



**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE LOS CÍTRICOS AL
EXCESO DE BORO. ESTUDIO DE PORTAINJERTOS Y
MICORRIZACIÓN**

Directores:

Dr. Francisco García Sánchez

Dr. Juan José Martínez Nicolás

Trabajo realizado por **Silvia Simón Grao** para optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

2015

Dr. FRANCISCO GARCÍA SÁNCHEZ, Científico Titular del Departamento de Nutrición Vegetal de Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC),

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE LOS CÍTRICOS AL EXCESO DE BORO. ESTUDIO DE PORTAINJERTOS Y MICORRIZACIÓN**” ha sido realizada por la doctoranda **D^a. Silvia Simón Grao**, bajo mi inmediata dirección y supervisión y la del Director del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández, el doctor **D. Juan José Martínez Nicolás**, en el Departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC; y que el Departamento ha dado conformidad para que sea presentada ante la comisión de Doctorando.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente a ____ de _____ de _____.

Fdo.: Dr. Francisco García Sánchez.

Científico Titular. Departamento de Nutrición Vegetal.
CEBAS-CSIC.



Dr. JUAN JOSÉ MARTÍNEZ NICOLÁS, Director del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE LOS CÍTRICOS AL EXCESO DE BORO. ESTUDIO DE PORTAINJERTOS Y MICORRIZACIÓN**” ha sido realizada por la doctoranda **D^a. Silvia Simón Grao**, bajo mi inmediata dirección y supervisión y la del doctor **D. Francisco García Sánchez**, en el Departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC, y que el Departamento ha dado conformidad para que sea presentada ante la comisión de Doctorando.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente a ____ de _____ de _____.

Fdo.: Dr. Juan José Martínez Nicolás.

Director del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología.
EPSO-UMH.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar querría agradecer a mi director de Tesis, el Dr. Francisco García Sánchez por la dedicación y apoyo que me ha brindado en la realización de este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que han facilitado la culminación de las mismas. Gracias por la oportunidad y la confianza ofrecida desde que llegué como “alumna en prácticas”. También agradecer a mi codirector de Tesis, el Dr. Juan José Martínez Nicolás por su gran ayuda y orientación, por la atención a mis consultas y por las sabias sugerencias recibidas.

Al director del Departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC, el Dr. Vicente Martínez López, así como al resto de miembros del mismo: Dra. Teresa Mestre, Reyes Ródenas, Lidia Olmos, José Antonio Esteban, Dr. Paco Rubio, Dra. Rosa Rivero, Javier Abrisqueta; gracias por vuestro apoyo profesional, personal y humano. Con vosotros he compartido momentos excepcionales, tanto dentro como fuera del CEBAS, que han hecho que esta etapa de mi vida sea única e irrepetible. Tere, Reyes, Lidia y José, sois los mejores amigos/compañeros que una podría haber deseado. También agradecer a mi ilustradora personal, Irene Olmos; pese a tu juventud, has plasmado de una manera sublime la esencia de esta tesis, te espera un gran futuro.

A esa gran familia que representa “Queremos piscina en la finca”: Laura, JuanSa, Mari “Muchamiel”, Joaquín, Marina, Javier, Fina Mari, Olmos, Santomera,...entre otros muchos. La gente viene y va, pero vosotros sois el claro ejemplo de que cuando alguien “se va”, los lazos de amistad que se forjan en esos largos días de trabajo duro en la finca son para siempre. A ti Fina Mari y a tu familia deciros que me siento privilegiada de haber podido compartir esta última etapa con vosotros, no solamente nos ha unido un trabajo y un esfuerzo, sino también un tupper de profiteroles; y dicen que “lo que une los profiteroles es para siempre”.

Muy especialmente agradecer a los doctores: Manolo Nieves, Vicente Lidón, Inma Simón, Vicente Gimeno y, por supuesto otra vez, a Paco García. Un trabajo de investigación es fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas, por ello estaré siempre en deuda con vosotros. Gracias por vuestra profesionalidad y por vuestra amabilidad. Pero sobre todo gracias por contestar a mis llamadas de socorro a cualquier hora. Por acudir a mis convocatorias, aunque fueran de un día para otro. Por llevarme “coca cola” y comida cuando se me han hecho las mil en la finca. Por hacer mil y una gestiones para facilitarme la faena. En conclusión gracias por haber estado y estar siempre ahí.

A Vito, Amadeo, Javi y “teacher Conor” por dejarme ser una ocupa ocasional en vuestro piso y en vuestras reuniones; a Isa, Irene, Juan Fran y Sonia por acogerme en vuestra mesa. Sois lo mejorcito del CEBAS.

A Afri y a Luis. Gracias por entendernos y, sobre todo, gracias por enseñarnos que el vino es más que un “liquidito rojo”...jajajaj. No olvidéis que lo tenemos que celebrar por todo lo alto en Pamplona.

Agradecer a mis compis de carrera y grandes amigas: Ana Rodríguez, Rebeca Aldeguer y Almudena Martínez. Gracias por preguntar: “¿Cuándo lees?” y acto seguido: “avísame pa` que vaya a verte”. Os echo de menos compis.

A esas grandes mujeres que componen “Femme de la famille”: mis tías Encarna, Ana y Vicky y mis primas Ana, Irene y María. Sois...sois...sois...unas locas, pero unas locas que recargan mi energía y mi alegría. Con vosotras el vaso es siempre “medio lleno”.

A Ángela y Gema, con vosotras el concepto amistad toma otra dimensión. Gracias por estar SIEMPRE ahí. Gracias por mil cosas, pero sobre todo gracias por preguntar e intentar entender lo que hacemos. Y no sufras Angelosa, que no se me ha olvidado que prometí mencionar tu inestimable ayuda tanto en la finca como en el laboratorio.

A mis padres (Jesús y Susi), a mi hermano (Alex) y a mi cuñía (Laury), sois la fuerza y energía que me anima a crecer cada día como persona y como profesional. Soy lo que soy gracias a vuestro amor incondicional y a vuestro inagotable sacrificio y, por todo ello, os estaré eternamente agradecida. “Todo esfuerzo obtiene su recompensa” y, sin ningún tipo de duda, este trabajo también es VUESTRO; gracias por esforzaros.

A mi sobrina, Lola Simón. Te has hecho esperar, pero has llegado justo a tiempo. Gracias, porque sin darte cuenta has contribuido en esta Tesis de la manera más especial, y esa contribución no es otra que hacer que tu tía quiera con todas sus fuerzas que te sientas ORGULLOSA de ella. ¡¡¡Vicente, Paco!!! aquí tenemos otra “Simón” más para la finca.

Y por último, pero no menos importante, a ti Félix. Gracias por ser mi compañero, mi mejor amigo, mi confidente. Por escuchar y entender. Por compartir esta etapa conmigo. Por enseñarme cada día cosas diferentes y extraordinarias que hacen mí día a día maravilloso. Por compartir conmigo a esa gran familia que tienes y que tan buenos momentos me hacen vivir (Mari Nieves, Juana Mari, Juan, Lola, Marcial, más nieves, es que sois muchoooooos...jajajaja). Gracias por hacerme siempre reír o por secar mis lágrimas de agobio e impotencia, por esos “chuchones” que tanto me gustan. Pero sobre todas las cosas, gracias por “jubar” siempre conmigo....YO SIEMPRE MÁS!!!

En definitiva, gracias a todos por haber formado parte y compartir esto conmigo. OS QUIERO.

RESUMEN

Las concentraciones de boro (B) en las aguas de riego procedentes de plantas de desalinizadoras, depuradoras, etc. podrían suponer un problema importante a corto plazo en la zona del Levante Español, ya que este elemento podría alcanzar niveles tóxicos para un gran número de nuestros cultivos, entre ellos los cítricos. La tolerancia de los cítricos a los estreses medioambientales como sequía, salinidad, inundación, deficiencias nutricionales dependen de una gran número de factores, pero uno de los principales es el portainjerto en el que se injerta la variedad. Por ello, es de gran importancia conocer la tolerancia relativa al exceso de boro de los portainjertos de cítricos utilizados en el levante español, para identificar cuáles son tolerantes o sensibles, así como abordar una serie de estrategias que nos permitan mejorar esta tolerancia en aquellos portainjertos más sensibles. Por ello, el objetivo principal de esta tesis fue mejorar la tolerancia de los cítricos al estrés por exceso de boro seleccionando portainjertos tolerantes, o mejorando los portainjertos sensibles mediante la micorrización. Para la consecución de este objetivo se plantearon tres experimentos. En el primer experimento se estudiaron los efectos del exceso de B (0,25 y 10 mg L⁻¹, aplicado como H₃BO₃ en la solución nutritiva) sobre los tres portainjertos más utilizados en la citricultura española: citrange Carrizo (CC), *Citrus macrophylla* (CM) y naranjo Amargo (NA). El segundo experimento consistió en comparar los portainjertos citrange Carrizo (CC), mandarino Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (híbrido entre mandarino Cleopatra × citrange Carrizo; F5) con tres tratamientos de boro: 0,25 (control), 5 y 10 mg L⁻¹. En el tercer experimento se evaluó la micorrización como una estrategia para mejorar la tolerancia al exceso de boro de las plantas de citrange Carrizo, regando con 0,25 (control), 5 y 10 mg L⁻¹ de B. En los tres experimentos se midieron parámetros de crecimiento vegetativo, intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas, nutrición mineral, solutos orgánicos y estrés oxidativo. Según los resultados, en el primer experimento se llegó a la conclusión que el portainjerto de NA fue el más tolerante, mientras que CC el más sensible al exceso de boro. Esto fue debido a que las plantas de NA acumularon una menor concentración de boro como consecuencia de la menor absorción de boro por las raíces y su transporte hacia la parte aérea con respecto a los otros dos portainjertos. Además, en el portainjerto NA detectamos un potente sistema

antioxidante capaz de contrarrestar los efectos tóxicos del boro. Al ver que las plantas de citrange Carrizo eran las menos tolerantes, se evaluó si la combinación de este portainjerto con mandarino Cleopatra (Forner-Alcaide nº 5) podría mejorar la tolerancia de citrange Carrizo. Los resultados obtenidos indicaron que efectivamente F5 presentó una mayor tolerancia al exceso de boro que su progenitor CC, aunque no mejoró dicha tolerancia con respecto a CL. No obstante, F5 podría ser un buen portainjerto para cítricos cultivados en condiciones de exceso de B, porque su raíz no muestra ninguna sensibilidad a la toxicidad del B. Por otro lado, se evaluó la micorrización como una estrategia más a corto plazo para mejorar la tolerancia al exceso de boro de variedades injertadas ya en citrange Carrizo. Se observó que las plantas micorrizadas son más tolerantes al exceso de boro ya que tuvieron una menor concentración de B en las hojas; y además, en estas plantas, su maquinaria fotosintética parece ser menos sensible a la concentración de B que las plantas no micorrizadas. Los datos de estos tres experimentos también nos permitieron conocer cómo afecta la toxicidad por boro a la asimilación neta de CO₂, y qué papel juegan los azúcares y el sistema antioxidante en los posibles mecanismos que tienen las plantas para reducir la sensibilidad a la toxicidad por boro en los cítricos.

SUMMARY

The concentrations of boron (B) in irrigation water coming from desalination and water treatment plants could become a major concern at a short term in the Spanish region of Mediterranean areas, since this element may reach toxic levels for many of their horticultural crops, including among them citrus trees. *Citrus* tolerance to environmental stresses such as drought, salinity, flooding, nutritional deficiencies depend on many factors, but one of them is the rootstock on which the scion is grafted. It is therefore very important to know the relative tolerance to boron excess of citrus rootstocks used in the Spanish, to identify which are tolerant or sensitive as well as address agronomical strategies that allow improving the tolerance of those more sensitive rootstocks. Therefore, the main objective of this thesis was to improve tolerance to stress excess boron in citrus trees selecting rootstocks tolerant, or improving sensitive rootstocks by mycorrhizae. To achieve these objective three independent experiments were carried out. In the first experiment, the effects of excess B (0,25 and 10 mg L⁻¹, applied as H₃BO₃ in the nutrient solution) over the three citrus rootstocks most used in the Spanish studied Carrizo citrange (CC), *Citrus macrophylla* and Sour orange (NA) was studied. The second experiment was done to compare rootstocks Carrizo citrange (CC), Cleopatra mandarin (CL) and Forner-Alcaide N° 5 (F5; hybrid of Cleopatra mandarin × Carrizo citrange) with three boron treatments: 0,25 (control), 5 and 10 mg L⁻¹. The third experiment, mycorrhizal colonization was evaluated as a strategy to improve the tolerance of Carrizo citrange plants, watered with 0,25 (control), 5 and 10 mg L⁻¹ B. In all three experiments parameters of vegetative growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, mineral nutrition, organic solutes and oxidative stress were measured. According to the results in the first experiment it was concluded that the NA rootstock was the most tolerant, while CC was the most sensitive to excess boron. This was because the NA plants accumulated a lower concentration of boron as a result of lower boron uptake by the roots and transport to the aerial part with respect to the other two rootstocks. In addition, in the rootstock NA was detected a powerful antioxidant system able to counteract the toxic effects of boron. As CC plants were less tolerant, we evaluated whether the combination of CC with CL rootstock (F5) could improve tolerance of citrange Carrizo. The results showed that effectively F5

showed a higher tolerance to excess boron relative to its parent CC, but it did not improve the tolerance with respect to CL. With this data, we concluded that F5 could be a good rootstock for citrus grown in conditions of excess B, because its root shows no sensitivity to the toxicity. On the other hand, the mycorrhizae were evaluated as a more short-term strategy to improve excess boron tolerance of grafted trees in CC. It was observed that mycorrhizal plants are more tolerant to excess boron as they had a lower concentration of B in leaves; and furthermore, in these plants the photosynthetic machinery appears to be less sensitive to the concentration of B relative to non-mycorrhizal plants. Data from these three experiments also let us know how it affects boron toxicity net CO₂ assimilation rate and the role the sugars and antioxidant system in the possible mechanisms of citrus plants to reduce sensitivity the toxicity of boron in their tissues.



**A mis abuelas:
Maruja “La Campusina” y Antonia “La Roja”**

**Me habéis regalado lo mejor de vosotras:
*fortaleza y bondad***



*"Para llegar a cualquier cosa que te propongas
hace falta primero la ambición y luego el talento,
el conocimiento y, finalmente, la oportunidad"*

El juego del Ángel

Carlos Ruíz Zafón

*"La raza humana necesita un desafío intelectual.
Debe ser aburrido ser Dios, y no tener nada que
descubrir"*

Stephen Hawking

Profesor de Matemáticas
(Universidad de Cambridge)



ÍNDICE

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

| | |
|--|-----------|
| 1.1. Consideraciones generales sobre el boro | 3 |
| 1.2. Origen, contenido y formas del boro en el suelo | 4 |
| 1.2.1. Fuentes naturales de boro y su distribución | 4 |
| 1.2.2. Dinámica de boro en el suelo. Factores influyentes..... | 5 |
| 1.2.2.1. <i>Textura del suelo</i> | 5 |
| 1.2.2.2. <i>pH y componentes del suelo</i> | 6 |
| 1.2.2.3. <i>Factores climáticos</i> | 8 |
| 1.2.3. Influencia de la actividad humana..... | 8 |
| 1.3. El boro en las plantas | 11 |
| 1.3.1. Un nutriente esencial..... | 11 |
| 1.3.2. Funciones del boro en las plantas..... | 12 |
| 1.3.2.1. <i>Función estructural</i> | 12 |
| 1.3.2.2. <i>Elongación de la raíz, metabolismo de ácidos nucleicos y síntesis proteica</i> | 13 |
| 1.3.2.3. <i>Metabolismo de glúcidos</i> | 15 |
| 1.3.2.4. <i>Otras funciones importantes</i> | 16 |
| 1.3.3. Absorción y transporte de boro en plantas | 17 |
| 1.3.3.1. <i>Absorción rápida de boro por las plantas</i> | 17 |
| 1.3.3.2. <i>Rutas de entrada y salida del boro en las células</i> | 18 |
| 1.3.3.3. <i>Función principal de los transportadores de boro</i> | 20 |
| 1.3.3.4. <i>Distribución de boro en las plantas sin necesidad de transportadores de membrana</i> | 21 |
| 1.4. Toxicidad por boro en las plantas | 23 |
| 1.4.1. Síntomas visuales | 23 |
| 1.4.2. Daños internos a nivel celular y vascular..... | 25 |
| 1.4.3. Causas de la toxicidad por boro | 27 |
| 1.4.4. Mecanismos de tolerancia al exceso de boro | 29 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1.4.4.1. | Mecanismos de tolerancia en raíz..... | 29 |
| 1.4.4.2. | Mecanismos de tolerancia en hoja..... | 31 |
| 1.5. | Metabolismo antioxidante en plantas | 32 |
| 1.5.1. | Sistemas antioxidantes en las células vegetales | 32 |
| 1.5.2. | Boro y estrés oxidativo..... | 34 |
| 1.6. | El cultivo de los cítricos | 35 |
| 1.6.1. | Importancia de los cítricos a nivel mundial y nacional | 35 |
| 1.6.2. | El portainjerto..... | 36 |
| 1.6.3. | Requerimiento de boro en los cítricos | 39 |
| 1.7. | Las micorrizas y el boro | 40 |
| 1.7.1. | Aspectos generales de las micorrizas arbusculares (MA)..... | 40 |
| 1.7.2. | Beneficios de las micorrizas en la nutrición de las plantas | 41 |
| 1.7.3. | Endomicorrizas en cítricos: <i>Glomus intraradices</i> Schenck & Smith..... | 43 |
| 1.7.4. | Micorrizas y Boro..... | 44 |
| 1.7.4.1. | Papel del boro en la simbiosis planta-hongo | 44 |
| 1.7.4.2. | Captación y movilidad del boro por el micelio fúngico | 46 |
| 1.8. | Bibliografía..... | 49 |

Capítulo 2: OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

| | | |
|-------------|------------------------------|-----------|
| 2.1. | Objetivos..... | 61 |
| 2.2. | Plan de trabajo | 62 |

Capítulo 3: ESTUDIO DE LA TOLERANCIA DE LOS PORTAINJERTOS CITRANGE CARRIZO, NARANJO AMARGO Y *CITRUS MACROPHYLLA* A LA TOXICIDAD POR BORO

| | | |
|-------------|--------------------------------|-----------|
| 3.1. | Introducción | 67 |
| 3.2. | Material y Métodos..... | 68 |
| 3.2.1. | Material Vegetal..... | 68 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.2.2. | Descripción del invernadero y condiciones del cultivo | 69 |
| 3.2.3. | Concentración de boro en la solución nutritiva | 70 |
| 3.2.4. | Determinaciones analíticas | 71 |
| 3.2.4.1. | <i>Parámetros de crecimiento</i> | 71 |
| 3.2.4.2. | <i>Parámetros de intercambio gaseoso</i> | 72 |
| 3.2.4.3. | <i>Parámetros de fluorescencia de clorofilas</i> | 72 |
| 3.2.4.4. | <i>Determinación de la concentración de nutrientes minerales</i> | 76 |
| 3.2.4.5. | <i>Determinación de la concentración de prolina</i> | 77 |
| 3.2.4.6. | <i>Determinación de la concentración de compuestos de amonio cuaternarios (CAQ)</i> | 78 |
| 3.2.4.7. | <i>Determinación de la concentración de carbohidratos</i> | 78 |
| 3.2.4.8. | <i>Determinación del metabolismo antioxidante en hoja</i> | 80 |
| 3.2.4.8.1. | Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y de malonildialdehído (MDA) | 80 |
| 3.2.4.8.2. | Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes | 81 |
| 3.2.5. | Diseño experimental y análisis estadístico. | 83 |
| 3.3. | Resultados | 84 |
| 3.3.1. | Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro | 84 |
| 3.3.2. | Parámetros de crecimiento..... | 85 |
| 3.3.3. | Concentración boro en los diferentes tejidos de las plantas | 89 |
| 3.3.4. | Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas..... | 94 |
| 3.3.5. | Concentración de nutrientes minerales | 100 |
| 3.3.6. | Concentración de carbohidratos..... | 102 |
| 3.3.7. | Concentración de prolina y CAQ..... | 106 |
| 3.3.8. | Concentración de H ₂ O ₂ y MDA..... | 109 |
| 3.3.9. | Actividad de las enzimas antioxidantes | 110 |
| 3.4. | Discusión | 112 |
| 3.4.1. | Plantas del portainjerto naranjo Amargo son más tolerantes al exceso de boro en la solución nutritiva que <i>Citrus macrophylla</i> o citrange Carrizo | 112 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.2. Plantas del portainjerto citrange Carrizo tuvieron una concentración foliar de boro más alta que los portainjertos <i>Citrus macrophylla</i> o naranjo Amargo lo que puedo determinar su distinta tolerancia | 113 |
| 3.4.3. El boro es un nutriente poco móvil en los portainjertos de cítricos acumulándose principalmente en las hojas adultas | 115 |
| 3.4.4. La disminución de la A_{CO_2} fue mayor en las plantas de citrange Carrizo, seguido de <i>Citrus macrophylla</i> y naranjo Amargo..... | 116 |
| 3.4.5. De los tres portainjertos ensayados las plantas de naranjo Amargo fueron las que mostraron una mayor sistema antioxidante debido a una alta actividad APX y SOD | 117 |
| 3.4.6. El exceso de boro en la solución nutritiva disminuyó la concentración de prolina y aumentó la concentración de GB en naranjo Amargo y <i>Citrus macrophylla</i> | 119 |
| 3.4.7. La concentración de azúcares solubles disminuyó por el exceso de boro, aunque la relación entre los azúcares reductores/azúcares totales dependió del portainjerto | 121 |
| 3.4.8. El exceso de boro en la solución nutritiva disminuyó la concentración foliar de Ca y Mg pero sin llegar a rangos de deficiencia | 122 |
| 3.5. Bibliografía..... | 123 |

Capítulo 4: ESTUDIO DE LA TOLERANCIA DE LOS PORTAINJERTOS CITRANGE

CARRIZO, MANDARINO CLEOPATRA Y FORNER-ALCAIDE N° 5 A LA TOXICIDAD POR BORO

| | |
|---|------------|
| 4.1. Introducción | 133 |
| 4.2. Materiales y Métodos..... | 134 |
| 4.2.1. Material Vegetal..... | 134 |
| 4.2.2. Descripción del invernadero y condiciones de cultivo | 135 |
| 4.2.3. Concentraciones de boro en la solución nutritiva | 136 |
| 4.2.4. Determinaciones analíticas | 137 |
| 4.2.4.1. <i>Parámetros de crecimiento</i> | 137 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.4.2. <i>Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas.....</i> | 137 |
| 4.2.4.3. <i>Determinación de la concentración de nutrientes minerales.....</i> | 137 |
| 4.2.4.4. <i>Determinación de la concentración de prolina, compuestos amoniocuaternarios (CAQ) y carbohidratos</i> | 137 |
| 4.2.4.5. <i>Determinación del metabolismo antioxidante en hoja.....</i> | 138 |
| 4.2.5. <i>Análisis estadístico</i> | 138 |
| 4.3. Resultados..... | 138 |
| 4.3.1. <i>Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro</i> | 138 |
| 4.3.2. <i>Parámetros de crecimiento.....</i> | 139 |
| 4.3.3. <i>Concentración boro en los diferentes tejidos de las plantas</i> | 142 |
| 4.3.4. <i>Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas.....</i> | 145 |
| 4.3.5. <i>Concentración de nutrientes minerales</i> | 151 |
| 4.3.6. <i>Concentración de carbohidratos.....</i> | 155 |
| 4.3.7. <i>Concentración de CAQ y prolina.....</i> | 160 |
| 4.3.8. <i>Concentración de H₂O₂ y MDA</i> | 162 |
| 4.3.9. <i>Actividad de las enzimas antioxidantes</i> | 163 |
| 4.4. Discusión..... | 166 |
| 4.4.1. <i>Mandarino Cleopatra fue el portainjerto más tolerante al exceso de boro, mientras que citrange Carrizo fue el más sensible</i> | 166 |
| 4.4.2. <i>La mayor concentración de boro en las hojas se dio en plantas del portainjerto citrange Carrizo, lo que se puede relacionar con su menor tolerancia al exceso de boro</i> | 167 |
| 4.4.3. <i>Alta concentración de boro altera las funciones fotosintéticas de las hojas, aunque estas alteraciones dependen del portainjerto.....</i> | 170 |
| 4.4.4. <i>La toxicidad por boro afectó a la eficiencia cuántica del PSII solamente en hojas del portainjerto mandarino Cleopatra.....</i> | 171 |
| 4.4.5. <i>Las hojas del portainjerto mandarino Cleopatra tienen un potente sistema antioxidante tanto en condiciones control como con exceso de boro basado en una alta actividad CAT y GR</i> | 172 |

| | |
|--|------------|
| 4.4.6. La disminución de la concentración de prolina en las hojas parece que ser que es una respuesta generaliza en plantas de cítricos en condiciones de toxicidad por boro | 173 |
| 4.4.7. Respuesta nutricional de los portainjertos al exceso de boro | 175 |
| 4.5. Bibliografía | 176 |

Capítulo 5: ESTUDIO DE LA TOLERANCIA DEL PORTAINJERTO CITRANGE CARRIZO MICORRIZADO A LA TOXICIDAD POR BORO

| | |
|---|------------|
| 5.1. Introducción | 183 |
| 5.2. Materiales y métodos | 183 |
| 5.2.1. Material Vegetal: citrange Carrizo..... | 183 |
| 5.2.2. Inoculación de las plantas con cepas de <i>Glomus intraradices</i> | 184 |
| 5.2.3. Descripción del invernadero y condiciones de cultivo | 184 |
| 5.2.4. Concentración de boro en la solución nutritiva | 185 |
| 5.2.5. Determinaciones analíticas | 186 |
| 5.2.5.1. <i>Parámetros de crecimiento</i> | 186 |
| 5.2.5.2. <i>Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas</i> | 186 |
| 5.2.5.3. <i>Determinación de nutrientes minerales en los diferentes tejidos de la planta</i> | 187 |
| 5.2.5.4. <i>Determinación de la concentración de prolina, compuestos amoniocuaternarios (CAQ) y carbohidratos</i> | 187 |
| 5.2.5.5. <i>Determinación del metabolismo antioxidante en hoja</i> | 187 |
| 5.2.5.6. <i>Determinación del porcentaje de colonización micorrícica</i> | 187 |
| 5.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico | 189 |
| 5.3. Resultados..... | 189 |
| 5.3.1. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro | 189 |
| 5.3.2. Porcentaje de colonización micorrícica | 190 |
| 5.3.3. Parámetros de crecimiento | 192 |
| 5.3.4. Concentración boro en los diferentes tejidos de las plantas | 195 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 5.3.5. | Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas..... | 198 |
| 5.3.6. | Concentración mineral foliar y radicular en la planta..... | 202 |
| 5.3.7. | Concentración de solutos orgánicos | 204 |
| 5.3.8. | Concentración de MDA y H ₂ O ₂ | 209 |
| 5.3.9. | Actividad de las enzimas antioxidantes. | 210 |
| 5.4. | Discusión..... | 211 |
| 5.4.1. | Las altas concentraciones de boro en la solución nutritiva no afectaron al porcentaje de micorrización, pero sí a la proliferación del hongo en las raíces.. | 211 |
| 5.4.2. | Las plantas micorrizadas fueron más tolerantes al exceso de boro que las no-micorrizadas, debido a que las +MA tuvieron una menor concentración de boro en las hojas | 215 |
| 5.4.3. | El boro en las plantas de citrange Carrizo es poco móvil entre sus diferentes tejidos y su entrada parece que es mediada por un proceso pasivo | 217 |
| 5.4.4. | La maquinaria fotosintética de las plantas no-micorrizadas es más sensible a la toxicidad por boro que las plantas micorrizadas..... | 218 |
| 5.4.5. | La relación entre los azúcares solubles y reductores parece ser que juega un papel decisivo en la mayor tolerancia de las plantas micorrizadas al exceso de boro | 221 |
| 5.4.6. | La disminución de prolina por el exceso de boro en plantas no micorrizadas podría dar una idea de la enorme sensibilidad de citrange Carrizo a este estrés..... | 224 |
| 5.4.7. | El estado nutricional de las plantas fue apenas afectado por los tratamientos con exceso de B o la micorrización. | 225 |
| 5.5. | Bibliografía..... | 225 |

Capítulo 6: CONCLUSIONES

| | | |
|------------|---|------------|
| 6.1 | <u>Conclusiones experimento 1:</u> <i>Estudio de la tolerancia de los portainjertos citrange Carrizo, <u>Citrus macrophylla</u> y naranjo Amargo a la toxicidad por boro</i> | 233 |
| 6.2 | <u>Conclusiones experimento 2:</u> <i>Estudio de la tolerancia de los portainjertos citrange Carrizo, mandarino Cleopatra y el híbrido Forner-Alcaide n°5 a la toxicidad por boro.....</i> | 234 |

6.3 Conclusiones experimento 3: *Estudio de la tolerancia del portainjerto citrange Carrizo micorrizado a la toxicidad por boro.*235

ANEXOS

ANEXO I. Índice de Tablas 239

ANEXO II. Índice de Figuras 245

ANEXO III. Índice de Ilustraciones 253



Capítulo 1

Introducción



1.1. Consideraciones generales sobre el boro

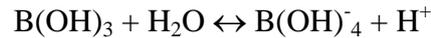
El boro (B) se aisló por primera vez con una pureza del 80% en 1808 por Gay Lussac y Thernard, pero no fue identificado como elemento químico hasta el año 1824 por Jöns Jacob Berzelius. Este elemento presenta dos isótopos estables en la naturaleza con una masa atómica de 10 y 11, los cuales se encuentran aproximadamente en una proporción de 20:80 que lo lleva a presentar una masa atómica media de unos 10,81 g mol⁻¹.

Tabla 1.1. Principales características físico-químicas del boro.

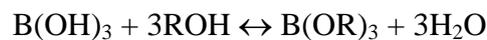
| | | | |
|-----------------|--------------------------------------|-----------------------|--|
| Símbolo químico | B | Electrones por capa | 2,3 |
| Número atómico | 5 | Estados de oxidación | 3 (levemente ácido) |
| Grupo | 13 | Estructura cristalina | Romboédrica |
| Periodo | 2 | Estado | Sólido |
| Aspecto | Negro | Punto de fusión | 2349 K |
| Bloque | P | Punto de Ebullición | 4200 K |
| Densidad | 2460 Kg/m ³ | Calor de fusión | 50,2 kJ/mol |
| Masa atómica | 10.811u | Presión de vapor | 0,348 |
| Radio medio | 85 pm | Electronegatividad | 2,04 |
| Radio atómico | 87 | Calor específico | 1026 J/(K·Kg) |
| Radio covalente | 82 pm | Conductividad | 1,0 × 10 ⁻⁴ m ⁻¹ S/m |
| Configuración | [He] 2s ² 2p ¹ | Conductividad térmica | 27,4 W/(K·m) |

Como podemos ver en la Tabla 1.1, el boro es un elemento trivalente, metaloide y semiconductor que se localiza en el grupo IIIA de la tabla periódica y que presenta un pequeño átomo de número atómico 5. De acuerdo con su configuración electrónica (1s²2s²2p¹) posee tan sólo tres electrones en su capa más externa, esto hace que el B sea a menudo definido como un elemento “*deficiente en electrones*”.

Su pequeño tamaño y su elevado potencial iónico tan sólo le permiten formar enlaces covalentes, fundamentalmente con átomos de oxígeno. El número de coordinación del B (número de átomos dadores enlazados al átomo central) suele ser de 3 o 4. En la naturaleza se encuentra en forma de ácido bórico (H₃BO₃), borato [B(OH)₄] o como mineral borosilicato. El ácido bórico se comporta como un ácido débil de Lewis en solución acuosa, de manera que acepta iones hidróxido y libera protones de acuerdo con la siguiente ecuación (pK_a = 9,24 a 25 °C):



La disociación del ácido bórico está por tanto determinada por el pH, de manera que por encima de un pH de 9,24 el B se encuentra fundamentalmente en forma de anión $[\text{B(OH)}_4]^-$, mientras que a pH ácido o bien cerca de un pH neutro, como ocurre en la mayoría de los fluidos biológicos, predomina en forma de ácido bórico. El ácido bórico también se caracteriza por reaccionar con alcoholes formando ésteres de B:



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

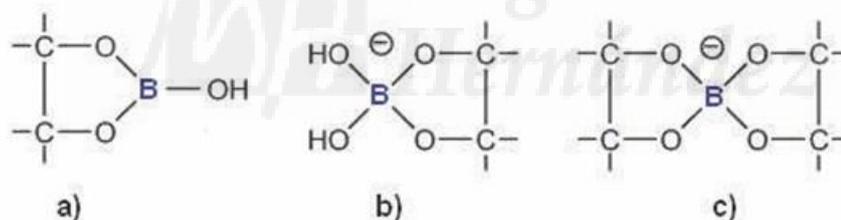


Figura 1.1. Ester mono borato *cis*-diol (a), complejo monoborato (b) y complejo *bis*(diol) (c). Fuente: (Bolaños y col., 2004).

1.2. Origen, contenido y formas del boro en el suelo

1.2.1. Fuentes naturales de boro y su distribución

La fuente principal de B en el suelo es la turmalina, mineral completamente insoluble y muy resistente al humedecimiento. Desde el punto de vista químico, es un borosilicato que contiene aproximadamente un 3% de boro y cantidades variables de hierro, aluminio, magnesio, calcio, litio y sodio. La liberación de este material bajo la forma de boratos es lentísima, y ello explica por qué la turmalina nativa del suelo no puede suministrar las cantidades que los cultivos requieren en régimen intensivo y prolongado. También, el agua de mar es una fuente de B. En los suelos de las zonas

costeras suelen hallarse cantidades de este elemento hasta cincuenta veces superiores a las presentes en suelos interiores.

En la mayor parte de los suelos el B se encuentra en cantidades extremadamente pequeñas, oscilando entre 2 y 100 ppm. La mayor parte no es utilizable por las plantas. La forma asimilable (soluble en agua caliente) solo alcanza un rango comprendido entre 0,4 y 5 ppm, y es suministrada por la fracción orgánica. Los suelos con cantidades tóxicas para la vegetación son escasos en número y suelen presentarse en regiones áridas o en zonas regadas con aguas con alta concentración de B. Hay que tener en cuenta el hecho de que la intensificación en la agricultura es cada vez mayor lo cual implica una continua extracción del elemento del suelo, y por tanto la posibilidad de un empobrecimiento de sus reservas y, consecuentemente, el aumento de estados deficitarios en los cultivos. A esto hay que unir la circunstancia de que los fertilizantes actuales llevan cada vez menos impurezas, y el aporte, por tanto, de oligoelementos en general, y el caso del boro en particular, ha dejado de producirse. El umbral de deficiencia se puede establecer en 0,5 ppm, aunque depende gradualmente del pH y del contenido en materia orgánica del suelo.

1.2.2. Dinámica de boro en el suelo. Factores influyentes

El movimiento del boro en el suelo está regulado por diversos factores que se hallan íntimamente relacionados entre sí. No se puede por ello efectuar una separación específica de cada uno y señalar su particular influencia. En su conjunto vamos a destacar: la textura del suelo, pH, concentración presente en el suelo, temperatura y la naturaleza de los componentes del suelo.

1.2.2.1. *Textura del suelo*

Los suelos de textura gruesa son pobres en boro hidrosoluble, ya que de ellos es fácilmente lixiviable y desplazable a las capas más profundas. Esta eliminación, depende como es lógico del agua que reciban. En cambio, los suelos de textura fina tienden a retener el boro añadido durante períodos de tiempo más largos (Wear y Patterson, 1962). Este hecho, no implica necesariamente que las plantas absorban el elemento fijado en las arcillas en cantidades mayores al presente en los arenosos, a iguales concentraciones de boro hidrosoluble. En realidad es al contrario. Se ha

comprobado que cuando esto se cumple, las plantas toman más cantidad de boro en suelos arenosos que en suelos de textura fina.

1.2.2.2. pH y componentes del suelo

Numerosas investigaciones han orientado sus trabajos al estudio de los mecanismos por los cuales este oligoelemento queda retenido en el suelo. Mayoritariamente se admite que este proceso depende fundamentalmente del pH del suelo y de la naturaleza de sus componentes. La opinión más extendida es que los máximos responsables de la adsorción son los óxidos de aluminio y hierro que forman parte del suelo, y que al aumentar el pH se incrementa la adsorción, alcanzando un máximo en la zona alcalina.

En condiciones de pH bajas, el boro hidrosoluble se encuentra fundamentalmente en la forma molecular H_3BO_3 en la disolución del suelo, es decir, está muy poco dissociado y, por tanto, prácticamente no queda adsorbido en los coloides. Esto puede ser la razón por la que este oligoelemento es lixiviado tan fácilmente en estas condiciones. Pero al aumentar el pH, la adsorción tiende a manifestarse, y va aumentando hasta alcanzar un máximo entre 7 y 9, para disminuir rápidamente con mayores aumentos de alcalinidad, hasta el punto de que a pH=10 ya es mínima. Este proceso puede explicarse si se tiene en cuenta que la forma H_3BO_3 , al aumentar el pH, tiende a ser aceptor de OH^- , apareciendo entonces la forma ionizada $B(OH)_4^-$:



Esta forma, por un simple cambio aniónico de sus hidroxilos con los de los hidróxidos de hierro y aluminio, o bien por formación de un complejo borato-diol, pasa a formar parte de un polímero. Es evidente que al ir aumentando el pH del suelo aumentará la concentración de $B(OH)_4^-$, ya que el equilibrio se ve desplazado hacia la formación de la forma iónica, incrementándose así el poder de fijación. La inflexión que se produce a pH cercano a 9 quedaría explicada por el mayor aumento de OH^- , que desplazaría la reacción de polimerización hacia la izquierda, dando lugar a la desorción de $B(OH)_4^-$ de los hidróxidos donde estaban adsorbidos. Otra razón posible es la competencia que se origina entre los OH^- y $B(OH)_4^-$ por los lugares de

adsorción, que a un pH suficientemente alcalino favorecería a los OH^- . Estos dos motivos justificarían que a un pH superior a 9 no se produzcan prácticamente adsorciones de boro en los suelos. Es digno de señalar, asimismo, que la adsorción del boro por los hidróxidos de aluminio es notablemente superior a la ejercida por los correspondientes de hierro.

La adsorción de boro por las arcillas silíceas se considera que ocurre en una proporción mucho más baja que en los hidróxidos de hierro y aluminio, y concretamente las que son expansibles. Experimentos realizados con montmorillonita lavada (libre de hidróxidos) y no lavada muestran una retención muy baja de boro en el primer caso, y un notable aumento en el segundo (Sims y Bingham, 1967). Ello hace suponer que el poder de adsorción de las arcillas silíceas está supeditado a las distintas formas de hierro y aluminio que pueden estar presentes, como a impurezas entre las unidades cristalinas que las constituyen.

El boro puede también ser fijado por la materia orgánica, ya que los grupos hidroxilo de las sustancias húmicas pueden unirse con el ácido bórico. Se cree que esta retención es más firme que la de los hidróxidos de hierro y aluminio, en condiciones neutras o ácidas. Debido a esta fijación se necesitan mayores cantidades de boro para producir toxicidad en las plantas que crecen en suelos con alto contenido de materia orgánica.

La posible influencia del calcio y potasio del suelo en este proceso de adsorción del boro ha sido también objeto de estudio. La posibilidad de que tenga lugar una disminución del elemento asimilable en presencia del Ca^{+2} , por formarse meta-boratos insolubles, es más bien escasa, ya que el $\text{Ca}(\text{BO}_2)_2$ sólo puede originarse en disoluciones concentradas de borato, situación difícil de encontrar en el suelo. Además, el meta-borato cálcico se redisuelve fácilmente. La influencia que el calcio puede ejercer en la fijación del boro parece estar orientada en primer lugar por el aumento de pH, que se produce si la sal de calcio que existe o se añade es carbonato. En segundo lugar hay que considerar la posibilidad de que la adsorción del boro se lleve a cabo a través del calcio como intermediario, particularmente cuando éste se encuentra adsorbido en una proporción elevada al coloide del suelo:



Por otra parte, la adición de potasio debería aumentar la disponibilidad del boro en el suelo, debido a la formación de tetraborato potásico, de gran solubilidad. Sin embargo, se ha encontrado que para valores altos de pH, el potasio disminuye la solubilidad del boro (Kumar y col., 1981). Por ello, los cultivos que reciben una fuerte fertilización potásica tienen mayor necesidad de boro.

1.2.2.3. Factores climáticos

La temperatura y la humedad del suelo son factores también a considerar en la fijación del boro. La influencia de la temperatura es de menor cuantía que la de los factores anteriormente expuestos. Algunos trabajos experimentales en los que han estudiado un rango de temperaturas entre 10 y 45 °C, han observado disminución en la fijación con el incremento de la temperatura. El hecho puede explicarse admitiendo en estos casos un aumento de la desorción.

