (1996) con el contenido en pectinas de la pared celular, siendo la capacidad de unión del B a estas pectinas esenciales en la aparición de diferencias entre distintas especies vegetales a nivel de absorción y requerimientos de B. Los resultados obtenidos en nuestra experiencia están en concordancia con los de Hu et al. (1996), puesto que una mayor absorción de B daría lugar a mayores concentraciones de B unidos a pectinas, y a mayores concentraciones de B total, hechos que se producen al utilizar el tratamiento B3.

Por otra parte, considerando la importancia de la unión del B a las pectinas en los procesos de absorción de este micronutriente (Shelp, 1993; Brown y Hu, 1994; Hu et al., 1996; Matoh, 1997; Hu y Brown, 1997), y conociendo que el Ca se caracteriza también por su unión a estos compuestos (Konno et al., 1984; Marschner, 1995), podría aparecer competencia entre estos dos elementos por los sitios de unión a las pectinas. Este hecho provocaría que al incrementarse la concentración de Ca en el medio de cultivo (Ca³), y por lo tanto en la planta, disminuyeran los sitios libres de unión a las pectinas reduciéndose así también la unión de B a las pectinas, y consecuentemente su absorción radicular. En nuestra experiencia, por un lado las relaciones entre las concentraciones B y Ca unidos a las pectinas solubles en hidróxido sódico, tanto en raíces ($r = -0.88$ ***) como en hojas ($r = -0.91$ ***), nos demuestran la existencia de competencia entre estos dos elementos en su unión a las pectinas. Mientras que por otro lado, las relaciones entre el B total y la concentración de Ca unido a la fracción II de pectinas, tanto en raíces ($r = -0.92$ ***) como en hojas ($r = -0.90$ ***), nos indican que el antagonismo que ejerce el Ca sobre la absorción del B

se podría deber a la formación de complejos Ca-pectinas en la pared celular.

Finalmente, y en cuanto a la absorción de Ca, incrementos en la aplicaciones de B favorecen la absorción de este catión (Ganmore-Neumann y Davidov, 1993; Bonilla et al., 1995), posiblemente debido a que el B parece aumentar la unión del Ca a la pared celular y membrana plasmática, puesto que el Ca se une a complejos formados por esteres de B con polihidroxi-compuestos (Goldbach et al., 1991; Mühling et al., 1998). Estas conclusiones explicarían porque en nuestra experiencia el B aumenta la concentración de Ca unido a las pectinas, especialmente a las solubles en hidróxido sódico, y las concentraciones de Ca total en raíces y hojas.

Finalmente, la justificación en nuestras experiencia de porque los tratamientos de Ca aumentan la concentración de Ca unido a las pectinas, sería similar a la de porque aumentan los niveles de Ca disponible, evitándose de esta manera un aumento del contenido de Ca citoplasmático (Bush, 1995; Marschner, 1995).

V. Conclusiones.

Primera: Considerando los efectos que ejercen los distintos tratamientos de B y de Ca sobre la distribución y concentración de las formas totales de estos nutrientes en nuestra experiencia, podemos concluir que los tratamientos de B facilitan la absorción de B y de Ca (sinergismo del B sobre el Ca), mientras que los tratamientos de Ca disminuyen la absorción de B (antagonismo del Ca sobre el B) y facilitan la de Ca.

Segunda: En cuanto a la concentración y caracterización de las pectinas, los distintos tratamientos de B y de Ca no conllevaron a ninguna variación en sus concentraciones, ni en raíces ni en hojas,

indicándonos que en nuestra experiencia ni el B ni el Ca influyen en el metabolismo de las pectinas.

Tercera: Finalmente, y en relación a las concentraciones de B y de Ca ligadas a las distintas fracciones de pectinas, indicar que los tratamientos solamente ejercieron un efecto significativo sobre las concentraciones de estos nutrientes ligados a las pectinas solubles en hidróxido sódico (fracción II). Nuestros resultados indican que los tratamientos de B facilitan la unión del B y del Ca a las pectinas, mientras que los tratamientos de Ca disminuyen la unión del B aumentando la unión del Ca a las pectinas, por lo que concluimos que posiblemente estos comportamientos sean determinantes para entender e interpretar las relaciones entre estos nutrientes a nivel de absorción, y por lo tanto a nivel de sus concentraciones en plantas en nuestra experiencia.

VII. Referencias.

- Atkinson CJ, Mansfield TA, McAinsh MR, Bachs O, Agell N, Carafoli E. 1992.** Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 1113: 259-270.
- Bharti N, Singh RP, Sinha SK. 1996.** Effect of calcium chloride on heavy metal induced alteration in growth and nitrate assimilation of *Sesamum indicum* seedlings. *Phytochem.* 41: 105-109.
- Bingham FT, Elseewi A, Oertli JJ. 1970.** Characteristics of boron absorption by excised barley roots. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34: 613-617.
- Bjorkman T, Cleland RE. 1991.** The role of extracellular free-calcium gradients in gravitropic signalling in maize roots. *Planta* 185: 379-384.
- Bonilla I, Bolaños L, Mateo P. 1995.** Interaction of boron and calcium in the cyanobacteria *Anabanea* and *Synechococcus*. *Physiol. Plant.* 94: 31-36.
- Bowen JE. 1972.** Effect of environmental factors on water utilisation and boron accumulation and translocation in sugarcane. *Plant Cell Physiol.* 13: 703-714.
- Bowen JE, Nissen P. 1971.** Boron uptake by excised barley roots II. Characteristics and kinetics of active proton. *Physiol. Plant.* 41: 109-115.
- Bourne EJ. 1958.** The polyhydric alcohols. *Acyclic polyhydric alcohols.* *Encycl. Plant Physiol.* VI. Springer-Verlag, New York.
- Bowen JE. 1981.** Micro-element nutrition of sugar-cane. II. Interaction in micro-element accumulation. *Trop. Agric.* 58: 215-220.
- Brown PH, Hu H. 1994.** Boron uptake by sunflower, squash and cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.* 91: 435-441.
- Brown PH, Hu H. 1996.** Phloem mobility of boron is species dependent. Evidence for phloem mobility in sorbitol rich species. *Ann. Bot.* 77: 497-505.
- Brown PH, Shelp BJ. 1997.** Boron mobility in plants. *Plant Soil* 193: 85-101.
- Bush DS, Biswas AK, Jones RL. 1989.** Gibberellic-acid-stimulated Ca^{2+} accumulation in endoplasmic reticulum of barley aleurone: Ca^{2+} transport and steady-state levels. *Planta* 178: 411-420.
- Bush DS. 1993.** Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* 103: 7-13.
- Bush DS. 1995.** Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 95-122.
- Campbell LC, Miller MH, Loneragan F. 1975.** Translocation of boron to plant fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 2: 481-487.
- Crandall PC, Chamberlain JD, Garth JKL. 1981.** Toxicity symptoms and tissue levels associated with excess boron in pear. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 12: 1047-1057.

- Chanson A. 1993.** Active transport of proton and calcium in higher plant cells. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 943-955.
- Darvill A, McNeill M, Albersheim P, Delmer DP. 1980.** The primary cell wall of flowering plants. In: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise.* Tolbert NE, ed., Academic Press, New York.
- Delgado A, Benlloch M, Fernández-Escobar R. 1994.** Mobilisation of boron in olive trees during flowering and fruit development. *HortSci.* 29: 616-618.
- Dieter P, Marmé D. 1981.** Far-red light irradiation of intact corn seedlings affects mitochondrial and calmodulin-dependent microsomal Ca^{2+} -transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 749-755.
- Dye MH, Buchanan L, Dorofaeff FD, Beecroft FG. 1983.** Dieback of apricot trees following soil application of boron. *New Zealand J. Exp. Agric.* 11: 331-342.
- Evans DE, Brians SA, Willians LE. 1991.** Active calcium transport by plant cell membranes. *J. Exp. Bot.* 42: 285-303.
- Fairley-Grenot KA, Assmann SM. 1992.** Permeation of Ca^{2+} through K^{+} channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *J. Membr. Biol.* 128: 103-113.
- Felle H. 1988.** Short-term pH regulation in plants. *Physiol. Plant.* 74: 583-591.
- Felle H. 1991.** Aspects of Ca^{2+} homeostasis in *Riccia fluitans*: reactions to perturbations in cytosolic-free Ca^{2+} . *Plant Sci.* 74: 27-33.
- Flora LF, Madore MA. 1993.** Stachyose and mannitol transport in olive. *Planta* 189: 484-490.
- Ganmore-Neumann R, Davidov S. 1993.** Uptake and distribution of calcium in rose plantlets as affected by calcium and boron concentration in culture solution. *Plant Soil* 155/156: 151-154.
- Goldbach HE, Blaser-Grill J, Lindermann N, Porzelt M, Hörrmann C, Lupp B, Gessner B. 1991.** Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic process. In: *Current topics in plant biochemistry and physiology.* Vol. 10. Randall DD, Blevins DG, Miles D. eds., University of Missouri-Columbia, Columbia, MO.
- Gupta UC, MacLeod JC. 1977.** Influence of calcium and magnesium sources on boron uptake and yield of alfalfa and rutabagas as related to soil pH. *Soil Sci.* 124: 279-284.
- Gupta UC. 1979.** Boron nutrition of crops. *Adv. Agron.* 31: 273-307.
- Harker FR, Venis MA. 1991.** Measurement of intracellular and extracellular free calcium in apple fruit cells using calcium selective microelectrodes. *Plant Cell Environ.* 14: 525-530.
- Häussling M, Jorns CA, Lehmbecker G, Hecht-Buchholz Ch, Marschner H. 1988.** Ion and water uptake in relation to root development in Norway spruce (*Picea abies* L.). *J. Plant Physiol.* 133: 486-491.
- Hille B. 1992.** *Ionic channels of excitable membranes.* Sunderland, MA., Sinauer Assoc.

- Hocking PJ, Pate JS. 1977.** Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. *Ann. Bot.* 41: 1259-1278.
- Hsieh WL, Pierce WS, Sze H. 1991.** Calcium-pumping ATPases in vesicles from carrot cells. Stimulation by calmodulin or phosphatidylserine, and formation of a 120 kilodalton phosphoenzyme. *Plant Physiol.* 97: 1535-1544.
- Hu H, Brown PH. 1994.** Localisation of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. Evidence for a structural role of boron in the cell wall. *Plant Physiol.* 105: 681-689.
- Hu H, Brown PH, Labavitch JM. 1996.** Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *J. Exp. Bot.* 47: 227-232.
- Hu H, Penn SG, Lebrilla CB, Brown PH. 1997.** Isolation and characterisation of soluble B-complexes in higher plants. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiol.* 113: 649-655.
- Huang C, Graham RD. 1990.** Resistance of wheat genotypes to boron toxicity is expressed at cellular level. *Plant Soil* 126: 295-300.
- Hu H, Brown PH. 1997.** Absorption of boron by plant roots. *Plant Soil* 193: 49-58.
- Ishii T, Matsunaga T. 1996.** Isolation and characterisation of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydr. Res.* 284: 1-9.
- Jauneau A, Cabin-Flaman A, Verduz MC, Ripoll C, Thellier M. 1994.** Involvement of calcium in the inhibition of endopolygalacturonase activity in epidermis cell wall of *Linum usitatissimum*. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 839-846.
- Jenkin M, Hu H, Brown P, Graham R, Lance R, Sparrow D. 1993.** Investigations of boron uptake at the cellular level. In: *Plant nutrition-from genetic engineering to field practice*. Barrow NJ, ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Jeschke WD, Pate JS. 1991.** Cation and chloride partitioning through xylem and phloem within the whole plant on *Ricinus communis* L. under conditions of salt stress. *J. Exp. Bot.* 42: 1105-1116.
- Jones JrJB, Wolf B, Mills HA. 1991.** *Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide.* Micro-Macron Publishing Inc., Athens, Georgia.
- Keren R, Bingham FT. 1985.** Boron in water, soils and plants. In: *Advances in soil science VI*. Stewart BA, ed., Springer-Verlag, New York.
- Keren R, Bingham FT, Rhoades JD. 1985.** Effect of clay content in soil on boron uptake and yield of wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49: 1466-1470.
- Konno H, Yamaya T, Yamasaki Y, Matsumoto H. 1984.** Pectic polysaccharide break-down of cell walls in cucumber roots grown with calcium starvation. *Plant Physiol.* 76: 633-637.

- Kreimer G, Melkonian M, Holtum JAM, Latzko E. 1988.** Stromal free calcium concentration and light-mediated activation of chloroplast fructose-1-6-bisphosphatase. *Plant Physiol.* 86: 423-428.
- Liu L, Shelp BJ, Spiers GA. 1993.** Boron distribution and retranslocation in field-grown broccoli. *Can. J. Plant Sci.* 73: 587-600.
- Loescher WH. 1987.** Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plant.* 70: 553-557.
- Loomis WD, Durst RW. 1992.** Chemistry and biology of boron. *Biofactors* 3: 229-239.
- Makkee M, Kieboom APG, van Bekkum H. 1985.** Studies on borate esters. III. Borate esters of D-mannitol, D-glucitol, D-fructose and D-glucose in water. *Recl. Trav. Chim. Pay-Bas* 104: 230-235.
- Malis-Arad S, Didi S, Mizrahi Y. 1983.** Pectic substances: changes in soft and firm tomato cultivars and in non-ripening mutants. *J. Hort. Sci.* 58: 111-116.
- Marschner H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Matoh T, Ishigaki K, Mizutani M, Matsunaga W, Tabake K. 1992.** Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for and intracellular localisation of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. *Plant Cell Physiol.* 33: 1135-1141.
- Matoh T, Ishigaki K, Ohno K, Azuma J. 1993.** Isolation and characterization of a boron-polysaccharide complex from radish roots. *Plant Cell Physiol.* 34: 639-642.
- Matoh T. 1997.** Boron in plant cell walls. *Plant Soil* 193: 59-70.
- Matsumoto H. 1988.** Repression of proton extrusion from intact cucumber roots and the proton transport rate of microsomal membrane vesicles of the roots due to Ca^{2+} starvation. *Plant Cell Physiol.* 29: 79-84.
- McDaniel CN. 1996.** Development physiology of floral initiation in *Nicotiana tabacum* L. *J. Exp. Bot.* 47: 465-475.
- McIlrath WJ. 1965.** Mobility of boron in several dicotyledonous species. *Botan. Gaz.* 126: 27-30.
- Mozafar A. 1989.** Boron effect on mineral nutrients of maize. *Agron. J.* 81: 285-290.
- Miller AJ, Sanders D. 1987.** Depletion of cytosolic free calcium induced by photosynthesis. *Nature* 326: 397-400.
- Miller AJ, Vogg G, Sanders D. 1990.** Cytosolic calcium homeostasis in fungi: roles of plasma membrane transport and intracellular sequestration of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9348-9352.
- Minorsky PV, Spanswick RM. 1989.** Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings. *Plant Cell Environ.* 12: 137-143.

- Mühling KH, Wimmer M, Goldbach HE. 1998.** Apoplastic and membrane-associated Ca^{2+} in leaves and root as affected by boron deficiency. *Physiol. Plant.* 102: 179-184.
- Oertli JJ, Grgurevic M. 1975.** Effect of pH on the absorption of boron by excised barley roots. *Agron. J.* 67: 278-280.
- Oertli JJ. 1994.** Non-homogeneity of boron distribution in plants and consequences for foliar diagnosis. *Comm. Soil. Sci. Plant Anal.* 25: 1133-1147.
- Ohki R. 1975.** Mn and B effect on micronutrients and P in cotton. *Agron. J.* 67: 204-207.
- Pinta M. 1973.** Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique. *Oleagineux.* 28: 87-92.
- Raven JA. 1980.** Short- and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytol.* 84: 231-249.
- Reid RJ, Smith FA. 1992.** Regulation of calcium influx in *Chara*. *Plant Physiol.* 100: 637-643.
- Rihouey Ch, Jauneau A, Cabin-Flaman A, Demarty M, Lefebvre F, Morvan C. 1995.** Calcium and acidic pectin distribution in flax cell walls: evidence for different kinds of linkages in the cell junction and middle lamella of the cortical parenchyma of flax hypocotyl. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 497-508.
- Rincon M, Hanson JB. 1986.** Controls on calcium ion fluxes in injured or shocked corn root cells: importance of proton pumping and cell membrane potential. *Physiol. Plant.* 67: 576-583.
- Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, Pozzan T. 1992.** Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature.* 358: 325-327.
- Roberts DM, Harmon AC. 1992.** Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 375-414.
- Robertson GA, Loughman BC. 1974.** Reversible effect of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba* L. *New Phytol.* 73: 291-298.
- Roblin G, Fleurat-Lessard P, Bonmort J. 1989.** Effects of compounds affecting calcium channels on phytochrome- and blue pigment-mediated pulvinar movements of *Cassia fasciculata*. *Plant Physiol.* 90: 697-701.
- Roe B, Bruemmer JH. 1981.** Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of Keitt mangos. *J. Food. Sci.* 46: 186-189.
- Rouse AH, Atkins CD. 1955.** Pectinesterase and pectin in commercial citrus juices as determined by methods used at the citrus experiment station. *Fla. Univ. Agric. Exp. Stn. Bull.* 570.
- Ruiz JM, Romero L. 1998.** Ca impact on P and its main bioindicators. Response in the roots and leaves of *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Nutr.* 21: 2273-2285.

- Ruiz JM, Rivero RM, Garcia PC, Baghour M, Romero, R. 1999.** Role of CaCl_2 in nitrate assimilation in leaves and roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Sci.* 141: 107-115.
- Rushing JW, Huber DJ. 1990.** Mobility limitations of bound polygalacturonase in isolated cell wall from tomato pericarp tissue. *J. Amer. Soc. Sci.* 115: 97-101.
- Schumucker T. 1933.** Zur blütenbiologie tropischer nymphaea-arten. II. (bor als entscheidender faktor). *Planta* 18: 641-650.
- Schumucker T. 1934.** Über den einfluss von borsäure auf pflanzen, insbesondere keimende pollenkner. *Planta* 23: 264-283.
- Shelp BJ, Shattuck VI, Proctor JTA. 1987.** Boron nutrition and mobility, and its relation to elemental composition of greenhouse grown root crops. II. Radish. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 18: 203-219.
- Shelp BJ, Shattuck VI. 1987a.** Boron nutrition and mobility, and its relation to elemental composition of greenhouse grown root crops. II. Rutabega. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 18: 187-201.
- Shelp BJ, Shattuck VI. 1987b.** Boron nutrition and mobility, and its relation to hollow stem and the elemental composition of greenhouse grown cauliflower. *J. Plant Nutr.* 10: 143-162.
- Shelp BJ. 1988.** Boron mobility and nutrition in broccoli. *Ann. Bot.* 61: 83-91.
- Shelp BJ, Shattuck VI, McLellan D, Liu L. 1992.** Boron nutrition and composition of glucosinolates and soluble nitrogen compounds in two broccoli cultivars. *Can. J. Plant Sci.* 72: 889-899.
- Shelp BJ. 1993.** Physiology and biochemistry of boron in plants. In: Boron and its role in crop production. Gupta UC, ed., CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Shelp BJ, Marentes E, Kitheka AM, Vivekanandan P. 1995.** Boron mobility in plants. *Physiol. Plant.* 94, 356-361.
- Shelp BJ, Vivekanandan P, Vanderpool RA, Kitheka AM. 1996.** Translocation and effectiveness of foliar-applied boron in broccoli plants of varying boron status. *Plant Soil* 183: 309-313.
- Schroeder JI, Hagiwara S. 1990.** Repetitive increases in cytosolic Ca^{2+} of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca^{2+} permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9305-9309.
- Singh V, Singh SP. 1984.** Effect of applied boron on nutrients and uptake by barley crop. *Curr. Agric.* 8: 86-90.
- Tanaka H. 1967.** Boron adsorption by plant roots. *Plant Soil* 27: 300-302.
- Tsien RW, Tsien RY. 1990.** Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 715-760.
- Tester M. 1990.** Plant ion channels: whole-cell and single-channel studies. *New Phytol.* 114: 305-340.
- Thellier M, Duval Y, Demarty M. 1979.** Borate exchanges of *Lemma minor* L. as studied with the help of the enriched stable isotopes and a nuclear reaction. *Plant Physiol.* 63: 283-288.
- Trewavas A, Gilroy S. 1991.** Signal transduction in plant cells. *TIG.* 7: 356-361.

van Goor BJ, van Lune P. 1980. Redistribution of potassium, boron, iron, magnesium and calcium in apple trees determined by an indirect method. *Physiol. Plant.* 48: 21-26.

Wilders RA, Neales TF. 1971. The absorption of boron by disks of plant storage tissues. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 873-884.

Wolf B. 1974. Improvement in the Azomethine-H method for determination of boron. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 5: 39-44.

Wolf B. 1982. A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 13: 1035-1059.

Yamauchi M. 1971. The role of B in higher plants. Relationship between B and Ca on the pectin substances in plants. *J. Sci. Soil Manure* 42: 207-213.

Yamauchi T., Hara T, Sonoda Y. 1986. Distribution of calcium and boron in the pectin fraction of tomato leaf cell wall. *Plant Cell Physiol.* 27: 729-732.

CAPITULO II. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE B Y Ca SOBRE EL METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN PLANTAS DE TABACO

I. Introducción

- I.1. Bioactividad de los fenoles en plantas superiores.
 - I.1.1. Generalidades
 - I.1.2. Síntesis de los compuestos fenólicos.
 - I.1.2.1. Ruta biosintética Shikimato/arogenato.
 - I.1.3. Oxidación de los compuestos fenólicos.
 - I.1.4. Funciones de los fenoles bajo condiciones de estrés.
 - I.1.5. Interacciones fisiológicas de los fenoles.
- I.2. Papel del B en el metabolismo de los fenoles.
- I.3. Papel del Ca en el metabolismo de los fenoles.

II. Objetivos

III. Material y métodos.

- III.1. Diseño experimental.
- III.2. Muestreo de las plantas.
- III.3. Análisis de las plantas.
- III.4. Análisis estadístico.

IV. Resultados.

V. Discusión.

VI. Conclusiones

VII. Referencias

I. Introducción.

I.1. Bioactividad de los fenoles en plantas superiores.

I.1.1. Generalidades.

Un fenol es un compuesto químico caracterizado por tener al menos un anillo aromático (C6) con uno o más grupos hidroxilos. Químicamente, los fenoles son sustancias reactivas, siendo capaces, la mayoría de estos compuestos, de unirse a átomos de hidrógeno. La unión al hidrógeno puede ser intramolecular, como entre el 5-hidroxil y el 4-carboxil en muchos flavonoides, e

intermolecular, siendo ésta última más importante ya que conlleva a interacciones entre los fenoles y los péptidos de proteínas y enzimas.

Otra propiedad importante de muchos fenoles con grupos o-hidroxy es su capacidad para quelatar metilos, siendo estos quelatos importantes biológicamente para las plantas. Finalmente, los fenoles son muy susceptibles a la oxidación y hay enzimas especiales presentes en las plantas las cuales realizan la oxidación de monofenoles a difenoles y de difenoles a quinonas (Harborne, 1989; Strack, 1997)

I.1.2. Síntesis de los compuestos fenólicos.

Existen distintas rutas bioenergéticas por las cuales se sintetizan todos los compuestos fenólicos (Harborne, 1989; Strack, 1997):

1.- La ruta shikimato/arogenato es la ruta principal de síntesis de la mayoría de los fenoles, y se realiza fundamentalmente a través de la fenilalanina, aunque algunos fenoles se sintetizan a partir de intermediarios que se generan en esta ruta, como por ejemplo algunas quinonas.

2.- La ruta acetato/malonato, la cual conduce a la síntesis de algunas quinonas y un largo grupo de flavonoides.

3.- La ruta acetato/mevalonato, que conduce, por deshidrogenación, a algunos compuestos terpenoides aromáticos, principalmente monoterpenos.

Como hemos indicado, la primera ruta (shikimato/arogenato) es la principal en la producción y síntesis de los compuestos fenólicos en las plantas.

I.1.2.1. Ruta biosintética shikimato/arogenato.

Esta ruta conduce a la formación de tres aminoácidos aromáticos: L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano. Estos aminoácidos son importantes precursores de las hormonas, tipo auxinas, y de varios compuestos secundarios incluidos los fenoles (Harborne, 1989; Strack, 1997).

Una vez que se produce la síntesis de estos compuestos y, especialmente, la de la L-fenilalanina, se inicia la ruta denominada fenilalanina/hidroxicinamato que es,

generalmente a través de la cual se forman la mayoría de los compuestos fenólicos. La reacción inicial, que es además la más importante y determinante en la síntesis de los fenoles, es el paso de la L-fenilalanina a E-cinamato. La fenilalanina amonoliasa (PAL, EC 4.3.1.5) es la enzima clave de la biosíntesis de los fenoles puesto que cataliza la desaminación no oxidativa de la fenilalanina, produciendo trans-acinamato. Esta enzima fue detectada por Koukol y Conn (1961) y se encuentra bien distribuida en la mayoría de las plantas superiores y también en muchos microorganismos (Camm y Towers, 1997). La PAL tiene un peso molecular de 330.000, un pH óptimo de 8.8 y no requiere cofactor. Algunas preparaciones de PAL, especialmente aquellas procedentes de césped, muestran actividad hacia la tirosina. En general, la PAL es especialmente específica hacia el sustrato que le da su nombre.

A partir del ácido cinámico producido por la acción de la PAL se producen varios compuestos fenólicos simples debido a reacciones de hidroxilación, metilación y deshidratación. Estos compuestos son el p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sinápico y las cumarinas. Estos tres ácidos raramente se acumulan a altos niveles en las células, por lo que se suelen unir generalmente a azúcares, a los carbohidratos de la pared celular (ésteres de ferulato) o a ácidos orgánicos (ej. ácido clorogénico). Los ácidos salicílico, benzoico y p-hidroxibenzoico, aunque no son estrictamente compuestos fenólicos, se originan a partir de compuestos como el cinamato y el p-cumárico (Leon et al., 1992; Yalpani et al., 1993). La lignina y la suberina son polímeros complejos formados por la mezcla de compuestos fenólicos simples, siendo su composición diferente dependiendo de la especie

vegetal (Whetten y Sederoff, 1995). Un gran número de compuestos fenólicos derivan del esqueleto C15 de los flavonoides, los cuales se sintetizan a través de la enzima chalcone-sintetasa, que cataliza la condensación del p-cumaril-coenzima-A con tres moléculas de malonil-CoA (Harborne, 1989). En la mayoría de las plantas el producto final de esta reacción es su tetrahidroxichalconato, el cual es convertido posteriormente en otras clases de flavonoides, tales como favones, flavonones, antocianinas y 3-deoxiantocianidinas (Holton y Cornish, 1995).

Finalmente, en varias especies vegetales la condensación del p-cumaril-CoA o cinamil-CoA con tres moléculas de malonil-CoA dan lugar a unos compuestos denominados "stilbenes" (Schridder et al., 1988). En leguminosas, a través de la enzima isoflavona sintasa se producen compuestos como isoflavonoides o isoflavones.

I.1.3. Oxidación de los compuestos fenólicos.

El metabolismo de los fenoles está regulado por la actividad de varias enzimas. Como hemos indicado anteriormente, la enzima principal y determinante de la síntesis de los fenoles es la PAL, mientras que en los procesos de oxidación, las enzimas que intervienen son la peroxidasa (POD. EC. 1.11.1.7) y principalmente la polifenoloxidasa (PPO. EC. 1.14.18.1)

La polifenoloxidasa (PPO), conocida también como catechol oxidasa, fenolasa o difenol-oxígeno oxidorreductasa, y la POD catalizan la oxidación de los difenoles a diquinonas, al igual que la hidroxilación de los

monofenoles (Vaughn y Duke, 1984). La PPO se encuentra localizada exclusivamente en los plastidios de tejidos sanos (Czaninski y Catesson, 1974; Barnun y Mayer, 1983; Vaughn y Duke, 1984), mientras que la mayoría de los compuestos fenólicos son localizados en las vacuolas (Vaughn y Duke, 1984), existiendo, por tanto, una separación de naturaleza fresca entre ambos compuestos.

Aunque algunos investigadores han encontrado relaciones entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad PPO en células o tejidos (Vaughn et al., 1981; Kojima y Conn, 1982), éstas son poco probables, dada la separación física y el estado latente de la PPO en vivo. Estas relaciones posiblemente sean debidas a la actividad POD, puesto que varios trabajos han encontrado relaciones muy estrechas entre la actividad POD y la oxidación de los fenoles (Bricage, 1982; Egley et al., 1983).

Se ha demostrado que la PPO que actúa directamente sobre los compuestos fenólicos en aquellos casos en los que se mezclan los contenidos del plasto y de la vacuola. Estos casos han sido divididos en dos categorías: i) senescencia y ii) estreses tanto bióticos como abióticos. En el primer caso, la PPO ha sido involucrada en la pigmentación oscura, síntoma usual de la muerte del tejido. El incremento de la actividad PPO durante la senescencia es debido a la activación de los procesos de su síntesis (Meyer y Biehl, 1981). En cuanto al estrés provocado por factores bióticos o abióticos, se produce un incremento en la actividad POD y PPO (Thypyapong et al., 1995; Söderhäll, 1995; Kwak et al., 1996; Cheng y Ccrisoto, 1995; McConchie et al., 1994; Vaughn y Duke, 1984)

I.1.4. Funciones de los fenoles bajo condiciones de estrés.

El ataque de patógenos, como virus, bacterias y hongos es una de los factores principales que determina modificaciones tanto en la acumulación como en el metabolismo de los fenoles. Los compuestos fenólicos inducidos por este tipo de estrés son definidos como fitoalexinas. Estos compuestos antimicrobianos son sintetizados en respuesta al ataque por patógenos. Entre las fitoalexinas, las hidroxycoumarinas y los hidroxycinamatos son los de mayor importancia (Bailey y Mansfield, 1982; Dixon et al., 1995). Los niveles de estos compuestos incrementan de forma importante alrededor del sitio de infección. Las concentraciones de ácido salicílico incrementan en respuesta a la infección y debido también a los rayos UV y al ozono (Rasmussen et al., 1991; Yalpani et al., 1994), pero más bien, y según las últimas investigaciones, el ácido salicílico muestra una actividad antimicrobiana "per se" formando parte de las señales que dan lugar a lo que se denomina resistencia sistémica adquirida (SAR) (Tenhaken y Rubel, 1997; Fodor et al., 1997; Wendehenne et al., 1998).

Muchos de los compuestos fenólicos son inducidos en respuesta a herbicidas o por la alimentación de los herbívoros. El incremento en los niveles de coumestrol y de coumarinas resulta tóxico para los herbívoros, causando en ellos efectos anticoagulantes y estrogénicos (Smith, 1982). Por otro lado, los fenoles son de gran importancia como material de soporte celular, ya que forman parte de la estructura de la pared celular, principalmente en forma de polímeros, tales como las ligninas y las suberinas, lo que da lugar a la formación de barreras físicas. La síntesis masiva de

estos polímeros es inducida tanto por los herbicidas, como por el ataque por patógenos (Hahbrock y Scheel, 1989; Bernards y Lewis, 1992).

Otro tipo de fenoles, como las antocianinas y los flavonoides, incrementan en respuesta a niveles de luz visible elevados, reduciéndose a través de esos compuestos la cantidad de luz alcanzada o captada por las células fotosintéticas (Beggs et al., 1987; Lois, 1994). Estos compuestos fenólicos protegen contra los daños de los rayos ultravioleta (UV), que producen generalmente dimerización y rotura del ADN celular.

Otro tipo de estreses, aunque menos estudiado, que produce la síntesis de compuestos fenólicos son los siguientes: Niveles determinados de antocianinas incrementan con un estrés provocado por el frío (Christie et al., 1994) y con un estrés nutricional, principalmente bajo la limitación de P.

Recientes investigaciones ponen de manifiesto que, bajo condiciones deficientes de N, ciertos fenoles pueden actuar como señales en proceso de reconocimiento entre bacterias fijadoras de nitrógeno y ciertas especies de plantas leguminosas. Estas plantas exudan a través de la raíz flavonoides, los cuales actúan selectivamente sobre los *Rhizobium* como inductores de la nodulación, activando los genes Nod (Graham, 1991; Wojtaszek et al., 1993). Finalmente, bajo condiciones limitantes de Fe también se puede producir un aumento de la liberación radicular de ácidos fenólicos, presumiblemente para ayudar a solubilizar los metales y facilitar así su absorción (Marschner, 1991).

I.1.5. Interacciones fisiológicas de los fenoles.

Aún no está todavía demasiado claro si los fenoles tiene un papel fisiológico en el

crecimiento y metabolismo de las plantas. Muchos de los compuestos fenólicos son claramente capaces de ejercer efectos significativos sobre los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas cuando éstos son aplicados en los tejidos de las plantas a concentraciones fisiológicas, aunque esto no indica que ellos tengan un papel endógeno.

¿Tienen los fenoles un papel como hormonas endógenas en las plantas superiores?. La contestación a esta pregunta es que la mayoría de los fenoles no muestran esta propiedad; sin embargo es posible que algunos fenoles sí puedan actuar como hormonas. A pesar de que la mayoría de los fenoles no son hormonas, ellos pueden afectar al crecimiento de la planta por interacción con alguna de las hormonas más comunes, como por ejemplo las auxinas. Varios investigadores se han centrado en el estudio de los fenoles sobre la IAA oxidasa, una enzima de tipo peroxidasa que es capaz de oxidar la auxina. Está bien establecido que la acumulación de ciertos fenoles producen la activación de esta enzima (Krylov et al., 1994; Volpert et al., 1995) y, por lo tanto, el aumento de la auxina, estimulando de esta manera el crecimiento de la planta.

Otra de las hormonas a las que pueden afectar los fenoles es el etileno. Es conocido que el ácido p-cumárico es necesario como cofactor para la biosíntesis del etileno (Mapson, 1970). Por otro lado, el ácido cafeico inhibe una enzima (tipo peroxidasa) cuyo cofactor es el ácido p-cumárico. Por lo tanto, el balance p-cumárico-ácido cafeico puede teóricamente influir en la regulación de la biosíntesis del etileno.

Los fenoles pueden reaccionar con otras hormonas por sinergismo o inhibición, y ambas situaciones han sido

observadas en el caso de la giberelina. Hay evidencias de que el dihidroxiconiferil-alcohol en lechuga muestra un efecto sinérgico sobre la giberelina estimulando la elongación del hipocotilo (Kamisaka y Shibata, 1997). Por el contrario, la sustitución del hidroxiconiferil-alcohol por uno o varios ácidos hidroxicinámicos da lugar a la inhibición de los efectos producidos por la giberelina.

En los anteriores ejemplos, los fenoles aparecen interaccionando específicamente con las hormonas para producir los efectos sobre el crecimiento. Está también claro que los fenoles pueden presentar efectos indirectos sobre los procesos fisiológicos. Por ejemplo, muchos fenoles son capaces de inhibir la síntesis del ATP en la mitocondria, afectar a la respiración (Deladonde et al., 1996) e inhibir la absorción radicular de ciertos iones por inhibición de la ATPasa (Erdei et al., 1994).

1.2. Papel del B en el metabolismo de los fenoles.

El ácido bórico tiene la particular habilidad de formar complejos estables con compuestos que presentan grupos cis-hidroxil (grupos cis-diol) (shelp, 1993). Varios compuestos, como los azúcares y sus derivados y algunos fenoles (o-difenoles) tienen estos grupos cis-diol y, por tanto, pueden formar complejos estables con el B.

La pared celular es una estructura rica en compuestos con configuración cis-diol. Por otro lado, se ha observado que el B es un elemento predominante en esta estructura, principalmente bajo condiciones de deficiencia (Matoh et al., 1992; Hu y Brown, 1994). Se ha encontrado que el B presente en la pared celular supone, aproximadamente, el 96% del total del B celular en células de *Daucus carota* (zanahoria) (Loomist y Durst, 1991). En células de tabaco, el B en la pared celular

supone el 90 y el 60 % del total del B celular bajo condiciones de deficiencia y normales de B respectivamente (Hu y Brown, 1994).

Incrementos en la concentración de los fenoles bajo condiciones de deficiencia de B son bien conocidas, particularmente en plantas que presentan altos requerimientos de B, tales como el girasol (Shkol'nik, 1984; Fawzra et al., 1994). La formación de complejos cis-diol en el B y en algunos azúcares o compuestos fenólicos juegan un papel decisivo en la acumulación de los fenoles en los tejidos deficientes de B. El B forma complejos con el ácido 6-fosfogluconico y, por tanto, se produce la inhibición de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Dugger, 1983), lo que conlleva a la existencia de más ácido 6-fosfogluconico libre en los tejidos deficientes en B. Consiguientemente, bajo condiciones de deficiencia de B, el sustrato es trasladado desde la glicolisis a la ruta de las pentosas fosfato, lo que conduce a un aumento de la síntesis de los fenoles (Dugger, 1983).

La formación de complejos B-fenoles puede también afectar a la cantidad de estos compuestos en los tejidos. Como indicaron Lewis (1980) y Pilbeam y Kirkby (1983) la unión de B y ácido cafeico bloquea la formación de quinonas y, por lo tanto, facilita la síntesis de fenoles.

La acumulación de fenoles en tejidos deficientes de B es un paso crítico en el inicio de distintas respuestas celulares, ya que la mayoría de los fenoles son conocidos por su fitotoxicidad, incluso a bajas concentraciones (1 μ M) (Vaughn y Ord, 1990). En plantas deficientes en B, el ácido cafeico, clorogénico, ferúlico y vanílico y algunas cumarinas se acumulan (Rajaratnam y Lowry, 1974), siendo esta acumulación más

pronunciada con un aumento en la intensidad luminosa (Marschner, 1995). La estimulación de la síntesis de los fenoles por incrementos en la intensidad luminosa es un fenómeno también demostrado (Chattopadhyay et al., 1994), y es atribuido a una inducción de la enzima PAL por la luz (Bolwee y Butt, 1983). Varios autores han reportado que la actividad PAL, independientemente de la intensidad luminosa, es incrementada por la deficiencia de B (shkol'nik, 1984; Fawzra et al., 1994).

La acumulación de fenoles en tejidos deficientes en B puede activar un grupo de enzimas que utilizan los fenoles como sustrato. En hojas de girasol deficientes en B la actividad PPO incrementa progresivamente a medida que van apareciendo los síntomas de deficiencia de B (Maschner, 1995). Plantas con diferente sensibilidad a la deficiencia de B difieren en la actividad PPO. La acumulación de los fenoles y la actividad PPO fue mayor en plantas más sensibles a la deficiencia de B, como el girasol, que en plantas como el maíz con menos sensibilidad (Shkol'nik, 1984).

La oxidación de los fenoles por la PPO y la POD en hojas deficientes en B conduce a la producción de quinonas. Estos compuestos son conocidos por su elevada toxicidad y por ser los responsables de la producción de radicales oxigenados (H_2O_2 , O_2) (Pillinger et al., 1994). La acumulación de cantidades de quinonas en plantas sensibles a la deficiencia de B ha sido considerada la mayor causa de daño celular y disminución de crecimiento bajo condiciones de deficiencia de B (Shkol'nik et al., 1981).

En la mayoría de los casos, la deficiencia de B está asociada con un aumento de la pigmentación marrón ("browning") en los tejidos foliares. En plantas de girasol, Cakmak et al. (1995) mostraron que la pigmentación foliar en

planas deficientes en B aumentaba por el incremento de la intensidad luminosa. Posiblemente, esta pigmentación sea causada en tejidos deficientes en B por el aumento en la concentración de fenoles y por su posterior oxidación por la PPO. Las quinonas producidas por la actividad PPO son consecutivamente polimerizadas dando lugar a esta pigmentación (Cakmak y Römheld, 1997). También en frutos, el desarrollo del color marrón durante la maduración o la postrecogida está asociado a altos niveles de fenoles y a la actividad PPO (Macheix et al., 1991).

Como hemos descrito, la mayoría de los trabajos que relacionan al B con el metabolismo de los fenoles se centran en el efecto de la deficiencia del B. Sin embargo, existen otros trabajos que muestran el efecto de dosis crecientes de B sobre el metabolismo de estos compuestos secundarios. Por ejemplo, Fawzra et al. (1994) encontraron que a medida que incrementaban las dosis de B aplicadas hasta 500 ppm se producía una disminución de la concentración de fenoles y de la actividad PAL y PPO, mientras que el efecto contrario se presentaba en la actividad POD. Posiblemente, la elevada actividad de la POD junto con la baja actividad de la PAL fuesen las causas en la disminución del contenido de fenoles a estas concentraciones altas de B aplicadas. Estos mismos autores encontraron respuestas totalmente contrarias bajo condiciones de deficiencia de B.

Finalmente, recientes investigaciones realizadas por Ruiz et al. (1998) han encontrado que se produce una acumulación foliar de los fenoles bajo la aplicación de dosis mínimas (0.5 μM) y máximas (20 μM) de B, mientras que la utilización de dosis intermedias de B (5 y 10 μM) producen la oxidación de los fenoles por un comportamiento

contrario al de las enzimas PPO y PAL, ya que las máximas actividades se presentaron con las dosis mínimas y máximas, disminuyéndose su actividad en las dosis intermedias. La explicación a estos comportamientos contrarios, según los autores, se puede basar en las dos distintas formas en las que se puede encontrar el B en las hojas, bien formando complejos con los fenoles, o bien de forma libre.

Según los autores, la dosis mínima (0.5 μM) y máxima (20 μM) de B reflejan, respectivamente, deficiencia y niveles elevados de B. En estas condiciones, la proporción de B libre es mínima, mientras que posiblemente, la proporción de B formando complejos con otros fenoles es elevada, puesto que otros trabajos indican que la aplicación de B a dosis deficientes o excesivas da lugar a la formación de complejos entre el B y el compuesto, como pectinas y fenoles (> 90% del B total) (Hu and Brown, 1994; Hu et al., 1996).

Este hecho explicaría la elevada actividad PAL, la baja disponibilidad de los fenoles para su oxidación y, por lo tanto, las bajas actividades PPO y POD, y las mayores concentraciones foliares de fenoles en estas dosis.

Por el contrario, las dosis intermedias de B (5 y 10 μM) dieron lugar a niveles adecuados de B, aumentándose posiblemente los niveles de B libre o metabólico. Éstos pueden producir una inhibición de la PAL y un incremento en la oxidación de los fenoles, debido principalmente a dos causas: 1) una mayor disponibilidad de los fenoles no acomplejados con el B y 2) un efecto del B libre aumentando las actividades PPO y POD, como ha sido reportado por Van Assche et al. (1990).

1.3. Papel del Ca en el metabolismo de los fenoles.

Al contrario que con el B, existen muy pocos trabajos que estudian directamente el efecto del Ca sobre el metabolismo de los fenoles.

Castañeda y Pérez (1996), trabajando con plantas de limonero, observaron que la aplicación de 10 μM de CaCl_2 incrementaba la actividad PAL una hora antes que cuando eran trabados únicamente con las paredes celulares del hongo *Alternaria alternata*, o cuando se inducía solamente por una lesión. Por lo tanto, los autores sugieren que la aplicación externa de Ca^{2+} aumenta o favorece las señales de transducción producidas por los “elicitors” o por la herida, con el fin de producir dos respuestas: una relacionada con la defensa de la planta, y otra con la reparación del daño producido por las heridas.

En definitiva, y según los resultados de este trabajo, el Ca^{2+} actuaría posiblemente como segundo mensajero. Sin embargo, y como indican los autores, es muy dificultoso determinar si el incremento de Ca citosólico, que conllevaría su actuación se debe a la entrada de Ca extracelular o a la salida de Ca procedente de otros orgánulos celulares.

Para determinar esto último, los autores administraron a las plántulas 50 μM de Varopimil, un compuesto muy conocido por ser un efectivo bloqueador de los canales de Ca. El resultado fue una disminución drástica en la absorción de Ca y también una disminución de la actividad PAL. Por otro lado, el incremento del Ca citoplasmático, procedente de la absorción del medio de cultivo, conllevaría a la aparición de una serie de señales de transducción que produciría la iniciación rápida y eficaz de unas respuestas contra el daño mecánico o el ataque de patógenos.

Finalmente, estos autores indican que las diferentes concentraciones de CaCl_2 añadidas al medio de reacción de la PAL no altera la actividad de esta enzima, lo que sugiere que el Ca está involucrado en la respuesta celular y no en la actividad de la enzima (Castañeda y Pérez, 1996).

Otra serie de trabajos nos muestran el efecto del Ca sobre las enzimas responsables de la oxidación de los fenoles. Söderhäll (1995) nos indican que la presencia de CaCl_2 incrementa la actividad PPO. Teniendo en cuenta que esta enzima se encuentra normalmente de forma latente, Söderhäll explica el incremento de la actividad PPO al añadir 6 mM de CaCl_2 por la alteración conformacional del sitio activo de la PPO, haciéndose accesible al sustrato.

En relación a la POD, Wan y Heinrich (1997) encuentran también un aumento de la actividad POD, tanto en hojas como en raíces, al incrementar en la solución nutritiva de 5 a 10 mM de CaCl_2 .

II. Objetivos.

El objetivo de este capítulo será estudiar la influencia de la aplicación conjunta de B y Ca sobre la bioactividad de los compuestos fenólicos (síntesis y oxidación de los fenoles).

Teniendo en cuenta las funciones esenciales que juegan estos compuestos en distintos procesos fisiológicos, así como en las respuestas adaptativas a distintos tipos de estrés, es de gran importancia conocer que factores determinan bien su síntesis y acumulación o bien su oxidación. Por lo tanto, es este capítulo trataremos de analizar como actúan sobre el metabolismo de los fenoles los nutrientes B y Ca aplicados conjuntamente a diferentes dosis.

III. Material y métodos.

III.1. Diseño experimental.

(Ver Capítulo I).

III.2. Muestreo de las plantas.

(Ver Capítulo I).

III.3. Análisis de las plantas.

III.3.1. Extracción y ensayo de la actividad fenilalanina-amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5).

La extracción de esta enzima fue llevada a cabo siguiendo el método propuesto por Lister et al. (1996). Un total de 2 g de material vegetal fresco (raíces y hojas) fue homogeneizado con 5-ml de buffer fosfato (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0) que contenía 5% de PVP (p/v), 50 mM de ascorbato sódico, 18 mM de mercaptoetanol, y 0.1% (v/v) de Tritón X-100. El homogenado fue filtrado y centrifugado a 13000 rpm durante 10 min. Una vez finalizada la centrifugación, se adiciono a los tubos de centrifuga 2-ml de una solución de sulfato amónico al 35% de saturación, y posteriormente se centrifugo la mezcla a 13000 rpm durante 20 min con el fin de eliminar el PVP. De nuevo, a los tubos de centrifuga se le añadió 2-ml de una solución de sulfato amónico al 85% de saturación, centrifugándose esta mezcla a 13000 rpm durante 20 min. El sobrenadante resultante de esta última centrifugación fue desechado, mientras que el residuo fue resuspendido con 2-ml de buffer de extracción sin PVP y Tritón. La solución resultante fue utilizada para la determinación de la actividad PAL. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-

4°C.

La cuantificación de las proteínas en el extracto enzimático se realizaron siguiendo el método de Bradford (1976).

La actividad PAL en el extracto enzimático se determino por medio de una modificación de los métodos de Zucker (1965) y MaCallum y Walker (1990). La mezcla de reacción consistía en 1.8-ml de buffer borato sódico 0.06M, pH 8.8, y 0.5-ml de extracto enzimático. La reacción se inicio por la adición de 0.5-ml de 11 mM de L-fenilalanina. Seguidamente los tubos fueron incubados en oscuridad durante 60 min a 30 °C, y la reacción fue parada por la adición de 0.25-ml de ácido trifluoroacético al 35% (p/v). Finalmente, estos tubos fueron centrifugados durante 5 min a 6500 rpm con el fin de retirar la proteína desnaturalizada. La actividad PAL fue determinada a partir de la producción de ácido cinámico, estimado a una longitud de onda de A_{290} , frente a una curva patrón de ácido cinámico (5-40 μmol).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco, el cual presentaba todos los reactivos excepto el ácido cinámico que fue reemplazado por buffer borato sódico. Por último, para cada muestra se realizo un control que no presentaba L-fenilalanina con el fin de eliminar así el posible ácido cinámico presente en el extracto enzimático. La actividad PAL se expreso como μmol de ácido cinámico mg^{-1} proteína h^{-1} .

III.3.2. Extracción y ensayo de la actividad polifenol-oxidasa (PPO, EC 1.14.18.1).

El método utilizado para la extracción de esta enzima fue el propuesto por Kahn (1985). Entre 0.5-1 g de material vegetal fresco fue homogeneizado con 5-ml de buffer fosfato (100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0) que contenía 1.5% de PVP (p/v). El homogenado fue

filtrado y centrifugado a 11000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante resultante fue utilizado para el ensayo de la actividad PPO. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a una temperatura de 0-4°C.

La cuantificación de las proteínas en el extracto enzimático se realizaron siguiendo el método de Bradford (1976).

La mezcla de reacción para la ensayo de la actividad PPO consistió en 1.95-ml de buffer fosfato (100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0), 50- μl de Tritón X-100 al 0.58% (v/v), y 50- μl de extracto enzimático. La reacción se inicio con la aplicación de 1-ml de ácido cafeico 30 μM . La actividad PPO, consistente en la desaparición enzimática por oxidación del ácido cafeico, fue medida mediante el cambio de absorbancia durante 5 min a una longitud de onda de A_{390} , y a una temperatura de 30°C.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco, el cual presentaba todos los compuestos presentes en la mezcla de reacción excepto el extracto enzimático que fue reemplazado por buffer fosfato. La actividad PPO se expreso como μmol de ácido cafeico oxidado mg^{-1} proteína min^{-1} .

III.3.3. Extracción y ensayo de la actividad peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7).

El método utilizado para la extracción de esta enzima fue el de Kalir et al. (1984). Un total de 1 g de material vegetal fresco fue homogeneizado con 6-ml de buffer tris-acetato 50 mM, pH 7.5, que contenía 2 mM de EDTA y 0.5% de PVP (p/v). El homogenado fue filtrado y centrifugado a 11500 rpm durante 10 min. Tras la centrifugación el residuo obtenido fue desechado, mientras que el

sobrenadante fue utilizado para los ensayos de la actividad POD. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a una temperatura de 0-4°C.

La cuantificación de las proteínas en el extracto enzimático se realizaron siguiendo el método de Bradford (1976).

La actividad POD fue determinada de acuerdo con el método de Kalir y Poljakoff-Mayber (1981) mediante el cambio de absorbancia durante 5 min a una longitud de onda de A_{485} debido a la oxidación del guaiacol. La mezcla de reacción contenida en 3 ml fue la siguiente: 0.5-ml de buffer tris-acetato 100 μM , pH 5.0, 0.5-ml de EDTA 1 μM , 0.75-ml de guaiacol 0.1 μM , 0.75-ml de H_2O_2 0.003 μM , y 0.5-ml de extracto enzimático.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco, el cual presentaba todos los compuestos presentes en la mezcla de reacción excepto el extracto enzimático que fue reemplazado por buffer tris-acetato. La actividad PPO se expreso como μmol de guaiacol oxidado mg^{-1} proteína min^{-1} .

III.3.4. Extracción y ensayo de la actividad ácido indolacético oxidasa (AIA oxidasa).

El procedimiento de extracción utilizado fue similar al descrito por Beffa et al. (1990). Una cantidad de 1 g de material vegetal fresco fue homogeneizado con 4-ml de buffer acetatoamónico 20 mM, pH 6.8. El homogenado fue centrifugado dos veces a 13000 rpm durante 20 min, y en cada vez el residuo obtenido fue desechado. Por lo tanto, el segundo sobrenadante fue utilizado como extracto enzimático para el análisis de la actividad AIA oxidasa. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a una temperatura de 0-4°C.

La cuantificación de las proteínas en el extracto enzimático se realizaron siguiendo el método de Bradford (1976).

La actividad AIA oxidasa fue

determinada siguiendo el método descrito por Talwar et al. (1985) y Beffa et al. (1990). La mezcla de reacción contenía un volumen final de 1.2-ml, formados por: 250- μ ml de buffer fosfato (6.66 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6.0), 250- μ l de MnCl_2 100 μM , 250- μ l de ácido p-cumárico 50 μM , 250- μ l de AIA 85.6 μM , y 200- μ l de extracto enzimático. Esta mezcla de reacción fue incubada en oscuridad durante 15 min a 30°C.

Tras esta incubación la reacción fue parada por la adición de 2-ml de reactivo de Salkowski, y de nuevo los tubos se incubaron en oscuridad durante 30 min a 30°C. El reactivo de Salkowski se obtuvo a partir de la mezcla de 3-ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.5 M con 60-ml de H_2SO_4 al 96-98%, y con 100-ml de agua bidestilada.

La absorbancia del color desarrollado durante la última incubación fue medido a una longitud de onda de A_{530} , resultado del AIA libre no oxidada por la enzima.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, un blanco que consistió en la omisión en el ensayo de AIA y extracto enzimático, y un estándar AIA que consistió en la mezcla de ensayo sin extracto enzimático, finalmente también se realizó un control para cada muestra sin AIA con el fin de averiguar la cantidad de AIA presente en el extracto enzimático. La actividad AIA se expresó como μg de AIA metabolizados mg^{-1} proteína 30 min^{-1} .

III.3.4. Extracción y cuantificación de los fenoles totales y ortodifenoles.

Los fenoles del material vegetal fresco fueron extraídos con metanol. Una cantidad de 0.5 g de material vegetal fue homogeneizado con 5-ml de metanol, 5-ml de cloroformo y 2.5-ml de una

solución de NaCl al 1%, todos ellos a una temperatura de 4°C. El homogenado fue filtrado y tras una centrifugación a 5000 rpm durante 10 min se obtuvieron las siguientes fases: fase metanólica, interfase y fase clorofórmica, siendo la solución metanólica la que se utiliza para la cuantificación de los fenoles totales y ortodifenoles.

Los fenoles totales fueron determinados por colorimetría a una longitud de onda de A_{765} ante una curva patrón de ácido cafeico (10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), utilizando para ello el reactivo de Folin-Ciocalteu, siguiendo el método propuesto por Singleton y Rossi (1965). La mezcla de reacción fue la siguiente: 1.5-ml de Na_2CO_3 al 2%, 0.5-ml de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50%, 2.75-ml de agua y 0.5-ml de la solución metanólica. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 1h se procedió a la determinación de los fenoles totales como indicábamos anteriormente.

El contenido en ortodifenoles fue determinado colorimetricamente a A_{360} ante una curva patrón de ácido cafeico (10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), como propone Johnson y Schaal (1957). La mezcla de reacción contenía: 1.8-ml de mezcla hidrometanólica (2/3 metanol + 1/3 agua), 1-ml H_2SO_4 0.1 N, 3-ml $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6$ al 10% (p/v) y 0.5-ml de extracto de la solución metanólica. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 30 min se procedió a la determinación de los ortodifenoles como indicábamos.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, un blanco que consistió en la sustitución del extracto por metanol. Los resultados, tanto de ortodifenoles como de fenoles totales, fueron expresados como μg de ácido cafeico g^{-1} p.f.

III.4. Análisis estadístico.

(Ver Capítulo I).

IV. Resultados.

Como indicábamos en la introducción la enzima responsable de la síntesis de los compuestos fenólicos en la PAL. En nuestra experiencia, la actividad enzimática PAL en raíces disminuyó con la aplicación de B ($F=618.61$, $P<0.001$) (Fig. 1a), presentándose en el tratamiento B3 una disminución en la actividad PAL del 46% en relación a la máxima obtenida en B1.

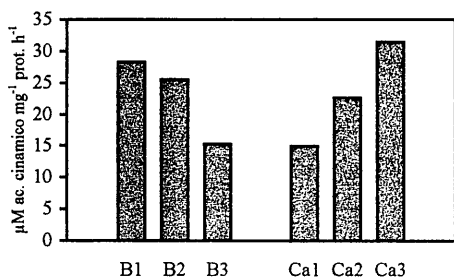


Figura 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad PAL en raíces (LSD= 0.78).

Por el contrario, la relación entre el Ca y la actividad PAL en raíces fue directamente proporcional, puesto que a medida que se aumentó las dosis de Ca al medio de cultivo incrementó la actividad PAL ($F=893.81$, $P<0.001$). La máxima actividad PAL se presentó en Ca3 con un incremento del 110% respecto a la mínima obtenida en Ca1 (Fig. 1a).

En cuanto a la existencia de algún tipo de interacción B-Ca ($F=83.44$, $P<0.01$), podemos observar en la figura 1b que la influencia del Ca sobre el efecto individual del B se produjo solamente al aplicar las dosis Ca3, puesto que cuando se aplicaron las distintas dosis de B con las dosis Ca1 y Ca2 predominó el efecto individual del B sobre la actividad PAL

anteriormente explicado. Sin embargo, y como acabamos de mencionar, la aplicación de Ca3 dio lugar a que el efecto del B sobre la actividad PAL fuera más significativo desde un punto de vista estadístico, presentándose diferencias entre los tres tratamientos de B (Fig. 1b). Según estos resultados podríamos indicar que el aumento en la aplicación de Ca (Ca3) en la solución nutritiva potenció el efecto negativo del B sobre la actividad PAL.

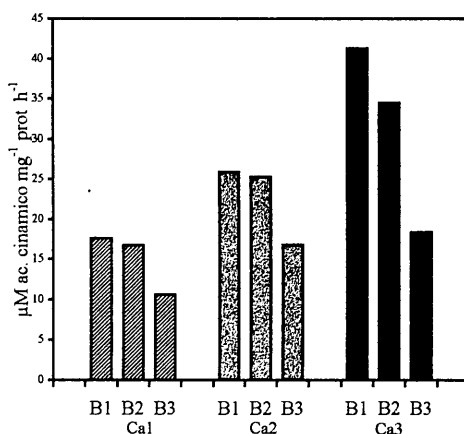


Figura 1b. Interacción B-Ca sobre la actividad PAL en raíces: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 1.36).

Con respecto a la influencia del B sobre el efecto individual del Ca (Fig. 1c), encontramos que independientemente de las dosis de B aplicadas, el aumento en la aplicación de Ca conllevó a un aumento de la actividad PAL, por lo que en este caso no se produjo ningún tipo de interacción.

En relación a las concentraciones radiculares de ortodifenoles y fenoles totales su comportamiento fue similar al mostrado por la actividad PAL. El efecto individual del B sobre estos parámetros fue inversamente proporcional, ya que un aumento en su aplicación supuso una disminución en las concentraciones radiculares de estos compuestos

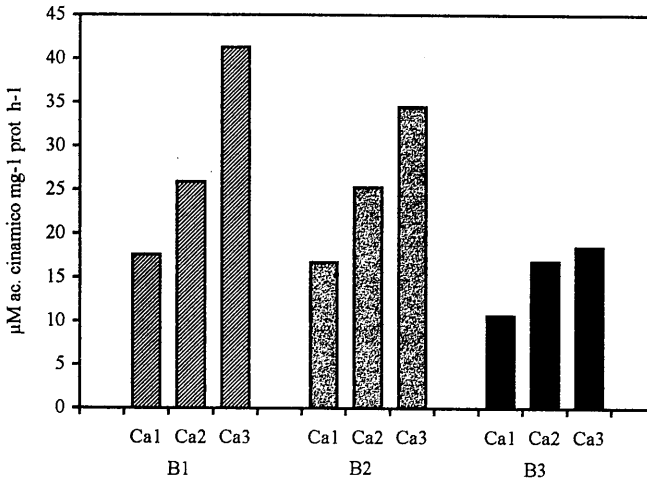


Figura 1c. Interacción B-Ca sobre la actividad PAL en raíces: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 1.36).

(Ortodifenoles, $F= 475.86$, $P< 0.001$; Fenoles totales, $F= 891.64$, $P< 0.001$) (Tabla 1a). Por el contrario, el efecto individual del Ca consistió en un aumento de las concentraciones radiculares de ortodifenoles y fenoles totales (Ortodifenoles, $F= 216.71$, $P< 0.001$; Fenoles totales, $F= 405.32$, $P< 0.001$) (Tabla 1a).

TABLA 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de ortodifenoles y fenoles totales.

	Ortodifenoles	Fenoles totales
B ₁	848.2	1898.3
B ₂	701.4	1576.9
B ₃	504.2	1138.5
LSD	22.5	36.4
Ca ₁	550.1	1246.9
Ca ₂	750.8	1632.2
Ca ₃	752.9	1734.6
LSD	22.5	36.4

Ortodifenoles y fenoles totales expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.f.

En cuanto a la interacción B-Ca (Ortodifenoles, $F= 34.19$, $P< 0.05$;

Fenoles totales, $F= 78.75$, $P< 0.05$), la influencia del Ca sobre el efecto individual del B (Tabla 1b) no se produjo cuando se aplicaron conjuntamente las dosis Ca₂ y Ca₃ con las distintas dosis de B. Por el contrario, cuando la dosis utilizada fue Ca₁ la disminución de las concentraciones radiculares de ortodifenoles y fenoles totales se produjo en B₃ (Tabla 1b).

TABLA 1b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de ortodifenoles y fenoles totales: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Ortodifenoles	Fenoles totales
Ca ₁ B ₁	617.2	1373.6
B ₂	593.4	1355.3
B ₃	439.8	1011.9
Ca ₂ B ₁	974.9	2057.4
B ₂	721.6	1598.7
B ₃	555.9	1240.6
Ca ₃ B ₁	952.6	2263.9
B ₂	789.2	1776.8
B ₃	516.9	1163.1
LSD	39.0	63.0

Ortodifenoles y fenoles totales expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.f.

Con respecto a la influencia del B sobre el efecto individual del Ca (Tabla 1c), ésta se diferencio dependiendo de la dosis de B empleada.

TABLA 1c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de ortodifenoles y fenoles totales: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Ortodifenoles	Fenoles totales
B ₁ Ca ₁	617.2	1373.6
Ca ₂	974.9	2057.4
Ca ₃	952.6	2263.9
B ₂ Ca ₁	593.4	1355.3
Ca ₂	721.5	1598.7
Ca ₃	789.2	1776.8
B ₃ Ca ₁	439.8	1011.9
Ca ₂	555.9	1240.6
Ca ₃	516.9	1163.1
LSD	39.0	63.0

Ortodifenoles y fenoles totales expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.f.

La aplicación conjunta de B3 con las dosis de Ca dio lugar a la no aparición del efecto individual de Ca, tanto en los ortodifenoles como en los fenoles totales, produciéndose incluso una disminución en la concentración de estos compuestos en B3Ca3 (Tabla 1c). Finalmente, la aplicación de la dosis B1 y B2 no supuso ningún cambio en el efecto individual de Ca sobre los ortodifenoles y fenoles totales, no apareciendo por lo tanto ningún tipo de interacción.

Como indicábamos en la introducción el metabolismo de los fenoles implica tanto su síntesis como su oxidación. Las enzimas encargadas de la oxidación de estos compuestos son principalmente la PPO y la POD. Con respecto a la PPO, el efecto del B no fue homogéneo ya que la máxima actividad se presento en B2 ($F= 101.61, P< 0.001$), con un incremento del 45% respecto a la mínima actividad de B1 (Tabla 2a). Por lo tanto, un aumento en la dosis de B

supuso un incremento de la actividad PPO.

TABLA 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad radicular de algunas enzimas oxidativas involucradas en el metabolismo de los fenoles.

	PPO	POD	AIAox
B ₁	5.21	2.93	1.48
B ₂	7.55	4.08	2.07
B ₃	6.99	6.44	2.53
LSD	0.34	0.29	0.11
Ca ₁	9.07	6.78	2.51
Ca ₂	5.77	3.95	1.85
Ca ₃	4.91	2.71	1.72
LSD	0.34	0.29	0.11

Polifenol oxidasa (PPO) expresada en $\mu\text{M ac. cafeico oxidado mg}^{-1}$ prot. min^{-1} ; Peroxidasa (POD) expresada en $\mu\text{M guaicol oxidado mg}^{-1}$ prot. min^{-1} . Acido Indolacético oxidasa (AIAox) expresada en $\mu\text{g AIA metabolizados mg}^{-1}$ prot. min^{-1} .

Al contrario que el B, el incremento en la aplicación de Ca conllevo una disminución inversamente proporcional en la actividad PPO ($F= 327.55, P< 0.001$), presentándose la mínima actividad en Ca3 con una disminución del 46% respecto a la máxima actividad PPO de Ca1 (Tabla 2a).

En cuanto al estudio de la interacción B-Ca ($F= 7.74, P> 0.05$), en la tabla 2b observamos la influencia del Ca sobre el efecto del B indicándonos que no existió ninguna influencia de este macronutriente, puesto que independientemente de la dosis aplicada de Ca siempre se observo el efecto individual del B, es decir máximas actividades PPO en las combinaciones con B2 y B3. Con respecto al efecto del B sobre el Ca (Tabla 2c), explicar que bajo las dosis B1 y B2 se observo el efecto individual del Ca sobre la PPO, presentándose las máximas actividades en Ca1. Solamente destacar que la aplicación conjunta de la dosis B3 con las dosis de Ca no supuso una disminución tan significativa de la actividad PPO puesto que las actividades de esta enzima en las combinaciones B3Ca2 y B3Ca3 fueron

similares (Tabla 2c). Teniendo en cuenta estos datos, el B bajo su dosis B3 podría contrarrestar el efecto negativo de las dosis de Ca (Ca3) sobre la actividad PPO.

TABLA 2b. Interacción B-Ca sobre la actividad radicular de algunas enzimas oxidativas involucradas en el metabolismo de los fenoles: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	PPO	POD	AIAox
Ca ₁ B ₁	7.58	4.61	1.91
B ₂	10.6	6.05	2.51
B ₃	9.01	9.68	3.10
Ca ₂ B ₁	4.73	2.92	1.29
B ₂	6.53	3.66	2.01
B ₃	6.04	5.28	2.24
Ca ₃ B ₁	3.32	1.25	1.23
B ₂	5.48	2.54	1.66
B ₃	5.94	4.35	2.26
LSD	0.60	0.51	0.18

Polifenol oxidasa (PPO) expresada en μM ac. cafeico oxidado mg^{-1} prot. min^{-1} ; Peroxidasa (POD) expresada en μM guaicol oxidado mg^{-1} prot. min^{-1} . Acido Indolacético oxidasa (AIAox) expresada en μg AIA metabolizados mg^{-1} prot. min^{-1} .

Otra de las enzimas que intervienen activamente en la oxidación de los fenoles es la POD. En la tabla 2a esta reflejado como influyeron las distintas dosis de B sobre esta actividad enzimática ($F= 292.59$, $P < 0.001$). El análisis estadístico nos reveló que la aplicación de B conllevó a un incremento proporcional de esta actividad enzimática, mostrando en B3 un incremento del 120% respecto a la mínima actividad de B1. En cuanto al efecto individual del Ca (Tabla 2a), y como ocurría también en el caso de la actividad PPO, éste fue muy significativo y negativo ($F= 398.71$, $P < 0.001$), es decir un aumento en la aplicación de Ca supuso una disminución de esta actividad enzimática. Por lo tanto, la máxima actividad se presentó en Ca1 mientras que la mínima en Ca3, con una

disminución del 60% (Tabla 2a).

En la tabla 2b analizamos el posible efecto del Ca sobre el efecto individual del B ($F= 17.03$, $P > 0.05$). En este caso indicar que independientemente de la dosis de Ca aplicadas se presentó el efecto individual del B sobre la actividad POD. Por otro lado, ninguna dosis de B influyó de forma alguna sobre el efecto individual presentado por el Ca ($F= 17.03$, $P > 0.05$). Independientemente de la dosis de B aplicada, el aumento en la aplicación de Ca supuso una disminución significativa de la actividad POD (Tabla 2c).

Finalmente, terminamos los resultados del metabolismo de los fenoles en las raíces de plantas de tabaco con el comportamiento de la actividad AIAox. Como ha ocurrido en las raíces en relación al comportamiento de las enzimas oxidativas, los efectos individuales del B y del Ca fueron similares a los explicados anteriormente. Es decir, un aumento del B conllevó a un incremento de la actividad radicular AIAox, presentándose la máxima actividad en B3 y la mínima en B1 con una disminución del 42% ($F= 204.87$, $P < 0.001$) (Tabla 2a). Por el contrario, el efecto del Ca sobre esta actividad enzimática en las raíces fue totalmente contrario, con la mínima actividad en Ca3 y la máxima Ca1 ($F= 133.77$, $P < 0.001$) (Tabla 2a).

En cuanto a los efectos de un elemento sobre otro ($F= 3.29$, $P > 0.05$), la interacción B-Ca no fue significativa puesto que predominaron los efectos individuales de ambos nutrientes (Tablas 2b y 2c).

TABLA 2c. Interacción B-Ca sobre la actividad radicular de algunas enzimas oxidativas involucradas en el metabolismo de los fenoles: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	PPO	POD	AIAox
B ₁ Ca ₁	7.58	4.61	1.91
Ca ₂	4.73	2.92	1.29
Ca ₃	3.32	1.25	1.23
B ₂ Ca ₁	10.6	6.05	2.54
Ca ₂	6.53	3.66	2.01
Ca ₃	5.48	2.54	1.66
B ₃ Ca ₁	9.01	9.68	3.10
Ca ₂	6.04	5.28	2.24
Ca ₃	5.94	4.35	2.26
LSD	0.60	0.51	0.18

Polifenol oxidasa (PPO) expresada en $\mu\text{M ac. cafeico oxidado mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$; Peroxidasa (POD) expresada en $\mu\text{M gualico oxidado mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$; Acido Indolacético oxidasa (AIAox) expresada en $\mu\text{g AIA metabolizados mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$.

Al igual que en raíces, iniciamos la descripción de los resultados del metabolismo de los fenoles en hojas con la actividad PAL. En la figura 2a se presentan los efectos individuales tanto del B como del Ca.

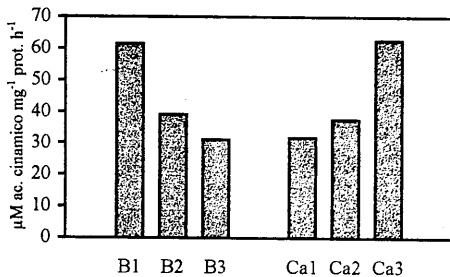


Figura 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad foliar PAL (LSD= 2.03).

Un aumento en la aplicación en la solución nutritiva de B conlleva a una disminución en la actividad PAL ($F=489.93, P<0.001$), presentándose la mínima actividad foliar en B3 con una disminución respecto a la máxima

actividad en B1 de un 50% (Fig. 2a). Por otro lado, la influencia del Ca fue totalmente contrario al del B, puesto que la máxima actividad PAL se presentó en Ca3 con un incremento del 97% en relación a la mínima actividad de Ca1 ($F=525.98, P<0.001$) (Fig. 2a).

En cuanto a la interacción B-Ca ($F=13.57, P>0.05$), y tras analizar los resultados de la figura 2b, podemos indicar que el Ca no influyó de manera muy importante sobre el efecto individual del B. Indicar solamente que bajo la dosis Ca3 no se presentó el efecto individual del B sobre la actividad enzimática PAL ya que las combinaciones Ca3B2 y Ca3B3 no presentaron diferencias significativas (Fig. 2b). Al igual que en el caso anterior, al aplicar la dosis B2 no se reflejó el efecto individual del Ca sobre la PAL puesto que no existieron diferencias significativas entre las combinaciones B2Ca1 y B2Ca2 (Fig. 2c).

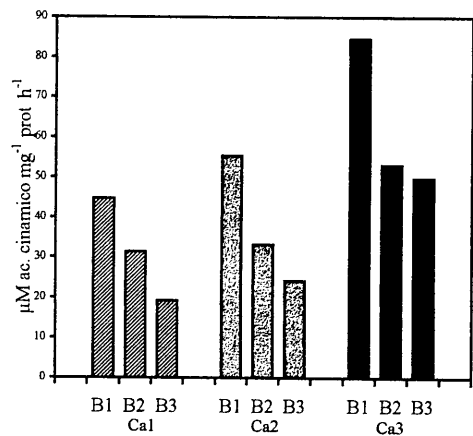


Figura 2b. Interacción B-Ca sobre la actividad foliar PAL : Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 3.51).

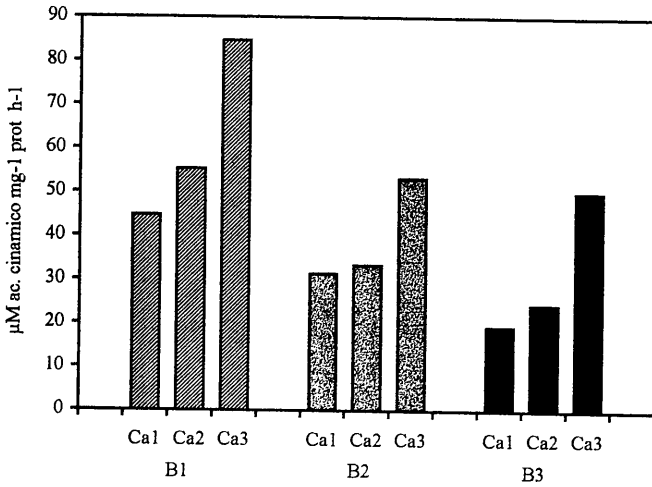


Figura 2c. Interacción B-Ca sobre la actividad foliar PAL: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 1.36).

En relación a la concentración foliar de los ortodifenoles y los fenoles totales, estos compuestos mostraron un comportamiento similar. La aplicación de la dosis de B supuso una disminución en las concentraciones de ambos compuestos (Ortodifenoles, $F= 934.26$, $P < 0.001$; Fenoles totales, $F= 16997.35$, $P < 0.001$), presentándose las máximas concentraciones en B1 y las mínimas en B3 (Tabla 3a).

TABLA 3a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de ortodifenoles y fenoles totales.

	Ortodifenoles	Fenoles totales
B ₁	1572.2	3467.4
B ₂	838.9	1814.1
B ₃	778.8	1691.5
LSD	41.2	21.7
Ca ₁	731.4	1617.1
Ca ₂	1129.0	2480.9
Ca ₃	1329.5	2874.9
LSD	41.2	21.7

Ortodifenoles y fenoles totales expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.f.

Como era de esperar, el Ca dio lugar al efecto contrario (Ortodifenoles, $F= 443.63$, $P < 0.001$; Fenoles totales, $F= 7152.25$, $P < 0.001$), ya que un aumento de la aplicación de Ca conlleva a un incremento paulatino de estos compuesto (Tabla 3a).

TABLA 3b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de ortodifenoles y fenoles totales: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca

	Ortodifenoles	Fenoles totales
Ca ₁ B ₁	791.2	1785.4
Ca ₂ B ₁	733.8	1675.2
Ca ₃ B ₁	669.2	1450.7
Ca ₁ B ₂	1818.3	4035.5
Ca ₂ B ₂	804.7	1741.6
Ca ₃ B ₂	772.2	1665.5
Ca ₁ B ₃	2115.0	4581.4
Ca ₂ B ₃	978.3	2085.4
Ca ₃ B ₃	895.1	1958.2
LSD	71.3	37.5

Ortodifenoles y fenoles totales expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.f.

La influencia de un elemento sobre otro también fue similar en ambos

compuestos puesto que no se observo ningún tipo de interacción B-Ca (*Ortodifenoles*, $F= 84.56$, $P> 0.05$; *Fenoles totales*, $F= 106.25$, $P> 0.05$) predominando los efectos individuales (Tablas 3b y 3c).

TABLA 3c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de ortodifenoles y fenoles totales: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Ortodifenoles	Fenoles totales
B ₁ Ca ₁	791.2	1785.4
Ca ₂	733.8	4035.5
Ca ₃	669.2	4581.4
B ₂ Ca ₁	1810.3	1615.2
Ca ₂	804.7	1741.6
Ca ₃	772.2	2085.4
B ₃ Ca ₁	2115.0	1450.7
Ca ₂	978.3	1665.5
Ca ₃	895.1	1958.2
LSD	71.3	37.5

Ortodifenoles y fenoles totales expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.f.

En cuantos a las enzimas oxidativas PPO y POD, su comportamiento en hojas también fue similar al igual que ocurría en raíces. Para ambas enzimas se encontró un aumento en sus actividades enzimáticas a medida que incrementaban las dosis de B (PPO, $F= 470.22$, $P< 0.001$; POD, $F= 889.12$, $P< 0.001$), presentándose las máximas actividades foliares PPO y POD en B₃ y las mínimas en B₁, con disminuciones del 51 y del 39% respectivamente (Tabla 4a). Por otro lado, la influencia del Ca se baso en una disminución de las actividades enzimáticas inversamente proporcional al aumento de la aplicación de este catión (PPO, $F= 943.41$, $P< 0.001$; POD, $F= 2061.32$, $P< 0.001$). Las máximas actividades foliares PPO y POD se presentaron en Ca₁ y las mínimas en Ca₃ con disminuciones del 61 y del 52%

respectivamente (Tabla 4a).

TABLA 4a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad foliar de algunas enzimas oxidativas involucradas en el metabolismo de los fenoles.

	PPO	POD	AIAox
B ₁	3.05	1.97	0.80
B ₂	4.67	2.58	0.92
B ₃	6.20	3.22	1.48
LSD	0.21	0.06	0.07
Ca ₁	7.12	3.61	1.47
Ca ₂	4.03	2.43	0.96
Ca ₃	2.77	1.73	0.76
LSD	0.21	0.06	0.07

Polifenol oxidasa (PPO) expresada en $\mu\text{M ac. caféico oxidado mg}^{-1}$ prot. min^{-1} ; Peroxidasa (POD) expresada en $\mu\text{M guaicol oxidado mg}^{-1}$ prot. min^{-1} . Acido Indolacético oxidasa (AIAox) expresada en $\mu\text{g AIA metabolizados mg}^{-1}$ prot. min^{-1} .

Mientras que no se observo ninguna influencia de las dosis de Ca en el efecto individual del B sobre la actividad PPO ($F= 37.32$, $P> 0.05$) (Tabla 4b), en el caso de la actividad foliar POD las dosis Ca₁ y Ca₂ modificaron parcialmente el efecto del B sobre esta actividad enzimática ($F=126.96$, $P< 0.01$). Cuando se aplico Ca₁ con B₂ se produjo una disminución de la actividad enzimática POD en relación a la actividad obtenida en Ca₁B₁, en lugar de un aumento como nos mostró el efecto individual del B (Tabla 4b). Mientras que la aplicación de Ca₂ supuso la no existencia de diferencias estadísticas entre las combinaciones Ca₂B₂ y Ca₂B₃, diferencia que si existieron en el efecto individual del B (Tabla 4b).

En cuanto a la influencia del B sobre el efecto individual del Ca (PPO, $F= 37.32$, $P< 0.05$; POD, $F= 126.96$, $P> 0.05$) solamente se presento en la actividad PPO (Tabla 4c), puesto que en el caso de la POD predomino el efecto individual del Ca. Destacar que la actividad PPO en las combinaciones B₁Ca₂ y B₁Ca₃ fue similar sin diferencias estadísticas, hecho que no se mostraba al estudiar el efecto individual del

Ca.

Finalmente, el comportamiento de la actividad foliar AIAox fue similar a las enzimas PPO y POD, encontrándose un aumento en la actividad enzimática a medida que incrementaba la dosis de B (B3) (F= 201.74, P< 0.001) (Tabla 4a), y una disminución en la actividad enzimática a medida que incrementaba la dosis de Ca (Ca3) (F= 200.75, P< 0.001) (Tabla 4a).

TABLA 4b. Interacción B-Ca sobre la actividad foliar de algunas enzimas oxidativas involucradas en el metabolismo de los fenoles: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	PPO	POD	AIAox
Ca ₁ B ₁	4.78	3.25	1.43
B ₂	7.16	3.08	1.19
B ₃	9.39	4.51	1.77
Ca ₂ B ₁	2.29	1.65	0.54
B ₂	4.27	2.82	0.90
B ₃	5.53	2.87	1.42
Ca ₃ B ₁	2.05	1.05	0.41
B ₂	2.58	1.83	0.64
B ₃	3.67	2.28	1.23
LSD	0.36	0.10	0.13

Polifenol oxidasa (PPO) expresada en μM ac. cafeico oxidado mg^{-1} prot. min^{-1} .; Peroxidasa (POD) expresada en μM guaicol oxidado mg^{-1} prot. min^{-1} . Acido Indolacético oxidasa (AIAox) expresada en μg AIA metabolizados mg^{-1} prot. min^{-1} .

En cuanto al estudio de la interacción B-Ca (F= 16.12, P> 0.05), indicar que no se presento ningún tipo de interacción ya que predominaron los efectos individuales sobre la actividad AIAox (Tablas 4b y 4c).

TABLA 4c. Interacción B-Ca sobre la actividad foliar de algunas enzimas oxidativas involucradas en el metabolismo de los fenoles: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	PPO	POD	AIAox
B ₁ Ca ₁	4.78	3.25	1.43
Ca ₂	2.29	1.60	0.54
Ca ₃	2.05	1.05	0.41
B ₂ Ca ₁	7.16	3.08	1.19
Ca ₂	4.27	2.82	0.90
Ca ₃	2.58	1.83	0.64
B ₃ Ca ₁	9.39	4.51	1.77
Ca ₂	5.53	2.87	1.42
Ca ₃	3.67	2.28	1.23
LSD	0.36	0.10	0.13

Polifenol oxidasa (PPO) expresada en μM ac. cafeico oxidado mg^{-1} prot. min^{-1} .; Peroxidasa (POD) expresada en μM guaicol oxidado mg^{-1} prot. min^{-1} . Acido Indolacético oxidasa (AIAox) expresada en μg AIA metabolizados mg^{-1} prot. min^{-1} .

V. Discusión.

Como indicábamos en la introducción de este capítulo, tanto el B como el Ca influyen directamente sobre el metabolismo de los fenoles. Por lo tanto, además de estudiar las relaciones de los distintos parámetros pertenecientes a este proceso metabólico, también es interesante analizar cómo influyen las concentraciones de B_t y Ca_t sobre la síntesis y oxidación de los fenoles, tanto en raíces como en hojas.

El metabolismo de los fenoles está regulado por la actividad de varias enzimas. El primer paso esencial para la síntesis de los fenoles en plantas superiores es la desaminación de la L-fenilalanina para producir ácido trans-cinámico y amonio. Esta reacción es catalizada por la PAL, la cual es comúnmente definida como la enzima clave en la biosíntesis de los fenoles (Hao et al., 1996; Ritenoour and Salvait, 1996; Rösler et al., 1997). La actividad PAL es afectada por numerosos factores, como la luz, la temperatura, los bioreguladores, las lesiones, los pesticidas y el estatus nutricional de ciertos nutrientes (Jones, 1984; Ruiz et al., 1998; Nemet Alla and Younis, 1995). Entre los nutrientes, de los que se han comprobado su influencia sobre esta actividad enzimática, mencionar al B y al Ca. Se ha observado que bajo condiciones de deficiencia de B se produce un aumento de la actividad PAL (Bolwell and Butt, 1983; Shkol'nik, 1984; Fawzra et al., 1994; Cakmak et al., 1995; Cakmak and Römheld, 1997). Por otro lado, Ruiz et al. (1998) encontraron que tanto la aplicación de 0.5 μ M como de 20 μ M de B conlleva a un aumento de esta actividad enzimática. En relación al Ca, y aunque existen muy pocas investigaciones al respecto, Castañeda y Pérez (1996) reportaron que el aumento en la concentración de $CaCl_2$ suponía un

aumento en la actividad PAL.

En nuestra experiencia, tanto en raíces como en hojas, el comportamiento de la actividad PAL fue el mismo. Un aumento en la aplicación de B en la solución nutritiva supuso un incremento de la actividad PAL (Figs. 1a y 5^a), mientras que el aumento en los niveles de Ca conllevó a un aumento de la actividad PAL, tanto en raíces como en hojas (Figs. 1a y 5a). Las relaciones de la actividad enzimática con B_t y el Ca_t nos reflejan que en nuestra experiencia fue exclusivamente la concentración de B_t , tanto en raíces como en hojas, las que influyen significativamente sobre la actividad PAL (raíz: PAL- B_t , $r = -0.84$ ***; PAL- Ca_t , $r = 0.13$ ns; Hojas: PAL- B_t , $r = -0.85$ ***; PAL- Ca_t , $r = 0.07$ ns). Por lo tanto, un aumento en la concentración de B en su forma total de lugar a una disminución de la actividad PAL. Esta disminución se produce fundamentalmente cuando se aplica la dosis de 20 μ M de H_3BO_3 . Como indicábamos, una característica de los tejidos deficientes en B es el aumento de la actividad PAL (Shkol'nik, 1984; Fawzra et al., 1994). En nuestra experiencia, aunque no se producen condiciones de deficiencia de B, las máximas actividades PAL, tanto en raíces como en hojas, se encuentran cuando las concentraciones de B_t son bajas. Por lo tanto, aumentos en los niveles del B_t pueden actuar inhibiendo la actividad PAL. Este hecho, además, podría explicar por qué se produce un aumento en la actividad PAL cuando se incrementan las dosis de Ca (Figs. 1a y 5a). El aumento en las dosis de Ca, como indicábamos en el Capítulo I, da lugar a una disminución en las concentraciones de B_t , tanto en hojas como en raíces (Tabla o Figs. del Cap.I), lo que produciría, por lo tanto, un aumento en la actividad PAL. Posiblemente, en las investigaciones realizadas por Castañeda y Pérez (1996) el hecho de aplicar conjuntamente paredes celulares del hongo y $CaCl_2$, conlleva a un

efecto facilitador incrementando la actividad PAL, resultado que no se produce cuando el CaCl_2 es aplicado individualmente.

Como describíamos, la PAL es la enzima clave en la biosíntesis de los fenoles. La relación positiva obtenida, tanto en raíces como en hojas, entre estos dos parámetros confirman esta idea (Raíces: PAL-fenoles, $r = 0.89^{***}$; PAL-ortodifenoles, $r = 0.84^{***}$; Hojas: PAL-fenoles, $r = 0.84^{***}$; PAL-ortodifenoles, $r = 0.84^{***}$). Las concentraciones máximas de ortodifenoles y fenoles totales, tanto radicales como foliares, se producen con las dosis mínimas de B_t y las máximas concentraciones de Ca (Ca_3) (Tablas 1a y 2a), que son en los tratamientos con los niveles de B_t más bajos de la experiencia.

Por otro lado, en el metabolismo de los fenoles también están involucradas enzimas oxidativas, tales como la PPO y la POD, las cuales catalizan la oxidación de los fenoles a quinonas (Vaughn and Duke, 1984; Egley et al., 1983). Un gran número de trabajos han demostrado que esta enzima incrementa en respuesta a estreses tanto bióticos como abióticos (Söderhäll, 1995; Thipyapong et al., 1995). La influencia del B y del Ca sobre estas enzimas ha sido probada en varios trabajos. En cuanto al B, la acumulación de los fenoles en los tejidos deficientes en este micronutriente puede dar lugar a la activación de estas enzimas oxidativas (Cakmak et al., 1995; Cakmak and Römhald, 1997). Por el contrario, Ruiz et al. (1999) observaron como, a medida que aumentaba la dosis de B, se producía un incremento de la actividad PPO y POD, produciéndose este hecho hasta que las concentraciones de B_t en hojas era muy elevada ($> 80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{p.s}$) a partir de las cuales, de nuevo, disminuían esas actividades enzimáticas. En cuanto al Ca,

Söderhäll (1995) nos indica que la presencia de 6mM de CaCl_2 produce la activación de la PPO en su forma latente, puesto que el CaCl_2 conlleva un cambio conformacional del sitio activo de la PPO, haciéndose accesible al sustrato. En relación a la POD, Kim y Heinrich (1997) encontraron un aumento de la actividad PPO, tanto en raíces como en hojas, al incrementar en la solución nutritiva de 5 a 10 mM el CaCl_2 .

En nuestra experiencia las actividades PPO y POD, tanto en hojas (Figs. 6a y 7a) como en raíces (Figs.2a y 3a), presentaron la misma dinámica aumentando proporcionalmente al incrementar las dosis de B, y disminuyendo a medida que se aumentaban las dosis de Ca. Las relaciones existentes entre el B_t y el Ca_t nos muestran de nuevo que es solamente el B el que influye en estas actividades enzimáticas (Raíz: B_t -PPO, $r = 0.81^{***}$; B_t -POD, $r = 0.91^{***}$; Ca_t -PPO, $r = -0.26$ ns; Ca_t -POD = -0.08 ns; Hojas: B_t -PPO, $r = 0.95^{***}$; B_t -POD, $r = 0.90^{***}$; Ca_t -PPO, $r = 0.28$ ns; Ca_t -POD = -0.28 ns). Por lo tanto, en nuestra experiencia las concentraciones de Ca_t no tienen influencia sobre estas enzimas. Por el contrario, a medida que se aumentan las concentraciones radicales y foliares de B_t se produce un aumento, tanto de la actividad PPO como de la actividad POD.

En cuanto a las relaciones de estas enzimas oxidativas con las concentraciones foliares y radicales de fenoles totales y ortodifenoles (Raíces: PPO-Fenoles totales, $r = -0.69^{***}$; POD ortodifenoles, $r = -0.80^{***}$; POD-Fenoles totales, $r = -0.82^{***}$; POD-ortodifenoles, $r = -0.80^{***}$; Hojas: PPO-Fenoles totales, $r = -0.68^{***}$; PPO-ortodifenoles, $r = -0.67^{***}$; POD-Fenoles totales, $r = -0.79^{***}$; POD-ortodifenoles, $r = -0.82^{***}$) deducimos que las bajas concentraciones radicales y foliares de estos compuestos obtenidos en nuestra experiencia se deben, por un lado a las mínimas actividades PAL, y por otro lado a

las máximas actividades PPO y POD en aquellos tratamientos donde las concentraciones de B_t fueron las máximas. Estas condiciones se presentan en nuestra experiencia con las máximas dosis de B aplicadas (B3) y con las mínimas de Ca (Ca1).

Destacar, por último, que, teniendo en cuenta estas relaciones, parece ser que la principal enzima encargada de la oxidación de los fenoles ha sido en nuestra experiencia la POD. Esto es lógico si tenemos en cuenta la separación espacial que existe entre la PPO y los fenoles, lo que hace disminuir su actividad (Vaughn and Duke, 1984).

Como han reportado distintos trabajos (Hu and Brown, 1994; Hu et al., 1996; Ruiz et al., 1998) los niveles de B parecen influir sobre el metabolismo de los fenoles. Cuando el B es aplicado bajo condiciones deficientes o excesivas, la mayoría de éste forma complejos (>90% del contenido), principalmente con pectinas y fenoles, incrementando de esta forma la estabilidad de la pared celular y de la membrana plasmática. En contraste, cuando el B es aplicado a niveles adecuados, más del 60% de su contenido permanece en forma libre ejerciendo así distintas funciones fisiológicas.

En nuestra experiencia, y como indicábamos en el Capítulo I, a medida que se aumentan las dosis de B la proporción de B unido a pectinas no aumenta de forma proporcional, incrementando así el B3, posiblemente, la concentración del B libre, tanto en raíces como en hojas (Ver Capítulo I). Por el contrario, la aplicación B1 la cantidad de B unido a pectinas en relación con el B_t fue la más elevada, presentándose posiblemente en este tratamiento las concentraciones mínimas de B libre, tanto en raíces como en hojas.

Teniendo en cuenta estas

hipótesis, en el tratamiento B1, y al igual que ocurren en plantas deficientes en B, se produce una mayor síntesis y acumulación de los fenoles, posiblemente debido a las siguientes razones (i) bajos niveles de B libre que ejercen un efecto negativo sobre la actividad PAL (ii) unión del B a los fenoles, lo que hace que no estén disponibles para su oxidación, disminuyendo así las actividades PPO y POD.

Por el contrario, en los tratamientos B2, y principalmente en B3, podrían existir niveles adecuados de B libre o metabólico. Los altos niveles de B libre influirían posiblemente en la disminución de la actividad PAL (Ruiz et al., 1999) e incrementarían la oxidación de los fenoles, debido principalmente a dos causas: (i) una mayor disponibilidad de los fenoles no unidos al B (Cakmak et al., 1995) y (ii) el efecto del B incrementando la actividad de las enzimas oxidativas PPO y POD (Van Assche and Clijsters, 1990; Ruiz et al., 1998; Ruiz et al., 1999).

Por otro lado, y como describíamos en la introducción de este capítulo (2.1.4. Interacciones fisiológicas de las plantas), aunque la mayoría de los fenoles no son hormonas, algunos pueden afectar al crecimiento de las plantas a través de la interacción con alguna de ellas, como por ejemplo, las auxinas. Varias investigaciones se han centrado en el efecto de los fenoles sobre la actividad IAA oxidasa, una enzima tipo peroxidasa que es capaz de oxidar la auxina. Está bien establecido que la acumulación de ciertos fenoles (ortodifenoles) producen la inhibición de esta enzima (Krylov et al., 1994; Volpert et al., 1995) y, por lo tanto, el aumento de los niveles de auxina, estimulándose de esta manera el crecimiento de las plantas. En nuestra experiencia, la relación, tanto en hojas ($r = -0.87^{***}$) como en raíces ($r = -0.77^{***}$) entre la actividad IAA oxidasa y las concentraciones de ortodifenoles fue

negativa y significativa, al igual que los resultados obtenidos por Krylov et al. (1994) y por Volpert et al. (1995). Por lo tanto, en nuestra experiencia, un aumento en la concentración de los ortodifenoles dio lugar a una disminución de la actividad IAA oxidasa.

Al igual que con las otras enzimas oxidativas estudiadas PPO y POD, la actividad IAA oxidasa fue influenciada directamente por las concentraciones de B_t en raíces (Fig 4a) y en hojas (Fig 8a) el incremento de las concentraciones de B_t dio lugar a un aumento de la actividad IAA oxidasa (Raíz: B_t -IAAox, $r = 0.85^{***}$; Hoja: B_t -IAAox, $r = 0.90^{***}$). Esta relación entre ambos parámetros explicaría los resultados obtenidos tras analizar los efectos individuales. Como describíamos, el aumento en la aplicación de B da lugar a un incremento proporcional de la actividad IAA oxidasa, debido a que se produce un aumento de las concentraciones radiculares y foliares del B_t . Por el contrario, un aumento de las dosis de Ca conlleva a una disminución de esta actividad enzimática, puesto que el aumento de Ca produce una disminución en las concentraciones de B_t . Finalmente, y con respecto al Ca_t , no existe ninguna relación entre este catión y la actividad IAA oxidasa, ni en raíces ($r = 0.21$ ns) ni en hojas ($r = -0.13$ ns).

V.I. Conclusiones.

Tras haber discutido los efectos individuales del B y del Ca sobre los distintos parámetros del metabolismo de los fenoles, pasamos a dar explicación a las interacciones que se han producido en nuestra experiencia. El análisis de las interacciones a través de los anovas parerilos (Influencia del Ca sobre el efecto individual de B y viceversa) nos

indican que existen distintos tipos de interacciones, las cuales podemos dividir en 4 tipos o clases:

Primera: La primera se basa en que, cuando el B es aplicado con una dosis de Ca, se produce un potenciamiento del efecto individual del B. En general, en aquellos parámetros en los cuales no se producen diferencias estadísticas entre B_2 y B_3 , la aplicación conjunta con cualquier dosis de Ca conduce a que existan diferencias estadísticas entre Ca_xB_1 , Ca_xB_2 y Ca_xB_3 . Por ejemplo, en los casos de la actividad PAL en raíces (Fig 1b) y en hojas (Fig 5b) y en las concentraciones foliares de fenoles y ortodifenoles (Tablas 1b y 2b) la aplicación conjunta de B con Ca supone un aumento efectivo individual del B.

El hecho de que el Ca acentúe el efecto individual del B se puede explicar mediante la relación existente entre la aplicación de Ca y los niveles radiculares y foliares de B_t . Como indicábamos, en nuestra experiencia solamente ha sido el B el que ha influido sobre el metabolismo de los fenoles, tanto en raíces como en hojas. Teniendo en cuenta que un aumento en la concentración de Ca conlleva una disminución estadísticamente significativa en las cocentraciones radiculares y foliares de B_t , la relación estrecha en nuestra experiencia entre el B_t y los distintos parámetros del metabolismo de los fenoles podría explicar la influencia del Ca sobre el efecto individual del B a través de una disminución de las concentraciones del B_t . Destacar que estas interacciones se producen principalmente en aquellos parámetros donde sus incrementos dependen de la disminución de la concentración del B_t .

Segunda: En cuanto a la segunda interacción, y al igual que ocurría en la primera interacción explicada, el B influye acentuando el efecto individual del Ca, siendo ésta la interacción más común en nuestra experiencia. Como indicábamos, el

efecto individual del Ca se debe a que, el aumento en la aplicación de Ca da lugar, tanto en hojas como en raíces, a una disminución en la concentración de B_t . Por lo tanto, y conociendo, por un lado, la relación positiva entre las dosis de B y las concentraciones de B_t , y, por otro lado, la influencia del B sobre el metabolismo de los fenoles, es lógico que el B acentúe el efecto individual del Ca, que se produce a través de su influencia sobre el B_t . Estas interacciones se produjeron en las actividades enzimáticas PAL foliar (Fig 5c), IAA oxidasa radicular (Fig. 4c) y foliar (Fig 8c) y en las concentraciones radiculares y foliares de fenoles y ortodifenoles (Tablas 1c y 2c respectivamente).

Tercera: La no aparición del efecto individual del Ca, principalmente cuando se aplica este elemento con la dosis de B3. Concretamente, las concentraciones radiculares de fenoles y ortodifenoles (Tabla 1c) en el tratamiento B3Cu3 fueron menores que en las obtenidas en B3Cu2, a pesar de que el efecto individual del Ca nos muestra un efecto contrario. También, en cuanto a la actividad PPO radicular (Fig. 2c), ésta fue igual en los tratamientos B3Cu2 y B3Cu3, a pesar de que el incremento de Ca supone una disminución de esta actividad enzimática. Estas dos interacciones que acabamos de describir se podrían explicar por el hecho de que al aplicar la máxima dosis de B (B3) la disminución en las concentraciones de B_t , que supone un aumento en la concentración de Ca (Ca2a y Ca3), no se produzca mínimamente o, simplemente, no se produzca, lo que produciría que el efecto del Ca sobre ciertos parámetros del metabolismo fenólico, a través de la disminución de B_t , no se produjera.

Finalmente, una interacción de este tipo también se observa en la

actividad PPO foliar (Fig. 6c), puesto que, aunque el efecto individual del Ca conlleva a una disminución de esta actividad, ésta no es observada entre las combinaciones B1Ca2 y B1Ca3, presentando estas combinaciones actividades enzimáticas similares sin diferencias estadísticas. En este caso, y como se muestra en la Tabla — del Cap. I, las concentraciones de B_t fueron iguales en ambas combinaciones, lo que explica el comportamiento similar de la PPO.

Cuarta: Finalmente, las combinaciones que a continuación vamos a describir nos indican una posible interacción del Ca, como han revelado varios trabajos (Tomasbarberan et al., 1997; Kawai et al., 1995), puesto que los efectos individuales del B no se reflejan. Estas interacciones se muestran en las hojas y sobre las enzimas oxidativas, como la POD (Fig. 7b) y la IAA oxidasa (Fig. 8b). Para la primera enzima observamos que el aumento de B no produce un incremento en la actividad POD cuando se aplica conjuntamente con Ca1 (Ca1B1 > Ca1B2) y Ca 2 (Ca2B2 = Ca2B3). En cuanto a la IAA oxidasa, el aumento de B, de B1 a B2, no sólo no produce un aumento de esta actividad enzimática, sino que la disminuye cuando se aplica conjuntamente con Ca1. Estos efectos son muy complicados de explicar si tenemos en cuenta que las concentraciones de B_t fueron el único factor que influyó sobre el metabolismo de los fenoles en nuestra experiencia. Según estas combinaciones, el aumento de la concentración de B bajo la dosis de Ca1 y Ca2 supondría un aumento en la concentración de B_t y esto no daría lugar a la aparición del efecto individual del B. Sin embargo, en estas combinaciones también se están aumentando las concentraciones de Ca_t en hojas, las cuales podrían dar lugar a una disminución en las actividades de estas enzimas oxidativas, como ha sido demostrado por distintos

trabajos, como los de Tomasbarberan et al. (1997) y Kawai et al. (1995).

VII. Referencias.

- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bailey JA, Mansfield JW.** eds. 1982. *Phytoalexins*. John Wiley and Sons, New York.
- Barnun N, Mayer AM.** 1983. Suppression of catechol oxidase by norleucine in plant suspension cultures. *Phytochem.* 22: 1329-1333.
- Beffa R, Martin HV, Pilet PE.** 1990. In vitro oxidation of indolacetic acid by soluble auxin-oxidases and peroxidases from maize roots. *Plant Physiol.* 94: 485-491.
- Beggs CJ, Kuhn K, Böker R, Wellmann E.** 1987. Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapsis alba* L.) cotyledons: enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 172: 121-126.
- Bernard MA, Lewis NG.** 1992. Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochem.* 31: 3409-3412.
- Bolwell GP, Butt VS.** 1983. Photoinduced changes in o-dyphenol oxidase and p-coumarate hydroxylase activities in spinach bett seedlings and leaves. *Phytochem.* 22: 37-45.
- Bricage P.** 1982. Pigmentation and soluble peroxidase isozyme patterns of leaves of *Pedilanthus tithymaloides* L. variegatus as a result of daily temperature differences. *Plant Physiol.* 69: 668-671.
- Cakmak I, Kurz H, Marschner H.** 1995. Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. *Physiol. Plant.* 95: 11-18.
- Cakmak I, Römheld V.** 1997. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil* 193: 71-83.
- Camm EL, Towers GHN.** 1977. Phenylalanine ammonia lyase. *Prog. Phytochem.* 4: 169-188.
- Castañeda P, Perez LM.** 1996. Calcium ions promote the response of citrus limon against fungal elicitors or wounding. *Phytochem.* 42: 595-598.
- Chattopadhyay S, Datta SK, Mahato SB.** 1994. Production of L-DOPA from cell suspension culture of *Mucuna pruriens* f. *pruriens*. *Plant Cell Rep.* 13: 519-522.
- Cheng GW, Crisoto CH.** 1995. Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 835-838.
- Chritie PJ, Alfenito MR, Walbot V.** 1994. Impact of low temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194: 541-549.
- Czaninski Y, Catesson AM.** 1974. Polyphenoloxidases. In: *Electron microscopy of enzymes*. Hayat MA. ed., Van Nostrand Reinhold, New York.

- Delalonde M, Barret Y, Coumans MP. 1996.** Development of phenolic compound in maize anthers (*Zea mays*) during cold pretreatment prior to androgenesis. *J. Plant Physiol.* 149: 612-616.
- Díaz J, Merino F. 1998.** Wound-induced shikimate dehydrogenase and peroxidase related to lignification in pepper (*Capsicum annum L.*) leaves. *J. Plant Physiol.* 152: 51-57.
- Dixon RA, Paiva NL. 1995.** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dugger WM. 1983.** Boron in plant metabolism. In: *Encyclopedia of plant physiology, new series.* Vol. 15. Lauchli A, Bielecki RL. Springer-Verlag, Berlin.
- Egley GH, Paul RN, Vaughn KC, Duke SO. 1983.** Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in *Sida spinosa L.* *Planta* 157: 224-232.
- Erdei L, Szabo-Nagy A, Laszlavik M. 1994.** Effects of tannin and phenolics on the H⁺ATPase activity in plant plasma membrane. 144: 49-52.
- Fawzia SA, Al-Whaibi MH, El-Hirweris SO. 1994.** Influence of boron concentrations on some metabolites of date palm and sorghum seedlings. *J. Plant Nutr.* 17: 1037-1052.
- Fodor J, Gullner G, Ádám AL, Barna B, Kömives T, Király Z. 1997.** Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. Role in systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 114: 1443-1451.
- Graham TL. 1991.** Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissue and in seed and root exudates. *Plant Physiol.* 95: 594-603.
- Hahlbrock K, Scheel D. 1989.** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 347-369.
- Hao Z, Charles DJ, Yu L, Simon JE. 1996.** Purification and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*. *Phytochem.* 43: 735-739.
- Harborne JB. 1989.** Plant Phenolics. In: *Methods in plant biochemistry.* Dey PM, Harborne JB. eds. Academic Press, London.
- Holton TA, Cornish EC. 1995.** Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083.
- Hu H, Brown PH. 1994.** Localisation of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. Evidence for a structural role of boron in the cell wall. *Plant Physiol.* 105: 681-689.
- Hu H, Brown PH, Labavitch JM. 1996.** Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *J. Exp. Bot.* 47: 227-232.
- Johnson G, Schaal LA. 1957.** Chlorogenic acid and other orthodihydrophenols on scab-resistant russet burbank and scab-susceptible triumph potato tubers of different maturities. *Phytopathol.* 47: 253-255.
- Jones DH. 1984.** Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochem.* 23: 1349-1359.

- Kalir A, Poljakoff-Mayber A. 1981.** Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione portulacoides* (L.) Aellen, exposed to high sodium chloride concentrations. *Ann. Bot.* 47: 75-85.
- Kalir A, Omri G, Poljakoff-Mayber A. 1984.** Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity. *Physiol. Plant.* 62: 238-244.
- Kahn V. 1985.** Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushrooms, avocado and banana. *J. Food Sci.* 50: 111-115.
- Kamisaka S, Shibata K. 1977.** Anticotyledon factor: competitive inhibitor of dihydroconiferyl alcohol in stimulating GA₃ induced lettuce hypocotyl elongation. *Plant Cell Physiol.* 18: 1057-1066.
- Kawai T, Hikawa M, Ono Y. 1995.** Effects of calcium-sulfate and sublimed sulfur on incidence of internal browning in roots of Japanese radish. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 64: 79-84.
- Kim WT, Heinrich G. 1997.** Effect of strontium on chlorophyll content, peroxidase activity, and iron distribution in cell walls. *J. Plant Nutr.* 20: 255-269.
- Kojima M, Conn EE. 1982.** Tissue distributions of chlorogenic acid and of enzymes involved in its metabolism in leaves of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol.* 70: 922-925.
- Koukol J, Conn EE.** Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236: 2692-2698.
- Krylov SN, Krylova SM, Chebotarev IG, Chebotareva AB. 1994.** Inhibition of enzymatic indole-3-acetic acid oxidation by phenols. *Phytochem.* 36: 263-267.
- Kwak SS, Kim SK, Park IH, Liu JR. 1996.** Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochem.* 43: 565-568.
- Lagrimini LM. 1992.** Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants over expressing peroxidase. *Plant Physiol.* 96: 577-583.
- León J, Yalpani N, Raskin I, Lawton MA. 1993.** Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103: 323-328.
- Lewis DH. 1980.** Boron, lignification and the origin of vascular plants a unified hypothesis. *New Phytol.* 84: 209-229.
- Lister CE, Lancaster JE, Walker JRL. 1996.** Phenylalanine ammonia-lyase activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand-grown apple cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 121: 281-285.
- Lois R. 1994.** Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. II. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta* 194: 504-509.

- Loomis WD, Durst RW. 1991.** Boron and cell walls. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 10: 149-178.
- Macheix JJ, Sapis J, Fleuriet A. 1991.** Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30: 441-486.
- Mapson LW. 1970.** Biosynthesis of ethylene and the ripening of fruit. *Endeavour* 39: 29-33.
- Marschner H. 1991.** Root-induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere. In: *Plant roots, the hidden half.* Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, eds. Marcel Dekker Inc. New York.
- Marschner H. ed. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Matoh T, Ishigaki K, Mizutani M, Matsunaga W, Tabake K. 1992.** Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for and intracellular localisation of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. *Plant Cell Physiol.* 33: 1135-1141.
- McCallum JA, Walker JRL. 1990.** Phenolic biosynthesis during grain development in wheat: changes in phenylalanine ammonia-lyase activity and soluble phenolic content. *J. Cereal Sci.* 11: 35-49.
- McConchie R, Lang NS, Lax AR, Lang GA. 1994.** Reexamining polyphenol oxidase, peroxidase and leaf-blackening activity in *Protea*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119: 1248-1254.
- Meyer HU, Biehl E. 1981.** Activation of latent phenolase during spinach leaf senescence. *Phytochem.* 20: 955-959.
- Nemat Alla MM, Younis ME. 1995.** Herbicide effects on phenolic metabolism in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) seedlings. *J. Exp. Bot.* 46: 1731-1736.
- Pilbean DJ, Kirkby EA. 1983.** The physiological role of boron in plants. *J. Plant Nutr.* 6: 563-582.
- Pillinger JM, Coope JA, Ridge I. 1994.** Role of phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw. *J. Chem. Ecol.* 20: 1557-1569.
- Rasmussen JB, Hammerschmidt R, Zook MN. 1991.** Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 97: 1342-1347.
- Rajaratnam JA, Lowry JB. 1974.** The role of boron in the oil-palm (*Elaeis guinensis*). *Ann. Bot.* 38: 193-200.
- Ritenour MA, Saltveit ME. 1996.** Identification of a phenylalanine ammonia-lyase inactivating factor in harvested head lettuce (*Lactuca sativa*). *Physiol. Plant.* 97: 327-331.
- Rösler J, Krekel F, Amrhein N, Schmid J. 1997.** Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* 113: 175-179.
- Ruiz JM, Bretones G, Baghour M, Belakbir A, Romero L. 1998.** Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochem.* 48: 269-272.

- Ruiz JM, Garcia PC, Rivero RM, Romero L. 1999.** Response of phenolic metabolism to the application of carbendazim plus boron in tobacco. *Physiol. Plant. En prensa.*
- Schröder G, Brown JWS, Schröder J. 1988.** Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur. J. Biochem.* 172: 161-169.
- Shelp BJ. 1993.** Physiology and biochemistry of boron in plants. In: Boron and its role in crop production. Gupta UC, ed., CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Shkolnik MY. 1984.** Trace elements in plants. In: *Developments in crop science.* Elsevier, New York.
- Singleton VL, Rossi JAJr. 1965.** Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16: 144-158.
- Smith DA. 1982.** Toxicity of phytoalexins. In: *Phytoalexins.* Bailey JA, Mansfield JW. eds. John Wiley and Sons, New York.
- Söderhäll I. 1995.** Properties of carrot polyphenoloxidase. *Phytochem* 39: 33-38.
- Strack D. 1997.** Phenolic metabolism. In: *Plant biochemistry.* Dey PM, Harborne JB. eds. Academic Press, London.
- Talwar G, Dendsay JPS, Gupta VK. 1985.** Kinetic properties of IAA oxidase from mung bean cotyledons. *Phytochem.* 24: 673-676.
- Tenhaken R, Rübel C. 1997.** Salicylic acid is needed in hypersensitive cell death in soybean but does not act as a catalase inhibitor. *Plant Physiol.* 115: 291-298.
- Thipyapong P, Hunt MD, Steffens JC. 1995.** Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochem.* 40: 673-676.
- Tomasbarberan FA, Gil MI, Castaner M, Artes F, Salveit ME. 1997.** Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *J. Agricul. Food Chem.* 45: 583-589.
- Zucker M. 1965.** Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 40: 779-784.
- Van Assche F, Clijsters H. 1990.** Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13: 195-206.
- Vaughn KC, Miller PD, Wilson KG. 1981.** Ultrastructural localization of polyphenoloxidase in *Aegopodium podagraria*. *Cytobios.* 31: 27-36.
- Vaughn KC, Duke SO. 1984.** Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112.
- Vaughan D, Ord BG. 1990.** Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. *J. Sci. Food Agric.* 52: 289-299.
- Volpert R, Osswald W, Elstner EF. 1995.** Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochem.* 38: 19-22.

Wendehenne D, Durner J, Chen Z, Klessig DF. 1998. Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochem.* 47: 651-657.

Whetten R, Sederoff R. 1995. Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-1013.

Wolf B. 1982. A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 13: 1035-1059.

Wojtaszek P, Stobiecki M, Gulewicz K. 1993. Role of nitrogen and plant growth regulators in the exudation and accumulation of isoflavonoids by roots of intact white lupin (*Lupinus albus* L.) plants. *J. Plant Physiol.* 142: 689-694.

Yalpani N, Leon J, Lawton MA, Raskin I. 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103: 315-321.

Yalpani N, Enyedi AJ, Leon J, Raskin I. 1994. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193: 372-376.

CAPÍTULO III. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE B Y Ca SOBRE LA ASIMILACIÓN DE NITRATOS EN PLANTAS DE TABACO

I. Introducción

I.1. Generalidades sobre el metabolismo nitrogenado.

I.1.1. Absorción de NO_3^- . Mecanismos de transporte.

I.1.2. Translocación de NO_3^- .

I.1.3. Asimilación de NO_3^- . Enzimas involucradas.

I.1.3.1. Nitrato reductasa.

I.1.3.2. Nitrito reductasa.

I.1.3.3. Glutamina sintetasa.

I.1.3.4. Glutamato sintasa.

I.1.3.5. Fosfoenolpiruvato carboxilasa.

I.1.4. Regulación del metabolismo nitrogenado.

I.2. Papel del B en los procesos de asimilación de NO_3^- .

I.3. Papel del Ca en los procesos de asimilación de NO_3^- .

II. Objetivos

III. Material y métodos.

III.1. Diseño experimental.

III.2. Muestreo de las plantas.

III.3. Análisis de las plantas.

III.4. Análisis estadístico.

IV. Resultados.

V. Discusión.

VI. Conclusiones

VII. Referencias

I. Introducción.

I.1. Generalidades sobre el metabolismo nitrogenado.

De los macronutrientes requeridos por las plantas, el N es el nutriente más consumido y a menudo se define como el factor limitante para el crecimiento y desarrollo de estas. Las formas disponibles de N para las plantas varían dependiendo del hábitat, e incluyen N_2 molecular, formas volátiles de amonio u óxidos de nitrógeno (NH_3 ,

NO_x), formas inorgánicas (NO_3^- y NH_4^+) y formas orgánicas (urea, aminoácidos). En muchos suelos, especialmente en los destinados a la agricultura, los nitratos son las formas nitrogenadas más abundante, los nitratos además también son una importante señal de crecimiento para las plantas, puesto que responden a esta forma nitrogenada alterando su metabolismo e induciendo los genes que intervienen en los procesos de la asimilación del N. Estos genes codifican a transportadores que son capaces de absorber los NO_3^- del medio exterior, y

codifican a todas las enzimas responsables de dar lugar en las células a los compuestos orgánicos nitrogenados (Glass y Siddiqi, 1995; Crawford, 1995; Owata, 1995; Von Wiren et al., 1997; Crawford y Glass, 1998).

Los procesos de absorción, translocación y asimilación de NO_3^- son independientes y muestran una regulación muy estrecha en las plantas superiores. La existencia de NO_3^- en el medio de cultivo da lugar a un aumento en la absorción y asimilación de estos (Deane-Drummond, 1990; Redinbaugh y Campbell, 1991). Estas primeras respuestas a la presencia de NO_3^- , se deben a la existencia de un sistema constitutivo de proteínas sensibles a la señal de los NO_3^- . Este sistema regula la transcripción de los genes necesarios para la expresión de estas respuestas iniciales (absorción y asimilación) en las plantas superiores (Redinbaugh y Campbell, 1991; Campbell, 1996).

Por otro lado, la translocación de NO_3^- depende de la absorción de estos por el sistema radicular; sin embargo estos dos procesos parecen ser regulados diferentemente, puesto que la translocación de NO_3^- es más sensible que la absorción al ser la primera restringida por el suplemento de carbohidratos, por las bajas temperaturas, inhibidores metabólicos y privación de K (Jackson et al., 1986). Finalmente, una vez que se ha producido la acumulación de NO_3^- en las células estos están disponibles para su asimilación, por lo tanto, una asimilación de NO_3^- dependerá en gran parte de una continua absorción de este anión (Zhay y Mackown, 1993).

Los niveles intracelulares de NO_3^- es uno de los factores más importantes que afectan a la absorción y asimilación de NO_3^- en plantas (Deane-Drummond, 1990; Crawford, 1995; Sivasankar y Oaks, 1996; Gojon et al., 1998; López-

Cantarero et al., 1997; Ruíz et al., 1998; Ruíz y Romero, 1998, 1999; Ruíz et al., 1999). Cambios en la cantidad y actividad NR son paralelas a la acumulación y desaparición de NO_3^- en los tejidos de las plantas. Plantas con altos niveles de NO_3^- a menudo muestran una baja absorción de este anión, quizás como consecuencia de la aparición de mecanismos de regulación asociados con los elevados niveles de NO_3^- intracelulares, y con los bajos niveles de N en plantas (Mackown et al., 1983; Cooper y Clarkson, 1989; Siddiqi et al., 1990).

En definitiva, la dependencia entre los procesos de absorción, translocación y asimilación de NO_3^- hace difícil la interpretación fisiológica de la absorción y asimilación de NO_3^- , así como del estatus nutricional del N.

I.1.1. Absorción de NO_3^- . Mecanismos de transporte.

La absorción de NO_3^- por la planta es el principal factor intrínseco que influye en la posterior asimilación de NO_3^- (Crawford, 1995; Glass y Siddiqi, 1995; Sivasankar y Oaks, 1996).

La mayoría de las plantas exhiben un sistema bifásico para la absorción de NO_3^- , típicamente descrito como de alta afinidad y baja afinidad a la absorción de este anión. En general, ambos sistemas de absorción requieren energía incluso cuando la concentración externa de NO_3^- esta en el rango de mM (Crawford y Glass, 1998; Glass y Siddiqi, 1995; Miller y Smith, 1996; Sivasankar and Oaks, 1996). La energía para la absorción del ión proviene de la creación de un gradiente de concentración, por medio del funcionamiento de las ATPasa de membrana, el cual es adecuado para la absorción de NO_3^- . Además, la absorción de NO_3^- esta asociado con la

despolarización de la membrana plasmática (es decir con el aumento de las cargas positivas dentro de la célula) (Crawford y Glass, 1998).

Teniendo en cuenta estos dos procesos, ha sido propuesto que la absorción de NO_3^- es mediada por un mecanismo simporte $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ para los sistemas tanto de alta como de baja afinidad (Miller y Smith, 1996; Meharg y Blatt, 1995).

Las raíces poseen al menos tres sistemas de transporte de NO_3^- cinéticamente distintos (Glass y Siddiqi, 1995; Crawford y Glass, 1998): i) un sistema de transporte constitutivo de alta afinidad inducido rápidamente por la presencia de NO_3^- y saturable a bajas concentraciones de NO_3^- en el medio ($< 1 \text{ mM}$); ii) unos transportadores de alta afinidad que son inducidos entre horas y días de la exposición a los NO_3^- ; y iii) finalmente después unos transportadores constitutivos de baja afinidad, los cuales pueden contribuir en la absorción de NO_3^- a partir de concentraciones en el medio de $250 \mu\text{M}$ hasta 50 mM .

Evaluaciones termodinámicas demuestran que la absorción de NO_3^- por éste último sistema es también activo, a pesar de la respuesta lineal a la concentración (Glass y Siddiqi, 1995; Glass et al., 1992).

Los dos sistemas de alta afinidad son regulados o inducidos en respuesta a los NO_3^- . Los transportadores de alta afinidad a los NO_3^- han sido más estudiados y se ha comprobado su inducción por los NO_3^- o NO_2^- (Aslam et al., 1992; Kronzucker et al., 1995). Los transportadores de alta afinidad son rápidamente activados por la demanda de NO_3^- de la parte aérea, para posteriormente ser inactivados o disminuida su actividad después de la exposición a los NO_3^- (Glass y Siddiqi, 1995; Crawford y Glass, 1998). Estudios

fisiológicos y moleculares en distintas especies de Nicotiana, indican que varias formas nitrogenadas, incluyendo NO_3^- , NH_4^+ y aminoácidos, pueden participar en la inactivación de este sistema de transporte. Tal regulación es esencial para coordinar la absorción radicular con la demanda de N por la parte aérea durante el ciclo de crecimiento de la planta (Imsande y Touraine, 1994; Crawford y Glass, 1998).

Los efectos del NH_4^+ sobre la inhibición de la absorción de NO_3^- se produce tanto en periodos largos (horas a días) y también en periodos cortos como unos pocos minutos. Por ejemplo, un estudio reciente usando $^{15}\text{NO}_3^-$ en cebada, muestra que la entrada de NO_3^- fue disminuida mientras que la salida de estos incrementaba después de unos pocos minutos ante la exposición de NH_4^+ en las raíces.

Una explicación común que se da en este sentido (inhibición rápida de la absorción de NO_3^- por la presencia de NH_4^+) es que el NH_4^+ produce la despolarización de la membrana plasmática, lo que induce la absorción activa de NO_3^- por el mecanismo sinporte $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ (Ulrich, 1992). Sin embargo, y en contra de esta hipótesis, el K es conocido también por su efecto despolarizando la membrana plasmática sin que ello conlleve a una reducción en la absorción de NO_3^- (Crawford and Glass, 1998).