Una mayor influencia la ejerce el contenido de agua del suelo. La deficiencia de boro, en determinados cultivos, se acelera en condiciones de extrema sequedad. Este comportamiento, ampliamente observado en campo, aunque no está totalmente aclarado, parece estar relacionado con la proporción de materia orgánica descompuesta, ya que durante periodos de sequía la actividad microbiana es reducida y hay menos destrucción de materia orgánica. También puede ser debido, en parte, a una menor proliferación de las raíces en estos suelos. En general, la deficiencia de boro se manifiesta mayoritariamente en suelos secos y pobres en materia orgánica.

1.2.3. Influencia de la actividad humana

La manipulación de los recursos naturales que contienen boro por parte del hombre en sus diferentes actividades industriales es uno de los principales factores que producen la contaminación por boro tanto en suelos como en los diferentes recursos hídricos. Aunque existen unos 200 tipos diferentes de minerales que contienen B solo los que se indican en la tabla 1.2 tienen importancia comercial (WHO, 2004). De todos estos destaca el borax, colemanita y ulexita que son extraídos de manera extensiva. El Borax y el ácido bórico son los que se suelen utilizar como fertilizantes, siendo este último aplicado directamente tanto al suelo como a las hojas (Parks y Edwards, 2005).

Tabla 1.2. Productos de boro de mayor a menor uso (WHO, 2004).

| Substancia | Fórmula | Nº CAS |
|--|---|------------|
| Bórax pentahidratado | $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | 12179-04-3 |
| Bórax | $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4]\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ | 1303-96-4 |
| Ulexita | $\text{NaCa}[\text{B}_5\text{O}_6(\text{OH})_6]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 1319-33-1 |
| Colemanita | $\text{Ca}[\text{B}_3\text{O}_4(\text{OH})\cdot \text{H}_2\text{O}]$ | 1318-33-8 |
| Perborato sódico tetrahidratado | $\text{Na}_2[\text{B}_2\text{O}_4(\text{OH})_4]$ | 10486-00-7 |
| Perborato sódico monohidratado | $\text{Na}_2[\text{B}_2\text{O}_4(\text{OH})_4]$ | 10332-33-9 |
| Ácido bórico | $\text{B}(\text{OH})_3$ | 10043-35-3 |
| Bórax anhídrido (tetraborato de disodio) | $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (amorfo) | 1330-43-4 |
| Óxido bórico | B_2O_3 (amorfo) | 1303-86-2 |
| Boro | B | 7440-42-8 |

Nº CAS: número de registro para productos químicos.

Los compuestos de boro, además de ser utilizados como fertilizantes, tienen una multitud de usos como manufacturación de vidrio, cerámicas, retardantes de fuego, jabones, detergentes, cosméticos, compuestos farmacéuticos y pesticidas entre otros (Malina, 2004).

En las últimas décadas se ha incrementado la extracción de B con fines industriales. Tanto en el proceso de extracción de B en las minas como durante la fabricación de los productos derivados, se producen fugas y se libera una gran cantidad de B al medio ambiente. El vertido de compuestos con alto contenido en B durante la producción y uso de detergentes, como por ejemplo el perborato sódico, ha dado lugar a su acumulación en ambientes acuáticos ya que estos compuestos suelen ser solubles en agua. Por esta razón, en el agua subterránea los niveles de B pueden incluso superar los 5 mg L^{-1} (Parks y Edwards, 2005).

Otro aspecto de suma importancia que puede contribuir a la acumulación de B en el suelo es la utilización de agua desalinizada en las explotaciones agrarias; ya que uno de los principales reservorios de B son los océanos (Shaffer y col., 2012). En general, el agua desalinizada no presenta una concentración de B que afecte de forma negativa a la salud humana, pero sí a la mayoría de las plantas, a menos que el B sea retirado de forma eficiente durante el proceso de desalinización (Parks y Edwards, 2005). En un ambiente ácido o neutro el B pasa fácilmente a través de las membranas de ósmosis reversa de las plantas desalinizadoras. Sin un tratamiento especial

adicional, el agua desalinizada obtenida a partir de agua del mar Mediterráneo puede alcanzar una concentración de 2 mg L^{-1} de B, niveles que son tóxicos para un gran número de cultivos (Nable y col., 1997).

En los últimos años la desalinización ha sido reconocida como una de las principales vías para obtener recursos hídricos que abastezcan a todos los sectores derivados del incremento de la población (Elimelech y Phillip, 2011), como por ejemplo el creciente turismo en las áreas de costa o la agricultura intensiva, cuya demanda de agua se ha visto impulsada por las sequías severas en muchas zonas áridas tales como la región Mediterránea (Voutchkov, 2005).

Según “DesalData”, España es el cuarto país del mundo en la producción de agua desalada (Tabla 1.3) con una producción diaria de $5,24 \text{ Hm}^3$, lo que representa un 8% de toda el agua desalada que se produce en el mundo.

Tabla 1.3. Países con mayor producción de agua desalada del mundo (DesalData, 2015).

| País | Capacidad de Producción ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$) | Capacidad total mundial (%) |
|------------------------|---|-----------------------------|
| Arabia Saudí | 10.759.693 | 17 |
| Emiratos Árabes Unidos | 8.428.256 | 13.4 |
| Estados Unidos | 8.133.415 | 13 |
| España | 5.249.536 | 8 |
| Kuwait | 2.876.625 | 5 |
| Argelia | 2.675.985 | 4 |
| China | 2.259.741 | 4 |
| Qatar | 1.712.886 | 3 |
| Japón | 1.493.158 | 3 |
| Australia | 1.184.812 | 2 |

Esta agua desalada procede en un 62% del agua de mar, mientras que un 38% lo es de agua salobre de pozos subterráneos; aunque estos porcentajes pueden variar según la zona. Generalmente, esta agua desalada va destinada en su mayor parte al abastecimiento humano (67%), y a la industria (23%), y solamente un 10% va destinada a la agricultura. Sin embargo, el uso de esta fuente de agua para la agricultura podría incrementarse de forma significativa en los próximos años, ya que se ha demostrado que su uso directo es factible en las producciones agrícolas si se

aplican técnicas de riego eficaces y se rebaja el coste de su producción mediante subvenciones (Vargas-Amelin y Pindado, 2014).

1.3. El boro en las plantas

1.3.1. Un nutriente esencial

La esencialidad del boro para el desarrollo de las plantas fue demostrada por primera vez en leguminosas por Warington (1923). El boro es un micronutriente esencial para plantas vasculares, diatomeas y algunas especies de algas verdes. No parece ser esencial para hongos y bacterias (con la excepción de las cianobacterias) ni tampoco para animales.

El boro es absorbido por las plantas en distintas formas del ácido bórico: $B_4O_7^{-2}$, BO_3^{-3} , HBO_3^{-2} o $H_2BO_3^{-}$; bien mediante su aparato radicular o por vía foliar. Las cantidades requeridas son pequeñas, aunque varían dentro de ciertos límites. Así, en la cebada su contenido es bajo (2-4 ppm en peso seco), mientras que en la remolacha los valores pueden situarse entre 40-75 ppm. En general, en los tubérculos y leguminosas se encuentran los contenidos más altos, seguidos de frutales y hortalizas, siendo los cereales los que requieren una menor concentración. Además, estas concentraciones, al igual que ocurre con otros oligoelementos, pueden variar considerablemente en plantas de la misma especie. Las hojas y los órganos reproductores presentan siempre los contenidos máximos.

El boro es un elemento que presenta una escasa movilidad en la planta. Esta característica se pone de manifiesto cuando se aplican disoluciones de sales de boro directamente por pulverización en algunas hojas de las plantas; el elemento queda fijado preferentemente en las hojas tratadas. También está comprobado que las plantas jóvenes absorben el boro más intensamente que las adultas, y que la movilidad del elemento de los tejidos viejos a los jóvenes es pequeña. Incluso es frecuente que una hoja particular pueda contener suficiente boro, o exceso del mismo, mientras otra hoja del mismo tallo puede ser deficiente. No obstante, cada vez hay más evidencias de que la movilidad del B en el floema varía drásticamente de unas especies a otras. A finales de los años noventa, se descubrió que las plantas que transportan azúcares del tipo manitol o sorbitol presentan una importante retranslocación floemática de B (Brown y Shelp, 1997). Esto se produce como consecuencia de la formación de complejos *bis*(diol) entre el B y dichos azúcares.

En agricultura, la deficiencia del boro en los cultivos es un problema muy común que impide el crecimiento de las plantas y generalmente causa una disminución de la elongación radicular y reduce la expansión de las hojas (Broadley y col., 2012). Sin embargo, el rango de concentración entre la deficiencia y la toxicidad es bastante estrecho, lo que hace que un exceso de boro en el suelo también pueda causar pérdidas de producción y calidad de los cultivos. Desde hace una década los suelos contaminados por boro han aumentado considerablemente lo que está también generando un problema muy serio en el mundo, especialmente en zonas de clima árido. En la producción de cultivos, la toxicidad por boro es más difícil de manejar que la deficiencia, ya que esta última puede ser evitada por un buen programa de fertilización (Takano y col., 2008).

1.3.2. Funciones del boro en las plantas

1.3.2.1. *Función estructural*

Actualmente, se sabe que el B está implicado en el mantenimiento de la estructura y la funcionalidad de la pared celular. Esto se ha conocido gracias al aislamiento y caracterización de los complejos rhamnogalacturonano-II-boro (RG-II-B), donde se puso de manifiesto la presencia de enlaces entre el B y residuos de apiosa unidos a pectinas (Figura 1.2), lo que permite estabilizar la compleja red péctica y regular el tamaño de los poros de la pared celular. Por eso, la baja concentración de boro en las plantas produce una disminución de los enlaces de borato entre las pectinas conduciendo a los síntomas de deficiencias de boro tan característicos (O'Neill y col., 2004). Sin embargo, la función estructural del boro no explica totalmente los efectos de la deficiencia de B en las plantas, lo que hace pensar que este elemento podría desempeñar otras funciones. Bolaños y col. (2004) propusieron que el B podría establecer enlaces covalentes con grupos *cis*-hidroxilo de moléculas que forman parte del citoesqueleto de las células como fosfoinositoles, glicoproteínas y glicolípidos. Wimmer y col. (2009) confirmaron este hecho utilizando el ácido borónico en cultivos celulares. Este ácido es un derivado alquilo-aril sustituido del ácido bórico con la fórmula química $R-BO_2H_2$ que contiene un enlace carbono-boro, perteneciente a la familia de los compuestos órgano-boranos. El ácido borónico compete directamente con el ácido bórico en los enlaces del boro con las proteínas; y su presencia en los cultivos de callos celulares altera la unión de las paredes entre dos

células adyacentes. Estos investigadores identificaron proteínas microsomales que tenían una alta afinidad por los boronatos, y propusieron que el boro podría interactuar con la fracción de azúcares de los glicolípidos de las membranas confiriéndoles una gran estabilidad.

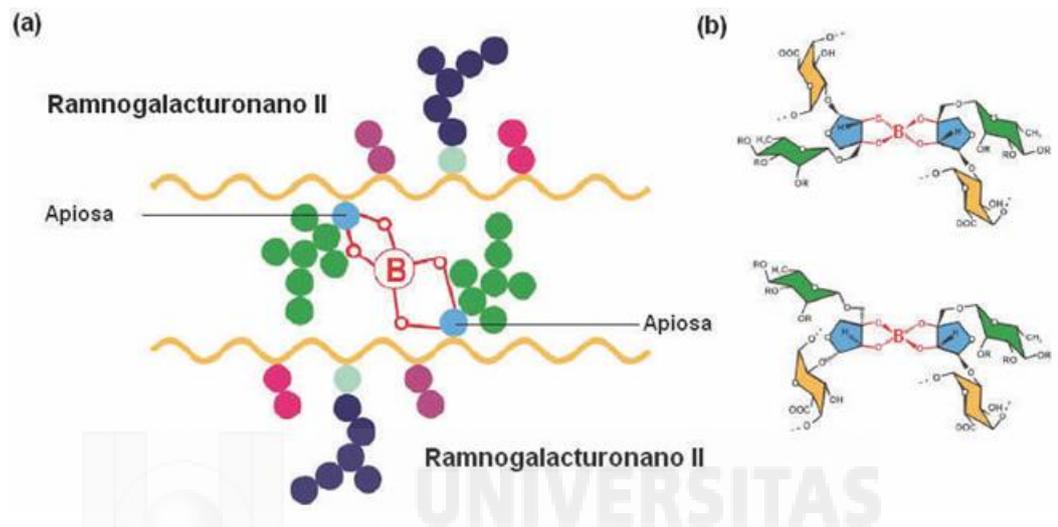


Figura 1.2. Dos moléculas de ramnogalacturonano-II se unen a través de un complejo borato *bis*(diol) formado entre los residuos de apiosa (a). Representación de dos residuos de apiosa unidos a través de un enlace borato éster donde puede observarse como el átomo de B es quiral (b). Fuente: (O'Neill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

1.3.2.2. Elongación de la raíz, metabolismo de ácidos nucleicos y síntesis proteica

Se ha observado recientemente que el boro participa en los procesos de elongación de la raíz. Cuando se cultivan plantas bajo condiciones deficitarias de boro los primeros síntomas que se producen son alteraciones en la división y desarrollo celular en los tejidos meristemáticos. Oiwa y col. (2013) observaron en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, que 1 hora después de que las plantas se expusieran a una solución nutritiva sin boro se producía la muerte en las células de la zona de elongación de la raíz (Imagen 1.1). El desarrollo celular tiene lugar normalmente en dos fases. Una es el fenómeno típico de la división celular, y la otra es el desarrollo y maduración de la célula. Pues bien, se ha demostrado de manera categórica que la división celular no se interrumpe por la deficiencia de boro, por lo que este elemento no interviene en este proceso. Sin embargo, sí que se interrumpe el desarrollo y maduración de las células.

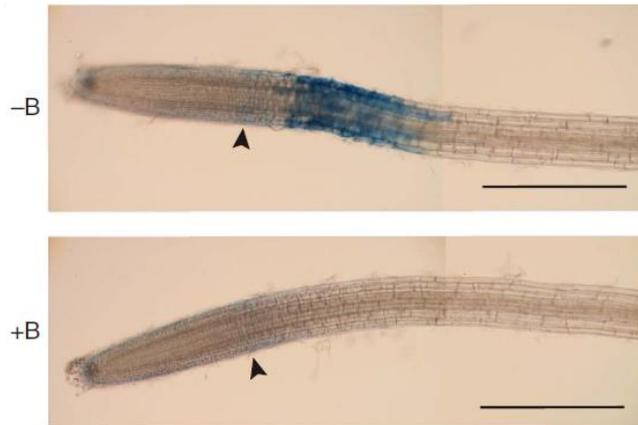


Imagen 1.1. Raíces de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en hidropónico durante 1 hora con una solución nutritiva sin boro (-B) o con boro (+B), y teñidas con azul de Evans para identificar la viabilidad de las células (el color azul oscuro identifica las células muertas). Fuente:(Ojwa y col., 2013).

Por otra parte, cuando las células adquieren su madurez, es decir, cuando los tejidos son ya adultos, la deficiencia de boro no actúa tampoco sobre estos tejidos. De ahí que todo síntoma deficitario de boro se caracterice por un hecho común, cualquiera que sea la planta, como es la destrucción de los meristemos terminales, y por tanto la paralización de las zonas de crecimiento.

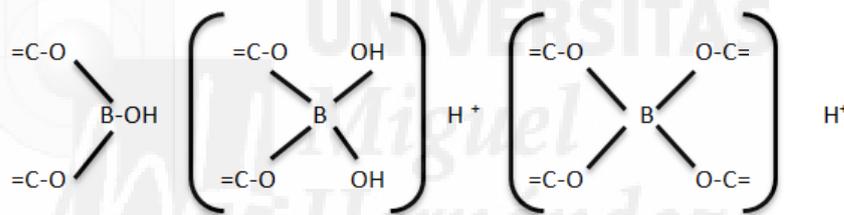
Los hechos expuestos anteriormente están íntimamente relacionados con el metabolismo de los ácidos nucleídos y con la síntesis proteica. Se ha sugerido que la muerte de las zonas de crecimiento en plantas deficientes de boro es debida a una disminución en el contenido de ARN y ADN en brotes y raíces. Algunas experiencias realizadas en planta de girasol, utilizando disoluciones nutritivas sin boro, han mostrado estos efectos. Además, se ha observado que al aplicarse boro de nuevo a la solución nutritiva se produce un incremento de los ácidos nucleicos, lo que genera un crecimiento celular normal (Josten y Kutschera, 1999).

Los estados deficitarios de boro llevan consigo también acumulaciones de varios compuestos nitrogenados, ya sea en forma inorgánica, como nitrógeno amoniacal, o como compuestos orgánicos, especialmente amidas en los tejidos de más edad de la planta. Además pueden provocar variaciones sensibles en el contenido y composición de aminoácidos, aunque esta respuesta es bastante específica según la planta de que se trate. En plantas superiores se han encontrado incrementos de arginina, prolina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico. En cambio, se suelen encontrar reducciones en los niveles de tirosina y fenilalanina,

compuestos precursores de la lignina que están muy relacionados con el boro como hemos comentado en el apartado anterior. Estas alteraciones aminoacídicas provocan un efecto de retardo en la síntesis proteica, obstaculizando la incorporación de aminoácidos a las proteínas.

1.3.2.3. Metabolismo de glúcidos

Al boro se le atribuye un importante papel en la translocación de los azúcares en el interior de la planta. Está comprobado experimentalmente que la deficiencia de este elemento provoca una acumulación de azúcares en los tejidos. Este hecho se relaciona con la capacidad complejante que presenta el anión borato con los polialcoholes, y por ello se sugiere que cuando este elemento se halla en cantidad adecuada en la planta forma complejos boro-hidratos de carbono que favorecen la movilidad del azúcar. Las estructuras propuestas para este tipo de complejos son del tipo:



Estos iones complejos tienen una mayor movilidad para atravesar las membranas semipermeables. Esto explicaría que cuando aparece la deficiencia no se forma el complejo, y los azúcares se acumulan en los tejidos (Gupta, 1993).

Otra sugerencia alternativa sobre el metabolismo de los glúcidos es la que supone que el boro inhibe la acción de la enzima almidón-fosforilasa, que actúa en la síntesis del almidón, manteniéndose los azúcares en formas solubles fácilmente transportables. Se considera que esta inhibición se produce por la complejación de este elemento con la parte activa del enzima. En plantas de frijol (*Vigna unguiculata* Walp.) cultivada bajo condiciones deficientes en boro se observó un incremento de los azúcares reductores y no reductores, siendo acompañado por una disminución de la actividad enzimática de la almidón-fosforilasa (Chatterjee y col., 1990).

Por último, otros investigadores consideran que el boro promueve la formación o estabilización del uridín-difosfatoglucosa (UDPG; (Dugger y Palmer, 1980)) que se forma a partir de la reacción entre la glucosa-1-fosfato y el UTP para

formar UDP-glucosa. Posteriormente, la UDP-glucosa es utilizada por el glucógeno sintasa para añadir una molécula de glucosa a un polímero de glucógeno en formación.

1.3.2.4. Otras funciones importantes

El boro está implicado en el metabolismo del fósforo en las plantas por su capacidad para formar complejos con los ésteres glucídicos. Estos compuestos como glucosa-6-fosfato, ribosa-5-fosfato y otros ésteres pueden formar complejos con el boro en los carbonos situados en posición 5 o 6, pero no forman complejos con ésteres en posición 1. Esta capacidad selectiva que presentan los boratos hace pensar que el oligoelemento puede estar involucrado en la regulación del metabolismo de los ésteres fosfatados, de la misma forma que está implicado en el metabolismo de los azúcares (Goldbach, 1985). Como consecuencia de esta actuación, la deficiencia provoca, según diversas experiencias, una acumulación de fosfatos inorgánicos y un descenso en el contenido de fósforo orgánico. Por otra parte, se sintetizan menos fosfolípidos, y como éstos compuestos son constituyentes básicos de la membrana intercelular, esto explicaría los desórdenes que se observan en la organización de la estructura celular.

La síntesis de vitaminas está influenciada igualmente por el contenido de boro. La síntesis de tiamina y niacina se favorece cuando aumenta el boro; en cambio, el ácido ascórbico disminuye (Navarro, S. y Navarro, G., 2003). También se ha comprobado que la concentración del alcaloide nicotina en la hoja de tabaco se encuentra estrechamente relacionada con los niveles de boro en el medio nutritivo. La deficiencia de boro origina un aumento de cinco veces el contenido de nicotina.

El boro también se cree que está involucrado en otros procesos biológicos en plantas como el i) metabolismo de fenoles (Cakmak y col., 1998) y compuestos nitrogenados (Ruiz y col., 1998; Nielsen, 2000), ii) polinización y cuajado de frutos (Eckhart y Rowe, 1999), y iii) aumento a la tolerancia de las plantas a condiciones climáticas adversas, enfermedades y plagas (Brown y col., 2002).

1.3.3. Absorción y transporte de boro en plantas

1.3.3.1. *Absorción rápida de boro por las plantas*

Todos los nutrientes minerales esenciales de las plantas son absorbidos en su forma iónica. La carga de estos nutrientes reduce en gran medida su permeabilidad a través de las membranas celulares, una característica que es fundamental para que las células puedan controlar su composición interna. El uso selectivo de una amplia gama de proteínas transportadoras de membrana, permite a las células regular el flujo de nutrientes, y expulsar o compartimentar internamente moléculas tóxicas o nutrientes en exceso.

El boro es una excepción al resto de nutrientes; ya que a pH fisiológico, existe como ácido bórico no cargado. Los solutos neutros pequeños de esta naturaleza tienen una alta permeabilidades a través de las bicapas lipídicas que constituyen la base de las membranas biológicas. Un ejemplo sencillo de la velocidad con la que el boro puede entrar en las células fue proporcionada por la observación de que cuando plantas de cebaba (*Hordeum vulgare* L.) fueron colocadas en soluciones que contienen concentraciones del orden de mM de boro, las raíces equilibraron el boro interno con respecto a la solución externa en un tiempo medio aproximado de 6 minutos (Hayes y Reid, 2004).

Este tiempo incluso se redujo a 4 minutos cuando el experimento se realizó en cultivos celulares (*datos de Hayes y Reid no publicados*). La permeabilidad de las membranas biológicas al boro y otros solutos se pueden medir fácilmente en células gigantes de algas carófitas cuya superficie es fácil de medir. En estas células, el ácido bórico tiene una permeabilidad diez veces mayor que el sodio (Na) y cuatro veces mayor que la urea, otro pequeño soluto neutro (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Permeabilidad del ácido bórico relativo a otros solutos medidos en algas de células gigantes (Reid, 2014).

| | Permeabilidad (cm s⁻¹) | Referencia |
|------------------|--|---------------------------|
| H ₂ O | 2×10^{-2} | (Dainty y Hope, 1959) |
| Etanol | 2×10^{-4} | (Dainty y Ginzburg, 1964) |
| Ácido bórico | 4×10^{-7} | (Stangoulis y col., 2001) |
| Urea | 1×10^{-7} | (Collander, 1954) |
| Na | 3×10^{-8} | (Findlay y col., 1969) |

1.3.3.2. Rutas de entrada y salida del boro en las células

Existen tres principales vías por las que el boro entra y sale de las células: i) Pasivo, difusión bidireccional a través de la bicapa lipídica, ii) difusión pasiva bidireccional a través de canales selectivos o no selectivos y iii) transporte activo de excreción de boro. Estas tres rutas están esquematizadas en la Figura 1.3.

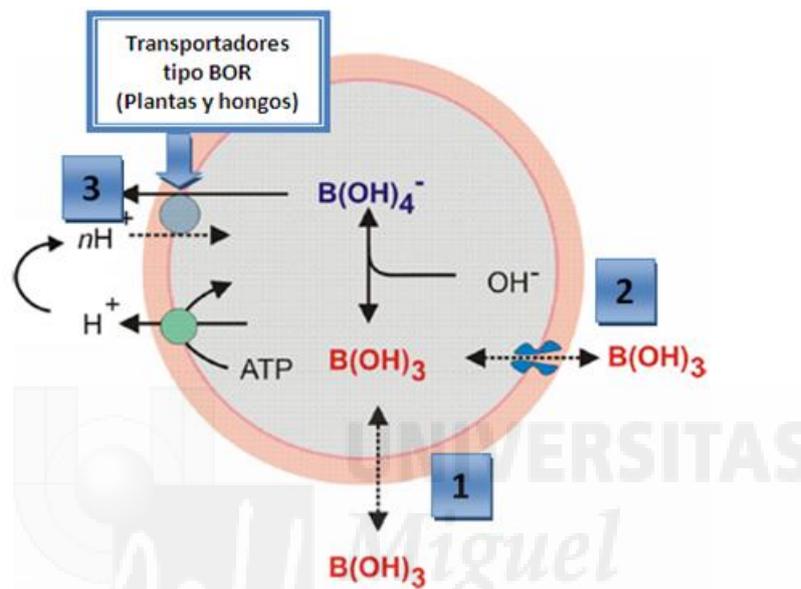


Figura 1.3. Esquema propuesto para el transporte de boro en las células vegetales. En ausencia de transporte activo, se trataría de equilibrar el B a través de la membrana plasmática por permeación de ácido bórico directamente a través de la bicapa lipídica (1) o a través de canales de tipo acuaporinas (2). También puede ser equilibrado mediante un sistema activo de transporte (antiporte) con H^+ (3). Debido a la entrada de H^+ y a la salida de borato se despolariza la membrana plasmática y se acidifica el citoplasma, por lo que el eflujo de H^+ electrogénico a través de la H^+ -ATPasa es necesaria para mantener los gradientes. Flujos pasivos de membrana se indican mediante línea discontinua y las flechas continuas indican transporte activo *Fuente:* (Reid, 2014).

i) Pasivo, difusión bidireccional a través de la bicapa lipídica

La bicapa de fosfolípidos, estructura básica de la membrana biológica, presenta alta permeabilidad al boro. Esto se ha puesto de manifiesto en los múltiples ensayos en los que se ha medido la permeabilidad de este nutriente en diferentes vesículas celulares. Por ejemplo, en liposomas (vesículas esféricas con una membrana compuesta de una doble capa de fosfolípidos), formados a partir de fosfatidil colina, el coeficiente de permeabilidad del boro es de $4,9 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, pero puede ser reducido hasta 10 veces si a estas estructuras se les añade en su composición colesterol (Dordas y Brown, 2000). Medidas en vesículas artificiales enriquecidas

con membranas plasmática de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) se ha encontrado una permeabilidad para el boro de $3,9 \times 10^{-7}$ cm s⁻¹ (Dordas y col., 2000), que es casi el mismo valor que el obtenido en células intermodales (carecen de plasmodesmos) de *Chara corallina*. Las vesículas preparadas a partir de membranas de microsomas (vesículas pequeñas y cerradas, de unos 100 nm de diámetro, que resultan de la fragmentación del retículo endoplasmático) presentaron una permeabilidad de boro mucho menor de $2,4 \times 10^{-8}$ cm s⁻¹ (Dordas y col., 2000).

En cierta medida, la forma en la que la planta distribuye el boro por sus tejidos parece ser que es un tanto incontrolada cuando las plantas crecen en soluciones nutritivas con un rango normal de concentraciones de boro. En la naturaleza, sin embargo, las plantas pueden encontrarse con suelos deficitarios o muy ricos en boro, por lo que las plantas tienen que optimizar sus mecanismos de absorción y distribución de boro para evitar problemas de deficiencias o toxicidades, respectivamente; y esto lo realizan poniendo en juego dos tipos de transportadores de membrana: canales y/o bombas de transporte activo de excreción de boro.

ii) Difusión pasiva bidireccional a través de canales selectivos o no selectivos

Además de la difusión a través de la bicapa lipídica, hay evidencias de que, en las membranas plasmáticas, al menos hay un camino paralelo que implica el empleo de canales de membrana que pueden facilitar el movimiento de boro en las plantas, pero no queda claro si el boro es el sustrato deseado, o simplemente un viajero oportunista. Así, la aplicación de bloqueadores de canales en raíces de calabaza produjo una reducción de la absorción de boro de aproximadamente el 50% (Dordas y Brown, 2001). Estos resultados fueron similares a los observados en raíces de cebada tratadas con ácidos débiles e inhibidores metabólicos (Fitzpatrick y Reid, 2009) que cierran los canales por acidificación del citoplasma (Chaumont y col., 2005; Bramley y col., 2010). La captación de boro también se inhibe en presencia de urea, que tiene un tamaño molecular parecido al del boro, por lo que compiten por los mismos canales (Dordas y Brown, 2001). En poco más de una década, un gran número de canales o posibles canales de boro han sido ya identificados.

iii) Transporte activo de excreción de boro

A pesar de la rápida entrada de boro en las células, algunos tejidos de las plantas son capaces de mantener la concentración interna de boro por debajo de la del medio externo. Por ejemplo, el cultivar de cebada “Sahara” tolerante al exceso de boro es capaz de reducir la concentración de boro interna a menos de la mitad de la concentración de la solución externa (Hayes y Reid, 2004). Esta capacidad de generar un gradiente de concentración a través de la membrana plasmática se pierde en presencia de inhibidores metabólicos, lo que sugiere que necesita energía para mantener dicho gradiente. La primera publicación que describió los transportadores de excreción de boro fue realizado por Takano y col. (2002), donde se proporcionó información sobre una serie de genes con secuencias similares en diferentes especies, y homólogos con específica expresión celular en las distintas especies. A día de hoy, se han identificado un gran número de transportadores de salida de boro para una amplia gama de plantas y para diferentes tejidos. La capacidad de estos transportadores para establecer gradientes de concentración depende tanto de la velocidad a la que el boro puede ser bombeado, como también de la facilidad con la que el boro puede entrar de nuevo a las células por los canales o a través de la bicapa lipídica.

1.3.3.3. Función principal de los transportadores de boro

Actualmente se conocen tres funciones principales para estos transportadores de boro:

1º Suministro de boro a la pared celular: dado que el principal papel del boro en el desarrollo de la planta es como constituyente de la pared celular, la capacidad de estos transportadores para concentrar boro en el apoplasto se convierte en algo crítico en condiciones de deficiencia.

2º Transporte radial de boro a través de las raíces y brotes: el suministro de boro desde el suelo a los brotes requiere la transferencia eficiente de este elemento a través de las raíces y su posterior carga en el xilema. La difusión de solutos del suelo hacia el tejido vascular es lenta, pudiendo ser asistida por el flujo de agua en bloque impulsado por transpiración, con la participación tanto de la vía apoplástica y como de la simplástica. Ahora está claro que esta transferencia radial de boro en las raíces se ve facilitada por canales permeables al boro actuando en armonía con

transportadores de salida, en particular bajo condiciones de deficiencia (Takano y col., 2010).

3° Evitar la toxicidad: el boro se convierte en tóxico para la mayoría de las plantas cuando la concentración intracelular excede en varias veces el orden de mM (Reid y col., 2004), tanto en especies B-tolerantes como en las B-sensibles. La capacidad de tolerancia por parte de las plantas para hacer frente a la alta concentración de boro parece ocurrir por eflujo activo de boro intracelular hacia la ruta apoplástica. Esto ha sido demostrado tanto en las raíces como en hojas (Hayes y Reid, 2004; Reid y Fitzpatrick, 2009).

1.3.3.4. *Distribución de boro en las plantas sin necesidad de transportadores de membrana*

Si la concentración de boro en el suelo es suficiente, las plantas no necesitan la ayuda de transportadores de boro. De hecho, algunos transportadores cuya expresión es constitutiva se degradan en condiciones adecuadas de boro, presumiblemente porque ya no son necesarios. Experimentos con mutantes que tienen inhibido el transporte de boro pueden crecer con toda normalidad cuando la concentración de boro es adecuado en el medio de cultivo, pero su crecimiento se inhibe a bajo B. La relación lineal que se ha observado entre la concentración de boro en el medio nutritivo y la concentración de boro en la planta en condiciones de un suministro normal o alto de boro, descartan la implicación de los transportadores de boro en estas condiciones ya que si fuera así debería observarse una saturación en las cinéticas de absorción (Takano y col., 2002; Hayes y Reid, 2004).

El boro es capaz de moverse en las plantas a través de la ruta simplástica y apoplástica a través de difusión y flujo másico. En el apoplasto, el flujo de agua impulsado por la transpiración puede llevar cualquier soluto disuelto en él, así que el boro puede viajar rápidamente grandes distancias en el xilema. En esta ruta, las diferencias de concentración de boro entre el xilema y los tejidos circundantes (por ejemplo, tallo, hojas) crean un gradiente de concentración que hace que el boro entre en estos tejidos por difusión pasiva con o sin la participación de canales de boro. Muchos estudios han demostrado la estrecha relación entre la acumulación de boro en las hojas y las tasas de transpiración, uno de los primeros fue el de Bowen (1972).

La importancia del xilema en el movimiento de boro ha quedado de manifiesto por el hecho de que los síntomas de toxicidad de boro son observados primero en los márgenes y puntas de las hojas, donde terminan los vasos xilemáticos (Oertli y Kohl, 1961; Oertli, 1993). En contraste con el xilema, la movilidad de boro en el floema varía considerablemente entre especies y parece depender de la presencia de moléculas capaces de complejar a este nutriente. En la mayoría de las especies cuando se interrumpe el suministro de boro, el crecimiento de los meristemos apicales y la expansión de las hojas jóvenes se inhiben, aunque las hojas más viejas contienen abundantes cantidades de boro (Oertli, 1993; Hu y Brown, 1994). Sin embargo, en un número limitado de especies tales como *Malus*, *Prunus* y *Pyrus*, la movilidad de B en el floema es alta, observándose los síntomas de toxicidad más comúnmente en los frutos y la corteza de los árboles en lugar de en las hojas (Brown y Hu, 1994; El-Motaiium y col., 1994).

La diferencia en la movilidad del boro entre especies parece estar relacionada con la presencia de moléculas complejantes de boro en el floema. En aquellas especies con una alta movilidad de B en el floema, se ha observado que los compuestos fotoasimilados que se translocan en forma de polioles (por ejemplo, sorbitol (Brown y Hu, 1996)), tienen una alta afinidad por el boro; aunque la mayoría de las plantas translocan estos compuestos en forma de sacarosa que tiene una afinidad mucho menor (Stangoulis y col., 2010) y es por lo tanto menos eficaz en la redistribución de boro a través de la vía floemática.

Numerosos estudios indican que la interacción de floema y xilema en la redistribución de boro pueden ser muy compleja. Matoh y Ochiai (2005) encontraron indicios, a partir de experimentos de marcaje de isótopos de boro en plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.), de que el boro era liberado en las hojas jóvenes en plantas cultivadas bajo condiciones deficitarias en boro, y por tanto otros factores distintos a la tasa de transpiración podrían estar involucrados en la distribución del boro. La importancia de la fuerza sumidero fue investigada por Huang y col. (2008) en altramuces (*Lupinus albus* L.) utilizando también isotopos radiactivos de boro. Estos investigadores encontraron que cuando el suministro de boro a las plantas era interrumpido, el boro acumulado previamente tanto en las hojas jóvenes como adultas fue movilizadas a las inflorescencias. Sorprendentemente, también observaron que la concentración de este boro movilizadas en el xilema fue muy alta en la base del

tallo principal. Los autores llegaron a la conclusión de que el boro había sido movilizado desde las hojas a través del floema hacia la raíz, y desde aquí fue de nuevo cargado en el xilema. Es difícil explicar este movimiento por todos los tejidos de la planta simplemente por mecanismos de tipo pasivo. Por lo que estos datos sugirieron que los transportadores de membrana podrían estar claramente implicados, además de que debe existir alguna vía de señalización eficaz que permita movilizar el boro por toda la planta.

1.4. Toxicidad por boro en las plantas

1.4.1. Síntomas visuales

Los síntomas visuales de toxicidad por boro incluyen raíces y brotes de menor tamaño, y clorosis y necrosis de las hojas (Lovatt y Bates, 1984; Nable y col., 1990). La causa subyacente de estos cambios puede estar vinculada a la interrupción de una amplia gama de procesos fisiológicos, que incluye: i) la inhibición de la fotosíntesis, ii) disminución de la conductancia estomática (Lovatt y Bates, 1984), iii) aumento de la peroxidación de lípidos, iv) alteraciones en las enzimas dentro de las vías antioxidantes, v) aumento de la permeabilidad de las membranas (Karabal y col., 2003), vi) reducción de la extrusión de protones en las raíces (Roldán y col., 1992), y vii) degradación de suberina y lignina (Ghanati y col., 2002). Los síntomas de toxicidad se correlacionan generalmente con la acumulación de altas concentraciones de boro en las hojas, la cual a su vez está relacionada proporcionalmente a la concentración de boro en el suelo y al tiempo de exposición. Las primeras observaciones que hizo Oertli y Kohl (1961) en 29 especies de plantas, en las que se incluía hierbas, cítricos, hortalizas y cultivos de flores, establecieron que en general la clorosis de las hojas se aprecia aproximadamente a una concentración de 1.000 mg kg^{-1} ps (ps; peso seco) y la necrosis entre $1.500\text{-}2.000 \text{ mg kg}^{-1}$ ps.

El síntoma visible más común en las plantas expuestas a un exceso de B es la presencia de quemaduras, que aparecen como parches cloróticos y/o necróticos a menudo en los márgenes y en las puntas de las hojas maduras (Eaton, 1944; Bennett y col., 1999). La alta concentración de boro se mantiene en el xilema y por tanto se va acumulando donde terminan los vasos del xilema. En el caso de los cultivos con venación paralela, primero se da dicha toxicidad en la punta de la hoja; mientras que

para las dicotiledóneas, que en general presentan venación reticulada, la toxicidad se observa en torno a los bordes de las hojas (Imagen 1.2).

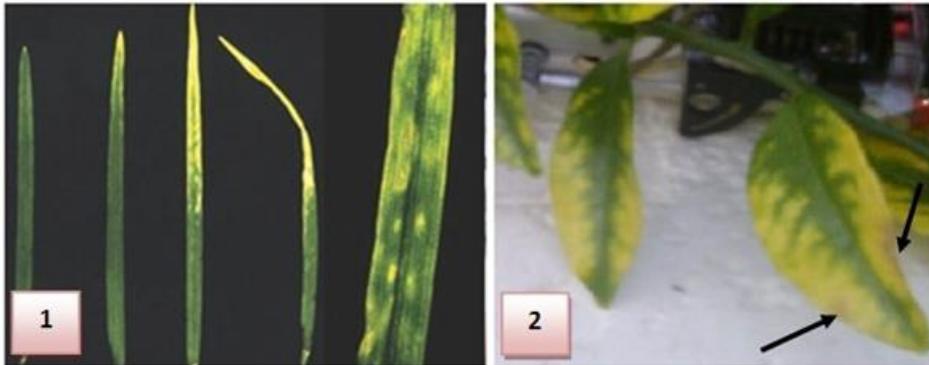


Imagen 1.2. Síntomas de toxicidad por B en hojas de trigo (1) y en cítricos (2). Las flechas negras señalan las quemaduras.

En las raíces, al contrario que en las hojas, no parecen desarrollarse síntomas visibles, ya que la concentración de B es relativamente inferior al de las hojas incluso a altos niveles de boro en el suelo (Nable, 1988). Todo esto refleja la escasa movilidad de este elemento a través del floema, dónde su acumulación se relaciona de forma estrecha con la intensidad en la tasa de transpiración.

En aquellas especies en las que existe una importante retranslocación floemática de B no aparece la sintomatología habitual. En lugar de las típicas quemaduras en los márgenes y en las puntas de las hojas, se observan yemas apicales muertas, abscisión de brotes jóvenes y presencia de lesiones en forma de acorchamientos de color marrón junto a tallos y pecíolos como ha sido mostrado en diferentes especies del género *Prunus*, *Malus* y *Pyrus* (Brown y Shelp, 1997). De forma similar, en otras especies de plantas como el apio (*Apium graveolens*), el exceso de B produce malformación de tallos y hojas jóvenes (Francois, 1988). Por lo tanto, la sintomatología por exceso de boro depende de la movilidad del B a través del floema; entonces para el diagnóstico de este desorden nutricional es fundamental seleccionar el tejido adecuado que va a ser empleado para dicho diagnóstico. En este sentido, se ha sugerido que el análisis de fruto puede ser mejor indicador en las especies en las que el B es significativamente móvil a través del floema, puesto que éste se acumula aquí rápidamente (Brown y Shelp, 1997).

1.4.2. Daños internos a nivel celular y vascular

La toxicidad por boro también queda reflejada en los daños que se producen a nivel celular y vascular. En los últimos años se han publicado varios artículos donde describen como el boro afecta a la anatomía de las hojas y la ultraestructura de los cloroplastos. Dos de los artículos más interesantes a este respecto han sido realizados por Papadakis y sus colaboradores que estudiaron como afecta el boro en plantas de mandarina “Clementina” (Papadakis y col., 2004a) y naranjo “Navelina” (Papadakis y col., 2004b) regadas con una solución nutritiva que contenía una concentración de B de 2,5 mg L⁻¹. Estos autores estudiaron la anatomía de las hojas del mandarino “Clementina” realizando cortes transversales y observándolos al microscopio. En el tratamiento control (0,25 mg L⁻¹) la lámina de las hojas exhibieron la anatomía típica de los cítricos (Imagen 1.3.A,B):

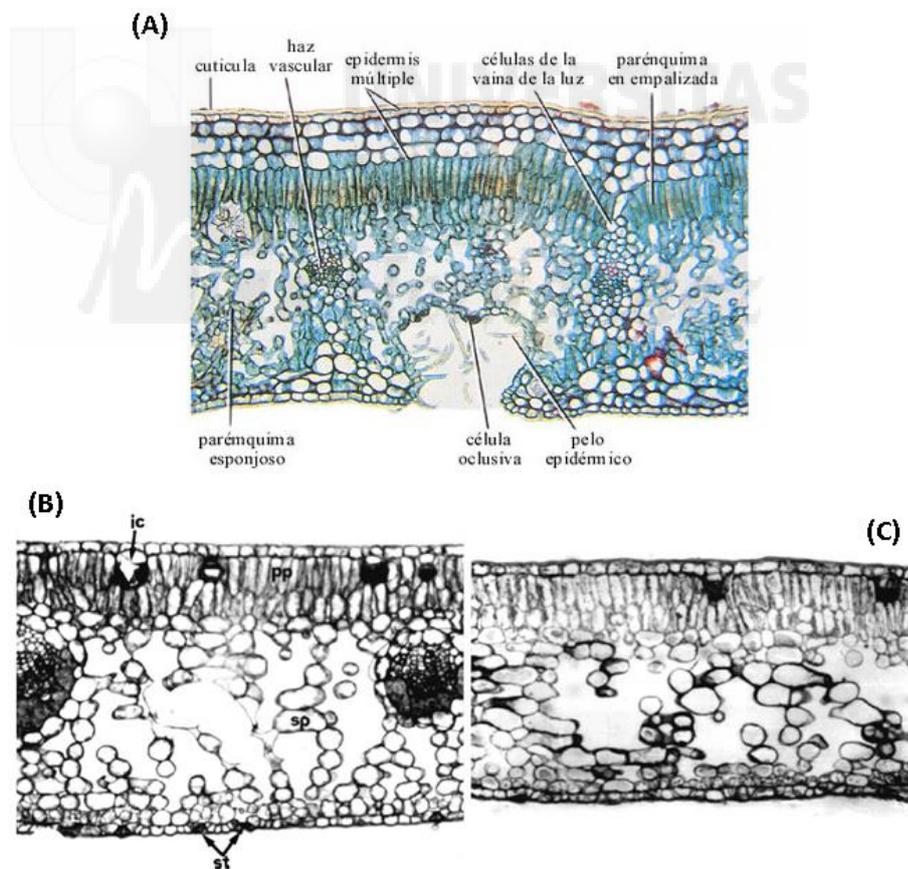


Imagen 1.3. Esquema modelo de la ultraestructura de una hoja (A). Micrograffas de luz de secciones transversales de hoja de mandarina “Clementina” cultivadas con 0,25 mg L⁻¹ de boro (B; ampliado: ×170) y 2,50 mg L⁻¹ de boro (C; ampliado: ×170). **ic:** celda de cristal (idioblasto); **pp:** parénquima en empalizada; **sp:** parénquima esponjoso; **st:** estomas. Fuente: Papadakis y col. (2004a).

En dicha imagen, se observa una epidermis superior de células grandes y una inferior de células pequeñas y en la parte intermedia encontramos el mesófilo formado por el parénquima en empalizada y el esponjoso (Imagen 1.3.B). El parénquima en empalizada se compone de dos capas de células alargadas con pequeños espacios intercelulares. Las células del parénquima esponjoso tienen forma irregular, dando lugar a espacios intercelulares muy grandes, que contienen haces vasculares de distintos tamaños. En la zona entre la epidermis superior y el parénquima de empalizada, se encuentran grandes células idioblásticas en cuyo interior se encuentran cristales romboédricos individuales de oxalato de calcio, distribuidas de forma irregular. La anatomía del mesófilo en hojas de plantas con exceso de boro ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de B), sufrió alteraciones notables (Imagen 1.3.C), particularmente en lo referente al espesor del parénquima esponjoso (mucho menor), al grosor de la cutícula (más alto), a la densidad de las células idioblásticas (inferior), a la densidad de estomas (inferior) y al contenido de las células del mesófilo (desorganizados).

En el estudio de los cloroplastos en plantas de naranja “Navelina” se observó que los cloroplastos de las células del mesófilo de las hojas de las plantas control estaban densamente ocupadas por tilacoides dispuestos en grana y como las membranas de los tilacoides conectaban unas granas con otras (Papadakis y col., 2004b; Imagen 1.4.A). También se observaron granos de almidón en el estroma de los cloroplastos. Además, las plastoglobulinas exhibieron una alta densidad de electrones. En las plantas cultivadas con exceso de B, sin embargo, los cloroplastos de las células del mesófilo eran menor en número y más pequeños que en las plantas control (Imagen 1.4.B), el estroma del cloroplasto tenía un aspecto más oscuro, el volumen total de las membranas tilacoidales quedó severamente reducido, y las membranas de los tilacoides que interconectaban unos granas con otros estaban de alguna manera dilatadas. Además, aunque las plastoglobulinas no se vieron alteradas en número, sí que aumentaron su tamaño y presentaron una densidad de electrones más baja de lo normal.

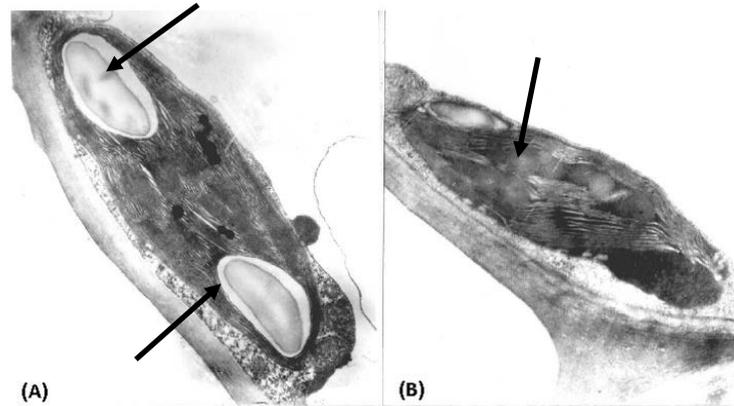


Imagen 1.4. Cloroplastos en las células del mesófilo de plantas de naranja “Navelina” cultivadas con $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de boro (A; ampliado: $\times 15.000$) y $2,50 \text{ mg L}^{-1}$ de boro (B; ampliado: $\times 22.000$). Las *fechas negras* señalan los granos de almidón fotosintético. Fuente: Papadakis y col. (2004b).

1.4.3. Causas de la toxicidad por boro

La causa real de la toxicidad del boro en plantas hoy en día sigue siendo un misterio. En comparación con otros nutrientes esenciales para las plantas, el boro es relativamente no reactivo, lo que debería hacerlo supuestamente menos tóxico. Como ya se ha mencionado, la formación de complejos con boro se restringe principalmente a aquellos compuestos que poseen dos hidroxilos en la conformación *cis*, conocido como *cis*-dioles. Hoy en día existen algunas hipótesis que intentan explicar por qué el boro es tóxico en plantas. Una de estas hipótesis parte de la idea de que el boro es capaz de formar complejos con la ribosa (por la cual tiene una alta afinidad). Este azúcar forma parte de muchos metabolitos clave tales como ATP, NADH, NADPH y ácidos nucleicos. La unión del boro con estos compuestos puede inhibir el metabolismo energético y afectar a un gran número de procesos relacionados con la expresión génica y la síntesis de proteínas.

Reid y col. (2004) estudiaron cómo la concentración de boro de la solución nutritiva afecta los procesos celulares de respiración, fotosíntesis, síntesis de proteínas y enzimas del metabolismo energético (malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y fosfatasa ácida) en diferentes especies de plantas, comparando además estas respuestas en los diferentes tejidos de las plantas. Estos autores llegaron a la conclusión de que el umbral de toxicidad de B depende de la variedad; así en las plántulas de cebada estos procesos celulares se vieron inhibidos con una concentración de 50 mM , mientras que en *Arabidopsis* y trigo, una concentración tan baja como 2 mM fue capaz de afectar a estos procesos. En este experimento, además

se comprobó que la inhibición del crecimiento en raíces sólo ocurría si se aplicaba concentraciones altas de boro en la zona apical; no observándose dicha inhibición cuando se aplicaba el boro en las secciones maduras de la raíz como se puede ver en la figura 1.4.

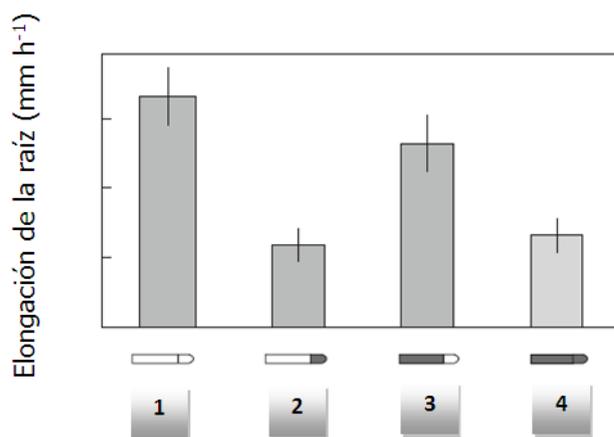


Figura 1.4. Sensibilidad espacial (inhibición del crecimiento) en raíces de trigo en respuesta a la aplicación de 10 mM de B. El sombreado indica las regiones donde se aplicó el boro: (1) en ninguna, (2) en la zona apical, (3) en la sección madura y (4) tanto en la zona apical como en la sección madura. Fuente: Reid y col., (2004).

Los datos de este experimento sugirieron que la diferente sensibilidad entre el tejido maduro y el meristemático podría estar relacionada con la expansión o división celular. Basándose en la idea de que el boro presenta una alta afinidad por la ribosa, estos autores surgieron que la unión ribosa-B podría crear problemas en los procesos relacionados con la síntesis de proteínas. Sin embargo, algunos autores ponían en duda esta hipótesis argumentando que aunque el ADN contiene desoxirribosa, esta carece de los grupos *cis*-diol necesarios para unirse al boro, por lo que la inhibición de la replicación del ADN no parece que sea probable. Por otro lado, aunque el ARN contiene ribosa, uno de los dos grupos hidroxilo participa en la unión de las bases de nucleótidos, de modo que ya no dispone un *cis*-diol para la complejación con el boro. Sin embargo, se ha visto que los dos grupos hidroxilo de la ribosa están libres por el extremo 3' de la cadena, sobre todo durante el procesamiento del ARNm, en la fase conocida como “*splicing*”, lo que le permitiría al boro formar el complejo con los dos -OH de la ribosa del extremo 3'. En el caso del ARNt, los dos grupos hidroxilo

pueden estar expuestos al boro en el extremo 3' de la molécula, por lo que el boro podría inhibir la traducción de proteínas al dañar la estructura del ARN.

1.4.4. Mecanismos de tolerancia al exceso de boro

Se sabe que existen especies e incluso variedades dentro de una misma especie que tienen una mayor capacidad que otras para poder crecer en suelos con exceso de boro. En varios estudios (Nable, 1988; Paull y col., 1988; Kaur y col., 2006) se han identificado variedades de trigo, cebada y nabo tolerantes al boro, respectivamente. La característica principal en todos estos ensayos fue que la variedad tolerante tuvo una concentración de boro más baja en sus tejidos comparada con aquellas variedades que se consideraron sensibles. Por este motivo, se planteó la hipótesis de que la tolerancia al exceso de boro se encuentra asociada a una capacidad de restringir la absorción de boro desde el suelo hacia las raíces, reduciendo así el transporte hacia la parte aérea.

1.4.4.1. *Mecanismos de tolerancia en raíz*

El hecho de que variedades tolerantes al boro presenten menores concentraciones de este elemento en sus raíces y hojas, sugiere que tiene que existir algún tipo de control en la absorción neta de boro por parte de la planta. Esto podría suceder por dos mecanismos: i) bien la raíz restringe la entrada de boro, o bien ii) existe un flujo de salida de boro desde la raíz hacia la zona externa. En los años setenta, cuando se expusieron estas dos hipótesis, sin embargo, era muy difícil decantarse por una de las dos ya que se sabía muy poco acerca de los procesos por los cuales el boro puede atravesar las membranas biológicas. Raven (1980) sugirió que la permeabilidad al ácido bórico en las membranas biológicas debía ser alta según los coeficientes de distribución del boro entre dos fases (éter-agua); esta predicción fue confirmada más tarde por los estudios de Dordas y Brown (2000) en bicapas lipídicas artificiales. Si el movimiento de boro a través de las membranas fuera el caso que predomina en las plantas, entonces el ácido bórico debería equilibrarse rápidamente entre la raíz y el medio circundante. Sin embargo, este no siempre ocurre, Hayes y Reid (2004) demostraron que este equilibrio se produce en las variedades sensibles, pero no así en las variedades tolerantes donde la concentración de B de la raíz es menor que en la solución externa (Figura 1.5.A). A pesar de ser las concentraciones intracelulares de

boro más bajas en las especies tolerantes, la tasa de entrada y salida de boro en las raíces fueron similares en las variedades tolerantes y sensibles, lo que indica que las diferencias en la concentración de boro de las raíces no están relacionadas directamente con las diferencias en la permeabilidad de las membranas.

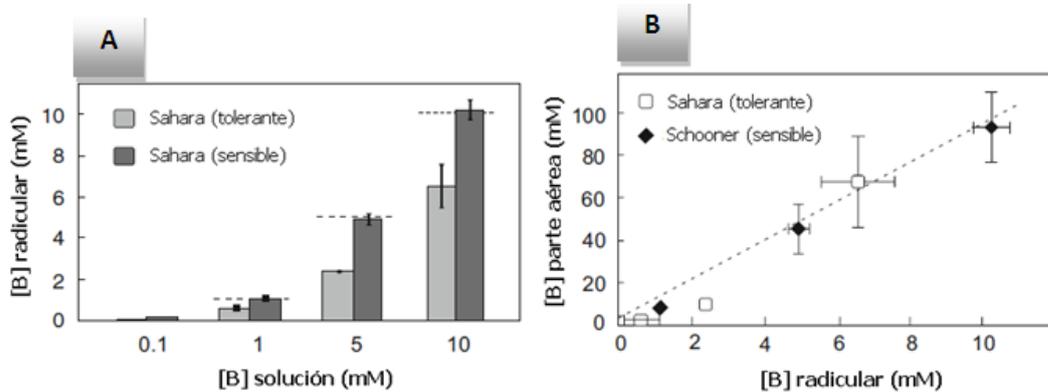


Figura 1.5. Variedades boro-tolerantes de cebada capaces de mantener concentraciones de boro en raíz por debajo del de la solución externa, mientras que variedades sensibles, las concentraciones en raíz y en solución externa son los mismos. Las líneas discontinuas indican la concentración externa equivalente (A). Transferencia de boro desde la raíz a la parte aérea en variedades boro-sensibles y boro-tolerantes (B). Fuente: Hayes y Reid (2004).

Experimentos con cebada, mostraron que las concentraciones de boro en la parte aérea se relaciona linealmente con las concentraciones de boro en las raíces, tanto en cultivares sensibles como en los tolerantes (Figura 1.5.B). Esto significa, en términos de tolerancia, que el principal factor que determina la concentración de boro en la parte aérea es la concentración de la raíz; y si esto se puede reducir, entonces tendrá un efecto directo sobre las concentraciones de la parte aérea, y por lo tanto sobre la toxicidad. Reid (2007), en un experimento con ocho plantas de trigo (todas crecidas en la misma solución), comprobó que la concentración de B de la parte aérea presentó una relación lineal significativamente positiva con respecto a la concentración de boro radicular, mientras que el peso seco de la parte aérea presento una relación lineal significativa negativa (las concentraciones de boro radicular oscilaron entre 4-6 mM). A partir de esta investigación, se hizo evidente que las plantas tolerantes eran capaces de generar un flujo de salida de boro de las raíces, pero no se conocía el mecanismo por el cual se llevaba a cabo. Esto condujo a la búsqueda de genes que codificaran transportadores de membrana capaces de bombear el boro fuera de las células de la raíz.

Aunque el mecanismo más común que se dan en las plantas tolerantes para reducir la concentración de boro en sus tejidos es la salida del boro desde las células hacia el exterior, también se han descritos otros dos mecanismos de tolerancia en las raíces. El primero fue sugerido por Choi y col. (2007), quienes mostraron que hay especies tolerantes al boro en las que se producen cambios morfológicos en el ápice de la raíz, tras la exposición a altas concentraciones de boro, y estos cambios podrían estar relacionados con el incremento que se da en la concentración de azúcares reductores. Se piensa que estos cambios en la concentración de azúcares pueden mantener el equilibrio osmótico necesario para que pueda continuar el crecimiento de la raíz; ya que en condiciones de exceso de boro las células se hacen más rígidas y pierden el turgor celular lo que les impide crecer. Un aumento de la presión osmótica por el incremento en la concentración de azúcares permite a las células tomar más agua y mantener el turgor celular que es imprescindible para que se produzca la elongación de las raíces.

Respecto al segundo mecanismo, encontramos que entran en juego los factores transcripcionales. Ochiai y col. (2008) investigaron las razones por las cuales la variedad de arroz “japónica” es más tolerante al exceso de boro que la variedad “índica”, y encontraron un QTL (Quantitative Trait Loci; *en español “Loci de Caracteres Cuantitativos”*) asociado a dicha tolerancia. En estudios posteriores, se comprobó que la supresión de tan solo un nucleótido en el factor de transcripción de la familia NAC (NAM, ATAF1-2 y CUC) confería tolerancia a la planta, y parece ser que el mecanismo por el cual incrementa la tolerancia es independiente del flujo de salida de B.

1.4.4.2. Mecanismos de tolerancia en hoja

En algunos casos la diferente tolerancia entre plantas no puede ser explicada por los mecanismos de tolerancia que se dan sólo en la raíz; ya que se ha visto que hay variedades tolerantes capaces de acumular más boro en las hojas que una variedad sensible. Los estudios realizados por Reid y Fitzpatrick (2009) en hojas de cebada y trigo demostraron que en las variedades sensibles la muerte celular se producía a concentraciones de boro foliar mucho más baja que en las variedades tolerantes. Este experimento sugirió que la distribución del boro entre el citoplasma, y la vacuola podría explicar estos resultados. Las variedades tolerantes tenían una alta expresión

de genes del tipo *Bor2* que se encargan de bombear el B desde el citoplasma al interior de la vacuola donde el boro es mucho menos tóxico.

1.5. Metabolismo antioxidante en plantas

1.5.1. Sistemas antioxidantes en las células vegetales

Desde hace mucho tiempo se sabe que las plantas responden al daño oxidativo generado por un gran número de estreses tanto abióticos como bióticos (Mittler, 2002) mediante el aumento de los sistemas antioxidantes. Cuando las plantas sufren algún tipo de estrés se puede producir un desequilibrio entre los sistemas de captación de luz (fase luminosa de la fotosíntesis) y la síntesis de hidratos de carbono (fase oscura de la fotosíntesis). Esto significa, que la energía del fotón absorbido por el sistema de recolección de luz no es utilizada para la asimilación de CO_2 , por lo que los electrones generados son utilizados en la fotorrespiración y en menor medida en la reacción de Mehler (Figura 1.6).

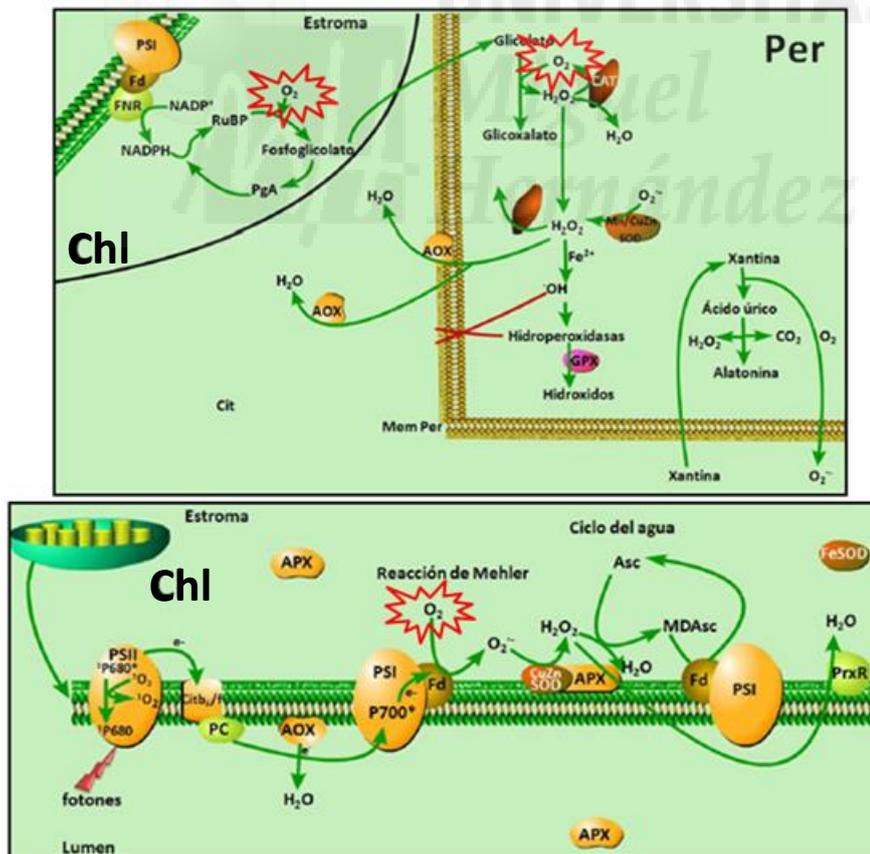


Figura 1.6. Destinos alternativos para los electrones bajo condiciones de estrés: fotorrespiración (en peroxisomas; **Per**) y reacción de Mehler (en cloroplastos; **Chl**). En ambos casos, esto conduce a la producción acelerada de especies reactivas de oxígeno (ROS). *Ilustración tomada y modificada de Velarde, A.M. (2009).*

En ambos casos, esto conduce a la producción acelerada de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son formas parcialmente reducidas del oxígeno (Sies, 1991), de las que destacan: el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Su formación es un proceso normal, inevitable y constante en organismos que poseen un metabolismo energético basado en reacciones de oxidación-reducción (Mano, 2002) ya que son producto de multitud de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. No obstante, son especies químicas altamente reactivas y con poder oxidante que, dependiendo de la especie, pueden dañar diversos componentes celulares. Por eso, un aumento de estas especies puede provocar daños en las células. De forma general, los efectos que provocan las ROS son: i) inhibición de enzimas (Berlett y Stadtman, 1997); ii) Degradación pigmentos fotosintéticos; iii) peroxidación de lípidos de las membranas celulares (Moran y col., 1994; Munné-Bosch y Alegre, 2002); y iv) fragmentación del DNA (Mano, 2002). Los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes para evitar los daños causados por los ROS (Slater, 1988; Halliwell, 1999). Cuando se produce un desequilibrio entre el balance ROS y las defensas antioxidantes es cuando tiene lugar el daño en los tejidos y el estrés oxidativo (Sies, 1994). Las ROS producidas en las células son eliminadas por diversos sistemas antioxidantes (Figura 1.7), que se clasifican en: i) enzimáticos y ii) no enzimáticos; aunque en muchos casos, ambos tipos de sistemas funcionan de forma coordinada.

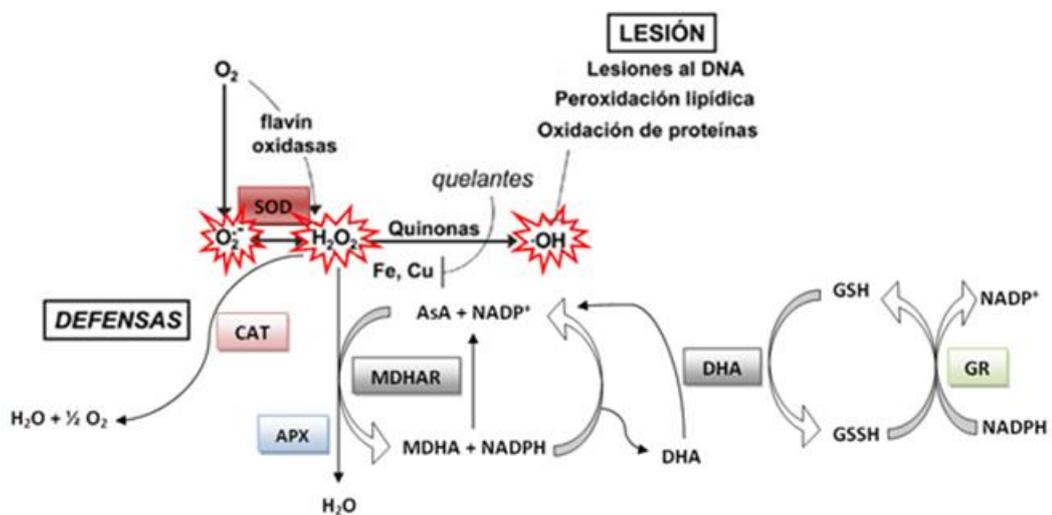


Figura 1.7. Esquema general del metabolismo antioxidante. Generación de especies reactivas de oxígeno, tales como el oxígeno solo (O_2), anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y sistemas antioxidantes encargados de su detoxificación.

i) Sistemas antioxidantes enzimáticos: constituyen un grupo variado de enzimas con la propiedad común de ser capaces de eliminar, suprimir o neutralizar a los radicales libres y a las ROS. En la figura 1.7 se muestra, de forma resumida, las distintas enzimas que intervienen en la defensa celular frente a la acción perjudicial de estas moléculas. Las más importantes serían: i) Superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del radical superóxido para formar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno; ii) Catalasa (CAT), cuya función principal consiste en la eliminación del peróxido de hidrógeno; y iii) Ciclo del Ascorbato-Glutation (ASA-GSH), que elimina también el peróxido de hidrógeno.

ii) Sistemas antioxidantes no enzimáticos: en este grupo pueden distinguirse los antioxidantes hidrosolubles y los liposolubles. Entre los primeros (importantes en el citoplasma, en el estroma del cloroplasto, etc.) destacan el ácido ascórbico y el glutatión (Foyer y col., 1994). Entre los antioxidantes liposolubles (presentes en membranas) se encuentran los carotenoides (carotenos y xantofilas (Young, 1991)) y el α -tocoferol (Munné-Bosch y Alegre, 2002).

1.5.2. Boro y estrés oxidativo.

En los últimos años, varios artículos han sido publicados donde describen como se comportan los sistemas antioxidantes ante el exceso de boro en plantas. En un experimento en cítricos, los investigadores Keles y col. (2004) observaron que el exceso de boro en las hojas producía daños en las membranas celulares como consecuencia de la peroxidación lipídica. En estas plantas se observó que la actividad catalasa y la glutatión reductasa se reducían en un 42% y 54%, respectivamente; mientras que la actividad de la superóxido dismutasa solo se reducía en un 14%. Por lo tanto la disminución significativa de la actividad de la catalasa y la glutatión reductasa debido a la toxicidad de boro causó la acumulación de H_2O_2 . Cervilla y col. (2007) y Melgar y col. (2009) mostraron que el exceso de boro estimula a las enzimas antioxidantes y, en particular, la actividad del ciclo ASA-GSH y sus enzimas relacionadas. Por el contrario, en hojas de cítricos los sistemas antioxidantes respondían mejor a estrés por deficiencia de boro que por exceso; de hecho, la actividad ASA y GSH se redujo en plantas sometidas a exceso de B en relación a las plantas control (Han y col., 2009). Estudios realizados en dos variedades de albahaca

por parte de Landi y col. (2013) también evidenciaron una acumulación de la actividad SOD en plantas sometidas a exceso de B, independientemente de la variedad. En cuanto a la CAT y APX (ascorbato peroxidasa), también se observó un incremento significativo en ambas variedades con exceso boro, de acuerdo con los resultados observados anteriormente en pera (Wang y col., 2011).

1.6. El cultivo de los cítricos

1.6.1. Importancia de los cítricos a nivel mundial y nacional

Los cítricos son el principal cultivo frutal del mundo, con una producción anual de unos 115,5 millones de toneladas según los últimos datos publicados en 2012 por la FAO correspondientes a la campaña 2010/2011. En España también es el principal frutal, con una superficie que ocupa actualmente alrededor de 317.600 Ha, de las cuales 153.220 Ha se dedican al cultivo de naranjas, unas 120.210 Ha al cultivo de mandarinas, principalmente clementinas, y unas 40.000 Ha al limón (principalmente en Alicante y Murcia). La Comunidad Valenciana alcanza el 59% de la superficie, seguida de Andalucía con el 24%, la Región de Murcia el 13% y Cataluña el 3%.

La producción nacional de cítricos asciende a los 6,1 millones de toneladas. La mitad de esta producción corresponde al grupo de naranjas (35% tipo “Navel” y un 13% “Blancas” y “Sanguinas”), un tercio de la producción corresponde a mandarinas (25% de “Clementinas”, 5% “Satsumas” y 8% a otras variedades), y el 16% restante a la producción de pomelos. La Comunidad Valenciana acapara el 55,3% de toda la producción, seguida, en segundo lugar por Andalucía con el 30%, la Región de Murcia con el 10,9% y Cataluña con el 3,8% (Hueso Martín, J.J. y Cuevas González, J., 2014)

En la Comunidad Valenciana, el 47% de su producción corresponde a naranjas, el 46% a mandarinas y el 7% a otros cítricos. En los últimos años se ha apreciado un pequeño descenso en el volumen de producción, por abandono de los campos con variedades donde la oferta es superior a la demanda, con el consiguiente descenso de los precios de venta. La segunda zona productora es Andalucía, donde el 74% del total de cítricos corresponde a naranjas, el 18% a mandarinas, el 6% a limones y el 2% restante a otros cítricos. La provincia de Huelva mantiene el liderazgo, con el 28% de toda la producción andaluza. La tercera zona en importancia es la Región de Murcia, donde alrededor del 62% de su producción total

corresponde a limones, el 25,6% a naranjas, el 8,5% a mandarinas, y el resto a pomelo y otros cítricos. En Cataluña el cultivo de los cítricos se concentra en la provincia de Tarragona. Por último y en muy pequeña extensión, también se cultivan cítricos en Extremadura, Islas Baleares e Islas Canarias.

Más de la mitad de la producción de cítricos se exporta en fresco, cerca de un 17% se industrializa y el resto se consume en el mercado interno, descontando un porcentaje variable de pérdidas. España es el primer país exportador en fresco de cítricos del mundo, superando los 3 millones de toneladas. Los principales destinos de la producción española son Alemania y Francia (Tabla 1.5), que reciben entre 700.000 y 800.000 toneladas anuales. Les sigue un segundo grupo de países como Polonia, Reino Unido y Holanda, con alrededor de 250.000 toneladas cada uno. Un tercer grupo de países, que reciben más de 100.000 toneladas anuales, son Bélgica, Italia y Suecia.

Tabla 1.5. Destino de las exportaciones españolas de cítricos por países (*en miles de toneladas*).

| | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Alemania | 870 | 814.400 | 807.234 | 834.778 |
| Francia | 808 | 718.940 | 888.127 | 729.295 |
| Polonia | 283 | 247.583 | 246.582 | 261.183 |
| Gran Bretaña | 297 | 245.346 | 256.279 | 258.884 |
| Holanda | 281.155 | 233.220 | 242.330 | 238.326 |
| Bélgica | 122.696 | 116.919 | 116.348 | 121.860 |
| Italia | 171.024 | 153.308 | 260.935 | 116.537 |
| Suecia | 78.903 | 78.917 | 79.511 | 112.047 |
| R. Checa | 110.245 | 83.478 | 82.629 | 82.077 |
| Suiza | 67.581 | 58.781 | 69.929 | 60.662 |
| Estados unidos | 98.438 | 53.649 | 49.442 | 60.465 |
| Austria | 52.656 | 49.498. | 55.923 | 54.413 |
| Resto de países | 441.667 | 359.297 | 351.598 | 340.748 |
| Total | 3.684.322 | 3.213.341 | 3.506.874 | 3.271.281 |

1.6.2. El portainjerto

Habitualmente en los cítricos, la raíz con parte del tronco constituye lo que se llama el patrón o portainjerto. Cuando un patrón se injerta de una variedad, se crea una nueva planta, en la que cada una de las partes conserva sus características propias, pero se establece una especie de simbiosis en la que cada una de las partes integrantes influye más o menos en las funciones y desarrollo de la otra.

El comportamiento del árbol es el resultado de la interacción entre injerto y portainjerto (Forner, 1985). El patrón afecta a muchas características vegetativas y productivas del injerto incluyendo el tamaño y el vigor del árbol, producción, tamaño, textura, calidad interna y época de maduración de la fruta (Castle, 1987). Del mismo modo, puede conferir resistencia al frío, adaptación a determinadas condiciones del suelo como pueden ser salinidad, pH elevado, exceso de agua, etc., resistencia o tolerancia a nemátodos parásitos y a *Phytophthora* sp. Los patrones también tienen un efecto considerable sobre el contenido mineral de las hojas del injerto (Wutscher, 1989). El injerto también puede tener influencia sobre el patrón, modificando su tamaño.

Las especies con interés comercial de los cítricos pertenecen a la familia de las *Rutáceas*, subfamilia *Aurantioideas*. Desde el punto de vista botánico todas las especies del género *Citrus* pueden injertarse unas sobre otras, pero no siempre esa unión tiene porque ser buena desde un punto de vista comercial. En algunos casos las combinaciones son adecuadas y aparecen árboles productivos y longevos, pero en otras no son rentables (González-Sicilia, 1968).

La elección del portainjerto ha evolucionado al compás de la aparición y difusión de algunas enfermedades que atacan a los agrios. Son varios los patrones que se utilizan en el mundo en función de las condiciones específicas de cada área de cultivo. En España, los patrones más utilizados se recogen en la figura 1.8. Debido a sus excelentes características agronómicas el *Poncirus trifoliata* ha sido utilizado como progenitor masculino en hibridaciones con especies del género *Citrus*, obteniéndose diferentes híbridos. Se citan: “citranges” (naranja dulce \times *P. trifoliata*), “citremones»” (limonero \times *P. trifoliata*), “citrumelos” (pomelo \times *P. trifoliata*), “citrandarines” (mandarina \times *P. trifoliata*). Dentro de estos híbridos los más importantes son “Citrango Troyer”, “Citrango Carrizo”, “C-35” y “Citrumelo Swingle” (Hueso Martín, J.J. y Cuevas González, J., 2014).

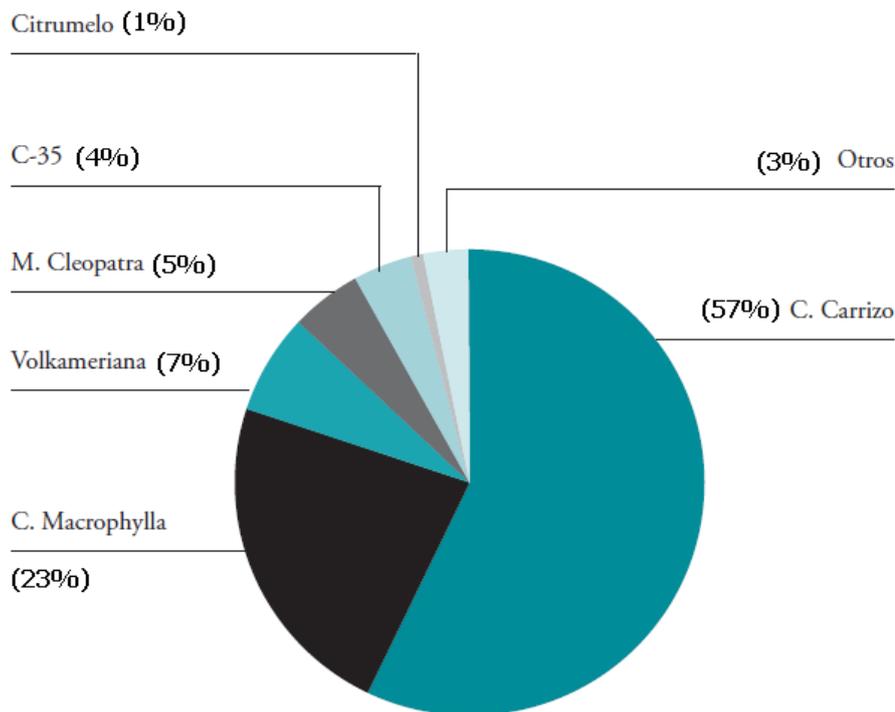


Figura 1.8. Patrones de cítricos más utilizados en España.

El citrange Carrizo se originó de forma espontánea, en una multiplicación por semilla de citrange Troyer en Texas en 1932. Morfológicamente es parecido al citrange Troyer. También el comportamiento de ambos tiene aspectos comunes, aunque citrange Carrizo es más productivo, más tolerante al encharcamiento y más resistente a *Phytophthora* sp., por lo que ha desplazado a citrange Troyer.

El mandarino Cleopatra presenta una resistencia a *Phytophthora* sp. inferior a los citranges. Es tolerante a tristeza, exocortis y psoriasis. Muy resistente a la salinidad y a la clorosis férrica, siendo sensible a la asfixia radical. En plantaciones comerciales da lugar a un crecimiento lento en los primeros años. Induce buena productividad y excelente calidad de fruta, aunque el tamaño del fruto suele ser menor que el obtenido con otros patrones. En general las variedades de “Satsuma” injertadas sobre este patrón son muy productivas, no siendo así con “Clemenules”.

Dado que no existe en el mundo ningún patrón perfecto, se han desarrollado distintos programas de mejora al respecto. En 1974 se inició en el IVIA un programa de mejora genética de patrones mediante hibridaciones dirigidas. Fruto de este programa se han registrado los híbridos Forner-Alcaide nº 5 (“FA-5”), “FA-13”, “FA-517”, “FA-V94”, “FA-234”, “FA-V17”, “FA-2313” y “FA-31”. Todos ellos son

resistentes o tolerantes al virus de la tristeza y reducen el tamaño del árbol de un modo notable, aspectos esenciales en la citricultura moderna.

1.6.3. Requerimiento de boro en los cítricos

La concentración foliar óptima de boro en los cítricos oscila entre 36-100 ppm dependiendo de la variedad y edad del árbol. En general, su concentración es mayor que la de otros micronutrientes como Mn, Zn, Cu, y Mo, pero es más baja que la de Fe. Como vemos en la tabla 1.6 su principal particularidad es que el B pasa de la carencia al exceso en un margen muy estrecho.

Tabla 1.6. Valores foliares de referencia de diferentes estados nutritivos de cítricos establecidos por Legaz y Primo-Millo (2000).

| | Muy bajo | Bajo | Normal | Alto | Muy alto |
|---------|----------|-------|--------|---------|----------|
| B (ppm) | <21 | 21-30 | 31-100 | 101-260 | >260 |

En las zonas agrícolas del Levante Español se detectan más los síntomas de exceso que los de carencia, debido principalmente a la alta concentración de este elemento en las aguas de riego procedentes de depuradoras, desalinizadoras, etc., o bien porque las aguas transcurren por parajes donde las cantidades de boro son importantes (Amorós, 2003).

La carencia de boro en los cítricos se manifiesta inicialmente en las hojas jóvenes donde pueden aparecer manchas translucidas. Con el tiempo, si la deficiencia es muy severa también pueden aparecer síntomas en las hojas maduras observándose un amarellamiento a lo largo de los nervios principales y secundarios. Éstos además aparecen dilatados, en algunos casos suberizados, y a menudo se extienden longitudinalmente. Al envejecer, las hojas se vuelven gruesas, coriáceas, quebradizas, faltas de brillo y deformadas. Los brotes jóvenes mueren, desecándose de forma progresiva desde su ápice; se producen brotes laterales en un número excesivo que mueren prematuramente y es frecuente la aparición de yemas múltiples. En las ramillas, ramas y tronco se producen grietas o hendiduras en las que se forma goma. En la corteza de los frutos jóvenes se forman manchas amarillentas que se tornan marrones oscuras al madurar el fruto y a través de las cuales el albedo exuda goma. En el albedo de los frutos se forman bolsas de goma, que también pueden

presentarse en el eje central del fruto. Los frutos pueden presentar formas anormales y en general son pequeños, duros, con la corteza gruesa, poco jugosos y con escaso contenido en azúcares.

En el exceso de boro en cítricos aparecen lesiones cloróticas en las hojas que se extienden desde el ápice hasta los bordes de las hojas. En las raíces, no parecen desarrollarse síntomas visibles, ya que la concentración de B es relativamente inferior al de la hoja, incluso a altos niveles de boro en el suelo (Papadakis y col., 2004a; Papadakis y col., 2004b; Gimeno y col., 2012). Además los cítricos, pertenecen al grupo de plantas que presentan escasa movilidad de este elemento a través del floema, por lo que su acumulación se ve relacionada de forma estrecha con la intensidad en la tasa de transpiración que presente cada variedad (Gimeno y col., 2012).