La absorción de NO_3^- debe ser sensible a señales internas, al igual que a condiciones externas. Una de estas señales internas que intervienen activamente en el metabolismo nitrogenado son los aminoácidos. Los aminoácidos son un componente mayoritario del floema en la mayoría de las plantas (Peuke y Jeschke, 1993; Peuke et al., 1994), particularmente en plantas que no reducen ni asimilan los

NO_3^- en las raíces (Cooper y Clarkson, 1989). Las plantas que reducen mayoritariamente los NO_3^- en las hojas como es el tabaco translocan el nitrógeno reducido desde las hojas hacia las raíces a través del floema en forma de aminoácidos (Li et al., 1995).

Los aminoácidos (principalmente glutamina, glutamato y asparagina) que se encuentran en el xilema pueden ser resultado de la asimilación del nitrógeno inorgánico en las raíces, o pueden ser el producto del ciclo del nitrógeno desde la parte aérea hacia la raíz y vuelta ad nuevo a la parte aérea como propuso Cooper y Clarkson (1989). Por lo tanto, un exceso de aminoácidos podría significar una señal de exceso en la cantidad de N y por lo tanto inhibir la entrada de NO_3^- (Cooper y Clarkson, 1989; Imsade y Touraine, 1994; Padgett y Leonard, 1996).

Un estudio presentado por Muller y Touraine (1992), demostró una inhibición de un 50% en la absorción de NO_3^- cuando fueron aplicados los aminoácidos alanina,, glutamina, asparagina, arginina, beta-alanina. La Arginina inhibe la absorción de NO_3^- inmediatamente, siendo esta respuesta cinética similar a la que produce el NH_4^+ . Los autores sugieren que esto puede ser el resultado de una respuesta no metabólica, como puede ser la alteración del potencial de membrana. Por el contrario la alanina produce una disminución en la absorción de NO_3^- lo que sugiere un componente metabólico.

Estos son principalmente los dos mecanismos por los que los aminoácidos inhiben o disminuyen la absorción de NO_3^- .

Por otro lado, estudios con plantas unicelulares y microbios, indican fuertemente que los aminoácidos, particularmente glutamina tienen un papel significativo en la regulación de la

absorción de NO_3^- y su asimilación (Clarkson y Lüttger, 1991).

Finalmente, Padgett y Leonard (1996) han observado que las células de maíz exhiben una preferencia en la absorción de aminoácidos sobre los nitratos cuando ambos están presentes en el medio de cultivo. La adición de 2mM de glutamina inhibe la entrada de NO_3^- produciéndose también la salida al medio de este anion.

I.1.2. Translocación de NO_3^- .

Una vez que los NO_3^- son absorbidos por la raíz, pueden ser asimilados en la propia raíz, transportados hacia la parte aérea y asimilados en ese órgano de la planta, o pueden ser almacenados en las vacuolas tanto de raíces o de la parte aérea. Los NO_3^- almacenados en las vacuolas pueden salir hacia el citoplasma y ser asimilados cuando sus niveles externos han sido agotados (King et al., 1992; Sivasankar y Oaks, 1996).

Se ha argumentado que la carga xilemática de los NO_3^- ocurre de forma pasiva siguiendo los gradientes electroquímicos. El hecho de que p-fluorofenilalanina, una molécula análoga estructuralmente a la fenilalanina, reduzca el contenido de NO_3^- en el xilema, nos indica que la carga xilemática de NO_3^- requiere la síntesis proteica y por lo tanto debe de ser mediada por transportadores (Morgan et al., 1985).

La translocación a través del xilema hacia la parte aérea es la relacionada con el transporte de agua. Este transporte ocurre cuando el movimiento del agua es conducido por los procesos llamados : presión radicular, lo que produce una exudación o excreción xilemática en plantas decapitadas (Barthes et al., 1996). Esta

exudación xilemática es aumentada por la presencia de NO_3^- , lo que podría ser debido a un incremento de la diferencia de potenciales osmóticos entre el medio radicular y los vasos xilemáticos. También los NO_3^- podrían incrementar la conductancia hidráulica radicular. Ambos fenómenos facilitarían el transporte de estos NO_3^- hacia la parte aérea a través del movimiento del H_2O (Barthes et al., 1996).

I.1.3. Asimilación de NO_3^- . Enzimas involucradas.

Una vez que los NO_3^- han entrado en la célula son asimilados por medio de una serie de etapas, en las cuales están involucradas distintas enzimas cuya función vamos a describir a continuación.

I.1.3.1. Nitrato reductasa (NR).

La NR cataliza la reducción de NO_3^- a NO_2^- (Warner, 1987). De acuerdo con la especificidad por el donador de electrones existen dos principales tipos de NR que pueden ser distinguidos: a) una NR ferredoxina dependiente, la cual es típica de cianobacterias y bacterias fotosintéticas y b) una NR nucleotido piridina dependiente que se encuentra en organismos eucariotas.

Las diferencias entre estos dos tipos de NR se basan en diferencias tanto en sus grupos prostéticos como en sus propiedades físico-químicas. También, mientras que la NR ferredoxina dependiente parece encontrarse exclusivamente en las membranas fotosintéticas, la NR piridina dependiente es una enzima soluble (Guerrero et al., 1981; Solomonson y Barber, 1990). En esta introducción hablaremos y describiremos solamente la NR presente en los eucariotas.

De acuerdo a la especificidad mostrada por el NADH o el NADPH, se diferencian dos subclases de NR piridina dependiente: la EC 1.6.6.1. es específica por el NADH y corresponde al tipo de enzima presente en las hojas de la mayoría de las plantas superiores y en algunas especies de algas verdes como *Chlorella* (Guerrero et al., 1987; Warner, 1987; Solomonson y Barber, 1990; Sivasankar y Oaks, 1996), y la EC. 1.6.6.2. NR-NADPH específica que se presenta principalmente en tejidos no verdes como las raíces.

En general, la NAD(P)H-NR es una enzima oligomeriza con un peso molecular que oscila desde 197 a 460 Kdaltons, compuesta por varias subunidades aparentemente idénticas (Guerrero et al., 1987; Caboche y Rouze, 1990). En plantas superiores, cada monomero tiene tres dominios funcionales que corresponden a cada uno de sus tres centros redox formados por FAD, hemo (cytrocromo b557) y un cofactor de molibdeno (MoCo), los cuales son presentados en una relación 1:1:1 (Caboche y Rouzé, 1990; Solomonson and Barber, 1990).

Los centros redox transfieren dos electrones desde el NAD(P)H a los NO_3^- lo que facilita la reducción de éstos a NO_2^- .

La NR se encuentra en el citoplasma tanto radicular como de la parte aérea, hecho que se ha comprobado a través del fraccionamiento celular y técnicas bioquímicas o inmunocitoquímicas (Fedorova et al., 1994). En el citoplasma de las células foliares, el NADH requerido para el funcionamiento normal de la NR es suministrado a través de dos mecanismos. Uno en el que está involucrado un translocador 3-fosfogliceraldehído en las hojas y localizado en el cloroplasto, y otro en el

que esta involucrado un translocador malato-oxaloacetato, localizado tanto en el cloroplasto como en la mitocondria (House y Anderson, 1980). En cuanto a las raíces, el suministro de NADH o NADPH se produce a través de las actividades glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Bowsher et al., 1993). Además, el mecanismo comentado para las hojas malato-oxaloacetato también puede suministrar NADH en las raíces (Naik y Nicholas, 1984).

Análisis moleculares y genéticos han revelado que la mayoría de las plantas tienen dos o más genes estructurales para la NR (Coboche y Rouzé, 1990; Sivasankar y Oaks, 1996). La proteína NR y el RNAm son inducidos por la adición de NO_3^- (Sueyoshi et al., 1995), y esta inducción es reprimida por la glutamina o asparagina (Vicentz et al., 1993; Sivasankar y Oaks, 1995). La adición de sacarosa y de luz también aumentan la inducción de la proteína NR y el RNAm (Li y Oaks, 1994; Sivasankar y Oaks, 1996).

I.1.3.2. Nitrito reductasa (NiR).

Se han descrito dos tipos de NiR, las cuales se definen por medio de un donador específico de electrones: a) feridoxin nitrito reductasa (EC 1.7.7.1), característica de los organismos fotosintéticos, y b) NAD(P)H-nitrito reductasa que se encuentra en organismos no fotosintéticos.

Ambas enzimas catalizan la reducción de NO_2^- a NH_4^+ , lo que implica la transferencia de $6e^-$, al igual que ocurre en la reducción de N_2 a NH_4^+ catalizado por la nitrogenasa (Guerrero et al., 1987; Sivasankar y Oaks, 1996).

La NiR se localiza en los cloroplastos de las hojas y en los

plastidios en las raíces (Sechley et al., 1992). La NiR es una proteína monomeriza con un peso molecular de 60 a 70 Kdaltons y con dos grupos prostéticos, uno hemo llamado "sirohaem" y otro un centro $4\text{Fe}4\text{S}$ (Siegel y Wilkerson, 1989).

El gen que codifica la NiR ha sido identificado al menos en 6 diferentes especies. Hay solamente un gen de la NiR en cebada y en espinaca, mientras que al menos dos en maíz y cuatro en tabaco, lo que da lugar a diferentes isoformas de las enzimas (Duncanson et al., 1993; Kroneuberger et al., 1993).

En cuanto a la inducción de la NiR, distintos experimentos han evidenciado que la inducción de la NiR por los NO_3^- es un evento transcripcional (Rashogi et al., 1993). La adición de asparagina o glutamina al medio de cultivo resulta al igual que la NR, en una represión de la inducción de la NiR, mientras que la sacarosa la aumenta (Vicentz et al., 1993; Sivasankar y Oaks, 1995). Los NO_3^- y la luz son factores esenciales en la inducción de la NiR (Wray, 1993).

I.1.3.3. Glutamina sintetasa (GS).

El NH_4^+ procedente de la reducción de los NO_3^- , de la absorción directa, de la fotorespiración, de la biosíntesis de los compuestos fenilpropanoides, y del catabolismo de los aminoácidos es incorporado a formas orgánicas inicialmente por la enzima glutamina sintasa (GS, EC 6.3.1.2.) (Sirasaukar y Oaks, 1996; Temple et al., 1998).

Esta enzima cataliza la conversión del aminoácido glutamato a la amida glutamina, usando NH_4^+ , ATP y cationes divalentes, tales como el Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} , como cofactores.

La proteína GS tiene un peso molecular de 350 Kdalton y este compuesto por 8 subunidades idénticas (Sechley et al., 1992). En las hojas esta presente tanto en el cloroplasto (GS_2) y en el citoplasma (GS_1). La GS_2 del cloroplasto parece estar involucrada en los procesos de asimilación del NH_4^+ procedente de la fotorespiración (Freeman et al., 1990). La GS radicular también se encuentra localizada tanto en el citoplasma como en los plastidios.

I.1.3.4. Glutamato sintasa (GOGAT).

La GOGAT (EC 1.4.1.14) (glutamina-2-oxoglutamato aminotransferasa) cataliza la transferencia del grupo amida de la glutamina al α -cetoglutarato, para producir dos moléculas de glutamato.

Las reacciones conjuntas de la GS y esta de la GOGAT se conocen como el ciclo GS/GOGAT, y son esenciales para la asimilación del N en las plantas. Los glutamatos sintetizados por la acción de la GOGAT pueden ser de nuevo reutilizados como sustratos de la GS, o pueden a partir de su grupo amino ser utilizados para formar otros compuestos nitrogenados. Un importante destino del glutamato y de la glutamina es la síntesis de aspartato y asparagina, producidos en las reacciones catalizadas por la aspartato aminotransferasa y la asparagina sintetasa. Estos aminoácidos son importantes ya que son compuestos nitrógenados de transporte para muchas plantas (Sivasankar y Oaks, 1996; Temple et al., 1998).

En plantas superiores, GOGAT aparece bajo dos distintas isoformas, NADH-GOGAT (EC, 1.4.1.14) y ferredoxin-GOGAT (Fd-GOGAT, EC. 1.2.7.1.), estas difieren en su masa molecular, su composición, su cinética enzimática y sus funciones metabólicas

(Temple et al., 1998 ; Vance, 1997).

La Fd-GOGAT es una flavoproteína Fe-S con un peso molecular de 130 a 180 Kda. En combinación con la GS localizada en los plastidios, la Fd-GOGAT cataliza la asimilación del NH_4^+ derivado de la reducción de NO_3^- dependiente de la luz y el NH_4^+ generado durante la fotorespiración (Lea et al., 1990). Las raíces de maíz contienen una isoforma de Fd-GOGAT que es distinta a la de las hojas, y que esta implicada en la asimilación de NH_4^+ derivado de la reducción de NO_3^- procedentes del medio externo (Redinbaugh y Campbell, 1993).

Aunque la NADH-GOGAT, al igual que la Fd-GOGAT, es también una flavoproteína Fe-S, esta enzima fue encontrada inicialmente en tejidos no verdes (Vance, 1997; Temple et al., 1998). En plantas superiores la NADH-GOGAT existe como monomero con una subunidad de peso molecular aproximado de 225-230 Kda (Lea et al., 1990).

En raíces noduladas, el NH_4^+ es exportado hacia el citoplasma de la planta donde es rápidamente asimilado vía NADH-GOGAT y GS citoplasmático. La expresión de los genes que dan lugar a estas dos enzimas parecen estar coordinados en plantas no leguminosas, donde estas enzimas funcionan juntas en procesos de asimilación primaria de NH_4^+ derivado de la reducción de NO_3^- procedentes del medio, en la reasimilación del NH_4^+ liberado durante el catabolismo de los aminoácidos, y en la reasimilación del NH_4^+ liberado durante la germinación (Lea et al., 1990; Lam et al., 1996).

Experiencias realizadas con arroz, han demostrado que se producen cambios paralelos entre las dos formas de GOGAT, y además que la forma NADH-GOGAT es tres veces más

abundante que la forma Fd-GOGAT (Hayakawa et al., 1993).

I.1.3.5. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).

La enzima PEPC (EC 4.1.1.3.1) es una enzima esencial en el suministro de la estructura carbonada, derivada del ciclo de los ácidos tricarbónicos, que es usada en la síntesis de glutamato y aspartato y de sus amidas (Sediley et al., 1992). Es por lo tanto, una pieza clave en la conjunción entre el metabolismo carbonado y metabolismo nitrogenado (Champigny y Foyer, 1992).

Los niveles de la proteína PEPC en raíces aumentan por la adición de NH_4^+ (Oaks, 1994), pero no hay un efecto real en los tejidos radiculares cuando los NO_3^- , asparagina o glutamina son incluidos en el medio. En cuanto a la actividad foliar de esta enzima no es influenciada por la adición de NO_3^- o NH_4^+ (Oaks, 1994).

I.1.4. Regulación del metabolismo nitrogenado.

La regulación de la asimilación de NO_3^- ha sido y sigue siendo el centro de muchas investigaciones, debido a la importancia que tiene este proceso tanto en la producción como en la calidad de los productos agrícolas (Silberbush y Lips, 1991; Mattson et al., 1991; McDaniel et al., 1996; López-Cantarero et al., 1997; Ruiz y Romero, 1998a, 1998b; Ruiz y Romero, 1999).

Actualmente se conocen muchos factores, así como su modo de acción, sobre la asimilación de NO_3^- y particularmente sobre la NR (Solomonson y Barber, 1990; Karser y Huber, 1994; Campbell, 1996; Sivasankar y Oaks, 1996). La reducción de NO_3^- a NO_2^- por la NR es considerada

tras muchas investigaciones como la etapa limitante en la asimilación de NO_3^- en plantas superiores (Campbell, 1996; Gojon et al., 1998).

La actividad celular de la NR puede ser regulada a los niveles de síntesis y degradación, inactivación reversible, concentración de sustratos y otros factores, y a nivel del suministro intracelular de la enzima. Factores que pueden influir en la actividad NR directamente o a través de señales son la luz, oxígeno, CO_2 , nitratos, fijación de nitratos, estatus nutricional y otros metabolitos y condiciones medioambientales (Karser y Huber 1994; Solomonson y Barber, 1990).

Las actividades NR y NiR están prácticamente ausentes en las células que utilizan NH_4^+ como fuente nitrogenada. Los NO_3^- han sido considerados ser un inductor de la síntesis de la NR, mientras que el NH_4^+ o algún producto resultante del metabolismo del NH_4^+ , como los aminoácidos, es considerado como un represor de la síntesis de la NR (Solomonson y Barber, 1990).

En varias especies, sin embargo, los NO_3^- no aparecen ser requeridos para la síntesis de la proteína NR por lo que más bien la disminución o retirada de NH_4^+ parece ser suficiente para la síntesis de NR (Zeiler y Solomonson, 1989).

Crawford et al., (1986) mostraron que el ARNm de la NR fue 120 veces mayor en cotiledones de "squash" inducidos con NO_3^- que en cotiledones no inducidos. Además, tanto la proteína como la actividad NR fueron mínimamente detectados en cotiledones no inducidos, sugiriendo estos resultados que la inducción por NO_3^- de la NR ocurre principalmente a nivel del ARN.

Oaks et al. (1988) mostraron que la inducción de la NR proteína inactiva

en maíz ocurrió en respuesta a la luz en presencia de bajas concentraciones de estos, mientras que la máxima expresión de la actividad enzimática requería mayores niveles de NO_3^- . Shuster et al. (1989) indicaron que una señal era requerida para la inducción por NO_3^- de las enzimas NR y NiR, a esta señal la denominaron: señal plastídica. Por lo tanto, el fitocromo aparece mediar en la estimulación de la expresión de la NR por la luz (Rajasekar et al., 1988).

Recientes investigaciones realizadas por Lillo (1994), indican que la luz estimula la síntesis al igual que la activación a nivel proteica de la NR en plantas superiores. Además, la glucosa o sacarosa pueden reemplazar a la luz incrementando la acumulación de ARNm NR, lo que sugiere que el efecto de la luz se realiza, o es mediado, por la luz activa fotosintéticamente a través de los productos resultantes de la incorporación del CO_2 .

La regulación de la síntesis de la NR por las hormonas vegetales no ha sido extensamente investigada. La síntesis de la NR ha sido reportada ser estimulada por las citoquininas (Gutteridge et al., 1983). Schmerder y Borriss (1986) indicaron que la actividad NR era también inducida por el etileno, y que la inducción por citoquininas solamente ocurría con la presencia de etileno.

Por otro lado, la actividad NR puede ser modulada por varios factores en respuesta a particulares condiciones medioambientales, lo que conduce en algunos casos a una inactivación reversible de la enzima cuando reacciona con moléculas tales como cianida, hidroxilamina o radicales superóxido.

La reactivación enzimática puede ser medida por la exposición a sistemas oxidantes tales como la luz azul, falvinas u oxígeno. (Solomonson y Barber, 1990).

Otros factores que pueden inactivar a la NR son proteínas, concretamente endopeptidasas que parecen unirse específicamente a la NR inactivándolas (Guerrero et al., 1981; Hamano et al., 1985).

Finalmente, la disponibilidad de los substratos NADH y nitratos pueden ser importantes en la asimilación de nitratos. Las reacciones o procesos que generan NADH son importantes en este sentido, como son los procesos que mantienen los niveles de NO_3^- intracelulares, tales como la absorción de NO_3^- y movilización de estos procedentes de las vacuolas (Solomonson y Barber, 1990).

Como indicábamos al inicio de este apartado se ha considerado a la NR la enzima limitante en el procesos de asimilación de NO_3^- , por lo que el estudio de la regulación de esta enzima ha sido muy elevado dejando a un lado los factores que determinan o regulan la actividad del resto de enzimas que intervienen en dicho proceso. A este respecto, Sivasankar y Oaks (1996), en su revisión sobre la asimilación de NO_3^- , mencionan algunos de los factores más comunes y estudiados que influyen sobre las enzimas involucradas en la asimilación nitrogenada. Así indican, que tanto la NR y la NiR parecen ser más sensibles a la aplicación de NO_3^- , sacarosa y glutamina o asparagina.

En hojas la NR y la NiR incrementan en respuesta a la luz, mientras que en la zona radicular responden principalmente a la sacarosa.

Las diferencias distintas isoformas de la GS son inducidas en respuesta a la aplicación de NO_3^- en hojas y sacarosa en la zona radicular. La GOGAT también aumenta tras la aplicación o la presencia de NO_3^- . Por último, la PEPC es inducida principalmente por la aplicación de NH_4^+

(Oaks, 1994).

Recientes investigaciones realizadas por Temple et al. (1998) han tratado sobre la regulación de la GOGAT. Al igual que se ha comprobado que la luz, vía fitocromo, tienen un efecto positivo sobre la expresión de la GS localizada en el cloroplasto (Peterman y Goodman, 1991), este factor ejerce también un efecto positivo sobre la expresión de la Fd-GOGAT (Suzuki y Rothstein, 1997). En otros estudios recientes, utilizando plantas de tabaco con muy bajos niveles de enzima NR, los niveles de NO_3^- mostraron actuar como una señal, resultando en cambios generales en la expresión de los genes de las enzimas involucradas en la asimilación de NO_3^- , incluida la GOGAT.

Además de este efecto anterior, se produjo una inducción del metabolismo de los ácidos orgánicos y la represión del metabolismo del almidón por los NO_3^- , lo que incrementa la disponibilidad de esqueletos carbonados necesarios para la asimilación del N (Scheible et al., 1997).

II. Objetivos.

En este capítulo nuestros objetivos se centraran en los siguientes aspectos:

(I) determinar la influencia de la aplicación conjunta de diferentes dosis de B y CaCl_2 sobre la absorción y distribución de los NO_3^- , dada la importancia que tiene la disponibilidad de este anión en los procesos de asimilación de NO_3^- .

(ii) estudiar la respuesta de las enzimas involucradas en el proceso de reducción y asimilación de NO_3^- (NR, NiR, GS, GOGAT, y PEPC) así como la de los productos resultantes de este proceso (Aminoácidos, proteínas, N orgánico y total), con el fin de poder evaluar si los efectos del B y del CaCl_2 son directos o a través de las variaciones producidas en la

disponibilidad de NO_3^- .

(iii) comprobar de qué forma y en que medida en nuestra experiencia la actividad NR es la fase limitante de la asimilación de los NO_3^- , además de estudiar en que órgano se produce principalmente este proceso metabólico.

(iv) finalmente, nos centraremos en la aparición de interacciones B-Ca sobre todos los parámetros que definen la asimilación de NO_3^- , con el propósito de determinar las combinaciones B-Ca más adecuadas para potenciar este proceso determinante del crecimiento de las plantas de tabaco.

III. Material y métodos.

III.1. Diseño experimental.

(Ver Capítulo I).

III.2. Muestreo de las plantas.

(Ver Capítulo I).

III.3. Análisis de las plantas.

III.3.1. Extracción y ensayo de las actividades enzimáticas involucradas en la asimilación de NO_3^- .

III.3.1.1. Ensayo de la actividad NR in vivo.

El método utilizado fue una adaptación de los métodos propuestos por Jaworski (1957) y Mauriño et al. (1986). Se realizaron discos del tejido foliar de 5 mm de diámetro, tomando un peso aproximado de 0.25 g. Los discos foliares fueron introducidos en 10-ml de un buffer fosfato (100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.5) que contenía 25 mM de KNO_3 y propanol al 1% (v/v), y seguidamente las muestras se sometieron a un proceso de vacío (aproximadamente 0.8 bar) durante 10 min y en oscuridad. A continuación fueron incubadas en oscuridad a 30°C durante 1h, y pasado este tiempo se inhibió la actividad NR por acción del calor en un baño de agua hirviendo.

Los NO_3^- resultantes se cuantificaron por colorimetría a una longitud de onda de A_{540} frente a una curva patrón de NO (0.25-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), siguiendo el método propuesto por Hageman y Hucklesby (1971). La determinación de los NO_3^- se realizó en un volumen final de reacción de 5-ml consistente en: 2-ml de sulfanilamida al 1% (p/v) disuelto en HCl 1.5 N, 2-ml de dihidrocloruro de N-(1-naftil)-etilendiamida al 0.02% (p/v)

disuelta en HCl 0.2 N, y finalmente 1-ml de la muestra problema. La actividad NR in vivo fue expresada como μmol de NO formados $\text{g}^{-1} \text{ pf h}^{-1}$.

III.3.1.2. Ensayo de las actividades enzimáticas in vitro NR, NiR, GS, GOGAT, y PEPC.

Para la determinación de las actividades enzimáticas NR, NiR y GOGAT se utilizó un medio de extracción optimizado para nuestras condiciones basándonos en los métodos empleados por Farnden y Roberston (1980), Groat y Vance (1981), Lillo (1984), Kaiser y Lewis (1984), y Singh y Srivastava (1986).

Un cantidad de 1 g de material vegetal fresco (raíces y hojas) fue homogeneizado en un buffer fosfato (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.5) que contenía 2 mM de EDTA, caseína soluble al 1.5% (p/v), 2 mM de DTT y PVP soluble al 1% (p/v). El homogenado resultante fue filtrado y centrifugado a 5000 rpm durante 5 min, seguidamente el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 15000 rpm durante 20 min, obteniéndose de esta manera el extracto enzimático utilizado para medir las actividades NR, NiR y GOGAT. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-4°C.

La cuantificación de las proteínas en el extracto enzimático se realizaron siguiendo el método de Bradford (1976).

El ensayo de la actividad NR se realizó siguiendo la metodología de Kaiser y Lewis (1984). En un volumen final de 2-ml, la mezcla de reacción contenía: 0.6-ml de buffer fosfato (100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.5), 0.2-ml de KNO_3 100 mM, 0.2-ml de cisteína 10 mM, 0.2-ml de NADH 2 mM, y 0.6-ml de extracto enzimático. La actividad NR fue parada por la adición de 0.1-ml de zinc acetato 1 M después de la incubación de

las muestras en oscuridad a 30°C durante 30 min. Seguidamente, y con el fin de eliminar el precipitado formado tras la adición del zinc-acetato, se centrifugaron las muestras 2000 rpm durante 15 min. Finalmente, y como describíamos en el caso de la actividad NR in vivo, los NO_2^- del sobrenadante procedente de la última centrifugación fueron cuantificados por el método de Hageman y Hucklesby (1971).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco el cual presentaba todos los reactivos, y en el que se sustituyó el volumen del extracto enzimático por buffer fosfato. La actividad NR se expresó como $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ formados mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$.

El ensayo de la actividad NiR fue determinado a través de la desaparición de los NO_2^- del medio de reacción (Lillo, 1984). El medio de reacción contenía 0.25-ml de buffer fosfato (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.5), 50- μl de KNO_2 20 mM, 75- μl de dimetil-viologeno 5 mM, 75- μl de ditionito sódico 145 mM disuelto en NaHCO_3 300 mM, y 50- μl de extracto enzimático. Después de incubación en oscuridad a 30°C durante 30 min, la mezcla de reacción se agita vigorosamente hasta la oxidación del dimetil-viologeno (paso del color azul a color blanco) que conlleva a la parada de la actividad NiR. Finalmente y tras la adición de 5-ml de agua bidestilada (Millipore RX-21), se toma una alícuota de 1-ml y procediéndose a la cuantificación de los NO_2^- no transformados por la actividad NiR, por el método de Hageman y Hucklesby (1971).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, un blanco que consistió en la omisión en el ensayo de KNO_2 y extracto enzimático, un estándar de KNO_2 20 mM que consistió en la mezcla de ensayo sin extracto enzimático, y finalmente también se realizó un control para cada muestra sin KNO_2 con el fin de averiguar la cantidad de KNO_2 presente en

el extracto enzimático. La actividad NiR se expresó como $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ transformados mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$.

La actividad GOGAT, esencialmente como indican Groat y Vance (1981) y Singh y Srivastava (1986), fue ensayada espectrofotométricamente a 30°C por medio de la oxidación de NADH a una longitud de onda de A_{340} . La disminución de la absorbancia, lineal al menos durante 10 min, fue registrada durante 5 min. La mezcla de reacción consistía en 0.75-ml de buffer fosfato (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.5) que contenía mercaptoetanol al 0.1% (v/v) y 1 mM de EDTA, 0.2-ml de 2-oxoglutarato 18.75 mM, 0.1-ml de amino-oxiacetato 15 mM, 0.1-ml de NADH 1.5 mM, 0.15-ml de extracto enzimático, y finalmente 0.2-ml de L-glutamina 75 mM que inicia la reacción enzimática. Se hicieron dos controles, el primero sin 2-oxoglutarato y el segundo sin L-glutamina, con el fin de corregir la oxidación endógena del NADH.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y la actividad GOGAT se expresó como $\mu\text{mol NADH oxidados mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$.

La extracción de la enzima GS se realizó siguiendo el método de Rees et al. (1995). Una cantidad de 0.5 g de material vegetal fresco se homogeneizó con 5-ml de buffer HEPES 0.2 M, pH 7.9. El homogenado se centrifugó a 16000 rpm durante 20 min, y el sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la actividad GS. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de $0-4^\circ\text{C}$.

La cuantificación de las proteínas en el extracto enzimático se realizó siguiendo el método de Bradford (1976).

El análisis de la actividad GS se basó sobre el descrito por Slawyk y Rodier (1970). La mezcla de reacción contenía: 0.6-ml de MgCl_2 50 mM, 0.2-ml de EDTA-Na 5 mM, 0.4-ml de glutamato

potásico 100 mM, 0.15-ml acetato amónico 50 mM, 0.4-ml de extracto enzimático, y 0.25-ml de ATP 8 mM que inicia la reacción. La mezcla de reacción fue incubada en luz en un baño de agua a 30°C durante 15 min, tras lo cual se inhibió la reacción enzimática por la adición de 0.25-ml de H_2SO_4 1 N. La mezcla seguidamente fue centrifugada (11000 rpm, 2 min), y del sobrenadante resultante se tomó 50- μl para cuantificar el Pi procedente de la utilización enzimática del ATP. La concentración de Pi fue determinada usando el método colorimétrico del vanadomolibdofosforico (Hogue et al., 1970), a una longitud de onda de A_{430} y frente a una curva patrón de K_2HPO_4 (5-100 μM).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, un blanco que consistió en la omisión en el ensayo del extracto enzimático y del glutamato, siendo sustituidos los volúmenes correspondientes por buffer HEPES. La actividad GS se expresó como nmol Pi mg^{-1} proteína min^{-1} .

La extracción y actividad de la PEPC se realizó siguiendo el método de Vance y Stade (1984), modificado por Ocaña et al. (1996). Una cantidad de 0.5 g de material vegetal fresco fue homogeneizada en 5-ml de buffer maleico-KOH 100 mM, pH 6.8, que contenía 100 mM de sacarosa, β -mercaptoetanol al 2% (v/v), y etilenglicol al 20% (v/v). A continuación el homogenado fue centrifugado a 4500 rpm durante 5 min, desachandose el residuo y sometiendo al sobrenadante a una segunda centrifugación de 16000 rpm durante 20 min. Finalmente, el sobrenadante obtenido en la última centrifugación se utilizó para determinar la actividad PEPC. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-4°C.

La cuantificación de las proteínas en el extracto enzimático se realizaron siguiendo el método de Bradford (1976).

La actividad enzimática PEPC se determinó espectrofotométricamente por oxidación del NADH a una longitud de onda de A_{340} durante 3 min, adicionando 25- μl de extracto enzimático a 0.975-ml de buffer bicina-KOH 0.1 M, pH 8.5 que contiene 10 mM de NaHCO_3 , 5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de NADH, y 2 mM de PEP.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, un blanco que consistió en la omisión en el ensayo del extracto enzimático, siendo sustituido el volumen correspondientes por buffer bicina-KOH. La actividad PEPC se expresó como $\mu\text{mol NADH oxidados mg}^{-1}$ proteína h^{-1} .

III.3.2. Determinación de aminoácidos y proteínas solubles.

Los aminoácidos y las proteínas solubles se cuantificaron siguiendo los métodos propuestos por Yemm y Cocking (1955) y Bradford (1976), respectivamente.

Una cantidad (0.5 g) de material vegetal fresco (raíces y hojas) fue homogeneizada con 5-ml de buffer fosfato (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0). El homogenado fue filtrado y centrifugado a 10000 rpm durante 15 min, resultando un sobrenadante que fue utilizado para la cuantificación de estos compuestos nitrogenados. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-4°C.

Para la cuantificación de los aminoácidos solubles, se adicionó 0.1-ml de extracto a 1.5-ml de reactivo de ninhidrina [1:1 (v/v) cloruro de estaño (80 mg de cloruro de estaño disueltos en 50-ml de buffer citrato 200 mM, pH 5) : ninhidrina (2 g de ninhidrina disueltos en 50-ml de etilenglicol)], y esta mezcla se introdujo en un baño de agua a 100°C durante 20 min. A continuación, y una vez enfriada la mezcla se le añadió 8-ml de

propanol al 50%. Finalmente, y pasados 30 min se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de A_{570} , frente a una curva patrón de glicina (Solución madre de glicina: 10 mg/50 ml).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco que consistió en la omisión en el ensayo del extracto, siendo sustituido el volumen correspondiente por buffer fosfato. La concentración de aminoácidos solubles se expreso como mg g^{-1} p.f.

En la cuantificación de las proteínas solubles se tomó 0.1-ml de sobrenadante y se adicionó a 0.9-ml de buffer fosfato (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0) y a 5-ml de azul de cromasie (Cromasie al 10% (p/v) + Etanol del 96% al 5% (v/v) + H_3PO_4 del 85% al 10% (v/v)). Transcurridos 20 min las muestras se midieron colorimetricamente a una longitud de onda de A_{595} , frente a una curva patrón de albúmina (Solución Madre de albúmina: 10 mg/50 ml).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco que consistió en la omisión en el ensayo del extracto, siendo sustituido el volumen correspondiente por buffer fosfato. La concentración de proteínas solubles se expreso como mg g^{-1} p.f.

III.3.3. Determinación de la prolina.

La extracción y cuantificación de la concentración de prolina se realizó siguiendo el método propuesto por Irigoyen et al. (1992). Una cantidad de material vegetal fresco (0.5 g) fue homogeneizado inicialmente con 5-ml de etanol al 96%, y posteriormente dos veces con 5-ml de etanol al 70%. El homogenado se centrifugo a 5500 rpm durante 10 min, y el sobrenadante resultante se utilizo para la determinación de la prolina. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-4°C.

Del sobrenadante se tomo un volumen de 2-ml y se adiciono los siguientes reactivos: 4-ml de agua bidestilada (Millipore RX-21), 2.5-ml de reactivo de ninhidrina [ninhidrina al 2.5% (p/v) + H_3PO_4 6 M al 40% (v/v) + ácido acético glacial del 99% al 60% (v/v), y 2.5-ml de ácido acético glacial del 99%. A continuación, y tras introducir la mezcla resultante en un baño de agua a 100°C durante 45 min, se le añadió 5-ml de benceno del 99%, y pasados 15 min se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de A_{515} frente a una curva patrón de prolina (Solución madre de prolina: 25 $\mu\text{g/ml}$).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco que consistió en la omisión en el ensayo del extracto, siendo sustituido el volumen correspondiente por agua bidestilada. La concentración de prolina se expreso como $\mu\text{g g}^{-1}$ p.f.

III.3.4 Determinación de los cloruros y de las distintas formas nitrogenadas.

Las concentraciones de Cl^- , de NO_3^- y de NH_4^+ fueron analizadas a partir de una extracción del material seco y molido (0.1 g) en 10-ml de agua bidestilada (Millipore RX-21) (Wolf, 1982). La mezcla se sometió a una agitación vuelta-vuelta durante 2 h, y transcurrido este tiempo se centrifugo a 2500 rpm durante 10 min. Finalmente, la solución obtenida fue filtrada a través de papel de filtro Whatman ($n^\circ 4$), resultando una solución en la cual se determinaron las concentraciones de Cl^- , NO_3^- , y de NH_4^+ .

Para la determinación de Cl^- , se le adiciono a 2-ml de la extracción acuosa 1-ml de cromato potásico al 25% (p/v), valorándose la mezcla con AgNO_3 0.0141 N frente a un blanco de NaCl 0.0141 N, como propone el método de Koltoff y Kuroda (1951).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, expresándose la concentración de Cl^- como mg g^{-1} p.s.

El análisis de los NO_3^- se realizó siguiendo el método de Cataldo et al. (1975). A 100- μl de la extracción acuosa se le añadió 0.4-ml de una solución al 10% (p/v) de ácido salicílico en ácido sulfúrico del 96%, y 9.5-ml de NaOH 2 N. La concentración de NO_3^- se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de A_{410} frente a una curva patrón de KNO_3 (50-500 $\mu\text{g/ml}$).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco que consistió en la omisión en el ensayo del extracto, siendo sustituido el volumen correspondiente por agua bidestilada. La concentración de NO_3^- se expresó como mg g^{-1} p.s.

Para el NH_4^+ se tomó un volumen de 100- μl de la extracción acuosa, y la concentración de esta forma nitrogenada se determinó siguiendo el método de Krom (1980), que se describirá a continuación.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco que consistió en la omisión en el ensayo del extracto, siendo sustituido el volumen correspondiente por agua bidestilada. La concentración de NH_4^+ se expresó como mg g^{-1} p.s.

En relación al análisis de N orgánico, 0.15 g de material seco y molido fue sometido a una mineralización con H_2SO_4 12N y H_2O_2 al 30% libre de P (Wolf, 1982). Del mineralizado resultante, y tras la adición de 20-ml de H_2O bidestilada (Millipore RX-21), se tomó un volumen en el que se determinó el contenido en N orgánico.

A 100- μl del mineralizado se le añadieron 1-ml del reactivo A [8.5% (p/v) de salicilato-sódico + 0.06% (p/v) de nitroprusiato-sódico] y 1-ml del reactivo B [4% (p/v) de NaOH + 0.625% (p/v) de dicloroisocianurato-sódico], y

transcurridos 45 min se procedió a la medición colorimétricamente a una longitud de onda de A_{630} , frente a una curva patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-20 $\mu\text{g/ml}$) (Krom, 1980).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco que consistió en la omisión en el ensayo del volumen del mineralizado. La concentración de N orgánico se expresó como mg g^{-1} p.s.

Finalmente, la concentración de N total se obtuvo mediante la suma de las tres fracciones descritas anteriormente, y fue expresado como mg g^{-1} p.s.

III.4. Análisis estadístico.

(Ver Capítulo I).

IV. Resultados.

La primera etapa en la asimilación de los NO_3^- , la reducción de los NO_3^- a NO_2^- , es catalizada por la NR (Sivasankar y Oaks, 1996).

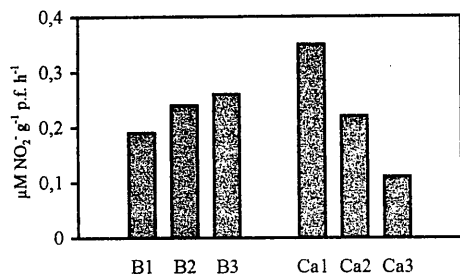


Figura 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad NR in vivo en raíces (LSD= 0.01)

Tanto la actividad NR in vivo (Fig. 1a) como la actividad NR in vitro (Tabla 1a) presentaron similares respuestas a la aplicación de B y Ca. Un aumento en la aplicación de B dio lugar a un aumento proporcional de la actividad NR in vivo ($F= 101.28, P< 0.001$) y NR in vitro ($F= 68.11, P< 0.001$), mostrándose las máximas actividades en B3 con unos incrementos del 37 y del 20% respectivamente. En cuanto al efecto individual del Ca, fue totalmente contrario al del B, puesto que las máximas actividades NR in vivo (Fig. 1a) y NR in vitro (Tabla 1a) se presentaron en Ca1 y las mínimas en Ca3 con unas disminuciones del 69 y del 63% (NR in vivo, $F= 1088.35, P< 0.001$; NR in vitro, $F= 1563.89, P< 0.001$).

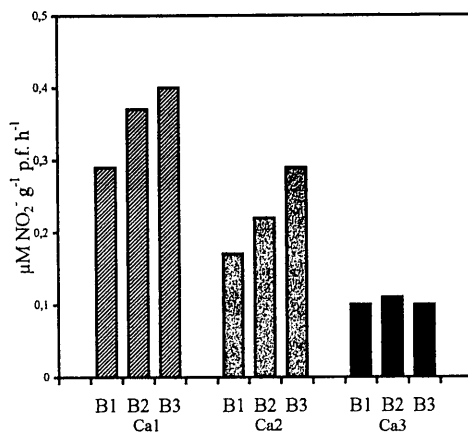


Figura 1b. Interacción B-Ca sobre la actividad NR in vivo en raíces: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 0.02).

Con respecto a los efectos conjuntos de ambos nutrientes (NR in vivo, $F= 25.72, P< 0.001$; NR in vitro, $F= 33.47, P< 0.001$), solamente destacar la interferencia del Ca3 sobre el efecto individual del B, puesto que cuando se aplica esta dosis de Ca el efecto individual del B no se produjo (NR in vivo, Figs. 1b y 1c; NR in vitro, Tablas 1b y 1c), manteniéndose el efecto individual de ambos nutrientes en resto de combinaciones.

La siguiente fase en la asimilación de los NO_3^- es la conversión de los NO_2^- a NH_4^+ por la acción de la NiR (Sivasankar y Oaks, 1996). El comportamiento de la actividad NiR fue similar al de la NR (Tabla 1). La relación entre la aplicación del B y la actividad NiR fue directamente proporcional, presentándose la máxima actividad en B3 con un incremento del 82% ($F= 206.54, P< 0.001$) (Tabla 1a). Por el contrario, la relación entre el Ca y la actividad NiR fue inversamente proporcional, encontrándose la máxima actividad en Ca1 con un incremento cuatro veces superior a la actividad de Ca3 ($F= 730.06, P< 0.001$) (Tabla 1a).

En cuanto a la interacción B-Ca ($F= 78.54, P< 0.001$), el efecto individual del B se presentó con las dosis Ca1 y Ca2, mientras que en Ca3, y al igual que ocurría con la actividad NR, el efecto individual de B no se produjo (Tabla 1b). Por el contrario, el B no varió bajo ninguna de sus dosis el efecto individual del Ca sobre la NiR (Tabla 1c), por lo que podemos concluir que solamente bajo Ca3 se produce una interacción entre el B y el Ca.

La principal ruta de asimilación del NH_4^+ producido por la actividad NiR se produce a través de lo que se denomina el ciclo glutamina sintetasa (GS)/glutamato sintasa (GOGAT) (Sivasankar y Oaks, 1996). Los efectos individuales del B y del Ca sobre ambas enzimas fueron similares (Tabla 1a). Un aumento en la aplicación de B dio lugar a un incremento significativo de la actividad GS ($F= 204.38, P< 0.001$) y GOGAT ($F= 210.05, P< 0.001$), presentándose las máximas actividades en B3 con incrementos del 33 y del 100% (Tabla 1a).

Por el contrario, un aumento de Ca conllevó a una disminución de las actividades GS y GOGAT encontrándose las mínimas actividades en Ca3 con disminuciones del 60 y del 66% respectivamente (GS, $F= 1733.40, P< 0.001$; GOGAT, $F= 397.63, P< 0.001$) (Tabla 1a).

De nuevo, y al igual que ocurría con en la NR y NiR, la interacción B-Ca (GS, $F= 105.09, P< 0.001$; GOGAT, $F= 77.31, P< 0.001$) se basó únicamente en la influencia del Ca sobre el efecto individual del B, y más específicamente cuando se aplicó Ca3 lo que dio lugar a la no aparición del efecto individual del B (Tabla 1b). Por el contrario, no se produjo ningún tipo de influencia del B sobre el efecto individual del Ca, ya que independientemente de la dosis aplicada de B se observó el efecto individual negativo del Ca (Tabla 1c).

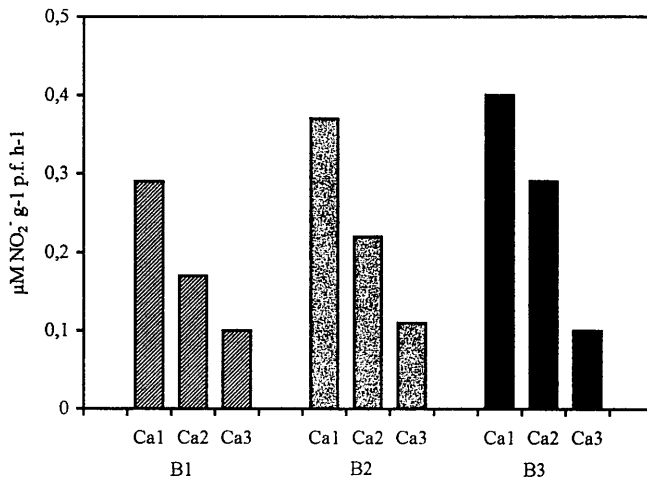


Figura 1c. Interacción B-Ca sobre la actividad NR in vivo en raíces: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 1.36).

La actividad PEPC refleja la relación entre el metabolismo nitrogenado y el metabolismo carbonado (Champigny y Foyer, 1992). En nuestra experiencia, el aumento de la aplicación de B supuso un incremento proporcional de la actividad PEPC, presentándose la máxima actividad en B3 con un aumento del 80% ($F=322.39$, $P<0.001$) (Tabla 1a). Con respecto al Ca, este elemento influyó más significativamente sobre la actividad PEPC que el B ($F=1733.18$, $P<0.001$). Un aumento en la aplicación de Ca dio lugar a una disminución de la actividad PEPC presentándose la mínima actividad en Ca3 con un disminución del 81%.

En cuanto a la interacción B-Ca ($F=99.72$, $P<0.001$), y como ha ocurrido en el resto de las enzimas involucradas en el metabolismo nitrogenado, solamente se produjo ésta cuando aplicamos Ca3 haciendo que no se reflejara el efecto individual positivo del B sobre la PEPC (Tabla 1b). El B por otro parte no influyó de manera significativa el efecto individual del Ca sobre la actividad PEPC (Tabla 1c).

Los principales productos de la asimilación de NO_3^- son los aminoácidos y las proteínas (Barneix y Causin, 1996). En relación a las concentraciones radiculares de estos compuestos de bajo y alto peso molecular, ambos siguieron un comportamiento similar que el resto de las enzimas radiculares involucradas en el metabolismo del N. Un aumento en la aplicación de B dio lugar a un incremento en las concentraciones radiculares de aminoácidos, obteniéndose la máxima concentración en B3 ($F=605.12$, $P<0.001$) (Tabla 2a). En cuanto a las proteínas también la máxima concentración radicular se presentó en B3, pero hay que destacar que no existieron diferencias significativas entre las concentraciones de B1 y B2 ($F=94.8$, $P<0.001$) (Tabla 2a).

Tabla 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las actividades radiculares de las enzimas involucradas en la asimilación de NO_3^- .

	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPC
B ₁	0.050	0.22	14.4	0.072	0.26
B ₂	0.053	0.25	16.7	0.094	0.35
B ₃	0.061	0.40	19.2	0.145	0.47
LSD	0.002	0.02	0.48	0.007	0.02
Ca ₁	0.080	0.46	22.9	0.160	0.59
Ca ₂	0.055	0.32	18.1	0.101	0.37
Ca ₃	0.029	0.09	9.23	0.053	0.11
LSD	0.002	0.02	0.48	0.007	0.02

Nitrato reductasa (NR) in vitro expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ formados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Nitrito reductasa (NiR) expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ transformados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Glutamina sintetasa (GS) expresada en $\mu\text{M Pi}$ mg^{-1} prot. min^{-1} ; Glutamato sintasa (GOGAT) expresada en $\mu\text{M NADH}$ oxidados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresada en $\mu\text{M NADH}$ oxidados mg^{-1} prot. min^{-1} .

Tabla 1b. Interacción B-Ca sobre las actividades radiculares de las enzimas involucradas en la asimilación de NO_3^- ; Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPC
Ca ₁ B ₁	0.073	0.33	19.5	0.092	0.43
B ₂	0.080	0.37	22.0	0.140	0.57
B ₃	0.089	0.69	27.5	0.240	0.79
Ca ₂ B ₁	0.046	0.22	13.9	0.070	0.23
B ₂	0.057	0.29	18.4	0.091	0.37
B ₃	0.064	0.44	22.1	0.150	0.51
Ca ₃ B ₁	0.034	0.11	9.96	0.065	0.11
B ₂	0.024	0.09	9.67	0.056	0.12
B ₃	0.031	0.09	8.06	0.051	0.10
LSD	0.003	0.03	0.83	0.013	0.03

Nitrato reductasa (NR) in vitro expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ formados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Nitrito reductasa (NiR) expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ transformados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Glutamina sintetasa (GS) expresada en $\mu\text{M Pi}$ mg^{-1} prot. min^{-1} ; Glutamato sintasa (GOGAT) expresada en $\mu\text{M NADH}$ oxidados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresada en $\mu\text{M NADH}$ oxidados mg^{-1} prot. min^{-1} .

Tabla 1c. Interacción B-Ca sobre las actividades radiculares de las enzimas involucradas en la asimilación de NO_3^- : Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPC
B ₁ Ca ₁	0.073	0.33	19.5	0.092	0.43
Ca ₂	0.046	0.22	13.9	0.070	0.23
Ca ₃	0.034	0.11	9.96	0.055	0.11
B ₂ Ca ₁	0.080	0.37	22.0	0.140	0.57
Ca ₂	0.057	0.29	18.4	0.091	0.37
Ca ₃	0.024	0.09	9.67	0.056	0.12
B ₃ Ca ₁	0.089	0.69	27.5	0.240	0.79
Ca ₂	0.057	0.44	22.1	0.150	0.51
Ca ₃	0.024	0.09	8.06	0.051	0.10
LSD	0.003	0.03	0.83	0.013	0.03

Nitrato reductasa (NR) in vitro expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ formados $\text{mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$; Nitrito reductasa (NiR) expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ transformados $\text{mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$; Glutamina sintetasa (GS) expresada en $\mu\text{M Pi mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$; Glutamato sintasa (GOGAT) expresada en $\mu\text{M NADH oxidados mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$; Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresada en $\mu\text{M NADH oxidados mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$.

El efecto del Ca fue similar en ambos compuestos nitrogenados (Tabla 2a), puesto que el aumento en su aplicación conlleva a una disminución proporcional de aminoácidos ($F= 4036.05$, $P < 0.001$) y proteínas ($F= 3289.71$, $P < 0.001$), presentándose las máximas concentraciones en Ca₁ y las mínimas en Ca₃ (Tabla 2a).

TABLA 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de aminoácidos y proteínas.

	Aminoácidos	Proteínas
B ₁	1.28	4.34
B ₂	1.44	4.29
B ₃	1.57	4.73
LSD	0.02	0.07
Ca ₁	1.74	5.98
Ca ₂	1.52	4.19
Ca ₃	1.02	3.19
LSD	0.02	0.07

Aminoácidos y proteínas expresados en $\text{mg g}^{-1} \text{p.f.}$

Para ambos compuestos nitrogenados la interacción B-Ca fue significativa. En relación a los

aminoácidos ($F= 256.10$, $P < 0.001$), y

TABLA 2b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de aminoácidos y proteínas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Aminoácidos	Proteínas
Ca ₁ B ₁	1.44	5.27
B ₂	1.73	5.97
B ₃	2.05	6.69
Ca ₂ B ₁	1.37	3.95
B ₂	1.59	4.14
B ₃	1.61	4.48
Ca ₃ B ₁	1.04	3.79
B ₂	1.00	2.78
B ₃	1.04	3.01
LSD	0.03	0.12

Aminoácidos y proteínas expresados en $\text{mg g}^{-1} \text{p.f.}$

como ya hemos descrito con anterioridad, la interacción se produjo con Ca₃ impidiendo la aparición del efecto individual del B (Tabla 2b). En cuanto a las proteínas ($F= 190.85$, $P < 0.001$), destacar que bajo las dosis Ca₁ y Ca₂ el efecto individual del B se acentúa ya que

entre las concentraciones de B1, B2, y B3 existieron diferencias significativas, mientras que la aplicación de Ca3 supuso que el efecto individual del B no solo no se produjera, sino que fuera contrario ya que la máxima concentración radicular de proteínas se presentó en Ca3B1 (Tabla 2b). Finalmente, indicar que tanto para los aminoácidos como para las proteínas el B no influyó sobre el efecto individual del Ca (Tabla 2c).

TABLA 2c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radicales de aminoácidos y proteínas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Aminoácidos	Proteínas
B ₁ Ca ₁	1.44	5.27
Ca ₂	1.37	3.95
Ca ₃	1.04	3.79
B ₂ Ca ₁	1.73	5.97
Ca ₂	1.59	4.14
Ca ₃	1.00	2.78
B ₃ Ca ₁	2.05	6.69
Ca ₂	1.61	4.48
Ca ₃	1.04	3.01
LSD	0.03	0.12

Aminoácidos y proteínas expresados en mg g^{-1} p.f.

Uno de los aminoácidos que recientemente ha sido objeto de estudio por su papel en distintos tipos de estrés es la prolina (Delauney y Verma, 1993; Dörffling et al., 1993). El comportamiento de la concentración radicular de prolina varió substancialmente al descrito para los aminoácidos. Tanto el incremento en la aplicación de B ($F= 6.26, P< 0.01$) como de Ca ($F= 13.27, P< 0.001$) indujeron un aumento de la concentración radicular de prolina, presentándose las máximas concentraciones en B2 y B3 y Ca3 (Fig. 2a).

En cuanto a la interacción B-Ca ($F= 6.42, P< 0.001$), el efecto del Ca sobre el B se destacó bajo las dosis Ca1 y Ca2,

no existiendo bajo estas dosis diferencias significativas entre los tratamientos de B (Fig. 2b). Por el contrario, bajo la dosis Ca3 se reflejó el efecto individual B sobre la prolina (Fig. 2b). En relación al efecto del B sobre el Ca, solamente cuando se aplicó B1 no se presentó el efecto individual del Ca ya que entre los distintos tratamientos de Ca no se observó diferencias significativas (Fig. 2c).

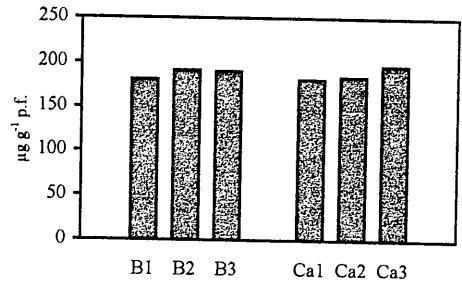


Figura 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de prolina (LSD= 6.47)

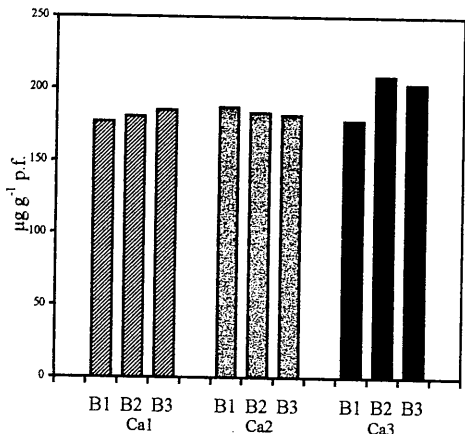


Figura 2b. Interacción B-Ca sobre la concentración radicular de prolina: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 11.2).

El B influyó significativamente sobre la concentración radicular de los NO_3^- ($F= 69.01, P< 0.001$) (Tabla 3a). La máxima concentración de NO_3^- se presentó con B1 mientras que la mínima con B2.

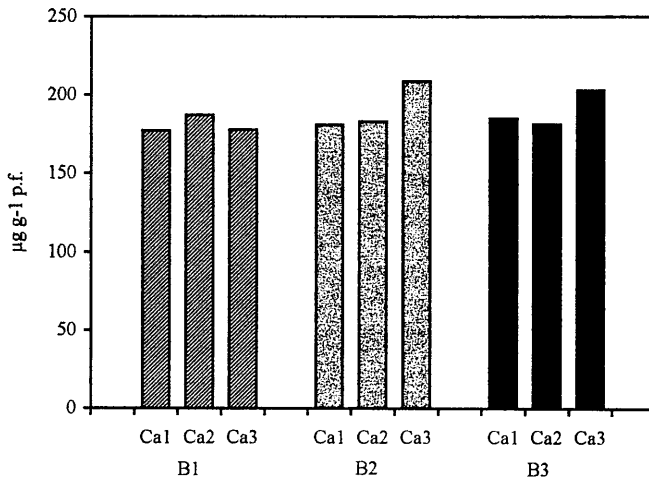


Figura 2c. Interacción B-Ca sobre la concentración radicular de prolina: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 11.2).

En cuanto al efecto individual del Ca, el aumento en la dosis de este nutriente supuso una disminución en la concentración radicular de NO_3^- ($F= 1383.03$, $P < 0.001$) (Tabla 3a), presentándose la máxima concentración en Ca1 y la mínima en Ca3.

En el estudio de la interacción B-Ca ($F= 18.10$, $P < 0.01$), solamente el Ca2 vario el efecto individual del B puesto que con esta dosis la variación en las dosis de B no conllevaron a ninguna diferencia en la concentración radicular de los NO_3^- (Tabla 3b). En cuanto al efecto del B sobre el Ca, éste fue mínimo presentándose la unica diferencia cuando se aplico la dosis B2 lo que produjo que las combinaciones B2Ca1 y B2Ca2 presentaran concentraciones de NO_3^- similares (Tabla 3c).

El ion antagonico a los NO_3^- por excelencia es el ion Cl^- , siendo su comportamiento totalmente contrario al de los NO_3^- . Con respecto al efecto individual del B ($F= 585.74$, $P < 0.001$) (Fig. 3a), la máxima concentración radicular de Cl^- se

presento en B2 mientras que la mínima en B1, con una disminución del 23%.

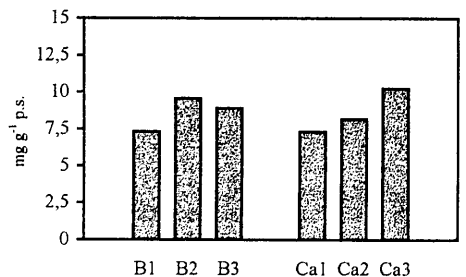


Figura 3a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de Cl⁻ (LSD= 0.14)

El efecto individual del Ca fue contrario al que produjo a los NO_3^- , puesto que un aumento en la aplicación de Ca dio lugar a un incremento proporcional del nivel radicular del ion Cl^- ($F= 998.19$, $P < 0.001$) (Fig. 3a).

En las figuras 3b y 3c observamos como los efectos individuales de ambos elementos prevalecieron, no presentándose ninguna influencia del Ca sobre el efecto individual del B y viceversa ($F= 23.47$, $P >$

0.05).

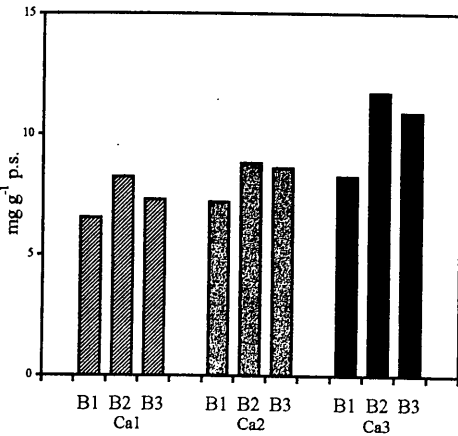


Figura 3b. Interacción B-Ca sobre la concentración radicular de CT: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 0.24).

Como indicabamos anteriormente, el producto de la actividad NiR es el NH_4^+ (Sivasankar y Oaks, 1996). En nuestra experiencia, ni el efecto individual del B ($F= 0.5, P> 0.05$) (Tabla 3a) ni el efecto individual del Ca ($F= 0.33, P> 0.05$) (Tabla 3a) influyeron de forma significativa sobre la concentración radicular de NH_4^+ .

TABLA 3a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las concentraciones radiculares de las distintas fracciones nitrogenadas.

	NO_3^-	NH_4^+	Norg	Nt
B1	1.06	0.68	19.6	20.3
B2	0.93	0.67	21.1	21.8
B3	1.01	0.67	21.8	22.5
LSD	0.02	0.06	0.33	0.33
Ca1	1.22	0.69	22.5	23.1
Ca2	1.11	0.66	20.8	21.4
Ca3	0.67	0.68	19.4	20.1
LSD	0.02	0.06	0.33	0.33

Concentraciones de nitratos (NO_3^-), amonio (NH_4^+), N orgánico (Norg) y N total (Nt) expresadas en mg g^{-1} p.s.

Por último, y al igual que los efectos individuales, la interacción B-Ca

sobre la concentración radicular de NH_4^+ no fue significativa ($F= 0.48, P> 0.05$) (Tablas 3b y 3c).

En cuanto a las formas nitrogenadas N orgánico y N total, ambas presentaron un comportamiento similar. El aumento de la aplicación de B supuso un incremento proporcional de N orgánico ($F= 92.69, P< 0.001$) (Tabla 3a) y de N total ($F= 91.58, P< 0.001$) (Tabla 3a), presentandose las máximas concentraciones radiculares en B3. En relación al efecto individual del Ca (Norg, $F= 176.02, P< 0.001$; Nt, $F= 178.44, P< 0.001$), éste fue contrario al que dio lugar el B, puesto que un aumento de la aplicación de Ca dio lugar a una disminución proporcional de N orgánico y N total (Tabla 3a).

TABLA 3b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de las distintas fracciones nitrogenadas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	NO_3^-	NH_4^+	Norg	Nt
Ca1B1	1.33	0.72	19.8	20.5
B2	1.09	0.68	21.7	22.4
B3	1.25	0.66	25.8	26.5
Ca2B1	1.12	0.66	19.0	19.7
B2	1.10	0.67	20.9	21.6
B3	1.10	0.65	22.4	23.0
Ca3B1	0.73	0.68	20.1	20.8
B2	0.60	0.66	20.7	21.4
B3	0.69	0.70	17.8	18.0
LSD	0.04	0.10	0.57	0.57

Concentraciones de nitratos (NO_3^-), amonio (NH_4^+), N orgánico (Norg) y N total (Nt) expresadas en mg g^{-1} p.s.

Con respecto a la interacción B-Ca (Norg, $F= 142.46, P< 0.001$; Nt, $F= 141.36, P< 0.001$), la influencia del Ca sobre el B se observa tanto para el N orgánico como para el N total cuando la dosis de Ca aplicada fue Ca3, ya que bajo esta dosis de Ca no se reflejo el efecto individual positivo del B (Tabla 3b).

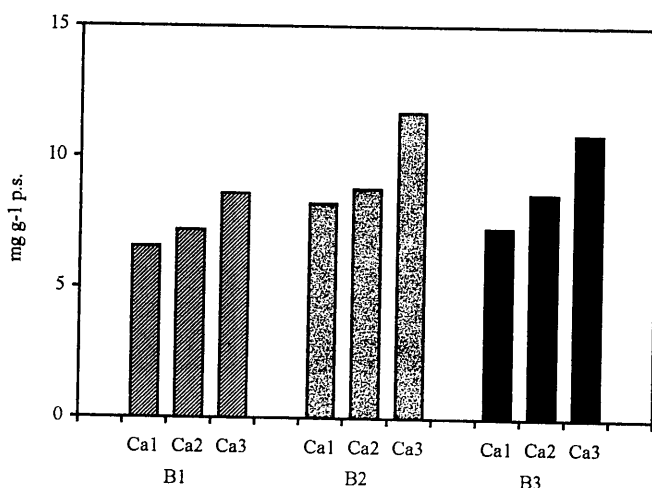


Figura 3c. Interacción B-Ca sobre la concentración radicular de Ca: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 0.24).

TABLA 3c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de las distintas fracciones nitrogenadas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	NO_3^-	NH_4^+	Norg	Nt
B ₁ Ca ₁	1.33	0.72	19.8	20.5
Ca ₂	1.12	0.66	19.0	19.7
Ca ₃	0.72	0.69	20.1	20.8
B ₂ Ca ₁	1.09	0.68	21.7	22.4
Ca ₂	1.10	0.67	20.9	21.6
Ca ₃	0.60	0.66	20.7	21.4
B ₃ Ca ₁	1.25	0.66	25.8	26.5
Ca ₂	1.10	0.65	22.4	23.0
Ca ₃	0.68	0.70	17.4	18.0
LSD	0.04	0.10	0.57	0.57

Concentraciones de nitratos (NO_3^-), amonio (NH_4^+), N orgánico (Norg) y N total (Nt) expresadas en mg g^{-1} p.s.

Por último, y en relación a la influencia del B sobre el Ca destacar que ésta se diferencio al efecto individual del Ca cuando la dosis aplicada de B fue B1. Bajo esta dosis de B las máximas concentraciones se presentaron en B1Ca1 y B1Ca3 no existiendo diferencias

estadísticas entre ambas combinaciones (Tabla 3c).

Como describiremos a continuación el comportamiento de los distintos parámetros del metabolismo nitrogenado en hojas fue similar al de las raíces.

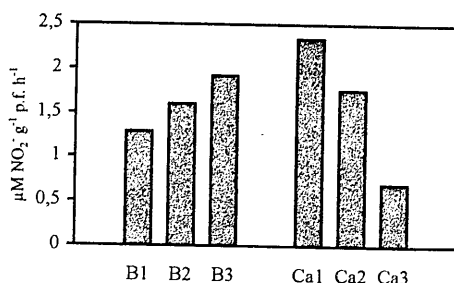


Figura 4a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad NR in vivo en hojas (LSD= 0.14)

La influencia del B sobre las actividades enzimáticas NR in vivo ($F=42.93, P<0.001$) (Fig. 4a), NR in vitro ($F=166.67, P<0.001$) (Tabla 4a) y NiR ($F=88.92, P<0.001$) (Tabla 4a) se definio

Tabla 4a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las actividades foliares de las enzimas involucradas en la asimilación de NO_3^- .

	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPC
B ₁	0.33	1.28	22.7	0.25	0.70
B ₂	0.43	1.59	25.3	0.32	0.93
B ₃	0.55	1.96	27.8	0.44	1.08
LSD	0.02	0.10	0.72	0.02	0.04
Ca ₁	0.66	2.47	30.6	0.53	1.57
Ca ₂	0.48	1.67	26.0	0.37	0.95
Ca ₃	0.18	0.69	19.2	0.12	0.19
LSD	0.02	0.10	0.72	0.02	0.04

Nitrato reductasa (NR) in vitro expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ formados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Nitrito reductasa (NiR) expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ transformados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Glutamina sintetasa (GS) expresada en $\mu\text{M Pi}$ mg^{-1} prot. min^{-1} ; Glutamato sintasa (GOGAT) expresada en $\mu\text{M NADH}$ oxidados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresada en $\mu\text{M NADH}$ oxidados mg^{-1} prot. min^{-1} .

como una relación directamente proporcional, encontrándose las máximas actividades en B3 con incrementos respecto a la mínima actividad de B1 del 49, 67 y 53% respectivamente. Por el contrario, la relación entre el Ca y las actividades NR in vivo ($F= 298.53$, $P< 0.001$) (Fig. 4a), NR in vitro ($F= 784.14$, $P< 0.001$) (Tabla 4a), y NiR ($F= 602.14$, $P< 0.001$) (Tabla 4a) fue inversamente proporcional, con las máximas actividades en Ca1 y las mínimas en Ca3 con disminuciones del 33, 72 y 72% respectivamente.

Como ocurría en raíces, y en relación a la interacción B-Ca (NR in vivo, $F= 13.08$, $P< 0.001$; NR in vitro, $F= 52.63$, $P< 0.001$; NiR, $F= 28.57$, $P< 0.001$), el efecto individual el B sobre estas enzimas no se reflejó cuando las dosis de B se aplicaron conjuntamente con la dosis Ca3. En este caso, no existió diferencias estadísticas entre las actividades enzimáticas obtenidas en los tres tratamientos de B (Fig. 4b y Tabla 4b). Al contrario que con el Ca, ninguna dosis de B varío el efecto individual del Ca sobre la actividad NR in vivo (Fig. 4c), NR in vitro (Tabla 4c) y NiR (Tabla 4c).

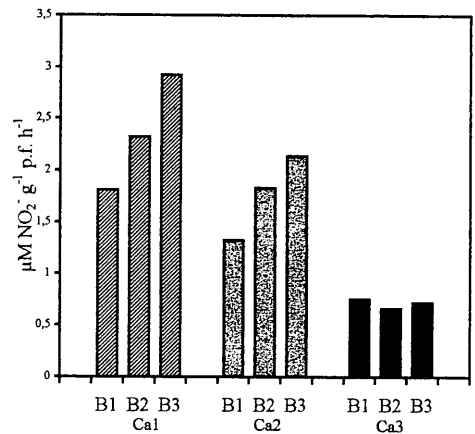


Figura 4b. Interacción B-Ca sobre la actividad NR in vivo en hojas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 0.24).

Como ocurría con la NR en sus dos formas y la NiR, las actividades enzimáticas GS, GOGAT y PEPC presentaron un comportamiento muy similar. El efecto individual del B sobre las actividades GS ($F= 104.07$, $P< 0.001$) (Tabla 4a), GOGAT ($F= 218.89$, $P< 0.001$) (Tabla 4a), y PEPC ($F= 248.53$, $P< 0.001$) se basó en un aumento proporcional de las actividades enzimáticas a medida que se

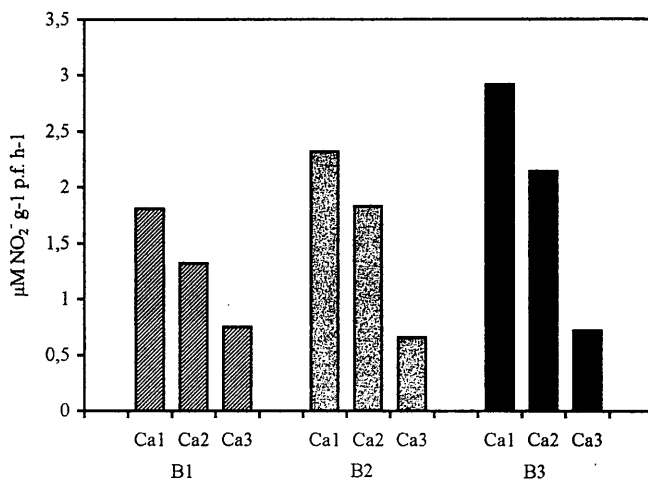


Figura 4c. Interacción B-Ca sobre la actividad NR in vivo en hojas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 1.36).

Tabla 4b. Interacción B-Ca sobre las actividades foliares de las enzimas involucradas en la asimilación de NO_3^- : Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPC
Ca ₁ B ₁	0.47	1.89	25.9	0.36	1.11
B ₂	0.62	2.45	30.3	0.47	1.60
B ₃	0.87	3.07	35.7	0.76	2.02
Ca ₂ B ₁	0.34	1.22	22.8	0.27	0.71
B ₂	0.48	1.64	26.3	0.36	0.99
B ₃	0.61	2.17	29.0	0.47	1.15
Ca ₃ B ₁	0.19	0.73	19.4	0.12	0.29
B ₂	0.18	0.69	19.4	0.13	0.19
B ₃	0.18	0.65	18.8	0.11	0.10
LSD	0.04	0.18	1.25	0.03	0.06

Nitrato reductasa (NR) in vitro expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ formados $\text{mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$; Nitrito reductasa (NiR) expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ transformados $\text{mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$; Glutamina sintetasa (GS) expresada en $\mu\text{M Pi}$ $\text{mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$; Glutamato sintasa (GOGAT) expresada en $\mu\text{M NADH oxidados}$ $\text{mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$; Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresada en $\mu\text{M NADH oxidados}$ $\text{mg}^{-1} \text{ prot. min}^{-1}$.

Tabla 4c. Interacción B-Ca sobre las actividades foliares de las enzimas involucradas en la asimilación de NO_3^- : Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPC
B ₁ Ca ₁	0.47	1.89	25.9	0.36	1.11
Ca ₂	0.34	1.22	22.8	0.27	0.71
Ca ₃	0.19	0.73	19.4	0.12	0.29
B ₂ Ca ₁	0.62	2.45	30.3	0.47	1.60
Ca ₂	0.48	1.64	26.3	0.36	0.99
Ca ₃	0.18	0.69	19.4	0.13	0.19
B ₃ Ca ₁	0.87	3.07	35.7	0.76	2.02
Ca ₂	0.61	2.17	29.0	0.47	1.15
Ca ₃	0.18	0.65	18.8	0.11	0.10
LSD	0.04	0.18	1.25	0.03	0.06

Nitrato reductasa (NR) in vitro expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ formados $\text{mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$; Nitrito reductasa (NiR) expresada en $\mu\text{M NO}_2^-$ transformados $\text{mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$; Glutamina sintetasa (GS) expresada en $\mu\text{M Pi mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$; Glutamato sintasa (GOGAT) expresada en $\mu\text{M NADH oxidados mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$; Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresada en $\mu\text{M NADH oxidados mg}^{-1} \text{prot. min}^{-1}$.

incrementaba la aplicación de B, encontrándose las máximas actividades en B₃ con incrementos del 23, 76 y 54% respectivamente, respecto a las mínimas actividades en B₁.

En cuanto al Ca, su efecto individual sobre las actividades enzimáticas GS (F= 519.86, P< 0.001) (Tabla 4a), GOGAT (F= 941.20, P< 0.001) (Tabla 4a), y PEPC (F= 3164.49, P< 0.001) (Tabla 4a) fue negativo presentándose las mínimas actividades en Ca₃.

En relación a la interacción B-Ca sobre la GS (F= 36.58, P< 0.001), GOGAT (F= 88.34, P< 0.001) y PEPC (F= 168.37, P< 0.001), la influencia del Ca sobre el B se reflejó cuando se aplicó la dosis Ca₃ conjuntamente con las dosis de B, haciendo que no existieran diferencias estadísticas entre los tratamientos de B en el caso de la GS y GOGAT (Tabla 4b), o bien que la máxima actividad enzimática se presentase en el tratamiento B₁ como en el caso de la actividad PEPC (Tabla 4b). Por último, y al igual que ha ocurrido en la mayoría de los casos estudiados, el B no influyó bajo ninguna dosis el efecto

individual del Ca sobre estas actividades enzimáticas (Tabla 4c).

Los aminoácidos y proteínas siguieron un comportamiento semejante al que estamos describiendo para el resto de parámetros nitrogenados. El incremento de la aplicación de B conllevó a un aumento proporcional de las concentraciones foliares de aminoácidos (F= 128.92, P< 0.001) (Tabla 5a) y de proteínas (F= 53.57, P< 0.001) (Tabla 5a), presentándose las máximas concentraciones en B₃.

TABLA 5a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de aminoácidos y proteínas.

	Aminoácidos	Proteínas
B ₁	2.58	9.43
B ₂	2.50	10.7
B ₃	3.46	11.6
LSD	0.13	0.42
Ca ₁	3.86	13.8
Ca ₂	2.79	10.8
Ca ₃	1.88	7.06
LSD	0.13	0.42

Aminoácidos y proteínas expresados en $\text{mg g}^{-1} \text{p.f.}$

Por otro lado, el Ca dio lugar a un comportamiento contrario al del B encontrándose las máximas concentraciones foliares de aminoácidos (F= 446.49, P< 0.001) y proteínas (F= 532.81, P< 0.001) en Ca1 y las mínimas en Ca3 (Tabla 5a).

TABLA 5b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de aminoácidos y proteínas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Aminoácidos	Proteínas
Ca ₁ B ₁	3.48	12.2
B ₂	2.33	13.9
B ₃	5.04	15.4
Ca ₂ B ₁	2.33	9.19
B ₂	2.47	11.0
B ₃	3.57	12.2
Ca ₃ B ₁	1.93	6.96
B ₂	1.94	7.12
B ₃	1.76	7.11
LSD	0.23	0.72

Aminoácidos y proteínas expresados en mg g⁻¹ p.f.

TABLA 5c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de aminoácidos y proteínas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Aminoácidos	Proteínas
B ₁ Ca ₁	3.48	12.2
Ca ₂	2.33	9.19
Ca ₃	1.93	6.96
B ₂ Ca ₁	2.33	13.9
Ca ₂	2.47	11.0
Ca ₃	1.94	7.12
B ₃ Ca ₁	5.04	15.4
Ca ₂	3.57	12.2
Ca ₃	1.76	7.11
LSD	0.03	0.72

Aminoácidos y proteínas expresados en mg g⁻¹ p.f.

En relación a la interacción B-Ca (Aminoácidos, F= 52.70, P< 0.001; Proteínas, F= 11.52, P< 0.001), destacar

que el efecto individual del B sobre estos compuestos nitrogenados no se reflejó cuando se aplicaron las dosis de B conjuntamente con Ca₃ (Tabla 5b), mientras que el B no influyó sobre el efecto individual del Ca descrito anteriormente (Tabla 5c).

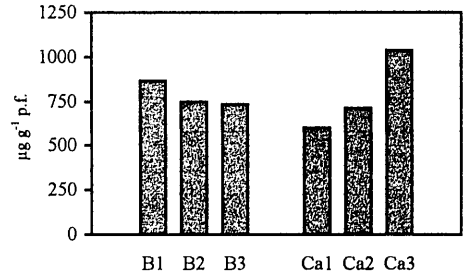


Figura 5a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de prolina (LSD= 39.7)

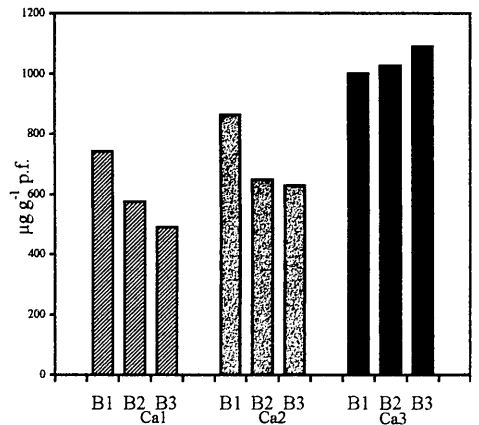


Figura 5b. Interacción B-Ca sobre la concentración foliar de prolina: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 68.8).

La prolina mostro un comportamiento contrario al descrito hasta el momento, ya que el aumento de B dio lugar a una disminución de este aminoácido, presentandose la mínima concentración en B3 (F= 27.04, P< 0.001) (Fig. 5a), mientras que el aumento de Ca conllevó a un incremento proporcional de

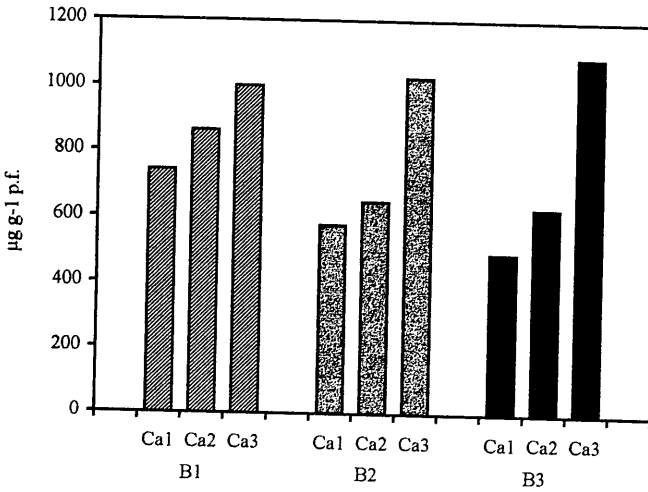


Figura 5c. Interacción B-Ca sobre la concentración foliar de prolina: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 68.8).

la prolina encontrándose la máxima concentración foliar en Ca3 ($F= 264.41$, $P < 0.001$) (Fig. 5a).

El estudio de la interacción B-Ca ($F= 16.88$, $P < 0.001$) nos indica que fue de nuevo la dosis Ca3 el que impidió que se reflejara el efecto individual del B sobre la prolina (Fig. 5b). Por el contrario, bajo las dosis Ca1 y Ca2 si se observó el efecto individual del B encontrándose las máximas concentraciones de prolina en B1. Finalmente, y en relación a la influencia del B sobre el efecto individual del Ca, ésta no se produjo presentándose las máximas concentraciones de prolina en Ca3 independientemente de las dosis de B aplicadas (Fig. 5c).

En relación a la concentración foliar de NO_3^- , el aumento en la aplicación de B supuso un aumento proporcional de éstos ($F= 103.74$, $P < 0.001$), presentándose la máxima concentración en B3 y la mínima en B1 (Tabla 6a). Con respecto al efecto del Ca ($F= 1120.11$, $P < 0.001$), el incremento en la aplicación de este elemento al medio de cultivo provocó una

disminución proporcional de NO_3^- , encontrándose la mínima concentración foliar en Ca3 (Tabla 6a).

TABLA 6a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las concentraciones foliares de las distintas fracciones nitrogenadas.

	NO_3^-	NH_4^+	Norg	Nt
B1	3.58	1.33	23.6	24.9
B2	4.23	1.39	26.0	27.4
B3	5.03	1.35	30.0	31.3
LSD	0.20	0.06	0.86	0.85
Ca1	6.75	1.33	35.4	36.8
Ca2	4.09	1.37	26.0	27.3
Ca3	2.00	1.38	18.2	19.5
LSD	0.20	0.06	0.86	0.85

Concentraciones de nitratos (NO_3^-), amonio (NH_4^+), N orgánico (Norg) y N total (Nt) expresadas en mg g^{-1} p.s.

En cuanto a la interacción B-Ca ($F= 50.98$, $P < 0.001$), ésta fue significativa debido principalmente a la influencia del Ca sobre el efecto individual del B (Tabla 6b). Bajo la dosis Ca3 observamos como el efecto del B sobre los NO_3^- no se produjo, presentándose las máximas concentraciones de este anión en Ca3B1 y

Ca3B2. Finalmente, el B no varío el efecto individual del Ca sobre los NO_3^- (Tabla 6c).

TABLA 6b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de las distintas fracciones nitrogenadas: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	NO_3^-	NH_4^+	Norg	Nt
Ca ₁ B ₁	5.23	1.31	30.1	31.4
B ₂	6.84	1.34	34.1	35.5
B ₃	8.20	1.34	42.1	43.4
Ca ₂ B ₁	3.41	1.32	23.2	24.5
B ₂	3.72	1.43	25.3	26.7
B ₃	5.15	1.37	29.5	30.8
Ca ₃ B ₁	2.12	1.38	17.5	18.9
B ₂	2.15	1.41	18.7	20.1
B ₃	1.75	1.36	18.3	19.7
LSD	0.35	0.11	1.50	1.48

Concentraciones de nitratos (NO_3^-), amonio (NH_4^+), N orgánico (Norg) y N total (Nt) expresadas en mg g^{-1} p.s.

TABLA 6c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de las distintas fracciones nitrogenadas: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	NO_3^-	NH_4^+	Norg	Nt
B ₁ Ca ₁	5.23	1.32	30.1	31.4
Ca ₂	3.41	1.32	23.2	24.5
Ca ₃	2.12	1.38	17.5	18.9
B ₂ Ca ₁	6.84	1.34	34.1	35.5
Ca ₂	3.72	1.43	25.3	26.7
Ca ₃	2.15	1.41	18.7	20.1
B ₃ Ca ₁	8.20	1.34	42.1	43.4
Ca ₂	5.15	1.37	29.5	30.8
Ca ₃	1.75	1.36	18.3	19.7
LSD	0.35	0.11	1.50	1.48

Concentraciones de nitratos (NO_3^-), amonio (NH_4^+), N orgánico (Norg) y N total (Nt) expresadas en mg g^{-1} p.s.

Con respecto al comportamiento del Cl^- , tanto los efectos individuales del B ($F=125.64$, $P<0.001$) (Fig. 6a) y del Ca ($F=960.67$, $P<0.001$) (Fig. 6a), como la interacción B-Ca ($F=61.42$, $P<0.001$) fueron totalmente contrarios a los

explicados para los NO_3^- .

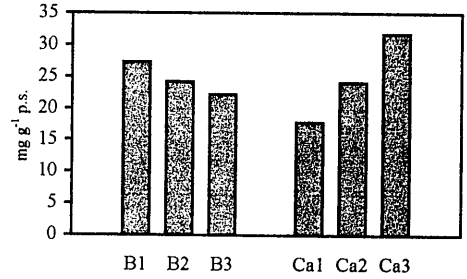


Figura 6a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de Cl^- (LSD= 0.64)

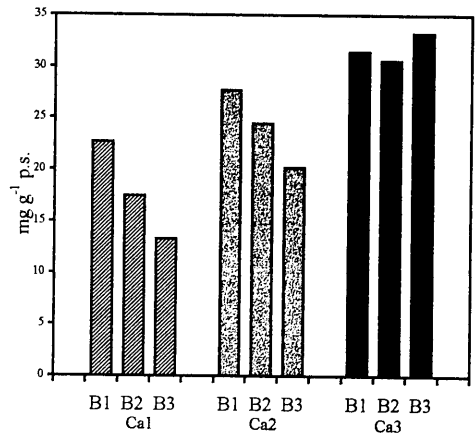


Figura 6b. Interacción B-Ca sobre la concentración foliar de Cl^- : Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 1.11).

Al igual que ocurría en las raíces, en hojas no se obtuvo ningún efecto estadísticamente significativo ni del B ($F=1.45$, $P>0.05$) (Tabla 6a), ni del Ca ($F=1.46$, $P>0.05$) (Tabla 6a), ni de la interacción B-Ca ($F=0.55$, $P>0.05$) sobre la concentración foliar de NH_4^+ .

Por último, el N orgánico y el Ntotal mostraron un comportamiento similar, incrementando sus concentraciones foliar al aumentar las dosis de B (Norg, $F=113.28$, $P<0.001$; Nt, $F=116.01$, $P<0.001$) (Tabla 6a), y disminuyendo éstas al aumentar las dosis

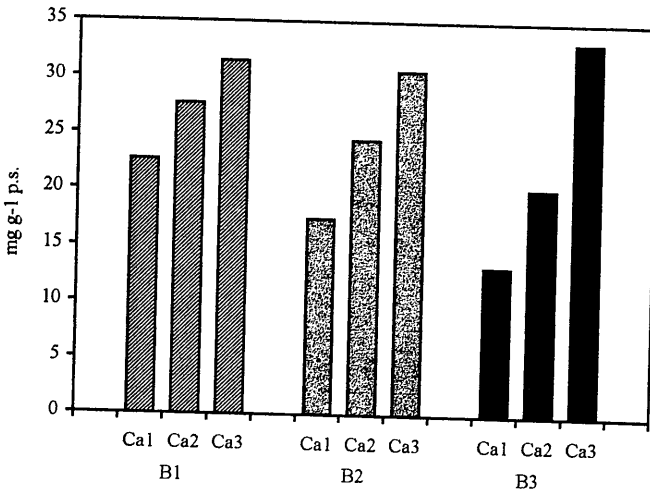


Figura 6c. Interacción B-Ca sobre la concentración foliar de Cl: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 1.11).

de Ca (Norg, $F= 816.90$, $P < 0.001$; Nt, $F= 829.35$, $P < 0.001$) (Tabla 6a). De nuevo, el hecho de que el Ca muestre un efecto superior al del B hizo que posiblemente la única interacción B-Ca se presente cuando se aplicó Ca3 (Norg, $F= 30.74$, $P < 0.001$; Nt, $F= 31.68$, $P < 0.001$), lo que conlleva a la no aparición del efecto individual de B sobre estas formas nitrogenadas (Tablas 6b y 6c).

V. Discusión.

Iniciamos este apartado analizando las respuesta NO_3^- ante la aplicación de B y Ca, dado que uno de los principales factores que limitan la asimilación de NO_3^- es su disponibilidad. Además, los NO_3^- son una señal esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, puesto que inducen o activan los genes que intervienen en los procesos de asimilación del N (Glass y Siddiqi, 1995; von Wiren et al., 1997; Crawford y Glass, 1998).

En nuestra experiencia, y en relación al B, la influencia de este micronutriente sobre la concentración radicular de NO_3^- no fue muy directa y clara (Tabla 3a), puesto que las máximas concentraciones se presentaron en B1 y las mínimas en B2, no siendo por lo tanto las relaciones entre las concentraciones de B total y las de NO_3^- en raíces significativas ($r = -0.27$, ns). Por el contrario, en hojas el aumento en la aplicación de B dio lugar a un incremento significativo de la concentración foliar de NO_3^- , presentándose las máximas concentraciones en B3 (Tabla 6a), y siendo además en este caso la relación entre el B total y los NO_3^- significativa ($r = 0.87$, ***).

Ruiz et al. (1998) indicaron que una de las posibles causas del efecto positivo del B sobre la asimilación de NO_3^- se debía a la influencia del B incrementando la absorción de este anión. Ésta posibilidad, se basaba en la observación de que bajo condiciones deficientes o elevadas de B se producía una hiperpolarización de la membrana plasmática radicular (Schon et al., 1990; Cakmak et al., 1995). La hiperpolarización de la membrana plasmática daría lugar a la entrada masiva de NO_3^- a las células radiculares, que posteriormente se transportarían hacia la parte aérea para actuar en ésta como estímulo en la

inducción de las enzimas responsables de su reducción y asimilación (Crawford, 1995; Sivasankar y Oaks, 1996).

En nuestra experiencia, la concentración foliar de NO_3^- (Tabla 6a) fue superior a la radicular (Tabla 3a). Este hecho, junto con el efecto positivo y directo del B sobre los NO_3^- en hojas, nos sugiere pensar que el aumento en la aplicación de B al medio de cultivo favorece la absorción y posterior translocación de NO_3^- hacia las hojas, encontrándose de esta manera las máximas concentraciones foliares de esta fracción nitrogenada en B3 (Tabla 6a).

En cuanto al efecto individual del Ca sobre los niveles de NO_3^- , en nuestra experiencia tanto en raíces (Tabla 3a) como en hojas (Tabla 6a) el aumento en la aplicación de Ca dio lugar a una disminución en la concentración de NO_3^- . Varios estudios han descrito que el Ca puede inhibir la absorción o entrada radicular de los NO_3^- , lo que haría disminuir también su transporte hacia la parte aérea (Kafkafi et al., 1992; Aslam et al., 1995). En nuestra experiencia las relaciones entre estos dos parámetros, tanto en raíces como en hojas, nos indican que posiblemente el Ca este inhibiendo o disminuyendo de forma significativa la absorción y posterior translocación de los NO_3^- hacia la parte aérea ($r = -0.85$, ***; $r = -0.94$ ***, respectivamente).

Sin embargo, otro factor que podría influir tanto la absorción como la translocación hacia la parte aérea de NO_3^- es la presencia del ion Cl^- , dado el antagonismo entre los dos aniones (Wieneke, 1994; Gouia et al., 1994; Sweeby et al., 1994; Jaenicke et al., 1996). No hay que olvidar que en nuestra experiencia el Ca fue aplicado como CaCl_2 , y por lo tanto, y como era de esperar el ion Cl^- incremento a medida que aumentaba la dosis de CaCl_2 tanto en

raíces (Fig. 3a) como en hojas (Fig. 6a). La relación entre los aniones Cl^- y NO_3^- en raíces y en hojas fue negativa y significativa ($r = -0.79$, ***; $r = -0.88$, ***, respectivamente), lo que nos muestra un efecto antagónico del Cl^- sobre los NO_3^- similar al descrito en el caso del Ca.

Jaenicke et al. (1996) indicaron que cuando el Cl^- aplicado al medio de cultivo era en una concentración de 25 mM la entrada de NO_3^- se reducía significativamente. Por el contrario, a bajas concentraciones de Cl^- el antagonismo con los NO_3^- ocurría principalmente en la translocación hacia la parte aérea, acumulándose por lo tanto los NO_3^- en las raíces. Este último proceso fue observado también por Ruiz et al. (1999). En nuestra experiencia, la máxima concentración de Cl^- aplicada al medio de cultivo fue de 5 mM, y teniendo en cuenta que a esta concentración los contenidos en NO_3^- disminuyeron tanto en raíces como en hojas, parece ser que el antagonismo en nuestra experiencia aparece en la absorción y no en la translocación.

El efecto del B sobre la acumulación de los NO_3^- en hojas se presentó cuando este micronutriente se aplicó conjuntamente con las dosis Ca1 y Ca2 (Tabla 6b). Sin embargo, cuando se aplicó conjuntamente con Ca3 el efecto individual del B no se produjo en hojas (Tabla 6b), y además las concentraciones de NO_3^- tanto en raíces (Tabla 3b) como en hojas (Tabla 6b) fueron las más bajas de la experiencia. La aplicación de la dosis Ca3 conlleva a que en este tratamiento, tanto en raíces como en hojas, se presentaran las máximas concentraciones de Ca y Cl^- , lo que explicaría las mínimas concentraciones de NO_3^- obtenidas, debido a una disminución tanto en su absorción radicular como en su translocación hacia la parte aérea. Otra de las posibles causas de que se produzca esta interacción B-Ca en

relación a los NO_3^- podría ser la función del Ca como estabilizador de la membrana plasmática, lo que impediría posiblemente la hiperpolarización de ésta bajo la dosis Ca3 y por lo tanto la entrada masiva de NO_3^- .

Estos hechos nos demuestran en nuestra experiencia que los efectos negativos tanto del Ca como del Cl^- sobre los NO_3^- fueron predominantes a los del B. Además, la aplicación conjunta de cualquier dosis de B con los distintos tratamientos de CaCl_2 no modificó el efecto ni del Ca ni el del Cl^- sobre los NO_3^- ni en raíces (Tabla 3c) ni en hojas (Tabla 6c).

La primera etapa en la asimilación de NO_3^- es la reducción de éstos a NO_2^- por la actividad NR, siendo esta etapa la más regulable y a su vez limitante en el proceso de asimilación de los NO_3^- (Huber et al., 1996; Campbell, 1996; Sivasankar y Oaks, 1996; Gojon et al., 1998). Uno de los factores principales que determinan la inducción y actividad de la NR es la disponibilidad de NO_3^- o los niveles intracelulares de estos (Crawford, 1995; Sivasankar y Oaks, 1996; López-Cantarero et al., 1997; Gojon et al., 1998; Ruiz et al., 1998; Ruiz y Romero, 1998, 1999; Ruiz et al., 1999). En nuestra experiencia, las relaciones entre las concentraciones de NO_3^- y las actividades NR in vivo e in vitro, tanto en raíces como en hojas, fueron positivas y significativas (*Raíces*: NO_3^- -Actividad NR in vivo, $r = 0.81$ ***, NO_3^- -Actividad NR in vitro, $r = 0.84$ ***; *Hojas*: NO_3^- -Actividad NR in vivo, $r = 0.87$ ***, NO_3^- -Actividad NR in vitro, $r = 0.95$ ***). Estas relaciones nos confirman la dependencia de esta actividad enzimática a la disponibilidad de su sustrato.

Distintos investigadores han indicado que uno de los efectos de la deficiencia de B es la reducción en la actividad NR (Augsten y Michel, 1986;

Bonilla et al., 1980, 1984, 1988; Kastori y Pretovic, 1989; Ramón et al., 1989). Por otro lado, se ha comprobado que el principal efecto del B sobre el metabolismo nitrogenado se basa en la síntesis "de novo" de proteínas enzimáticas (Shelp, 1988, 1990; Ruiz et al., 1998). En nuestra experiencia, la acción del B sobre la actividad NR in vivo y la NR in vitro consistió en un aumento de las actividades enzimáticas, presentándose tanto en raíces (Fig. 1a y Tabla 1a, respectivamente) como en hojas (Fig. 4a y Tabla 4a, respectivamente) las máximas actividades en B3, siendo por lo tanto las correlaciones entre estos parámetros positivas y significativas (*Raíces*: B total-Actividad NR in vivo, $r = 0.78$ ***; B total-Actividad NR in vitro, $r = 0.82$ ***; *Hojas*: B total-Actividad NR in vivo, $r = 0.86$ ***; B total-Actividad NR in vitro, $r = 0.88$ ***).

Por otro lado, otros trabajos han revelado el efecto inhibitor tanto del Ca (Lillo, 1994; Bharti et al., 1996; Huber et al., 1996; Ruiz et al., 1999) como del Cl^- (Sweby et al., 1994; Gouia et al., 1994; Kenjebaeva y Rakova, 1995; Richharia et al., 1997; Ruiz et al., 1999) sobre la actividad NR. El aumento proporcional en la aplicación de las dosis de CaCl_2 en nuestra experiencia dio lugar a un incremento, tanto en raíces como en hojas, de las concentraciones de Ca (Ver Capítulo I: Tablas 1a y 5a, respectivamente) y del Cl^- (Figs. 3a y 6a, respectivamente). Este hecho podría explicar las mínimas actividades enzimáticas NR in vivo y NR in vitro encontradas en el tratamiento Ca3, y las máximas en el tratamiento Ca1 tanto en raíces como en hojas. La relación entre estos parámetros nos refleja el efecto inhibitor del Ca y del Cl^- sobre la actividad NR en nuestra experiencia (*Raíces*: Ca total-Actividad NR in vivo, $r = -0.83$ ***; Ca total-Actividad NR in vitro, $r = -0.80$ ***; Cl^- -Actividad NR in vivo, $r =$

-0.86 ***; Cl^- -Actividad NR in vitro, $r = -0.85$ ***; *Hojas*: Ca total-Actividad NR in vivo, $r = -0.91$ ***; Ca total-Actividad NR in vitro, $r = -0.90$ ***; Cl^- -Actividad NR in vivo, $r = -0.94$ ***; Cl^- -Actividad NR in vitro, $r = -0.92$ ***).

En cuanto a la interacción B-Ca que se produce sobre las actividades NR in vivo y NR in vitro tanto en raíces (Fig 1b y Tabla 1b, respectivamente) como en hojas (Fig. 4b y Tabla 4b, respectivamente) cuando el CaCl_2 fue aplicado bajo su concentración de 5 mM conjuntamente con las dosis de B, indicar que al igual que ocurría en el caso de los NO_3^- el efecto positivo del B sobre estas actividades enzimáticas no se reflejó apareciendo o predominando el efecto inhibitor del Ca y del Cl^- .

La siguiente etapa en la asimilación de los NO_3^- es la conversión de NO_2^- a NH_4^+ por acción de la actividad NiR (Sivasankar y Oaks, 1996; Migge y Becker, 1996). Ambas enzimas, la NR y la NiR, son inducidas por los mismos factores (Oaks, 1994). Uno de estos factores es los NO_3^- (Wray, 1993), presentando una relación con la actividad NiR en nuestra experiencia tanto en raíces como en hojas positiva y significativa (*Raíces*: NO_3^- -Actividad NiR, $r = 0.77$ **; *Hojas*: NO_3^- -Actividad NiR, $r = 0.87$ ***). Como indicábamos en la sección de resultados tanto los efectos individuales del B y del Ca, así como la interacción B-Ca fueron similares a los que explicábamos para la actividad NR.

En cuanto al NH_4^+ , ni el B ni el Ca influyeron significativamente sobre esta fracción nitrogenada en ninguno de los órganos estudiados (Tablas 3 y 6, respectivamente). Además, destacar que tampoco se observó ningún tipo de interacción B-Ca en este parámetro. Quizás, y teniendo en cuenta que la acumulación de NH_4^+ puede ser tóxica

para las células, las plantas de tabaco independientemente del tratamiento aplicado utilice este NH_4^+ rápidamente para la formación de compuestos nitrogenados, como ha sido reportado en otros trabajos (Temple et al., 1998).

El NH_4^+ originado en las plantas procedente de la reducción de los NO_3^- es incorporado a moléculas orgánicas inicialmente a través de la actividad GS. Esta enzima cataliza la conversión del aminoácido glutamato a su amida glutamina. Entonces y posteriormente, la enzima GOGAT cataliza la transferencia del grupo amida de la glutamina a la molécula 2-oxoglutarato para producir 2 moléculas de glutamato. Una de estas moléculas de glutamato vuelve a ser el sustrato de la GS mientras que la otra es transformada para sintetizar otros aminoácidos (Sivasankar y Oaks, 1996). Finalmente, una de las enzimas también esta involucrada en la asimilación de los NO_3^- es la actividad PEPC, cuya función ha sido relacionada con la producción de ácidos tricarbónicos, como esqueletos carbonados para la síntesis de glutamato y aspartato y de sus amidas (Sechley et al., 1992).

En cuanto a los factores que regulan a estas enzimas, aunque la bibliografía existente no es muy clara, parece ser que las actividades GS y GOGAT serían afectadas por la presencia de NO_3^- (Oaks, 1994), mientras que la PEPC sería inducida principalmente por el NH_4^+ (Oaks, 1994). En nuestra experiencia, las relaciones entre los NO_3^- y estas enzimas fueron positivas y significativas principalmente en hojas (*raíces*: NO_3^- -GS, $r = 0.63$ *, NO_3^- -GOGAT, $r = 0.69$ **, NO_3^- -PEPC, $r = 0.66$ *; *hojas*: NO_3^- -GS, $r = 0.84$ ***, NO_3^- -GOGAT, $r = 0.89$ ***, NO_3^- -PEPC, $r = 0.83$ ***)).

Por otro lado, el comportamiento

de estas tres enzimas fue similar a de las enzimas NR y NiR, disminuyendo sus actividades al aumentar la aplicación al medio de CaCl_2 y aumentando sus actividades al incrementar las dosis de B aplicadas, tanto en raíces (Tabla 1a) como en hojas (Tabla 4a). De nuevo, y al igual que ocurría para las enzimas NR y NiR, cuando la dosis Ca_3 se aplicó conjuntamente con los distintos tratamientos de B apareció una interacción B-Ca consistente en que no se reflejó el efecto individual del B tanto en raíces (Tabla 1b) como en hojas (Tabla 4b).

Distintos trabajos han examinado la relación entre la actividad NR y el resto de enzimas involucradas en la asimilación de los NO_3^- (Woodall y Forde, 1996; Ruiz et al., 1998, 1999). En estos trabajos se ha comprobado que existe una relación muy estrecha entre estas enzimas, lo que confirma de alguna manera el supuesto de que la acción de la NR es la etapa clave y limitante en la asimilación de los NO_3^- (Gojon et al., 1998). En nuestra experiencia, también se observó tanto en raíces como en hojas, una relación estrecha de la NR con el resto de las enzimas involucradas en la asimilación de NO_3^- (*raíces*: NR-NiR, $r = 0.82$ ***, NR-GS, $r = 0.76$ **, NR-GOGAT, $r = 0.86$ ***, NR-PEPC, $r = 0.83$ ***, *hojas*: NR-NiR, $r = 0.93$ ***, NR-GS, $r = 0.88$ ***, NR-GOGAT, $r = 0.90$ ***, NR-PEPC, $r = 0.95$ ***)

Este hecho nos puede sugerir que tanto los efectos individuales del B y del Ca, así como la interacción B-Ca se producen principalmente sobre la actividad NR, lo que repercutiría en el resto de las enzimas comportándose éstas de forma similar a la actividad NR, dada su papel como factor limitante en la reducción y posterior asimilación de los NO_3^- . Finalmente, nos gustaría destacar que independientemente de los tratamientos

aplicados tanto las concentraciones de NO_3^- como las actividades enzimáticas involucradas en la asimilación de éstos fueron superiores en hojas en comparación a los resultados obtenidos en raíces. Esto nos sugiere que la mayoría de los NO_3^- que son absorbidos son translocados hacia la parte aérea y allí son reducidos. Esta hipótesis esta concordancia con los trabajos de Wakhloo y Staudt (1980), Mackown et al. (1990), Mackown (1991) y Sisson et al. (1991), en los cuales se indica que en plantas de tabaco normalmente más del 80% de la reducción de los NO_3^- ocurre en las hojas.

Por lo general, un incremento en la cantidad y actividad NR conduce a un aumento en el potencial de asimilación de NO_3^- , y confiere además una mayor capacidad para sintetizar aminoácidos, proteínas y N orgánico y total, como ha sido reportado en distintos trabajos (Vincentz et al., 1993; Barneix y Causin, 1996; López-Cantarero et al., 1997; Ruiz et al., 1998; Ruiz y Romero, 1998, 1999; Ruiz et al., 1999). Efectivamente, tanto en raíces como en hojas, la relación entre la actividad NR y estas formas nitrogenadas fue muy estrecha (*raíces*: NR-aminoácidos, $r = 0.83$ ***, NR-proteínas, $r = 0.87$ ***, NR-N orgánico, $r = 0.81$ ***, NR-N total, $r = 0.85$ ***; *hojas*: NR-aminoácidos, $r = 0.96$ ***, NR-proteínas, $r = 0.92$ ***, NR-N orgánico, $r = 0.90$ ***, NR-N total, $r = 0.92$ ***), puesto que el comportamiento de estos compuestos nitrogenados fue similar al de la actividad NR, aumentando sus concentraciones al incrementar la aplicación de B y disminuyéndose al aumentar la aplicación de Ca al medio de cultivo (*raíces*: Tablas 2a y 3a, respectivamente; *hojas*: Tablas 5a y 6a respectivamente). Con respecto a la interacción B-Ca que se produjo en estos compuestos y formas nitrogenadas fue igual a la descrita para la actividad NR,

puesto que la aplicación conjunta de la dosis Ca3 con los tratamientos de B produjo una inhibición del efecto individual del B tanto en raíces (Tablas 2b y 3b, respectivamente) como en hojas (Tablas 5b y 6b, respectivamente).

Finalmente, y para concluir esta apartado intentaremos discutir la posible función de la prolina en nuestra experiencia. Como ha sido descrito en distintas revisiones, la acumulación de la prolina es una respuesta común de las plantas superiores a situaciones de déficit hídrico, estrés salino y estrés térmico (Delauney y Verma, 1993; Dörffling et al., 1993). Además, la prolina puede proteger ante una desnaturalización térmica de las proteínas (Santoro et al., 1992), y en algunos casos disminuir o contrarrestar los efectos inhibidores del ClNa (Manetas et al., 1986). La prolina también en determinados casos muestra una función como "receptor" de radicales hidroxilos (Smirnoff y Cumbes, 1989), y de estabilizador de membranas por su interacción con fosfolípidos (Rudolf et al., 1986). Todas estas funciones definen a la prolina como un aminoácido clave en la adaptación de las plantas a condiciones adversas.

En nuestra experiencia intentaremos abordar la relación entre la prolina y la acumulación de Cl⁻. En las raíces, la relación Cl⁻-prolina no fue significativa ($r = 0.44$ ns), lo que nos puede explicar el comportamiento poco homogéneo de la prolina en este órgano (Figs. 2a,b,c). La falta de correlación entre estos parámetros en raíces, podría deberse posiblemente a que la mayoría del ion Cl⁻ absorbido fue translocado hacia las hojas, presentándose en las raíces concentraciones de este elemento inferiores a las de las hojas. Por el contrario, en hojas la relación entre el Cl⁻ y la prolina fue positiva y significativa ($r =$

0.94 ***) acumulándose este compuesto nitrogenado al aumentar la concentración foliar de Cl^- (Fig. 6a). Este hecho explicaría porque los efectos individuales tanto de B como del Ca sobre la prolina (Fig. 5a) fueron contrarios a los presentados para los aminoácidos y proteínas (Tabla 6a).

VI. Conclusiones.

Primera: La absorción y translocación de NO_3^- se vio afectada por las dosis elevadas de CaCl_2 aplicada al medio de cultivo, puesto que éstas dieron lugar a las máximas concentraciones radiculares y foliares de Ca y Cl^- , y a las mínimas concentraciones de NO_3^- , reflejándonos estos resultados una relación antagonica entre estos elementos. Por el contrario, el incremento en la aplicación de B nos hace pensar que favoreció la absorción y translocación de NO_3^- hacia la parte aérea. Sin embargo, estos procesos no se produjeron cuando se aplico conjuntamente las dosis de B con Ca^{3+} , lo que nos sugiere el efecto predominante de este último. Por su parte, el B no afecto en ningún momento el efecto del CaCl_2 sobre la absorción y translocación de NO_3^- .

Segunda: En nuestra experiencia tanto la actividad NR in vivo como la actividad NR in vitro se vieron reguladas por varios factores. La disponibilidad de los NO_3^- presento una relación positiva y muy estrecha con esta actividad enzimática. Por otro lado, los efectos individuales del B y del Ca sobre la actividad NR confirma, como ha sido descrito en otros trabajos, que el B influye induciendo positivamente a esta actividad enzimática mientras que el Ca y el Cl^- la inhiben claramente.

Teniendo en cuenta la bibliografía sobre al respecto, los resultados y las correlaciones obtenidas en nuestra

experiencia, podemos sugerir que la fase limitante en la asimilación de los NO_3^- es la actividad NR, y por lo tanto el comportamiento del resto de las enzimas involucradas en este proceso metabólico, como son la NiR, GS, GOGAT y PEPC, se debería directamente a su dependencia de la actividad NR y no a los efectos del B, del Ca y del Cl^- . Este hecho también explicaría la respuesta similar a la NR que se observe en los compuestos resultantes de la asimilación de los NO_3^- como son los aminoácidos, las proteínas y el N orgánico y total. Finalmente, la interacción B-Ca se produce solamente cuando se aplican las distintas dosis de B con Ca^{3+} , lo que da lugar a la no aparición del efecto positivo del B debido principalmente a las elevadas concentraciones de Ca y Cl^- que presentan los tratamientos a los que se le aplica Ca^{3+} .

Tercera: En nuestra experiencia la asimilación de los NO_3^- se realiza principalmente en las hojas, puesto que en este órgano se encuentran las concentraciones de NO_3^- más elevadas, las máximas actividades enzimáticas, y los máximos niveles de compuestos resultantes de la asimilación de NO_3^- , como son los aminoácidos, las proteínas, el N orgánico y total. Finalmente, y teniendo en cuenta los efectos individuales, así como la interacción B-Ca sobre los distintos parámetros nitrogenados, sería más beneficioso para inducir este proceso metabólico aplicar elevadas dosis de B conjuntamente con bajas de Ca (B^3Ca^1).

Cuarta: La relación entre la acumulación de Cl^- y la acumulación de prolina fue significativa y directamente proporcional únicamente en las hojas, lo que nos puede indicar que la función de la prolina ante un estrés salino solamente se produce cuando las concentraciones de las distintas sales, y principalmente del Cl^- , son elevadas, puesto que en nuestra experiencia las concentraciones de Cl^-

VII. Referencias.

- Ali AA, Ikeda M, Yamada Y. 1991.** Effects of supply of K, Ca, and Mg on the absorption and assimilation of ammonium- and nitrate-nitrogen in tomato plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37: 283-289.
- Artes OC, Ruiz ROC. 1983.** Influence of boron on amino acid contents in tomato plant. I. *Sap. Agrochim.* 27: 498.
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC. 1992.** Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley seedlings. *Plant Physiol.* 99: 1124-1133.
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC. 1995.** Effect of pH and calcium on short-term NO fluxes in roots of barley seedlings. *Plant Physiol.* 108: 727-734.
- Augsten H, Michel D. 1986.** Influence of boron on nitrate reductase activity in roots of *Zea mays*. In: Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Lambers H, Neeteson JJ, Stulen I. eds. Martinus Nijhoff Publishers, AA Dordrecht, The Netherlands.
- Barneix AJ, Causin HF. 1996.** The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *J. Plant Physiol.* 149: 358-362.
- Barthes L, Deléens E, Bousser A, Hoarau J, Prioul JL. 1996.** Xylem exudation is related to nitrate assimilation pathway in detopped maize seedlings: use of nitrate reductase and glutamine synthetase inhibitors as tools. *J. Exp. Bot.* 47: 485-495.
- Belver A, Roldan M, Rodriguez MP, Donaire JP. 1988.** Plant senescence in relation to boron. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 383-388.
- Bharti N, Singh RP, Sinha SK. 1996.** Effect of calcium chloride on heavy metal induced alteration in growth and nitrate assimilation of *Sesamum indicum* seedlings. *Phytochem.* 41: 105-109.
- Bonilla I, Cadahia C, Carpena O, Hernando V. 1980.** Effects of boron on nitrogen metabolism and sugar levels of sugar beet. *Plant Soil* 57: 3.
- Bonilla I, Mateo P, Garate A, Fernandez E, Sánchez E. 1984.** Effects of boron on nitrate reductase activity and sugar levels in *Lycopersicon esculentum*. 6th International Colloquium for the Optimization of Plant Nutrition. Actes Proc., Vol. 1, Pierre Martin-Prevel, Montpellier, 77.
- Bonilla I, Mateo P, Garate A. 1988.** Acción del boro sobre el metabolismo nitrogenado en *Lycopersicon esculentum* cv. Dombo, cultivado en hidroponia. *Agrochim.* 32: 276-284.
- Botella MG, Cruz C, Martins-Loucao AM, Cerda A. 1993.** Nitrate reductase activity in wheat seedlings as affected by NO/NH ratio and salinity. *J. Plant Physiol.* 142: 531-536.
- Bowsher CG, Hucklesby DP, Emes MJ. 1993.** Induction of ferredoxin-NADP oxidoreductase and ferredoxin synthesis in pea root plastids during nitrate assimilation. *Plant J.* 3: 463-467.

- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Caboche M, Rouzé P. 1990.** Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet.* 6: 187-192.
- Cakmak I, Kurz H, Marschner H. 1995.** Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. *Physiol. Plant.* 95: 11-18.
- Campbell WH. 1996.** Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiol.* 111: 355-361.
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Young VL. 1975.** Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 6: 71-80.
- Champigny ML, Foyer C. 1992.** Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 100: 7-12.
- Clarkson DT, Luttge U. 1991.** Mineral nutrition: inducible and repressible nutrient transport system. *Progress in Botany*, Vol. 52. Springer-Verlag, Berlin.
- Cooper HD, Clarkson DT. 1989.** Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals. A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 40: 753-762.
- Crawford NM. 1995.** Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7: 859-868.
- Crawford NM, Glass ADM. 1998.** Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trend Plant Sci.* 3: 389-395.
- Dave IC, Kannan S.** Influence of boron deficiency on micronutrients absorption by *Phaseolus vulgaris* and protein contents in cotyledons. *Acta Physiol. Plant.* 3: 27.
- Deane-Drummond CE, Glass ADM. 1982.** Studies of nitrate influx into barley roots by the use of ^{36}ClO as a tracer for nitrate. 1. Interaction with chloride and other ions. *Can. J. Bot.* 60: 2147-2153.
- Deane-Drummond CE. 1990.** Biochemical and physiological aspects of nitrate uptake and its regulation. In: *Nitrogen in higher plants*. Abrol YP. ed., Research studies press, John Wiley & Sons, New York.
- Delauney AJ, Verma DPS. 1993.** Proline biosynthesis and osmoregulation in plant. *Plant J.* 4: 215-223.
- Dörffling K, Dörffling H, Lesselich G. 1993.** In vitro-selection and regeneration of hydroxyproline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance. *J. Plant Physiol.* 142: 222-225.
- Dugger WM. 1983.** Boron in plant metabolism. In: *Encyclopedia of plant physiology*. Vol. 15. Lauchli A, Bielecki RL. eds., Springer-Verlag, Berlin.

- Duncanson E, Gilkes AF, Kirk DW, Sherman A, Wray JL. 1993.** nirl, a conditional-lethal mutation in barley causing a defect in nitrite reduction. *Mol. Gen. Genet.* 236: 275-282.
- Farnden KJF, Roberston JG. 1980.** Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: *Methods for evaluating biological nitrogen fixation.* Bergersen FJ, ed. John Wiley & Sons, New York.
- Fedorova E, Greenwood JS, Oaks A. 1994.** In situ localization of nitrate reductase in maize roots. *Planta* 194: 279-286.
- Freeman J, Marquez AJ, Wallsgrave RM, Saarelainen R, Forde BG. 1990.** Molecular analysis of barley mutants deficient in chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol. Biol.* 14: 297-311.
- Fenn CH, Taylor RM, Burks CM. 1994.** Calcium stimulation of ammonium absorption and growth by beet. *Agron. J.* 86: 916-920.
- Glass ADM, Siddiqi MY. 1995.** Nitrogen absorption by plant roots. In: *Nitrogen nutrition in higher plants.* Srivastava HS, Singh RP, eds. Associated Publishing Co. of New Delhi, India.
- Glass ADM, Shaff JE, Kochian LV. 1992.** Studies on the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiol.* 99: 456-463.
- Gojon A, Dapoigny L, Lejay I, Tillard P, Rufty TW. 1998.** Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on ^{15}NO uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant, Cell Environ.* 21: 43-53.
- Gouia H, Ghorbal MH, Touraine B. 1994.** Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant Physiol.* 105: 1409-1418.
- Groat RG, Vance CP. 1981.** Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 67: 1198-1203.
- Guerrero MG, Vega JM, Losada M. 1981.** The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 169-204.
- Gutteridge S, Bray RC, Notton BA, Fido RJ, Hewitt EJ. 1983.** Studies by electron paramagnetic resonance spectroscopy of the molybdenum center of spinach nitrate reductase. *Biochem. J.* 213: 137-142.
- Hageman RH, Hucklesby DP. 1971.** Nitrate reductase. *Methods Enzymol.* 23: 497-503.
- Hamono T, Oji Y, Okamoto S, Mitsuhashi Y, Matsuki Y. 1985.** Inverse correlation of thiol proteinase with nitrate reductase activities in barley leaves. *Plant Physiol.* 76: 353-358.
- Hayakawa T, Yamaya T, Mae T, Ojima K. 1993.** Changes in the content of two glutamate synthase proteins in spikelets of rice (*Oryza sativa*) plants during ripening. *Plant Physiol.* 101: 1257-1262.
- Hogue E, Wilcow GE, Cantliffe DJ. 1970.** Effect of soil P on phosphate fraction in tomato leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95: 174-176.

- House CM, Anderson JW. 1980.** Light-dependent reduction of nitrate by pea chloroplasts in the presence of nitrate reductase and C_4 dicarboxylic acids. *Phytochem.* 19: 1925-1930.
- Huber SC, Bachmann M, Huber JL. 1996.** Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci.* 1: 432-438.
- Imssande J, Touraine B. 1994.** N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* 105: 3-7.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M. 1992.** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84: 55-60.
- Jackson WA, Pan WL, Moll RH, Kamprath EJ. 1986.** Uptake, translocation and reduction of nitrate. In: *Biochemical basis of plant breeding. II. Nitrogen metabolism.* Neyra VA. ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Jaenicke H, Lips HS, Ullrich WR. 1996.** Growth, ion distribution, potassium and nitrate uptake of *Leucaena leucocephala*, and effects of NaCl. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 743-751.
- Jaworski EG. 1971.** Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 1274-1279.
- Kafkafi U, Siddiqi MY, Ritchie RJ, Glass ADM, Ruth TJ. 1992.** Reduction of nitrate (^{13}NO) influx and nitrogen (^{13}N) translocation by tomato and melon varieties after short exposure to calcium and potassium chloride salts. *J. Plant Nutr.* 15: 959-975.
- Kaiser JJ, Lewis OAH. 1984.** Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil* 70: 127-130.
- Kaiser WM, Huber SC. 1994.** Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol.* 106: 817-821.
- Kastori R, Petrovic N. 1989.** Effect of boron on nitrate reductase activity in young sunflower plants. *J. Plant Nutr.* 12: 621-627.
- Kenjebaeva S, Rakova N. 1995.** Multiple forms of nitrate reductase and their role in nitrate assimilation in roots of wheat at low temperature or high salinity. *Physiol. Plant.* 93: 249-252.
- King BJ, Siddiqi MY, Glass ADM. 1992.** Studies of the uptake of nitrate in barley. V. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity. Implications for nitrate influx. *Plant Physiol.* 99: 1582-1589.
- Koltoff IM, Kuroda PK. 1951.** Determination of trace of chloride. *Ann. Chem.* 23: 1301-1306.
- Krom MD. 1980.** Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst.* 105: 305-316.
- Kronemberger J, Lepingle A, Caboche M, Vaucheret H. 1993.** Cloning and expression of distinct nitrite reductases in tobacco leaves and roots. *Mol. Gen. Genetics* 236: 203-208.

- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM. 1995.** Nitrate induction in spruce: an approach using compartmental analysis. *Planta*. 196: 683-690.
- Krueger RW, Lovatt CJ, Albert LS. 1987.** Metabolic requirement of Cucurbita pepo for boron. *Plant Physiol*. 83: 254.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. 1996.** The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-593.
- Lea PJ, Robinson SA, Stewart GR. 1990.** The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: *The biochemistry of plants*. Vol. 16. Mifflin BJ, Lea PJ. eds., Academic Press, London.
- Li XZ, Oaks A. 1994.** Induction and turnover of nitrate reductase in Zea mays: influence of light. *Plant Physiol*. 106: 1145-1149.
- Li XZ, Larson DE, Glibetic M, Oaks A. 1995.** Effect of glutamine on the induction on nitrate reductase. *Physiol. Plant*. 93: 740-744.
- Lillo C. 1984.** Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanina aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiol. Plant*. 61: 214-218.
- Lillo C. 1994.** Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant*. 90: 616-620.
- López-Cantarero I, Ruiz JM, Hernandez J, Romero L. 1997.** Nitrogen metabolism and yield response to increases in nitrogen-phosphorus fertilization: Improvement in greenhouse cultivation of eggplant (*Solanum melongena* Cv. Bonica). *J. Agric. Food Chem.* 45: 4227-4231.
- Mackown CT, Jackson WA, Volk RJ. 1983.** Partitioning of previously-accumulated nitrate to translocation, reduction, and efflux in corn roots. *Planta*. 157: 8-14.
- Mackown CT, Sutton TG, Bush LP. 1990.** Nitrogen compositional changes in xylem exudate and leaves of burley tobacco. *Crop Sci.* 30: 133-138.
- Mackown CT. 1991.** Labeled-nitrate assimilation and nitrogen-15 export from leaves of burley tobacco. *Crop Sci.* 31: 1213-1217.
- Manetas Y, Petropoulou Y, Karabourniotis G. 1986.** Compatible solutes and their effects on phosphoenolpyruvate carboxylase of C4-halophytes. *Plant Cell Environ.* 9: 145-151.
- Mattson M, Lundborg T, Larsson M, Larsson CM. 1991.** Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth. I. Growth and nitrate uptake kinetics in vegetative cultures grown at different relative addition rates of nitrate-N. *J. Exp. Bot.* 43: 15-23.
- McDonald AJ, Ericsson T, Larsson C. 1996.** Plant nutrition, dry matter gain and partitioning at the whole-plant level. *J. Exp. Bot.* 47: 1245-1253.