1.7. Las micorrizas y el boro

1.7.1. Aspectos generales de las micorrizas arbusculares (MA)

Se conoce con el nombre de micorriza a la asociación mutualista establecida entre las raíces de plantas, tanto cultivadas como silvestres, y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas, sino también porque pueden estar presentes en la mayoría de los hábitats naturales (Hernández-Dorrego, 2003). El mutualismo supone una relación beneficiosa para los dos organismos implicados, por lo que, tanto el hongo como la planta se ven favorecidos por la asociación. Por una parte, el hongo coloniza la raíz de la planta y le proporciona nutrientes minerales y agua, que extrae del suelo por medio de su red externa de hifas (micelio extrarradial); mientras que por el otro, la planta suministra al hongo sustratos energéticos y carbohidratos que elabora a través de la fotosíntesis (Hernández-Dorrego, 2003).

Basado en criterios estructurales, funcionales y taxonómicos, se han establecido y clasificado 7 tipos de micorrizas: Ectomicorrizas, Endomicorrizas, Ectendomicorrizas, Arbutoides, Monotropoides, Ericoides y Orquidioides. En cuanto a las estructuras formadas, al tipo de colonización y a la cantidad de especies vegetales y fúngicas implicadas, se puede decir que las micorrizas arbusculares (o Endomicorrizas) son las de mayor importancia y las que más ampliamente se

encuentran distribuidas, tanto a nivel geográfico como dentro del Reino Vegetal (Hernández-Dorrego, 2003).

Los hongos formadores de micorrizas pertenecen a la clase Zigomicetos y se caracterizan por producir, a lo largo de su ciclo de vida, unas estructuras conocidas como arbuscúlos (en todos los casos) y vesículas (en la mayoría de ellos; figura 1.9). Las primeras, son las estructuras responsables de la transferencia bidireccional de nutrientes entre los simbiosntes, realizada en la interfase planta-hongo producida a este nivel; mientras que las vesículas, son estructuras globosas e irregulares que actúan como órganos de reserva de lípidos (Francl, 1993; Hernández-Dorrego, 2003).

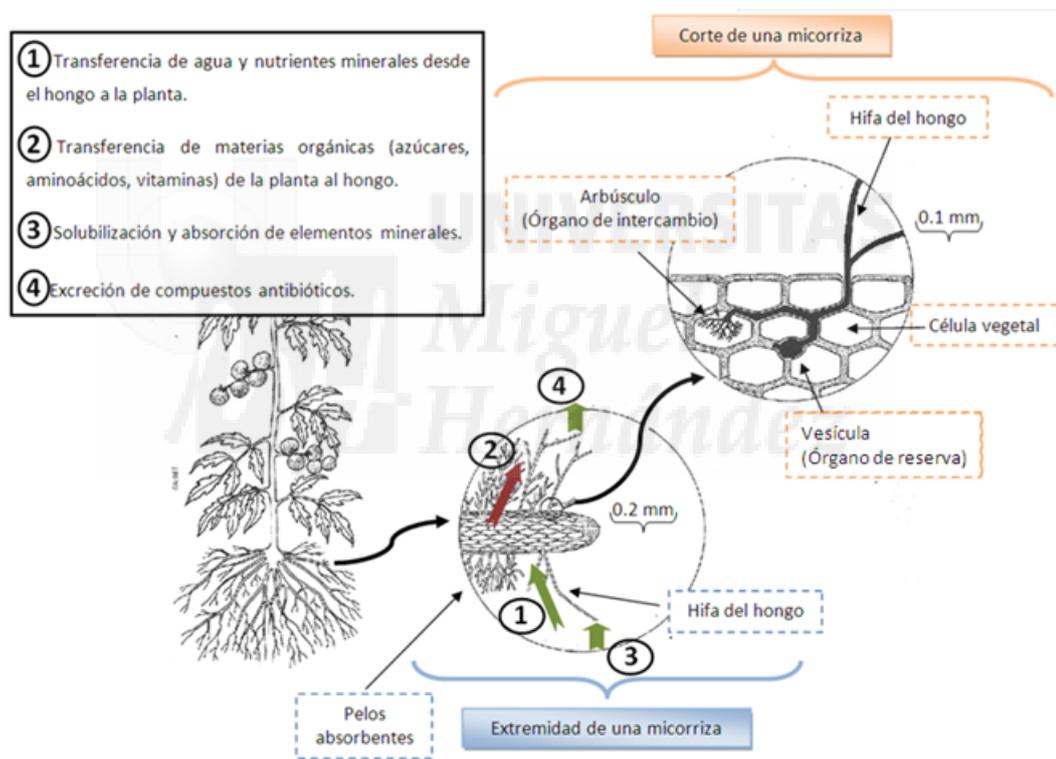


Figura 1.9. Esquema de la colonización de raíces por micorrizas arbusculares (MA).

1.7.2. Beneficios de las micorrizas en la nutrición de las plantas

El efecto más importante que producen las MA en las plantas es un incremento en la absorción de nutrientes minerales del suelo, que se traduce en un mayor crecimiento y desarrollo de las mismas (Hernández-Dorrego, 2003). La expansión del micelio externo del hongo por la rizosfera es la causa principal del aumento de la absorción, ya que permite captar más allá de la zona de agotamiento que se crea alrededor de las

raíces; es decir, se produce de forma indirecta la expansión de la superficie de absorción del “sistema radicular” de la planta (Sanders y Tinker, 1973; Jakobsen y col., 1992; Hernández-Dorrego, 2003).

Los hongos formadores de MA ayudan a la captación de elementos minerales del suelo mediante dos mecanismos. Uno puramente físico, donde el micelio del hongo es capaz de extenderse y explorar mayor superficie de suelo; en el iones, como el fosfato, el amonio, el zinc o el cobre, son transportados más rápidamente a través de las hifas del hongo que por difusión a través del suelo. El segundo es un mecanismo bioquímico que incrementa la afinidad de la raíz micorrizada por el fosfato soluble de manera que las raíces son capaces de captar fosfato en el suelo a concentraciones bajas (Camprubí y col., 2000).

De forma generalizada, se considera que las micorrizas tienen posibilidades de mejorar el crecimiento de sus hospedadores en suelos donde el contenido en nutrientes es bajo. El efecto de la micorriza y el establecimiento en el sistema radical, son afectados por la concentración de nutrientes que hay en el suelo (Gianiazzi-Pearson y Gianinazzi, 1981). La necesidad de añadir fertilizantes no se elimina inoculando las plantas con hongos formadores de MA, ya que las micorrizas no producen fósforo ni otros nutrientes, pero sí permiten optimizar el rendimiento del fertilizante, reduciendo de esta manera su aporte (Camprubí y col., 2000).

Existen otros efectos producidos por las MA entre los que destacan un aumento de la resistencia de la planta al estrés hídrico y a la salinidad, un aumento de la resistencia y/o tolerancia a determinados patógenos del suelo, un incremento de la supervivencia al trasplante y un incremento en la fijación del nitrógeno en leguminosas (Gerdemann, 1968; Camprubí y col., 2000). Las micorrizas originan cambios en los exudados radicales, los cuales alteran la pauta de descomposición por parte de los microorganismos presentes en la rizósfera del suelo, de la misma manera que la microbiota del suelo también puede afectar la formación y función de las micorrizas (Linderman, 1993). Así mismo, las combinaciones de estos microorganismos y los hongos micorrícicos pueden incrementar el control biológico contra posibles patógenos del suelo.

1.7.3. Endomicorrizas en cítricos: *Glomus intraradices* Schenck & Smith

La selección de portainjertos representa, en la actualidad, un aspecto de la máxima importancia en citricultura (Agustí, 2003). De la elección del patrón depende el éxito de la plantación. Los portainjertos de cítricos también pueden formar micorrizas, son muchos los hongos micorrícicos asociados a las raíces de los cítricos, pero el más abundante es el género *Glomus*. En España la especie *Glomus intraradices* Schenk & Smith es la que se utiliza con más frecuencia (Calvet y Camprubí, 1996; Agustí, 2003). Aunque la simbiosis entre la raíz y el hongo va a depender de su capacidad de absorción de fósforo, de su densidad radicular y de su capacidad de transporte de agua (Agustí, 2003). Este hongo pertenece al orden Glomales, al suborden Glominae, a la familia Glomaceae, al género *Glomus* Tulasne & Tulasne y a la especie *Glomus intraradices* Schenck & Smith (INVAM, 2003). A continuación se describen algunas características de este hongo:

(i) Esporas: las esporas son de color blanco cremoso a amarillo cafetoso, a veces, con tintes verdes. La forma es de globosa a subglobosa, irregular y elíptica. Los tamaños van desde 40 a 140 μm (INVAM, 2003). De acuerdo a lo señalado por INVAM (2003), la espora posee una pared compuesta por tres capas (L1, L2 y L3), donde solamente L1 está presente en las esporas juveniles y sigue hacia las hifas. L2 y L3, luego, se forman secuencialmente, tanto en las esporas como en las hifas.

(ii) Hifas: las hifas son de forma cilíndrica ligeramente achatadas (Ilustración 1.8). Poseen un ancho de 11 a 18 μm , y su pared es de 3,2 a 6,4 μm de espesor (INVAM, 2003). INVAM (2003) señala que la pared de la hifa está compuesta por 3 capas (L1, L2 y L3) que son continuas con las tres capas de las esporas. Las dos capas más externas son las únicas presentes en las etapas tempranas de formación de esporas; ambas son delgadas y se degradan con la maduración de la espora. Las subcapas de L3 también se pueden separar a lo largo de la hifa, aunque en menos ocasiones.

(iii) Estructuras micorrícicas: a menudo numerosas vesículas (o esporas) forman puntos de entrada cercanos a lo largo de la red de arbusculos e hifas (Imagen 1.5). Es incierto cómo las vesículas intraradicales son capaces de diferenciarse en esporas, debido a que ello puede ocurrir en las raíces (INVAM, 2003). La colonización

arbuscular llega al máximo, más temprano que otros hongos de *Glomus*; junto con raíces viejas, a menudo, se encuentra una extensiva red de hifas (sin arbusculos) y numerosas esporas intraradicales. Estas esporas tienden a agruparse y formar densos racimos. Esta propiedad ha llevado a muchos micorrizólogos a confundir esta especie con *Glomus fasciculatum* (INVAM, 2003).

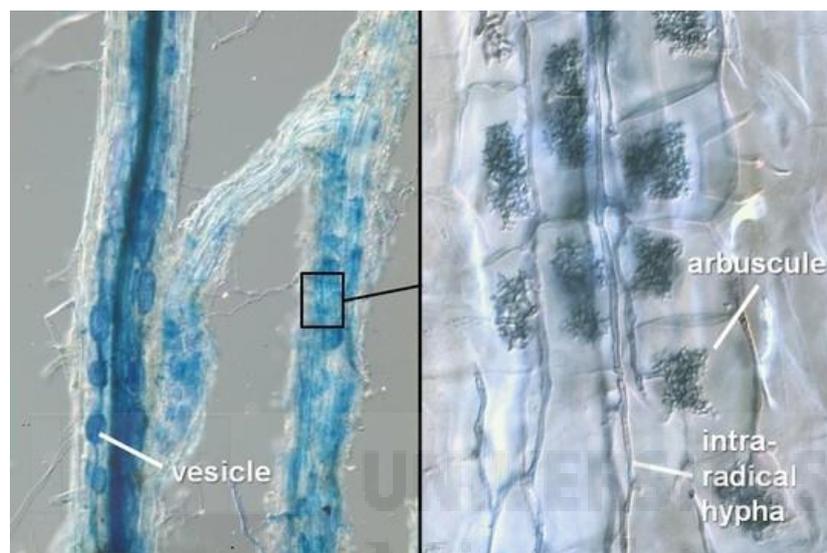


Imagen 1.5. Imagen al microscopio de raíz colonizada por *Glomus intraradices*, donde se observan las vesículas y los arbusculos. Fuente: facultad de biología de Ludwig-Maximilians-Universität München (Schüßler, 2015).

1.7.4. Micorrizas y Boro

1.7.4.1. *Papel del boro en la simbiosis planta-hongo*

La influencia positiva del B en la formación de micorrizas se demostró primero en plantas arbusculares micorrizadas de alfalfa y trébol rojo en el año 1980 (Lambert y col., 1980), y unos años más tarde se demostró también en plantas de *Citrus jambhiri* (Dixon y col., 1989). La mejora en la formación de micorrizas por el aumento de la disponibilidad de B en la zona radicular en principio parece desconcertante, por un lado, por el hecho de que es totalmente contrario a los efectos que se observan para otros nutrientes como N y P y, por otro, porque se cree que los hongos no tienen ningún requerimiento de B. En un principio se pensaba que el incremento de la concentración de los hidratos de carbono podría ser una razón probable que explicara los efectos del B sobre las micorrizas, por la relación que existe entre el B y los carbohidratos. Se ha observado que al fertilizar las plantas con boro se incrementa el porcentaje de colonización al incrementar la concentración de azúcares solubles en

las raíces. Esto se pensaba que era debido a que la fertilización de boro incrementaba los niveles de ácido indol-3-acético (AIA) que favorece el transporte de azúcares desde las hojas hacia la raíz (Lambert y col., 1980). Sin embargo, esta hipótesis no fue apoyada por los resultados experimentales llevados a cabo por Mitchell y col. (1986); en este experimento se observó que al fertilizar con boro las plantas de pino, los niveles de AIA disminuían en las raíces que habían sido inoculadas con micorrizas, mientras que la concentración de AIA no fue afectada en plantas no micorrizadas. Por consiguiente y en vista de estos resultados, estos autores consideraron que los hongos puedan requerir una pequeña cantidad de B para su crecimiento.

Más tarde, Sword y Garrett (1994) sugirieron que el mecanismo por el cual se produce un aumento de la infección micorrícica con la fertilización de boro está relacionado con la reducción de compuestos fenólicos causada por una alta concentración de boro. Esta hipótesis fue también apoyada por Marschner y Dell (1994). Esta hipótesis se base en que los compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento de los hongos micorrícicos. Sin embargo, una alta concentración de boro en las raíces de las plantas incrementa la actividad fenol-oxidasa, por lo que se reduce la concentración de fenoles y facilita la proliferación del hongo en el suelo y su simbiosis con la planta hospedadora. Sin embargo, en estos experimentos no quedó muy claro que exista una relación causa/efecto entre el B, los compuestos fenólicos y la formación de micorrizas. En general, la relación entre compuestos fenólicos y micorrizas no se comprende bien y la relación entre compuestos fenólicos y B se entiende aún menos. Se necesitan estudios experimentales para llegar a conocer el mecanismo que explique todas estas interrelaciones.

Un enfoque alternativo a las hipótesis anteriores (B-carbohidratos, B-AIA, B-fenoles) sería considerar que el B tiene un papel específico en las primeras fases del establecimiento de la simbiosis hongo-planta. La penetración del hongo en las células hospedadores es posible solamente en los estados iniciales de desarrollo de la raíz ya que en este estado la relación pectina:celulosa es mucho más alta que en las paredes de las células maduras. En esta fase de infección se forma una especie de matriz extracelular común entre la planta y el hongo huésped, que tiene componentes polisacáridos pécticos similares a los de la pared celular de la planta (Nylund, 1987). Para que se forme esta matriz es necesario que el hongo altere los procesos de la

formación de la pared celular de la planta interfiriendo sobre todo en la deposición de la pared primaria de las plantas y en la lámina media de la pared celular. Parece ser que es aquí donde el boro podría tener alguna función específica, aunque podría parecer un tanto contradictorio que se necesite la intervención del boro para impedir la formación de la pared celular de las plantas y favorecer la formación de esta matriz, siendo el boro uno de los componentes más importantes en las paredes celulares de las plantas (Matoh, 1997; O'Neill y col., 2004).

Una de las propuestas sobre el papel del B en la simbiosis micorrícica está relacionada con la formación del citoesqueleto tanto en el hongo como en las plantas hospedadoras, ya que la formación de micorrizas implica también cambios en la organización estructural y en la composición de proteínas del citoesqueleto en ambos organismos (Timonen y Peterson, 2002). En micorrizas arbusculares (Endomicorrizas), donde el hongo forma también estructuras intracelulares, los cambios en el citoesqueleto de la planta hospedadora son más grandes que los del hongo. Por el contrario, en Ectomicorrizas el citoesqueleto de la planta no se ve afectado, excepto en partes fuertemente colonizadas donde los filamentos del citoesqueleto de la planta desaparecen. En las hifas presentes en el tejido simbiótico de la red de Hartig (donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes, minerales y agua), tiene lugar una nueva organización reticular, que no se encuentra en las hifas del micelio externo (Timonen y Peterson, 2002). Entonces, el B podría tener un papel esencial en todas estas nuevas estructuras que se forman entre el hongo y la planta.

1.7.4.2. Captación y movilidad del boro por el micelio fúngico

Las Ectomicorrizas facilitan a sus hospedadores la absorción de nutrientes como: P, N, Ca y Mg (Melin, 1952; Marschner y Dell, 1994; Jentschke y col., 2000; Smith y Read, 2008; Plassard y Dell, 2010). Como ya hemos comentado anteriormente, se cree que el boro no es un nutriente esencial para los hongos, por lo que ha sido asumido que las Ectomicorrizas no son capaces de tomar el boro del suelo. Esto es debido a que muchos carbohidratos fúngicos son del tipo “diol” como el manitol, que tienen una alta afinidad por el boro formando complejos B-diol, lo que hace que el boro quede inmovilizado en estos complejos, y por lo tanto, no se translocan desde el hongo a la planta.

La considerable acumulación de B en los esporóforos de muchas micorrizas y especies de Basidiomicetos saprófitos indica que el B es translocado desde el micelio hacia los esporóforos (Lavola y col., 2010). Sin embargo, hay grandes diferencias en las concentraciones de B acumulado en esporóforos de diferentes especies (280 mg kg⁻¹ en *Paxillus involutus* y otras muchas especies con concentraciones inferiores a 2-3 mg kg⁻¹ o por debajo del límite de detección como el caso de *Coprinus comatus*). Dichas diferencias entre las especies de hongos puede atribuirse al diferente uso que hacen del agua, o a la utilización de diferentes carbohidratos en la translocación a larga distancia. Los complejos B-manitol son un posible candidato para el transporte del B, dado que el manitol se encuentra en casi todas las especies de hongos, aunque su relativa proporción a otros hidratos de carbono solubles puede variar considerablemente (Nehls, 2008). En las plantas, la formación de complejos B-poliolios, tales como manitol y sorbitol, es un mecanismo para transportar el B por el floema (Brown y Shelp, 1997; Hu y Brown, 1997). Como se ha observado en plantas transgénicas de tabaco, el aumento de la producción de sorbitol también supuso un aumento en la captación de B (Bellaloui y col., 1999); por tanto, no es descabellado pensar que en el caso de los hongos micorrícicos el aumento de manitol y otros polioliolios también tengan este efecto. Hay también estudios con isótopos estables (¹⁰B) que evidencian que el B puede ser absorbido por las hifas externas de la Ectomicorriza simbiote *Paxillus involutus*, y que este a su vez puede ser translocado a los tallos y hojas de la planta huésped (abedul de plata; *Betula pendula*) (Lehto y col., 2004).

El mecanismo de captación de B por parte de las micorrizas no se conoce todavía con detalle, pero todas las evidencias apuntan a que el mecanismo de absorción pasiva es el más importante. Y en este sentido juega un papel principal la composición química de las membranas de las células fúngicas. Por eso, la diferente capacidad de absorción observada entre las especies de hongos puede deberse a la composición de estas membranas, principalmente a la concentración y composición de esteroides (Dordas y Brown, 2000). También hay evidencias que apoyan que la expresión de canales mediadores de la absorción de agua como las acuaporinas, en las que el boro puede pasar pasivamente se incrementa con las micorrizas. Estos resultados han sido observados en plántulas de álamo inoculadas con micorrizas con respecto a plántulas no micorrizadas (Marjanović y col., 2005).

La forma de absorción de B suele ser como ácido bórico (Huy Brown, 1997). Sin embargo, la incorporación de B a través de la formación de complejos con materia orgánica también es concebible. El boro tiene una alta afinidad con los grupos hidroxilo, tales como ácidos orgánicos, para formar complejos (Wikner, 1983; Dembitsky y col., 2002). Los ácidos orgánicos y otros compuestos de moléculas pequeñas abundan en muchos suelos ricos en materia orgánica, y es asumido que tienen un papel clave en el ciclo del carbono en los suelos (van Hees y col., 2005). No obstante, diferentes fenómenos en los que se ven implicados los compuestos solubles necesitan ser estudiados, como el incremento de la estabilidad del complejo B-manitol en suelos donde hay un aumento de pH hasta pH 8,0 (Power y Woods, 1997); el cual es mucho mayor que el de la mayoría de los suelos forestales. Tales complejos, podrían ser absorbidos por micorrizas o raíces, pero hasta el momento esta hipótesis no se ha comprobado ya sea en plantas no-micorrizadas o micorrizadas. La formación del complejo con manitol y otros compuestos dentro del micelio permitiría la captación continua de ácido bórico del suelo en contra de un gradiente de concentración (Hu y Brown, 1997), y los complejos B-manitol podrían funcionar en el transporte a larga distancia en el hongo. Sin embargo, el transporte del complejo B-manitol para la planta huésped sería un modo muy altamente especializado de transporte. Esto también podría ser una forma de translocación de carbono “inversa” en la simbiosis, en donde la planta absorbe aminoácidos del suelo (Smith y Read, 2008).

Un aspecto importante de las micorrizas, que está siendo investigado en profundidad hoy en día, es si las micorrizas pueden inmovilizar ciertos nutrientes cuando estos se encuentran en exceso en el suelo para impedir problemas de toxicidad en las plantas. Así, Berthelsen y col. (1995) observaron que las micorrizas podrían incrementar la tolerancia al exceso de cobre en el suelo, impidiendo que este nutriente sea absorbido por la planta al quedar inmovilizado. Aunque se desconoce si la mayor proporción de Cu estaba en el hongo o en la parte de la raíz micorrizada. Pero es posible que el sistema simbiótico pueda controlar la concentración de Cu en la planta, aumentando la absorción de micronutrientes cuando haya escasez en la planta, y reduciéndola cuando haya un exceso en el suministro; pero hasta ahora hay poca evidencia de esto. En el caso del boro, si una gran parte que es tomado del suelo es retenido por los hongos micorrícicos, podría evitar la toxicidad en las plantas

protegiéndolas de este estrés. Por eso uno de los objetivos de esta tesis es evaluar si la micorrización de plantas de cítricos podrá incrementar la tolerancia al exceso de boro, ya que los cítricos son uno de los cultivos más sensibles a este estrés. En plantas de trigo (Sonmez y col., 2014), se observó que la micorrización disminuyó la acumulación de boro y los síntomas de toxicidad por este elemento, aunque el rendimiento no se vio afectado por las micorrizas en los niveles de B más altos. Sin embargo, en un experimento en *Pinus banksiana*, la inoculación micorrícica no afectó a la tolerancia de las plantas a altos niveles de boro, aunque si aumentaron su tolerancia a la salinidad (Calvo Polanco y col., 2008).

1.8. Bibliografía

- Agustí, M. (2003). Citricultura, Ed 2ª. Mundi-prensa, Madrid
- Amorós, M. (2003). Producción de agrios, Ed 3ª. Mundi-Prensa, Madrid
- Bellaloui, N., Brown, P.H., Dandekar, A.M. (1999). Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant physiology* **119**: 735-741
- Bennett, A., Rowe, R.I., Soch, N., Eckhert, C.D. (1999). Boron stimulates yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth. *Journal of Nutrition* **129**: 2236-2238
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 20313-20316
- Berthelsen, B.O., Olsen, R.A., Steinnes, E. (1995). Ectomycorrhizal heavy metal accumulation as a contributing factor to heavy metal levels in organic surface soils. *Science of the Total Environment* **170**: 141-149
- Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., Blevins, D. (2004). Why boron? *Plant physiology and biochemistry* **42**: 907-912
- Bowen, J.E. (1972). Effect of environmental factors on water utilization and boron accumulation and translocation in sugarcane. *Plant and cell physiology* **13**: 703-714
- Bramley, H., Turner, N.C., Turner, D.W., Tyerman, S.D. (2010). The contrasting influence of short term hypoxia on the hydraulic properties of cells and roots of wheat and lupin. *Functional Plant Biology* **37**: 183-193
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., Zhao, F. (2012). Function of nutrients: micronutrients. . In P Marschner, ed, Mineral Nutrition of Higher Plants. CA. Academic Press, San Diego, pp 191-248

- Brown, P., Bellaloui, N., Wimmer, M., Bassil, E., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F., Römheld, V. (2002). Boron in plant biology. *Plant Biology* **4**: 205-223
- Brown, P.H., Hu, H. (1994). Boron uptake by sunflower, squash and cultured tobacco cells. *Physiologia plantarum* **91**: 435-441
- Brown, P.H., Hu, H. (1996). Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol rich species. *Annals of Botany* **77**: 497-506
- Brown, P.H., Shelp, B.J. (1997). Boron mobility in plants. *Plant and Soil* **193**: 85-101
- Cakmak, I., Torun, B., Erenoğlu, B., Öztürk, L., Marschner, H., Kalayci, M., Ekiz, H., Yilmaz, A. (1998). Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. *Euphytica* **100**: 349-357
- Calvet, C., Camprubí, A. (1996). Integración de las micorrizas arbusculares en el proceso de producción de patrones de cítrico. *Levante Agrícola*: 62-66
- Calvo Polanco, M., Zwiazek, J., Jones, M., MacKinnon, M. (2008). Responses of mycorrhizal jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings to NaCl and boron. *Trees* **22**: 825-834
- Camprubí, A., Calvet, C., Estaun, V. (2000). Micorrizas arbusculares en producción agrícola. *Horticultura* **144**: 38-41
- Castle, W.S. (1987). *Citrus* rootstocks. In RC Rum, RF Carlson, eds, Root stocks for fruit crops. John Wiley and Sons, New York, pp 361-399
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Ríos, J.J., Romero, L., Ruiz, J.M. (2007). Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany* **100**: 747-756
- Collander, R. (1954). The Permeability of Nitella Cells to Non-Electrolytes. *Physiologia plantarum* **7**: 420-445
- Chatterjee, C., Sinha, P., Agarwala, S. (1990). Boron nutrition of cowpea. *Proceedings: Plant Sciences* **100**: 311-318
- Chaumont, F., Moshelion, M., Daniels, M.J. (2005). Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell* **97**: 749-764
- Choi, E.-Y., Kolesik, P., McNeill, A., Collins, H., Zhang, Q., HUYNH, B.L., Graham, R., Stangoulis, J. (2007). The mechanism of boron tolerance for maintenance of root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant, Cell & Environment* **30**: 984-993
- Dainty, J., Ginzburg, B. (1964). The permeability of the protoplasts of *Chara australis* and *Nitella translucens* to methanol, ethanol and isopropanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Biophysical Subjects* **79**: 122-128

- Dainty, J., Hope, A. (1959). The water permeability of cells of *Chara australis* R. Br. *Australian Journal of Biological Sciences* **12**: 136-145
- Dembitsky, V.M., Smoum, R., Al-Quntar, A.A., Ali, H.A., Pergament, I., Srebnik, M. (2002). Natural occurrence of boron containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Science* **163**: 931-942
- DesalData (2015). In, <https://www.desaldata.com/>
- Dixon, R., Garrett, H., Cox, G. (1989). Boron fertilization, vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and growth of *Citrus jambhiri* Lush. *Journal of plant nutrition* **12**: 687-700
- Dordas, C., Brown, P. (2000). Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. *The Journal of membrane biology* **175**: 95-105
- Dordas, C., Brown, P. (2001). Permeability and channel mediated transport of boric acid across plant membranes. An explanation for differential B uptake in plants. In *Plant Nutrition*. Springer, pp 190-191
- Dordas, C., Chrispeels, M.J., Brown, P.H. (2000). Permeability and channel mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant physiology* **124**: 1349-1362
- Dugger, W., Palmer, R. (1980). Effect of boron on the incorporation of glucose from UDP-glucose into cotton fibers grown *in vitro*. *Plant physiology* **65**: 266-273
- Eaton, F.M. (1944). Deficiency, toxicity, and accumulation of boron in plants. *Journal of Agricultural Research* **69**: 237-279
- Eckhart, C.D., Rowe, R.I. (1999). Embryonic dysplasia and adult retinal dystrophy in boron deficient zebrafish. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* **12**: 213-219
- El-Motaium, R., Hu, H., Brown, P.H. (1994). The relative tolerance of six *Prunus* rootstocks to boron and salinity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **119**: 1169-1175
- Elimelech, M., Phillip, W.A. (2011). The future of seawater desalination: energy, technology, and the environment. *Science* **333**: 712-717
- Findlay, G., Hope, A., Pitman, M., Smith, F., Walker, N. (1969). Ionic fluxes in cells of *Chara corallina*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **183**: 565-576
- Fitzpatrick, K.L., Reid, R.J. (2009). The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley roots. *Plant, Cell & Environment* **32**: 1357-1365
- Fornier, J.B. (1985). Características de los patrones de agrios tolerantes a la tristeza. Conselleria D`Agricultura I pesca., Generalitat Valenciana
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia plantarum* **92**: 696-717

- Francois, L. (1988). Yield and quality responses of celery and crisphead lettuce to excess boron. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **113**: 538-542
- Gerdemann, J. (1968). Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual review of phytopathology* **6**: 397-418
- Ghanati, F., Morita, A., Yokota, H. (2002). Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells. *Soil Science and Plant Nutrition* **48**: 357-364
- Gianiazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (1981). Role of endomycorrhizal fungi in phosphorus cycling in the ecosystem. *Mycology series*
- Gimeno, V., Simón, I., Nieves, M., Martínez, V., Cámara-Zapata, J.M., García, A.L., García-Sánchez, F. (2012). The physiological and nutritional responses to an excess of boron by Verna lemon trees that were grafted on four contrasting rootstocks. *Trees* **26**: 1513-1526
- Goldbach, H. (1985). Influence of boron nutrition on net uptake and efflux of ^{32}P and ^{14}C -glucose in *Helianthus annuus* roots and cell cultures of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology* **118**: 431-438
- González-Sicilia, E. (1968). El cultivo de los agrrios.
- Gupta, U.C. (1993). Boron and its role in crop production. CRC press
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research* **31**: 261-272
- Han, S., Tang, N., Jiang, H.-X., Yang, L.-T., Li, Y., Chen, L.-S. (2009). CO_2 assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress. *Plant Science* **176**: 143-153
- Hayes, J.E., Reid, R.J. (2004). Boron tolerance in barley is mediated by efflux of boron from the roots. *Plant physiology* **136**: 3376-3382
- Hernández-Dorrego, A. (2003). Las micorrizas *In*, [www.terraia.com /revista14/pagina12.htm](http://www.terraia.com/revista14/pagina12.htm)
- Hu, H., Brown, P.H. (1994). Localization 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 physiology* **105**: 681-689
- Hu, H., Brown, P.H. (1997). Absorption of boron by plant roots. *Plant and Soil* **193**: 49-58
- Huang, L., Bell, R.W., Dell, B. (2008). Evidence of phloem boron transport in response to interrupted boron supply in white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Kiev Mutant) at the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* **59**: 575-583

- Hueso, J.J. y Cuevas, J. (2014). La fruticultura del siglo XXI. ISBN: 978-84-95531-64-3
- INVAM (2003). International Culture Collection of Arbusular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi *In*, pp Glomus intraradices reference accession: UT 126, Glomus claroideum reference accession: SC 186, (on line)
- Jakobsen, I., Abbott, L., Robson, A. (1992). External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist* **120**: 371-380
- Jentschke, G., Brandes, B., Kuhn, A., Schröder, W., Becker, J.S., Godbold, D. (2000). The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant and Soil* **220**: 243-246
- Josten, P. y Kutschera, U. (1999). The micronutrient boron causes the development of adventitious roots in sunflower cuttings. *Annual Botany*. **84**:337–342.
- Karabal, E., Yücel, M., Öktem, H.A. (2003). Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science* **164**: 925-933
- Kaur, S., Nicolas, M., Ford, R., Norton, R., Taylor, P. (2006). Selection of Brassica rapa genotypes for tolerance to boron toxicity. *Plant and Soil* **285**: 115-123
- Keles, Y., Öncel, I., Yenice, N. (2004). Relationship between boron content and antioxidant compounds in citrus leaves taken from fields with different water source. *Plant and Soil* **265**: 345-353
- Kumar, S., Arora, B., Hundal, H. (1981). Potassium-boron synergism in the nutrition of rice (*Oryza sativa*). *Journal of the Indian Society of Soil Science* **29**: 563-564
- Lambert, D.H., Cole, H., Jr., Baker, D.E. (1980). The role of boron in plant response to mycorrhizal infection. *Plant and Soil* **57**: 431-438
- Landi, M., Pardossi, A., Remorini, D., Guidi, L. (2013). Antioxidant and photosynthetic response of a purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to boron excess. *Environmental and Experimental Botany* **85**: 64-75
- Lavola, A., Aphalo, P.J., Lehto, T. (2010). Boron and other elements in sporophores of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. *Mycorrhiza* **21**: 155-165
- Legaz, F., Primo-Millo, E. (2000). Criterios para la fertilización de los cítricos en riego localizado por goteo. . *In* Curso de fertirrigación de Cítricos, Phytoma-España. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Universitat Politècnica de Valencia
- Lehto, T., Lavola, A., Kallio, E., Aphalo, P.J. (2004). Boron uptake by ectomycorrhizas of silver birch. *Mycorrhiza* **14**: 209-212

- Linderman, R. (1993). Effect of microbial interactions in the mycorrhizosphere on plant growth and health. *In* D Ferrera-Cerratos, L Quintero, eds, Agroecología, sostenibilidad y educación., Centro de Edafología. Montecillo (Estado de México)
- Lovatt, C.J., Bates, L.M. (1984). Early effects of excess boron on photosynthesis and growth of *Cucurbita pepo*. *Journal of Experimental Botany* **35**: 297-305
- Malina, G. (2004). Ecotoxicological and environmental problems associated with the former chemical plant in Tarnowskie Gory, Poland. *Toxicology* **205**: 157-172
- Mano, J. (2002). Early events in environmental stresses in plants: induction mechanisms of oxidative stress. *In* D Inze, MV Montago, eds, Oxidative stress in plants. Taylor and Francis, New York, USA, pp 217–245
- Marjanović, Ž., Uehlein, N., Kaldenhoff, R., Zwiazek, J., Weiß, M., Hampp, R., Nehls, U. (2005). Aquaporins in poplar: What a difference a symbiont makes! *Planta* **222**: 258-268
- Marschner, H., Dell, B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* **159**: 89-102
- Matoh, T. (1997). Boron in plant cell walls. *Plant and Soil* **193**: 59-70
- Matoh, T., Ochiai, K. (2005). Distribution and partitioning of newly taken-up boron in sunflower. *Plant and Soil* **278**: 351-360
- Melgar, J.C., Guidi, L., Remorini, D., Agati, G., Degl'innocenti, E., Castelli, S., Camilla Baratto, M., Faraloni, C., Tattini, M. (2009). Antioxidant defences and oxidative damage in salt-treated olive plants under contrasting sunlight irradiance. *Tree Physiol* **29**: 1187-1198
- Melin, E. (1952). Transport of labelled nitrogen from an ammonium source to pine seedlings through mycorrhizal mycelium. *Svensk Botanisk Tidskrift* **46**: 281-285
- Mitchell, R.J., Garrett, H.E., Cox, G.S., Atalay, A. (1986). Boron and ectomycorrhizal influences on indole-3-acetic acid levels and indole-3-acetic acid oxidase and peroxidase activities of *Pinus echinata* Mill. roots. *Tree Physiology* **1**: 1-8
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* **7**: 405-410
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V., Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* **194**: 346-352
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 31-57

- Nable, R.O. (1988). Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: a preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant and Soil* **112**: 45-52
- Nable, R.O., Bañuelos, G.S., Paull, J.G. (1997). Boron toxicity. *Plant and Soil* **193**: 181-198
- Nable, R.O., Cartwright, B., Lance, R.C. (1990). Genotypic differences in boron accumulation in barley: relative susceptibilities to boron deficiency and toxicity. In Genetic aspects of plant mineral nutrition. Springer, pp 243-251
- Navarro, S., Navarro, G. (2003). Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. In Mundi-Pensa, pp 487
- Nehls, U. (2008). Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1097-1108
- Nielsen, F.H. (2000). The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition* **16**: 512-514
- Nylund, J.-E. (1987). The ectomycorrhizal infection zone and its relation to acid polysaccharides of cortical cell walls. *New Phytologist* **106**: 505-516
- O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A.G. (2004). Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 109-139
- Ochiai, K., Uemura, S., Shimizu, A., Okumoto, Y., Matoh, T. (2008). Boron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). I. Quantitative trait locus (QTL) analysis of tolerance to boron toxicity. *Theoretical and Applied Genetics* **117**: 125-133
- Oertli, J., Kohl, H. (1961). Some considerations about the tolerance of various plants species to excessive supplies of boron. *Soil Science* **92**: 43-247
- Oertli, J.J. (1993). The mobility of boron in plants. *Plant and Soil* **155-156**: 301-304
- Oiwa, Y., Kitayama, K., Kobayashi, M., Matoh, T. (2013). Boron deprivation immediately causes cell death in growing roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Soil Science and Plant Nutrition* **59**: 621-627
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Giannakoula, A. (2004a). Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant Science* **166**: 539-547
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Giannakoula, A. (2004b). Effects of B excess on some physiological and anatomical parameters of 'Navelina' orange plants grafted on two rootstocks. *Environmental and Experimental Botany* **51**: 247-257
- Parks, J.L., Edwards, M. (2005). Boron in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **35**: 81-114

- Paull, J., Cartwright, B., Rathjen, A. (1988). Responses of wheat and barley genotypes to toxic concentrations of soil boron. *Euphytica* **39**: 137-144
- Plassard, C., Dell, B. (2010). Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology* **30**: 1129-1139
- Power, P.P., Woods, W.G. (1997). The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant and Soil* **193**: 1-13
- Raven, J. (1980). Short and long distance transport of boric acid in plants. *New Phytologist* **84**: 231-249
- Reid, R. (2007). Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant and Cell Physiology* **48**: 1673-1678
- Reid, R. (2014). Understanding the boron transport network in plants. *Plant and Soil* **385**: 1-13
- Reid, R., Fitzpatrick, K. (2009). Influence of leaf tolerance mechanisms and rain on boron toxicity in barley and wheat. *Plant Physiology* **151**: 413-420
- Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R., Graham, R.D. (2004). A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1405-1414
- Roldán, M., Belver, A., Rodríguez-Rosales, P., Ferrol, N., Donaire, J.P. (1992). In vivo and in vitro effects of boron on the plasma membrane proton pump of sunflower roots. *Physiologia plantarum* **84**: 49-54
- Ruiz, J.M., Bretones, G., Baghour, M., Ragala, L., Belakbir, A., Romero, L. (1998). Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry* **48**: 269-272
- Sanders, F.E., Tinker, P.B. (1973). Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pesticide Science* **4**: 385-395
- Schüßler, A. (2015). The arbuscular mycorrhiza (AM) symbiosis. In, pp Ludwig-Maximilians-Universität München
- Shaffer, D.L., Yip, N.Y., Gilron, J., Elimelech, M. (2012). Seawater desalination for agriculture by integrated forward and reverse osmosis: Improved product water quality for potentially less energy. *Journal of membrane science* **415**: 1-8
- Sies, H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift* **69**: 965-968
- Sies, H. (1994). Strategies of antioxidant defense. In EJB Reviews 1993. Springer, pp 101-107

- Sims, J., Bingham, F. (1967). Retention of boron by layer silicates, sesquioxides, and soil materials: I. Layer silicates. *Soil Science Society of America Journal* **31**: 728-732
- Slater, T.F. (1988). Free radical mechanisms in tissue injury. *In Cell Function and Disease*. Springer, pp 209-218
- Smith, S.E., Read, D.J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. Academic press 3^a ed.
- Sonmez, O., Aydemir, S., Kaya, C. (2014). Mitigation effects of mycorrhiza on boron toxicity in wheat (*Triticum durum*) plants. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **37**: 99-104
- Stangoulis, J., Tate, M., Graham, R., Bucknall, M., Palmer, L., Boughton, B., Reid, R. (2010). The mechanism of boron mobility in wheat and canola phloem. *Plant Physiology* **153**: 876-881
- Stangoulis, J.C., Reid, R.J., Brown, P.H., Graham, R.D. (2001). Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. *Planta* **213**: 142-146
- Sword, M.A., Garrett, H.E. (1994). Boric acid phenolic relationships within the *Pinus echinata-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizal association. *Tree physiology* **14**: 1121-1130
- Takano, J., Miwa, K., Fujiwara, T. (2008). Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in plant science* **13**: 451-457
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., Fujiwara, T. (2002). Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature* **420**: 337-340
- Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S., Fujiwara, T. (2010). Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**: 5220-5225
- Timonen, S., Peterson, R.L. (2002). Cytoskeleton in mycorrhizal symbiosis. *In* S Smith, FA Smith, eds, *Diversity and Integration in Mycorrhizas*, Vol **94**. Springer Netherlands, pp 199-210
- van Hees, P.A., Jones, D.L., Finlay, R., Godbold, D.L., Lundström, U.S. (2005). The carbon we do not see the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 1-13
- Vargas-Amelin, E., Pindado, P. (2014). The challenge of climate change in Spain: water resources, agriculture and land. *Journal of Hydrology* **518**: 243-249
- Velarde, A.M. (2009). Modulación del transporte iónico por poliaminas y especies reactivas de oxígeno y su posible impacto en la respuesta de plantas al estrés salino. Universidad de Colima, Colima

- Voutchkov, N. (2005). Desalination water for the next generation. *Filtration & Separation* **42**: 14-25
- Wang, J., Tao, S., Qi, K., Wu, J., Wu, H., Zhang, S. (2011). Changes in photosynthetic properties and antioxidative system of pear leaves to boron toxicity. *African Journal of Biotechnology* **10**: 19693-19700
- Warrington, K. (1923). The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Annals of Botany* **37**: 629-672
- Wear, J.I., Patterson, R. (1962). Effect of soil pH and texture on the availability of water soluble boron in the soil. *Soil Science Society of America Journal* **26**: 344-346
- WHO (2004). Guidelines for drinking water quality: recommendations, **Vol 1**. World Health Organization
- Wikner, B. (1983). Distribution and mobility of boron in forest ecosystems. *Communicationes-Institutii Forestalis Fenniae*
- Wimmer, M.A., Lochnit, G., Bassil, E., Mühlhng, K.H., Goldbach, H.E. (2009). Membrane associated, boron interacting proteins isolated by boronate affinity chromatography. *Plant and cell physiology* **50**: 1292-1304
- Wutscher, H. (1989). Alteration of fruit tree nutrition through rootstocks. *Horticultural Science* **24(4)**: 578-583
- Young, A.J. (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia plantarum* **83**: 702-708

Capítulo 2

Objetivos y Plan de Trabajo



2.1. Objetivos

Las altas concentraciones de boro en las aguas de riego procedentes de plantas desalinizadoras y depuradoras podrían ser un problema importante para nuestros cultivos a corto plazo, especialmente en los cítricos que es un cultivo muy sensible a la toxicidad por boro. Se sabe que concentraciones de B en el agua de riego superior a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ disminuyen la producción y calidad de la fruta. Es por ello que el sector citrícola quiere conocer que estrategias agronómicas se pueden aplicar para disminuir los efectos tóxicos que tiene este micronutriente. Los árboles de cítricos están formados por la variedad y el portainjerto en el cual se injerta la variedad. Los portainjertos de cítricos pueden modificar más de 20 características hortícolas diferentes entre las que se incluyen la tolerancia a determinados estreses abióticos. Por otro lado, en los últimos años también se ha mostrado que la simbiosis hongo-planta puede afectar positivamente a los cultivos que sufren algún tipo de estrés abiótico. Bajo este contexto, el objetivo general de la tesis es incrementar en cítricos la tolerancia a la toxicidad por boro mediante el uso de portainjertos adecuados o mediante la micorrización con hongos arbusculares. Dentro de este objetivo general se plantea también conocer que mecanismos fisiológicos hacen que unos portainjertos (diferentes variedades o micorrizados) sean más tolerantes que otros. Para determinar estos mecanismos fisiológicos se propuso medir parámetros relacionados con el intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas, crecimiento vegetativo, nutrición mineral, acumulación de solutos orgánicos, sistemas antioxidantes contra especies reactivas de oxígeno, etc. El análisis de estos parámetros conjuntamente nos dará una idea de cómo los cítricos responden al exceso de boro. Para llevar a cabo estos objetivos se diseñaron tres experimentos:

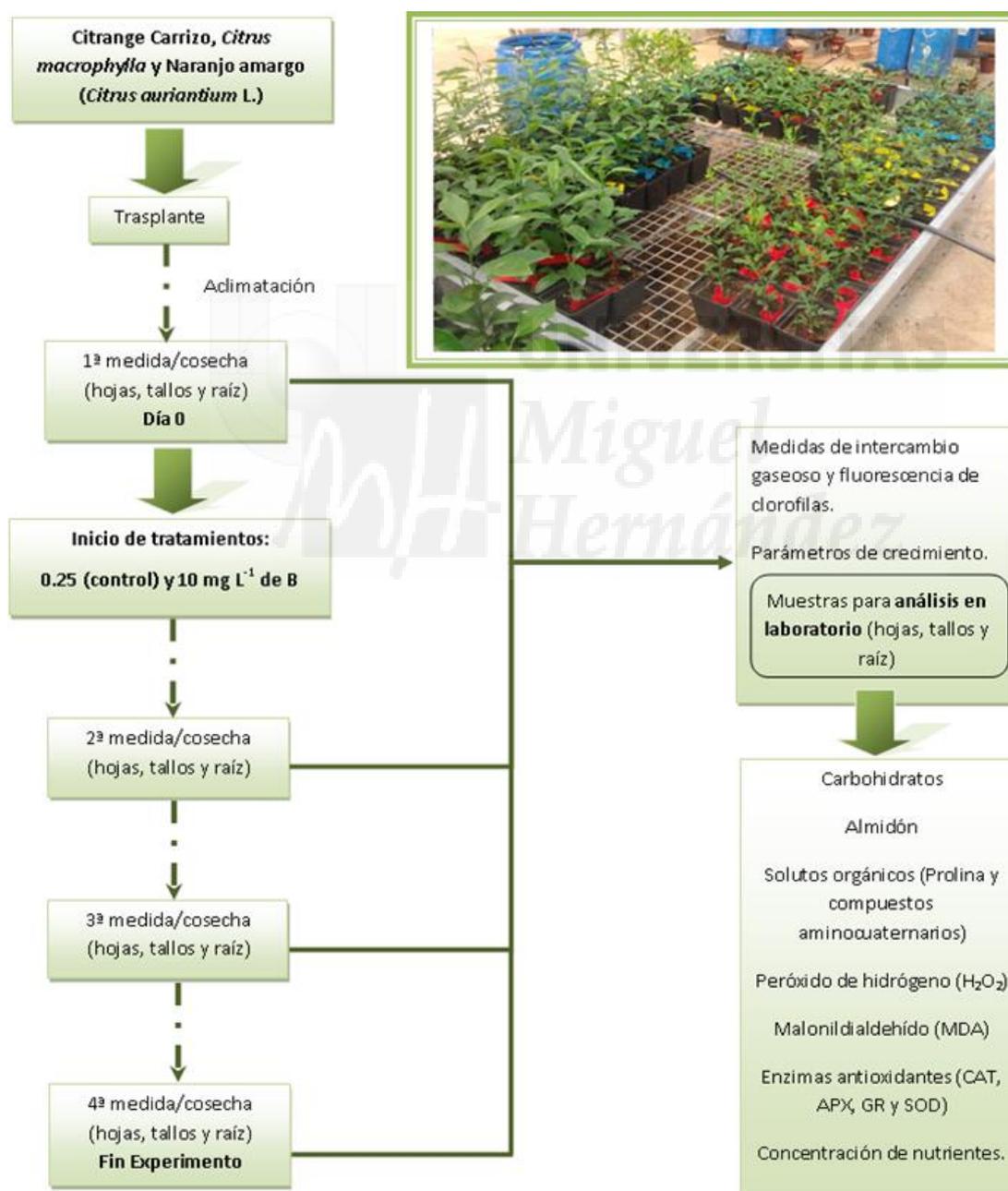
Experimento 1: estudio de la tolerancia de los portainjertos citrange Carrizo, *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo a la toxicidad por boro.

Experimento 2: comparar tolerancia a la toxicidad por boro de los portainjertos citrange Carrizo y mandarino Cleopatra con el portainjerto Forner-Alcaide nº 5, portainjerto desarrollado a partir de estos dos portainjertos.

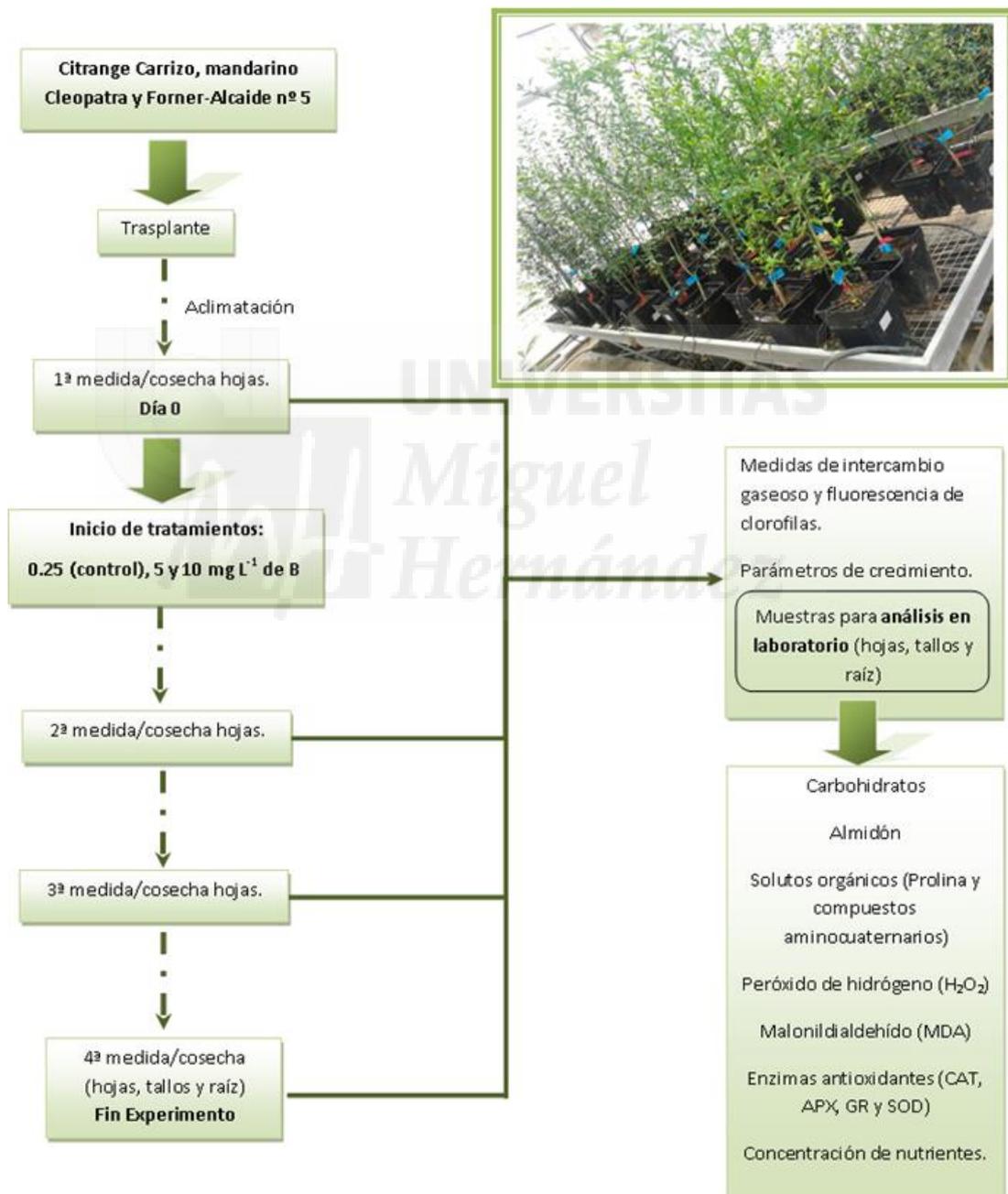
Experimento 3: estudio de la tolerancia del portainjerto citrange Carrizo micorrizado a la toxicidad por boro.

2.2. Plan de trabajo

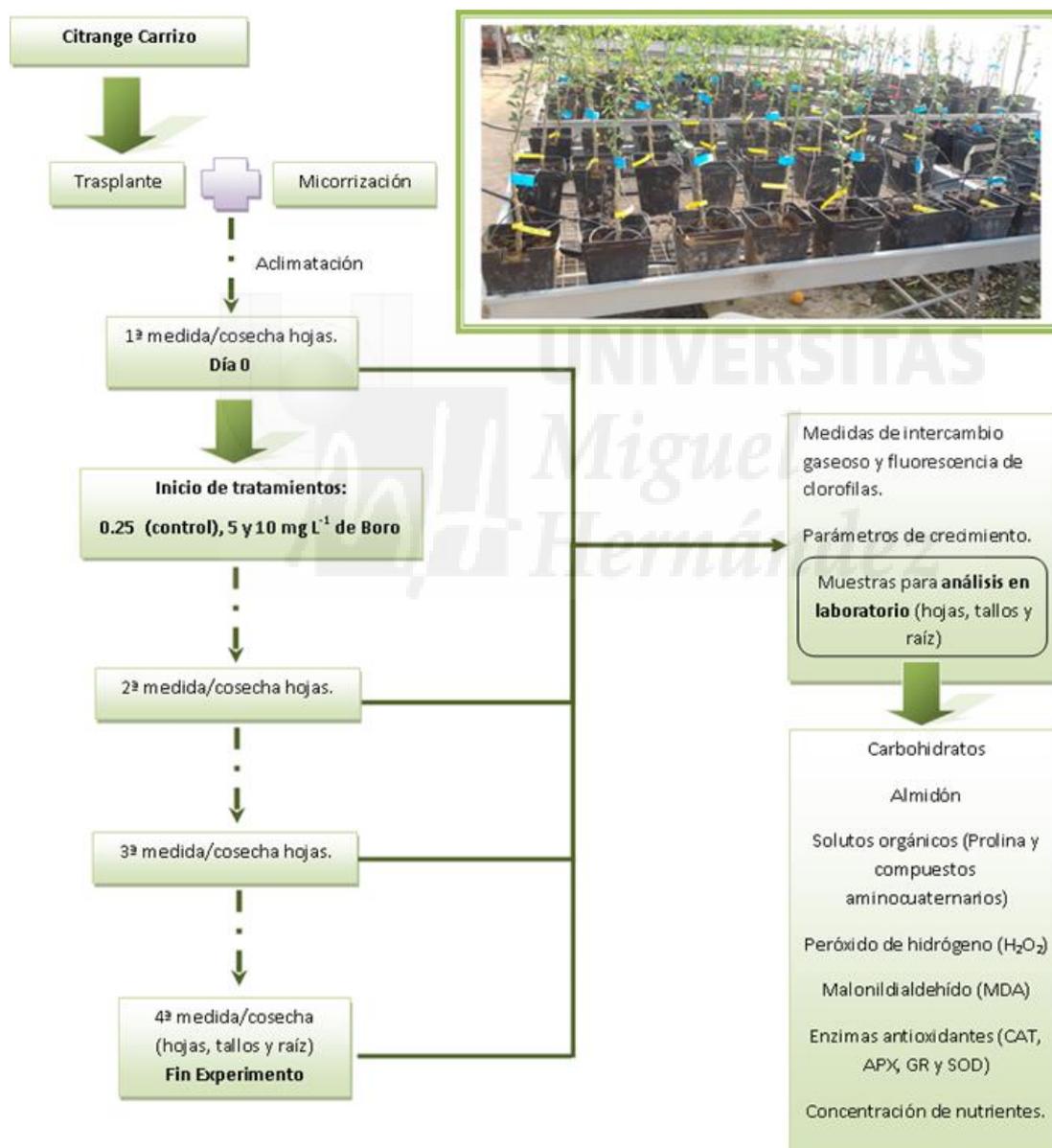
Experimento 1. Este experimento se realizó en 2012 en la finca experimental del CEBAS situada en La Matanza, en el término municipal de Santomera (a 18 km de Murcia), en un invernadero cuyas características se describen más adelante en esta memoria. El experimento duró 119 días (sin incluir los 33 días de aclimatación tras el trasplante). Para la consecución de los objetivos se realizó el siguiente plan de trabajo:



Experimento 2. Este experimento se realizó en 2013 en la finca experimental del CEBAS situada en La Matanza, en el término municipal de Santomera (a 18 km de Murcia), en un invernadero cuyas características se describen más adelante en esta memoria. Este experimento duró 83 días (sin incluir los 29 días de aclimatación tras el trasplante). Para la consecución de los objetivos se realizó el siguiente plan de trabajo:



Experimento 3: Este experimento se realizó en 2013 en la finca del CEBAS situada en La Matanza, en el término municipal de Santomera (a 18 km de Murcia), en un invernadero cuyas características se describen más adelante en esta memoria. El experimento duró 84 días (sin incluir los 28 días de aclimatación tras el trasplante y la micorrización de las raíces). Para la consecución de los objetivos se realizó el siguiente plan de trabajo:



Capítulo 3

Estudio de la Tolerancia de los Portainjertos Citrange Carrizo, Naranja Amargo y Citrus Macrophylla a la Toxicidad por Boro

Miguel Hernández

3.1. Introducción

La selección de portainjertos representa, en la actualidad, un aspecto de máxima importancia en citricultura, ya que de esta elección depende el éxito de la plantación. El portainjerto no es sólo el responsable de la absorción de agua y nutrientes, sino que también juega un papel decisivo en la adaptación de los árboles a condiciones medioambientales adversas, e incluso les confiere cierta tolerancia a enfermedades y plagas. Más de 20 características hortícolas de una variedad pueden ser determinadas por el patrón, sin embargo, el patrón perfecto no existe. Su elección debe estar en función de los principales factores limitantes de cada región citrícola, el clima y tipo de suelo, y la variedad a cultivar.

Actualmente, en España los patrones más utilizados son el citrange Carrizo (57%), *Citrus macrophylla* (23%), *Citrus Volkameriana* (7%), y mandarino Cleopatra (5%); mientras que en el portainjerto más popular hace 15 años, naranjo Amargo, se ha restringido su uso solamente al cultivo del limonero, debido a su sensibilidad al virus de la tristeza. De todos estos portainjertos se conoce su comportamiento frente a ciertas condiciones del suelo (caliza, salinidad, asfixia radicular, heladas y sequía) e incluso su comportamiento frente a ciertas enfermedades (*Phytophthora* sp., *Armillaria mellea* y *Tylenchulus semipenetrans*) y virosis o enfermedades afines (Tristeza, Exocortis, Psoriasis y Xyloporosis). Sin embargo, poco se conoce como responden ante el exceso de boro en el agua de riego, un problema que ha surgido en España en los últimos años, al emplear para el riego aguas residuales o desalinizadas. Lo que sí se sabe sobre el boro es que las variedades de cítricos son muy sensibles a su toxicidad, por lo que es necesario conocer las respuestas de los portainjertos de cítricos a este estrés, y clasificarlos según su tolerancia como ya se ha hecho con otros estreses. Por ello, se planteó un experimento para estudiar la tolerancia al exceso de boro de los portainjertos citrange Carrizo (CC), *Citrus macrophylla* (CM) y naranjo Amargo (NA), aplicando una dosis de boro de 10 mg L⁻¹ en forma de ácido bórico. En este experimento se realizaron medidas de parámetros de crecimiento, intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas, nutrición mineral y solutos orgánicos en los diferentes tejidos de la planta, y medidas del metabolismo antioxidante para caracterizar las respuestas fisiológicas de estos tres portainjertos y así conocer los mecanismos que hacen que unos portainjertos sean más sensibles que otros.

3.2. Material y Métodos

3.2.1. Material Vegetal

Para realizar este experimento se usaron plantas de tres semanas de edad desde su germinación, de los patrones citrange Carrizo (híbrido entre *Poncirus trifoliata* [L.] Raf. × *Citrus sinensis* L.), *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo (*Citrus aurantium* L.) adquiridos en un vivero comercial (Viveros Torreblanca S.L., España; imagen 3.1) con su certificado y su etiqueta oficial de calidad. La selección de las plantas utilizadas en el ensayo se realizó basándose en la uniformidad de altura. Una vez realizada la selección, y antes de empezar los tratamientos de boro, se procedió al trasplante a macetas de 0,5 L de volumen con sustrato universal de granulometría fina, libre de patógenos y de semillas de malas hierbas. Cuando las plántulas alcanzaron una altura aproximada de 30 cm fueron pasadas a macetas de 7 L de volumen con el mismo tipo de sustrato universal que en el caso anterior.



Imagen 3.1. Plantas utilizadas en el experimento de portainjertos. 1: *Citrus macrophylla*; 2: naranjo Amargo; y 3: citrange Carrizo.

El sustrato utilizado consistió en una mezcla de turba rubia y negra, fibra de coco y perlita (5:4:1 Projar, España). Este sustrato permite una aireación y drenaje suficientes para un buen desarrollo de la planta (Peñuelas y Filella, 1998).

3.2.2. Descripción del invernadero y condiciones del cultivo

El experimento se realizó en la finca experimental del CEBAS, situada en La Matanza, en el término municipal de Santomera (a 18 km de Murcia), en un invernadero tipo multitúnel construido con placas de policarbonato y techo de polietileno, tiene una superficie de 650 m² y 4,5 m de altura hasta la canal (Imagen 3.2). Para el control de la temperatura se dispone de un sistema de refrigeración del tipo “Cooling-system” que mantiene la temperatura por debajo de los 30 °C en verano. Además, el invernadero consta de ventiladores y de un sistema de calefacción con generador de aire caliente por combustión indirecta (SIAL Mirage 65) que mantiene la temperatura por encima de los 9 °C en invierno, y malla térmica para retener el calor.



Imagen 3.2. Vista parcial del invernadero donde se realizó el experimento.

El experimento se desarrolló durante los meses de Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre de 2012 con las siguientes características climáticas: temperatura día/noche 35/18 ± 3 °C, humedad relativa día/noche 65/85 ± 5% y un fotoperiodo de 16 h. El control de la humedad se realiza mediante un equipo de

humidificación con compresor de aire (Ingersoll-Rand SSR), manteniendo la humedad relativa en un 65%. Para el control de la radiación se dispone de una malla de sombreo de Aluminio (30%). El invernadero incluye un sistema de sensores de irradiación, temperatura y humedad relativa colocados a una altura de 1,5 m. Todos los datos se cogen periódicamente y son almacenados en una base de datos para su posterior análisis.

Para combatir las plagas se colocaron trampas cromatrópicas a lo largo del invernadero, y se aplicaron periódicamente vía foliar insecticidas, fungicidas y acaricidas (Imidacloprid, y Buprofezina) para el control de la mosca blanca (*Trialeuro desvaporariorum* y *Bemisia tabaci*), pulgones (*Myzus persicae* y *Aphis gossypii*), trips (*Frankliniella occidentalis*), araña roja (*Tetranychus urticae*), y minador (*Phyllocnistis citrella*).

3.2.3. Concentración de boro en la solución nutritiva

Las plantas se regaban 3 veces por semana con solución nutritiva Hoagland modificada (mM): 20 N, 0,75 P, 4,2 K y 6 Ca; y una mezcla de micronutrientes (μM): 25 B, 2 Mn, 2 Zn, 0,5 Cu, 0,5 Mo y 20 Fe^{+3} . El riego se aplicaba de forma manual con un volumen suficiente para conseguir un drenaje del 15% del volumen total aplicado. El agua empleada para la preparación de las soluciones nutritivas provenía del trasvase Tajo-Segura, y la composición de la solución nutritiva se ajustaba según la composición de esta agua, utilizándose los siguientes fertilizantes comerciales: KNO_3 (13-0-46), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (14,5-0-0), KH_2PO_4 (0-52-34), NH_4NO_3 (34,5-0-0) y un complejo de micronutrientes (Kelkat mix. Atlántica Agrícola SL, Alicante).

Tras 33 días de aclimatación, se realizó una medida de fotosíntesis y fluorescencia de clorofilas, y se cosecharon tres plantas de cada portainjerto para establecer cómo se encontraban las plantas al inicio del experimento (día 0). Posteriormente se iniciaron los diferentes tratamientos de B, adicionando a la solución nutritiva de cada tratamiento la siguiente concentración de B (Imagen 3.3):

- **Control** o **B0** (0,25 mg L^{-1} de B procedente del complejo de micronutrientes Kelkat)
- **B10** (10 mg L^{-1} de B aplicado como ácido bórico; H_3BO_3).



Imagen 3.3. Cubas de 120 L empleadas en el experimento para regar con los distintos tratamientos de boro (**B0** o **control**, 0,25 mg L⁻¹; **B10**, 10 mg L⁻¹).

3.2.4. Determinaciones analíticas

3.2.4.1. *Parámetros de crecimiento*

A lo largo del experimento se realizó un seguimiento de los parámetros de crecimiento cosechando plantas a los 0, 45, 84 y 119 días. En cada cosecha se separaban y pesaban el peso fresco de hojas, tallo y raíz de cada planta individualmente (4 plantas por tratamiento) mediante una balanza de precisión electrónica portátil. Cada una de estas partes, se introdujeron en una estufa a 65 °C durante 3-4 días, previamente lavadas con agua destilada. Una vez seco el material vegetal, se volvió a pesar para conocer el peso seco de cada uno de los tejidos de la planta. A partir del peso seco de hojas, tallo y raíz, se calculó la biomasa total (BT; corresponde a la suma del peso seco de hojas, del tallo y raíz) y la tasa de crecimiento relativo (TCR) siguiendo la ecuación de Fernandez-Ballester y col. (2003).

La TCR constituye el parámetro fundamental del análisis de crecimiento tradicional. Expresa el crecimiento en términos de velocidad de incremento en tamaño por unidad de tamaño. Se calcula a partir de la masa total de la planta (M):

$$TCR = \frac{1}{M} \frac{dM}{dt} = \frac{d(\ln M)}{dt}$$

$$TCR = \int_1^2 \frac{1}{M} \frac{dM}{dt} = \int_1^2 \frac{d(\ln M)}{dt} \rightarrow TCR = \frac{\ln M_2 - \ln M_1}{t_2 - t_1}$$

Donde M_2 y M_1 corresponden a la biomasa total seca de la planta correspondientes al tiempo transcurrido entre los muestreos sucesivos (t_2 y t_1 , respectivamente). Se suele expresar en $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ o $\text{g g}^{-1} \text{s}^{-1}$.

3.2.4.2. Parámetros de intercambio gaseoso

Al inicio del experimento (día 0), durante y al final del mismo, se midieron los parámetros de intercambio gaseoso: asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}), conductancia estomática (g_s), transpiración foliar (E_{leaf}), uso eficaz del agua ($\text{UEA} = A_{\text{CO}_2}/E_{\text{leaf}}$) y CO_2 subestomático (C_i). Estos parámetros se midieron entre las 8:00 y las 10:00 de la mañana utilizando un analizador portátil de gases para la medición de parámetros de intercambio gaseoso (PP System Ciras2, UK; imagen 3.4). Durante las medidas el equipo se configuró para mantener la luz (PAR: $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y la concentración de CO_2 (400 ppm) constante en la cámara de medida.



Imagen 3.4. Equipo portátil de fotosíntesis (PP System Ciras2, UK) empleado para hacer las medidas de intercambio gaseoso.

3.2.4.3. Parámetros de fluorescencia de clorofilas

Las medidas de fluorescencia de clorofilas se realizaron en los mismos días y en las mismas hojas en las que se midieron los parámetros de intercambio gaseoso utilizando un fluorímetro de pulso modulado FMS-2 portátil (Hansatech Instruments Ltd., UK; imagen 3.5). Los equipos de fluorescencia de clorofilas son capaces de medir la luz fluorescente y dependiendo de las condiciones de medida nos dan información sobre la fase luminosa de la fotosíntesis. El equipo de fluorescencia de

clorofilas mide los siguientes parámetros relacionados con la fase luminosa de la fotosíntesis:

- F_0 : fluorescencia mínima de hojas adaptadas a la oscuridad.
- F_m : valor máximo de fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad.
- F_v : componente variable de la fluorescencia, obtenida al restarle al valor de fluorescencia máxima el valor de fluorescencia inicial.
- PAR: radiación de luz fotosintéticamente activa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- Temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$).
- F_s : fluorescencia estable en hojas adaptadas a la luz.
- F_m' : máxima fluorescencia en hojas adaptadas a la luz después de aplicar un pulso saturante de luz actínica.
- F_0' : fluorescencia mínima en hojas adaptadas a la luz después de un pulso de luz roja.
- F_v' : fluorescencia variable en hojas iluminadas ($F_v' = F_m' - F_0'$).

A partir de estos parámetros se calcularon las siguientes variables:

- **F_v/F_m** : es la máxima eficiencia cuántica de los centros de reacción del PSII. Es la fluorescencia variable dividida por la fluorescencia máxima. Esta es una relación útil, que ha mostrado ser proporcional al rendimiento cuántico fotoquímico y muestra un alto grado de correlación con el rendimiento cuántico de la fotosíntesis neta.
- **ETR** : es el índice de la tasa de transporte de electrones y se calcula con la siguiente ecuación: $ETR = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times 0,5 \times a$; donde PPFD es la densidad de flujo fotónico fotosintético incidente, 'a' es la fracción de luz que es absorbida por la hoja y 0,5 es la fracción de luz absorbida utilizada por el PSII.
- **Φ_{PSII}** : es la eficiencia fotoquímica del PSII y se calcula con la ecuación $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$. Hace referencia a los cambios en el rendimiento cuántico efectivo a la luz.
- **F_v'/F_m'** : es la eficiencia de las antenas en los centros de reacción del PSII.
- **qP o "quenching fotoquímico"**: se calcula como $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$. Se considera una medida del estado de oxidación de Q_A (plastoquinona) o sea, la

proporción de centros del PSII que se encuentran en estado “abierto”. Su valor puede estar entre 0 y 1.

• **NPO o “quenching no fotoquímico”**: es calculado como $(F_m - F_m') / (F_m')$. Una alternativa a esta definición es $qN = 1 - (F_m' - F_0') / (F_m - F_0)$. Su valor puede estar entre 0 y 1.

En nuestro experimento, las hojas utilizadas fueron acondicionadas previamente en la oscuridad durante 30 minutos e iluminadas durante 5 micro segundos para inducir la fluorescencia. Se determinó la fluorescencia inicial (F_0) y la fluorescencia máxima (F_m).



Imagen 3.5. Equipo portátil de fluorescencia de clorofilas (fluorímetro de pulso modulado FMS-2 portátil; Hansatech Instruments Ltd., UK) empleado para hacer las medidas de cinética de emisión de la fluorescencia de la clorofila.

Con este equipo también se hizo una cinética de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz para obtener los parámetros: F_0' , F_m' y F_s . Para ello, las hojas se iluminaron con un PAR de $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 2 minutos y después se aplicó un pulso de luz saturante ($12.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para 0.8 s). Tras este pulso se apagó la fuente de luz actínica y se aplicó un pulso de luz roja lejana (735 nm) para drenar los electrones del PSII.

Parte de la luz que incide en una hoja es capturada por los pigmentos fotosintéticos (Figura 3.1). Dependiendo de la longitud de onda, la luz entra en uno de los dos centros de reacción llamados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII), que están localizados en las membranas de los cloroplastos. Cuando una molécula de Chl_a absorbe un fotón de energía, uno de sus electrones adquiere un estado de

energía mayor, y en este estado el electrón puede pasar a una molécula de quinona (Q_A) reduciéndola (Q_A^-) e iniciando el transporte lineal de electrones (Figura 3.1).

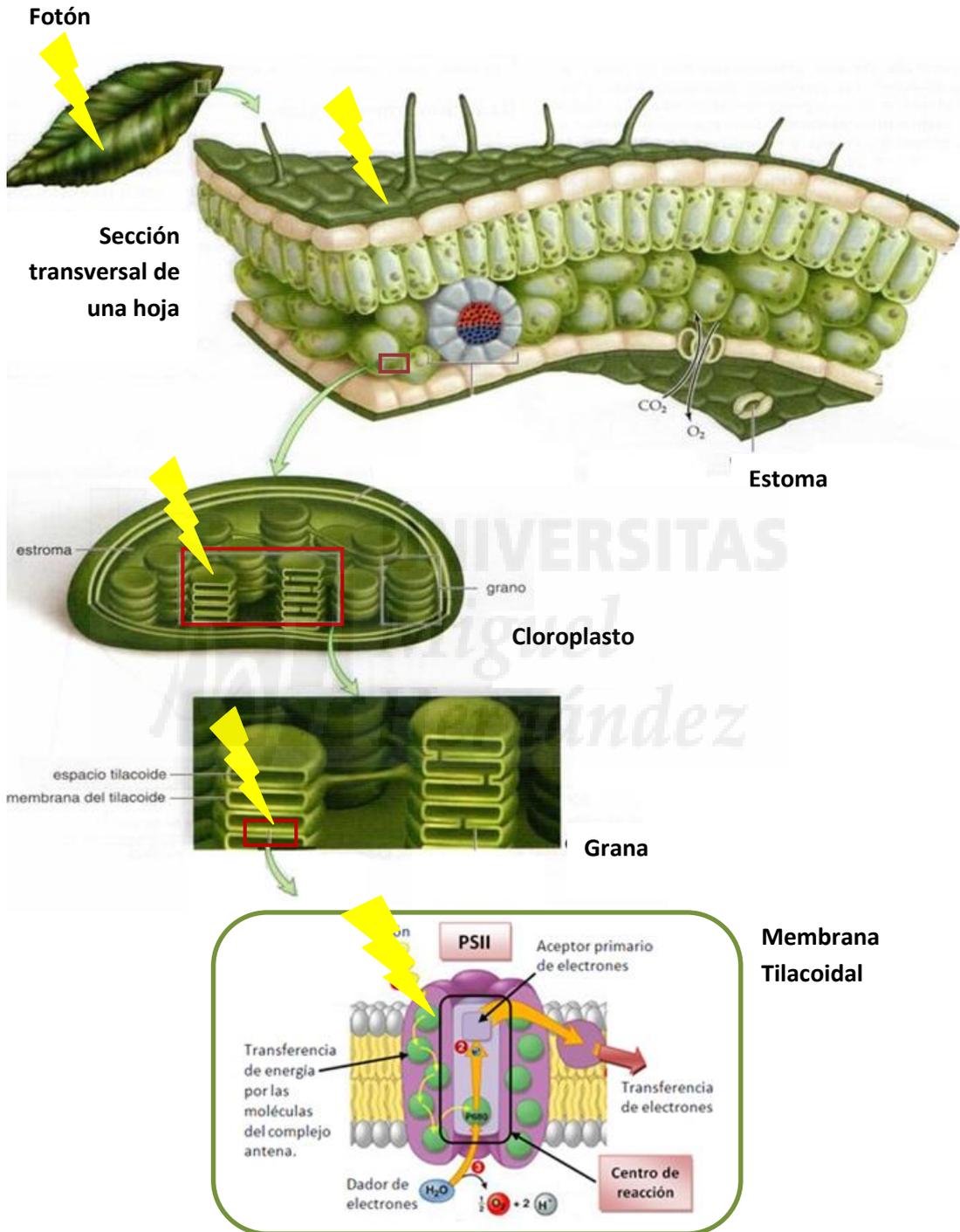


Figura 3.1. Diagrama simplificado de la transferencia del fotón durante la fase luminosa de la fotosíntesis desde que entra en contacto con la hoja hasta llegar al centro de reacción del PSII y pasar así a la cadena de transporte de electrones. Ilustración recuperada y modificada de Mader, S. (2008) y Pearson Benjamin Cummings (eds.) 2005 (<http://es.paperblog.com>).

Este proceso puede pasar indistintamente en el PSI y el PSII (PSI y PSII son nombrados así no por el orden de reacción sino por el orden en que estos sistemas fueron descubiertos). En el PSI el proceso fotoquímico genera poder reductor en forma de NADPH que se utilizará más tarde en el ciclo de Calvin para asimilar el CO₂ atmosférico y sintetizar azúcares. De esta forma la energía luminosa es convertida en energía química. Otro proceso importante en el proceso lumínico de la fotosíntesis es el llamado “fotólisis del agua”. Este proceso consiste en suministrar electrones a las clorofilas procedentes de la ruptura de las moléculas de agua generando así H⁺ y oxígeno que es liberado a la atmósfera.

Los protones generados participarán mediante la bomba de protones ATP_{asa} en la regeneración de ATP a partir del ADP. Cuando una molécula de Chl_a es excitada mediante la luz, no siempre los electrones pasan a la cadena del transporte de electrones sino que esta energía puede ser disipada en forma de calor (“quenching no fotoquímico”) o mediante la emisión de luz fluorescente (“quenching fluorescente”).

Estas medidas de fluorescencia de clorofilas son una herramienta muy útil que permite estudiar los cambios que se producen en el PSII sin necesidad de hacer medidas invasivas en las plantas. Además estas medidas son muy sensibles y complementarias con las medidas de los parámetros de intercambio gaseoso.

3.2.4.4. Determinación de la concentración de nutrientes minerales

Para estudiar cómo evolucionó la concentración de B y otros nutrientes en hojas y raíz, se analizaron las muestras que se iban cosechando a lo largo del experimento y que fueron previamente secadas y molidas. La concentración de B junto con la de los elementos K, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Mn, Na, S y Zn, se analizaron mediante espectrometría de plasma acoplado inductivamente (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA), tras la digestión previa con HNO₃:H₂O₂ (5:3 en volumen) utilizando un microondas (CERM) con una rampa de temperatura en la que se alcanza 200 °C en 20 min, y se mantenía a esa temperatura durante 2 h (CEM Mars, Xpress, North Carolina, USA).

Además, la tasa de absorción neta de boro por la raíz (TAN) y su transporte ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{día}^{-1}$) desde la raíz hasta la parte aérea de la planta fueron calculadas

como se describe a continuación (Pitman, 1988; Fernandez-Ballester y col., 2003; García-Sánchez y col., 2005):

$$TAN = \left[\frac{\ln R_2 - \ln R_1}{R_2 - R_1} \right] \times \left[\frac{C_{T2} - C_{T1}}{t_2 - t_1} \right]$$

Donde R_2 y R_1 corresponden al peso seco radicular y C_{T2} y C_{T1} son el contenido de boro en todos los tejidos de la planta (hojas + tallo + raíz) correspondientes a dos muestreos sucesivos 2 y 1 (t_2 y t_1 , respectivamente). El contenido de boro en cada órgano se determinó como el producto entre el peso seco de cada tejido y la concentración de cada uno de estos nutrientes en dichos tejidos.

$$Transporte = \left[\frac{\ln R_2 - \ln R_1}{R_2 - R_1} \right] \times \left[\frac{C_{A2} - C_{A1}}{t_2 - t_1} \right]$$

Donde R_2 y R_1 corresponden al peso seco radicular y C_{A2} y C_{A1} son el contenido de boro en la parte aérea de la planta (hojas + tallo) correspondientes a dos muestreos sucesivos (t_2 y t_1 , respectivamente).

3.2.4.5. Determinación de la concentración de prolina

El contenido de prolina se midió en hoja, tallo y raíz de acuerdo con el método propuesto por Bates y col. (1973), con algunas modificaciones. Para ello, se pesaron 20 mg de muestra de material seco y se le añadió 1 mL de ácido sulfosalicílico al 3%. Se agitó la mezcla durante 1 h a 30 °C y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, se tomaron 125 µL del sobrenadante y se le añadieron 125 µL de ácido acético glacial y 125 µL de la preparación de nihidrina ácida. A continuación, esta mezcla se calentó a 90 °C en un baño durante 1 h. Posteriormente, se enfrió en hielo y se extrajo el cromóforo añadiendo a la mezcla 4 mL de Tolueno. Se midió la absorbancia a 520 nm. Se preparó la curva estándar con el patrón de prolina (0, 50, 100, 150, 300 y 500 mg L⁻¹). La concentración de prolina fue expresada en mg g⁻¹ de peso seco (ps).

3.2.4.6. *Determinación de la concentración de compuestos de amonio cuaternarios (CAQ)*

Los compuestos amoniocuaternarios (CAQ) fueron extraídos y cuantificados del material seco siguiendo el protocolo de Grieve y Grattan (1983), sujeto a ciertas modificaciones. Se pesaron 20 mg de material seco, se homogeneizó con 1 mL de agua desionizada y se mantuvo en agitación durante 24 h a 30 °C. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó la mezcla durante 5 min a 5.000 rpm; y tomando 250 µL del sobrenadante, se le añadió 250 µL de H₂SO₄ (1 N). Se mezcló todo vigorosamente y se dejó durante 1 h en hielo. Posteriormente, a la mezcla se le añadió 250 µL del preparado KI-I₂ y se mantuvo en reposo a 4 °C durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 0 °C y, descartando el sobrenadante, se procedió a disolver los cristales que se han formado con 2 mL de 1,2-dicloroetano. Se dejó reposar durante 15-20 minutos y se procedió a medir la absorbancia a 365 nm. Se preparó una recta de calibrado con glicina-betaína (GB) con las siguientes concentraciones: 0, 25, 50, 75 y 100 mg L⁻¹. La concentración de CAQ fue expresada en mg betaína g⁻¹ ps.

3.2.4.7. *Determinación de la concentración de carbohidratos*

También se determinó la concentración de carbohidratos no estructurales incluyendo azúcares solubles totales, azúcares reductores y almidón en los diferentes tejidos de la planta (Nelson, 1944; Somogy, 1952; Hodge y Hofreiter, 1962; Haissig y Dickson, 1979; Perez-Perez y col., 2007).