- Mauriño SG, Echavarría C, Mejías JA, Vargas MA, Maldonado JM. 1986.** Properties of the *in vivo* nitrate reductase assay in maize, soybean, and spinach leaves. *J. Plant Physiol.* 124: 123-130.
- Meharg AA, Blatt MR. 1995.** Nitrate transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *J. Membr. Biol.* 145: 49-66.
- Migge A, Becker TW. 1996.** In tobacco leaves, the genes encoding the nitrate-reducing or the ammonium-assimilating enzymes are regulated differently by external nitrogen-sources. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 665-671.
- Miller AJ, Smith SJ. 1996.** Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *J. Exp. Bot.* 47: 843-854.
- Morgan AA, Volk RJ, Jackson WA. 1985.** p-fluorophenylalanine induced restriction of ion uptake and assimilation by maize roots. *Plant Physiol.* 77: 718-721.
- Muller B, Touraine B. 1992.** Inhibition of NO_3^- uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* 41: 221-241.
- Naik MS, Nicholas DJD. 1984.** Origin of NADH for nitrate reduction in wheat roots. *Plant Sci. Lett.* 35: 91-96.
- Oaks A, Poulle M, Goodfellow VJ, Class LA, Deising H. 1988.** The role of nitrate and ammonium ions and light on the induction of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol.* 88: 1067-1072.
- Oaks A. 1994.** Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72: 739-750.
- Ocaña A, Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C. 1996.** Phosphoenolpyruvate carboxylase in root nodules of *Vicia faba*: Partial purification and properties. *Physiol. Plant.* 97: 724-730.
- Omata T. 1995.** Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Cell Physiol.* 36: 207-213.
- Padgett PE, Leonard RT. 1996.** Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 47: 871-883.
- Peterman TK, Goodman HM. 1991.** The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Mol. Gen. Genet.* 230: 145-154.
- Peuke AD, Jeschke WD. 1993.** The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. I. Grown with ammonium or nitrate as nitrogen source. *J. Exp. Bot.* 44: 1167-1176.
- Peuke AD, Hartung W, Jeschke WD. 1994.** The uptake and flow of C, N, and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. II. Grown with low and high nitrate supply. *J. Exp. Bot.* 45: 733-740.
- Rajasekar VK, Gowri G, Campbell WH. 1988.** Phytochrome-mediated light regulation of nitrate reductase expression in squash cotyledons. *Plant Physiol.* 88: 242-244.
- Ramón AM, Carpena Ruiz RO, Gárate A. 1989.** *In vitro* stabilization and distribution of nitrate reductase in tomato plants. Incidence of boron deficiency. *J. Plant Physiol.* 135: 126-128.

- Rastogi R, Back E, Schneiderbauer A, Bowsher CG, Moffatt B, Rothstein SJ. 1993.** A 330 bp region of the spinach nitrite reductase gene promoter directs nitrate-inducible tissue-specific expression in transgenic tobacco. *Plant J.* 4: 317-326.
- Redinbaugh MG, Campbell WH. 1991.** Higher plant response to environmental nitrate. *Physiol. Plant.* 82: 640-650.
- Redinbaugh MG, Campbell WH. 1993.** Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiol.* 101: 1249-1255.
- Rees TAV, Larson TR, Heldens JWG, Huning FGJ. 1995.** In situ glutamine synthetase activity in a marine unicellular alga. Development of a sensitive colorimetric assay and the effects of nitrogen status on enzyme activity. *Plant Physiol.* 109: 1405-1410.
- Richharia A, Shah K, Dubey RS. 1997.** Nitrate reductase from rice seedlings: partial purification, characterization and the effects on *in situ* and *in vitro* NaCl salinity. *J. Plant Physiol.* 151: 316-322.
- Rudolph AS, Crowe JH, Crowe LM. 1986.** Effects of three stabilizing agents proline, betaine and trehalose on membrane phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 245: 134-143.
- Ruiz JM, Baghour M, Bretones G, Belakbir A, Romero L. 1998.** Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): Role of boron as a possible regulatory factor. *Int. J. Plant Sci.* 159: 121-126.
- Ruiz JM, Romero L. 1998.** Tomato genotype in relation to nitrogen utilization and yield. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4420-4422.
- Ruiz JM, Romero L. 1998.** Commercial yield and quality of fruits of cucumber plants cultivated under greenhouse conditions. Response to increases in nitrogen fertilization. *J. Agricultural. Food Chem.* 46: 4171-4173.
- Ruiz JM, Rivero RM, Garcia PC, Baghour M, Romero, R. 1999.** Role of CaCl_2 in nitrate assimilation in leaves and roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Sci.* (En prensa).
- Ruiz JM, Romero L. 1999.** Nitrogen efficiency and metabolism in grafted melon plants. *Sci. Hort.* (En prensa).
- Ruiz JM, Hernandez J, Castilla N, Romero L. 1999.** Potato Performance in Response to Different Mulches. I. Nitrogen Metabolism and Yield. *J. Agricultural. Food Chem.* (En prensa).
- Ruiz JM, Romero L. 1999.** Improvement in Greenhouse Cultivation of the Cucumber: Yield and Nitrogen Metabolism in Leaves and Fruit Response to Increases in Nitrogen Fertilization. *Sci. Hort.* (En prensa).
- Santoro MM, Liu Y, Khan SMA, Hou LX, Bolen DW. 1992.** Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochem.* 31: 5278-5283.

- Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Müller-Röber B, Caboche M, Sititt M. 1997.** Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 9: 783-798.
- Schon MK, Novacky A, Blevins DG. 1990.** Boron induces hyperpolarization of sunflower root cell membranes and increases membrane permeability to K^+ . *Plant Physiol.* 93: 566-571.
- Schmerder B, Borriss H. 1986.** Induction of nitrate reductase by cytokinin and ethylene in *Agrostemma githago* L. embryos. *Planta* 169: 539-593.
- Schuster C, Schimidt S, Mohr H. 1989.** Effect of nitrate, ammonium, light and plastidic factor on the appearance of multiple forms of nitrate reductase in mustard cotyledons. *Planta* 177: 74-83.
- Sechley KA, Yamaya T, Oaks A. 1992.** Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 134: 85-163.
- Shelp BJ. 1988.** Boron mobility and nutrition in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Ann. Bot.* 61: 83-91.
- Shelp BJ. 1990.** The influence of boron nutrition on nitrogen partitioning in broccoli plants. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 21: 49.
- Shelp BJ. 1993.** Physiology and biochemistry of boron in plants. In: Boron and its role in crop production. Gupta UC, ed., CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Siddiqi MY, Glass ADM, Ruth TJ, Ruffy TWJr. 1990.** Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of ^{15}NO influx. *Plant Physiol.* 93: 1426-1432.
- Siegel LM, Wilkerson JQ. 1989.** Structure and function of spinach ferredoxin-nitrite reductase. In: Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. Wray JL, Kinghorn JR. eds. Oxford Science Publications, Oxford.
- Silberbush M, Lips SH. 1991.** Potassium, nitrogen, ammonium/nitrate ratio, and sodium chloride effects on wheat growth. I. Shoot and root growth and mineral composition. *J. Plant Nutr.* 14: 751-764.
- Singh RP, Srivastava HS. 1986.** Increase in glutamate synthase activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.* 66: 413-416.
- Sisson VA, Ruffy TW, Williamson RE. 1991.** Nitrogen-use efficiency among flue-cured tobacco genotypes. *Crop Sci.* 31: 1615-1620.
- Sivasankar S, Oaks A. 1995.** Regulation of nitrate reductase during early seedling growth: a role for asparagine and glutamine. *Plant Physiol.* 107: 1225-1231.
- Sivasankar S, Oaks A. 1996.** Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 609-620.
- Slawyk G, Rodier M. 1988.** Biosynthetically active glutamine synthetase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*: optimization of the forward-reaction assay. *Mar. Biol.* 97: 269-274.

- Smirnoff N, Cumbes QJ. 1989.** Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem.* 28: 1057-1060.
- Solomonson LP, Barber MJ. 1990.** Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 225-253.
- Sueyoshi K, Kleinhofs A, Warner RL. 1995.** Expression of NADH-specific and NAD(P)H-bispecific nitrate reductase genes in response to nitrate in barley. *Plant Physiol.* 107: 1303-1311.
- Suzuki A, Rothstein S. 1997.** Structure and regulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 243: 708-718.
- Sweby DL, Huckett BI, Watt MP. 1994.** Effects of nitrogen nutrition on salt-stressed *Nicotiana tabacum* var. Samsun in vitro plantlets. *J. Exp. Bot.* 45: 995-1008.
- Temple SJ, Vance CP, Gantt JS. 1998.** Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trend Plant Sci.* 3: 51-56.
- Ullrich WR. 1992.** Transport of nitrate and ammonium through plant membranes. In: *Nitrogen metabolism of plants*. Mengel K, Pilbeam D. eds., Clarendon Press.
- Vance CP, Stade S. 1984.** Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 75: 261-264.
- Vance CP. 1997.** The molecular biology of N metabolism. In: *Plant metabolism*. Dennis DT. ed., Longman.
- Vincentz M, Moureaux T, Leydecker MT, Vaucheret H, Caboche M. 1993.** Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* 3: 315-324.
- von Wirén N, Gazzarrini S, Frommer WB. 1997.** Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant Soil.* 196: 191-199.
- Ward MR, Aslam M, Huffaker RC. 1986.** Enhancement of NO_3^- uptake and growth of barley seedlings by calcium under saline conditions. *Plant Physiol.* 80: 520-524.
- Warner RL, Narayanan KR, Kleihofs A. 1987.** Inheritance and expression of NAD(P)H nitrate reductase in barley. *Theor. Appl. Genet.* 74: 714-717.
- Wieneke J. 1994.** Use of a radio-labelled chloric anion (^{36}ClO) as an analogue for tracking the nitrate transport in higher plants. *J. Plant Nutr.* 17: 1671-1685.
- Wolf B. 1982.** A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 13: 1035-1059.
- Woodall J, Forde BG. 1996.** Glutamine synthetase polypeptides in the roots of 55 legume species in relation to their climatic origin and the partitioning of nitrate assimilation. *Plant Cell Environ.* 19: 848-858.
- Wray JL. 1993.** Molecular biology, genetics, and regulation of nitrite reduction in higher plants. *Physiol. Plant.* 89: 607-612.

Yemm EW, Cocking EC. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* 80: 209-213.

Zeiler KG, Solmonson LP. 1989. Regulation of *Chlorella* nitrate reductase: control of enzyme activity and immunoreactive protein levels by ammonia. *Arch. Biochem. Biophys.* 269: 46-54.

Zhang N, MacKown ChT. 1992. Nitrate use by tobacco cells in response to N-stress and ammonium nutrition. *Plant Cell Rep.* 11: 470-475.

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

CAPITULO IV. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE B Y Ca SOBRE EL METABOLISMO DEL P EN RAÍCES Y HOJAS DE PLANTAS DE TABACO

I. Introducción

I.1. Generalidades.

I.1.1. Absorción de P y su regulación.

I.1.1.1. Transportadores del Pi.

I.1.1.2. Regulación de la absorción de P.

I.1.2. Translocación y distribución del P en la planta.

I.1.3. Bioindicadores del P.

I.1.3.1. Carbohidratos.

I.1.3.2. Actividad de la fosfatasa ácida.

I.2. Influencia del B sobre el metabolismo del P.

I.3. Influencia del Ca sobre el metabolismo del P.

II. Objetivos.

III. Material y métodos.

III.1. Diseño experimental.

III.2. Muestreo de las plantas.

III.3. Análisis de las plantas.

III.4. Análisis estadístico.

IV. Resultados.

V. Discusión

VI. Conclusiones

VII. Referencias

I. Introducción.

I.1. Generalidades.

El fósforo (P), después del N, es el segundo elemento nutricional frecuentemente limitante para el crecimiento de las plantas, oscilando su concentración alrededor del 0.2% del peso seco de la planta. Es un componente clave para muchas moléculas tales como los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y el ATP, no pudiendo por lo tanto las plantas desarrollarse sin un suministro adecuado de este nutriente (Schachtman et al., 1998). Por otro lado, el fósforo inorgánico (Pi)

está involucrado en el control de muchas reacciones enzimáticas y en la regulación de distintos procesos metabólicos (Theodorou y Plaxton, 1993).

I.1.1. Absorción del P y su regulación.

La absorción del P es un problema para la mayoría de las plantas, ya que la concentración de este elemento en el medio externo suele ser muy inferior a los requerimientos de éstas. La forma de P más accesible para las plantas es el Pi, cuya concentración raramente excede de 10 μM en la solución del suelo (Bielecki, 1973). Por lo tanto, las plantas han

desarrollado unos transportadores especializados para la extracción del Pi del medio externo, así como otros mecanismos para el transporte de este a través de las membranas entre los distintos compartimentos intracelulares, donde la concentración de Pi llegar a ser 100 veces superior a la de la solución externa (Schachtman et al., 1998).

La forma en la que el Pi se presenta en el medio externo es determinada por los cambios en el pH. La disociación del H_3PO_4 inicialmente a H_2PO_4^- y después a HPO_4^{2-} se produce a pH de 2.1 y 7.2, respectivamente. Por lo tanto, a un pH de 6.0 la mayoría del Pi se presenta en su estado monovalente como H_2PO_4^- , mientras que a este pH las otras dos formas citadas anteriormente son minoritarias. La mayoría de los estudios que tratan la relación entre la absorción de Pi y el pH en plantas superiores, han encontrado que las mayores razones de absorción de este nutriente se producen entre los valores de pH 5.0 y 6.0, donde la forma H_2PO_4^- predomina (Ullrich-Eberius et al., 1984; Furihata et al., 1992), lo que sugiere que el Pi es absorbido principalmente bajo su forma monovalente.

Bajo condiciones fisiológicas normales se produce un requerimiento de energía para que se realice la absorción o transporte del Pi a través de la membrana plasmática desde el medio externo a la planta, debido a la aparición de los siguientes fenómenos: (i) elevada concentración de Pi en el citoplasma en relación a la existente en el medio externo, y (ii) reducción rápida de la absorción de Pi cuando se aplican distintos inhibidores metabólicos (Dunlop y Gardiner, 1993; Schachtman et al., 1998). En relación a este aspecto, existen contradicciones concernientes a la función que desempeñan los carbohidratos como suministro de energía en la absorción del P. De acuerdo con algunos autores, una

absorción elevada de P y posterior translocación hacia las hojas supone el transporte de los carbohidratos hacia las raíces, lo que produce una disminución de estos en su contenido foliar (Burauel et al., 1990; Qui y Israel, 1992; Ruiz et al., 1996; Ruiz y Romero, 1998). Estas observaciones se explican principalmente por la necesidad energética requerida para la absorción del P por la membrana plasmática de las células radiculares como para el transporte de este elemento a través del xilema (Sasaki et al., 1984; Ullrich-Eberius et al., 1984; Loughman, 1987). Por el contrario, otros autores han indicado que una elevada o mínima absorción de P no está necesariamente relacionada con un incremento o disminución del nivel foliar de carbohidratos (Crafts-Brandner et al., 1990; Crafts-Brandner, 1992).

La absorción de Pi está asociada con la entrada de un catión, puesto que se ha comprobado que la aplicación de Pi a raíces deficientes en este elemento resulta tanto en una despolarización de la membrana plasmática como en una acidificación del citoplasma (Ullrich y Novacky, 1990; Dunlop y Gardiner, 1993). La despolarización de la membrana plasmática indica que el Pi no entra simplemente como H_2PO_4^- , puesto que esto produciría una hiperpolarización y no una despolarización de la membrana. A partir de estos resultados estos autores indicaron que el Pi es cotransportado con un ion de carga positiva. Además, la acidificación que se observa en el citoplasma asociado con el transporte de Pi sugiere que este catión es el H^+ (Ullrich y Novacky, 1990; Dunlop y Gardiner, 1993).

En cuanto a la transferencia del Pi del citoplasma a la vacuola, se ha observado que en plantas a las cuales se le suministraba grandes cantidades de P, el Pi mostraba un equilibrio electroquímico a través del tonoplasto. En uno de los pocos estudios en el que se ha examinado el

transporte por el tonoplasto, se observó que la absorción o paso de Pi a las vacuolas en plantas con una aplicación de P adecuado seguía un comportamiento monofásico, caracterizado por ser lineal hasta una concentración de 20 mM e independiente del ATP (Mimura et al., 1990). Sin embargo, en plantas deficientes de P, el paso de Pi a las vacuolas era más elevado y dependía del ATP. Estos datos sugieren que la concentración de Pi puede dar lugar a una represión o activación de un transportador en el tonoplasto.

I.1.1.1. Transportadores del Pi.

Recientes avances en biología molecular referentes a los transportadores de Pi en la membrana plasmática y en el tonoplasto, confirman que las plantas tienen múltiples transportadores para el Pi (Schachtman et al., 1998). Los genes encargados de codificar a estos transportadores de Pi pueden ser regulados por la privación de Pi, mientras que la expresión de otros es constitutiva (Leggewie et al., 1997). En definitiva, los datos cinéticos y moleculares muestran que en las plantas superiores existen múltiples transportadores de Pi incorporados en las membranas celulares. Los datos moleculares indican que hay al menos cuatro genes que codifican transportadores de Pi, mientras que los datos cinéticos diferencian dos tipos o clases de transportadores con diferentes afinidades o comportamientos según el estatus nutricional de Pi.

I.1.1.2. Regulación de la absorción de Pi.

La absorción neta de Pi está regulada por tres vías diferentes que son: (i) la entrada o influjo radicular, (ii) la salida o eflujo radicular, y (iii) la actuación simultánea de ambos movimientos. Distintos trabajos nos describen la

existencia de dos estrategias diferentes en la regulación de la absorción de P, cuya aparición depende del estatus nutricional de este nutriente. Cuando las plantas muestran un estrés de P por deficiencia, el mecanismo del influjo radicular de Pi predomina sobre el eflujo y por lo tanto la absorción neta de P es controlada principalmente vía influjo. Por el contrario, cuando las plantas no presentan un estrés de P el influjo de Pi es reprimido operando a bajos niveles mientras que el eflujo comienza a ser el principal factor que controla la absorción neta de P (Cogliatti y Santa Maria, 1990; Lee et al., 1990; Adalsteinsson et al., 1994).

El mantenimiento de la concentración de Pi citoplasmático es esencial para muchas reacciones enzimáticas. El Pi citoplasmático es mantenido a concentraciones constantes (5-10 mM), más o menos independientemente de la concentración externa de Pi, excepto cuando existe una deficiencia severa de este elemento (Lee y Ratcliffe, 1993; Mimura, 1995). En contraste, el Pi vacuolar muestra una gran variación, resultando en algunos casos bajo condiciones de retirada o privación de P, indetectable. Además, el Pi vacuolar generalmente es la fracción que incrementa más rápidamente en respuesta a un adecuado estatus nutricional de P (Lee y Ratcliffe, 1993; Mimura, 1995).

Cuando la aplicación de Pi es limitante, predomina el crecimiento radicular con el fin de aumentar la absorción de P procedente del suelo, y además se suele producir una retranslocación de Pi procedente de las hojas viejas unido a una disminución del Pi almacenado en las vacuolas (Schachtman et al., 1998). Por el contrario, cuando las plantas tienen un adecuado suministro de P y la absorción de P supera la demanda de este nutriente, aparecen un número de procesos que actúan para prevenir la

acumulación tóxica de Pi. Entre estos procesos los más importantes son: (i) la conversión de Pi a P orgánico, (ii) reducción de la absorción de P y (iii) pérdida de Pi por salida o eflujo radicular (Lee et al., 1990; Bielecki y Ferguson, 1983). Furihata et al. (1992) observaron, utilizando técnicas cinéticas, que la expresión de los transportadores de alta afinidad de P eran inhibidos cuando existían altas concentraciones de este nutriente en el medio, mientras que los de baja afinidad no. Por el contrario, la expresión de ciertos transportadores en la membrana plasmática y tonoplastica aumentaba durante los períodos de privación de P.

Finalmente, existen contradicciones sobre la respuesta del Pi a más o menos absorción de P. Algunos investigadores han sugerido que diferencias en el estatus nutricional de P en la planta alteran los niveles de Pi en las hojas (Crafts-Brandner, 1992), mientras que otros han demostrado que el Pi es completamente independiente del estatus nutricional de P (Waterton et al., 1983; Foyer y Spencer, 1986). Por otro lado, Ruiz y colaboradores teniendo en cuenta los resultados de sus trabajos, indican que la relación entre el estatus nutricional de P y el Pi varía dependiendo de la especie vegetal, de la fertilización aplicada y del órgano analizado (Ruiz et al., 1996; López-Cantarero et al., 1998; Ruiz y Romero, 1998).

I.1.2. Translocación y distribución del P en la planta.

Recientes trabajos realizados por Mimura et al. (1996) y Jeschke et al. (1997) nos indican detalladamente los movimientos del Pi a través de la totalidad de la planta. En plantas P-suficientes con una aplicación adecuada, la mayoría del Pi es absorbido por las raíces y transportado

vía xilema a las hojas jóvenes en expansión, existiendo también una retranslocación significativa del Pi a través del floema desde las hojas viejas a las zonas de crecimiento apicales, tanto aéreas como radiculares.

En plantas deficientes en P se disminuye el transporte de Pi a través del xilema hacia la parte aérea. Esta disminución es suplementada por un incremento en la movilización del P almacenado en las hojas viejas y su retranslocación hacia las hojas y raíces en crecimiento. Estos procesos involucran tanto la pérdida de Pi almacenado en las vacuolas como la rotura del P orgánico en las hojas viejas (Jeschke et al., 1997).

Finalmente, en el xilema el P es transportado casi exclusivamente como Pi en su forma monovalente, mientras que en el floema junto a esta forma del P se encuentran también cantidades significativas de P orgánico (Schachtman et al., 1998).

I.1.3. Bioindicadores del P.

I.1.3.1. Carbohidratos.

Uno de los bioindicadores más estudiados del P son los carbohidratos, quizás porque tanto la absorción de P por las raíces como su carga en el xilema son procesos que requieren carbohidratos como fuente de energía (Sasaki et al., 1984; Ullrich-Eberius et al., 1984; Loughman, 1987). Sin embargo, el papel o la relación entre los carbohidratos y el estatus nutricional de P no está ausente de contradicciones como veremos a continuación.

Inicialmente, Burauel (1987) observó que un moderado estrés de P en plantas de judía conllevaba a un aumento de la importación de fotoasimilados hacia las raíces, en comparación con plantas con niveles nutricionales de P normales o

adecuados. Este hecho daba lugar a un aumento de los carbohidratos en la raíces y a una disminución del nivel foliar de estos. Este autor justificaba el aumento en la translocación de carbohidratos hacia las raíces como un proceso para incrementar o favorecer la absorción radicular de P bajo condiciones de estrés de P (Drew y Saker, 1984; Katz et al., 1986).

De nuevo Burauel et al. (1990), comparando el estatus nutricional de P de dos variedades de judía, observaron que la variedad que presentaba una mayor absorción radicular de P mostraba concentraciones radiculares de carbohidratos superiores a la otra variedad empleada en la experiencia, por lo que definió a los carbohidratos como un posible parámetro para explicar diferentes eficiencias en relación a la absorción de P.

En definitiva, estos trabajos, al igual que otros como los de Fredeen et al. (1989) y Lauer et al. (1989), indican que en el caso de una buena absorción y translocación de P se produce una disminución en el contenido foliar de carbohidratos.

Recientemente, los trabajos de Ruiz y colaboradores apoyan los resultados explicados anteriormente. Ruiz et al. (1996), trabajando con plantas injertadas de melón, observaron que en estas plantas injertadas se incrementaban las concentraciones foliares de P en relación a las obtenidas por las plantas no injertadas. Además, este hecho era acompañado por una disminución en los niveles foliares de glucosa, sacarosa, fructosa y almidón en plantas injertadas. Por otro lado, López-Cantarero et al. (1998), en plantas de berenjena, encontraron que un aumento en la aplicación de NO daba lugar a un aumento proporcional en la absorción de P, seguida de una disminución de los niveles foliares de carbohidratos. Esta disminución foliar de carbohidratos que describen ambos trabajos podría ser

explicada en el primero, por un aumento de la vigorosidad radicular de los injertos lo que conllevaría a un aumento en la translocación de fotoasimilados a estas raíces (Lee, 1994), y en el segundo, por un aumento en la asimilación foliar de NO_3^- que va ligado a una utilización de carbohidratos como fuente de energía, disminuyéndose así los niveles foliares de estos compuestos (Claussen, 1986). Sin embargo, Ruiz y Romero (1998) estudiando el posible efecto del Ca sobre el metabolismo del P, describen claramente el papel de los carbohidratos en el estatus nutricional de P. En este trabajo se observó que dosis excesivas de Ca (5 mM) producen una disminución en la absorción y translocación de P, debido al papel que ejerce el Ca incrementando la acumulación de azúcares en las hojas (Hepler y Wayne, 1985; Wei y Sung, 1993), lo que imposibilita su utilización de estos compuestos como fuente de energía. Por el contrario, la aplicación de dosis más bajas de Ca (2.5 mM) dieron lugar a un aumento en la absorción y translocación de P, que se vio facilitada por un incremento en la translocación de azúcares hacia las raíces.

Todos estos resultados que acabamos de describir se verifican cuando se estudia la relación entre los carbohidratos y el estatus nutricional de P en plantas deficientes en este nutriente. Existen bastantes trabajos que describen que la deficiencia de P causa un incremento de los carbohidratos, principalmente de almidón, en las hojas (Fredeen et al., 1989; Qiu y Israel, 1992; Cakmak et al., 1994a,b; Qiu y Israel, 1994). La acumulación de carbohidratos en hojas ante una deficiencia de P se basa, según estos autores, en una disminución de procesos como la fotosíntesis, la expansión foliar, y la asimilación de nitratos entre otros. Además, la deficiencia de P supondría una reducción en la absorción radicular de este elemento, lo que haría de

esta forma disminuir la utilización de los carbohidratos como fuente de energía.

Como indicábamos al inicio de este apartado, existen varios trabajos que contradicen las hipótesis que acabamos de mencionar. Por ejemplo, Crafts-Brandner (1992), trabajando con judía, demostró que las concentraciones foliares de carbohidratos no fueron significativamente afectadas en plantas crecidas en suelo con niveles de P comprendidos entre severamente deficientes a supraóptimos. Estos mismos resultados fueron también obtenidos por Crafts-Brandner et al. (1990) en plantas de tabaco. Según este autor el hecho de que ambos trabajos se hallan realizado en suelo podría haber afectado al estado nutricional de P en las plantas, puesto que las propiedades del suelo podrían minimizar las diferencias existentes entre los distintos niveles de P aplicados en la fertilización. Por otro lado, Rychter y Randall (1994) propusieron que la deficiencia de P daba lugar a una acumulación radicular de glucosa y fructosa, aunque según estos autores estos compuestos no muestran funciones metabólicas en las raíces, puesto que probablemente se almacenan en las vacuolas radiculares no siendo utilizados para el crecimiento y metabolismo de este órgano.

I.1.3.2. Actividad de la Fosfatasa Ácida.

En los últimos años se están realizando estudios cuyo fundamento reside en los cambios específicos de la actividad metabólica, enzimática o fisiológica producidos por deficiencias, toxicidad o inducción de respuestas en plantas o tejidos por la acción de un nutriente. Para conocer el nivel nutricional se utilizan los métodos bioquímicos que se basan en el empleo de enzimas específicas de iones. Estos métodos se fundamentan en la diferente actividad de ciertas enzimas

dependiendo del nivel nutricional (Romero, 1996).

La principal enzima que se está utilizando como bioindicador del P ha sido la actividad fosfatasa ácida. La enzima cataliza la hidrólisis de los ésteres fosfato y su actividad podría tener relación con un estímulo en la removilización del P (Smith y Chevalier, 1984). La mayoría de los trabajos, que se han realizado bajo condiciones deficientes de P, han encontrado una relación inversamente proporcional significativa entre las concentraciones de P y la actividad enzimática (Besford, 1979a,b; McLachlan, 1982, 1984; Speir y Cowling, 1991; Thapar et al., 1991; Barret-Lennard et al., 1993; Tadano et al., 1993). Sin embargo, los trabajos de Ruiz y colaboradores han demostrado que la actividad fosfatasa ácida refleja muy claramente cambios en el estatus nutricional de P, bajo condiciones adecuadas en este nutriente. En concreto, la actividad fosfatasa ácida refleja, por ejemplo, las diferencias en la eficiencia en la absorción y utilización de P entre plantas injertadas y no injertadas (Ruiz et al., 1996), el efecto del N sobre el estatus nutricional foliar de P (López-Cantarero et al., 1998), y por último, la relación antagonista que se produjo en plantas de tabaco entre el Ca y el P (Ruiz y Romero, 1996), sin que en ningún caso se observaran concentraciones deficientes o tóxicas de P en los órganos analizados.

I.2. Influencia del B sobre el metabolismo del P.

Existen muy pocos trabajos que traten clara y directamente la relación entre el B y el estatus nutricional de P, por lo que actualmente no se conoce realmente la posible existencia o no de dicha relación. Quizás, los únicos efectos o influencias del B sobre el P se produzcan a nivel de la absorción de este último, y a nivel de la

relación que mantienen ambos nutrientes con los carbohidratos.

El boro juega un importante papel tanto en la integridad estructural como funcional de la mayoría de las biomembranas, particularmente las de las membranas plasmáticas (Parr y Loughman, 1983; Marschner, 1995). En muchos trabajos, se ha mostrado que la deficiencia de B esta asociada con una variación rápida en los flujos de iones. Por ejemplo, la absorción de P fue disminuida por una deficiencia de B, restaurándose tras 1h la absorción mediante una aplicación de B a las plantas deficientes en este elemento (Robertson y Loughman, 1974). Más tarde, Pollard et al. (1977) estudiaron más detalladamente los efectos del B sobre la entrada o salida de iones. Ellos también encontraron que después de 1h tras haber aplicado B a plantas deficientes de maíz, se producía una restauración significativa en la absorción de P.

La influencia del B sobre el flujo de iones puede ser mediado directa o indirectamente por los efectos de este nutriente sobre las ATPasa de membrana. En los experimentos de Pollard et al. (1977), los desajustes en la absorción de iones en plantas de maíz deficientes en B se correspondían con una disminución de la actividad ATPasa. La restauración de la absorción iónica, por aplicación de B, era acompañado por un incremento de la actividad ATPasa.

Esta bien establecido que la salida de protones por las ATPasas de membrana es la principal fuerza conductora para la absorción de iones, además de ser responsable de la creación de un gradiente de potencial eléctrico a través de las membranas (Serrano, 1989). Existen bastantes evidencias de que el estatus nutricional de B tiene un marcado efecto sobre la secreción de protones y, por lo tanto, sobre la creación del gradiente de potencial eléctrico a través de las

membranas. En células de zanahorias (Blaser-Grill et al., 1989) y en células de girasol (Ferrol y Donaire, 1992), la deficiencia de B reduce significativamente la liberación de protones al medio externo. Esta reducción en la secreción de protones fue asociada con bajas actividades H^+ -ATPasa en membranas microsomaes de raíces de girasoles (Ferrol et al., 1993). Goldbach et al. (1990) también mostraron que la deficiencia de B disminuía la liberación de H^+ al medio externo. Recientemente, se ha observado que el B estimula a la actividad ATPasa de membrana (Obermeyer et al., 1996). Estos resultados confirman los de Schon et al. (1990), que indicaron que el B aumentaba la actividad ATPasa de membrana, produciéndose una hiperpolarización de la membrana plasmática por estimulación de la absorción iónica.

En definitiva, y teniendo en cuenta todos estos resultados, junto con el hecho de que la absorción de P se realiza ligado principalmente a H^+ , la deficiencia de B podría afectar indirectamente a la absorción de este macronutriente a través de la inhibición de la actividad ATPasa de membrana, disminuyéndose la secreción de H^+ hacia el medio externo.

La influencia del B sobre la actividad ATPasa de membrana, se puede explicar por el papel esencial que parece ejercer este micronutriente en el mantenimiento de la integridad estructural de la membrana plasmática, a través de su habilidad para formar complejos con los componentes de membrana que contienen grupos *cis-diol*, tales como glicoproteínas y glicolípidos (Cakmak y Römheld, 1997). La formación de los complejos B-fenoles puede tener un papel relevante en la integridad de la membrana. La acumulación de fenoles suele presentarse en plantas deficientes en B, en las cuales la oxidación enzimática o no-enzimática de estos fenoles genera quinonas y radicales

oxigenados, los cuales son altamente tóxicos para los componentes celulares, particularmente para las proteínas y lípidos de membrana, causando una desorganización estructural de la membrana plasmática (Pillinger et al., 1994). Esta es, posiblemente la causa principal de la alteración o disminución observada en la actividad de las enzimas de membrana como la ATPasa. Recientemente, Ruiz y Romero muestran que el estatus nutricional de B influye sobre la oxidación de los fenoles, lo que provoca una alteración de la actividad Fe-quelato-reductasa en membranas microsomales de raíces de tabaco (Ruiz y Romero, 1999. en consideración).

Sin embargo, y en contra de todos estos resultados que hemos mencionado hasta el momento, recientemente, Pfeffer et al. (1998) han observado que el B no mantiene la integridad de la membrana plasmática a través de la formación de complejos con los fenoles o disminuyendo su oxidación por medio de la inhibición de la polifenol oxidasa, sino que parece ser que el efecto directo del B sobre la membrana se produciría por una estimulación directa de las enzimas de membrana.

Otra posible relación entre el B y el P se basa en el efecto de la nutrición de B sobre el metabolismo de los carbohidratos. En cianobacteria *Anabaena* PCC 7119 (García-González et al., 1999), en hojas de girasoles (Kastori et al., 1995), y en hojas de espinacas (Goldbach et al., 1991), la deficiencia de B resulta en una disminución de los procesos fotosintéticos. A pesar de este empeoramiento en la fotosíntesis, los distintos azúcares y el almidón se acumulan ante una deficiencia de B (Bonilla et al., 1980; Dugger, 1983; García-González et al., 1990; Shelp, 1993; Kastori et al., 1995).

La acumulación foliar de los carbohidratos ante una deficiencia de B, ha

sido explicada por una inhibición es su degradación (García-González et al., 1990), y por una disminución en su translocación hacia las raíces. Inicialmente, esta última hipótesis fue defendida por Gauch y Dugger (1954), que asignaron al B un papel facilitador en la translocación de los azúcares, debido a la habilidad del $B(OH)_3$ en formar complejos con los azúcares facilitando de esta manera su transporte a través de las membranas. Trabajos posteriores, como los de Dugger (1983), Shelp (1993), Kastori et al. (1995) y Marschner (1995), demostraron que la reducción en la translocación de sacarosa desde las hojas deficientes en B hacia los distintos sumideros en crecimiento era atribuido a la pérdida de actividad de estos sumideros provocada por la deficiencia de B.

En definitiva, una mejora en el estatus nutricional de B podría estimular la translocación de los carbohidratos desde las hojas hacia otras partes de la planta como las raíces (Cakmak y Römheld, 1997), lo que podría implicar un aumento en la absorción de P.

1.3. Influencia del Ca sobre el metabolismo del P.

La deficiencia en P, o una disminución en su disponibilidad para las plantas, puede ser causada por una baja efectividad de los fertilizantes fosfóricos, y/o por la aparición de interacciones entre este elemento con otros existentes en el medio de cultivo (Xiong y Zu, 1995). En este sentido, es conocido que los fosfatos solubles en agua una vez aplicados a suelos calcáreos rápidamente precipitan a fosfato dicalcico, produciéndose una reducción en la disponibilidad de P para las plantas (Yin et al., 1989; Xiong et al., 1994). El efecto de la interacción Ca-P en suelos calcáreos sobre las plantas esta bien documentado, sin embargo existen muy pocos estudios

que reporten tales efectos en cultivos hidropónicos.

A parte de este posible efecto directo del Ca sobre la absorción de P, la acumulación de Ca puede afectar directamente a los niveles de carbohidratos en las plantas, principales bioindicadores del P (efecto indirecto). Algunos estudios, han mostrado que elevadas concentraciones de Ca dan lugar a un incremento en la acumulación de carbohidratos, particularmente de almidón (Hepler y Wayne, 1985; Wei y Sung, 1993; Ruiz y Romero, 1998). Wei y Sung (1993) explicaron que la acumulación de carbohidratos a elevadas concentraciones de Ca, principalmente el almidón, se debía a una estimulación en la actividad de la enzimas sacarosa sintetasa, invertasa, P_i-fosfofrutokinasa, uridina difosfato-glucosa pirofosforilasa y la adenosina pirofosforilasa.

Ruiz y Romero (1998), estudiando el efecto de una elevada aplicación de Ca sobre el metabolismo del P, concluyeron que las altas concentraciones foliares de Ca afectaron a la relación raíz-hoja con respecto al P, puesto que se produjo una disminución en la translocación de P hacia las hojas. El efecto de Ca, produciendo una acumulación foliar de carbohidratos, fue posiblemente la principal causa del impacto del Ca sobre la translocación de P. Finalmente, estos autores indican que el efecto del Ca sobre el P no se observó a nivel de absorción de este último, sino a nivel de su translocación hacia la parte aérea.

II. Objetivos.

En este capítulo, y teniendo en cuenta los antecedentes y la gran controversia existente entre el estatus nutricional del P y la respuesta de sus principales bioindicadores, abordaremos los siguientes objetivos:

(i) estudiar los efectos del B y Ca así como la existencia de la interacción B-Ca sobre el estatus nutricional de P y su distribución en plantas de tabaco, centrándonos principalmente en la relación Ca-P.

(ii) evaluar a la actividad fosfatasa ácida y a los carbohidratos como posibles bioindicadores del estatus nutricional de P, así como determinar si los tratamientos de B y Ca por medio de variaciones en el comportamiento de estos bioindicadores pueden influir en el estatus nutricional de este macronutriente.

III. Material y métodos.

III.1. Diseño experimental.

(Ver Capítulo I)

III.2. Muestreo de las plantas.

(Ver Capítulo I)

III.3. Análisis de las plantas.

III.3.1. Extracción y ensayo de la APA.

El método utilizado para la extracción y la cuantificación de la APA fue el propuesto por Besford (1979). Una cantidad (0.5 g) de material vegetal fresco (raíces y hojas) fue homogeneizada con 5-ml de buffer acetato (acetato-sódico:ácido acético) 0.1 M, pH 5.8. El homogenado se filtró y posteriormente se centrifugó a 15000 rpm durante 12 min, resultando un sobrenadante que fue utilizado para la determinación de la APA. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-4°C.

La cuantificación de las proteínas en el extracto enzimático se realizaron siguiendo el método de Bradford (1976).

Para el ensayo de la APA se realizó un control de cada muestra problema, consistiendo este en: 8-ml de NaOH 0.2 N, 0.3-ml de extracto enzimático, 0.2-ml de agua bidestilada, 0.5-ml de buffer acetato de maceración, y 1-ml de sustrato (p-NPP 2 μ M: 0.526% (p/v) 4-nitrofenilfosfato disódico disuelto en buffer acetato 0.1 M, pH 5.8). Las muestras problema presentaban la misma mezcla de reacción exceptuando el volumen de NaOH 0.2 N, con el fin de que en las muestras se produjera la reacción enzimática consistente en la hidrólisis del p-NPP.

Todos los tubos se incubaron en oscuridad durante 15 min a 30°C, y pasado este tiempo a los tubos problema se añadió

8-ml de NaOH 0.2 N con el fin de parar la reacción enzimática. Transcurridos 10 min se efectuó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de A_{405} .

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco el cual presentaba todos los reactivos, y en el que se sustituyó el volumen del extracto enzimático por buffer acetato. La APA se expresó como μ mol de p-NPP hidrolizados mg^{-1} proteína min^{-1} .

III.3.2. Extracción y cuantificación de los azúcares solubles.

Los azúcares solubles, glucosa, fructosa, sacarosa y almidón, fueron medidos siguiendo la metodología propuesta por Irigoyen et al. (1992). Una cantidad de material vegetal fresco (0.5 g) fue homogeneizado inicialmente con 5-ml de etanol al 96%, y posteriormente dos veces con 5-ml de etanol al 70%. El homogenado se centrifugó a 5500 rpm durante 10 min, y el sobrenadante resultante se utilizó para la determinación de los azúcares solubles. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-4°C.

Del sobrenadante se tomó un volumen de 0.1-ml y se adicionó 3-ml de 0.1% (p/v) de antrona disuelta en H_2SO_4 al 70%. A continuación, los tubos se introdujeron en un baño de agua a 100°C durante 10 min, y transcurrido este tiempo y una vez enfriados se procedió a su lectura a una longitud de onda de A_{650} , frente a las curvas patrón de glucosa (300-700 $\mu\text{g/ml}$), fructosa (100-800 $\mu\text{g/ml}$) y sacarosa (100-800 $\mu\text{g/ml}$).

En relación al almidón, se empleó el residuo procedente de la centrifugación anteriormente descrita. Tras su desecación a 40°C durante 2 días, se le añadió al residuo 2.5-ml de agua bidestilada, 2.5-ml de buffer acetato 4 M, pH 4.5, y finalmente 2.5-ml de glucoamilasa al 0.5% (p/v).

Seguidamente, esta mezcla de reacción se incubo en oscuridad durante 2 días a 38°C, y transcurrido este tiempo la solución resultante una vez filtrada se utiliza para determinar el almidón, como indicábamos anteriormente, frente a una curva patrón de glucosa. A los resultados obtenidos, y con el fin de determinar la concentración de almidón, se multiplico por un factor de 0.9 según indica (Ettel, 1981).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco en el cual se sustituyo el volumen del extracto por antrona. Los azúcares se expresaron como mg g^{-1} p.f.

III.3.3. Extracción y cuantificación de las distintas formas del P.

La concentración de P disponible o soluble fue analizada a partir de una extracción del material seco y molido (0.1 g) en 10-ml de agua bidestilada (Millipore RX-21) (Wolf, 1982). La mezcla se sometió a una agitación vuelta-vuelta durante 2 h, y transcurrido este tiempo se centrifugo a 2500 rpm durante 10 min. Finalmente, la solución obtenida fue filtrada a través de papel de filtro Whatman ($n^{\circ}4$), resultando una solución en la cual se determinó esta forma del P.

La concentración de P disponible fue determinada usando el método colorimétrico del vanadomolibdofosforico (Hogue et al., 1970), a una longitud de onda de A_{430} y frente a una curva patrón de K_2HPO_4 (6.75-81 $\mu\text{g/ml}$). A un volumen de 0.1-ml de la extracción acuosa se le añadieron 3.9-ml de agua bidestilada y 6-ml de reactivo de P [0.1% (p/v) de molibdato-amónico + 0.05% (p/v) de vanadato-amónico + 13.8% (v/v) de ácido nítrico], y pasada 1h se procedió a la lectura colorimétrica.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco en el cual se sustituyo el volumen del extracto por agua

bidestilada.

Para la determinación del P total, 0.15 g de material seco y molido fue sometido a una mineralización con H_2SO_4 12N y H_2O_2 al 30% libre de P (Wolf, 1982). Del mineralizado resultante, y tras la adición de 20-ml de H_2O bidestilada (Millipore RX-21), se tomó un volumen en el que se determinó el contenido en P total, siguiendo el mismo método que para el P disponible propuesto por Hogue et al. (1970).

Finalmente, P orgánico se calculo restando las concentraciones de P disponible a las de P total.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco en el cual se sustituyo el volumen del extracto por agua bidestilada. Las concentración de P disponible, total y orgánico se expresaron como mg g^{-1} p.s.

III.4. Análisis estadístico.

(Ver Capítulo I)

IV. Resultados

La concentración radicular de P total (Tabla 1a) no vario ante el incremento en la aplicación de B ($F= 1.15$; $P> 0.05$), mientras que por el contrario el Ca dio lugar a un aumento proporcional en la concentración radicular de P total ($F= 98.58$; $P< 0.001$), presentándose el máximo nivel en Ca3 y el mínimo en Ca1 (Tabla 1a). Por otro lado, y en relación a las otras dos formas fosfóricas analizadas en esta experiencia, el P inorgánico y el P orgánico, mostraron un comportamiento similar al del P total ante la aplicación de B (Tabla 1a), puesto que el incremento de este micronutriente en el medio de cultivo no supuso ninguna variación estadísticamente significativa en sus concentraciones (Pi, $F= 3.94$, $P>0.05$; Porg, $F= 1.32$, $P> 0.05$).

TABLA 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de las distintas formas de P.

	Pt	Pi	Porg
B ₁	8.36	3.81	4.55
B ₂	8.11	3.87	4.57
B ₃	8.54	3.91	4.63
LSD	0.57	0.16	0.52
Ca ₁	6.52	4.84	2.01
Ca ₂	8.02	4.02	3.99
Ca ₃	10.5	2.73	7.74
LSD	0.57	0.16	0.52

P total (Pt), inorgánico (Pi), y orgánico (Porg) en mg g⁻¹ p.s.

En cuanto al efecto individual del Ca sobre el Pi y el Porg, fue en ambos casos significativo pero vario en función de la forma fosfórica estudiada. Un aumento en la aplicación de Ca dio lugar a una disminución proporcional de la concentración radicular de Pi ($F= 2863.94$, $P< 0.001$), encontrándose la máxima concentración en Ca1 y la mínima en Ca3 (Tabla 1a). Por el contrario la respuesta del Porg fue inversa a la del Pi, puesto que el

máximo nivel de esta forma fosfórica se presento en Ca3 y el mínimo en Ca1 ($F= 284.81$, $P< 0.001$) (Tabla 1a).

En definitiva, el B no influye estadísticamente sobre ninguna de la formas fosfóricas estudiadas en la raíz (Tabla 1), mientras que el Ca lo hace de forma positiva o directamente proporcional sobre el Ptot y el Porg, y de forma negativa o inversamente proporcional sobre el Pi (Tabla 1a).

En relación al estudio de la interacción entre estos dos elementos, podemos observar en la tabla 1b y 1c que no se reflejo sobre el Pi, mientras que sobre el Ptot y Porg su aparición fue muy débil desde el punto de vista estadístico, predominando en la mayoría de los casos el efecto individual de ambos nutrientes.

TABLA 1b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de las distintas formas de P: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Pt	Pi	Porg
Ca ₁ B ₁	7.31	4.72	2.59
B ₂	6.81	4.95	1.86
B ₃	6.44	4.86	1.58
Ca ₂ B ₁	8.12	3.95	4.17
B ₂	8.16	4.13	4.03
B ₃	7.78	3.99	3.79
Ca ₃ B ₁	9.66	2.76	6.90
B ₂	10.37	2.55	7.82
B ₃	11.41	2.89	8.52
LSD	0.99	0.39	1.12

P total (Pt), inorgánico (Pi), y orgánico (Porg) en mg g⁻¹ p.s.

En cuanto al Ptot ($F= 3.12$, $P< 0.05$) (Tabla 1b) y Porg ($F= 6.68$, $P< 0.05$) (Tabla 1b), el efecto individual del B no se produjo solamente cuando este elemento se aplico junto con la dosis Ca3, presentándose en este caso diferencias estadísticas entre el tratamiento Ca3B3, con las máximas concentraciones de Ptot y Porg, y los tratamientos Ca3B1 y Ca3B2. Finalmente, el B no supuso ninguna

variación sobre el efecto individual del Ca, puesto que independientemente de la dosis de B aplicadas las máximas y mínimas concentraciones radiculares de P_{tot} y P_{org} se presentaron en Ca₃ y Ca₁ respectivamente (Tabla 1c). Por último, y como hemos indicado anteriormente, sobre el P_i no se presentó ningún tipo de interacción puesto que en las tablas 1b y 1c se puede observar como fueron los efectos individuales, tanto del B como del Ca, los que predominaron (F= 4.38, P> 0.05).

TABLA 1c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de las distintas formas de P: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Pt	P _i	P _{org}
B ₁ Ca ₁	7.31	4.72	2.59
Ca ₂	8.12	3.95	4.17
Ca ₃	9.66	2.76	6.90
B ₂ Ca ₁	6.81	4.95	1.86
Ca ₂	8.16	4.13	4.03
Ca ₃	10.4	2.55	7.82
B ₃ Ca ₁	6.44	4.86	1.58
Ca ₂	7.78	3.99	3.79
Ca ₃	11.4	2.89	8.52
LSD	0.99	0.39	1.12

P total (Pt), inorgánico (P_i), y orgánico (P_{org}) en mg g⁻¹ p.s.

En la tablas 2a, 2b y 2c esta reflejado el comportamiento de los azúcares glucosa, fructosa, sacarosa y almidón analizados en nuestra experiencia, y como describiremos a continuación este fue similar para todos ellos. En cuanto a los efectos individuales, el B no mostró ninguna influencia estadísticamente significativa sobre los azúcares (glucosa, F= 19.93, P> 0.05; fructosa, F= 14.39, P> 0.05; sacarosa, F= 10.19, P> 0.05; almidón, F= 10.52, P> 0.05) (Tabla 2a), mientras que un aumento de Ca dio lugar a una disminución en las concentraciones radiculares de todos los azúcares, presentándose las máximas concentraciones en Ca₁ y las mínimas en

Ca₃ (glucosa, F= 13671.42, P< 0.001; fructosa, F= 1204.69, P< 0.001; sacarosa, F= 1033.49, P< 0.001; almidón, F= 1092.02, P< 0.001) (Tabla 2a).

TABLA 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las concentraciones radiculares de carbohidratos.

	Glu	Fru	Sac	Alm
B ₁	19.8	16.0	17.3	22.4
B ₂	19.2	17.0	17.1	22.8
B ₃	19.5	16.2	16.6	22.8
LSD	1.23	1.31	1.33	0.88
Ca ₁	30.1	25.6	25.5	25.6
Ca ₂	17.6	14.0	14.8	23.3
Ca ₃	10.7	9.53	10.8	19.0
LSD	1.23	1.31	1.33	0.88

Glucosa (Glu), fructosa (Fru), sacarosa (Sac) y almidón (Alm) expresados en mg g⁻¹ p.f.

TABLA 2b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de carbohidratos: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Glu	Fru	Sac	Alm
Ca ₁ B ₁	26.7	25.5	24.9	24.8
B ₂	31.8	26.6	25.7	26.6
B ₃	29.0	24.8	25.7	25.6
Ca ₂ B ₁	18.4	13.0	14.9	22.6
B ₂	16.4	15.5	15.7	23.9
B ₃	17.9	13.5	14.0	23.4
Ca ₃ B ₁	11.3	9.45	12.1	19.8
B ₂	9.46	8.81	10.1	18.0
B ₃	11.5	10.4	10.3	19.4
LSD	2.72	2.56	2.05	1.97

Glucosa (Glu), fructosa (Fru), sacarosa (Sac) y almidón (Alm) expresados en mg g⁻¹ p.f.

En las tablas 2b y 2c podemos observar como predominan los efectos individuales no presentándose ningún tipo de interacción entre el B y el Ca. Es decir, independientemente de la dosis de Ca aplicada los tratamientos de B no van influir sobre la concentración radicular de los azúcares, mientras que el incremento de Ca conlleva a una disminución en la

concentración radicular de los azúcares independientemente de la dosis de B aplicada (glucosa, $F= 16.69$, $P> 0.05$; fructosa, $F= 5.29$, $P> 0.05$; sacarosa, $F= 7.71$, $P> 0.05$; almidón, $F= 8.76$, $P> 0.05$).

TABLA 2c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de carbohidratos: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Glu	Fru	Sac	Alm
B ₁ Ca ₁	29.7	25.5	24.9	24.8
Ca ₂	18.4	13.0	14.9	22.6
Ca ₃	11.3	9.45	12.1	19.8
B ₂ Ca ₁	31.8	26.6	25.7	26.6
Ca ₂	16.4	15.5	15.7	23.9
Ca ₃	9.46	8.81	10.1	18.0
B ₃ Ca ₁	29.0	24.8	25.7	25.6
Ca ₂	17.9	13.5	14.0	23.4
Ca ₃	11.5	10.4	10.3	19.4
LSD	2.72	2.56	2.05	1.97

Glucosa (Glu), fructosa (Fru), sacarosa (Sac) y almidón (Alm) expresados en mg g^{-1} p.f.

Finalmente, la actividad fosfatasa ácida solamente se vio influenciada por el incremento en la aplicación de Ca ($F= 1752.58$, $P< 0.001$) (Figura 1a), presentándose la máxima actividad radicular en Ca₃ con un incremento del 66% en relación a la mínima actividad de Ca₁. Al igual que con el resto de parámetros del P estudiados, el B no determino cambios sobre la actividad fosfatasa ácida en raíces ($F= 13.45$, $P> 0.05$) (Figura 1a).

Con respecto a los efectos conjuntos de ambos nutrientes, destacar al igual que en los azúcares que predominaron los efectos individuales no existiendo ningún tipo de interacción ($F= 11.89$, $P> 0.05$) (Figuras 1b y 1c).

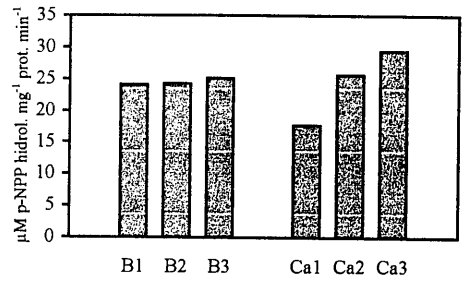


Figura 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad fosfatasa ácida radicular (LSD= 0.75).

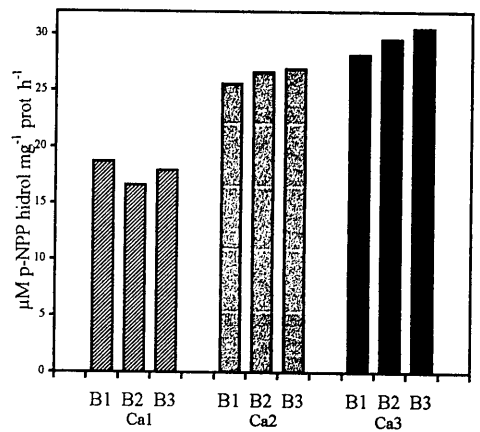


Figura 1b. Interacción B-Ca sobre la actividad fosfatasa ácida radicular: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 2.63).

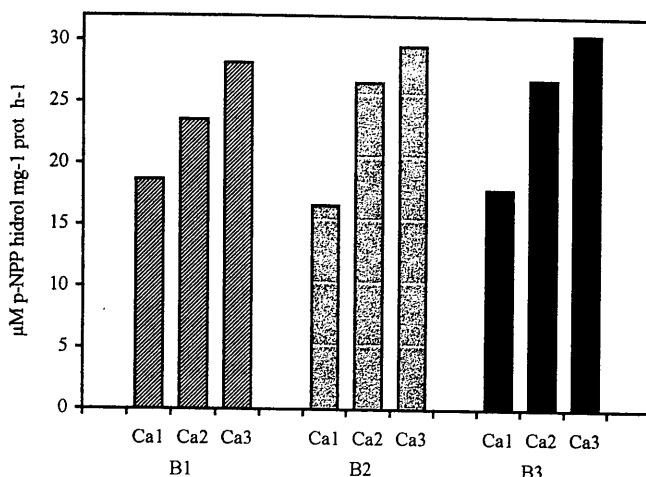


Figura 1c. Interacción B-Ca sobre la actividad fosfatasa ácida radicular: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 2.63).

Como explicaremos a continuación el comportamiento de todos los parámetros del P en hojas siguieron un comportamiento similar al que hemos descrito en raíces. En relación al P_{tot} (Tabla 3a) y al P_i (Tabla 3a), un aumento en la aplicación del B no dio lugar a diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (P_{tot}, F= 2.01, P> 0.05; P_i, F= 4.18, P> 0.05).

TABLA 3a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de las distintas formas de P.

	Pt	Pi	Porg
B ₁	5.51	2.99	2.52
B ₂	5.47	2.91	2.55
B ₃	5.50	3.01	2.49
LSD	0.22	0.12	0.14
Ca ₁	6.33	3.80	2.53
Ca ₂	5.76	3.24	2.52
Ca ₃	4.38	1.87	2.51
LSD	0.22	0.12	0.14

P total (Pt), inorgánico (Pi), y orgánico (Porg) en mg g⁻¹ p.s.

concentraciones de P_{tot} y P_i, presentándose la máximas concentraciones en Ca₁ y las mínimas en Ca₃ (P_{tot}, F= 22.56, P< 0.001; P_i, F= 2151.60, P< 0.001). En cuanto al Porg (Tabla 2a), ni el B (F= 1.25, P> 0.05) ni el Ca (F= 1.04, P> 0.05) produjeron ningún efecto estadísticamente significativo.

TABLA 3b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de las distintas formas de P: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Pt	Pi	Porg
Ca ₁ B ₁	6.31	3.77	2.54
B ₂	6.39	3.81	2.58
B ₃	6.29	3.82	2.47
Ca ₂ B ₁	5.81	3.28	2.53
B ₂	5.69	3.11	2.58
B ₃	5.79	3.33	2.46
Ca ₃ B ₁	4.42	1.93	2.49
B ₂	4.32	1.83	2.49
B ₃	4.41	1.87	2.54
LSD	0.37	0.34	0.43

P total (Pt), inorgánico (Pi), y orgánico (Porg) en mg g⁻¹ p.s.

Por el contrario, un aumento del Ca supuso una disminución foliar en las

La acción conjunta de ambos nutrientes no conlleva a cambios en los

efectos individuales del B o del Ca sobre el Ptot (F= 2.31, P> 0.05), Pi (F= 3.46, P> 0.05) y Porg (F= 1.23, P> 0.05), no apareciendo por lo tanto ningún tipo de interacción (Tablas 2b y 2c).

TABLA 3c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de las distintas formas de P: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Pt	Pi	Porg
B ₁ Ca ₁	6.31	3.77	2.54
Ca ₂	5.81	3.28	2.53
Ca ₃	4.42	1.93	2.49
B ₂ Ca ₁	6.39	3.81	2.58
Ca ₂	5.69	3.11	2.58
Ca ₃	4.32	1.83	2.49
B ₃ Ca ₁	6.29	3.82	2.47
Ca ₂	5.79	3.33	2.46
Ca ₃	4.41	1.87	2.54
LSD	0.37	0.34	0.43

P total (Pt), inorgánico (Pi), y orgánico (Porg) en mg g⁻¹ p.s.

En cuanto a la respuesta de los azúcares glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en hojas de tabaco ante la aplicación de B, esta fue de nuevo similar a la encontrada en las raíces, puesto que los distintos tratamientos de B aplicados no influyeron de forma significativa en la concentraciones foliares de estos (glucosa, F= 8.05, P> 0.05; fructosa, F= 3.61, P> 0.05; sacarosa, F= 6.76, P> 0.05; almidón, F= 6.21, P> 0.05) (Tabla 4a). Por el contrario, un aumento en la aplicación de Ca dio lugar a una acumulación foliar de los distintos azúcares, presentándose las máximas concentraciones en Ca₃ y las mínimas en Ca₁ (glucosa, F= 1402.26, P< 0.001; fructosa, F= 3269.56, P< 0.001; sacarosa, F= 2303.91, P< 0.001; almidón, F= 269.08, P< 0.001) (Tabla 4a).

TABLA 4a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las concentraciones foliares de carbohidratos.

	Glu	Fru	Sac	Alm
B ₁	50.4	38.1	39.4	45.5
B ₂	50.3	38.6	39.0	45.5
B ₃	49.5	38.3	39.4	46.9
LSD	1.57	0.64	0.84	1.56
Ca ₁	42.9	31.8	32.4	40.2
Ca ₂	49.1	38.0	38.6	46.4
Ca ₃	58.2	45.2	46.9	51.4
LSD	1.57	0.64	0.84	1.56

Glucosa (Glu), fructosa (Fru), sacarosa (Sac) y almidón (Alm) expresados en mg g⁻¹ p.f.