Preparación y extracción de las muestras

Se pesaron 30 mg de material seco y se homogeneizó con 900 µL de etanol al 80%, se mantuvo en agitación durante 30 min. Posteriormente se centrifugó durante 3 min a 10.000 rpm y se guardó el sobrenadante. Al eppendorf con el sedimento se le añadió de nuevo 300 µL de etanol (80%), se centrifugó durante 3 min a 10.000 rpm y se guardó de nuevo el sobrenadante junto al anterior (este paso se repitió una vez más). La “fase líquida”, formada por los sobrenadantes, se guardó a 4 °C hasta su posterior análisis, la “fase sólida” formada por el pellet sedimentado se dejó secar a temperatura ambiente durante 16 h.

Cuantificación de Azúcares Solubles Totales. Método de la Antrona

Se tomó 30 μL de la “Fase líquida”, se llevó a 300 μL con agua desionizada y se le añadió 1 mL de antrona al 0,2% con H_2SO_4 (97%). Se sometió a la mezcla a ebullición durante 5 min, y posteriormente se enfrió en hielo durante 1 min. Se midió la absorbancia a 625 nm antes de que transcurrieran dos horas. Se preparó una recta patrón con glucosa a las siguientes concentraciones: 0, 100, 250, 500, 750 y 1.000 mg L^{-1} . La concentración de azúcares solubles totales fue expresada en mg de glucosa g^{-1} ps.

Cuantificación de Azúcares Reductores

Se tomó 50 μL de la “Fase líquida”, se llevó a 100 μL con agua desionizada y se le añadió 100 μL de reactivo A (Blue)*. Se mezcló bien y se puso durante 10 min en un baño a 90 °C. Transcurrido ese tiempo, se pusieron las muestras en hielo durante 1 min, y se le añadieron 100 μL de reactivo B^γ (se volvió a mezclar todo bien). Para finalizar se añadió 700 μL de agua desionizada, se volvió a mezclar todo bien y se midió la absorbancia a 520 nm. Se preparó una recta patrón con glucosa a las siguientes concentraciones: 0, 100, 250, 500, 750 y 1.000 mg L^{-1} . La concentración de azúcares reductores fue expresada en mg glucosa g^{-1} ps.

(*) Reactivo A (reactivo de sulfato de cobre): se preparó una solución 1 en la cual se disolvieron 2,5 g de Na_2HPO_4 anhidro, 2 g de NaHCO_3 , 2,5 g de tartrato de sodio y potasio y 20 g de Na_2SO_4 anhidro en aproximadamente 80 mL de agua destilada y luego se completó hasta 100 mL. Luego se preparó una solución 2 en donde se disolvieron 15 g CuSO_4 en un pequeño volumen de agua destilada junto con una gota de H_2SO_4 (95-98%) y luego se completó hasta 100 mL. Se mezclaron 4 mL de la solución 2 junto con 96 mL de la solución 1. Este reactivo se puede guardar indefinidamente.

(γ) Reactivo B (reactivo de arsenio-molibdato): se disolvieron 2,5 g de molibdato en 45 mL de agua destilada y se añadieron 2,5 mL de H_2SO_4 (95-98%), mezclándolo bien. Posteriormente se añadió 0,3 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 25 mL de agua destilada. Se mezcló bien y se dejó incubar a 37 °C durante 24-48 h. Este reactivo es fotosensible, por lo que debe almacenarse en oscuridad.

Cuantificación de Almidón. Método de la Antrona

A la “Fase sólida” obtenida anteriormente en el paso de extracción, se le añadió 760 μL de agua destilada, 100 μL de solución MES (0,5 M) a pH 5, y 40 μL de almidón sintetasa (67,4 U mg^{-1}). Se homogeneizó todo bien y se puso en agitación durante 16 h a 30 °C. Transcurrido ese tiempo, se tomaron 100 μL de la mezcla, se llevó hasta 300 μL con agua desionizada y se le añadió 600 μL de antrona (0,2%) con H_2SO_4 (97%). Se sometió a la mezcla a ebullición durante 5 min, y posteriormente se enfrió en hielo durante 1 min. Se midió la absorbancia a 625 nm antes de que transcurrieran dos horas. Se preparó una recta patrón con glucosa a las siguientes concentraciones: 0, 100, 250, 500 y 750 mg L^{-1} . La concentración de almidón fue expresada en mg glucosa g^{-1} ps.

3.2.4.8. Determinación del metabolismo antioxidante en hoja

3.2.4.8.1. Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de malonildialdehído (MDA)

Al final del experimento, se tomaron muestras de hojas para analizar variables relacionadas con el estrés oxidativo. Estas hojas se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier residuo de suciedad que pudieran tener. Seguidamente, se congelaron en nitrógeno líquido. El material vegetal se conservó en un congelador a unos -80 °C hasta su posterior utilización.

Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La cuantificación del peróxido de hidrógeno se realizó siguiendo el método descrito por Yang y col. (2007), realizando pequeñas modificaciones. Para ello se trituraron con N_2 líquido 500 mg de material vegetal y se homogeneizaron con 5 mL ATC (ácido tricloroacético) al 0,1%. Se filtró el extracto y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente se tomaron 100 μL del sobrenadante del extracto y se le añadieron 100 μL de buffer fosfato potásico (100 mM) a pH 7, 500 μL de yoduro potásico (1 M), y 300 μL de agua ultrapura. Se agitó todo bien y se guardó en oscuridad durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se volvió a agitar bien y se midió la absorbancia a 390 nm. Se preparó una recta patrón con H_2O_2 a las siguientes concentraciones: 0, 55, 111, 222, 444 y 888 nmol mL^{-1} . La concentración de H_2O_2 fue expresada en $\text{nmol de H}_2\text{O}_2$ por gramos de peso fresco (pf).

Determinación de la concentración de malonildialdehído (MDA)

El daño oxidativo producido por el tratamiento de boro fue determinado midiendo el malonildialdehído (MDA) usando el método Hodges y col. (1999). Para ello se molieron 500 mg de material vegetal congelado a -80 °C, y se homogeneizaron con 5 mL de etanol frío al 80%. Se filtró el extracto y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se tomaron dos alícuota diferentes y se les añadió:

- Alícuota 1: 250 µL del sobrenadante y 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%.

- Alícuota 2: 250 µL del sobrenadante y 250 µL de una mezcla de TCA al 20% + ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) al 0,5%.

Se introdujeron en un baño a 90 °C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se enfriaron en hielo durante 1 min. Se midió la absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 440, 532 y 600 nm. La concentración de MDA se calculó aplicando las fórmulas [1], [2], y [3] y fue expresada como nmol de MDA por gramos de peso fresco:

$$[1]. A = [(A_{532 \text{ TBA}+}) - (A_{600 \text{ TBA}+}) - (A_{532 \text{ TBA}-}) - (A_{600 \text{ TBA}-})]$$

$$[2]. B = [(A_{440 \text{ TBA}+}) - (A_{600 \text{ TBA}+})] \times 0,0571$$

$$[3]. \text{MDA}_{\text{equivalentes}} (\text{nmol mL}^{-1}) = [(A-B)/157000] \times 10^6$$

3.2.4.8.2. *Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes*

Además del H₂O₂ y MDA se determinó y cuantificó la actividad de las siguientes enzimas antioxidantes implicadas en el metabolismo oxidativo: catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD). Para la obtención del extracto enzimático se procedió a moler con un mortero 500 mg de hoja, previamente congelada a -80 °C, en N₂ líquido y con 5 mL de buffer 50 mM MES/KOH a pH 6, 40 mL de 100 mM de KCl (40 mM), 2 mL de 100 mM de CaCl₂ (2 mM) y 1 mL de 100 mM de L-AsA (1 mM). Toda la mezcla se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante que se obtuvo se guardó a -80 °C para el posterior análisis de la actividad enzimática.

Cuantificación de proteínas

La concentración de la proteína soluble total contenida en el extracto vegetal se determinó mediante el método de Bradford (1976) con el fin de expresar las actividades en función de la concentración de la misma.

Cuantificación de la actividad catalasa (CAT)

La actividad de la CAT se analizó midiendo la velocidad de descomposición del H_2O_2 (coeficiente de extinción, $\epsilon \text{H}_2\text{O}_2 = 39,4 \text{ mM cm}^{-1}$) basándonos en el método propuesto por Chance y Maehly (1955). Para ello se preparó la siguiente mezcla: 325 μL de 50 mM de Buffer fosfato potásico pH 7, 75 μL de 100 mM de H_2O_2 , y 100 μL del extracto enzimático obtenido en el paso anterior (se preparó un blanco donde se sustituyó la cantidad de extracto por agua ultrapura). La disminución de H_2O_2 se siguió mediante el cambio de absorción a 240 nm durante un periodo determinado y se expresó como $\text{U g}^{-1} \text{ pf}$.

Cuantificación de la actividad ascorbato peroxidasa (APX)

La actividad de la APX se analizó midiendo la velocidad de descomposición del ácido ascórbico ($\epsilon \text{ ácido ascórbico} = 2,8 \text{ mM cm}^{-1}$) de acuerdo con el protocolo modificado de Nakano y Asada (1987). Para ello se preparó la siguiente mezcla: 489 μL de 50 mM de Buffer fosfato potásico pH 7, 1,25 μL de 100 mM de L-AsA y 10 μL de extracto enzimático obtenido en el paso anterior (se preparó un blanco donde se sustituyó la cantidad de extracto por agua ultrapura). La disminución del ácido ascórbico se siguió mediante el cambio de absorción a 290 nm durante un periodo determinado y se expresó como $\text{U g}^{-1} \text{ pf}$.

Cuantificación de la actividad glutatión reductasa (GR)

La actividad de la GR se cuantificó mediante la reacción de oxidación del glutatión reducido (GSH) dependiente de NADPH ($\epsilon \text{ NADPH} = 6,22 \text{ mM cm}^{-1}$) siguiendo el método propuesto por Halliwell y Foyer (1976). Para ellos se preparó la siguiente mezcla: 48 μL de 100 mM de Buffer HEPES pH 8, 25 μL de 10 mM de EDTA, 417 μL de 0,3 mM de NADPH y 10 μL de extracto enzimático obtenido en el paso anterior (se preparó un blanco donde se sustituyó la cantidad de extracto por agua ultrapura). Se procedió primero a medir la oxidación no enzimática del NADPH a 340 nm durante un tiempo determinado. Después se adicionó a cada mezcla 25 μL de

10 mM de GSSG (disulfuro de glutatión; forma oxidada del glutatión) y se procedió a medir el cambio de absorbancia durante el mismo tiempo y a 340 nm. La actividad específica de la GR se calculó por la sustracción de la oxidación no específica y se expresó como $U\ g^{-1}\ pf$.

Cuantificación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima SOD se determinó como describió McCord y Fridovic (1969), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistía en 50 mM de tampón HEPES (pH 7,8), 0,5 mM de EDTA, 0,5 mM de nitrobluetetrazolium (NTB), 4 mM de *Xantina*, 50 μ L de extracto, y 0,04 U de *Xantina oxidasa*. Se leyó la absorbancia a 560 nm al cabo de 10 minutos de reposo de las muestras. La actividad SOD total se determinó enfrentándola a diferentes blancos obteniéndose así el porcentaje de inhibición de la enzima. La actividad SOD se expresó como unidades de SOD ($U\ g^{-1}\ pf$, entendiendo una unidad como el volumen de extracto enzimático que produce el 50% de inhibición del desarrollo del color a 560 nm).

Todas las medidas de absorbancia de este experimento se realizaron con un espectrofotómetro microplaca Biotek Power Wave XS2 (Biotek Instruments, Inc.).

3.2.5. Diseño experimental y análisis estadístico.

El diseño experimental de este ensayo fue bifactorial con tres portainjertos diferentes de cítricos (citrange Carrizo, CC; *Citrus macrophylla*, CM; y naranjo Amargo, NA) \times dos tratamientos de boro (0,25 (control) y 10 $mg\ L^{-1}$), con 16 plantas para cada combinación Portainjerto \times Boro, las cuales estaban distribuidas al azar en las mesas de cultivo del invernadero y fueron cosechadas en 4 momentos diferentes del experimento ($n=4$). El análisis estadístico incluyó un ANOVA bifactorial (Portainjerto \times Boro) para cada fecha de muestro mediante el paquete estadístico SPSS versión 19. Cuando en el ANOVA el factor principal o la interacción portainjerto \times boro resultó significativa ($P<0.05$), se aplicó el test de rango múltiple de Duncan para la separación de las medias. En el caso de que la interacción fuera positiva, se aplicó el siguiente procedimiento para explicar porqué se dio dicha interacción: i) ANOVA unifactorial para cada portainjerto, donde se compara el tratamiento control frente al tratamiento de boro indicando el nivel de significancia (ns, *, **, y/o ***), ii) test de separación de medias comparando los portainjertos para

cada nivel de B, utilizando las *letras minúsculas* (a,b,c) y las *letras mayúsculas* (A, B, C) para comparar los portainjertos en el tratamiento de 0,25 y 10 mg L⁻¹ de B, respectivamente. Los valores que se presentan en las tablas y figuras para cada tratamiento son las medias de 4 plantas seguidas del error estándar de la media (\pm ES). En el caso de las tablas también se siguió el mismo procedimiento, aunque para simplificar los resultados del ANOVA unifactorial, que compara los niveles de B para cada portainjerto, se utilizó el símbolo γ para indicar las diferencias significativas a $P < 0.05$.

3.3. Resultados

3.3.1. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro

En los portainjertos citrange Carrizo y *Citrus macrophylla*, inicialmente los síntomas de toxicidad comenzaron por un amarilleamiento del ápice y de los bordes de las hojas más viejas, seguido de quemaduras (Imagen 3.6).

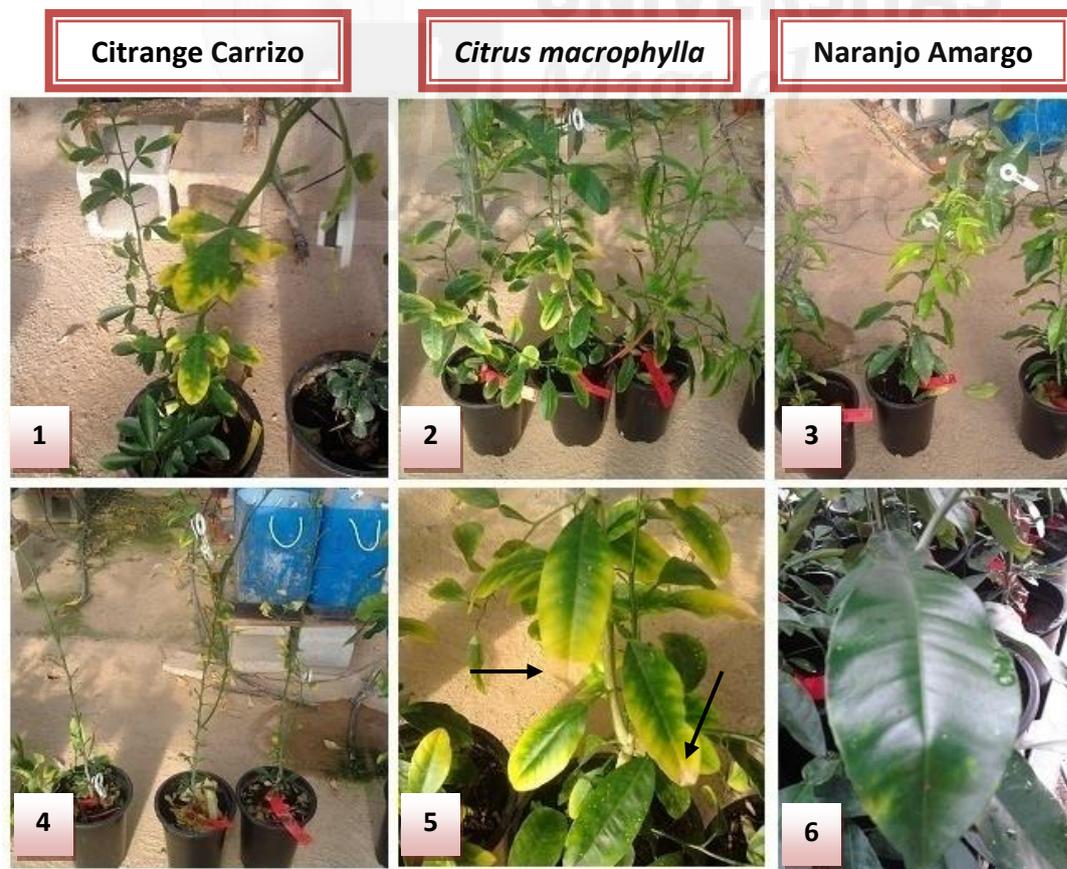


Imagen 3.6. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro. 1 y 4: carrizo Citrange (amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja; y defoliación severa); 2 y 5: *Citrus macrophylla* (amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja; y quemaduras (*flecha negra*)); 3 y 6: naranja Amargo (síntomas ligeros de clorosis en las hojas basales).

Más tarde estos síntomas se fueron extendiendo al resto de hojas. Solamente en citrange Carrizo se apreció una posterior caída prematura de las hojas (sufrió una defoliación bastante severa) al final del experimento. Por su parte, naranjo Amargo fue el único portainjerto que apenas mostró síntomas de toxicidad durante el experimento, solamente al final se apreció una ligera clorosis en las hojas basales y un leve amarilleamiento en las hojas medias y apicales (Imagen 3.6). Los primeros síntomas de toxicidad por B se detectaron a la vez en los portainjertos CC y CM del tratamiento de 10 mg L⁻¹ (a los 31 días). A los 45 días de experimento, se observaron los síntomas visuales en las plantas de CM/5 mg L⁻¹. Prácticamente en el ecuador (a los 61 días), se observaron los síntomas en CC/5 mg L⁻¹ y, por primera vez, en NA/10 mg L⁻¹. Por último, a los 84 días de experimento, fue cuando se detectaron síntomas en el grupo de plantas de NA/5 mg L⁻¹ de B.

3.3.2. Parámetros de crecimiento

De los tres portainjertos ensayados, *Citrus macrophylla* fue más vigoroso que los otros dos, tal y como muestran los valores de la tasa de crecimiento relativo, no observándose diferencias entre Carrizo y naranjo Amargo (Tabla 3.1). A lo largo del experimento, las plantas control, no regadas con boro, incrementaron su tasa de crecimiento relativo (Figure 3.2).

Tabla 3.1. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la tasa de crecimiento relativo (TCR) en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* a los 45, 84 y 119 días de experimento.

| Factor Pral. | | TCR (g g ⁻¹ día ⁻¹) | | |
|---------------------|-----------------------|--|---------|----------|
| | | 45 días | 84 días | 119 días |
| Portainjerto | Carrizo | 2,82 b | 3,07 b | 3,28 b |
| | N. Amargo | 2,56 b | 3,16 b | 3,52 b |
| | Macrophylla | 3,65 a | 4,10 a | 4,31 a |
| Boro | Control | 3,13 | 3,58 | 3,95 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 2,89 | 3,31 | 3,46 |
| Portainjerto | | *** | *** | *** |
| Boro | | ns | * | *** |
| Port. × Boro | | ns | ns | *** |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. Para cada columna, valores con diferente letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=12$ y $n=8$ repeticiones para los tratamientos de boro y para los portainjertos, respectivamente.

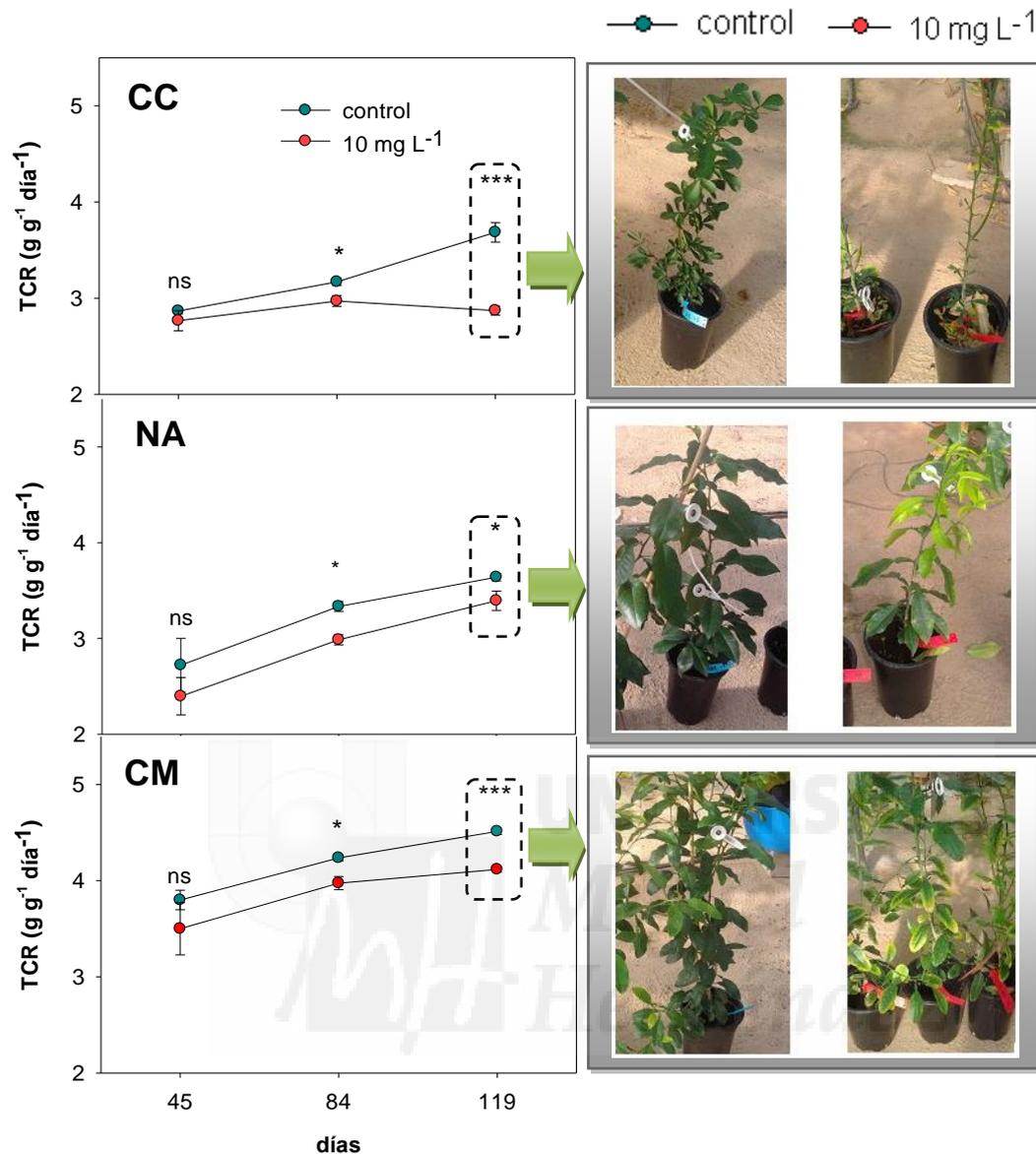


Figura 3.2. Evolución de la tasa de crecimiento relativo (TCR) en respuesta al exceso de B en la solución nutritiva en citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) durante los 119 días que duró el experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

En el caso de las plantas regadas con boro también se observó un incremento de la TCR con el tiempo, excepto para las plantas del portainjerto citrange Carrizo donde apenas hubo diferencias entre el periodo que va desde 0-45 días a 84-119 días. Incluso se observa una disminución entre los periodos comprendidos entre 45-84 y 84-119 días debido a la fuerte defoliación que sufrieron estas plantas. El tratamiento de boro también alteró la TCR con respecto al tratamiento control aunque su efecto dependió del tiempo de exposición y del portainjerto.

En el periodo comprendido entre 0-45 días, según el análisis de la varianza (Tabla 3.1), el tratamiento con exceso de boro no afectó a la TCR. En el periodo comprendido entre los 45-84 días, el tratamiento de boro (10 mg L^{-1}) disminuyó la TCR, pero esta disminución fue similar para los tres portainjertos ya que no se observa una interacción positiva portainjerto \times boro en el ANOVA. En el último periodo del experimento (84-119 días) el exceso de boro disminuyó la TCR pero esta disminución dependió del portainjerto: en las plantas de NA y CM el riego con exceso de boro disminuyó la TCR un 7 y 9%, respectivamente, relativo a sus correspondientes controles, mientras que esta reducción fue de un 22% para las plantas de CC.

La figura 3.3 muestra los pesos secos hojas, tallo y raíz de los tres portainjertos para los dos tratamientos de boro ensayados en los dos últimos muestreos (84 y 119 días). Los resultados indican que en condiciones control las plantas de CM tuvieron un mayor crecimiento vegetativo que CC y NA debido tanto a una mayor peso seco de las hojas, tallo y raíz. Entre estos dos portainjertos CC y NA, la biomasa seca total es similar aunque CC tiene un mayor peso de tallo y raíz, y menor de hojas que NA. El exceso de boro en la solución nutritiva, al final del experimento (119 d), afectó a los portainjertos reduciendo sus biomásas foliares en un 77% para citrange Carrizo, 35% para *Citrus macrophylla* y en un 14% para naranjo Amargo. En el tallo se observó una reducción del 34% en CM y del 31% en CC; sin embargo, las plantas de NA/ 10 mg L^{-1} de B no mostraron diferencias significativas con respecto a su control. En la raíz no se observó una interacción significativa entre el portainjerto y el tratamiento de boro. Sí que se observó una disminución aproximada del 43% del peso seco de la raíz en los tres portainjertos. Entonces, como consecuencia de los cambios comentados anteriormente para la biomasa seca de hoja, tallo y raíz, se observa que el exceso de B en la solución nutritiva dio lugar a una disminución significativa de la biomasa total en los tres portainjertos con respecto a sus controles, viéndose el porcentaje de disminución más drástico en citrange Carrizo (56%); por su parte, *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo disminuyeron su biomasa total con respecto a sus controles unos 33% y 23%, respectivamente (Figura 3.3).

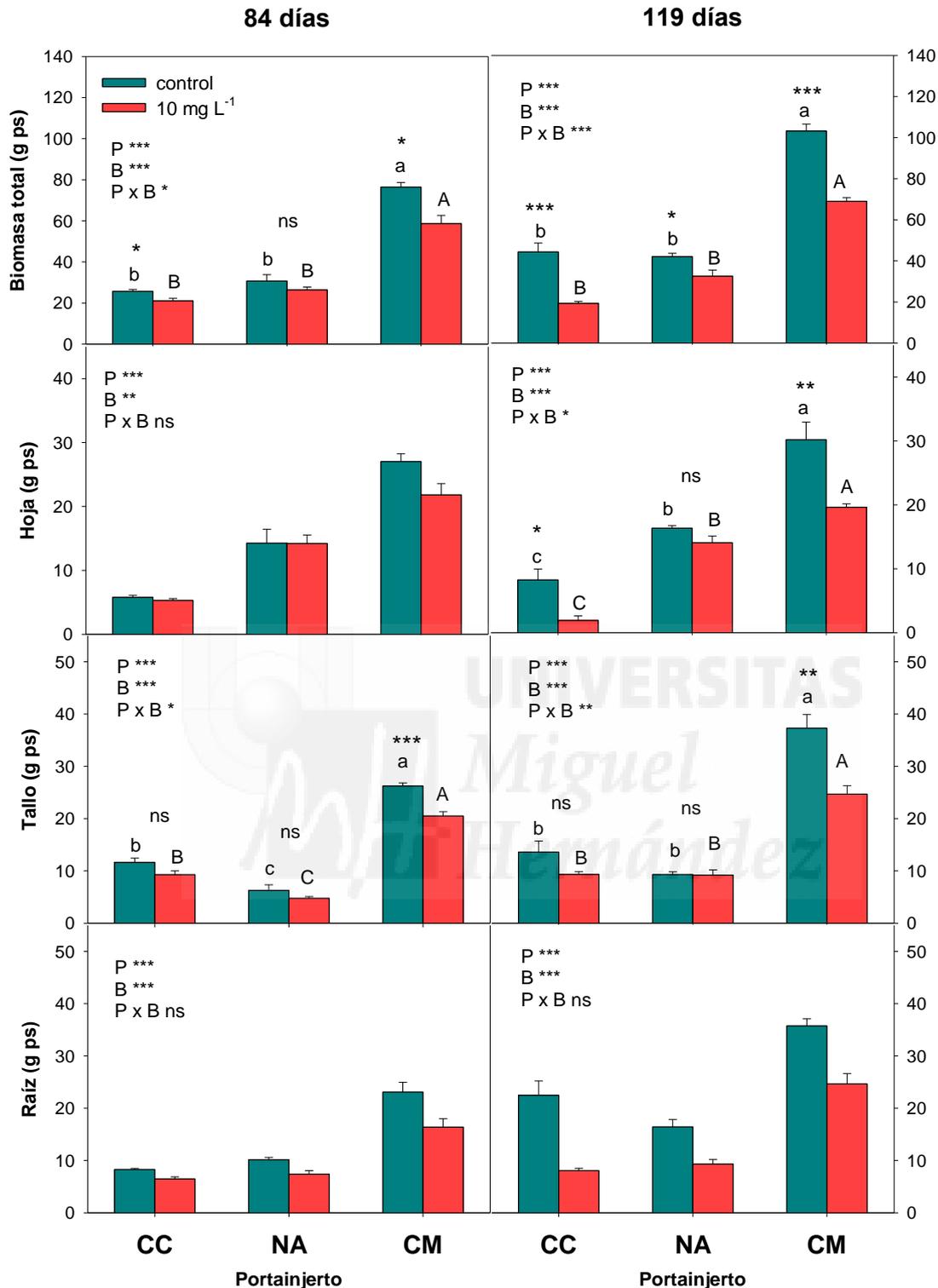


Figura 3.3. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la biomasa seca total, foliar, tallo y radicular en citrange Carrizo (CC), naranja Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 84 y 119 días de experimento. En el ANOVA, “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de B, las letras minúsculas (control) y mayúsculas (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

Por otro lado, comparando los datos de los días 84 y 119, se puede observar que el tratamiento con alta concentración de B (10 mg L^{-1}) produjo en plantas de Carrizo una gran defoliación pasando de 5,30 g ps de hojas a 1,91 g ps, respectivamente, (Figura 3.3). Las plantas de CM también sufrieron defoliación en este periodo de tiempo pero de forma menos agresiva que en citrange Carrizo como se observa en el peso seco foliar al pasar de 21,80 g ps a los 84 d a 19,63 g ps a los 119 días. Sin embargo, las plántulas de NA apenas sufrieron cambios en el intervalo comprendido entre este periodo de tiempo. Es decir, que el tratamiento de boro paró el crecimiento de estas plantas, pero no causó defoliación. En el caso del tallo, comparando los datos a los 84 y 119 días de las plantas regados con exceso de boro cabe destacar que el tallo de CM y NA siguió creciendo con el tiempo, mientras que el de CC apenas creció en este intervalo (Figura 3.3). En lo referente a la raíz, en la figura 3.3 comparando también los datos a los 84 y 119 días, se muestra como CC y NA frenan su crecimiento radicular a causa del exceso de B, mientras que CM sigue creciendo a pesar de dicho exceso (10 mg L^{-1}).

Tabla 3.2. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la biomasa seca total, foliar, tallo y radicular en citrange Carrizo, naranja Amargo y *Citrus macrophylla* a los 84 y 119 días de experimento.

| Factor Principal | | Hoja (g ps) 84 días | Tallo (g ps) 84 días | Raíz (g ps) 119 días |
|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Portainjerto | Carrizo | 5,54 c | 7,38 b | 15,28 b |
| | N. Amargo | 14,23 b | 8,76 b | 12,87 b |
| | Macrophylla | 24,42 a | 19,74 a | 30,21 a |
| Boro | Control | 15,69 | 13,84 | 24,89 |
| | 10 mg L^{-1} | 13,77 | 10,09 | 14,02 |
| Portainjerto | | *** | *** | *** |
| Boro | | ** | *** | *** |
| Port. × Boro | | ns | ns | ns |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.01$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. Para cada columna, valores con diferente letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=12$ y $n=8$ repeticiones para los tratamientos de boro y para los portainjertos, respectivamente.

3.3.3. Concentración boro en los diferentes tejidos de las plantas

El uso de solución nutritiva con exceso de B (10 mg L^{-1}) supuso un incremento gradual en la concentración de boro en hoja (B_{foliar}) a lo largo de todo el experimento,

independientemente del portainjerto utilizado (Figura 3.4). Las diferencias entre el control y el tratamiento de B se empezaron a dar desde el día 45 en todos los portainjertos (Figura 3.4 y tabla 3.3). Mientras que, en esa misma fecha, CM/10 mg L⁻¹ y NA/10 mg L⁻¹ mostraron valores foliares de boro en torno a 280 mg kg⁻¹ de peso seco (Figura 3.4); CC/10 mg L⁻¹, casi doblaba ese valor (438 mg kg⁻¹ ps). A los 84 días, los tres portainjertos regados con 10 mg L⁻¹ de B alcanzaron su máximo en concentración de B_{foliar} (Figura 3.4 y tabla 3.3), donde citrange Carrizo presentó el valor más alto (626,5 mg kg⁻¹ ps), seguido de naranjo Amargo (449,5 mg kg⁻¹ ps) y *Citrus macrophylla* (443,2 mg kg⁻¹ ps). Al final del experimento, las plantas CC/10 mg L⁻¹ de B mostraron un valor de B_{foliar} menor (499,1 mg kg⁻¹ ps) que el obtenido a los 84 días, mientras que NA/10 mg L⁻¹ y CM/10 mg L⁻¹ de B mostraron valores muy similares a la cosecha anterior (a los 84 días), siendo la concentración de 406 y 436 mg kg⁻¹ ps, respectivamente (Figura 3.4).

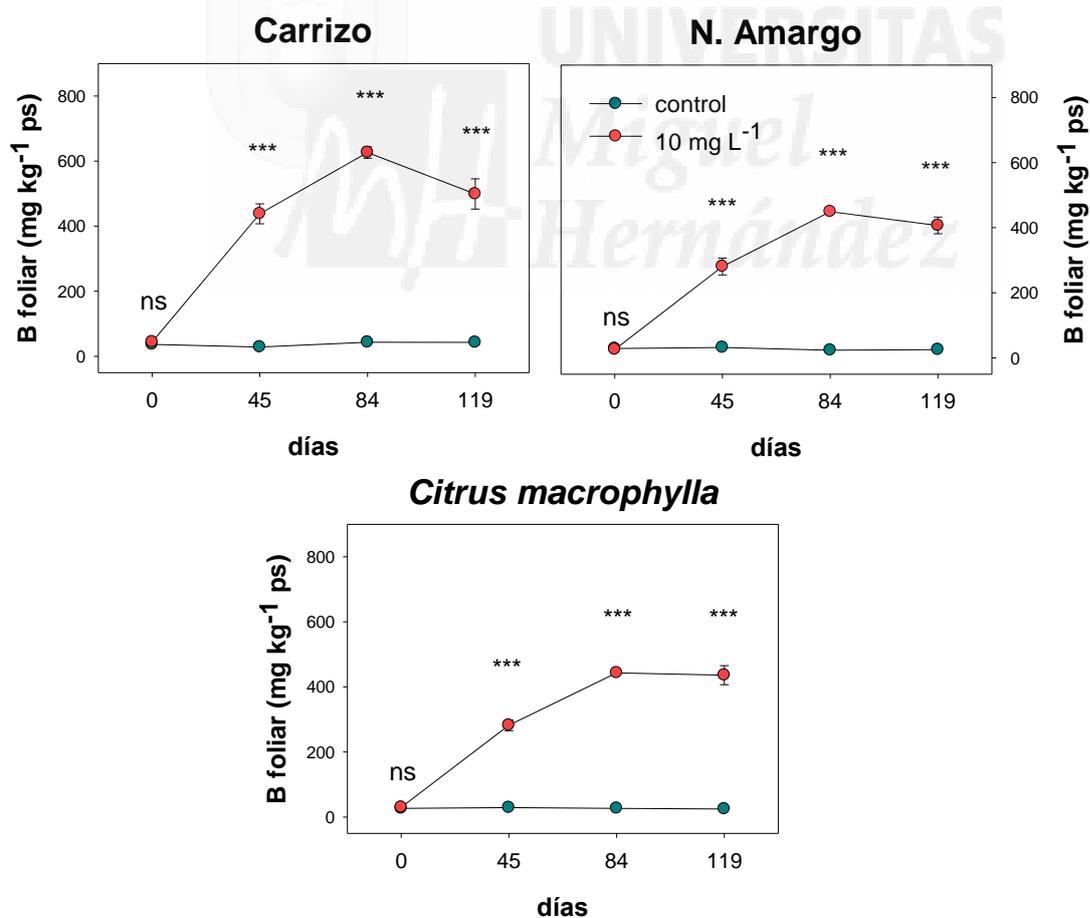


Figura 3.4. Evolución de la concentración de B_{foliar} en respuesta al exceso de B en la solución nutritiva en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* durante los 119 días que duró el experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *** indica diferencias significativas para P<0.001 entre los tratamientos. La barra vertical indica el error estándar de la media (n=4).

Tabla 3.3. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B_{foliar} en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* a los 0, 45, 84 y 119 días de experimento.

| Factor Pral. | | Boro foliar (mg kg ⁻¹ ps) | | | |
|---------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------|---------|----------|
| | | 0 días | 45 días | 84 días | 119 días |
| Portainjerto | Carrizo | 80,29 a | 233,3 a | 334,8 a | 270,9 |
| | N. Amargo | 52,25 ab | 156,3 b | 236,5 b | 216,0 |
| | Macrophylla | 48,26 b | 155,6 b | 235,1 b | 230,4 |
| Boro | Control | 40,58 | 29,86 | 31,11 | 30,88 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 79,95 | 333,6 | 506,4 | 447,3 |
| Portainjerto | | *** | ** | *** | ns |
| Boro | | ns | *** | *** | *** |
| Port. × Boro | | ns | *** | ** | ns |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.01$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. Para cada columna, valores con diferente letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=12$ y $n=8$ repeticiones para los tratamientos de boro y para los portainjertos, respectivamente.

Respecto a la tasa de asimilación neta de B (TAN de B) y al transporte de dicho ion, en la figura 3.5 se puede observar la evolución que siguieron ambos parámetros en el intervalo de 0-45 y 45-84 días (*datos del período comprendido entre 84-119 días no se muestran porque en los tres portainjertos ambos parámetros sufrieron una drástica disminución debida a la defoliación sufrida y a la disminución del crecimiento*). En el período comprendido entre 0-45 días y en plantas regadas sin exceso de B, se observó que el portainjerto con mayor TAN de B y transporte del mismo a la parte aérea fue NA (4,52 y 4,01 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{día}^{-1}$, respectivamente) seguido de CC y CM que no mostraron entre ellos diferencias significativas para ninguno de los dos parámetros (valor medio de TAN = 1,5 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{día}^{-1}$; y valor medio de transporte = 0,97 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{día}^{-1}$). Cuando a esos portainjertos se les sometió a un riego con exceso de B, se pudo comprobar que en los tres portainjertos se incrementaron significativamente tanto su TAN de B como el transporte de este a la parte aérea, siendo ese incremento mayor en el portainjerto citrange Carrizo, seguido de *Citrus macrophylla* y por último naranjo Amargo (Figuras 3.5). En el intervalo 45-84 días de experimento y en condiciones control, las plantas de naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* mostraron valores de TNA y de transporte inferiores a los obtenidos en la cosecha anterior: 0,77 y 0,51 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}}$

día⁻¹, respectivamente, para NA/control; y 0,50 y 0,42 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{día}^{-1}$, respectivamente, para CM/control (Figuras 3.5). En el caso de las plantas CC/control, aumentaron ambos parámetros con respecto a las controles de la cosecha anterior; siendo de 2,12 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{día}^{-1}$ para la TAN de boro y de 1,52 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{día}^{-1}$ para el transporte (Figuras 3.5).