Al igual que ocurría en las raíces, en las hojas los efectos individuales tanto del B como del Ca predominaron en la respuesta de los distintos azúcares, no observándose por lo tanto ningún tipo de interacción entre ambos nutrientes (glucosa, F= 8.01, P> 0.05; fructosa, F= 6.05, P> 0.05; sacarosa, F= 11.15, P> 0.05; almidón, F= 2.69, P> 0.05) (Tablas 4b y 4c).

TABLA 4b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de carbohidratos: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Glu	Fru	Sac	Alm
Ca ₁ B ₁	43.0	30.8	32.9	40.6
B ₂	41.8	31.0	31.3	38.8
B ₃	44.0	33.7	33.1	41.3
Ca ₂ B ₁	49.2	37.2	38.9	44.9
B ₂	50.4	38.6	39.0	46.4
B ₃	47.8	37.6	37.6	47.9
Ca ₃ B ₁	59.1	45.7	46.5	51.0
B ₂	58.7	46.2	46.8	51.3
B ₃	56.8	43.7	47.5	51.8
LSD	3.42	2.73	2.76	3.18

Glucosa (Glu), fructosa (Fru), sacarosa (Sac) y almidón (Alm) expresados en mg g⁻¹ p.f.

TABLA 4c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de carbohidratos: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Glu	Fru	Sac	Alm
B ₁ Ca ₁	43.0	30.8	32.9	40.6
Ca ₂	49.2	37.7	38.9	44.9
Ca ₃	59.1	45.7	46.5	51.0
B ₂ Ca ₁	41.8	31.0	31.3	38.8
Ca ₂	50.4	38.6	39.0	46.4
Ca ₃	58.7	46.2	46.8	51.3
B ₃ Ca ₁	44.0	33.7	33.1	41.3
Ca ₂	47.8	37.6	37.6	47.9
Ca ₃	56.8	43.7	47.5	51.8
LSD	3.42	2.73	2.76	3.18

Glucosa (Glu), fructosa (Fru), sacarosa (Sac) y almidón (Alm) expresados en mg g⁻¹ p.f.

Finalmente, y en relación a la actividad fosfatasa ácida foliar, podemos indicar que al igual que ocurría en las raíces no hubo ningún efecto del B sobre esta actividad enzimática (F= 7.07, P> 0.05) (Figura 2a), y que el efecto del Ca se baso en un aumento directamente proporcional de esta al aumentar la aplicación de Ca, presentándose por lo tanto la máxima actividad en Ca3 con un aumento del 46% respecto a la mínima de Ca1 (F= 3733.87, P< 0.001) (Figura 2a).

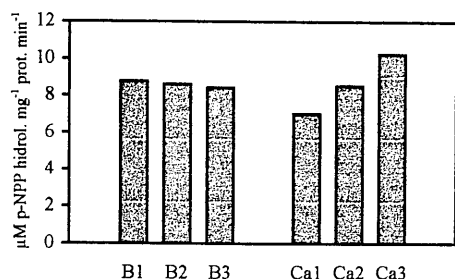


Figura 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad fosfatasa ácida foliar (LSD= 0.42).

En cuanto a la interacción, y como sucede en la mayoría de los parámetros de P analizados tanto en raíces como en hojas, predominaron los efectos individuales del B y del Ca, no influyendo ningún elemento sobre el otro (F= 9.51, P> 0.05) (Figuras 2b y 2c).

En definitiva y resumiendo los resultados obtenidos tanto en raíces como en hojas, podemos indicar que el B no muestra ninguna influencia sobre los distintos parámetros del P estudiados. Por el contrario, la aplicación de los distintos tratamientos de Ca determinan variaciones muy significativas en estos parámetros, siendo estas de distinta naturaleza dependiendo del órgano analizado. Posiblemente, el hecho de que el B no tenga influencia sobre los parámetros del P determina que no se produzca ningún tipo de interacción entre este elemento y el Ca en nuestra experiencia.

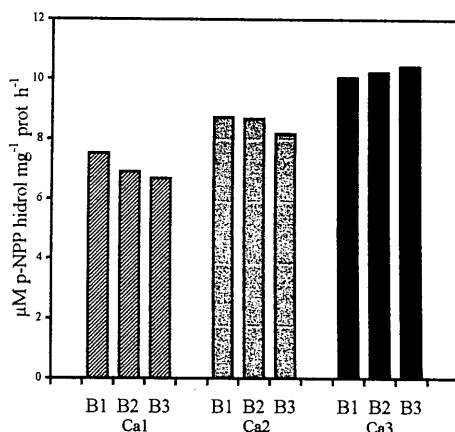


Figura 2b. Interacción B-Ca sobre la actividad fosfatasa ácida foliar: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 0.97).

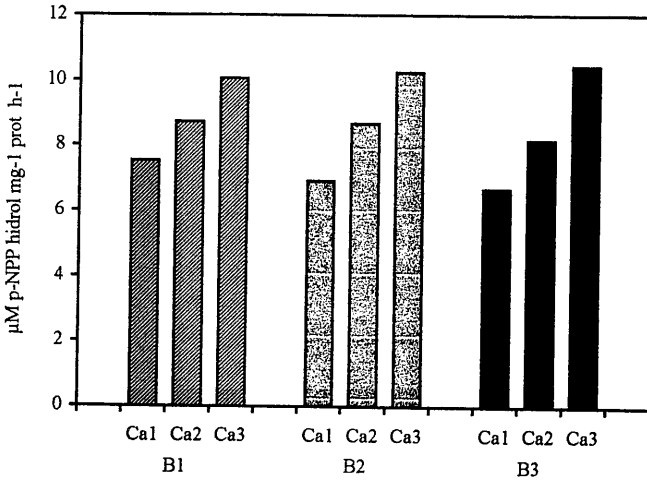


Figura 2c. Interacción B-Ca sobre la actividad fosfatasa ácida foliar: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 0.97).

V. Discusión

Como hemos descrito en el apartado anterior las concentraciones de P_{tot} permanecieron constantes, tanto en raíces (Tabla 1a) como en hojas (Tabla 3a), independientemente del tratamiento de B aplicado. En la introducción, indicábamos que el B podría tener influencia en la absorción de P y por lo tanto intervenir en el estatus nutricional de este en la planta. Estas sugerencias se basaban en los resultados de distintos trabajos, los cuales le otorgan al B un papel esencial en el flujo de iones por medio de su influencia sobre la actividad ATPasa de membrana (Pollard et al., 1977; Blaser-Grill et al., 1989; Goldbach et al., 1990; Schon et al., 1990; Ferrol y Donaire, 1992; Ferrol et al., 1993; Obermeyer et al., 1996). Sin embargo, este papel esencial del B sobre la absorción de iones a través de la membrana se ha demostrado en la mayoría de la investigaciones bajo condiciones de deficiencia en este micronutriente. En nuestra experiencia, por el contrario, no existió en ningún momento condiciones deficientes en B, lo que podría indicarnos que este micronutriente bajo concentraciones adecuadas en la planta no interviene sobre el estatus nutricional de P. Esta situación se demuestra observando los coeficientes de correlación obtenidos entre el B_{tot} y el P_{tot}, tanto en raíces ($r = -0.46$ ns) como en hojas ($r = 0.31$ ns).

Al contrario del B, el aumento en la aplicación de Ca supuso una variación significativa del P_{tot} tanto en raíces (Tabla 1a) como en hojas (Tabla 3a). En raíces el aumento de Ca dio lugar a un incremento proporcional en la concentración radicular de P_{tot}, presentándose la máxima concentración Ca₃, mientras que en hojas el aumento de Ca conllevó a una disminución gradual en la concentración de P_{tot}, encontrándose la mínima concentración en Ca₃. Como

explicábamos en el Capítulo I la mayoría del Ca es absorbido y acumulado en la parte aérea de las plantas, especialmente en plantas de tabaco (Bharti et al., 1996; Ruiz y Romero, 1998; Ruiz et al., 1999). En nuestra experiencia, la mayor acumulación de Ca_{tot} se produjo en el tratamiento Ca₃ en hojas (Tabla--, ver Capítulo I), siendo en este tratamiento donde encontramos las mínimas concentraciones foliares de P_{tot}. Por el contrario, en raíces, y a pesar de que también en Ca₃ se presentaron las máximas concentraciones de Ca_{tot}, observamos las máximas concentraciones radiculares de P_{tot}. Los coeficientes de correlación entre el Ca_{tot} y el P_{tot} en ambos órganos (raíces, $r = 0.76$ ***; hojas, $r = -0.79$ ***), nos sugieren que posiblemente la acumulación foliar de Ca este afectando a los procesos de translocación del P desde las raíces hacia las hojas, explicándose de esta manera los máximos niveles radiculares de P_{tot} en Ca₃ y los mínimos niveles foliares de P_{tot} en este mismo tratamiento. Estos mismos resultados han sido expuestos recientemente, también en plantas de tabaco, por Ruiz y Romero (1998).

La posibilidad de una interacción Ca-P a nivel de absorción demostrada en suelos calcáreos por varios investigadores (Yin et al., 1989; Xiong et al., 1994), no aparece en nuestra experiencia indicándonos la importancia de los factores exógenos a la planta, como el medio de cultivo, en la existencia o no existencia de una interacción específica entre elementos minerales.

Uno de los bioindicadores más estudiados en el estatus nutricional del P son los carbohidratos, aunque como indicábamos en la introducción existen bastantes controversias a este respecto. Los investigadores que utilizan los azúcares como bioindicadores del P se basan en que tanto la absorción de P por las raíces, como

su carga en el xilema son procesos que requieren carbohidratos como fuente de energía (Sasaki et al., 1984; Ullrich-Eberius et al., 1984; Loughman, 1987). Por otro lado, los azúcares, también pueden ser afectados por los niveles de Ca en la planta. Algunos estudios han demostrado que la acumulación de Ca involucra un incremento en la síntesis y posterior acumulación de estos azúcares (Hepler y Wayne, 1985; Wei y Sung, 1993; Ruiz y Romero, 1998). En nuestra experiencia, el aumento en la aplicación de Ca al medio de cultivo dio lugar a una disminución gradual de los azúcares glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en raíces, presentándose las máximas concentraciones en Ca1 (Tabla 2a), mientras que en hojas la situación fue inversa ya que las máximas concentraciones de estos azúcares se dieron en Ca3 (Tabla 4a). Los coeficientes de correlación en raíces y en hojas entre la concentración de Catot y los distintos azúcares (*raíces*, glucosa-Catot, $r = -0.74$ ***, fructosa-Catot, $r = -0.71$ ***, sacarosa-Catot, $r = -0.77$ ***, y almidón-Catot, $r = -0.71$ ***, *hojas*, glucosa-Catot, $r = -0.81$ ***, fructosa-Catot, $r = 0.87$ ***, sacarosa-Catot, $r = 0.82$ ***, y almidón-Catot, $r = 0.91$ ***) nos indican que es en las hojas, y concretamente en el tratamiento Ca3 con la mayor concentración de Catot, donde el efecto del Ca sobre los azúcares descrito por los autores Hepler y Wayne (1985), Wei y Sung (1993), y Ruiz y Romero (1998) se produce.

Por lo tanto, la aplicación de Ca3 al medio de cultivo da lugar en hojas a una acumulación de Catot que conlleva a la acumulación de los distintos azúcares (Tabla 4a). Esta acumulación de azúcares en hojas de Ca3 impediría o disminuiría su translocación vía floema hacia las raíces, lo que explicaría que en este órgano el tratamiento con las mínimas concentraciones de azúcares sea Ca3

(Tabla 2a). Las bajas concentraciones de azúcares en las raíces de las plantas tratadas con Ca3 podría ser la causa principal de la acumulación de Ptot en este tratamiento, debido a una disminución en la translocación de P hacia las hojas.

Por el contrario, en Ca1 con las concentraciones de Catot más bajas, tanto en raíces como en hojas, es en el tratamiento donde se presentan las concentraciones foliares de Ptot más elevadas (Tabla 3a) y las mínimas concentraciones foliares de azúcares (Tabla 4a). Por lo tanto, en este tratamiento posiblemente se favorezca la translocación vía floema de los azúcares hacia las raíces, facilitándose así la translocación del P hacia las hojas. La aparición de estos procesos explicaría las mínimas concentraciones de Ptot y las máximas concentraciones de azúcares en raíces de Ca1 (Tabla 1a y Tabla 2a, respectivamente).

En nuestra experiencia, y teniendo en cuenta los resultados y distribución en la planta de los azúcares, podemos indicar que estos compuestos son buenos bioindicadores del estatus foliar del P, puesto que como indican varios trabajos (Burauel, 1987; Burauel et al., 1990; Fredeen et al., 1989; Lauer et al., 1989; Ruiz et al., 1996; López-Cantarero et al., 1998; Ruiz y Romero, 1998) hemos observado que un aumento en la concentración foliar de P resulta en una disminución del contenido foliar de los azúcares, reflejándose este hecho en los coeficientes de correlación obtenidos en las hojas (Ptot-glucosa, $r = -0.85$ ***, Ptot-fructosa, $r = -0.86$ ***, Ptot-sacarosa, $r = -0.89$ ***, Ptot-almidón, $r = -0.88$ ***) .

Una de las pocas interacciones que aparece en el estudio de este capítulo, se produce en las raíces cuando analizamos los resultados del Ptot. Como podemos observar en la tabla 1b, el efecto individual del B no se refleja cuando aplicamos los

distintos tratamientos de B junto con la dosis Ca3. En este caso la combinación Ca3B3, con la máxima concentración radicular de Ptot, difiere las combinaciones Ca3B1 y Ca3B2. La posible explicación a este comportamiento se podría deber al hecho de que como indicábamos en el capítulo I, el B facilita la absorción de Ca. Por lo tanto, la mayor entrada y nivel de Ca en las plantas tratadas con Ca3B3 produciría, como acabamos de explicar, la acumulación de Ptot radicular debido a una disminución en su translocación hacia la parte aérea. Finalmente, y a este respecto, cabe destacar que esta interacción solamente se produce en este caso y específicamente sobre la concentración radicular de Ptot, ya que esta no se refleja ni en hojas ni sobre los distintos bioindicadores del P estudiados.

El Pi es uno de los elementos minerales más importantes, requerido para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas (Schachtman et al., 1998). Como indicábamos en la introducción de este capítulo, existen contradicciones sobre si el Pi puede ser un buen indicador del estatus nutricional de P en la planta. En nuestra experiencia, y teniendo en cuenta los coeficientes de correlación obtenidos entre el Ptot y el Pi (raíz, $r = -0.92$ ***; hojas, $r = 0.87$ ***), podemos indicar que en raíces, y como explican varios trabajos (Waterton et al., 1983; Foyer y Spencer, 1986), el comportamiento del Pi difiere sustancialmente al del Ptot. Por el contrario, en hojas, y como explica Crafts-Brandner (1992), la alteración en el estatus nutricional de Ptot conlleva también a una variación similar del Pi. Estos resultados confirman las hipótesis realizadas por Ruiz y colaboradores, los cuales sugieren que la relación entre el estatus nutricional de P y el Pi varía dependiendo de la especie vegetal, de la fertilización aplicada y del órgano analizado (Ruiz et al., 1996; López-Cantarero et al., 1998; Ruiz y Romero,

1998).

Las características de los coeficientes de correlación obtenidos entre el Ptot y el Pi, es decir su sentido positivo o negativo así como su significancia estadística, se deben principalmente al Ca, puesto que como podemos observar en las tablas 1a y 3a el B no influyó de ninguna manera sobre el comportamiento ni del Ptot ni del Pi. En cuanto al Ca, su influencia en raíces sobre el Pi fue contraria a la que mostró sobre el Ptot (Tabla 1a), mientras que en hojas el incremento en la aplicación de Ca dio lugar a incrementos tanto del Ptot como del Pi (Tabla 3a).

Posiblemente, el hecho de que en raíces la aplicación de Ca (Ca3) de lugar a una acumulación elevada de Ptot (Tabla 1a) haga disminuir los niveles radiculares de Pi (Tabla 1a). Distintos trabajos han comprobado que en plantas que muestran un suministro adecuado o excesivo de P, aparecen un número de procesos que actúan para prevenir la acumulación tóxica de Pi. Entre estos procesos los más importantes son: (i) la conversión de Pi a P orgánico, (ii) reducción en la absorción de P, y (iii) pérdida de Pi por salida o eflujo radicular (Bielecki y Ferguson, 1983; Lee et al., 1990; Furihata et al., 1992; Schachtman et al., 1998).

Por el contrario, la aplicación de los distintos tratamientos de Ca no conlleva en hojas a alteraciones drásticas en las concentraciones de Ptot (Tabla 3a), por lo que en este caso el Pi refleja fielmente el estatus nutricional de este nutriente (Tabla 3a), como ocurre en plantas con un suministro óptimo en este elemento (Lee y Ratcliffe, 1993; Mimura, 1995). Este hecho, también sería aplicable al efecto de los distintos tratamientos de B sobre las concentraciones radiculares y foliares de Ptot (Tablas 1a y 3a respectivamente).

Finalmente, los resultados obtenidos tanto en raíces como en hojas del P orgánico nos pueden ayudar a verificar todas las hipótesis expuestas anteriormente. En raíces, la aplicación de los distintos tratamientos de B no dieron lugar a diferencias significativas en las concentraciones de Porg (Tabla 1a). Por el contrario, el aumento en la aplicación de Ca conlleva a un aumento gradual del Porg radicular, presentándose la máxima concentración en Ca3 (Tabla 1a). Por otro lado, en hojas ni el B ni el Ca mostraron un efecto estadísticamente significativo sobre este parámetro (Tabla 3a).

Por lo tanto, la aplicación de las distintas dosis de Ca en raíces conlleva el aumento en la formación de Porg (Tabla 1a), evitándose de esta manera que se produjese una toxicidad por Pi (Bielecki y Ferguson, 1983; Lee et al., 1990; Furihata et al., 1992; Schachtman et al., 1998), debido a la acumulación de P que se presenta principalmente en raíces tratadas con Ca3. En el resto de los casos, es decir en las raíces tratadas con B y en las hojas tratadas tanto con B como con Ca, como los niveles de Ptot fueron adecuados el Pi sigue la dinámica del primero (Tablas 1a y 3a), y por lo tanto no se obtienen diferencias significativa en las concentraciones de Porg (Tablas 1a y 3a).

Los cambios que se producen en el Pi son claramente reflejados por la actividad fosfatasa ácida, ya que esta actividad enzimática generalmente muestra una cerrada relación con el estatus nutricional de P, y más específicamente con el Pi, basándose esta en un incremento en la actividad enzimática bajo condiciones deficientes de P (Thapar et al., 1991; Barrel-Lennard et al., 1993; Tadano et al., 1993). Los coeficientes de correlación obtenidos en nuestra experiencia entre el Pi y la actividad fosfatasa ácida confirman la relación estrecha entre estos dos parámetros (raíz,

$r = -0.90$ ***; hoja, $r = -0.93$ ***), y además, confirman que la actividad fosfatasa ácida puede reflejar también el estatus nutricional de P bajo condiciones adecuadas de este nutriente, como ocurre en nuestra experiencia y como ha sido indicado en varios trabajos (Ruiz et al., 1996; López-Cantarero et al., 1998; Ruiz y Romero, 1998).

Como indicábamos en el apartado de resultados, el B ni en raíces ni en hojas influye significativamente sobre la actividad fosfatasa ácida (Figuras 1a y 2a, respectivamente). Por el contrario, el aumento en la aplicación de Ca dio lugar en raíces a un incremento proporcional de esta actividad enzimática, mientras que en hojas a una disminución igualmente proporcional. Sin embargo, y teniendo en cuenta la relación estrecha entre el Pi y la actividad fosfatasa ácida, esta influencia del Ca sobre esta actividad enzimática probablemente pueda ser indirecta, a través de la acción directa que ejerza el Ca sobre el Ptot y Pi.

VI. Conclusiones

En general, podríamos obtener varias conclusiones que nos resumieran rápidamente el papel del B y del Ca sobre el metabolismo del fósforo tanto en raíces como en hojas:

Primera: La aplicación externa de las dosis de B empleadas en nuestra experiencia no determinan ninguna influencia, ni en raíces ni en hojas, sobre el metabolismo del fósforo. Este hecho nos sugiere que la influencia del B sobre el P parece ocurrir exclusivamente bajo condiciones de estrés del primero y no bajo concentraciones adecuadas de este micronutriente en planta, como ocurre en nuestra experiencia.

Segunda: Las elevadas concentraciones foliares de Ca, principalmente en Ca2 y Ca3, causadas por

la aplicación de este elemento en el medio de cultivo, afectan a la relación raíz-hoja con respecto al P, disminuyendo su translocación hacia las hojas y por lo tanto acumulándose en las raíces. El efecto del Ca sobre la acumulación foliar de los distintos azúcares en estos tratamientos fue posiblemente la causa principal de la retención del P en las raíces.

Tercera: El efecto del Ca sobre la acumulación radicular de P, supone la disminución del P_i en nuestra experiencia, favoreciéndose la formación de Porg con el fin de evitar una posible toxicidad de P_i . Por otro lado, la actividad fosfatasa ácida fue un buen indicador de las variaciones del P_i tanto en raíces como en hojas, lo que nos sugiere que el efecto del Ca sobre estos posibles bioindicadores (P_i y actividad fosfatasa ácida) se realiza de forma indirecta a través del efecto principal que muestra el Ca sobre el P_{tot} .

Cuarta: Finalmente, destacar que solo se produjo una interacción en raíces, que consistió en la no aparición del efecto individual del B sobre el P_{tot} cuando el Ca fue aplicado bajo la dosis Ca_3 . Esta interacción se debería al efecto positivo que ejerce el B sobre la absorción de Ca, lo que produciría un incremento en la concentración de Ca radicular y como consecuencia una acumulación de P_{tot} en la combinación Ca_3B_3 , como así lo muestran nuestros resultados.

VII. Referencias.

- Adalsteinsson S, Schjorring JK, Jensen P. 1994.** Regulation of phosphate influx in winter wheat: root-shoot phosphorus interactions. *J. Plant Physiol.* 143: 681-686.
- Barrett-Lennard EG, Dracup M, Greenway H. 1993.** Role of extracellular phosphatases in the phosphorus-nutrition of Clover. *J. Exp. Bot.* 44: 1595-1600.
- Besford RT. 1979.** Phosphorus nutrition and acid phosphatase activity in leaves of seven plant species. *J. Sci. Fd. Agric.* 30: 282-285.
- Bharti N, Singh RP, Sinha SK. 1996.** Effect of calcium chloride on heavy metal induced alteration in growth and nitrate assimilation of *Sesamum indicum* seedlings. *Phytochem.* 41: 105-109.
- Blaser-Grill J, Knoppik D, Amberger A, Goldbach H. 1989.** Influence of boron on the membrane potential in *Elodea densa* and *Helianthus annuus* roots and H⁺ extrusion of suspension cultured *Daucus carota* cells. *Plant Physiol.* 90: 280-284.
- Bonilla I, Cadahia C, Carpena O, Hernando V. 1980.** Effects of boron on nitrogen metabolism and sugar levels of sugar beet. *Plant Soil* 57: 3.
- Bialeski RL. 1973.** Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 225-252.
- Bialeski RL, Ferguson IB. 1993.** Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: *Encyclopedia of plant physiology.* Vol. 15a. Lauchli A, Bialeski RL. eds., Springer-Verlag, Berlin.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Burauel P. 1987.** Wechselwirkung zwischen sprob und wurzel zweier sojabohnensorten bei unterschiedlichem phosphaternahrungszustand: C-assimilatverteilung und kohlenhydratstatus. *Diss. Bonn.*
- Burauel P, Wieneke J, Führ F. 1990.** Carbohydrate status in roots of two soybean cultivars: A possible parameter to explain different efficiencies concernig phosphate uptake. *Plant Soil* 123: 169-174.
- Cakmak I, Hengeler C, Marschner H. 1994a.** Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. *J. Exp. Bot.* 45: 1245-1250.
- Cakmak I, Hengeler C, Marschner H. 1994b.** Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *J. Exp. Bot.* 45: 1251-1257.
- Cakmak I, Römheld V. 1997.** Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil* 193: 71-83.
- Claussen W. 1986.** Influence of fruit load and environmental factors on nitrate reductatase activity and on concentration of nitrate and carbohidrates in leaves of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Physiol. Plant.* 67: 73-80.

- Cogliatti DH, Santa Maria GE. 1990.** Influx and efflux of phosphorus in roots of wheat plants in non-growth-limiting concentrations of phosphorus. *J. Exp. Bot.* 41: 601-607.
- Crafts-Brandner SJ. 1992.** Phosphorus nutrition influence on leaf senescence in soybean. *Plant Physiol.* 98: 1128-1132.
- Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME, Sims JL, Sutton TG. 1990.** Phosphorus nutrition influence of plant growth and nonstructural carbohydrate accumulation in tobacco. *Crop Sci.* 30: 609-614.
- Drew MC, Saker LR. 1984.** Uptake and long-distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to internal ion concentration in barley: evidence of non-allosteric regulation. *Planta.* 160: 500-507.
- Dugger WM. 1983.** Boron in plant metabolism. In: *Encyclopedia of plant physiology.* Vol. 15. Lauchli A, Bielecki RL. eds., Springer-Verlag, Berlin.
- Dunlop J, Gardiner S. 1993.** Phosphate uptake, proton extrusion and membrane electropotentials of phosphorus-deficient *Trifolium repens* L. *J. Exp. Bot.* 44: 1801-1808.
- Ettel W. 1981.** Eine neue enzymatische stäkebestimmung für lebensmittel. *Alimenta* 20: 7-11.
- Ferrol N, Donaire JP. 1992.** Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells. *Plant Sci.* 86: 41-47.
- Ferrol N, Belver A, Roldan M, Rodriguez-Rosales MP, Donaire JP. 1993.** Effects of boron on proton transport and membrane properties of sunflower cell microsomes. *Plant Physiol.* 103: 763-769.
- Foyer C, Spencer C. 1986.** The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves. Effects on intracellular orthophosphate distribution, photosynthesis, and assimilate partitioning. *Planta* 167: 369-375.
- Fredeen AL, Rao IM, Terry N. 1989.** Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max.* *Plant Physiol.* 89: 225-230.
- Furihata T, Suzuki M, Sakurai H. 1992.** Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. *Plant Cell Physiol.* 33: 1151-1157.
- Garcia-González M, Mateo P, Bonilla I. 1991.** Effect of boron deficiency on photosynthesis and reductant sources and their relationship with nitrogenase activity in *Anabaena* PCC 7119. *Plant Physiol.* 93: 560-565.
- Gauch HG, Dugger WM. 1954.** The physiological action of boron in higher plants: a review and interpretation. *Agric. Exp. Station, University of Maryland, Bulletin A-80 (Technical),* College Park, MD.
- Goldbach H, Hartmann D, Rötzer T. 1990.** Boron is required for the ferricyanide-induced proton release by auxins in suspension cultured cells of *Daucus carota* and *Lycopersicon esculentum.* *Physiol. Plant.* 80: 114-118.

- Goldbach H, Blaser-Grill J, Lindemann N, Porzelt M, Hörrmann C, Lupp B, Gessner B. 1991.** Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic processes. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 10: 195-220.
- Hepler PK, Wayne RO. 1985.** Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 397-439.
- Hogue E, Wilcow GE, Cantliffe DJ. 1970.** Effect of soil P on phosphate fraction in tomato leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95: 174-176.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M. 1992.** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84: 55-60.
- Jeschke WD, Kirkby EA, Peuke AD, Pate JS, Hartung W. 1997.** Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). *J. Exp. Bot.* 48: 75-91.
- Kastori R, Plesnicar M, Pankovic D, Sakac Z. 1995.** Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrates in sunflower leaves as affected by boron deficiency. *J. Plant Nutr.* 18: 1751-1763.
- Katz DB, Gerloff GC, Gabelman WH. 1986.** Effects of phosphate stress on the rate of phosphate uptake during resupply to deficient tomato plants. *Physiol. Plant.* 67: 23-28.
- Lauer MJ, Blevins DG, Sierzputowska-Gracz H. 1989.** ³¹P-nuclear magnetic resonance determination of phosphate compartmentation in leaves of reproductive soybeans (*Glycine max* L.) affected by phosphate nutrition. *Plant Physiol.* 89: 1331-1336.
- Lee JM. 1994.** Cultivation of grafted vegetables I. Current status, grafting methods and benefits. *HortSci.* 29: 235-239.
- Lee RB, Ratcliffe RG, Southon TE. 1990.** ³¹P NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. *J. Exp. Bot.* 41: 1063-1078.
- Lee RB, Ratcliffe RG. 1993.** Subcellular distribution of inorganic phosphate, and levels of nucleoside triphosphate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: measurements with ³¹P NMR. *J. Exp. Bot.* 44: 587-598.
- Leggewie G, Wilmitzer L, Riesmeier JW. 1997.** Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* 9: 381-392.
- López-Cantarero I, Ruiz JM, Hernandez J, Romero L. 1998.** Phosphorus metabolism and yield response to increases in nitrogen-phosphorus fertilization: improvement in greenhouse cultivation of eggplant (*Solanum melongena* Cv. Bonica). *J. Agric. Food Chem.* 46: 1603-1608.
- Loughman BC. 1987.** The application of *in vivo* techniques in the study of metabolic aspects of ion absorption in crop plants. *Plant Soil* 99: 63-74.

- McLachlan KD. 1982.** Leaf acid phosphatase activity and the P status of field-grown wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 33: 453-464.
- McLachlan KD. 1984.** Effects of drought, aging and P status of leaf acid phosphatase activity in wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 35: 777-787.
- Marschner H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press, HB Publishers, London.
- Mimura T, Dietz KJ, Kaiser W, Schramm M, Kaiser G, Heber U. 1990.** Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta* 180: 139-146.
- Mimura T. 1995.** Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol.* 36: 1-7.
- Mimura T, Sakano K, Shimmen T. 1996.** Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell Environ.* 19: 311-320.
- Obermeyer G, Kriechbaumer R, Strasser D, Maschessnig A, Bentrup FW. 1996.** Boric acid stimulates the plasma membrane H^+ -ATPase of ungerminated lily pollen grains. *Physiol. Plant.* 98: 281-290.
- Parr AJ, Loughman BC. 1983.** Boron and membrane functions in plants. In: *Metals and micronutrients: uptake and utilization by plants.* Robb DA, Pierpoint WS. eds., Academic Press, London.
- Pfeffer H, Dannel F, Römheld V. 1998.** Are there connections between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants?. *Physiol. Plant.* 104: 479-485.
- Pillinger JM, Coope JA, Ridge I. 1994.** Role of phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw. *J. Chem. Ecol.* 20: 1557-1569.
- Pollard AS, Parr AJ, Loughman BC. 1977.** Boron in relation to membrane function in higher plants. *J. Exp. Bot.* 28: 831-841.
- Qiu J, Israel DW. 1992.** Diurnal starch accumulation and utilization in phosphorus-deficient soybean plants. *Plant Physiol.* 98: 316-323.
- Qiu J, Israel DW. 1994.** Carbohydrate accumulation and utilization in soybean plants in response to altered phosphorus nutrition. *Physiol. Plant.* 90: 722-728.
- Robertson GA, Loughman BC. 1974.** Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba*. *New Phytol.* 73: 291-298.
- Romero L. 1996.** Niveles exogenos y endogenos y sus efectos sobre la nutrición de la planta. En: *Algunos aspectos de la nutrición mineral de las plantas.* Romero L. ed., Granada.
- Ruiz JM, Belakbir A, Romero L. 1996.** Foliar level of phosphorus and its bioindicators in *Cucumis melo* grafted plants. A posible effect of rootstocks. *J. Plant Physiol.* 149: 400-404.

- Ruiz JM, Romero L. 1998.** Calcium impact on phosphorus and its main bioindicators: response in the roots and leaves of tobacco. *J. Plant Nutr.* 21: 2273-2285.
- Ruiz JM, Romero L. 1999.** Influence of B on the absorption and content of Fe in the roots of tobacco plants. Role of B in the stabilization of the plasma membrane. *Physiol. Plant.* (En consideración).
- Rychter AM, Randall DD. 1994.** The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiol. Plant.* 91: 383-388.
- Sasaki Y, Arima Y, Kumazawa K. 1984.** Radial transport of phosphate in corn roots: Mechanism of transport of phosphate estimated by the turnover rates of intermediate compounds. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30: 137-144.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998.** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.
- Schon MK, Novacky A, Blevins DG. 1990.** Boron induces hyperpolarization of sunflower root cell membranes and increases membrane permeability to K^+ . *Plant Physiol.* 93: 566-571.
- Shelp BJ. 1993.** Physiology and biochemistry of boron in plants. In: Boron and its role in crop production. Gupta UC, ed., CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Serrano R. 1989.** Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40: 61-94.
- Smith DA, Chevalier P. 1984.** Increases in phosphatase and β -glucosidase activities in wheat seedling in response to P-deficient growth. *J. Plant Nutr.* 7: 1221-1231.
- Spier TW, Cowling JC. 1991.** Phosphatase activities of pasture and soil: relationship with plant, productivity and soil P fertility indices. *Biol. Fertil. Soil* 12: 189-194.
- Tadano T, Ozawa K, Sakai H, Osaki M, Mutsui H. 1993.** Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. *Plant Soil.* 155/156: 95-98.
- Thapar S, Sekhon BS, Atwal A, Singh R. 1991.** Phosphorus nutrition and nitrogen assimilation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Plant Physiol.* 138: 111-114.
- Theodorou ME, Plaxton WC. 1993.** Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 101: 339-344.
- Ullrich-Eberius CI, Novacky A, van Bel AJE. 1984.** Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: Energetics and kinetics. *Planta.* 161: 46-52.
- Ullrich C, Novazacky A. 1990.** Extra- and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$, and NO uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferum*. *Plant Physiol.* 94: 1561-1567.
- Waterton JC, Bridges IG, Irving MP. 1983.** Intracellular compartmentation detected by ^{31}P -NMR in intact photosynthetic wheat-leaf tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* 763: 315-320.

Wei ML, Sung JM. 1993. Carbohydrate metabolism enzymes in developing grains of rice cultured in solution with calcium supplement. *Crop Sci.* 33: 174-177.

Wolf B. 1982. A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 13: 1035-1059.

Xiong LM, Lu RK, Truong B. 1994. An evaluation of the agronomic potential of partially acidulated rock phosphates in calcareous soil. *Fert. Res.* 38: 205-212.

Xiong LM, Zhou ZG. 1995. Magnesium influence on plant uptake of phosphorus in a calcareous soil. *J. Plant Nutr.* 18: 1251-1261.

Yin JL, Cao CR, Shi RH. 1989. Study on the phosphorus fixation of calcareous soils in Xu-Huai districts. *Acta Pedologica Sinica* 26: 131-138 (in Chinese).

CAPITULO V. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE B Y Ca SOBRE LA DISTRIBUCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS CATIONES K^+ , Mg^{2+} Y Ca^{2+} EN PLANTAS DE TABACO. UTILIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PYRUVATO KINASA COMO POSIBLE BIOINDICADOR

I. Introducción

- I.1. Influencia del B sobre la concentración de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} .
- I.2. Influencia del Ca sobre la concentración de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} .
- I.3. Actividad piruvato kinasa.

II. Objetivos.**III. Material y métodos**

- III.1. Diseño experimental.
- III.2. Muestreo de las plantas.
- III.3. Análisis de las plantas.
- III.4. Análisis estadístico.

IV. Resultados**V. Discusión****VI. Conclusiones****VII. Referencias****I. Introducción**

I.1. Influencia del B sobre la concentración de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}

El B juega un papel importante en el transporte de la mayoría de los nutrientes a través de la membrana plasmática, pero a pesar de estas evidencias, existen muy pocas investigaciones que tratan el estudio de las relaciones entre este micronutriente con el resto de nutrientes.

De estos pocos trabajos, gran parte de ellos se centran en la posible interacción entre el B y los cationes divalentes, especialmente el Ca^{2+} . En plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) la aplicación de dosis crecientes de B al suelo conlleva en un incremento de las concentraciones

de N y Na^+ , pero redujo las de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Singh y Singh, 1984). Por el contrario, en plantas de alfalfa, la aplicación de B de nuevo en el suelo no afectó a las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} en los distintos tejidos de la planta. Por otro lado, un análisis de los niveles foliares de nutrientes en caña de azúcar mostró que los niveles de B eran correlacionados positivamente con los de Ca^{2+} pero negativamente con los de Mg^{2+} (Bowen, 1981). Yamauchi et al. (1986) indicaron que la deficiencia de B producía una disminución de la cantidad de Ca asociado a las pectinas en hojas de tomate, mientras que Mozafar (1989) en la misma planta observó un sinergismo entre el B y el Ca^{2+} en la parte aérea y un antagonismo en la raíz.

Estudios más recientes en rosales, nos muestran que el aumento de la

concentración de B en la solución nutritiva favorecen tanto la absorción como la translocación de Ca^{2+} hacia la parte aérea, produciéndose por lo tanto un incremento en la concentración foliar de Ca^{2+} (Ganmore-Neumann y Davidov, 1993). Resultados similares a los que acabamos de describir han sido descritos por Bonilla et al. (1995), trabajando con las cianobacterias *Anabaena* y *Synechococcus*.

Finalmente, Mühling et al. (1998), en raíces de *Vicia faba*, observaron como el Ca apoplástico incrementaba del orden de 3 veces transcurridos solamente 20 minutos después de haber cambiado a las plantas a una solución nutritiva sin B. La adición de B inhibía el incremento del Ca apoplástico en segundos. En conclusión, estos autores y otros como Goldbach et al. (1991) achacan los efectos de la deficiencia de B al deterioro de la integridad de la membrana plasmática.

Como acabamos de describir, existe bastante controversia en cuanto a la relación entre el B y los distintos cationes, especialmente con el Ca^{2+} ya que la relación B-Ca ha sido la más estudiada. Por el contrario, la relación B- Mg^{2+} y sobre todo la relación B- K^+ han sido muy poco tratadas y realmente los efectos o posibles interacciones no se conocen todavía con detalle.

1.2. Influencia del Ca sobre la concentración de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} .

Cationes tales como K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} son nutrientes esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas superiores. Al igual que otros nutrientes, entre estos cationes se producen interacciones. Por lo general, la absorción de un ion puede ser influenciado por la presencia en el medio de otro ion o iones. Elevadas concentraciones de ion en la

solución externa conlleva generalmente a una alta absorción de éste, lo que conduce a una acumulación excesiva en la planta. La absorción excesiva de ion puede inhibir la absorción de otros nutrientes minerales por la raíz, así como su transporte hacia la parte aérea, lo que produciría la aparición de síntomas de deficiencia (Cramer et al., 1991).

Muchos suelos agrícolas en España y en el resto del mundo son calcáreos y presentan a menudo altos niveles de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , con el peligro de que el balance relativo entre estos nutrientes sea inadecuado para conseguir una producción óptima. Generalmente, los desequilibrios nutricionales, tanto en medios edáficos como medios hidrónicos, conllevan serias consecuencias para el crecimiento y producción de cualquier cultivo (Ruiz et al., 1999a).

Por ejemplo, las deficiencias de K^+ y Mg^{2+} resultan en una acumulación de fotosintatos en las hojas, disminuyéndose por lo tanto su distribución a órganos muy dependientes de estos compuestos como son los frutos y raíces (Cakmak et al., 1994a,b; Marschner et al., 1996). Además, la deficiencia de estos cationes produce una acumulación de radicales oxigenados seguida de una clorosis (Cakmak, 1994). Por otra parte, es característico que la deficiencia de Ca, entre otros efectos perjudiciales, de lugar a la aparición en los bordes de las hojas de quemaduras ("tipburn") (Sonneveld y Mook, 1983).

Como indicábamos más detalladamente en el Capítulo I, la ruta principal de entrada de Ca^{2+} a las células radiculares es a través de los llamados canales de Ca^{2+} (Bush, 1995). La rapidez en la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales, junto con la actividad de los sensores de estos que determinan el estado de apertura o cierre, permiten el control sobre la cinética de entrada de Ca^{2+} (Hille,

1992). Además se ha comprobado que ante elevadas concentraciones externas de este cation, la entrada de Ca^{2+} se puede producir por canales no selectivos y a través de los canales de K^+ (Schroeder y Hagiwara, 1990; Fairley-Grenot y Assmann, 1992).

Una vez que el Ca^{2+} ha sido absorbido por las raíces es distribuido en su mayoría hacia la parte aérea de la planta, puesto que se ha comprobado que existe una cerrada correlación entre la distribución de Ca^{2+} y la razón de transpiración en las distintas partes u órganos de la planta. Por ejemplo, bajas concentraciones de Ca^{2+} se han encontrado en órganos como los frutos con baja transpiración ($> 0.3\%$), en comparación con las concentraciones existentes en las hojas maduras de la misma planta (3-5%) (Marschner, 1995). Por otro lado, algunos trabajos ponen de manifiesto que el Ca^{2+} se encuentra mayoritariamente en la parte aérea, y mas específicamente en las hojas maduras en relación al nivel inferior existente en las raíces (Ganmore-Neumann y Davidov, 1993; Bharti et al., 1996; Ruiz y Romero, 1998; Ruiz et al., 1999a,b,c).

Tanto la absorción como la distribución del Ca^{2+} en la planta, van a ser factores fundamentales en la relación de este cation con los cationes K^+ y Mg^{2+} . La relación existente entre el Ca^{2+} y el Mg^{2+} es prácticamente en todos los casos de antagonismo (Miyasaka y Grunes, 1990; Fenn et al., 1994; Song y Fujiyama, 1996), mientras que con respecto al K^+ , existen estudios que describen el efecto positivo del Ca^{2+} sobre la absorción y concentración foliar de los cationes monovalentes, lo que se denomina como "efecto viets" (Viets, 1944; Sung y Lo, 1990; Fenn et al., 1994).

Por el contrario, estudios como los de Sims et al. (1995), realizados en plantas de tabaco, indican que un incremento moderado en la fertilización con Ca (380

Kg/Ha) aumenta la absorción y concentración foliar de K^+ , mientras que incrementos elevados (760 Kg/Ha) produce una disminución en la absorción y concentración del K^+ . Distintos trabajos y revisiones, como las de Dibb y Thompson (1985), Taylor et al. (1985), y Marschner (1995), indican que la estimulación en la absorción de K^+ por el Ca^{2+} depende de varios factores como: (i) el pH, disminuyendo esta estimulación al aumentar el pH, (ii) de la especie vegetal empleada, y (iii) de la dosis de K^+ empleada en la fertilización.

1.3. Actividad piruvato kinasa.

El proceso de la glicolisis es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por lo tanto, el conocimiento de la regulación de este proceso metabólico en plantas requiere la investigación de las enzimas claves en este proceso, como son la fosfoenolpiruvato kinasa y principalmente la piruvato kinasa (PK, EC 2.7.1.40), ya que en plantas existen bastantes evidencias que indican que es la PK el primer sitio de control de este proceso (Plaxton et al., 1993; Huppe y Turpin, 1994; Podestá y Plaxton, 1994a,b). Además, estudios que tratan la interacción entre el metabolismo carbonado y nitrogenado ponen de manifiesto que este sistema es críticamente dependiente de la regulación de la PK (Lin et al., 1989; Schuller et al., 1990; Vanlerberghe et al., 1990). En relación a este tema, se ha comprobado que bajo condiciones de asimilación nitrogenada activa, un incremento en la actividad PK y por lo tanto de la glicolisis no solamente suministra el esqueleto carbonado necesario para la asimilación del NH_3 , sino que también suministra ATP necesario para que se produzca la asimilación del N (Baysdorfer y Bassham, 1984; Turpin et al., 1990; Gergenberger y Stitt, 1991; Van

Quy et al., 1991; Podestá y Plaxton, 1994b).

La PK cataliza la síntesis de piruvato y ATP a partir del PEP y el ADP (Podestá y Plaxton, 1991). Estudios sobre la cinética de esta enzima revelan que su activación depende de los niveles de PEP, ADP y de la presencia de cationes como el K^+ y principalmente el Mg^{2+} . Por el contrario, el ATP, AMP, isocitrato, 2-oxoglutarato y malato entre otros son potentes inhibidores de esta actividad enzimática. Por otro lado, y bajo niveles elevados de Mg^{2+} , y debido a su unión con los sustratos de la enzima (PEP y ADP), también producen inhibición de la actividad PK (Podestá y Plaxton, 1991, 1992).

Por otro lado, y teniendo en cuenta la dependencia que muestra la actividad PK sobre la presencia de cationes, esta enzima ha sido utilizada como un potencial bioindicador de los niveles de cationes (K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}) en el órgano de estudio (Bar-Akiva et al., 1976; Lavon et al., 1988; Pulgar et al., 1996), con el fin de prevenir y controlar los desequilibrios nutricionales entre estos elementos.

Recientemente, Ruiz y colaboradores han examinado el efecto de la aplicación de K^+ y de Ca^{2+} sobre los niveles de los distintos cationes en hojas y frutos de plantas de pepino, y en hojas de tabaco, respectivamente. Además, en ambos trabajos han analizado a la actividad PK como posible indicador de las relaciones existentes entre los distintos cationes.

En el primero de los trabajos, Ruiz et al. (1999a) comprobaron que la máxima aplicación de K^+ al medio de cultivo (0.3 mg ml^{-1}) redujo, tanto en hojas como en frutos de pepino, las concentraciones de Mg^{2+} y Ca^{2+} . Estos resultados se reflejan claramente por la obtención en este tratamiento de las más bajas actividades

PK basal, y por las mayores diferencias existentes entre la actividad PK basal y las actividades PK estimuladas con los cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} , lo que indico la existencia en este tratamiento de un desequilibrio nutricional en relación a los cationes. El comportamiento contrario se presento cuando se aplico 0.15 mg ml^{-1} de K^+ , puesto que en este tratamiento se encontró la máxima actividad PK basal y las más bajas diferencias entre la actividad basal y las estimuladas por los distintos cationes, indicando un mejor balance nutricional entre los cationes bajo este tratamiento.

Con respecto al otro trabajo (Ruiz et al., 1999c), en el cual se estudia la influencia de la aplicación de Ca^{2+} sobre el nivel de los cationes y sobre la respuesta de la actividad PK en hojas de plantas de tabaco, estos autores encuentran que la máxima dosis de Ca^{2+} aplicada dio lugar a una disminución foliar de K^+ y Mg^{2+} , así como a una reducción de la actividad PK basal. La explicación a estos resultados, según los autores, se debería a una fuerte competición entre el Ca^{2+} y los cationes K^+ y Mg^{2+} , esenciales para la actividad PK, y posiblemente a la formación de complejos entre el Ca^{2+} y los sustratos de la PK, lo que haría disminuir la afinidad de estos por la enzima y por lo tanto su actividad. Además, bajo este tratamiento las diferencias entre la actividad PK basal y las actividades estimuladas con K^+ y Mg^{2+} fueron máximas, lo que indico un desequilibrio nutricional entre los cationes.

Finalmente, destacar que en este trabajo se demuestra que el Ca^{2+} , a elevadas dosis, muestra un efecto negativo sobre la actividad PK, y que esta enzima fue un buen indicador de los niveles de cationes, principalmente bajo sus formas inorgánicas o solubles.

II. Objetivos

Teniendo en cuenta lo que acabamos de describir en el apartado de antecedentes, los objetivos principales de este capítulo son los siguientes:

(i) estudiar los efectos individuales del B y del Ca sobre la distribución y concentración de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , y sobre la actividad PK tanto basal como estimulada por los distintos cationes en raíces y en hojas de plantas de tabaco.

(ii) evaluar a la actividad PK como posible indicador de las posibles variaciones sufridas por los cationes en raíces y en hojas, así como determinar si es la forma total o inorgánica de los cationes la que influye más decisivamente sobre esta actividad enzimática.

(iii) analizar e interpretar la aparición de posibles interacciones B-Ca sobre los distintos parámetros estudiados.

III. Material y métodos.

III.1. Diseño experimental.

(Ver Capítulo I)

III.2. Muestreo de las plantas.

(Ver Capítulo I)

III.3. Análisis de las plantas.

III.3.1. Extracción y ensayo de las actividades enzimáticas PK basal y estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} .

La actividad de las distintas formas de la PK fueron determinadas de acuerdo con el método de Bar-Akiva et al. (1976) modificado por Podestá y Plaxton (1991). Una cantidad (0.5 g) de material vegetal fresco fue homogenizado con 5-ml de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, que contenía glicerol al 50% (v/v) y 2-mercaptoetanol 10 mM. El homogenado fue centrifugado a 5000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante resultante fue de nuevo centrifugado a 15000 rpm durante 15 min, obteniéndose una solución clara o extracto enzimático a partir del cual se determinó la actividades enzimáticas. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-4°C.

La cuantificación de las proteínas en el extracto enzimático se realizaron siguiendo el método de Bradford (1976).

A un volumen de 100- μ l de extracto enzimático se le añadieron: 500- μ l de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 que contenía 0.25 mM de molibdato-sódico, 25 mM de PEP, y 5 mM ADP, y 200- μ l de agua bidestilada (Millipore RX-21). La mezcla de reacción fue incubada a 37°C durante 10 min, y transcurrido este tiempo la reacción enzimática fue parada por la adición de 500- μ l de 2,4-dinitrofenil-

hidrazina al 0.0125% (p/v) disueltos en una solución HCl 2 N, y 500- μ l de NaOH 2 N, con el fin de evitar las posibles variaciones de absorbancia que podrían ser alteradas por cambios en el pH de la mezcla de reacción. Después de una centrifugación a 5000 rpm durante 5 min, la absorbancia de la mezcla de reacción se midió a una longitud de onda de A_{510} , frente a una curva de ácido pirúvico (40-200 μ g/ml).

Para el ensayo de las actividades PK estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} se siguió la misma metodología que para la actividad PK basal, con la diferencia que en la mezcla de reacción se añadió para cada PK estimulada 100- μ l de K^+ en forma de KCl 50 mM, 100- μ l de Mg^{2+} en forma de $MgSO_4$ 50 mM, y 100- μ l de Ca^{2+} en forma de $CaCl_2$ 50 mM. Los procesos de incubación, centrifugación y medida de actividad fueron similares a los descritos para la actividad PK basal.

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco en el cual se eliminó el extracto enzimático, el ADP y el PEP, reemplazándose los volúmenes por el buffer Tris-HCl. La actividad PK en sus distintas formas se expresó como nmol pirúvico formado mg^{-1} proteína min^{-1} .

III.3.2. Extracción y cuantificación de las formas totales y disponibles de los iones K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} .

Para la determinación de las concentraciones totales de K, Mg y Ca, se tomó una cantidad de material seco y molido (0.15 g) que fue sometida a una mineralización con H_2SO_4 12N y H_2O_2 al 30% libre de P (Wolf, 1982). Del mineralizado resultante, y tras la adición de 20-ml de H_2O bidestilada (Millipore RX-21), se tomó un volumen determinado para determinar las concentraciones totales de Mg y Ca, mientras que el K se midió directamente en el mineralizado por

fotometría de llama (Lachica et al., 1973).

El Mg y Ca total fueron determinados por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977). El Ca puede formar compuestos difícilmente atomizables en la llama, pudiendo estar sujeta su determinación a errores por la formación de compuestos refractorios. La adición de lantano, usando una llama de aire-acetileno, subsana este inconveniente y permite una medida exacta del Ca (Pinta, 1973). Por lo tanto, a 0.1-ml del mineralizado se le añadió 10-ml de una solución de lantano al 0.003%, y el Mg y Ca fueron determinados como indicábamos anteriormente. Las concentraciones de K, Mg, y Ca total fueron expresadas como $mg\ g^{-1}$ p.s.

En cuanto a las formas disponibles o solubles de estos nutrientes fueron analizados a partir de una extracción acuosa de 0.2 g de material seco y molido en 10-ml de agua bidestilada (Millipore RX-21), y se cuantificaron de forma similar a la que acabamos de describir para sus formas totales. Las concentraciones de K, Mg, y Ca disponibles fueron expresadas como $mg\ g^{-1}$ p.s.

III.4. Análisis estadístico.

(Ver Capítulo I)

Tabla 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las concentraciones radiculares de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en sus formas totales y disponibles.

	Kt	Kd	Mgt	Mgd	Cat	Cad
B ₁	12.9	5.40	14.9	1.73	11.6	2.08
B ₂	12.4	5.50	15.0	1.85	16.6	2.27
B ₃	9.30	5.62	10.6	1.88	20.1	2.98
LSD	0.57	0.28	0.69	0.20	0.73	0.10
Ca ₁	9.31	5.44	10.5	1.85	12.0	1.63
Ca ₂	11.5	5.50	14.0	1.86	15.3	2.24
Ca ₃	13.8	5.58	16.4	1.75	21.0	3.46
LSD	0.57	0.28	0.69	0.20	0.73	0.10

Potasio total (Kt) y disponible (Kd), Magnesio total (Mgt) y disponible (Mgd), y Calcio total (Cat) y disponible (Cad) expresados en $mg\ g^{-1}$ p.s.

V. Resultados.

En raíces, y en relación al comportamiento del K en su forma total, indicar que como se muestra en la tabla 1a, incrementos en la aplicación de B produjo una disminución significativa de la concentración radicular de K total, presentándose la mínima concentración en B₃ ($F= 94.38$; $P < 0.001$) (Tabla 1a). Por el contrario, el efecto individual del Ca sobre el K total fue positivo, puesto que incrementos en la aplicación del primero al medio de cultivo conllevaron a un aumento gradual en la concentración radicular de K total, encontrándose la máxima concentración en Ca₃ ($F= 124.89$; $P < 0.001$) (Tabla 1a).

En relación al Mg en su forma total, destacar que los efectos individuales tanto del B como del Ca fueron similares a los que acabamos de explicar para el K total, ya que el B dio lugar a una disminución del Mg total radicular ($F= 108.24$; $P < 0.001$) mientras que el Ca aumento la concentración de este cation divalente ($F= 137.62$; $P < 0.001$).

La interacción BCa tanto para el K total ($F= 2.05$; $P > 0.05$) como para el Mg total ($F= 1.59$; $P > 0.05$) no fue significativa, lo que nos indica que prevalecieron principalmente los efectos

individuales sobre estos cationes (Tabla 1b y 1c).

Finalmente, ni los efectos individuales del B y del Ca (Tabla 1a) ni la interacción entre estos dos elementos (Tablas 1b y 1c), modificaron el comportamiento radicular homogéneo del K (B : $F= 1.13$, $P > 0.05$; Ca : $F= 0.49$, $P > 0.05$; BCa : $F= 3.61$, $P > 0.05$) y del Mg (B : $F= 1.34$, $P > 0.05$; Ca : $F= 0.65$, $P > 0.05$; BCa : $F= 1.15$, $P > 0.05$) en sus formas solubles.

En relación al otro cation divalente estudiado en nuestra experiencia, tanto el B como el Ca mostraron un efecto positivo sobre el Ca en su forma total ($F= 276.59$; $P < 0.001$ y $F= 318.23$; $P < 0.001$ respectivamente) (Tabla 1a) y en su forma soluble ($F= 180.02$; $P < 0.001$ y $F= 696.67$; $P < 0.001$ respectivamente) (Tabla 1a), presentándose las máximas concentraciones radiculares en los tratamientos B₃ y Ca₃ (Tabla 1a).

El efecto individual de ambos nutrientes predominó sobre el Ca total y soluble, puesto que para ninguno de estos parámetros la interacción BCa fue significativa (Ca total: $F= 1.28$, $P > 0.05$; Ca soluble: $F= 3.49$, $P > 0.05$) (Tabla 1b y 1c).

Tabla 1b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radicales de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en sus formas totales y disponibles: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Kt	Kd	Mgt	Mgd	Cat	Cad
Ca ₁ B ₁	10.1	5.73	11.9	1.64	7.38	1.27
B ₂	10.6	5.28	11.6	1.96	13.2	1.56
B ₃	7.25	5.32	7.87	1.95	15.6	2.05
Ca ₂ B ₁	13.3	5.41	15.9	1.76	10.9	1.98
B ₂	12.3	5.23	15.4	1.79	15.6	1.96
B ₃	9.01	5.85	10.8	2.02	19.4	2.78
Ca ₃ B ₁	15.4	5.08	17.0	1.78	16.6	2.99
B ₂	14.3	5.98	18.2	1.79	21.1	3.28
B ₃	11.7	5.69	13.1	1.69	25.4	4.10
LSD	1.22	0.96	1.20	0.39	1.26	0.17

Potasio total (Kt) y disponible (Kd), Magnesio total (Mgt) y disponible (Mgd), y Calcio total (Cat) y disponible (Cad) expresados en $mg\ g^{-1}$ p.s.

Tabla 1c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radicales de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en sus formas totales y disponibles: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Kt	Kd	Mgt	Mgd	Cat	Cad
B ₁ Ca ₁	10.1	5.73	11.9	1.64	7.38	1.27
Ca ₂	13.3	5.41	15.9	1.76	10.9	1.98
Ca ₃	15.4	5.08	17.0	1.78	16.6	2.99
B ₂ Ca ₁	10.6	5.28	11.6	1.96	13.2	1.56
Ca ₂	12.3	5.23	15.4	1.79	15.6	1.96
Ca ₃	14.3	5.98	18.2	1.79	21.1	3.28
B ₃ Ca ₁	7.25	5.32	7.87	1.95	15.6	2.05
Ca ₂	9.01	5.85	10.8	2.02	19.4	2.78
Ca ₃	11.7	5.69	13.1	1.69	25.4	4.10
LSD	1.22	0.96	1.20	0.39	1.26	0.17

Potasio total (Kt) y disponible (Kd), Magnesio total (Mgt) y disponible (Mgd), y Calcio total (Cat) y disponible (Cad) expresados en $mg\ g^{-1}$ p.s.

En cuanto a la actividad radicular de la PK basal, esta fue influenciada significativamente tanto por el B como por el Ca. El aumento de B supuso una disminución de esta actividad enzimática, presentandose la mínima actividad en B3 con una disminución del 37% respecto a las máximas actividades presentadas en B1 y B2 ($F= 703.68; P < 0.001$) (Fig. 1a).

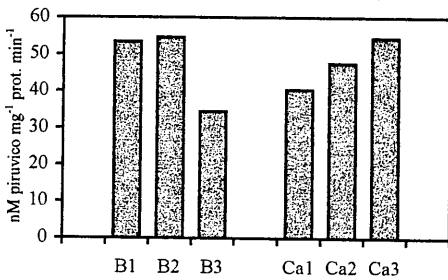


Figura 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad piruvato kinasa basal radicular (LSD= 1.20).

Por el contrario, el aumento de Ca dio lugar a un incremento gradual de la actividad PK basal, encontradonse la máxima actividad en Ca3, con un incremento del 35% respecto a la mínima actividad obtenida en el tratamiento Ca1 ($F= 276.54; P < 0.001$) (Fig. 1a).

Finalmente, y al igual que ocurría con los distintos cationes explicados, el Ca no influyo en el efecto individual del B sobre la actividad PK basal y viceversa, no presentandose ningun tipo de interacción ($F= 12.13; P > 0.05$) (Figs. 1b y 1c).

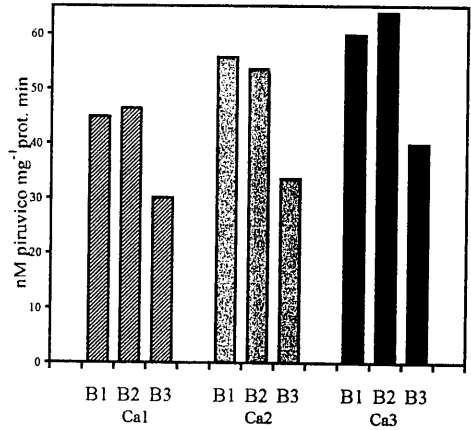


Figura 1b. Interacción B-Ca sobre la actividad piruvato kinasa basal radicular: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 3.09).

En las tablas 2a, 2b y 2c hemos representado en % los incrementos (+) o disminuciones (-) de la distintas actividades PK estimuladas con los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en relación a la actividad PK basal.

TABLA 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las actividades radiculares piruvato kinasa estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} .

	PK- K^+	PK- Mg^{2+}	PK- Ca^{2+}
B1	22.0	22.2	-45.2
B2	21.5	21.5	-45.6
B3	61.8	65.1	-14.3
LSD	0.79	0.93	0.98
Ca1	46.7	48.3	-28.1
Ca2	34.0	36.5	-33.0
Ca3	24.7	23.9	-44.0
LSD	0.79	0.93	0.98

Valores de las actividades enzimáticas PK estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , representadas como porcentajes de incremento o disminución (-) respecto a la actividad PK basal radicular (Fig. 1a).