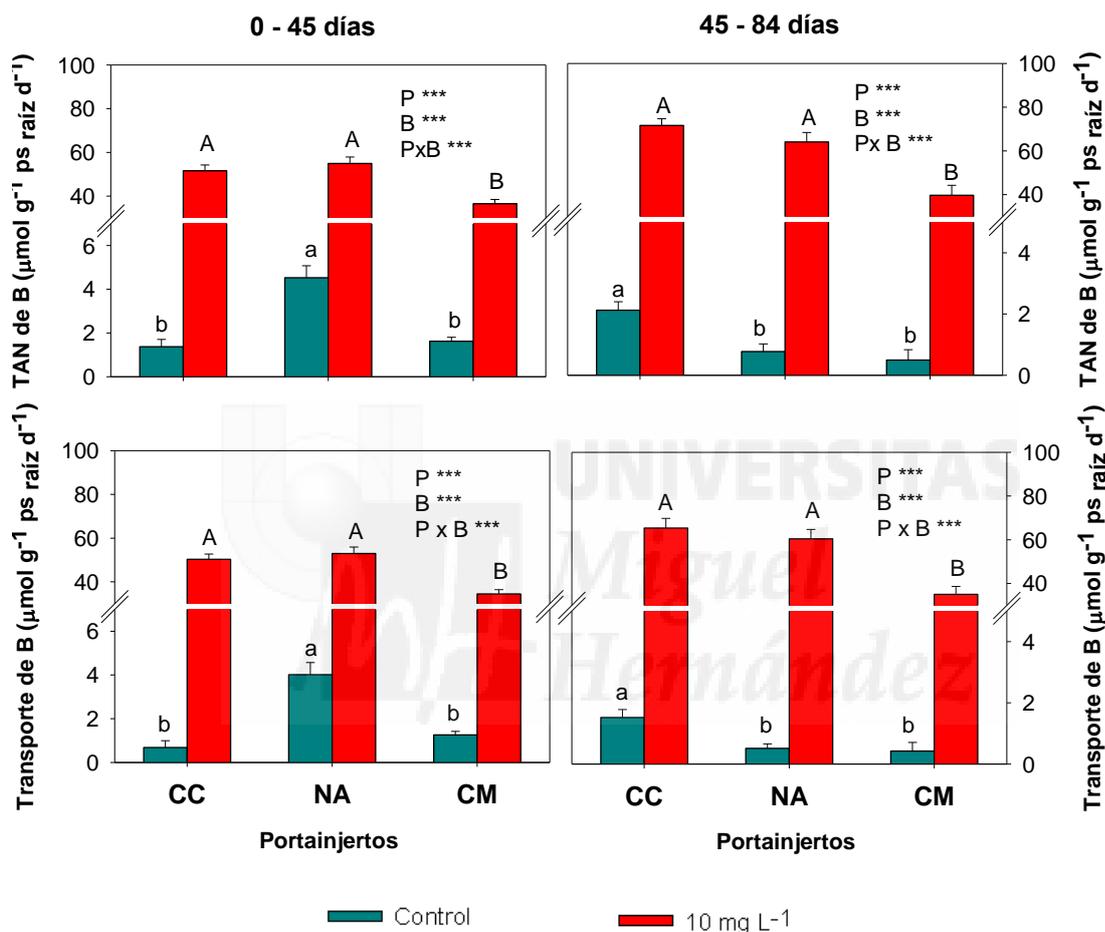


Figura 3.5. Tasa de absorción neta (TAN) y transporte de B a la parte aérea en respuesta al exceso de B en citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 0-45 y 45-84 días de experimento. En el ANOVA, “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de B, las letras minúsculas (control) y mayúsculas (10 mg L⁻¹) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

Cuando nos centramos en las plantas con exceso de B, observamos que los tres portainjertos muestran un incremento en ambos parámetros con respecto a la cosecha anterior. El mayor incremento se da en las plantas de citrange Carrizo que pasan de 51,57 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{día}^{-1}$ a 71,61 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{día}^{-1}$ de TAN de B, siendo

también mayor el transporte de este elemento (pasó de $50,29 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{ día}^{-1}$ a $65,31 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{ día}^{-1}$); por el contrario, el menor incremento se dio en *Citrus macrophylla*, que pasaron de $36,51 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{ día}^{-1}$ a $39,73 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{ día}^{-1}$ de TAN de B, siendo también menor el transporte (pasó de $34,44 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{ día}^{-1}$ a $35,05 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}_{\text{raíz}} \text{ día}^{-1}$)

En cuanto a la concentración de B en el resto de tejidos, en la figura 3.6 se puede observar como al final del experimento (119 días) la concentración de B radicular mostró diferencias significativas para la interacción Portainjerto \times Boro; mientras que en el tallo hubo diferencias significativas para los factores portainjerto y tratamientos de boro, pero no para la interacción.

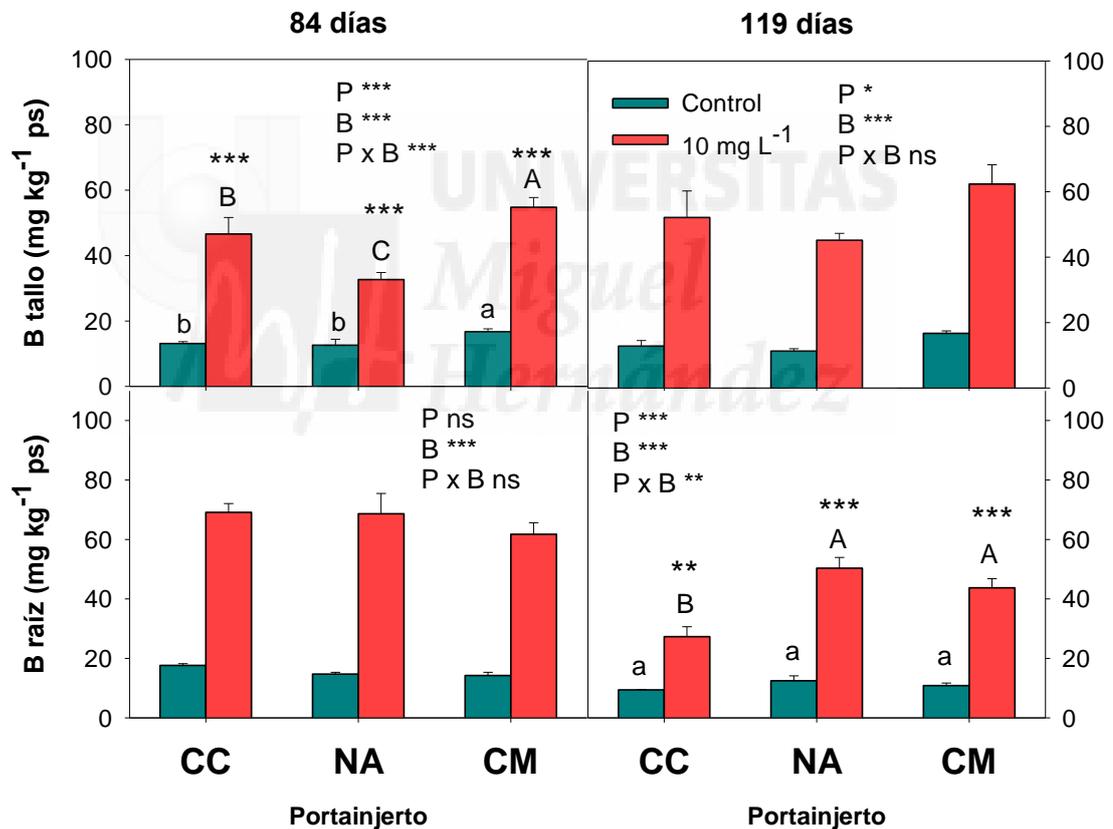


Figura 3.6. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B en tallo y raíz en citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. En el ANOVA, “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

Respecto a la concentración de B analizada en el tallo al final del experimento (a los 119 días), se comprobó que a nivel de portainjerto el que mostró el valor más alto fue *Citrus macrophylla*, seguido de citrange Carrizo y naranjo Amargo, que no presentaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 3.4). Si se tiene en cuenta como factor principal el B, las plantas regadas con exceso de este microelemento fueron las que acumularon más cantidad de B en este tejido con una media de 53,21 mg kg⁻¹ ps frente a los 13,59 mg kg⁻¹ ps observados en los controles.

En dicho muestro (a los 119 días), se comprobó que los tres portainjertos mostraron valores muy similares de boro en raíz ($B_{\text{radicular}}$) en condiciones control (CC: 9,41 mg kg⁻¹ ps; NA: 10,84 mg kg⁻¹ ps; y CM: 12,43 mg kg⁻¹ ps). Sin embargo, cuando se analizaron las plantas regadas con 10 mg L⁻¹ de B, se observó que citrange Carrizo incrementó su $B_{\text{radicular}}$ aproximadamente 3 veces con respecto a su control; mientras que naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* lo hicieron alrededor de 4 veces, con respecto a sus controles (Figura 3.6).

Tabla 3.4. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B en tallo en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* a los 119 días de experimento.

| | Portainjerto | | | Tratamiento | |
|---|--------------|-----------|-------------|-------------|-----------------------|
| | Carrizo | N. Amargo | Macrophylla | Control | 10 mg L ⁻¹ |
| B en Tallo_119 d (mg kg ⁻¹ ps) | 32,44 b | 28,23 b | 39,53 a | 13,59 | 53,21 |
| ANOVA | | * | | | *** |

* y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos). Valores con distinta letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=12$ y $n=8$ repeticiones para los tratamientos de boro y para los portainjertos, respectivamente.

3.3.4. Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas

A largo del experimento se hicieron medidas de los parámetros de intercambio gaseoso: tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO_2}) y transpiración foliar (E_{leaf}); y con estos datos se calcularon el uso eficaz del agua ($UEA = A_{\text{CO}_2}/E_{\text{leaf}}$) y la concentración de CO₂ subestomático (C_i). En la tabla 3.5 se exponen los datos de la A_{CO_2} y transpiración de los tres portainjertos para el tratamiento control sin exceso de boro. Se puede observar que existieron diferencias significativas para la A_{CO_2} entre los

portainjertos en las dos primeras cosechas y en la última (0, 45 y 119 d). *Citrus macrophylla* mostró el valor más alto al inicio del experimento, mientras que al final del experimento fue citrange Carrizo quien tuvo la mayor A_{CO_2} . Para el parámetro de transpiración sólo se observaron diferencias significativas en la última cosecha (Tabla 3.5), siendo citrange Carrizo quien mostró el valor más alto. En la figura 3.8 se representan la A_{CO_2} y E_{leaf} de las plantas tratadas con 10 mg L⁻¹ de B como porcentaje relativo a los valores del tratamiento control (0,25 mg L⁻¹ de B) para cada uno de los días que se hizo la medida y portainjerto.

Tabla 3.5. Efecto del portainjerto sobre la tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO_2}) y transpiración foliar (E_{leaf}) en plantas del tratamiento control (0,25 mg L⁻¹ de B) a lo largo del experimento.

| Tratamiento de 0,25 mg L ⁻¹ de B | | | | | | | | |
|---|--|-------------------|------|-------------------|--|------|------|-------------------|
| Portainjerto | A_{CO_2} (μmol m ⁻² s ⁻¹) | | | | E_{leaf} (mmol m ⁻² s ⁻¹) | | | |
| | 0 d | 45 d | 84 d | 119 d | 0 d | 45 d | 84 d | 119 d |
| Carrizo | 12,6 ^b | 10,7 ^a | 10,2 | 8,50 ^a | 2,77 | 2,45 | 2,73 | 2,86 ^a |
| N. Amargo | 12,5 ^b | 9,93 ^a | 9,60 | 7,00 ^b | 2,61 | 2,63 | 2,38 | 1,91 ^b |
| Macrophylla | 14,6 ^a | 7,75 ^b | 10,3 | 6,35 ^c | 3,11 | 2,61 | 2,44 | 1,48 ^c |
| ANOVA | * | *** | ns | *** | ns | ns | ns | *** |

“ns” indica diferencias no significativas; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente. Para cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan ($n=4$).

Respecto a la evolución de la tasa de asimilación neta de CO₂ a lo largo de todo el experimento, se puede observar en la figura 3.7 como existieron diferencias significativas entre las plantas control y las regadas con 10 mg L⁻¹ de B a partir de los 45 días de empezar el ensayo, produciéndose un descenso similar en los tres portainjertos. A partir de los 84 días de experimento, ya se empezaron a observar diferencias significativas en la interacción Portainjerto × Boro (Figura 3.7 y tabla 3.6), como consecuencia de que la disminución de la A_{CO_2} fue mayor para *Citrus macrophylla* que para los otros dos portainjertos. En esta fecha también cabe destacar que se produjo una ligera recuperación de los valores de A_{CO_2} para las plantas del tratamiento de exceso de B. Centrándonos en los resultados obtenidos al final de la experiencia (a los 119 días), se vio que para citrange Carrizo el exceso de B supuso una disminución del 82% en su A_{CO_2} ; mientras que en *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo se redujo, aproximadamente, a la mitad (Figura 3.7 y 3.8). En

cuanto a la transpiración foliar su modelo es muy parecido a la A_{CO_2} . Se produjo un descenso con el tratamiento del exceso de boro a partir del día 45, y este descenso fue similar para los tres portainjertos según el análisis estadístico mostrado en la tabla 3.6. En los muestreos sucesivos si se dio un interacción significativa entre los dos factores portainjerto y boro.

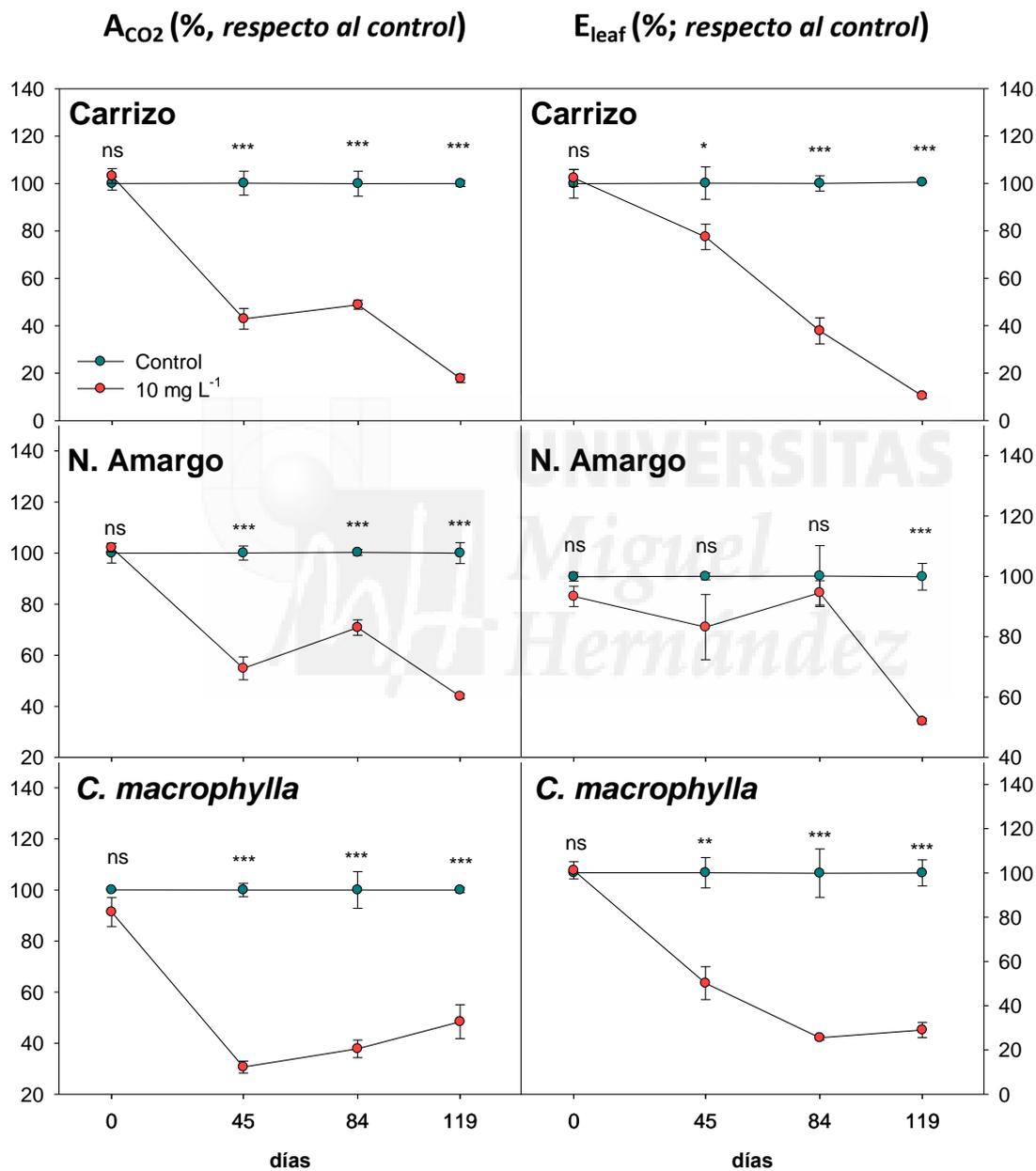


Figura 3.7. Evolución de la tasa de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}) y en la transpiración foliar (E_{leaf}) en respuesta al exceso de B en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* durante los 119 días que duró el experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

Tabla 3.6. Análisis de la varianza de la asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y de la transpiración foliar (E_{leaf}) para los factores: portainjerto, tratamientos de boro (B) y su interacción.

| Factor Pral. | ANOVA - Asimilación neta de CO ₂ (A _{CO2}) | | | |
|---------------------|---|---------|---------|----------|
| | 0 días | 45 días | 84 días | 119 días |
| Portainjerto | * | *** | ** | ns |
| Boro | ns | *** | *** | *** |
| Port. × Boro | ns | ns | *** | *** |

| Factor Pral. | ANOVA - Transpiración foliar (E _{leaf}) | | | |
|---------------------|---|---------|---------|----------|
| | 0 días | 45 días | 84 días | 119 días |
| Portainjerto | *** | ns | *** | *** |
| Boro | ns | ** | *** | *** |
| Port. × Boro | ns | ns | *** | *** |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos ($n=4$).

En la medida del día 84 siguieron descendiendo los valores en las plantas de citrange Carrizo y *Citrus macrophylla*, pero en las plantas de naranjo Amargo no hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos de boro. Al final del ensayo (119 días) el portainjerto que menos vio afectada su transpiración fue naranjo Amargo (se redujo solo en un 48%), mientras que *Citrus macrophylla* y citrange Carrizo se redujeron en un 71% y 90%, respectivamente (Figura 3.7).

En la figura 3.8 se exponen además de la A_{CO2} el resto de parámetros de intercambio gaseoso analizados al final del experimento (a los 119 días). Comenzando por la conductancia estomática (g_s), se observó que el portainjerto que en condiciones sin exceso de B en la solución nutritiva presentó la mayor g_s fue citrange Carrizo ($200,5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), con un valor que doblaba la de los otros dos portainjertos. Las plantas de citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* fueron las que más disminuyeron este parámetro a consecuencia del exceso de B, siendo una reducción del 94% para la primera y del 75% para la segunda (Figura 3.8); por su parte, naranjo Amargo fue la que menos redujo su g_s (41%). En cuanto al UEA_{fisiológico}, se puede observar como en condiciones control *Citrus macrophylla* fue el portainjerto que mostró el valor más alto ($4,33 \text{ } \mu\text{mol de CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ de H}_2\text{O}$), seguido de naranjo Amargo ($3,70 \text{ } \mu\text{mol de CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ de H}_2\text{O}$) y por último citrange Carrizo ($2,94 \text{ } \mu\text{mol de CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ de H}_2\text{O}$). Las plantas de CC y CM regadas con 10 mg L^{-1} de B incrementaron su UEA_{fisiológico} hasta casi el doble del valor que sus controles, mientras que las plantas NA no mostraron diferencias

significativas con su control (Figura 3.8). Por último, en lo referente a la C_i , en condiciones sin exceso de B, citrange Carrizo fue el que presentó mayor concentración de CO_2 en la cavidad subestomática con una concentración de $302,3 \mu\text{mol mol}^{-1}$; *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo presentaron valores muy similares ($245,5$ y $239,5 \mu\text{mol mol}^{-1}$, respectivamente). En el caso, de CC y CM el exceso de B influyó en este parámetro disminuyéndolo un 47% para el primero y un 37% para el segundo; por su parte, en NA no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Figura 3.8).

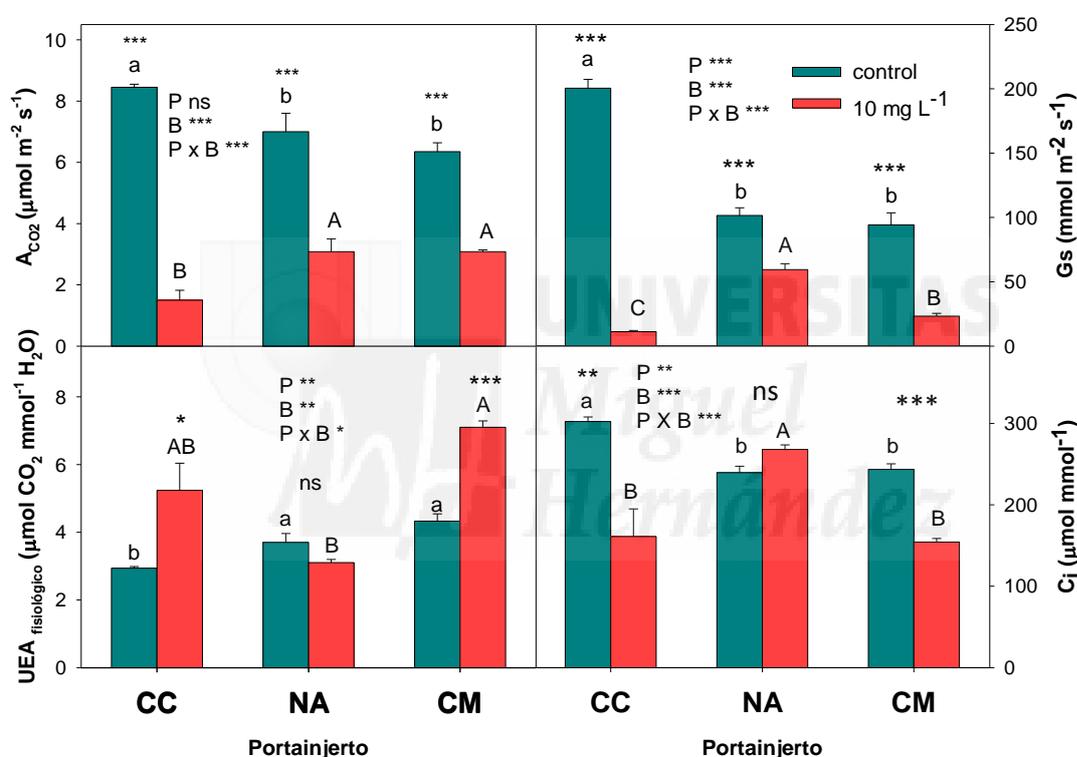


Figura 3.8. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la tasa de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}), conductancia estomática (g_s), uso eficiente del agua fisiológico ($UEA_{\text{fisiológico}} = A_{CO_2}/E_{\text{leaf}}$) y concentración de CO_2 subestomático (C_i) en citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. En el ANOVA, “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de B, las letras minúsculas (control) y mayúsculas (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

Respecto a los parámetros de fluorescencia, en la figura 3.9 se observa como el exceso de boro afectó a la F_v'/F_m' en las plantas de citrange Carrizo, disminuyéndola respecto al control, y como consecuencia disminuyendo a la eficiencia cuántica (Φ_{PSII}). Mientras que las plantas control de citrange Carrizo

presentaron valores de Fv'/Fm' y Φ_{PSII} de 0,873 y 0.642, respectivamente, las plantas regadas con 10 mg L^{-1} de B vieron reducidos dichos valores a 0,749 y 0,412, respectivamente. Los otros dos portainjerto no presentaron diferencias significativas respecto a sus controles en ninguno de los tres parámetros de fluorescencia estudiados (Figura 3.9).

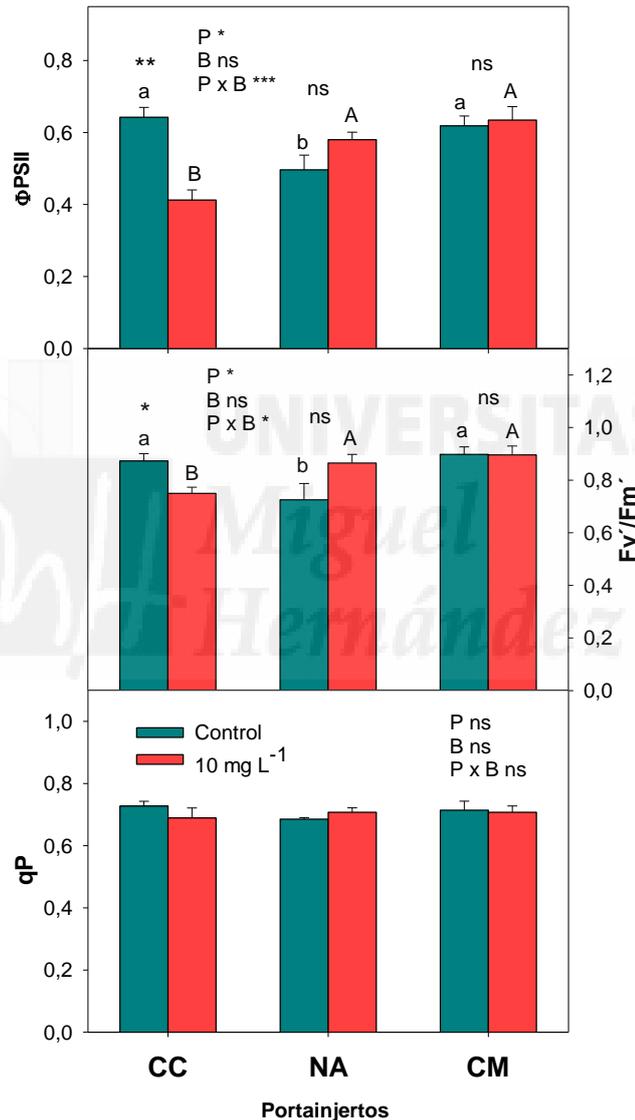


Figura 3.9. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la eficacia fotoquímica del PSII (Φ_{PSII}), la eficiencia de las antenas en el PSII (Fv'/Fm') y el coeficiente “Quenching Fotoquímico” (qP) en citrange Carrizo (CC), naranja Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. En el ANOVA, “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de B, las letras minúsculas (control) y mayúsculas (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

3.3.5. Concentración de nutrientes minerales

Respecto a la nutrición mineral, las hojas del portainjerto citrange Carrizo fueron las que presentaron mayor concentración de Ca y K (23,4 y 15,9 mg g⁻¹ ps, respectivamente) y *Citrus macrophylla* la que menos con una concentración de Ca foliar de 17,8 mg g⁻¹ ps y una concentración de K foliar de 12,6 mg g⁻¹ ps (Tabla 3.7). Independientemente del portainjerto, el tratamiento con exceso de B afectó a la concentración foliar de Ca y Mg, disminuyéndolas en ambos casos respecto a los controles (Tabla 3.7). Para el P foliar no se observaron diferencias significativas ni por factor ni para la interacción (Tabla 3.7).

En cuanto a la nutrición mineral en raíces, en la tabla 3.7 se puede observar que el portainjerto que más Ca concentró en sus raíces fue *Citrus macrophylla* con una concentración en torno a 11 mg g⁻¹ ps; por su parte, citrange Carrizo presentó la concentración más baja (4 mg g⁻¹ ps). Para el K, *Citrus macrophylla* y citrange Carrizo presentaron los valores más altos (10,5 y 11,8 mg g⁻¹ ps, respectivamente), mientras que el de naranjo Amargo estaba en torno a 7 mg g⁻¹ ps. Para la concentración de Mg radicular, se observó que *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo mostraron los valores más altos (2,77 y 2,44 mg g⁻¹ ps, respectivamente); citrange Carrizo no llegó a alcanzar los 2 mg g⁻¹ ps de Mg en raíz (Tabla 3.7). Por último, los portainjerto citrange Carrizo y naranjo Amargo fueron los que presentaron los valores más altos de P radicular (2,3 y 2,47 mg g⁻¹ ps, respectivamente) y *Citrus macrophylla* el más bajo (1,84 mg g⁻¹ ps). El único macronutriente que se vio afectado por el exceso de B en la solución nutritiva fue el K, que se vio incrementado (paso de 8,7 a 11 mg g⁻¹ ps). Para el P radicular no se observaron diferencias ni por el portainjerto ni por el tratamiento de B (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Efecto del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de Ca, K, Mg y P foliar y radicular en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* a los 119 días de experimento.

| Factor Pral. | | Hoja (mg g ⁻¹ ps) | | | |
|----------------------------|-----------------------|------------------------------|--------|--------|--------|
| | | Ca | K | Mg | P |
| Portainjerto | Carrizo | 23,4a | 15,9 a | 2,92 | 2,13 |
| | N. Amargo | 21,6ab | 14,6ab | 2,99 | 1,97 |
| | Macrophylla | 17,8b | 12,6b | 2,74 | 1,81 |
| Boro | Control | 22,7 | 14,0 | 3,15 | 1,96 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 19,1 | 14,7 | 2,62 | 1,98 |
| Portainjerto × Boro | | | | | |
| Carrizo | Control | 25,8 | 16,0 | 3,07 | 2,10 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 21,0 | 15,8 | 2,77 | 2,16 |
| N. Amargo | Control | 19,1 | 11,6 | 3,04 | 1,85 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 16,6 | 13,5 | 2,45 | 1,77 |
| Macrophylla | Control | 23,4 | 14,4 | 3,33 | 1,94 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 19,8 | 14,8 | 2,64 | 2,01 |
| Portainjerto | | * | * | ns | ns |
| Boro | | * | ns | * | ns |
| Port. × Boro | | ns | ns | ns | ns |
| Factor Pral. | | Raíz (mg g ⁻¹ ps) | | | |
| | | Ca | K | Mg | P |
| Portainjerto | Carrizo | 4,1c | 11,8a | 1,73 b | 2,30 a |
| | N. Amargo | 8,7b | 7,2b | 2,44 a | 2,47 a |
| | Macrophylla | 10,9a | 10,5 a | 2,77 a | 1,84 b |
| Boro | Control | 7,9 | 8,7 | 2,31 | 2,16 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 7,8 | 11,0 | 2,31 | 2,24 |
| Portainjerto × Boro | | | | | |
| Carrizo | Control | 4,2 | 9,7 | 1,75 | 2,10 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 4,0 | 13,9 | 1,71 | 2,49 |
| N. Amargo | Control | 11,0 | 9,6 | 2,66 | 1,92 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 10,7 | 11,5 | 2,88 | 1,76 |
| Macrophylla | Control | 8,7 | 6,9 | 2,52 | 2,46 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 8,7 | 7,5 | 2,35 | 2,48 |
| Portainjerto | | *** | *** | *** | * |
| Boro | | ns | ** | ns | ns |
| Port. × Boro | | ns | ns | ns | ns |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.01$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. Para cada columna, valores con diferente letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores con la media de 4 repeticiones.

3.3.6. Concentración de carbohidratos

A los 84 días de experimento, se observaron diferencias significativas para la concentración foliar de AS, AR y para su relación AR/AS foliar entre los tres portainjertos (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Efecto del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de azúcares reductores (AR), azúcares solubles (AS) y sobre la relación AR/AS foliar a los 84 días de experimento y sobre la concentración de AS foliar y radicular en Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* a los 119 días de experimento.

| Factor Pral. | | Carbohidratos (mg g ⁻¹ ps) | | | | |
|----------------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| | | AR_hoja 84 días | AS_hoja 84 días | AR/AS_hoja 84 días | AS_hoja 119 días | AS_raíz 119 días |
| Portainjerto | Carrizo | 35,05 b | 45,40 c | 0,78 a | 38,16 c | 22,53 b |
| | N. Amargo | 34,91 b | 61,64 b | 0,56 b | 60,94 b | 31,51 a |
| | Macrophylla | 58,92 a | 73,94 a | 0,79 a | 91,10 a | 27,87 ab |
| Boro | Control | 38,07 | 55,47 | 0,70 | 68,16 | 22,54 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 47,85 | 65,18 | 0,73 | 58,64 | 32,06 |
| Portainjerto × Boro | | | | | | |
| Carrizo | Control | 33,02 ^{ns} b | 38,75 ^γ c | 0,85 ^γ a | 43,56 | 25,34 ^{ns} a |
| | 10 mg L ⁻¹ | 37,07 C | 52,05 B | 0,71B | 32,74 | 19,7 B |
| N. Amargo | Control | 27,71 ^γ b | 54,82 ^γ b | 0,50 ^γ c | 66,59 | 28,47 ^{ns} a |
| | 10 mg L ⁻¹ | 42,12 B | 68,46 A | 0,62 C | 55,31 | 34,56 A |
| Macrophylla | Control | 43,47 ^γ a | 72,84 ^{ns} a | 0,73 ^γ b | 94,33 | 13,83 ^γ b |
| | 10 mg L ⁻¹ | 64,36 A | 75,04 A | 0,86 A | 87,87 | 41,88 A |
| Portainjerto | | *** | *** | *** | *** | ** |
| Boro | | *** | *** | ns | * | *** |
| Port. × Boro | | * | ** | *** | ns | *** |

“ns” significa diferencias no significativas al 95% ; * , ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. En la interacción Portainjerto × Boro, para cada portainjerto se indican las diferencias significativas entre los tratamientos de B al 95% o mayor con este símbolo: “ γ ”. Para los tratamientos: control y 10 mg L⁻¹ de B; las letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. En el factor Portainjerto, las letras diferentes indican diferencias significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores son la media de 4 repeticiones.

Observado en la tabla 3.8 los datos del día 84, se puede comprobar cómo en el caso de citrange Carrizo se incrementó la concentración de AS en hoja (AS_{foliar}) en las plantas regadas con 10 mg L⁻¹ de B (52,05 mg g⁻¹ ps) con respecto al control (38,75 mg g⁻¹ ps), pero la concentración de AR_{foliar} no mostró diferencias

significativas entre los dos tratamientos. En el caso de naranjo Amargo, se incrementó tanto los AS_{foliar} (1,2 veces respecto al control) como los AR_{foliar} (1,5 veces respecto al control) por el exceso de B (Tabla 3.8). En el caso de *Citrus macrophylla*, ocurrió lo contrario que en el caso de citrange Carrizo, esta vez fue mayor la concentración de AR_{foliar} en las plantas regadas con 10 mg L^{-1} de B ($64,36 \text{ mg g}^{-1}$ ps) que en las plantas control ($43,47 \text{ mg g}^{-1}$ ps), pero la concentración de AS_{foliar} no presentó diferencias significativas entre los dos tratamientos (Tabla 3.8). En condiciones normales, los valores de la relación AR/AS muestran como el portainjerto CC presenta el valor más alto (0,85) de los tres portainjertos (CM con 0,73 y NA con 0,50). Cuando son regados con exceso de B, el portainjerto CC disminuye esta relación hasta a 0,71 (Tabla 3.8); y por el contrario, CM y NA la incrementaron hasta 0,86 y 0,62, respectivamente.

Pasando a los datos del día 119, la concentración AS_{foliar} no mostró diferencias significativas en ninguno de los tres portainjertos estudiados (Tabla 3.8). En cuanto a la concentración foliar de AR los diferentes portainjertos no mostraron diferencias significativas entre tratamientos con B. Donde sí que se encontraron diferencias significativas fue en la relación AR/AS (Figura 3.10). Mientras que citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* no presentaron diferencias significativas entre las plantas control y las regadas con exceso de boro, naranjo Amargo incrementó esta relación por dicho exceso pasando de 0,52 (control) a 0,74 (10 mg L^{-1} de B).

Por su parte, en lo referente a la concentración de $AS_{\text{radicular}}$ se observó que los portainjertos citrange Carrizo y naranjo Amargo no mostraron diferencias significativas entre sus tratamientos; mientras que el *Citrus macrophylla* vio incrementada la concentración de AS por efecto del exceso de B (Tabla 3.8). En cuanto a los AR, en la figura 3.10 podemos observar como citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* no mostraron diferencias entre los tratamientos de B (a los 119 días). Sin embargo, en naranjo Amargo sí que se apreciaron diferencias entre tratamientos para la concentración de AR, donde las plantas regadas con B aumentaron estos azúcares 1,6 veces más con respecto a su control ($16,63 \text{ mg g}^{-1}$ ps). Respecto a la relación AR/AS radicular, en la figura 3.10 se muestra como en condiciones de no exceso de B las plantas que mostraron el valor más alto para esta relación fueron las del portainjerto *Citrus macrophylla* (0,81), seguidas de las plantas de citrange Carrizo (0,77) y, por último, las de naranjo Amargo (0,60). En condiciones de exceso

de B (10 mg L^{-1}), cada portainjerto se comporta de una manera diferente; mientras que citrange Carrizo no mostró diferencias entre tratamientos, naranjo Amargo incrementó esta relación hasta el 0,83. Por el contrario, las plantas de *Citrus macrophylla* lo redujeron hasta 0,29 (Figura 3.10).

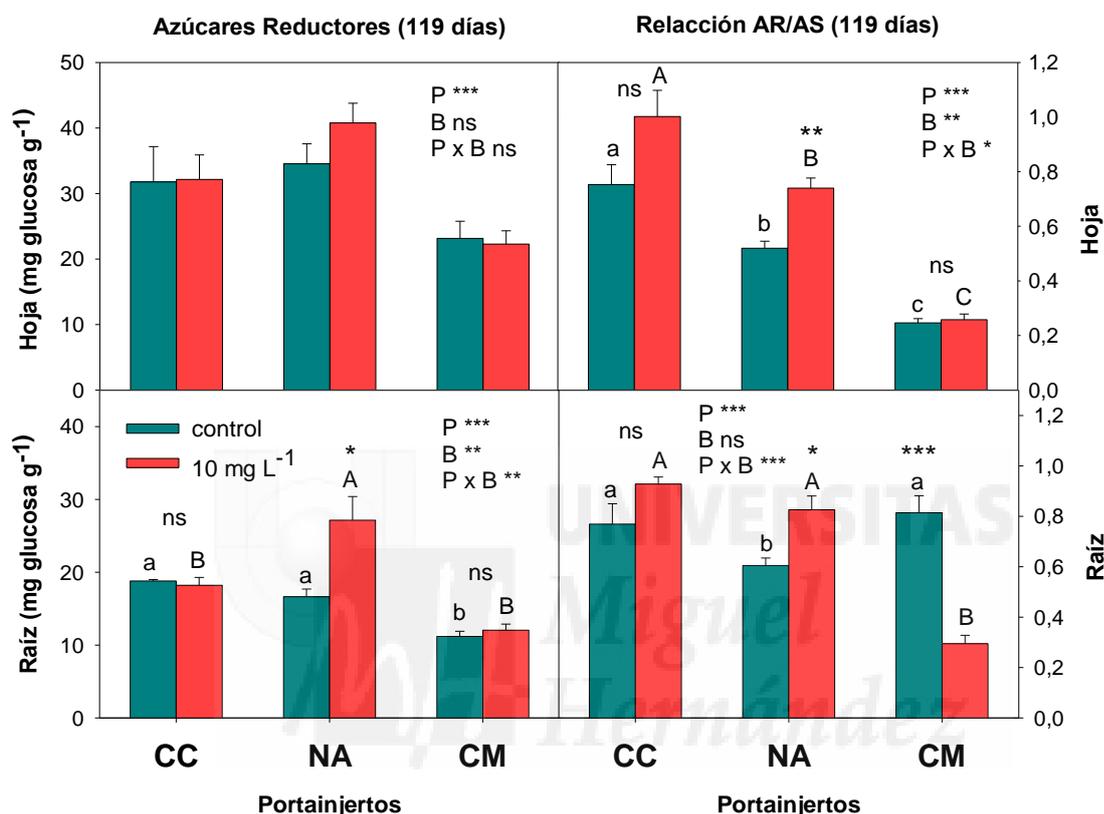


Figura 3.10. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de azúcares reductores y la relación AR/AS foliar y radicular en citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

En cuanto al almidón foliar, se observaron comportamientos diferentes en los portainjertos por efecto del exceso de B en las dos cosechas finales tal y como muestra la Tabla 3.9. A los 84 días, el portainjerto que en condiciones control presentó la mayor concentración fue NA ($30,58 \text{ mg g}^{-1}$ ps) y por debajo CC ($10,82 \text{ mg g}^{-1}$ ps) y CM ($7,73 \text{ mg g}^{-1}$ ps). A los 119 días, nos encontramos con la misma situación en las plantas control: naranjo Amargo con $21,23 \text{ mg g}^{-1}$ ps de almidón, citrange Carrizo con $14,46 \text{ mg g}^{-1}$ ps y *Citrus macrophylla* con $12,43 \text{ mg g}^{-1}$ ps (Tabla 3.9). En las plantas de citrange Carrizo regadas con niveles

tóxicos de B, se observó el mismo comportamiento tanto a los 84 días como a los 119 días, donde las plantas CC/10 mg L⁻¹ de B no mostraron diferencias respecto a sus controles (Tabla 3.9). También se observó el mismo comportamiento en las plantas de NA a los 84 y 119 días, pero esta vez sí que mostraron diferencias respecto a sus controles: NA/10 mg L⁻¹ disminuyó un 45% a los 84 días y un 30% a los 119 días (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Efecto del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de almidón foliar a los 84 y 119 días y almidón radicular a los 119 días en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla*.

| Factor Pral. | | Almidón (mg g ⁻¹ ps) | | |
|----------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Hoja_84 | Hoja_119 | Raíz_119 |
| Portainjerto | Carrizo | 12,93 b | 13,52 b | 56,14 |
| | N. Amargo | 23,64 a | 18,00 a | 53,03 |
| | Macrophylla | 6,79 c | 12,67 b | 51,09 |
| Boro | Control | 16,38 | 16,04 | 71,58 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 12,53 | 13,42 | 35,21 |
| Portainjerto × Boro | | | | |
| Carrizo | Control | 10,82 b | 14,46 ^{ns} b | 84,46 ^γ a |
| | 10 mg L ⁻¹ | 15,04 ^γ A | 12,59 A | 27,81 a |
| N. Amargo | Control | 30,58 ^γ a | 21,23 ^γ a | 70,65 ^γ b |
| | 10 mg L ⁻¹ | 16,70 A | 14,76 A | 35,36 A |
| Macrophylla | Control | 7,73 ^γ b | 12,43 ^{ns} b | 59,70 ^{ns} c |
| | 10 mg L ⁻¹ | 5,85 B | 12,92 A | 42,47 A |
| Portainjerto | | *** | *** | ns |
| Boro | | * | * | *** |
| Port. × Boro | | *** | * | *** |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para P<0.05 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. En la interacción Portainjerto × Boro, para cada portainjerto se indican las diferencias significativas entre los tratamientos de B al 95% o mayor con este símbolo: “γ”. Para los tratamientos de B (control y 10 mg L⁻¹), las letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas entre los portainjertos para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. En el factor Portainjerto, las letras diferentes indican diferencias significativa para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores son la media de 4 repeticiones.