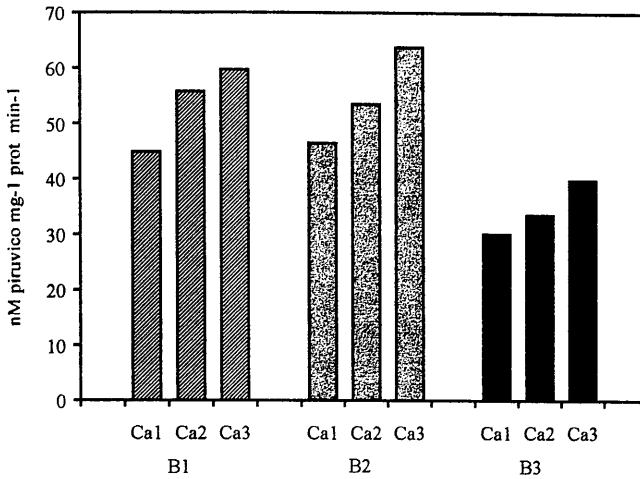


Figura 1c. Interacción B-Ca sobre la actividad piruvato kinasa basal radicular: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 3.09).

En cuanto a las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} , estas mostraron un comportamiento similar. Para ambas actividades enzimáticas los tratamientos de B supusieron un aumento en la actividad, presentándose por lo tanto los máximos incrementos en B3 (PKK⁺: F= 6909.34, P< 0.001; PKMg²⁺: F= 9494.53, P< 0.001) (Tabla 2a).

Por el contrario, los incrementos de las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} en relación a la actividad PK basal disminuyeron con los tratamientos de Ca, presentándose los mínimos incrementos en Ca3 (PKK⁺: F= 1575.38, P< 0.001; PKMg²⁺: F= 2243.02, P< 0.001) (Tabla 2a).

En las tablas 2b y 2c, podemos observar como los efectos individuales del B y del Ca que acamos de explicar sobre las actividades enzimáticas PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} predominaron, no presentándose por lo tanto ningún tipo de interacción (F= 18.89, P> 0.05 y F= 23.74, P> 0.05, respectivamente).

TABLA 2b. Interacción B-Ca sobre las actividades radiculares piruvato kinasa estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} : Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	PK- K^+	PK- Mg^{2+}	PK- Ca^{2+}
Ca ₁ B ₁	35.3	38.2	-35.7
B ₂	33.5	34.4	-36.4
B ₃	71.3	72.2	-12.0
Ca ₂ B ₁	20.3	19.7	-43.2
B ₂	21.2	21.5	-42.3
B ₃	60.5	68.4	-13.5
Ca ₃ B ₁	10.5	8.68	-56.7
B ₂	9.86	8.48	-57.8
B ₃	53.6	54.7	-17.4
LSD	2.37	3.27	1.71

Valores de las actividades enzimáticas PK estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , representadas como porcentajes de incremento o disminución (-) respecto a la actividad PK basal radicular (Fig. 1a).

En cuanto a la actividad PK estimulada con Ca^{2+} , su comportamiento fue similar a la PK basal, puesto que las mínimas disminuciones de esta actividad enzimática respecto a la actividad basal se presentaron en B3 (F= 2662.68; P< 0.001) (Tabla 1a). Por otro lado, el incremento en la aplicación de Ca aumento gradualmente

las disminuciones de la actividad PK estimulada con Ca^{2+} , presentandose la máxima disminución en Ca3 (F= 548.87; $P < 0.001$) (Tabla 2a).

Por último, en las tablas 2b y 2c podemos observar de nuevo como no se produce ninguna interacción BCa, puesto que en todo momento predominaron los efectos individuales del B y del Ca sobre la actividad PK estimulada con Ca^{2+} (F= 30.26; $P > 0.05$).

TABLA 2c. Interacción B-Ca sobre las actividades radiculares piruvato kinasa estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} : Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	PK- K^+	PK- Mg^{2+}	PK- Ca^{2+}
B ₁ Ca ₁	35.3	38.2	-35.7
Ca ₂	20.3	19.7	-43.2
Ca ₃	10.5	8.68	-56.7
B ₂ Ca ₁	33.5	34.4	-36.4
Ca ₂	21.2	21.5	-42.3
Ca ₃	9.86	8.48	-57.8
B ₃ Ca ₁	71.3	72.2	-12.0
Ca ₂	60.5	68.4	-13.5
Ca ₃	53.6	54.7	-17.4
LSD	2.37	3.27	1.71

Valores de las actividades enzimáticas PK estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , representadas como porcentajes de incremento o disminución (-) respecto a la actividad PK basal radicular (Fig. 1a).

En hojas, los cationes K y Mg, ambos en su forma total, presentaron el mismo comportamiento, puesto que los efectos individuales tanto del B como del Ca indujeron una disminución en la concentración foliar de K total (F= 23.41, $P < 0.001$ y F= 88.73, $P < 0.001$ respectivamente) (Tabla 3a) y Mg total (F= 20.22, $P < 0.001$ y F= 85.24, $P < 0.001$ respectivamente) (Tabla 3a), encontrandose las mínimas concentraciones foliares en B3 y Ca3. En cuanto a la forma soluble del K y del Mg, solamente destacar que el incremento en la aplicación de Ca dio lugar a una

disminución en la concentración foliar del Mg soluble (F= 15.81; $P < 0.001$), ya que el efecto individual del B sobre el Mg soluble (F= 1.32; $P > 0.05$), al igual que los efectos individuales del B y del Ca sobre el K soluble (F= 1.60, $P > 0.05$ y F= 0.15, $P > 0.05$ respectivamente) no fueron estadísticamente significativos (Tabla 3a).

En cuanto al comportamiento del Ca tanto en su forma total como soluble, este fue similar al explicado en las raíces (Tabla 1a). Los efectos individuales del B y del Ca se basaron en un incremento gradual en las concentraciones foliares de Ca total (F= 501.96, $P < 0.001$ y F= 838.12, $P < 0.001$ respectivamente) (Tabla 3a) y Ca soluble (F= 845.84, $P < 0.001$ y F= 1331.55, $P < 0.001$ respectivamente) (Tabla 3a), presentandose las máximas concentraciones en B3 y Ca3.

Uno de los aspectos que muestran en comun estos tres cationes en nuestra experiencia (Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+), es que para todos ellos prevalecieron o dominaron los efectos individuales del B y del Ca, y por lo tanto no se observo ningun tipo de influencia estadísticamente significativa de un elemento sobre otro o viceversa (Ca total: F= 8.88, $P > 0.05$; Ca soluble: F= 13.22, $P > 0.05$; Mg total: F= 0.59, $P > 0.05$; Mg soluble: F= 0.55, $P > 0.05$; K total: F= 0.19, $P > 0.05$; K soluble: F= 1.76, $P > 0.05$) (Tablas 3b y 3c).

Tabla 3a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las concentraciones foliares de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en sus formas totales y disponibles.

	Kt	Kd	Mgt	Mgd	Cat	Cad
B ₁	29.8	15.5	11.1	4.31	28.5	3.69
B ₂	29.0	15.9	9.98	4.00	37.8	5.31
B ₃	27.1	15.8	8.69	4.28	42.6	6.88
LSD	0.85	0.45	0.57	0.42	0.91	0.15
Ca ₁	31.6	15.8	12.1	4.47	26.5	3.25
Ca ₂	28.2	15.6	10.5	4.60	37.3	5.38
Ca ₃	26.1	15.7	7.2	3.52	45.0	7.26
LSD	0.85	0.45	0.57	0.42	0.91	0.15

Potasio total (Kt) y disponible (Kd), Magnesio total (Mgt) y disponible (Mgd), y Calcio total (Cat) y disponible (Cad) expresados en $mg\ g^{-1}$ p.s.

Tabla 3b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en sus formas totales y disponibles: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Kt	Kd	Mgt	Mgd	Cat	Cad
Ca ₁ B ₁	32.9	15.2	13.7	4.61	20.6	2.22
B ₂	31.9	15.9	12.2	4.19	26.7	3.26
B ₃	30.1	16.1	10.5	4.63	32.3	4.26
Ca ₂ B ₁	29.2	15.8	11.6	4.77	27.8	3.68
B ₂	28.7	15.7	10.6	4.59	40.3	5.23
B ₃	26.7	15.3	9.32	4.44	43.8	7.23
Ca ₃ B ₁	27.6	15.3	8.13	3.57	37.0	5.17
B ₂	26.3	15.9	7.14	3.22	46.4	7.43
B ₃	24.4	15.9	6.31	3.76	51.6	9.17
LSD	1.47	0.78	0.75	0.73	1.57	0.27

Potasio total (Kt) y disponible (Kd), Magnesio total (Mgt) y disponible (Mgd), y Calcio total (Cat) y disponible (Cad) expresados en $mg\ g^{-1}$ p.s.

Tabla 3c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en sus formas totales y disponibles: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Kt	Kd	Mgt	Mgd	Cat	Cad
B ₁ Ca ₁	32.9	15.2	13.7	4.61	20.6	2.22
Ca ₂	29.2	15.8	11.6	4.77	27.8	3.26
Ca ₃	27.6	15.3	8.13	3.57	37.0	4.26
B ₂ Ca ₁	31.9	15.9	12.2	4.19	26.7	3.68
Ca ₂	28.7	15.7	10.6	4.59	40.3	5.23
Ca ₃	26.3	15.9	7.14	3.22	46.4	7.23
B ₃ Ca ₁	30.1	16.1	10.5	4.63	32.3	5.17
Ca ₂	26.7	15.3	9.32	4.44	43.8	7.43
Ca ₃	24.4	15.9	6.31	3.76	51.6	9.17
LSD	1.47	0.78	0.75	0.73	1.57	0.27

Potasio total (Kt) y disponible (Kd), Magnesio total (Mgt) y disponible (Mgd), y Calcio total (Cat) y disponible (Cad) expresados en $mg\ g^{-1}$ p.s.

Al igual que en raíces, la actividad foliar de la PK basal disminuyó con el incremento en la aplicación de B ($F=39.87$; $P<0.001$), presentándose la mínima actividad en B3 con una disminución del 11% respecto a las máximas actividades de B1 y B2 (Fig. 2a).

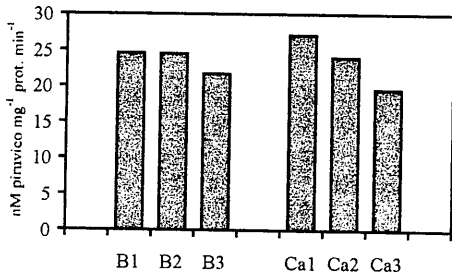


Figura 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la actividad piruvato kinasa basal foliar (LSD= 0.72).

Por otro lado, el Ca, y de forma similar al B, produjo una disminución gradual en la actividad foliar de la enzima PK basal ($F=222.43$; $P<0.001$), mostrándose la mínima actividad en Ca3 con una disminución del 33% en relación a la máxima actividad obtenida en Ca1 (Fig. 2a).

De nuevo, y como ocurría en el caso de los cationes, no se observó ningún tipo de interacción entre el B y Ca, puesto que dominaron los efectos individuales de ambos nutrientes ($F=1.56$; $P>0.05$) (Figs. 2b y 2c).

Como representábamos en raíces, en las tablas 4a, 4b y 4c hemos mostrado en % los incrementos (+) o disminuciones (-) de la distintas actividades PK estimuladas con los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en relación a la actividad PK basal.

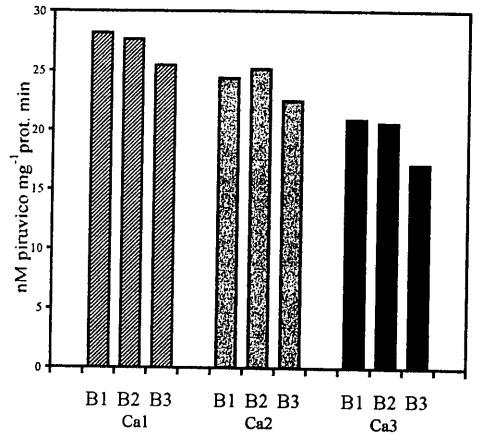


Figura 2b. Interacción B-Ca sobre la actividad piruvato kinasa basal foliar: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 1.25).

Las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} presentaron un comportamiento similar, puesto que los efectos individuales del B y del Ca para ambas actividades enzimáticas fueron positivos, aumentando las actividades enzimáticas y por lo tanto los incrementos respecto a la actividad PK basal en B3 y en Ca3 (PKK^+ : $F=23.96$, $P<0.001$ y $F=2044.62$, $P<0.001$ respectivamente; $PKMg^{2+}$: $F=87.71$, $P<0.001$ y $F=2206.76$, $P<0.001$ respectivamente) (Tabla 4a).

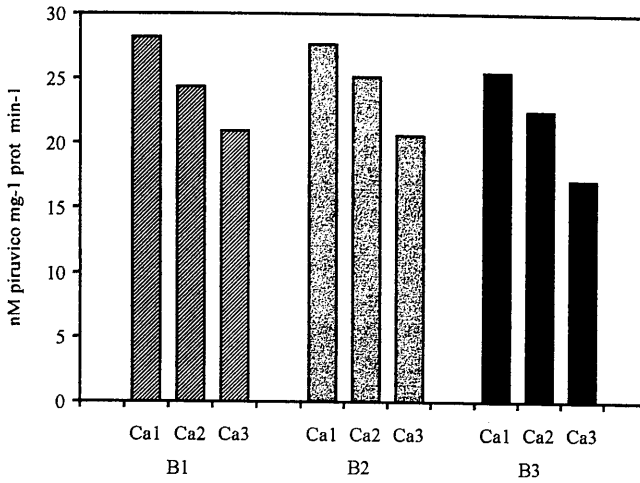


Figura 2c. Interacción B-Ca sobre la actividad piruvato kinasa basal foliar: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 1.25).

TABLA 4a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre las actividades foliares piruvato kinasa estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} .

	PK- K^+	PK- Mg^{2+}	PK- Ca^{2+}
B ₁	27.1	27.5	-36.2
B ₂	27.0	28.7	-36.0
B ₃	29.0	31.8	-29.1
LSD	0.69	1.16	1.02
Ca ₁	16.2	17.5	-45.5
Ca ₂	28.6	31.3	-37.6
Ca ₃	38.3	39.2	-18.2
LSD	0.69	1.16	1.02

Valores de las actividades enzimáticas PK estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , representadas como porcentajes de incremento o disminución (-) respecto a la actividad PK basal foliar (Fig. 2).

Al contrario de lo que hemos descrito hasta ahora, en las tablas 4b y 4c observamos interacciones entre el B y el Ca en las actividades PK estimuladas con K^+ ($F= 1532.26$; $P< 0.001$) y Mg^{2+} ($F= 1731.24$; $P< 0.001$).

Para ambas actividades enzimáticas, el Ca bajo la dosis Ca3 impidió que se produjera el efecto individual del B, puesto que en este caso el incremento en la aplicación de B supuso una disminución en los incrementos de las

actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} en relación a la actividad PK basal, presentándose por lo tanto los mínimos incrementos en la combinación Ca3B3 (Tabla 4b).

TABLA 4b. Interacción B-Ca sobre las actividades foliares piruvato kinasa estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} : Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	PK- K^+	PK- Mg^{2+}	PK- Ca^{2+}
Ca ₁ B ₁	12.1	9.07	-47.2
B ₂	13.2	10.1	-48.8
B ₃	23.3	33.2	-40.5
Ca ₂ B ₁	20.3	25.2	-39.8
B ₂	20.0	25.8	-39.1
B ₃	45.5	42.8	-33.8
Ca ₃ B ₁	48.9	48.4	-21.5
B ₂	47.9	50.0	-20.1
B ₃	18.3	19.3	-13.1
LSD	1.20	2.15	2.59

Valores de las actividades enzimáticas PK estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , representadas como porcentajes de incremento o disminución (-) respecto a la actividad PK basal foliar (Fig. 2a).

El efecto del B sobre el Ca fue similar al que acabamos de describir, ya que bajo la dosis B3 el aumento en la aplicación de Ca dio lugar a disminución en las actividades enzimáticas PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} , o lo que es lo mismo, se produjo una disminución en los incrementos respecto a la actividad PK basal, encontrándose las mínimas actividades y por lo tanto los mínimos incrementos en B3Ca3 (Tabla 4c).

de estos nutrientes.

TABLA 4c. Interacción B-Ca sobre las actividades foliares piruvato kinasa estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} : Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	PK- K^+	PK- Mg^{2+}	PK- Ca^{2+}
B ₁ Ca ₁	12.1	9.07	-47.2
Ca ₂	20.3	25.2	-39.8
Ca ₃	48.9	48.4	-21.5
B ₂ Ca ₁	13.2	10.1	-48.8
Ca ₂	20.0	25.8	-39.1
Ca ₃	47.9	50.0	-20.1
B ₃ Ca ₁	23.3	33.2	-40.5
Ca ₂	45.5	42.8	-33.8
Ca ₃	18.3	19.3	-13.1
LSD	1.20	2.15	2.59

Valores de las actividades enzimáticas PK estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , representadas como porcentajes de incremento o disminución (-) respecto a la actividad PK basal foliar (Fig. 2a).

Finalmente, la actividad foliar PK estimulada con Ca^{2+} mostro un comportamiento similar a la PK basal. Tanto el efecto individual del B ($F=125.81$, $P<0.001$) como el del Ca ($F=1534.27$, $P<0.001$) se basaron en una reducción de las disminuciones de esta actividad respecto a la actividad PK basal, presentandose por lo tanto las máximas actividades PK estimulada con Ca^{2+} en B3 y Ca3 (Tabla 4a). Por último, no se produjo ninguna interacción entre el B y el Ca ($F=2.59$; $P>0.05$), reflejandose claramente en este caso y en las tablas 4b y 4c el dominio de los efectos individuales

V. Discusión.

Como indicábamos en la introducción de este capítulo, son muy pocos los trabajos que han estudiado las relaciones existentes entre el B y los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , siendo la relación B-Ca en la que más se han centrado la mayoría de estos trabajos. Además, si a la poca información disponible en la literatura, le añadimos que existen bastantes contradicciones entre las conclusiones de estos trabajos, esto hace que el estudio de este tipo de relaciones sea bastante complicado. En nuestra experiencia, el B afecta de dos maneras dependiendo del cation en estudio. En primer lugar, el B influye de forma negativa sobre las concentraciones radiculares y foliares de los cationes K y Mg total, presentandose las mínimas concentraciones en B3 (Tablas 1a y 3a). Por el contrario, un incremento en la aplicación al medio de cultivo de B aumenta las concentraciones radiculares y foliares de Ca total, encontrandose las máximas concentraciones en B3 (Tablas 1a y 3a). Teniendo en cuenta estos resultados, podemos indicar que un aumento en la aplicación de B conduce a una disminución en la absorción de los iones K^+ y Mg^{2+} , mientras que se favorece la entrada y translocación hacia la parte aérea del Ca^{2+} .

Bowen (1981), trabajando en caña de azúcar, observo la existencia de una relación negativa entre el B y el Mg^{2+} , y por el contrario, una relación positiva entre el B y el Ca^{2+} . Efectivamente, la mayoría de los estudios recientes que tratan la relación B-Ca, indican que un aumento de la concentración de B en la solución nutritiva favorece tanto la absorción como la translocación de Ca^{2+} hacia la parte aérea (Goldbach et al., 1991; Ganmore-Neumann y Davidov, 1993; Bonilla et al., 1995; Mühling et al., 1998). Este efecto del

B incrementando la absorción del Ca^{2+} que se produce en nuestra experiencia principalmente en B3, podría explicar la acción negativa del tratamiento B3 sobre la concentración radicular y foliar del K^+ y del Mg^{2+} , dada la relación antagonica existente entre estos cationes con el Ca^{2+} (Miyasaka y Grunes, 1990; Fenn et al., 1994; Sims et al., 1995; Song y Fujiyama, 1996). Sin embargo y como veremos a continuación, el posible efecto antagonico entre el Ca^{2+} y los iones K^+ y Mg^{2+} a nivel de absorción no se produce en nuestra experiencia, lo que nos sugiere un efecto directo del B, aplicado a elevadas concentraciones, sobre la absorción de los cationes K^+ y Mg^{2+} . Este efecto directo del B conllevaría a una disminución, tanto en la concentración radicular como foliar, del K y Mg total bajo la dosis B3.

Al contrario que el B, un aumento en la aplicación de Ca al medio de cultivo conlleva a un incremento gradual en las concentraciones radiculares de K y Mg en su formas totales (Tabla 1a), presentandose el efecto inverso en las hojas puesto que las mínimas concentraciones foliares de estos cationes se obtuvieron en Ca3. Estos resultados nos sugieren que el Ca actuaría favoreciendo la absorción del K^+ y del Mg^{2+} , e impidiendo posteriormente su translocación hacia la parte aérea.

La relación existente en nuestra experiencia entre el Ca^{2+} y el K^+ se podría explicar a través del "efecto viets", por el cual el Ca^{2+} favorece la absorción de cationes monovalentes tales como el NH y el K^+ (Viets, 1944; Sung y Lo, 1990; Fenn et al., 1994). Las interacciones que se producen entre iones con propiedades químicas similares puede aparecer: (i) a nivel de absorción, (ii) a nivel de transporte por el xilema o por el floema, y (iii) a nivel de función en los distintos sitios activos (Robson y Pitman, 1983). En nuestra experiencia, parece ser que la interacción entre el Ca^{2+} y los iones K^+ y Mg^{2+} se

produce a nivel de translocación hacia la parte aérea, lo que explicaría la acumulación radicular de estos cationes en el tratamiento Ca3 (Tabla 1a), y por otro lado las mínimas concentraciones foliares de K^+ y Mg^{2+} en este mismo tratamiento.

En relación al Ca^{2+} , y como se ha descrito en varios trabajos (Ganmore-Neumann y Davidov, 1993; Bharti et al., 1996; Ruiz y Romero, 1998, Ruiz et al., 1999b), un aumento en la aplicación externa de este elemento dio lugar a un aumento en la absorción y translocación de Ca^{2+} , puesto que las concentraciones de Ca total en hojas fueron superiores a las de raíces, presentándose en ambos órganos las máximas concentraciones en Ca3 (Tablas 1a y 3a).

Todas estas relaciones que hemos descrito e intentado explicar no se reflejan en las formas solubles de los iones K^+ y Mg^{2+} , puesto que ambas tanto en raíces como en hojas permanecen constantes independientemente del tratamiento de B o Ca aplicado (Tablas 1a y 3a). Solamente el Ca en su forma soluble muestra de forma similar al Ca total los efectos del B y del Ca tanto en raíces como en hojas (Tablas 1a y 3a).

Finalmente, y como se puede observar en las tablas 1b, 1c, 3b y 3c, los efectos individuales del B y del Ca que acabamos de describir fueron los predominantes desde un punto de vista estadístico, no presentándose por lo tanto ningún tipo de influencia del Ca sobre el B y viceversa.

La enzima PK cataliza la síntesis de piruvato y ATP a partir del PEP y del ADP (Podestá y Plaxton, 1991). El papel de esta enzima es esencial, puesto que es el primer sitio de control del proceso de la glicolisis, proceso determinante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Plaxton et al., 1993; Huppe y Turpin, 1994; Podestá y Plaxton, 1994a,b).

Estudios sobre la cinética de esta enzima revelan que su activación depende de los niveles de PEP, ADP, y de la presencia de cationes como el K^+ , y principalmente el Mg^{2+} (Podestá y Plaxton, 1991, 1992). Por lo tanto, y teniendo en cuenta la dependencia que muestra la actividad PK sobre la presencia de cationes, esta enzima ha sido utilizada como un potencial bioindicador de los niveles de cationes (K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}) en el órgano en estudio (Bar-Akiva et al., 1976; Lavon et al., 1988; Pulgar et al., 1996; Ruiz et al., 1999a,c).

Como indicábamos, uno de los objetivos de este capítulo era determinar si en nuestra experiencia la actividad PK refleja el nivel de cationes en raíces y en hojas, y si esta es influenciada por los tratamientos de B y Ca.

En raíces, la aplicación de B conlleva a una disminución de la actividad PK basal en B3 (Fig. 1a), presentándose en este tratamiento la mínima actividad. En relación al efecto del Ca, este fue contrario al del B, puesto que el aumento en la aplicación del primero al medio de cultivo supuso un incremento en la actividad PK basal (Fig. 1a), encontrándose la máxima actividad en Ca3 y la mínima en Ca1.

Destacar, que tanto en el tratamiento B3 como en el tratamiento Ca1 se presentaron las mínimas concentraciones radiculares de K y Mg en su forma total (Tabla 1a), lo que podría explicar el comportamiento de la PK basal dada la dependencia de esta enzima a la presencia de estos dos cationes (Podestá y Plaxton, 1991, 1992). La relación en nuestra experiencia entre la actividad radicular PK basal y las concentraciones radiculares de K y Mg en sus formas totales confirma la cerrada relación existente entre estos parámetros (K total-PK basal, $r=0.88$ ***; Mg total-PK basal, $r=0.93$ ***).

En la tabla 2a se muestra los

efectos individuales tanto del B como del Ca sobre los incrementos (+) o disminuciones (-), expresados en %, de las actividades PK estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} respecto a la actividad PK basal. Como podemos observar el comportamiento de las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} fueron similares (Tabla 2a), puesto que ambas mostraron los máximos incrementos respecto a la actividad PK basal en los tratamientos B3 y Ca1, siendo en estos donde se presentaron las mínimas concentraciones radiculares de K y Mg total (Tabla 1a). Por el contrario, en los tratamientos B1, B2 y Ca3, con las máximas concentraciones radiculares de K y Mg total (Tabla 1a), los incrementos de las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} fueron mínimos respecto a la actividad PK basal, lo que nos sugiere que en estos tratamientos los niveles radiculares de K^+ y Mg^{2+} fueron los más óptimos (Bar-Akiva et al., 1979; Lavon et al., 1988; Pulgar et al., 1996; Ruiz et al., 1999a,c).

En cuanto a la actividad PK estimulada con Ca^{2+} , independientemente del tratamiento de B o de Ca, mostro actividades más bajas que la actividad PK basal, lo que se refleja en la tabla 2a como disminuciones en % con signo negativo. Las máximas disminuciones respecto a la actividad PK basal en raíces se presentaron en los tratamientos B1 y B2, que fueron aquellos que presentaron las máximas actividades PK basal (Fig 1a) y las máximas concentraciones radiculares de K y Mg total (Tabla 1a). En relación al efecto individual del Ca sobre la respuesta de la actividad PK estimulada con Ca^{2+} ocurrió algo similar a lo que acabamos de explicar, ya que las máximas disminuciones se presentaron en Ca3, que fue el tratamiento con la máxima actividad PK basal (Fig. 1a) y con las máximas concentraciones radiculares de K y Mg total (Tabla 1a).

La máxima inhibición de la actividad PK estimulada con Ca^{2+} respecto a la actividad PK basal en los tratamientos B1 y B2, se debe posiblemente a la baja concentración de Ca^{2+} existente en estos tratamientos, lo que conllevaría a: (i) una estimulación de la actividad PK basal en estos tratamientos, como así ocurre (Fig. 1a), puesto que se ha comprobado que el Ca a elevadas concentraciones se une formando complejos con los sustratos de la PK (Ca-PEP y Ca-ADP) impidiendo así su utilización por esta (Podestá y Plaxton, 1992), y (ii) a una fuerte inhibición de la actividad PK tras la adición al medio de reacción de Ca^{2+} . Por el contrario, en el tratamiento B3 y debido a la existencia de concentraciones radiculares de Ca total superiores a las de B1 y B2 (Tabla 1a), la actividad PK basal fue inferior (Fig. 1a) y por lo tanto también la inhibición por Ca^{2+} .

Respecto al efecto individual del Ca, como indicábamos la máxima disminución de la actividad PK estimulada con Ca^{2+} se produjo en Ca3 (Tabla 2a), y sin embargo este tratamiento fue el que presentó las máximas concentraciones radiculares Ca total (Tabla 1a). Por lo tanto, y teniendo en cuenta lo que acabamos de explicar en el caso del B, en el tratamiento Ca3 debería presentarse la mínima disminución de la actividad PK estimulada con Ca^{2+} . Posiblemente, el hecho de que en Ca3 se presenten las máximas concentraciones radiculares de K y Mg total (Tabla 1a) sea más determinante para la actividad PK basal que la presencia de Ca^{2+} , lo que explicaría de esta manera la máxima disminución de la actividad PK al añadir Ca^{2+} al medio de reacción en el tratamiento Ca3.

En hojas, al igual que en raíces, la actividad PK basal refleja claramente la relación entre los cationes K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} . Las máximas actividades PK basal en hojas se presentaron en los tratamientos B1 y Ca1 (Fig. 2a), que fueron aquellos en los

cuales se encontraron las máximas concentraciones foliares de K y Mg total (Tabla 3a) y las mínimas de Ca total (Tabla 3a). Las relaciones obtenidas entre la actividad foliar PK basal y las distintas concentraciones foliares de los cationes confirman la influencia positiva del K y del Mg (Podestá y Plaxton, 1991, 1992; Day y Copeland, 1993), así como la influencia negativa del Ca sobre esta actividad enzimática (Ruiz et al., 1999a,c) (PK basal-K total, $r = 0.84$ ***; PK basal-Mg total, $r = 0.87$ ***; PK basal-Ca total, $r = -0.83$ ***). Finalmente, y en relación a la actividad PK basal, destacar que tanto el efecto individual del B como el del Ca influyeron negativamente sobre esta actividad enzimática, presentándose las mínimas actividades en B3 y Ca3 (Fig. 2a). Este hecho se debe posiblemente a que al incrementar la aplicación al medio de cultivo de B y de Ca, las concentraciones foliares de Ca total aumentaron mientras que disminuyeron las de K y Mg total (Tabla 3a).

En relación a las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} , ambas se comportaron de forma similar, es decir contrariamente a la respuesta de la PK basal. Tanto el efecto individual del B como del Ca fue positivo, presentándose los máximos incrementos respecto a la actividad basal en B3 y Ca3 (Tabla 4a). Estos tratamientos (B3 y Ca3) fueron los que mostraron las mínimas concentraciones foliares de K y Mg total (Tabla 3a), por lo que la aplicación de estos cationes al medio de reacción enzimático provoca la estimulación de la actividad PK, explicándose de esta manera los resultados obtenidos. Al contrario que en los tratamientos B3 y Ca3, los tratamientos B1 y Ca1 dieron lugar a los mínimos incrementos de las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} , lo que nos sugiere que en hojas estos tratamientos

fueron los más óptimos en relación al balance entre los distintos cationes (Bar-Akiva et al., 1979; Lavon et al., 1988; Pulgar et al., 1996; Ruiz et al., 1999a,c).

La única interacción que se presentó en esta experiencia entre el B y el Ca fue en las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} (Tablas 4b y 4c). El Ca influyó en el efecto individual del B no reflejándose este cuando el primero fue aplicado bajo la dosis 5 mM (Ca3), puesto que el incremento en la aplicación de B supuso una disminución de las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} , disminuyéndose por lo tanto los incrementos de estas actividades respecto a la actividad basal (Tabla 4b). En cuanto a la influencia del B sobre el efecto individual Ca fue exactamente igual a la que acabamos de describir (Tabla 4c), ya que el incremento en la aplicación de Ca bajo la dosis B3 produjo una disminución de los incrementos de ambas actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} .

Para intentar explicar porque se produce la interacción entre el B y el Ca hay que tener en cuenta los siguientes aspectos: (i) en nuestra experiencia, y como se ha descrito en otros trabajos (Ganmore-Neumann y Davidov, 1993; Bharti et al., 1996; Ruiz et al., 1998; Ruiz y Romero, 1998; Ruiz et al., 1999b), el Ca absorbido fue mayoritariamente translocado hacia la parte aérea, presentándose por lo tanto en hojas concentraciones de este cation superiores a las de raíces, y (ii) que las máximas concentraciones de Ca total en hojas se presentaron en B3, debido al sinergismo que muestra el B con el Ca en nuestra experiencia (Tabla 3a), y en Ca3 debido al incremento en la aplicación de este nutriente en el medio de cultivo (Tabla 3a). La acción conjunta de estos dos aspectos hace que en la combinación B3Ca3 se presenten la máximas concentraciones de

Ca total (Tablas 3b y 3c). Por lo tanto, la presencia elevada de Ca en esta combinación posiblemente forme complejos con los sustratos de la actividad PK (Ca-PEP y Ca-ADP), lo que haría disminuir la actividad enzimática aunque se le añadiera los cationes K^+ y Mg^{2+} al medio de reacción enzimático (Podestá y Plaxton, 1992; Ruiz et al., 1999a,c), explicándose así la aparición de la interacción B-Ca. En raíces, no se produce la interacción B-Ca en estos parámetros debido a que la mayoría del Ca^{2+} es translocado hacia las hojas en nuestra experiencia, presentándose principalmente en este órgano los efectos de este nutriente.

Finalmente, la actividad PK estimulada con Ca^{2+} en hojas (Tabla 4a), al igual que en raíces, mostro un comportamiento similar a la actividad PK basal. Las máximas disminuciones de la actividad PK estimulada con Ca^{2+} respecto a la actividad basal se presentaron en B1 y Ca1 (Tabla 4a), que coincidieron con los tratamientos con mayores concentraciones foliares de K y Mg total (Tabla 3a) y las mínimas de Ca total (Tabla 3a). Este hecho podría explicar que la adición de Ca^{2+} al medio de reacción produjera una mayor inhibición de la actividad PK. Por el contrario, en los tratamientos B3 y Ca3, al presentar las máximas concentraciones foliares de Ca total (Tabla 3a), la adición de Ca^{2+} al medio de reacción de la PK no suponga una inhibición de la actividad enzimática tan elevada como en los tratamientos B1 y Ca1.

VI. Conclusiones.

Primera: En nuestra experiencia, la aplicación externa del B influye claramente de dos maneras sobre los niveles de los diferentes cationes en raíces y en hojas. En primer lugar podríamos definir como de antagonismo la relación entre la aplicación de B y los niveles de K^+

y Mg^{2+} , puesto que el incremento en la aplicación de este micronutriente (B3) dio lugar a una reducción a nivel de absorción de estos cationes, lo que conlleva a una disminución en sus concentraciones totales tanto en raíces como en hojas. Por el contrario, la relación entre la aplicación de B y el Ca en la planta fue de sinergismo, puesto que el incremento de B dio lugar a un aumento en las concentraciones radiculares y foliares de Ca total.

Segunda: La respuesta de los cationes K^+ y Mg^{2+} ante la aplicación al medio de cultivo de dosis crecientes de Ca vario en relación al órgano estudiado. En raíces, el aumento en la aplicación de Ca supuso un aumento en las concentraciones de K y Mg total, mientras que en hojas las mínimas concentraciones de estos cationes se presentaron en Ca3. Estos resultados nos indican que la interacción entre el Ca y los iones K^+ y Mg^{2+} se produjo en nuestra experiencia a nivel de translocación. Por otro lado y como era de esperar el aumento en la aplicación de Ca dio lugar a un incremento en la absorción y translocación de este nutriente hacia la parte aérea.

Tercera: En cuanto a las formas solubles de los cationes, indicar que solamente la forma soluble del Ca, tanto en raíces como en hojas, reflejo la acción de los distintos tratamientos aplicados.

Cuarta: La actividad PK basal reflejo claramente el balance entre los distintos cationes estudiados, mostrando una relación directamente proporcional con las concentraciones totales de K y Mg en raíces y en hojas, e inversamente proporcional con las de Ca solamente en hojas.

Quinta: Las actividades PK estimuladas con K^+ y Mg^{2+} mostraron un comportamiento contrario a la actividad PK basal, aumentando la estimulación de esta enzima en aquellos tratamientos con bajos niveles de K y Mg total. En hojas, ni el efecto individual del B ni el del Ca se

produjo cuando se aplicaron los distintos tratamientos de B y de Ca con Ca3 y B3, respectivamente. Este hecho se podría deber a que en la combinación B3Ca3 se presentan las máximas concentraciones foliares de Ca total, lo que podría interferir impidiendo la estimulación de la PK con los cationes K^+ y Mg^{2+} .

Finalmente la actividad PK estimulada con Ca^{2+} mostro valores inferiores a la actividad PK basal, lo que nos sugiere al Ca como posible inhibidor de esta actividad enzimática.

En definitiva, podemos definir a las distintas actividades PK como buenas indicadoras de los distintos niveles de cationes tanto en raíces como en hojas. En nuestra experiencia los resultados de las actividades PK estimuladas con K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} indican en raíces y en hojas que en los tratamientos B3 y Ca1, y B3 y Ca3 respectivamente, las plantas mostraron un mayor desbalance nutricional respecto a los niveles de estos cationes.

Sexta: Por último, indicar que el efecto del B sobre actividad PK no fue directo sino que se produjo a través de la influencia de la aplicación de este micronutriente sobre el contenido de los distintos cationes en raíces y hojas. Por el contrario, el Ca si afecto directamente a la actividad PK principalmente en hojas.

VII. Referencias.

- Bar-Akiva A, Sagiv J, Hasday D. 1976.** Effect of mineral deficiencies on pyruvate kinase activity of citrus leaves. Proc. 4th Inter. Colloq. Plant Nutri. 1: 109-118.
- Bharti N, Singh RP, Sinha SK. 1996.** Effect of calcium chloride on heavy metal induced alteration in growth and nitrate assimilation of *Sesamum indicum* seedlings. Phytochem. 41: 105-109.
- Baysdorfer C, Bassham JA. 1984.** Spinach pyruvate kinase isoforms. Partial purification and regulatory properties. Plant Physiol. 74: 374-379.
- Bonilla I, Bolaños L, Mateo P. 1995.** Interaction of boron and calcium in the cyanobacteria *Anabanea* and *Synechococcus*. Physiol. Plant. 94: 31-36.
- Bowen JE. 1981.** Micro-element nutrition of sugar-cane. II. Interaction in micro-element accumulation. Trop. Agric. 58: 215-220.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Bush DS. 1995.** Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 95-122.
- Cakmak I, Hengeler C, Marschner H. 1994a.** Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. J. Exp. Bot. 45: 1245-1250.
- Cakmak I, Hengeler C, Marschner H. 1994b.** Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. J. Exp. Bot. 45: 1251-1257.
- Cakmak I. 1994.** Activity of ascorbate-dependent H_2O_2 -scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium- and potassium-deficient leaves, but not in phosphorus-deficient leaves. J. Exp. Bot. 45: 1259-1266.
- Cramer GR, Epstein E, Laüchli A. 1991.** Effects of sodium, potassium and calcium on salt-stressed barley. II. Element analysis. Physiol. Plant. 81: 197-202.
- Day DA, Copeland L. 1993.** Respiración. In: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcon-Bieto J, Talon M. eds., McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Dibb DW, Thompson WRJr. 1985.** Interaction of potassium with other nutrients. In: Potassium in agriculture. Mudson RD. ed., American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Fairley-Grenot KA, Assmann SM. 1992.** Permeation of Ca^{2+} through K^+ channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. J. Membr. Biol. 128: 103-113.
- Fenn CH, Taylor RM, Burks CM. 1994.** Calcium stimulation of ammonium absorption and growth by beet. Agron. J. 86: 916-920.
- Ganmore-Neumann R, Davidov S. 1993.** Uptake and distribution of calcium in rose plantlets as affected by calcium and boron concentration in culture solution. Plant Soil 155/156: 151-154.

- Geigenberger P, Stitt M. 1991.** Regulation of carbon partitioning between sucrose and nitrogen assimilation in cotyledons of germinating *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* 185: 563-568.
- Goldbach HE, Blaser-Grill J, Lindermann N, Porzelt M, Hörrmann C, Lupp B, Gessner B. 1991.** Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic process. In: Current topics in plant biochemistry and physiology. Vol. 10. Randall DD, Blevins DG, Miles D. eds., University of Missouri-Columbia, Columbia, MO.
- Hille B. 1992.** Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, MA., Sinauer Assoc.
- Hocking PJ, Pate JS. 1977.** Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. *Ann. Bot.* 41: 1259-1278.
- Huppe HC, Turpin DH. 1994.** Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 577-607.
- Lachica M, Aguilar A, Yañez J. 1973.** Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidin. *Ann. Edaf. Agrobiol.* 32: 1033-1047.
- Lavon R, Salomon R, Goldschmidt E. 1988.** Pyruvate kinase activity of citrus leaves as affected by K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} deficiencies. *Contr. Agr. Res. Org. The Volcani Center, Israel*, 2270-E.
- Lin M, Turpin DH, Plaxton WC. 1989.** Pyruvate kinase isoenzymes from the green alga *Selenastrum minutum*. II. Kinetic and regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 269: 228-238.
- Marschner H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Marschner H, Kirkby EA, Cakmak I. 1996.** Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J. Exp. Bot.* 47: 1255-1263.
- Mozafar A. 1989.** Boron effect on mineral nutrients of maize. *Agron. J.* 81: 285-290.
- Mühling KH, Wimmer M, Goldbach HE. 1998.** Apoplastic and membrane-associated Ca^{2+} in leaves and root as affected by boron deficiency. *Physiol. Plant.* 102: 179-184.
- Miyasaka SC, Grunes DL. 1990.** Root temperature and calcium level effects on winter wheat forage: II. Nutrient composition and tetany potential. *Agron. J.* 82: 243-249.
- Plaxton WC, Sangwan RS, Singh N, Gauthier DA, Turpin DH. 1993.** Phosphoenolpyruvate metabolism of developing oil seeds. In: Seed oils for the future. Champaign, IL. ed., AOCS Press.
- Podestá FE, Plaxton WC. 1991.** Kinetic and regulatory properties of cytosolic pyruvate kinase from germinating castor beans. *Biochem. J.* 279: 495-501.
- Podestá FE, Plaxton WC. 1992.** Plant cytosolic pyruvate kinase: A kinetic study. *Biochem. Biophys. Acta* 1160: 213-220.

- Podestá FE, Plaxton WC. 1994a.** Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. I. Developmental profiles for the activity, concentration, and molecular structure of the pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinases, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta* 194: 374-380.
- Podestá FE, Plaxton WC. 1994b.** Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. II. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta* 194: 381-387.
- Pinta M. 1973.** Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique. *Oleagineux*. 28: 87-92.
- Pulgar G, Belakbir A, Villora G, Moreno D, Romero L. 1996.** Pyruvate kinase activity as bioindicator of cations in grafted watermelon plants. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 27: 1027-1046.
- Robson AD, Pitman MG. 1983.** Interactions between nutrients in higher plants. In: *Encyclopedia of plant physiology*. Vol. 15a. Läuchli A, Bieleski RL. eds., Springer-Verlag, Berlin.
- Ruiz JM, Romero L. 1998.** Ca impact on P and its main bioindicators. Response in the roots and leaves of *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Nutr.* 21: 2273-2285.
- Ruiz JM, Moreno DA, Romero L. 1999a.** Pyruvate Kinase Activity as an Indicator of the Level of Cations (K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+}) in Leaves and Fruits of the Cucumber: The Role of Potassium Fertilization. *J. Agricul. Food Chem.* 47: 845-849.
- Ruiz JM, Rivero RM, Garcia PC, Baghour M, Romero, R. 1999b.** Role of $CaCl_2$ in nitrate assimilation in leaves and roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Sci.* En prensa.
- Ruiz JM, López-Cantarero I, Romero L. 1999c.** Relationship between Ca^{2+} and glycolysis enzymes pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxylase. Can the activity of pyruvate kinase be considered a bioindicator of the foliar levels of cations? *Can. J. Bot.* (En consideración).
- Schroeder JL, Hagiwara S. 1990.** Repetitive increases in cytosolic Ca^{2+} of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca^{2+} permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9305-9309.
- Schaller KA, Plaxton WC, Turpin DH. 1990.** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green alga *Selenastrum minutum*: properties associated with the replenishment of tricarboxylic acid cycle intermediates during ammonium assimilation. *Plant Physiol.* 93: 1303-1311.
- Sims JL, Grove JH, Schlotzhauer WS. 1995.** Soluble calcium fertilizer effects on early growth and nutrition of burley tobacco. *J. Plant Nutr.* 18: 911-921.
- Singh V, Singh SP. 1984.** Effect of applied boron on nutrients and uptake by barley crop. *Curr. Agric.* 8: 86-90.

Song JQ, Fujiyama H. 1996. Difference in response of rice and tomato subjected to sodium salinization to the addition of calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 42: 503-510.

Sonneveld C, Mook E. 1983. Lettuce tipburn as related to the cation contents of different plant parts. *Plant Soil* 75: 29-40.

Sung FJM, Lo WS. 1990. Growth responses of rice in ammonium based nutrient solution with variable calcium supply. *Plant Soil* 125: 239-244.

Taylor RM, Fenn LB, Pety C. 1985. The influence of calcium on growth of selected vegetable species in the presence of ammonium-nitrogen. *J. Plant Nutr.* 8: 1013-1023.

Turpin DH, Botha FC, Smith RG, Feil R, Horsey A, Vanlerberghe GC. 1990. Regulation of carbon partitioning to respiration during dark ammonium assimilation in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* 96: 166-175.

Van Quy L, Foyer C, Champigny ML. 1991. Effect of light and NO on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol.* 97: 1476-1482.

Vanlerberghe GC, Schuller KA, Smith RG, Feil R, Plaxton WC, Turpin DH. 1990. Relationship between NH assimilation rate and in vivo phosphoenolpyruvate carboxylase activity: regulation of anaplerotic carbon flow in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* 94: 284-290.

Viets FGJr. 1944. Calcium and other polyvalent cations as accelerators of ion accumulation by excised barley roots. *Plant Physiol.* 3: 466-480.

Wolf B. 1982. A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 13: 1035-1059.

Yamauchi T., Hara T, Sonoda Y. 1986. Distribution of calcium and boron in the pectin fraction of tomato leaf cell wall. *Plant Cell Physiol.* 27: 729-732.

CAPÍTULO VI. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE B Y Ca SOBRE LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA PRODUCCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA BIOMASA EN PLANTAS DE TABACO

I. Introducción

I.1. Nutrición vegetal, biomasa y su distribución en la planta.

I.1.1. Generalidades.

I.1.2. Factores nutricionales que afectan a la producción de biomasa y su distribución en plantas de tabaco.

II. Objetivos.

III. Material y métodos

III.1. Diseño experimental.

III.2. Muestreo de las plantas.

III.3. Análisis de las plantas.

III.4. Análisis estadístico.

IV. Resultados

IV.1. Producción de biomasa y su distribución en plantas de tabaco.

IV.2. Factores determinantes en la producción de biomasa.

V. Discusión

V.1. Producción de biomasa y sus distribución en plantas de tabaco.

VI. Conclusiones

VII. Referencias

I. Introducción.

I.1. Nutrición vegetal, biomasa y su distribución en la planta.

I.1.1. Generalidades.

La distribución de la materia seca entre los distintos órganos de la planta, es una de las variables claves que afectan a la supervivencia, competitividad y mejora en la producción de las plantas individuales. Principalmente, el incremento en la producción de los distintos cultivos agrícolas se ha obtenido a través de la variación en la distribución de la materia seca entre los distintos órganos de la planta

(Ericsson, 1995). Esta formación de materia seca es el resultado neto de varios procesos como son: (i) la asimilación nitrogenada y carbonada, (ii) la distribución de los fotoasimilados entre los distintos órganos, así como (iii) su pérdida vía respiración, exudación y muerte de estos. El resultado neto de estos procesos es afectado por múltiples variables, siendo una de las más importantes la disponibilidad de nutrientes en el medio, su absorción, y su distribución en la planta (McDonald et al., 1996).

Thornley (1972), fue inicialmente el que propuso un modelo con el que explicar los cambios en la distribución de la biomasa entre las raíces y la parte aérea. En este modelo, el crecimiento es

dependiente del suministro de carbon procedente de la parte aérea y del nitrogeno procedente de la raiz, es decir, del flujo de carbon desde la parte aérea hacia la raiz a través del floema, y del flujo de nitrogeno desde la raiz a la parte aérea a través del xilema.

De acuerdo con el modelo de Thornley, las condiciones que dieran lugar a un incremento en la concentración de carbon deberian, por lo tanto, conducir a un aumento de la biomasa en las raices, mientras que un aumento en la concentración de nitrogeno deberia favorecer la distribición de la biomasa hacia la parte aérea. En principio, el modelo es tambien considerado eficaz teniendo en cuenta los efectos de las variables medioambientales, asi como la distribición y estatus nutricional de la planta (Wilson, 1988). Con respecto a este último factor, se ha comprobado que el estatus nutricional, principalmente de los elementos N, P y K, influye de una manera determinante sobre la producción y distribición de la materia seca entre los distintos órganos de la planta (Marschner et al., 1996).

La deficiencia nutricional puede afectar además de la provisión o síntesis de fotosintatos tambien a la distribición de estos entre la fuente (hojas) y los distintos sumideros. Los ejemplos más detallados en la bibliografía existente son los que muestran como las deficiencias de N, P y K alteran la distribición de fostosintatos durante el periodo de crecimiento vegetativo de las plantas (Marschner et al., 1996).

Bajo condiciones deficientes de N, el incremento en el cociente del peso seco entre raiz-parte aérea (Engels y Marschner, 1995), no es solamente debido por la translocación de fotoasimilados via floema hacia las raices, sino que tambien el transporte por esta via de compuestos nitrogenados hacia las raices, en la mayoría

de los casos, puede llegar a superar al transporte del N via xilema hacia la parte aérea (Peuke et al., 1994). Similarmente, bajo condiciones deficientes en P el cociente entre los valores de peso seco entre raiz-parte aérea suele incrementar (Fredeen et al., 1989). Este incremento del peso seco de la raiz puede ser causado en parte por un aumento de la retranslocación del P desde la parte aérea hacia las raices en plantas deficientes de este nutriente (Smith et al., 1990).

Estos resultados sugieren que bajo condiciones deficientes en N o P, no solamente una mayor proporción de nutrientes procedentes del substrato es retenida en las raices, sino que tambien la recirculación de nutrientes desde la parte aérea hacia las raices suple adicionalmente de N y P a este órgano de la planta. Por lo tanto, los niveles de nutrientes superiores en las raices pueden contribuir a que se produzca una translocación excesiva de fotoasimilados hacia este órgano, en deprimiento de la parte aérea (Marschner et al., 1996). Por ejemplo, bajo condiciones deficientes en P, a pesar de la fuerte reducción del crecimiento de la parte aérea, las concentraciones de clorofilas y por lo tanto la actividad fotosintetica a nivel foliar se mantiene (Fredeen et al., 1989; Cakmak, 1994), asegurandose el continuo suministro hacia las raices de fotoasimilados en estas plantas deficientes en P.

Las plantas deficientes en K muestran un comportamiento contrario, en relación a la distribición de fotoasimilados entre la parte aérea y la radicular, que las plantas deficientes en N o P (Anderson, 1988). Aunque la movilidad a través del floema del K es similar a la del N o a la del P, el cociente entre el peso seco de raiz y parte aérea generalmente disminuye bajo condiciones de deficiencia de K (Ericsson and Kähr, 1995). A pesar del requerimiento de K en los procesos

fotosintéticos, la disminución de K en plantas deficientes no conlleva a un empeoramiento de la fotosíntesis per se aunque las concentraciones de clorofilas disminuyan, sino que los resultados indican que la exportación de los fotoasimilados es el proceso más afectado por esta deficiencia, lo que da lugar a una acumulación de carbohidratos en las hojas (Fischer y Bremer, 1993).

En definitiva, y como hemos podido comprobar, la distribución de los fotoasimilados entre los distintos órganos de las plantas es fuertemente alterado por el estatus nutricional del N, P y K, y esta estrechamente correlacionado con el efecto de la deficiencia respectiva sobre producción de materia seco y su distribución entre la raíz y parte aérea.

I.1.2. Factores nutricionales que afectan a la producción de biomasa y su distribución en plantas de tabaco.

Recientemente, Balachandran et al. (1997) ha estudiado la influencia de distintos tipos de estres sobre la distribución de biomasa en plantas de tabaco. De entre los tipos de estres estudiados, el efecto de la deficiencia de N, P y K fue también analizado, siendo los resultados similares a lo que acabamos de describir. Bajo condiciones deficientes en N la biomasa de la totalidad de la planta disminuyó frente a un control, mostrando las plantas de tabaco hojas cloróticas y una reducción del peso seco por hoja y del número de hojas. Sin embargo, los autores destacan que la biomasa radicular fue mucho menos reducida que la biomasa foliar. Respuesta similar a la del N ocurrió bajo condiciones deficientes en P, reduciéndose también el número de hojas por planta pero sin embargo no encontrándose hojas cloróticas. En esta ocasión los autores también destacan que el crecimiento radicular permaneció

constante tanto en condiciones deficientes como óptimas en P. Estas respuestas, tanto la del N como la del P, la explican los autores por medio de un incremento en la translocación de fotoasimilados desde las hojas hacia las raíces en plantas deficientes en estos nutrientes.

En cuanto a la deficiencia de K provocó una reducción de la biomasa total de la planta. Sin embargo, la biomasa radicular fue más reducida bajo condiciones de deficiencia de K que la de la parte aérea (Balachandran et al., 1997).

El trabajo que acabamos de comentar es una excepción, puesto que la mayoría de los estudios que tratan la producción en las plantas de tabaco, o lo que es lo mismo la formación de biomasa foliar, lo hacen analizando el efecto bien de la fertilización nitrogenada o bien de la concentración del N en las hojas.

Efectivamente, bastantes trabajos ponen de manifiesto las relaciones estrechas y positivas en plantas de tabaco entre los parámetros: producción-fertilización nitrogenada y producción-concentración foliar de N total (Miner y Sims, 1983; Mackown et al., 1990; Sisson et al., 1991; Mackown, 1991; Mackown y Sutton, 1997, 1998). Recientemente, Mackown y Sutton (1998) han comprobado que, además de existir una relación muy estrecha entre los parámetros que hemos mencionado anteriormente ($R^2=0.979$, $P<0.001$), la determinación de la concentración de clorofilas en hojas de tabaco es una medida que presenta también una relación muy significativa y positiva, tanto con la concentración foliar de N total ($R^2=0.66$, $P<0.001$) como con la producción final ($R^2=0.864$, $P<0.001$).

Otros nutrientes que afectan a la producción de materia seca y a su distribución en plantas de tabaco son el B y el Ca. Ruiz et al. (1998) estudiando el efecto del B sobre el metabolismo nitrogenado en hojas de plantas de tabaco,

encontraron que un aumento en la aplicación al medio de cultivo de este micronutriente suponía un incremento gradual del peso seco foliar. Este hecho además se relacionaba claramente con el incremento que también se producía en la asimilación de NO_3^- al aplicar la máxima dosis de B. Estos resultados confirman la función de B como un elemento esencial para el crecimiento normal de las plantas, dado su papel esencial en los procesos de elongación y división celular, así como en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Shelp, 1993).

En cuanto al Ca, Sims et al. (1995) observó que un aumento en la aplicación de este nutriente desde 0 a 380 Kg Ca/Ha suponía un aumento gradual de la biomasa foliar y total (g/planta), mientras que la aplicación de 760 Kg Ca/Ha disminuía drásticamente la biomasa de las plantas de tabaco.

II. Objetivos.

El propósito de este capítulo es resolver o aclarar los siguientes objetivos:

(i) Estudiar la influencia del B y del Ca sobre la producción de biomasa, así como su distribución en plantas de tabaco. Además, intentaremos evaluar si el efecto del B y del Ca sobre estos parámetros se produce a través del comportamiento de los principales factores que influyen en la producción de biomasa, como son el N, P, K, azúcares y pigmentos fotosintéticos.

(ii) Finalmente, y teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, intentaremos definir que tratamientos individuales así como conjuntos de B y Ca fueron los más adecuados y beneficiosos para el cultivo del tabaco bajo las condiciones de nuestra experiencia.

III. Material y Métodos.

III.1. Diseño experimental.

(Ver Capítulo I).

III.2. Muestreo de las plantas.

(Ver Capítulo I).

III.3. Análisis de las plantas.

III.3.1. Extracción y cuantificación de los pigmentos foliares.

El método utilizado tanto para la extracción como para cuantificación de los distintos pigmentos foliares fue el descrito por Wellburn (1994). Se realizaron discos foliares de un diámetro de 7 mm correspondientes a un peso de 0.125 g, los cuales se introdujeron durante 24 h y en oscuridad en 10-ml de metanol. Pasado este tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia colorimetricamente a las longitudes de onda de A₆₆₆, A₆₅₄, y A₄₇₀, como indica Wellburn (1994). En este trabajo, también se definen las fórmulas que se aplican para obtener las concentraciones de los distintos pigmentos, y que nosotros hemos utilizado:

$$\text{Chl a} = [15.65(A_{666}) - 7.34(A_{653})]$$

$$\text{Chl b} = [27.05(A_{653}) - 11.21(A_{666})]$$

$$\text{Carotenos} = [(1000A_{470}) - 2.86(\text{Chl a}) - 129.2(\text{Chl b})]:221$$

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco el cual estaba formado por metanol. La concentración de los pigmentos foliares se expresó como $\mu\text{g m}^{-2}$.

III.3.2. Extracción y cuantificación de los azúcares solubles.

Los azúcares solubles, glucosa, fructosa, y sacarosa, fueron medidos

siguiendo la metodología propuesta por Irigoyen et al. (1992). Una cantidad de material vegetal fresco (0.5 g) fue homogenizado inicialmente con 5-ml de etanol al 96%, y posteriormente dos veces con 5-ml de etanol al 70%. El homogenado se centrifugó a 5500 rpm durante 10 min, y el sobrenadante resultante se utilizó para la determinación de los azúcares solubles. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-4°C.

Del sobrenadante se tomó un volumen de 0.1-ml y se adicionó 3-ml de 0.1% (p/v) de antrona disuelta en H₂SO₄ al 70%. A continuación, los tubos se introdujeron en un baño de agua a 100°C durante 10 min, y transcurrido este tiempo y una vez enfriados se procedió a su lectura a una longitud de onda de A₆₅₀, frente a las curvas patrón de glucosa (300-700 $\mu\text{g/ml}$), fructosa (100-800 $\mu\text{g/ml}$) y sacarosa (100-800 $\mu\text{g/ml}$).

Se realizaron tres ensayos para cada extracto, y un blanco en el cual se sustituyó el volumen del extracto por antrona. Los azúcares totales representan la suma de las concentraciones obtenidas de glucosa, fructosa y sacarosa, y se expresaron como mg g^{-1} p.f.

III.3.3. Extracción y cuantificación de los nutrientes totales N, P y K.

Para la determinación del N, P y K total, 0.15 g de material seco y molido fue sometido a una mineralización con H₂SO₄ 12N y H₂O₂ al 30% libre de P (Wolf, 1982). Del mineralizado resultante, y tras la adición de 20-ml de H₂O bidestilada (Millipore RX-21), se tomó un volumen en el que se determinó el contenido en N total siguiendo el método de Krom (1980) (ver Capítulo III), y el P total siguiendo el método de Hogue et al. (1970) (ver Capítulo IV), mientras que el K total se determinó directamente del mineralizado

siguiendo el método de Lachica et al. (1975) (ver Capítulo V).

III.3.4. Determinación de los parámetros de producción de biomasa.

El número de hojas por planta se efectuó por conteo directo mientras se realizaban los muestreos.

En relación al peso seco por hoja, peso seco por raíz y peso seco por tallo, todos ellos se determinaron después de proceder al lavado y secado del material en una estufa de aire forzado a 70°C durante 24 h, siendo expresados como g.

El peso seco de las hojas/planta se determinó por multiplicación del número de hojas por planta con el peso seco foliar. En relación al peso seco de la parte aérea se obtuvo al sumar el peso seco de las hojas/planta y peso seco por tallo, y el peso seco total al sumar el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la raíz. Finalmente, el cociente raíz:parte aérea se determinó dividiendo los pesos correspondientes.

III.4. Análisis estadístico.

(Ver Capítulo I).

Tabla 1a. Efectos individuales de los tratamientos de B y de Ca sobre la producción de biomasa (B) expresada en gr de p.s. en plantas de tabaco.

	Braiz	Nº hojas	Bfoliar	Bfoliar/ planta	Btallo	Baérea	Braiz/ Baérea	Btotal
B ₁	2.68	17.3	1.23	21.4	3.61	24.8	0.110	27.4
B ₂	2.69	18.3	1.33	24.1	3.64	27.8	0.096	30.7
B ₃	2.64	19.0	1.46	27.5	4.67	32.0	0.087	34.7
LSD	0.10	0.49	0.04	0.75	0.14	0.75	0.004	1.29
Ca ₁	2.31	19.0	1.53	29.2	4.76	33.7	0.068	35.9
Ca ₂	2.57	18.0	1.37	24.0	3.99	27.9	0.094	30.9
Ca ₃	3.15	17.7	1.12	19.9	3.24	23.0	0.130	26.1
LSD	0.10	0.49	0.04	0.75	0.14	0.75	0.004	1.29

IV. Resultados.

IV.1. Producción de biomasa y su distribución en plantas de tabaco.

La producción de biomasa radicular por planta no fue afectada por la aplicación de B al medio de cultivo ($P > 0.05$; $F = 0.412$), puesto que no hubo diferencias entre los tratamientos en relación al peso seco radicular (Tabla 1a). En cuanto al efecto individual del Ca, la aplicación de este elemento al medio de cultivo dio lugar a un aumento de la producción de biomasa radicular ($P < 0.001$; $F = 28.20$), presentándose el máximo peso radicular en Ca₃ (Tabla 1a).

Como podemos observar en las tablas 1b y 1c, los efectos individuales del B y del Ca fueron predominantes, no presentándose por lo tanto ningún tipo de interacción entre estos elementos para el peso seco radicular por planta ($P > 0.05$; 2.73).

Los distintos parámetros que definen la producción de biomasa de la parte aérea, como son: número de hojas por planta, peso seco por hoja, peso seco foliar por planta, peso seco por tallo y por planta, y peso seco de la parte aérea por planta (peso seco foliar por planta + peso seco por tallo), mostraron un comportamiento similar ante la aplicación

de B y Ca al medio de cultivo.

El efecto individual del B sobre estos parámetros fue positivo (Tabla 1a), aumentándose los valores de estos a medida que se incrementaba la aplicación del B al medio de cultivo ($n \square$ hojas/planta: $P < 0.001$, $F = 23.75$; peso seco/hoja: $P < 0.001$, $F = 18.96$; peso seco foliar/planta: $P < 0.001$, $F = 56.42$; peso seco tallo/planta: $P < 0.001$, $F = 21.69$; peso seco total de la parte aérea/planta: $P < 0.001$, $F = 70.03$), presentándose por lo tanto los máximos valores bajo el tratamiento B₃. Por el contrario, el efecto individual del Ca fue negativo, puesto que los mínimos valores de los parámetros que definen la producción de biomasa de la parte aérea se obtuvieron en Ca₃ (Tabla 1a) ($n \square$ hojas/planta: $P < 0.001$, $F = 16.25$; peso seco/hoja: $P < 0.001$, $F = 69.93$; peso seco foliar/planta: $P < 0.001$, $F = 127.66$; peso seco tallo/planta: $P < 0.001$, $F = 34.24$; peso seco total de la parte aérea/planta: $P < 0.001$, $F = 149.92$).

Al igual que ocurría con la producción de biomasa radicular, los efectos individuales tanto del B como del Ca fueron los predominantes (Tablas 1b y 1c), puesto que para todos los parámetros que definen la biomasa de la parte aérea no se observó ninguna influencia del Ca

Tabla 2b. Interacción B-Ca sobre la producción de biomasa (B) expresada en gr de p.s. en plantas de tabaco :Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Braiz	Nº hojas	Bfoliar	Bfoliar/ planta	Btallo	Baérea	Braiz/ Baérea	Btotal
Ca ₁ B ₁	2.37	18.0	1.36	24.5	4.52	29.2	0.083	31.6
B ₂	2.31	19.0	1.51	28.4	4.33	32.8	0.070	35.1
B ₃	2.24	20.0	1.73	34.6	5.43	40.0	0.051	42.1
Ca ₂ B ₁	2.66	17.0	1.28	21.8	3.66	25.4	0.104	28.1
B ₂	2.57	18.0	1.37	23.9	3.48	27.3	0.097	30.9
B ₃	2.49	19.0	1.46	26.2	4.85	31.1	0.080	33.6
Ca ₃ B ₁	3.06	17.0	1.05	17.9	2.89	20.7	0.141	23.7
B ₂	3.18	18.0	1.12	20.2	3.12	23.3	0.120	26.1
B ₃	3.21	18.0	1.21	21.7	3.73	24.9	0.130	28.5
LSD	0.20	0.85	0.06	1.32	0.30	1.26	0.007	2.23

Tabla 2c. Interacción B-Ca sobre la producción de biomasa (B) expresada en gr de p.s. en plantas de tabaco: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Braiz	Nº hojas	Bfoliar	Bfoliar/ planta	Btallo	Baérea	Braiz/ Baérea	Btotal
B ₁ Ca ₁	2.37	18.0	1.36	24.5	4.52	29.2	0.083	31.6
Ca ₂	2.66	17.0	1.28	21.8	3.66	25.4	0.104	28.1
Ca ₃	3.03	17.0	1.05	17.9	2.89	20.7	0.141	23.7
B ₂ Ca ₁	2.31	19.0	1.51	28.4	4.33	32.8	0.070	35.1
Ca ₂	2.57	18.0	1.37	23.9	3.48	27.3	0.097	30.9
Ca ₃	3.18	18.0	1.12	20.2	3.12	23.3	0.120	26.1
B ₃ Ca ₁	2.24	20.0	1.73	34.6	5.43	40.0	0.051	42.1
Ca ₂	2.49	19.0	1.46	26.2	4.85	31.1	0.080	33.6
Ca ₃	3.41	18.0	1.21	21.7	3.73	24.9	0.130	28.5
LSD	0.20	0.85	0.06	1.32	0.30	1.26	0.007	2.23

sobre el efecto individual de B ni viceversa (*nº hojas/planta*: $P > 0.05$, $F = 1.25$; *peso seco/hoja*: $P > 0.05$, $F = 2.95$; *peso seco foliar/planta*: $P > 0.05$, $F = 6.31$; *peso seco/tallo/planta*: $P > 0.05$, $F = 3.97$; *peso seco total de la parte aérea/planta*: $P > 0.05$, $F = 8.02$)

Finalmente, y para concluir este apartado de la sección de resultados, vamos a describir el comportamiento del cociente biomasa radicular:biomasa de la parte aérea y de la biomasa total por planta.

Los tratamientos de B influyeron negativamente sobre el coeficiente biomasa radicular-biomasa de la parte aérea ($P < 0.001$, $F = 19.45$), y positivamente sobre la biomasa total de la planta ($P < 0.001$; $F = 64.72$) (Tabla 1a). Por el contrario, el efecto individual del Ca fue positivo en relación al cociente entre la biomasa radicular y biomasa de la parte aérea ($P < 0.001$; $F = 145.81$) (Tabla 1a), y negativo en relación a la biomasa total mostrándose los mínimos valores al aumentar las dosis de este elemento en el

medio de cultivo ($P < 0.001$, $F = 121.43$) (Tabla 1a).

Por último, para ninguno de estos parámetros se observó algún tipo de interacción (Cociente biomasa radicular:biomasa de la parte aérea, $P > 0.05$, $F = 3.45$; Biomasa total, $P > 0.05$, $F = 6.44$), predominando por lo tanto los efectos individuales del B y del Ca (Tablas 1b y 1c).

IV.2. Factores que determinan la producción de biomasa.

En relación al N total en raíces, el aumento en la aplicación al medio de cultivo de B supuso un aumento proporcional del N total ($P < 0.001$; $F = 91.58$), presentándose las máximas concentraciones radiculares en B3 (Tabla 2a). En cuanto al efecto individual del Ca fue contrario al del B, puesto que un aumento de la aplicación de Ca dio lugar a una disminución proporcional del N total radicular ($P < 0.001$; $F = 178.44$) (Tabla 2a).

TABLA 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de los nutrientes N, P y K en sus formas totales.

	Nt	Pt	Kt
B ₁	20.3	8.36	12.9
B ₂	21.8	8.11	12.4
B ₃	22.5	8.54	9.30
LSD	0.33	0.57	0.57
Ca ₁	23.1	6.52	9.31
Ca ₂	21.4	8.02	11.5
Ca ₃	20.1	10.5	13.8
LSD	0.33	0.57	0.57

N total (Nt), P total (Pt), K total (Kt) en mg g^{-1} p.s.

Con respecto a la interacción BCa ($P < 0.001$; $F = 141.36$), la influencia del Ca sobre el efecto individual del B se observó cuando la dosis de Ca aplicada fue Ca3, puesto que bajo esta dosis de Ca no se reflejó el efecto individual del B presentándose la máxima concentración en

Ca3B2 y la mínima en Ca3B3 (Tabla 2b). En relación a la influencia del B sobre el efecto individual del Ca destacar que se presentó cuando la dosis de B aplicada fue B1. Bajo esta dosis de B las máximas concentraciones de N total en las raíces se presentaron en B1Ca1 y B1Ca3, no existiendo diferencias estadísticas entre ambas combinaciones (Tabla 2c).

TABLA 2b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de los nutrientes N, P, y K en sus formas totales: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Nt	Pt	Kt
Ca ₁ B ₁	20.5	7.31	10.1
B ₂	19.7	6.81	10.6
B ₃	20.8	6.44	7.25
Ca ₂ B ₁	22.4	8.12	13.3
B ₂	21.6	8.16	12.3
B ₃	21.4	7.78	9.01
Ca ₃ B ₁	26.5	9.66	15.4
B ₂	23.0	10.4	14.3
B ₃	18.0	11.4	11.7
LSD	0.57	0.99	1.22

N total (Nt), P total (Pt), y K total (Kt) en mg g^{-1} p.s.

La concentración radicular de P total (Tabla 2a) no varió ante el incremento en la aplicación de B ($F = 1.15$; $P > 0.05$), mientras que por el contrario el Ca dio lugar a un aumento proporcional en la concentración radicular de P total ($F = 98.58$; $P < 0.001$), presentándose el máximo nivel en Ca3 y el mínimo en Ca1 (Tabla 2a).

En relación al estudio de la interacción entre estos dos elementos, podemos observar en la tabla 2b y 2c que la aparición de la interacción sobre el Ptot fue muy débil desde el punto de vista estadístico ($F = 3.12$, $P < 0.05$), predominando en la mayoría de los casos el efecto individual de ambos nutrientes. El efecto individual del B no se produjo solamente cuando este elemento se aplicó

junto con la dosis Ca3, presentándose en este caso diferencias estadísticas entre el tratamiento Ca3B3, con las máximas concentraciones de Ptot y los tratamientos Ca3B1 y Ca3B2 (Tabla 2b). Finalmente, el B no supuso ninguna variación sobre el efecto individual del Ca, puesto que independientemente de la dosis de B aplicadas las máximas y mínimas concentraciones radiculares de Ptot se presentaron en Ca3 y Ca1 respectivamente (Tabla 2c).

TABLA 2c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones radiculares de los nutrientes N, P, y K en sus formas totales: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Nt	Pt	Kt
B ₁ Ca ₁	20.5	7.31	10.1
Ca ₂	22.4	8.12	13.3
Ca ₃	26.5	9.66	15.4
B ₂ Ca ₁	19.7	6.81	10.6
Ca ₂	21.6	8.16	12.3
Ca ₃	23.0	10.4	14.3
B ₃ Ca ₁	20.8	6.44	7.25
Ca ₂	21.4	7.78	9.01
Ca ₃	18.0	11.4	11.7
LSD	0.57	0.99	1.22

N total (Nt), P total (Pt), K total (Kt) en mg g⁻¹ p.s.

En raíces, y en relación al comportamiento del K total, indicar que como se muestra en la tabla 2a, incrementos en la aplicación de B produjeron una disminución significativa de la concentración radicular de K total, presentándose la mínima concentración en B3 (F= 94.38; P< 0.001) (Tabla 2a). Por el contrario, el efecto individual del Ca sobre el K total fue positivo, puesto que incrementos en la aplicación del primero al medio de cultivo conllevaron a un aumento gradual en la concentración radicular de K total, encontrándose la máxima concentración en Ca3 (F= 124.89; P< 0.001) (Tabla 2a).

La interacción B-Ca para el K total (F= 2.05; P> 0.05) no fue significativa, lo que nos indica que prevalecieron principalmente los efectos individuales sobre estos cationes (Tablas 2b y 2c).

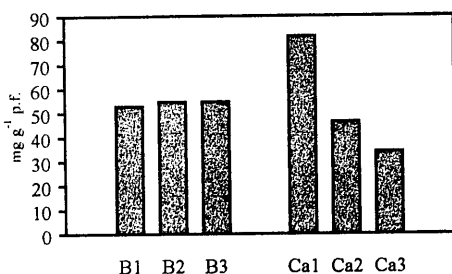


Figura 1a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración radicular de azúcares totales (LSD= 2.53).

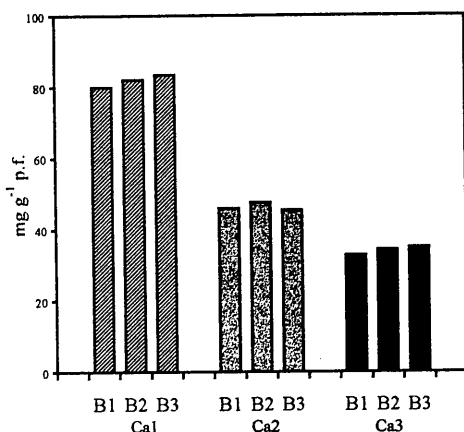


Figura 1b. Interacción B-Ca sobre la concentración radicular de azúcares totales: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 4.92).

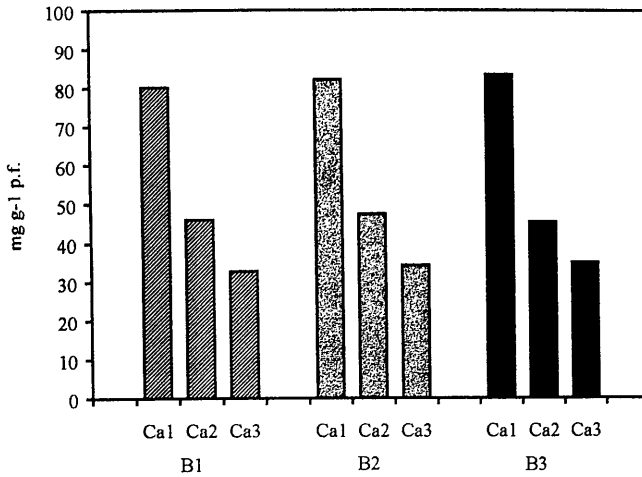


Figura 1c. Interacción B-Ca sobre la concentración radicular de los azúcares totales: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 4.92).

En la Figura 1 esta reflejado el comportamiento de la concentración de los azúcares totales. En cuanto a los efectos individuales, el B no mostró ninguna influencia estadísticamente significativa sobre los azúcares totales en las raíces ($P > 0.05$; $F = 1.160$) (Fig. 1a), mientras que un aumento de Ca dio lugar a una disminución en las concentraciones radiculares de los azúcares, presentándose las máximas concentraciones en Ca1 y las mínimas en Ca3 ($P < 0.001$; $F = 18394.65$) (Fig. 1a).

En las figuras 1b y 1c podemos observar como predominan los efectos individuales no presentándose ningún tipo de interacción entre el B y el Ca. Es decir, independientemente de la dosis de Ca aplicada los tratamientos de B no van influir sobre la concentración radicular de los azúcares totales, mientras que el incremento de Ca conlleva a una disminución en la concentración radicular de los azúcares independientemente de la dosis de B aplicada ($P > 0.05$; $F = 92.90$).

En relación a la concentración de los nutrientes N, P y K total en hojas

(Tabla 3), indicar inicialmente que el N total mostro un comportamiento similar al de las raíces, puesto que las concentraciones foliares de N aumentaron al incrementar las dosis de B ($P < 0.001$; $F = 116.01$) y disminuyeron al aumentar las de Ca ($P < 0.001$; $F = 829.35$) (Tabla 3a).

TABLA 3a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de los nutrientes N, P y K en sus formas totales.

	Nt	Pt	Kt
B ₁	24.9	5.51	29.9
B ₂	27.4	5.46	29.0
B ₃	31.3	5.49	27.1
LSD	0.85	0.22	0.85
Ca ₁	36.8	6.33	31.6
Ca ₂	27.3	5.76	28.2
Ca ₃	19.5	4.38	26.1
LSD	0.85	0.22	0.85

N total (Nt), P total (Pt), K total (Kt) en mg g^{-1} p.s.

La única interacción entre el B y Ca que se observó fue cuando se aplicaron conjuntamente las distintas dosis de B con la dosis Ca₃, no mostrándose el efecto individual de B que acabamos de explicar

($P < 0.001$; $F = 31.687$) (Tablas 3b y 3c).

TABLA 3b. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de los nutrientes N, P, y K en sus formas totales: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Nt	Pt	Kt
Ca ₁ B ₁	31.4	6.31	32.9
B ₂	35.5	6.39	31.9
B ₃	43.4	6.29	30.1
Ca ₂ B ₁	24.5	5.81	29.2
B ₂	26.7	5.69	28.7
B ₃	30.8	5.79	26.7
Ca ₃ B ₁	18.9	4.42	27.6
B ₂	20.1	4.32	26.3
B ₃	19.7	4.41	24.4
LSD	1.48	0.37	1.47

N total (Nt), P total (Pt), y K total (Kt) en mg g^{-1} p.s.

En relación al Ptot (Tabla 3a), un aumento en la aplicación del B no dio lugar a diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos ($F = 2.01$, $P > 0.05$). Por el contrario, un aumento del Ca supuso una disminución foliar en la concentración de Ptot, presentándose la máximas concentraciones en Ca1 y las mínimas en Ca3 ($F = 22.56$, $P < 0.001$) (Tabla 3a).

La acción conjunta de ambos nutrientes no conlleva a cambios en los efectos individuales del B o del Ca sobre el Ptot ($F = 2.31$, $P > 0.05$), no apareciendo por lo tanto ningún tipo de interacción (Tablas 3b y 3c).

Finalmente, en hojas y en relación al K total, los efectos individuales tanto del B como del Ca indujeron una disminución en su concentración foliar ($F = 23.41$, $P < 0.001$ y $F = 88.73$, $P < 0.001$ respectivamente) (Tabla 3a), encontrándose las mínimas concentraciones foliares en B3 y Ca3.

Al igual que ocurría en raíces, para el K total en hojas prevalecieron o dominaron los efectos individuales del B y

del Ca, y por lo tanto no se observó ningún tipo de influencia estadísticamente significativa de un elemento sobre otro o viceversa ($F = 0.19$, $P > 0.05$) (Tablas 3b y 3c).

TABLA 3c. Interacción B-Ca sobre las concentraciones foliares de los nutrientes N, P, y K en sus formas totales: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Nt	Pt	Kt
B ₁ Ca ₁	31.4	6.31	32.9
Ca ₂	24.5	5.81	29.2
Ca ₃	18.9	4.42	27.6
B ₂ Ca ₁	35.5	6.39	31.8
Ca ₂	26.7	5.69	28.7
Ca ₃	20.1	4.32	26.3
B ₃ Ca ₁	43.4	6.29	30.1
Ca ₂	30.8	5.79	26.7
Ca ₃	19.7	4.41	24.4
LSD	1.48	0.37	1.47

N total (Nt), P total (Pt), K total (Kt) en mg g^{-1} p.s.

En cuanto a la respuesta de los azúcares totales en hojas de tabaco ante la aplicación de B, esta fue de nuevo similar a la encontrada en las raíces, puesto que los distintos tratamientos de B aplicados no influyeron de forma significativa en la concentraciones foliares de estos ($P > 0.05$; $F = 10.18$) (Fig. 2a).

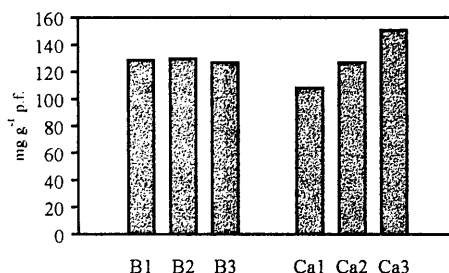


Figura 2a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre la concentración foliar de azúcares totales (LSD= 2.92).

Por el contrario, un aumento en la aplicación de Ca dio lugar a una acumulación foliar de los azúcares, presentándose las máximas concentraciones en Ca3 y las mínimas en Ca1 ($P < 0.001$; $F = 4732.83$) (Fig. 2a).

Al igual que ocurría en las raíces, en las hojas los efectos individuales tanto del B como del Ca predominaron en la respuesta de los azúcares totales, no observándose por lo tanto ningún tipo de interacción entre ambos nutrientes ($P > 0.05$; $F = 72.01$) (Figs. 2b y 2c).

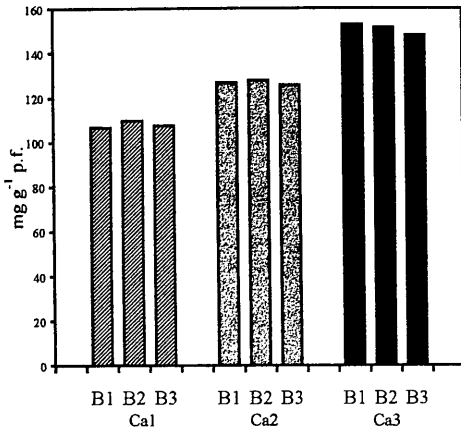


Figura 2b. Interacción B-Ca sobre la concentración foliar de azúcares totales: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca (LSD= 4.60).

Como indicábamos en la introducción de este capítulo, los pigmentos han sido muy utilizados en distintas plantas, entre ellas las plantas de tabaco, como indicadores de la producción de biomasa y del estatus nutricional principalmente de N, P y K de la planta. En nuestra experiencia, los distintos tratamientos de B dieron lugar a un aumento proporcional de la clorofila a, b, y total presentándose los máximos valores en B3 (*Chl a*: $P < 0.001$, $F = 80.29$; *Chl b*: $P < 0.001$, $F = 36.61$; *Chl total*: $P < 0.001$, $F = 132.80$) (Tabla 4a).

En cuanto al efecto individual del

Ca fue contrario al del B, puesto que un aumento del primero dio lugar a una disminución de todas las clorofilas estudiadas (Tabla 4a), encontrándose los mínimos contenidos en Ca3 (*Chl a*: $P < 0.001$, $F = 1907.77$; *Chl b*: $P < 0.001$, $F = 327.99$; *Chl total*: $P < 0.001$, $F = 2365.70$).

Tabla 4a. Efecto individual de los tratamientos de B y Ca sobre los pigmentos foliares.

	Chl a	Chl b	Chl t	Carot.
B ₁	86.2	18.5	104.7	31.3
B ₂	90.5	20.8	111.3	32.5
B ₃	94.1	22.5	116.6	32.2
LSD	1.09	0.46	1.31	1.25
Ca ₁	107.9	26.6	134.5	24.3
Ca ₂	88.6	19.8	108.3	30.7
Ca ₃	74.3	15.4	89.7	40.9
LSD	1.09	0.46	1.31	1.25

Clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl t) y carotenos (Carot.), expresados en $\mu\text{g m}^{-2}$.

En relación a las interacciones B-Ca, no se presentó ninguna clase de estas en la clorofila b ($P > 0.05$; $F = 6.65$) (Tablas 4b y 4c), mientras que en la clorofila a y total el efecto individual del B no se produjo bajo las dosis más elevadas de Ca (*chl a*: $P < 0.001$, $F = 59.78$; *Chl total*: $P < 0.001$, $F = 61.94$) (Tabla 4b). Por su parte el B no influyo sobre el efecto individual del Ca (Tabla 4c).

En relación a los carotenos, su comportamiento fue totalmente distinto al de las clorofilas, puesto que el B no influyo estadísticamente sobre este pigmento ($P > 0.05$; $F = 0.64$) (Tabla 4a), mientras que el efecto individual del Ca fue positivo, mostrándose el máximo valor en Ca3 ($P < 0.001$; $F = 342.49$) (Tabla 4a).

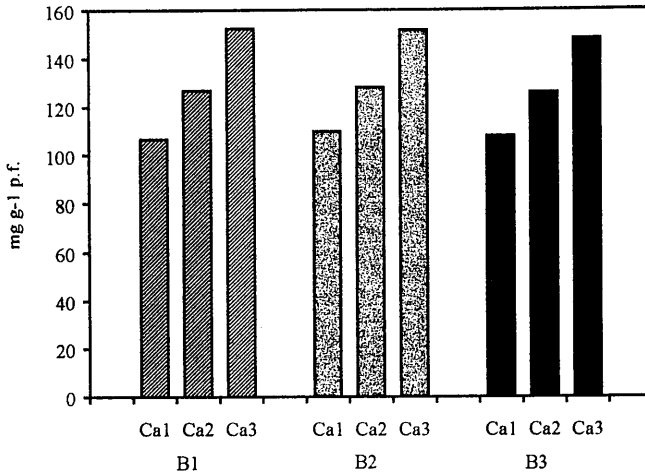


Figura 2c. Interacción B-Ca sobre la concentración foliar de los azúcares totales: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B (LSD= 4.60).

Tabla 4b. Interacción B-Ca sobre los pigmentos foliares: Influencia de los tratamientos de B en función de las diferentes dosis de Ca.

	Chl a	Chl b	Chl t	Carot.
Ca ₁ B ₁	102.2	23.5	125.8	25.1
B ₂	108.6	27.7	136.3	24.5
B ₃	112.9	28.6	141.6	23.4
Ca ₂ B ₁	82.4	17.6	99.9	31.1
B ₂	85.5	19.3	104.8	31.5
B ₃	97.8	22.5	120.3	29.5
Ca ₃ B ₁	74.0	14.4	88.4	37.7
B ₂	77.4	15.5	92.8	41.5
B ₃	71.5	16.4	87.9	43.6
LSD	1.90	0.75	2.26	2.16

Clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl t) y carotenos (Carot.) expresados en µg m⁻².

En los carotenos también podemos observar como el efecto individual del B no refleja bajo la dosis Ca₃ (P < 0.001; F = 3.01), puesto que en este caso existieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, encontrándose los máximos valores en las combinaciones Ca₃B₂ y Ca₃B₃ y los mínimos en Ca₃B₁ (Tabla 4b). Por su parte el B, y al contrario del Ca, no mostro

ningun tipo de influencia sobre el efecto individual del Ca (Tabla 4c)

Tabla 4c. Interacción B-Ca sobre los pigmentos foliares: Influencia de los tratamientos de Ca en función de las diferentes dosis de B.

	Chl a	Chl b	Chl t	Carot.
B ₁ Ca ₁	102.2	23.5	125.8	25.1
Ca ₂	82.4	17.6	99.9	31.1
Ca ₃	74.0	14.4	88.4	37.7
B ₂ Ca ₁	108.6	27.7	136.3	24.5
Ca ₂	85.5	19.3	104.8	31.5
Ca ₃	77.4	15.5	92.8	41.5
B ₃ Ca ₁	112.9	28.6	141.6	23.4
Ca ₂	97.8	22.5	120.3	29.5
Ca ₃	71.5	16.4	87.9	43.6
LSD	1.90	0.75	2.26	2.16

Clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl t) y carotenos (Carot.) expresados en µg m⁻².

V. Discusión.

V.1. Producción de biomasa y sus distribución en plantas de tabaco.

Como acabamos de describir en la sección de resultados, en todos los parámetros que hemos analizado para determinar la producción de biomasa y su distribución en plantas de tabaco prevalecieron los efectos individuales tanto del B como del Ca, no encontrándose por lo tanto ningún tipo de interacción entre estos dos nutrientes. Este hecho hace que a continuación discutamos los efectos del B y del Ca sobre la producción de biomasa de forma separada e individual.

El B es un elemento esencial para el desarrollo y crecimiento normal de las plantas, dado su papel determinante en los procesos de elongación y división celular, así como en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Shelp, 1993). Sin embargo, y como veremos a continuación el efecto del B sobre la producción de biomasa en nuestra experiencia varió dependiendo del órgano analizado. En raíces, un incremento en la aplicación de B al medio, y por lo tanto en su concentración radicular, no dio lugar a un aumento proporcional de la producción de biomasa radicular, puesto que este parámetro permaneció constante independientemente del tratamiento aplicado (Tabla 1a). Por el contrario, la producción de biomasa de la parte aérea fue afectada de forma positiva por el B, encontrándose los máximos valores de todos los parámetros (nº de hojas, peso seco/hoja, peso seco foliar/planta, peso seco/tallo/planta, peso seco total de la parte aérea) en el tratamiento B3 (Tabla 1a).

Estos resultados y los coeficientes de correlación que se reflejan en la tabla 6, nos sugieren que el B no muestra ningún tipo de efecto sobre el crecimiento en raíces, mientras que está muy relacionado de forma positiva con la producción de

biomasa de la parte aérea.

En cuanto al Ca, un aumento en su aplicación al medio de cultivo dio lugar a un aumento significativo del peso seco radicular, presentándose el máximo valor en el tratamiento Ca3 (Tabla 1a). Por el contrario, en las hojas el incremento en las dosis aplicadas de este elemento conlleva a una disminución en general de todos los parámetros que determinan la producción de biomasa de la parte aérea, mostrándose los máximos valores en Ca1 y los mínimos en Ca3 (Tabla 1a).

En este caso, los distintos coeficientes de correlación entre las concentraciones de Ca total en raíces y en hojas con los parámetros de producción de biomasa en ambos órganos, respectivamente, nos indican que el Ca afecta de forma positiva la producción de biomasa en raíces, y de forma negativa en hojas.

Como observamos las relaciones entre las concentraciones de B y Ca con la producción de biomasa varían dependiendo del órgano estudiado. Aunque existen trabajos que muestran un efecto positivo del B (Ruiz et al., 1998a,b) y negativo del Ca (Sims et al., 1995) sobre la producción de biomasa de la parte aérea, el hecho de que estos efectos que se producen en hojas no se reflejen en las raíces nos sugiere que, al menos en este último órgano, la producción de biomasa se podría deber a la acción de otros factores tales como el estatus nutricional de N, P, y K, y la concentración radicular de azúcares.

Otra posibilidad que podría explicar las diferencias existentes entre raíces y hojas, es que en nuestra experiencia la mayoría del B y del Ca es absorbido, translocado y acumulado en la parte aérea, donde podrían ejercer sus funciones como elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Shelp, 1993; Marshner, 1995).

Como indicábamos en la introducción, los factores que han sido más estudiados en relación a su influencia con la producción de biomasa son el estatus nutricional de N, P y K, y el contenido en azúcares totales (McDonald et al., 1996; Marschner et al., 1996; Balachandran et al., 1997). En raíces, el incremento en la aplicación de B dio lugar a un aumento en la concentración radicular de N total, a una disminución en la concentración radicular de K total (Tabla 2a), y finalmente los tratamientos de B no determinaron variaciones en las concentraciones radiculares de P total (Tabla 2a) y azúcares (Fig. 1a).

En cuanto Ca, su efecto individual en raíces dio lugar a disminuciones en las concentraciones radiculares de N total (Tabla 2a) y azúcares (Fig. 1a), mientras que la aplicación de elevadas dosis de Ca conllevaron a un aumento radicular de las concentraciones de P total (Tabla 2a) y K total (Tabla 2a).

Los coeficientes de correlación reflejados en la tabla 6 nos sugieren que, en nuestra experiencia, fue principalmente el P total el que de forma más significativa determino la producción de biomasa radicular. Distintos trabajos, como los de Fredeen et al. (1989), Smith et al. (1990), Marschner et al. (1996), y Balachandran et al. (1997), han demostrado que uno de los factores fundamentales en el aumento o constancia de la producción de biomasa radicular es la existencia de concentraciones de P radicular adecuadas. Por ejemplo, Smith et al. (1990) concluyeron que el incremento de biomasa radicular y del cociente biomasa radicular:biomasa de la parte aérea, que se observaba en plantas deficientes en P, se debía a una recirculación del P desde la parte aérea hacia las raíces, presentando este órgano concentraciones de este macronutriente adecuadas. Resultados similares a los anteriores encontraron

Balachandran et al. (1997) estudiando plantas de tabaco, ya que la biomasa radicular de plantas deficientes en P era similar a la de plantas con niveles adecuados de este nutriente, debido principalmente a la retranslocación y acumulación del P en las raíces de las plantas deficientes.

En la introducción del Capítulo 4 indicábamos que el B podría tener influencia en la absorción de P, y por lo tanto intervenir en el estatus nutricional de éste en la planta. Estas sugerencias se basaban en los resultados de distintos trabajos, los cuales le otorgan al B un papel esencial en el flujo de iones por medio de su influencia sobre la actividad ATPasa de membrana (Pollard et al., 1977; Blaser-Grill et al., 1989; Goldbach et al., 1990; Schon et al., 1990; Ferrol y Donaire, 1992; Ferrol et al., 1993; Obermeyer et al., 1996). Sin embargo, este papel esencial del B sobre la absorción de iones a través de la membrana se ha demostrado en la mayoría de la investigaciones bajo condiciones de deficiencia en este micronutriente. En nuestra experiencia, y como describíamos más detalladamente en el Capítulo 4, no existieron en ningún momento condiciones deficientes en B, lo que podría indicarnos que este micronutriente bajo concentraciones adecuadas en la planta no interviene sobre el estatus nutricional de P (Tabla 2a), lo que explicaría que los valores de biomasa radicular, al igual que los de P total, permanecieran también constantes independientemente del tratamiento de B aplicado (Tabla 1a).

Al contrario del B, y como también describíamos en el Capítulo 4, el aumento en la aplicación de Ca supuso una variación significativa del P_{tot} en raíces (Tabla 2a). El aumento de Ca dio lugar a un incremento proporcional en la concentración radicular de P_{tot}, presentándose la máxima concentración en Ca₃ (Tabla 2a). Como hemos explicado en

varias ocasiones, la mayoría del Ca es absorbido y acumulado en la parte aérea de las plantas, especialmente en plantas de tabaco (Bharti et al., 1996; Ruiz y Romero, 1998; Ruiz et al., 1999). Esta acumulación de Ca en hojas en nuestra experiencia, y como sugeríamos en el Capítulo 4, posiblemente este afectando a los procesos de translocación del P desde las raíces hacia las hojas, explicándose de esta manera los máximos niveles radiculares de P_{tot} en Ca_3 . Estos mismos resultados han sido expuestos recientemente, también en plantas de tabaco, por Ruiz y Romero (1998). Por lo tanto, posiblemente el efecto positivo del Ca sobre la acumulación de P total en las raíces determina el incremento que se observa en los valores de la biomasa radicular (Tabla 1a).

En definitiva, podemos concluir que en raíces ni el B ni el Ca muestran un efecto directo sobre la producción de biomasa, sino que probablemente es a través de la influencia que ejercen estos nutrientes sobre la concentración radicular de P total lo que determine variaciones en la producción de la biomasa radicular.

Por el contrario, en la parte aérea la acción positiva que ejerce el B (Tabla 1a) y negativa que ejerce el Ca (Tabla 1a) sobre la producción de biomasa si han sido descritos en otros trabajos y revisiones. Por ejemplo, es bien conocida la esencialidad del B para el óptimo crecimiento y desarrollo de las plantas, dada su función determinante en los procesos de elongación y división celular, así como en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Shelp, 1993; Cakmak y Römheld, 1997). Además, recientemente Ruiz et al. (1998a,b) en plantas de tabaco han encontrado que el incremento en la aplicación de B al medio de cultivo conlleva incrementos significativos en la producción de biomasa foliar.

En cuanto al Ca, Sims et al. (1995) observo que un aumento en la aplicación

de este nutriente desde 0 a 380 Kg Ca/Ha suponía un aumento gradual de la biomasa foliar y total (g/planta), mientras que la aplicación de 760 Kg Ca/Ha disminuía drásticamente la biomasa de las plantas de tabaco.

Estos resultados obtenidos en nuestra experiencia, nos hacen pensar que en la parte aérea de las plantas de tabaco si se produce un efecto directo del B y del Ca sobre el crecimiento y la producción de biomasa. Esta hipótesis es apoyada por las regresiones obtenidas en la tabla 6 entre las concentraciones foliares de B y Ca total y los distintos parámetros que determinan la producción de biomasa en la parte aérea.

En cuanto a la relación existente entre el estatus nutricional foliar de N, P y K total, y azúcares totales con los distintos parámetros de producción de biomasa de la parte aérea, indicar que fue el N total el que mostro una mayor influencia sobre la producción de biomasa (Tabla 6). Efectivamente, y al igual que ocurre en nuestra experiencia, bastantes trabajos ponen de manifiesto las relaciones estrechas y positivas en plantas de tabaco entre los parámetros: producción-fertilización nitrogenada y producción-concentración foliar de N total (Miner y Sims, 1983; Mackown et al., 1990; Sisson et al., 1991; Mackown, 1991; Mackown y Sutton, 1997, 1998).

Como indicábamos en el Capítulo III, el B y el Ca se diferenciaban claramente en relación al efecto que producían en el metabolismo del N. Incrementos en las dosis de B conllevaban a un aumento del metabolismo nitrogenado, y por lo tanto a una acumulación de N total, en las hojas, mientras que el incremento en la aplicación de Ca daba lugar a una disminución drástica en el tratamiento Ca_3 , tanto de la translocación de NO_3^- hacia las hojas como de la asimilación de estos.

En definitiva, teniendo en cuenta la relación tan estrecha que aparece en nuestra experiencia entre la producción de biomasa en la parte aérea y el contenido en N total (Tabla 6), y considerando la esencialidad que tiene este macronutriente en la producción en plantas de tabaco, nos sugiere que los efectos directos que describamos del B y del Ca sobre la producción de biomasa de la parte aérea no serían tales, sino que se podrían producir por medio de su influencia sobre la concentración foliar de N total.

Sin embargo, si la producción de biomasa de la parte aérea estuviese tan estrechamente relacionada con la concentración foliar de N total, como acabamos de indicar, es lógico que en todos los parámetros que definen esta biomasa se reflejara la interacción BCa que se muestra en el N cuando los tratamientos de B son aplicados con la dosis Ca₃ (Tabla 3b). En este caso, el efecto individual del B incrementando el metabolismo nitrogenado foliar no se refleja. Por el contrario, y como podemos observar en la tabla 1b, esta interacción no se encuentra en ninguno de los parámetros estudiados de la biomasa de la parte aérea.

Antes de finalizar la discusión sobre el efecto que ejercen los distintos factores (N, P, K y azúcares) sobre la producción biomasa, nos gustaría destacar que en nuestra experiencia la distribución y concentración de azúcares en los distintos órganos de la planta también podrían tener un papel determinante en la producción de ésta, como ha sido descrito en otros trabajos (McDonald et al., 1996; Marschner et al., 1996; Balachandran et al., 1997).

Como observamos en la tabla 6, la relación entre el contenido total de azúcares y los distintos parámetros que definen la biomasa, tanto en raíces como en hojas, siempre ha sido negativa y significativa. Es decir, un aumento en la

producción biomasa conlleva a una reducción en la concentración de estos compuestos en nuestra experiencia. Posiblemente, y teniendo en cuenta el papel esencial que ejercen los fotoasimilados como compuestos donadores de energía para los distintos procesos fisiológicos (Iglesias y Podestá, 1996; Leegood y Edwards, 1996), las mínimas concentraciones de carbohidatos (Figs. 1a y 2a) en aquellos tratamientos que muestran la máxima biomasa (Tabla 1a) se deba a la utilización de estos compuestos en los procesos de crecimiento y desarrollo. Además, Rychter y Randall (1994) demostraron que los azúcares acumulados por efecto de las elevadas concentraciones de Ca no eran utilizados metabólicamente, por lo que no intervenían en los distintos procesos metabólicos de la planta.

En nuestra experiencia, las conclusiones realizadas por Rychter y Randall (1994) podrían explicar la relación entre acumulación foliar de azúcares y disminución de producción de biomasa en el tratamiento Ca₃ (Fig. 2a y Tabla 1a, respectivamente), que muestra las máximas concentraciones foliares de Ca total.

Tabla 6. Coeficientes de correlación (r) entre los parámetros que definen la producción de biomasa (B) y sus factores determinantes. P > 0.05, ns; P < 0.05, *; P < 0.01, **; P < 0.001, *.**

	Btotal	Catotal	Ntotal	Ptotal	Ktotal	Azúcares totales
Bradicular	-0.14 ns	0.48 ns	-0.31 ns	0.84 **	0.51 ns	-0.74 **
n° hojas	0.77 **	-0.02 ns	0.68 *	0.28 ns	0.17 ns	-0.48 ns
Bfoliar	0.81 ***	-0.39 ns	0.85 ***	0.55 ns	0.43 ns	-0.73 **
Bfoliar/planta	0.89 ***	-0.32 ns	0.90 ***	0.52 ns	0.39 ns	-0.72 **
Btallo	0.77 **	-0.22 ns	0.77 **	0.47 ns	0.25 ns	-0.60 *
Baérea	0.90 ***	-0.31 ns	0.91 ***	0.53 ns	0.38 ns	-0.72 **

Uno de los parámetros que define con claridad la distribución de biomasa entre la raíz y la parte aérea es el cociente entre la biomasa de ambas partes (McDonald et al., 1996; Marschner et al., 1996; Balachandran et al., 1997). Como describíamos en el apartado de resultados, el incremento en la aplicación de las dosis de B supone una disminución del cociente biomasa radicular:biomasa parte aérea (Tabla 1a), lo que nos indica que el B da lugar fundamentalmente a un aumento del crecimiento de la parte aérea. En cuanto al Ca, su efecto es totalmente contrario al del B puesto que favorece el crecimiento de la raíz y disminuye el de la parte aérea, aumentando por lo tanto el cociente biomasa radicular:biomasa parte aérea a medida que incrementamos las dosis de Ca aplicadas al medio de cultivo. Los efectos individuales del B y del Ca (Tabla 1a), y teniendo en cuenta que no se produce ningún tipo de interacción BCa en los distintos parámetros de crecimiento en nuestra experiencia (Tablas 1b y 1c), nos sugieren que la aplicación de la combinación B3Ca1 es la más adecuada y eficaz para obtener el máximo rendimiento de las plantas de tabaco bajo las condiciones de nuestra experiencia.

En cuanto a la biomasa total (Tabla 1a), su comportamiento confirma lo que acabamos de definir, puesto que el B da lugar a un aumento de la biomasa total mientras que incrementos en la aplicación de Ca suponen una disminución. Estos

resultados demuestran la esencialidad del B bajo condiciones adecuadas en los procesos de crecimiento (Shelp, 1993; Marschner, 1995; Marschner et al., 1996), y el efecto negativo del Ca sobre el crecimiento de la plantas cuando se aplica en concentraciones elevadas (Sims et al., 1995).

Finalmente, y antes de concluir esta sección de la discusión, intentaremos evaluar en plantas de tabaco la relación existente entre la concentración de los distintos pigmentos, la concentración de N y la producción de biomasa.

Normalmente, diferencias en el contenido de los distintos pigmentos, especialmente de las clorofilas, han sido relacionados con síntomas de fertilización inapropiada o desequilibrio nutricional, aunque otros factores tales como temperatura o salinidad pueden también influir en la concentración de los distintos pigmentos (Zekri, 1991; Leidi et al., 1992; Romero et al., 1997). Por otro lado, ha sido demostrado en varios trabajos que uno de los factores determinantes en la concentración foliar de pigmentos es el nivel foliar de N (Takabe et al., 1990; Fanizza et al., 1991; López-Cantarero et al., 1994). Recientemente, Mackown y Sutton (1998), en hojas de tabaco, han comprobado que la determinación de la concentración de clorofilas es una medida que presenta una relación muy significativa y positiva, tanto con la concentración foliar de N total ($R^2 = 0.66$,

Tabla 7. Coeficientes de correlación (*r*) entre los pigmentos foliares y los parámetros que definen la producción de biomasa (B) en la parte aérea, y el N total. $P > 0.05$, ns; $P < 0.05$, *; $P < 0.01$, **; $P < 0.001$, *.**

	Ntotal	n° hojas	Bfoliar	Bfoliar/planta	Btallo	Baérea
Chl a	-0.14 ns	0.48 ns	-0.31 ns	0.84 ***	0.73 **	0.85 ***
Chl b	0.77 **	-0.02 ns	0.68 *	0.89 ***	0.79 ***	0.90 ***
Chl total	0.81 ***	-0.39 ns	0.85 ***	0.86 ***	0.76 **	0.87 ***
Carotenos	0.89 ***	-0.32 ns	0.90 ***	-0.72 **	-0.62 *	-0.73 **

$P < 0.001$) como con la producción final ($R^2 = 0.864$, $P < 0.001$).

En la tabla 7, podemos observar que también en nuestra experiencia existe una relación muy estrecha y positiva entre los niveles foliares de clorofilas con la concentración de N total, y con la producción de biomasa. Por lo tanto, el incremento en la aplicación de B al medio de cultivo da lugar a una mayor acumulación foliar de N total (Tabla 3a), a un incremento de la actividad fotosintética, por medio de un incremento en la síntesis de clorofilas (Tabla 4a), y a una mayor producción de biomasa en la parte aérea (Tabla 1a). Resultados totalmente contrarios en hojas se producen al aplicar dosis crecientes de Ca.

En cuanto al comportamiento de los carotenos, podemos ver en la tabla 7 como muestran una relación negativa con la concentración total de N. Goodwin (1980) indicó que distintos factores ambientales daban lugar a cambios en la síntesis de carotenos. Además, este autor también refleja que condiciones deficientes de ciertos nutrientes, especialmente el N, producen incrementos en las concentraciones de este pigmento.

Esta relación inversa que parece existir entre los carotenos y la concentración de N, podría explicar el hecho de que en nuestra experiencia incrementos en la aplicación de Ca den lugar a un aumento en la concentración de estos pigmentos, puesto que fue el tratamiento Ca3 dio lugar a la mínima

concentración foliar de N total (Tabla 3a). Por otro lado, y como los tratamientos de B conllevaron a concentraciones de N total adecuadas y elevadas (Tabla 3a), se podría explicar así la no existencia de diferencias entre los niveles de carotenos (Tabla 4a).

Por último, y en relación a los pigmentos, indicar que fueron la clorofila a y a+b, y los carotenos los que reflejaron más fielmente el comportamiento del N total, puesto que como podemos observar en la tabla 4b la interacción BCa que se producía para el N también se refleja en el comportamiento de estos pigmentos. Además, y de forma general, podemos concluir que el contenido de los distintos pigmentos estudiados en nuestra experiencia también reflejan la producción de biomasa de la parte aérea, por lo que en definitiva nuestros resultados en plantas de tabaco son similares a los obtenidos por Mackown y Sutton (1998).

VI. Conclusiones.

Primera: Los efectos del B y Ca sobre la producción de biomasa en plantas de tabaco dependieron del órgano analizado:

(i) En hojas, existió una relación muy cerrada y directamente proporcional entre los tratamientos de B y la producción de biomasa, mientras que los tratamientos de Ca condujeron a una disminución de la producción de biomasa de la parte aérea. En este órgano, además de los efectos del B y del Ca, la producción de biomasa

también se vio afectada por el contenido en azúcares y el estatus nutricional de N, lo que confirma la dependencia de este cultivo al N.

(ii) En raíces, y al contrario que en hojas, ni el B ni el Ca muestran un efecto directo sobre la producción de biomasa radicular, sino que probablemente es a través de la influencia que ejercen estos nutrientes sobre la concentración radicular de P y sobre el contenido de azúcares en este órgano lo que determine variaciones en la producción de biomasa radicular.

Segunda: El cociente biomasa radicular:biomasa de la parte aérea nos indica claramente en nuestra experiencia que mientras que el B favorece fundamentalmente el crecimiento de la parte aérea, el Ca lo hace sobre el crecimiento radicular. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que no se produce ningún tipo de interacción B-Ca en los distintos parámetros de crecimiento, la aplicación de la combinación B3Ca1 sería la más adecuada y eficaz para obtener el máximo rendimiento de las plantas de tabaco bajo las condiciones de nuestra experiencia.

Tercera: En nuestra experiencia se refleja una relación muy estrecha y positiva entre los niveles foliares de clorofilas con la concentración foliar de N, y con la producción de biomasa. En cuanto al comportamiento de los carotenos, se observo una relación inversamente proporcional entre la concentración de éstos y el estatus nutricional de N y la producción de biomasa. Estos resultados nos sugieren la utilización de los pigmentos foliares como indicadores en plantas de tabaco del estatus nutricional de N, así como de la producción de biomasa.

VII. Referencias.

- Anderson EL. 1988.** Tillage and N fertilization effects on maize root growth and root:shoot ratio. *Plant Soil* 108: 245-251.
- Ayling SM, Brownlee C, Clarkson DT. 1994.** The cytoplasmic streaming response of tomato root hairs to auxin; observations of cytosolic calcium levels. *J. Plant Physiol.* 143: 184-188.
- Balachandran S, Hull RJ, Martins RA, Vaadia Y, Lucas WJ. 1997.** Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. *Plant Physiol.* 114: 475-481.
- Bharti N, Singh RP, Sinha SK. 1996.** Effect of calcium chloride on heavy metal induced alteration in growth and nitrate assimilation of *Sesamum indicum* seedlings. *Phytochem.* 41: 105-109.
- Blaser-Grill J, Knoppik D, Amberger A, Goldbach H. 1989.** Influence of boron on the membrane potential in *Elodea densa* and *Helianthus annuus* roots and H⁺ extrusion of suspension cultured *Daucus carota* cells. *Plant Physiol.* 90: 280-284.
- Bolaños L, Esteban E, de Lorenzo C, Fernández-Pascual M, de Felipe MR, Gárate A, Bonilla I. 1994.** Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*) rhizobium nodules. *Plant Physiol.* 104: 85-90.
- Bonilla I, Cadahia C, Carpena O, Hernando V. 1980.** Effects of boron on nitrogen metabolism and sugar levels of sugar beet. *Plant Soil* 57: 3.
- Bonilla I, Mateo P, Garate A. 1988.** Acción del boro sobre el metabolismo nitrogenado en *Lycopersicon esculentum* cv. Dombo, cultivado en hidroponía. *Agrochim.* 32: 276-284.
- Brunnemann KD, Hoffman D. 1982.** Pyrolytic origins of major gas phase constituents of cigarette smoke. *Rec. Adv. Tob. Sic.* 8: 103-140.
- Cakmak I. 1994.** Activity of ascorbate-dependent H₂O₂-scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium- and potassium-deficient leaves, but not in phosphorus-deficient leaves. *J. Exp. Bot.* 45: 1259-1266.
- Cakmak I, Römheld V. 1997.** Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil* 193: 71-83.
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Young VL. 1975.** Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 6: 71-80.
- DiTomaso JM, Hart JJ, Linscott DL, Kochian LV. 1992.** Effect of inorganic cations and metabolic inhibitors on putrescine transport in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiol.* 99: 508-514.
- Engels C, Marschner H. 1995.** Plant uptake and utilization of nitrogen. In: Nitrogen fertilization in the environment. Bacon PE. ed., Marcel Dekker Inc., New York.
- Ericsson T. 1995.** Growth and shoot:root ratio of seedlings in relations to nutrient availability. *Plant Soil* 168/169: 205-214.

- Ericsson T, Kähr M. 1995.** Growth and nutrition of birch seedlings at varied relative addition rates of magnesium. *Tree Physiol.* 15: 85-93.
- Fanizza G, Della Gatta C, Bagnulo C. 1991.** A non-destructive determination of leaf chlorophyll in *Vitis vinifera*. *Ann. App. Biol.* 119:203-205.
- Ferrol N, Donaire JP. 1992.** Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells. *Plant Sci.* 86: 41-47.
- Ferrol N, Belver A, Roldan M, Rodriguez-Rosales MP, Donaire JP. 1993.** Effects of boron on proton transport and membrane properties of sunflower cell microsomes. *Plant Physiol.* 103: 763-769.
- Fischer ES, Bremer E. 1993.** Influence of magnesium deficiency on rates of leaf-expansion, starch and sucrose accumulation, and net assimilation in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 89: 271-276.
- Fredeen AL, Rao IM, Terry N. 1989.** Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. *Plant Physiol.* 89: 225-230.
- Gaines TP, Csinos AS, Stephenson MG. 1983.** Grade index and yield correlations with chemical quality characteristics of flue-cured tobacco. *Tob. Sci.* 27: 101-105.
- Goddijn OJM, de Kam RJ, Zanetti A, Schilperoort RA, Hoge JHC. 1992.** Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Caranthus roseus*. *Plant Mol. Biol.* 18: 1113-1120.
- Goldbach H, Amberger A. 1986.** Influence of boron deficiency on ^3H indole-3yl-acetic acid uptake and efflux in cell cultures of *Daucus carota* L. *Plant Growth Regulat.* 4: 81.
- Goldbach H, Hartmann D, Rötzer T. 1990.** Boron is required for the ferricyanide-induced proton release by auxins in suspension cultured cells of *Daucus carota* and *Lycopersicum esculentum*. *Physiol. Plant.* 80: 114-118.
- Goodwin TW. 1980.** The biochemistry of carotenoids. Vol. I. Chapman & Hall, London.
- Hashimoto T, Yamada Y. 1992.** Tropane alkaloid biosynthesis: regulation application. In: Proc. 7th Annu. Penn. State Symp. Plant Physiol. Rockville. Am. Soc. Plant Physiol. Press.
- Hashimoto T, Yamada Y. 1993.** Nicotine and tropane alkaloids. In: Methods in plant biochemistry. Dey PM, Harborne JB. eds., Academic Press, London.
- Hashimoto T, Yamada Y. 1994.** Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 257-285.
- Hibi N, Fujita T, Hatano M, Hashimoto T, Yamada Y. 1992.** Putrescine N-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*. *Plant Physiol.* 100: 826-835.
- Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T, Yamada Y. 1994.** Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* 6: 723-735.

- Hogue E, Wilcow GE, Cantliffe DJ. 1970.** Effect of soil P on phosphate fraction in tomato leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95: 174-176.
- Iglesias AA, Podestá FE. 1996.** Photosynthate formation and partitioning in crop plants. In: *Handbook of photosynthesis in crop plants*. Pessarakli M. ed., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M. 1992.** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84: 55-60.
- Koltoff IM, Kuroda PK. 1951.** Determination of trace of chloride. *Ann. Chem.* 23: 1301-1306.
- Krom MD. 1980.** Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst.* 105: 305-316.
- Lachica M, Aguilar A, Yañez J. 1973.** Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidin. *Ann. Edaf. Agrobiol.* 32: 1033-1047.
- Leegood RC, Edwards GE. 1996.** Carbon metabolism and photorespiration: temperature dependence in relation to other environmental factors. In: *Photosynthesis and the environment*. Baker NR. ed., Kluwer Academic Publishers, Netherland.
- Leidi EO, Silberbush M, Soares MIM, Lips SH. 1992.** Salinity and nitrogen nutrition studies on peanut and cotton plants. *J. Plant Nutr.* 15: 591-604.
- López-Cantarero I, Lorente FA, Romero L. 1994.** Are chlorophylls good indicators of nitrogen and phosphorus levels?. *J. Plant Nutr.* 17: 979-990.
- Mackown CT, Sutton TG, Bush LP. 1990.** Nitrogen compositional changes in xylem exudate and leaves of burley tobacco. *Crop Sci.* 30: 133-138.
- Mackown CT. 1991.** Labeled-nitrate assimilation and nitrogen-15 export from leaves of burley tobacco. *Crop Sci.* 31: 1213-1217.
- Mackown CT, Sutton TG. 1997.** Recovery of fertilizer N applied to burley tobacco. *Agron. J.* 89: 183-189.
- Mackown CT, Sutton TG. 1998.** Using early-season leaf traits to predict nitrogen sufficiency of burley tobacco. *Agron. J.* 90: 21-27.
- McDonald AJ, Ericsson T, Larsson C. 1996.** Plant nutrition, dry matter gain and partitioning at the whole-plant level. *J. Exp. Bot.* 47: 1245-1253.
- Marschner H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Marschner H, Kirkby EA, Cakmak I. 1996.** Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J. Exp. Bot.* 47: 1255-1263.
- Miner GS, Sims JL. 1983.** Changing fertilization practices and utilization of added plant nutrients for efficient production of burley and flue-cured tobacco. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 9: 4-76.

- Obermeyer G, Kriechbaumer R, Strasser D, Maschessnig A, Bentrup FW. 1996.** Boric acid stimulates the plasma membrane H^+ -ATPase of ungerminated lily pollen grains. *Physiol. Plant.* 98: 281-290.
- Pasquali G, Goddijn OJM, de Waal A, Verpoorte R, Schilperoort RA. 1992.** Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol. Biol.* 18: 1121-1131.
- Peuke AD, Hartung W, Jeschke WD. 1994.** The uptake and flow of C, N, and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. II. Grown with low and high nitrate supply. *J. Exp. Bot.* 45: 733-740.
- Pollard AS, Parr AJ, Loughman BC. 1977.** Boron in relation to membrane function in higher plants. *J. Exp. Bot.* 28: 831-841.
- Ramón AM, Carpena Ruiz RO, Gárate A. 1989.** In vitro stabilization and distribution of nitrate reductase in tomato plants. Incidence of boron deficiency. *J. Plant Physiol.* 135: 126-128.
- Romero L, Belakbir A, Ragala L, Ruiz JM. 1997.** Response of plant yield and leaf pigments to saline conditions: The effectiveness of different rootstocks in melon plants (*Cucumis melo* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 43: 855-862.
- Ruiz JM, Romero L. 1998.** Ca impact on P and its main bioindicators. Response in the roots and leaves of *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Nutr.* 21: 2273-2285.
- Ruiz JM, Baghour M, Bretones G, Belakbir A, Romero L. 1998a.** Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): Role of boron as a possible regulatory factor. *Int. J. Plant Sci.* 159: 121-126.
- Ruiz JM, Bretones G, Baghour M, Belakbir A, Romero L. 1998b.** Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochem.* 48: 269-272.
- Ruiz JM, Rivero RM, Garcia PC, Baghour M, Romero R. 1999.** Role of $CaCl_2$ in nitrate assimilation in leaves and roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Sci.* En prensa.
- Rychter AM, Randall DD. 1994.** The effects of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiol. Plant.* 91: 383-388.
- Sato M, Asaine K. 1982.** Studies on the accumulation of nicotine-converting mutants in tobacco. III. A cotyledon-test method for the detection of nicotine-converting mutants. *Iwata Tob. Rep.* 14: 17-21.
- Saitoh F, Noma M, Kawashima N. 1985.** The alkaloid contents of sixty *Nicotina* species. *Phytochem.* 24: 477-480.
- Schon MK, Novacky A, Blevins DG. 1990.** Boron induces hyperpolarization of sunflower root cell membranes and increases membrane permeability to K^+ . *Plant Physiol.* 93: 566-571.
- Schumaker HM, Gundlach H, Fiedler F, Zenk MH. 1987.** Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Rep.* 6: 410-413.

- Shelp BJ. 1993.** Physiology and biochemistry of boron in plants. In: Boron and its role in crop production. Gupta UC, ed., CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Sims JL, Atkinson WO, Benner JF. 1979.** Nitrogen fertilization and genotype effects on selected constituents of smoke from all-burley cigarettes. *Tob. Sci.* 23: 11-13.
- Sims JL, Grove JH, Schlotzhauer WS. 1995.** Soluble calcium fertilizer effects on early growth and nutrition of burley tobacco. *J. Plant Nutr.* 18: 911-921.
- Sisson VA, Ruffy TW, Williamson RE. 1991.** Nitrogen-use efficiency among flue-cured tobacco genotypes. *Crop Sci.* 31: 1615-1620.
- Smeeton BW. 1987.** Genetic control of tobacco quality. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 13: 3-26.
- Smith FW, Jackson WA, van den Berg PJ. 1990.** Internal phosphorus flows during development of phosphorus stress in *Stylosanthes hamata*. *Aus. J. Plant Physiol.* 17: 451-464.
- Tabake MT, Yoneyama T, Inada K, Murakami T. 1990.** Spectral reflectance ratio of rice canopy for estimating crop nitrogen status. *Plant Soil.* 123: 295-297.
- Tang PM, de la Fuente RK. 1986.** Boron and calcium sites involved in indole-3-acetic acid transport in sunflower hypocotyl segments. *Plant Physiol.* 93: 1071.
- Thornley JHM. 1972.** A balanced quantitative model for root:shoot ratios in vegetative plants. *Ann. Bot.* 36: 431-441.
- van der Bonn J, Steenhuizen JW, Steingröver EG. 1990.** Growth and nitrate concentrations of lettuce as affected by total nitrogen and chloride concentration, NH_4/NO_3 ratio and temperature of the recirculating nutrient solution. *J. Hort. Sci.* 65: 309-321.
- Wellburn AR. 1994.** The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.
- Weybrew JA, Wan Ismail WA, Long RC. 1983.** The cultural management of flue-cured tobacco quality. *Tob. Sci.* 27: 56-61.
- Wilson JB. 1988.** A review of evidence on the control of shoot:root ratio, in relation to models. *Ann. Bot.* 61: 433-449.
- Wolf B. 1982.** A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 13: 1035-1059.
- Zekri M. 1991.** Effects of NaCl on growth and physiology of sour orange and Cleopatra mandarin seedlings. *Sci. Hort.* 47: 305-315.