Por último, *Citrus macrophylla* se comportó de manera diferente en las dos cosechas; mientras que a los 84 días el exceso de B afectó disminuyendo la concentración de almidón foliar hasta 5,85 mg g⁻¹ ps, a los 119 días las plantas de

CM/10 mg L⁻¹ de B no mostraron diferencias significativas con los controles (Tabla 3.9). En lo referente a la concentración de almidón radicular, citrange Carrizo y naranjo Amargo mostraron los valores más altos con 84,46 y 70,65 mg g⁻¹ ps, mientras que *Citrus macrophylla* rondaba los 60 mg g⁻¹ ps (Tabla 3.9). La concentración más alta de B (10 mg L⁻¹ de B) afectó de la misma manera a los portainjertos citrange Carrizo y naranjo Amargo, disminuyendo su concentración en un 71% y 50%, respectivamente; mientras que CM/10 mg L⁻¹ de B no mostró diferencias significativas con su respectivo control (Tabla 3.9).

3.3.7. Concentración de prolina y CAQ

En cuanto a la concentración de otros solutos orgánicos y comenzando con la prolina, se observó que, independientemente del portainjerto y del tratamiento, la concentración de prolina foliar fue aumentando a lo largo del experimento (*en la tabla 3.10. solo se muestran datos de la cosecha a los 84 y a los 119 días*). A los 84 días, el exceso de B afectó solamente al portainjerto citrange Carrizo, de tal forma que las hojas de CC/control presentaron una concentración de 17,17 mg g⁻¹ ps y CC/10 mg L⁻¹ de 13,15 mg g⁻¹ ps (Tabla 3.10). Por su parte, los otros dos portainjertos se comportaron de la misma manera ante el exceso de B, no mostrando diferencias significativas entre control y tratamiento. Sin embargo, al final del experimento (a los 119 días), los tres portainjertos se comportaron de la misma manera ante el exceso de B, disminuyendo significativamente la concentración de prolina foliar con respecto a sus respectivos controles (Tabla 3.10). Donde sí se observaron diferencias significativas fue a nivel de portainjerto y de tratamiento (Tabla 3.10). Mientras que a nivel de portainjerto, se comprobó que el portainjerto con mayor concentración de prolina foliar fue CM (25,46 mg g⁻¹ ps), seguido de CC y NA que no mostraron diferencias entre ellos (20,18 y 20,56 mg g⁻¹ ps, respectivamente); a nivel de tratamiento, se observó una mayor concentración de prolina foliar en la plantas control (24,06 mg g⁻¹ ps) que en las regadas con 10 mg L⁻¹ de B (20,10 mg g⁻¹ ps).

Tabla 3.10. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de prolina foliar y radicular en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* a los 84 y 119 días de experimento.

| Fact. principal | | Prolina (mg g ⁻¹ ps) | | | |
|----------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------|---------|----------|
| | | Hoja_84 | Hoja_119 | Raíz_84 | Raíz_119 |
| Portainjerto | Carrizo | 15,15 b | 20,18 b | 11,66 b | 14,83 b |
| | N. Amargo | 16,08 b | 20,56 b | 15,16 a | 16,11 ab |
| | Macrophylla | 20,96 a | 25,46 a | 14,62 a | 18,33 a |
| Boro | Control | 18,50 | 24,06 | 13,14 | 15,98 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 16,30 | 20,10 | 14,48 | 16,86 |
| Portainjerto × Boro | | | | | |
| Carrizo | Control | 17,17 ^γ b | 21,99 ^γ | 10,87 | 13,22 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 13,15 C | 18,37 | 12,44 | 16,44 |
| N. amargo | Control | 16,78 ^{ns} b | 22,79 ^γ | 14,04 | 16,57 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 15,37 B | 18,40 | 16,28 | 15,65 |
| Macrophylla | Control | 21,54 ^{ns} a | 27,39 ^γ | 14,52 | 18,15 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 20,37 A | 23,51 | 14,72 | 18,50 |
| Portainjerto | | *** | *** | *** | * |
| Boro | | *** | *** | ** | ns |
| Port. × Boro | | *** | ns | ns | ns |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. En la interacción Portainjerto × Boro, para cada portainjerto se indican las diferencias significativas entre los tratamientos de B al 95% o mayor con este símbolo: “ γ ”. Para los tratamientos de B (control y 10 mg L^{-1}), las letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. En el factor Portainjerto, las letras diferentes indican diferencia significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores son la media de repeticiones.

En el caso de la concentración de prolina radicular ocurre lo mismo que con la foliar en los portainjertos naranjo Amargo y *Citrus macrophylla*, en donde la tendencia es ir aumentando con el tiempo independientemente del tratamiento (Tabla 3.10). Sin embargo, en el caso de las plantas de citrange Carrizo regadas con 10 mg L^{-1} de B, en vez de seguir aumentando se mantiene estable observándose una concentración de $16,28 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ a los 84 días y de $15,65 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ a los 119 días (Tabla 3.10). Al final del experimento, solo se observaron diferencias para este parámetro a nivel de portainjerto, donde se puede encontrar a *Citrus macrophylla* como el portainjerto que presentó la concentración más alta de este osmolito en raíz ($18,33 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$), seguido de naranjo Amargo ($16,11 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$) y, por último, citrange Carrizo ($14,83 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$).

Para la concentración de compuestos amoniocuaternarios (CAQ) en hoja, y centrándonos en las dos últimas cosechas del experimento (a los 84 y 119 días), se observaron comportamientos diferentes en cada portainjerto. Las plantas control de citrange Carrizo no mostraron diferencias entre la cosecha de los 84 días ($2,13 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$) y la de 119 días ($2,25 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$); pero las plantas regadas con B sí que sufrieron una disminución, pasando de $2,36 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ a $1,42 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ (Tabla 3.11). En las plantas de naranjo Amargo, se observó cómo disminuyó la concentración de $\text{CAQ}_{\text{foliar}}$ en ambos tratamientos de B: las plantas control pasaron de $1,58$ a $0,43 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ y las tratadas con exceso de B pasaron de $1,32$ a $0,69 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ (Tabla 3.11). Por su parte, *Citrus macrophylla* fue el único portainjerto donde no se observaron diferencias entre ambas cosechas, independientemente del tratamiento (Tabla 3.11).

Centrándonos sólo en los datos obtenidos a los 119 días, en condiciones control se vio que el portainjerto que presentaba el valor más alto de este parámetro fue citrange Carrizo ($2,25 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$) y el más bajo naranjo Amargo ($0,43 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$). El análisis estadístico reveló que el exceso de B afectó de la misma manera a naranjo Amargo y a *Citrus macrophylla* haciendo que aumentaran su concentración de CAQ foliar hasta $0,69$ y $2,18 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$, respectivamente; mientras que citrange Carrizo la redujo en un 37% respecto a su control (Tabla 3.11).

Por último, en lo referente a la concentración de CAQ detectados en raíz, a los 84 días el exceso de B afectó solamente al portainjerto citrange Carrizo, de tal forma que las hojas de CC/control presentaron una concentración de $1,61 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ y CC/10 mg L^{-1} de $2,30 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ (Tabla 3.11). Por su parte, los otros dos portainjertos se comportaron de la misma manera ante el exceso de B, no mostrando diferencias significativas entre control y tratamiento. Al final del experimento (a los 119 días), los tres portainjertos se comportaron de la misma manera ante el exceso de B, aumentando significativamente la concentración de CAQ en raíz con respecto a los controles (Tabla 3.11). Donde sí se observaron diferencias significativas fue a nivel de portainjerto y de tratamiento (Tabla 3.11). Mientras que el primer caso, se comprobó que el portainjerto con mayor concentración de CAQ radicular fue *Citrus macrophylla* ($2,18 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$), seguido de citrange Carrizo y naranjo Amargo que no mostraron diferencias entre ellos ($1,63$ y $1,51 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$, respectivamente); en el segundo caso, se observó una mayor concentración de este parámetro en la plantas regadas con aguas de 10 mg L^{-1} ($2,08 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$) que en las control ($1,46 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$).

Tabla 3.11. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de compuestos amoniocuaternarios (CAQ) foliar y radicular en citrange Carrizo, naranja Amargo y *Citrus macrophylla* los 84 y 119 días de experimento.

| Fact. principal | | CAQ (mg g ⁻¹ ps) | | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|----------|
| | | Hoja_84 | Hoja_119 | Raíz_84 | Raíz_119 |
| Portainjerto | Carrizo | 2,25 a | 1,84 a | 1,96 a | 1,63 b |
| | N. Amargo | 1,45 b | 0,56 b | 1,75 a | 1,51 b |
| | Macrophylla | 1,72 b | 1,73 a | 1,29 b | 2,18 a |
| Boro | Control | 1,70 | 1,32 | 1,52 | 1,46 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 1,91 | 1,43 | 1,80 | 2,08 |
| Portainjerto × Boro | | | | | |
| Carrizo | Control | 2,13 | 2,25 ^γ a | 1,61 a | 1,14 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 2,36 | 1,42 B | 2,30 ^γ A | 2,11 |
| N. amargo | Control | 1,58 | 0,43 c | 1,54 a | 1,38 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 1,32 | 0,69 ^γ C | 1,95 A | 1,63 |
| Macrophylla | Control | 1,39 | 1,28 b | 1,42 a | 1,87 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 2,05 | 2,18 ^γ A | 1,16 B | 2,50 |
| Portainjerto | | ** | *** | ** | *** |
| Boro | | ns | ns | ns | *** |
| Port. × Boro | | ns | *** | * | ns |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. En la interacción Portainjerto × Boro, para cada portainjerto se indican las diferencias significativas entre los tratamientos de B al 95% o mayor con este símbolo: “ γ ”. Para los tratamientos de B (control y 10 mg L⁻¹), las letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. En el factor Portainjerto, las letras diferentes indican diferencia significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores son la media de repeticiones.

3.3.8. Concentración de H₂O₂ y MDA

Respecto a los productos del metabolismo oxidativo H₂O₂ y el MDA, se observó al final del experimento que en condiciones de no estrés por B el portainjerto que mayor concentración de H₂O₂ presentó en hoja fue *Citrus macrophylla*, seguido de naranja Amargo y por último citrange Carrizo (13,08, 7,45 y 5,23 $\mu\text{mol g}^{-1}$ pf, respectivamente), tal y como muestra la figura 3.11. Con el MDA ocurrió lo mismo, siguiendo exactamente el mismo orden CM > NA > CC. En condiciones de exceso de B (10 mg L⁻¹), encontramos que las plantas de CM fueron las que más concentración de H₂O₂ presentaron (hasta 3 veces más que su control); los otros dos portainjertos, prácticamente doblaron el valor de sus respectivos controles (Figura 3.11). En cuanto al MDA, *Citrus macrophylla* volvió a ser el portainjerto que

más incrementó este producto (hasta 29,60 nmol g⁻¹ pf) con el tratamiento de B seguido de citrange Carrizo (hasta 7,00 nmol g⁻¹ pf) con respecto a sus controles; por su parte, las plantas de naranjo Amargo regadas con exceso de B no vieron afectada su concentración de MDA (Figura 3.11).

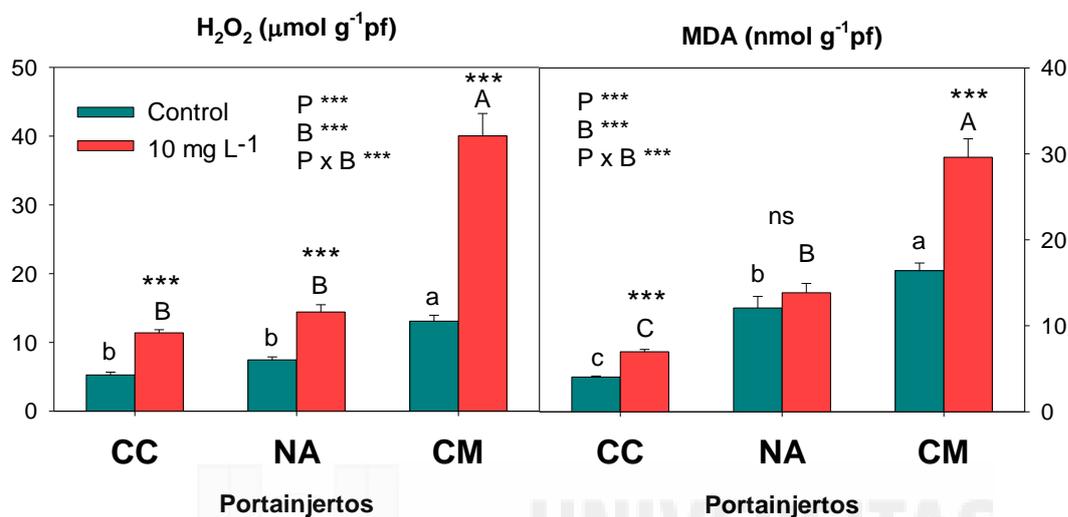


Figura 3.11. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y malonildialdehído (MDA) en hojas de citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. En el ANOVA, “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de B, las letras minúsculas (control) y mayúsculas (10 mg L⁻¹) indican diferencias significativas entre los portainjertos para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media (n=4).

3.3.9. Actividad de las enzimas antioxidantes

Respecto a la actividad enzimática de los sistemas antioxidantes, encontramos que las 3 enzimas analizadas mostraron diferencias significativas para la interacción Portainjerto × Boro (Figura 3.12). En el caso de la CAT, el portainjerto que en condiciones normales presentó más actividad fue naranjo Amargo (3,2 U g⁻¹ pf), los otros dos portainjertos no superaron los 1,5 U g⁻¹ pf (Figura 3.12). Las plantas de citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* regadas con niveles tóxicos de B incrementaron la actividad de la CAT alcanzando valores de 2,6 y 2,4 U g⁻¹ pf, respectivamente; naranjo Amargo, por su parte, no mostró diferencias significativas con su control (Figura 3.12).

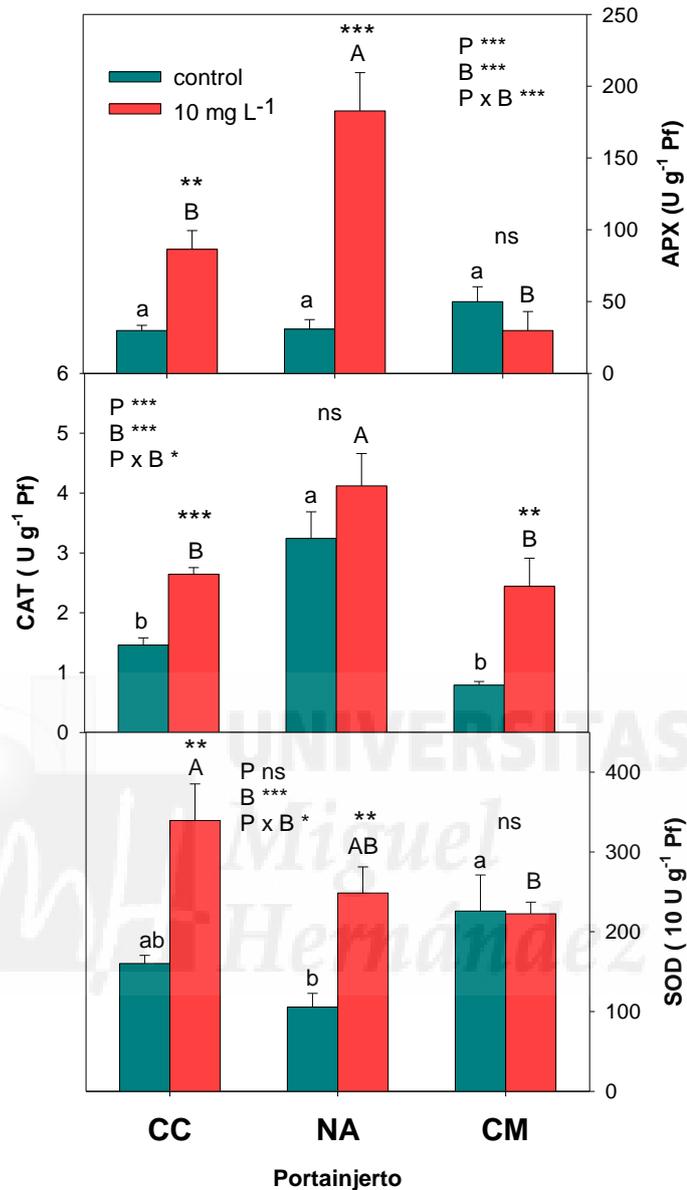


Figura 3.12. Efectos del exceso de B sobre la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en hojas de citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. En el ANOVA, “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto se emplean también estos símbolos para indicar la significancia entre los dos tratamientos de boro. Para cada tratamiento de B (control y 10 mg L⁻¹), las letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

Para la APX, las plantas control de los tres portainjertos mostraron valores de actividad enzimática muy parecidos situados dentro del intervalo 29-50 U g⁻¹ pf (Figura 3.12). No obstante, las plantas regadas con exceso de B muestran

comportamientos diferentes según el portainjerto estudiado. Mientras que *Citrus macrophylla* no mostró diferencias con respecto a su control, citrange Carrizo y naranjo Amargo mostraron un incremento de la actividad de APX, siendo el más drástico el de NA que aumento dicha actividad en hasta 12 veces respecto a su control (Figura 3.12). Citrange Carrizo, por su parte, solo aumentó su actividad en casi 3 veces más que su control.

Por último, respecto a la actividad de la SOD, se observó que el portainjerto que en condiciones normales mayor actividad de esta enzima presentó fue *Citrus macrophylla* ($226 \times 10 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$) y la que menor actividad mostró fue NA ($105,7 \times 10 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$). El efecto que tuvo el exceso de B sobre las plantas de los portainjertos citrange Carrizo y naranjo Amargo fue el de incrementar la actividad de esta enzima hasta el doble del valor de las plantas control (Figura 3.12); mientras que *Citrus macrophylla* no mostró diferencias significativas con su control ($222,4 \times 10 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$).

3.4. Discusión

3.4.1. Plantas del portainjerto naranjo Amargo son más tolerantes al exceso de boro en la solución nutritiva que *Citrus macrophylla* o citrange Carrizo

El exceso de B en la solución nutritiva afectó negativamente, como era de esperar, a las plantas, reduciendo su biomasa seca total. En el caso de citrange Carrizo y *Citrus macrophylla*, la reducción fue debida tanto a la disminución del crecimiento en la parte aérea como en la raíz; mientras que en naranjo Amargo, se debió principalmente a la inhibición del crecimiento en la raíz (ver Fig. 3.2). El hecho de que la reducción de la biomasa seca fuese también debida a la reducción de la parte aérea es un efecto atípico de la toxicidad por B con respecto a otras especies de plantas, ya que se ha observado que el efecto fenotípico principal de dicha toxicidad es la inhibición del crecimiento de la raíz; de hecho, numerosos autores consideran dicha inhibición radicular como un efecto típico de la toxicidad en plantas supuestamente sensibles al boro (Reid y col., 2004; Choi y col., 2006; Sheng y col., 2010; Simón, 2012). En otros experimentos con cítricos (Papadakis y col., 2004a; Papadakis y col., 2004b) no se observó ningún efecto sobre los parámetros de crecimiento cuando fueron tratados con $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de B durante 204 días de

tratamiento, por eso en este experimento aplicamos una concentración de B de 10 mg L⁻¹.

Usando la relación entre la biomasa seca total en condiciones de exceso de B (10 mg L⁻¹) con respecto a la biomasa seca total del tratamiento control (0,25 mg L⁻¹ de B) para cada portainjerto, podemos determinar su tolerancia relativa. En base a esta relación se puede concluir que las plantas de naranjo Amargo parecen ser las más tolerantes (redujeron su biomasa solo en un 23%). En el otro extremo, encontramos al portainjerto citrange Carrizo que resultó ser el menos tolerante al reducir su biomasa en un 56%.

Los síntomas de toxicidad de B aparecieron en las hojas maduras, desarrollándose clorosis en los bordes y centro de las mismas (ver imagen 3.6); en concordancia con las observaciones descritas en otras especies de plantas como melón (Goldberg y col., 2003), cítricos (Papadakis y col., 2004a; Papadakis y col., 2004b; Gimeno y col., 2012), olivos (Chatzissavvidis y Therios, 2010) y *Jatropha curca* (Simón, 2012). Ha sido descrito que estos síntomas podrían ser debidos a desórdenes metabólicos relacionados con la formación de enlaces de B a las ribosas causando daños celulares (Gunes y col., 2006; Cervilla y col., 2007). En nuestro experimento, los síntomas de toxicidad fueron bastante más graves en los portainjertos citrange Carrizo y *Citrus macrophylla*, y además aparecieron mucho antes que en el portainjerto naranjo Amargo. Además, cabe destacar que la abscisión foliar solo tuvo lugar en citrange Carrizo (ver imagen 3.7, 4); por lo que en este caso, la reducción de la parte aérea en citrange Carrizo fue debida principalmente a dicha defoliación más que a la inhibición del crecimiento como sí que ocurrió en *Citrus macrophylla*.

3.4.2. Plantas del portainjerto citrange Carrizo tuvieron una concentración foliar de boro más alta que los portainjertos *Citrus macrophylla* o naranjo Amargo lo que puedo determinar su distinta tolerancia

Especies y genotipos sensibles al exceso de B, generalmente contienen concentraciones más altas en hojas y brotes que los genotipos tolerantes (Nable y col., 1997). Los resultados de nuestro experimento mostraron que la concentración de B foliar dependió del portainjerto (ver Fig. 3.4 y tabla 3.3). A los 84 días de tratamiento, antes de que se produjera la defoliación, el portainjerto citrange Carrizo

fue el que más boro acumuló en sus hojas ($626,53 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$), en comparación con *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo que no superaron los 450 mg de B por kg de ps. La menor concentración foliar de boro alcanzado en *Citrus macrophylla* con respecto a citrange Carrizo, podría estar relacionado entre otros factores a que las raíces de *Citrus macrophylla* son capaces de absorber y transporte por gramo de raíz una menor cantidad de boro como podemos ver en los resultados de la Fig. 3.5. En un trabajo realizado recientemente, se ha observado que las plantas de *Citrus macrophylla* reducen la concentración de boro en las hojas como consecuencia de una regulación negativa de los transportadores de boro *NIP5* y *PIP5*, y la activación del gen *BOR4* que codifica los genes relacionados con el eflujo de boro (expulsión de boro de las células) en las raíces y hojas (Martínez-Cuenca y col., 2015). Por otro lado, aunque la absorción y el transporte de boro fueran similares en citrange Carrizo y naranjo Amargo, la mayor acumulación en citrange Carrizo podría deberse, entre otros factores, a la menor relación hoja/raíz que se observó en las plantas de citrange Carrizo (ver Fig. 3.3).

La mayor acumulación de boro en las hojas de citrange Carrizo podría ser la causa de que este portainjerto fuera menos tolerante que los otros dos. En el caso de *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo, a lo largo del experimento, se observó que la concentración de boro en las hojas evolucionó de una forma similar, alcanzando $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ a los 45 días que se incrementó hasta los $400 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ a los 84 días y manteniéndose estable al final del experimento. Esto indicaría que las plantas de *Citrus macrophylla* son mucho más sensibles a la toxicidad al boro que las de naranjo Amargo. Para la misma concentración de boro, el efecto de la toxicidad es más perjudicial para *Citrus macrophylla*. En plantas el mecanismo para tolerar el exceso de B incluye diversas estrategias como la capacidad para restringir la acumulación de B en los tejidos vegetales, inhibición del transporte de B desde la raíz a la parte aérea, y la capacidad para tolerar elevadas concentraciones de B en las hojas y la raíz mediante la compartimentación (Torun y col., 2002; Torun y col., 2006; Stiles y col., 2010). Esta última estrategia está relacionada con la capacidad de acumulación de B en las vacuolas, ya sea en la raíz o en la parte aérea, para así evitar o minimizar lo máximo posible el daño que pueda causar el B al metabolismo celular (Kaur y col., 2006).

Por otro lado, la reducción de la raíz por el tratamiento de boro en los tres portainjertos no estuvo relacionada con la concentración de boro acumulada en este órgano. Al final del experimento vemos que la reducción fue similar para los tres portainjertos, pero la concentración fue mayor para naranjo Amargo y *Citrus macrophylla*, los dos portainjertos que acumularon menos boro en las hojas. Esto nos indicaría que las raíces de estos portainjertos son menos sensibles a la toxicidad por boro, y que podrían ser capaces de acumularlo hasta ciertos límites para impedir su transporte hacia la parte aérea de las plantas (ver Fig. 3.6).

3.4.3. El boro es un nutriente poco móvil en los portainjertos de cítricos acumulándose principalmente en las hojas adultas

La concentración de B y su distribución en los diferentes tejidos dependen de la movilidad del B dentro de la propia planta. En las plantas que sintetizan cantidades elevadas de alcoholes en sus hojas, tales como manitol y sorbitol, el boro tiene una alta movilidad vía floema que le permitirá retranslocarse de forma eficaz por toda la planta como consecuencia de la formación de complejos B-poliol. Estas especies pertenecen a la familia de las Rosáceas (melocotón, manzana, pera), Apiáceas (zanahoria, apio), Rubiáceas (café) y Oleáceas (de oliva) (Brown y Hu, 1996; Brown y Shelp, 1997). Estas especies que crecen en condiciones de exceso de B, no acumulan B en las hojas, pero sí en tallos donde se observan síntomas visibles de toxicidad (El-Motaium y col., 1994). En contraste, en especies en las cuales no se sintetizan cantidades suficientes de estos compuestos, el B es poco móvil y su distribución en la parte aérea sigue fundamentalmente la corriente de transpiración (Takano y col., 2008), acumulándose fundamentalmente en los tejidos foliares adultos y principalmente en los márgenes de las hojas (Brown y Shelp, 1997). De los datos de nuestro experimento en base a la concentración acumulada en los diferentes tejidos, así como los síntomas de toxicidad observados en las plantas, se puede decir que los tres portainjertos pertenecen al grupo de plantas donde el B tiene una escasa movilidad y sería el flujo de transpiración quien determinase la concentración de B total y su distribución dentro de la planta (ver Fig. 3.4 y 3.6). Al final del experimento, las hojas contenían una media aproximada de 450 mg de B por kg de peso seco, mientras que en los demás tejidos no encontramos concentraciones superiores a 50 mg kg⁻¹ de B. Estos datos están de acuerdo con los mostrados para

otras especies de plantas, donde el B se acumula mayoritariamente en las hojas y en concentraciones relativamente bajas en la raíz, madera del tronco, fruta, y otros tejidos de almacenamiento o meristemáticos (Lovatt y Bates, 1984; El-Motaium y col., 1994; Kastori y col., 1995; Bellaloui y Brown, 1998; Papadakis y col., 2003; Papadakis y col., 2004a; Papadakis y col., 2004b; Gimeno y col., 2012; Simón, 2012). El hecho de que las mayores concentraciones de B se encuentren en las hojas, en vez de en otras partes vegetativas, es una clara evidencia de que B es inmóvil en el floema y en consecuencia, no se puede redistribuir dentro de la planta.

3.4.4. La disminución de la A_{CO_2} fue mayor en las plantas de citrange Carrizo, seguido de *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo

Respecto a los parámetros de intercambio de gaseoso, nuestros resultados mostraron que la presencia de una alta concentración de B en la solución nutritiva causó una disminución en A_{CO_2} y g_s en las hojas de los tres portainjertos (ver Fig. 3.7 y 3.8), y que esta reducción dependió del portainjerto. Como ya hemos visto anteriormente, las plantas de citrange Carrizo son las que acumulan más boro y las que vieron reducido su crecimiento en un mayor porcentaje; esto concuerda con los datos de A_{CO_2} ya que en este portainjerto se observó la mayor reducción de este parámetro, un 60% en los días 45 y 84, y un 83% al final del experimento (día 119). En los otros dos portainjertos, a pesar de que tuvieron entre ellos la misma concentración foliar de boro, las plantas de naranjo Amargo fueron las que en menor grado se redujo la A_{CO_2} , lo que avala nuestra hipótesis de que las hojas de este portainjerto tienen una menor sensibilidad a la toxicidad por boro que las hojas de *Citrus macrophylla*.

A pesar de que A_{CO_2} y g_s se redujeran en paralelo en los 3 portainjertos, estos presentaron diferencias en los valores C_i . Por un lado, encontramos que en citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* el exceso de B también indujo una reducción de C_i , que parece estar directamente relacionada con la disminución de la g_s . Por tanto, en estos dos portainjertos parece ser que la disminución de la A_{CO_2} fue debida a factores estomáticos. Mientras que en naranjo Amargo dicha toxicidad propició una disminución en A_{CO_2} sin cambios en C_i , sugiriendo que la reducción fue debida principalmente a factores no estomáticos más que a factores estomáticos (Farquhar y Sharkey, 1982). Resultados similares a naranjo Amargo han sido descritos en *Cucurbitas pepo* (Lovatt y Bates, 1984), cítricos (Papadakis y col., 2004a; Papadakis

y col., 2004b; Gimeno y col., 2012), kiwi (Sotiropoulos y col., 1999) y *Jatropha curcas* (Simón, 2012). En olivos, sin embargo, se ha publicado que aunque una elevada concentración de B disminuye el valor de A_{CO_2} , éste fue acompañado por un incremento de gs (Chatzissavvidis y Therios, 2010).

A pesar de que el modelo de Farquhar y Sharkey (1982) indica que, basado en los datos de C_i , la caída de la A_{CO_2} en citrange Carrizo se debió a factores estomáticos, nuestro estudio de fluorescencia de clorofilas muestra como las hojas de este portainjerto tenían daños en su sistema fotosintético, ya que en este caso se observó una disminución en la proporción de energía fotoquímica absorbida por el fotosistema II en los cloroplastos. La reducción de Φ_{PSII} puede ser debida a cambios en qP y/o F_v'/F_m' (Maxwell y Johnson, 2000). En este experimento, los cambios en la Φ_{PSII} de las hojas de citrange Carrizo se debieron sólo a los cambios que se produjeron en el parámetro F_v'/F_m' ; lo que sugiere, que la pérdida de la eficiencia cuántica por parte del PSII en este portainjerto fue a consecuencia de que el complejo de recolección de luz estuviera dañado (Guerfel y col., 2009). Esto puede ser debido a que el exceso de B en las hojas haya podido dañar la estructura del cloroplasto y/o otros pigmentos fotosintéticos (Papadakis y col., 2004a; Papadakis y col., 2004b). Por tanto, aunque la reducción de la A_{CO_2} en el portainjerto citrange Carrizo se debió principalmente a factores estomáticos, los daños en la maquinaria fotoquímica de los cloroplastos también podrían haber contribuido a la disminución de este parámetro.

3.4.5. De los tres portainjertos ensayados, las plantas de naranja Amargo fueron las que mostraron una mayor sistema antioxidante debido a una alta actividad APX y SOD

En condiciones de estrés medioambiental, se puede dar el caso de que la energía absorbida por el aparato fotosintético no pueda ser canalizada hacia la absorción de CO_2 , por lo tanto, pueden producirse daños foto-oxidativos debido a la sobre-estimulación de la reacción de Mehler. Esta reacción es una fuente de radicales superóxido incluso en condiciones óptimas (Eltner, 1982; Badger, 1985; Foyer y col., 1994), que en condiciones de estrés se ve fuertemente favorecida (Guo y col., 2006). En la bibliografía uno de los parámetros que se utilizan para estimar que se está sobre-produciendo especies reactivas de oxígeno en condiciones de estrés es la relación A_{CO_2}/Φ_{PSII} , ya que el parámetro Φ_{PSII} es directamente proporcional a la tasa

de transporte de electrones (Cakmak, 1994; Cakmak y Römheld, 1997). En nuestro experimento, pudimos comprobar que el exceso de B redujo esta relación A_{CO_2}/Φ_{PSII} (*datos no mostrados*), independientemente del portainjerto, y que el más afectado fue citrange Carrizo. Estos datos ponen de manifiesto que la reacción de Mehler se vio favorecida por el exceso de B y ello supuso la formación de las ROS.

El hecho de que en las hojas de naranjo Amargo la concentración de MDA (ver Fig. 3.11) no se vieran afectadas a pesar de la disminución en la relación de A_{CO_2}/Φ_{PSII} , sugiere que este portainjerto tiene un sistema antioxidante bastante potente y eficiente capaz de hacer frente a las ROS que se podrían haber formado a consecuencia del exceso de B. En la otra cara, encontramos a citrange Carrizo y *Citrus macrophylla*, donde la concentración de MDA fue mayor en el tratamiento de exceso de boro con respecto al control, especialmente en las plantas de *Citrus macrophylla*. A pesar de que en los tratamientos de exceso de boro se observó un aumento de APX, CAT y SOD en citrange Carrizo, y un aumento en CAT en *Citrus macrophylla*, parece ser que no fue suficiente para contrarrestar el estrés oxidativo producido por la toxicidad por boro (ver Fig. 3.12).

Este modelo de respuesta diferente entre los tres portainjertos podría sugerirnos algunos puntos interesantes que deberían ser estudiados con más detalle en futuros experimentos. En primer lugar, los datos evidenciaron un incremento de la actividad SOD en los portainjertos citrange Carrizo y naranjo Amargo con exceso de B, mientras que *Citrus macrophylla* no incrementó la actividad de SOD (ver Fig. 3.12). Sin embargo, la alta concentración de H_2O_2 en este portainjerto con su consiguiente daño en las membranas (ver Fig. 3.11), nos indica que inicialmente tuvo que presentar una elevada actividad por parte de la enzima SOD, como respuesta a la alta producción de anión superóxido (O_2^-) en hojas. Sin embargo, la intensa producción de este radical durante un tiempo prolongado, podría haber agotado la estimulación de la actividad enzimática de SOD, ya que el producto de la reacción (H_2O_2) la inhibió por medio de un proceso que se conoce como retroalimentación negativa (en inglés *Negative Feedback*). Una estimulación general de SOD también ha sido descrita por muchos estudios sobre la toxicidad de B (Gunes y col., 2006; Molassiotis y col., 2006; Cervilla y col., 2007; Ardic y col., 2009; Han y col., 2009; Kaya y col., 2009). Además de la reacción de Mehler, hay otra vía de formación de H_2O_2 alternativa que es la fotorrespiración. De hecho algunos autores

han visto de que la producción de H_2O_2 por medio de esta vía representa aproximadamente el 70% de H_2O_2 total que se forma (Noctor y col., 2002); otros estudios defienden que la tasa de producción de H_2O_2 en el cloroplasto es mayor (Foyer y Noctor, 2000; Miyake y Yokota, 2000), cuando las plantas presentan una menor actividad de la Rubisco (Ruuska y col., 2000). Por tanto, no podemos descartar en nuestro experimento que el aumento de la concentración de H_2O_2 pueda ser debido tanto a la fotorrespiración como a la reacción de Mehler-ascorbato peroxidasa.

En citrange Carrizo se observó para el resto de enzimas (ver Fig. 3.12) un incremento de la actividad de CAT y APX estimulada por el exceso de B, aunque la concentración de MDA también aumentó, sugiriendo que su sistema antioxidante no fue lo suficientemente potente para evitar daños por estrés oxidativo. Por su parte, en *Citrus macrophylla*, CAT fue el principal enzima implicado en la respuesta antioxidante al exceso de B. Por tanto parece ser que el H_2O_2 fue detoxificado por la CAT principalmente en los peroxisomas de hojas (Foyer y col., 1994), pero no en otras estructuras celulares, lo que explica que al final el sistema antioxidante de este portainjerto no fuera lo suficientemente eficaz para detoxificar todo el H_2O_2 producido tanto por la reacción de Mehler como por la fotorrespiración. Por último, en naranjo Amargo comprobamos que el exceso de boro favoreció, no solo a la enzima SOD, sino también a la actividad de la APX. De hecho los resultados muestran, que en condiciones de toxicidad la actividad de la APX fue estimulada hasta aproximadamente 12 veces más que en condiciones normales. Para este portainjerto la enzima CAT, a pesar de que no se vieron diferencias entre la actividad de CAT de las plantas control y de las regadas con exceso de B, también pudo jugar un papel importante en la detoxificación del H_2O_2 (ver Fig. 12).

3.4.6. El exceso de boro en la solución nutritiva disminuyó la concentración de prolina y aumentó la concentración de GB en naranjo Amargo y *Citrus macrophylla*

Una de las respuestas más comunes al estrés en las plantas es la sobreproducción de diferentes tipos de solutos orgánicos (Serraj y Sinclair, 2002; Rivero y col., 2004; Parvaiz y Satyawati, 2008). Generalmente, protegen a las plantas: i) contribuyendo al ajuste osmótico celular, ii) mediante la desintoxicación de las ROS, iii) protegiendo la integridad de la membrana y iv) mediante la estabilización de enzimas/proteínas

(Yancey y col., 1982; Bohnert y Jensen, 1996). En estos solutos se incluyen a la prolina, compuestos de amonio cuaternario (CAQ), y azúcares como los más importantes (Rhodes y Hanson, 1993). De la prolina se sabe que se produce ampliamente en las plantas superiores y, normalmente, se acumula en grandes cantidades en respuesta a las estreses ambientales (Ashraf y Wu, 1994; Ali y col., 1999; Rhodes y col., 1999; Öztürk y Demir, 2002; Hsu y col., 2003; Kishor y col., 2005). Entre las funciones mencionadas de este osmolito, cabe destacar su papel en la detoxificación de las ROS y el de la protección de membranas frente a la peroxidación de lípidos (Hong y col., 2000).

Bajo condiciones de exceso de B se ha observado una reducción de los niveles de prolina en hojas de cítricos (Papadakis y col., 2004a), manzano (Molassiotis y col., 2006) y vid (Gunes y col., 2006). Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro experimento, donde podemos comprobar que el exceso de B en la solución nutritiva contribuyó a reducir la concentración de prolina foliar en los tres portainjertos al final del experimento (ver tabla 3.10). El hecho de que en las hojas con alta concentración de boro de nuestros portainjertos muestren una menor concentración de prolina, puede estar relacionado con que se haya producido un aumento de la síntesis de proteínas que tienen a la prolina en su composición química o que la ruta de síntesis de este osmolito haya visto interrumpida. Además, no debemos descartar que las plantas de cítricos puedan utilizar la prolina como una fuente de nitrógeno cuando necesitan un aporte adicional de este nutriente. El incremento de prolina en situaciones de estrés por B no es típico de todas las plantas. Otros autores han observado un incremento de los niveles de prolina en hojas de plantas de tomate y pimiento sometidas a toxicidad por B (Eraslan y col., 2007; Cervilla, 2009).

En cuanto a la GB, esta es abundante principalmente en cloroplastos donde es sintetizada (Hanson y Scott, 1980; Rhodes y Hanson, 1993) y juega un papel vital en el ajuste y la protección de la membrana tilacoidal, manteniendo de ese modo la eficiencia fotosintética (Robinson y Jones, 1986; Genard y col., 1991). De la GB se sabe que se acumulan en respuesta al estrés en muchas plantas, tales como, remolacha azucarera (Weimberg y col., 1984), espinaca (Fallon y Phillips, 1989), cebada (McCue y Hanson, 1990), trigo (Rhodes y Hanson, 1993), sorgo (Yang y col., 2003) y *Jatropha curcas* (Simón, 2012). De tal manera que especies con genotipos

tolerantes normalmente acumulan más GB que genotipos sensibles en respuesta al estrés. Sin embargo, esta relación no es universal. Por ejemplo, no se observó correlación significativa entre la acumulación de GB y la tolerancia al exceso de boro en diferentes portainjertos de cítricos (Gimeno y col., 2012). Por el contrario, nuestros resultados mostraron que naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* incrementaron la concentración de GB en las hojas con concentraciones altas de B, mientras que en citrange Carrizo se redujo este soluto (ver tabla 3.11). El hecho de que la GB sea de gran importancia en la protección de la membrana tilacoidal, podría explicar que *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo mantuvieran su eficiencia fotosintética (Φ_{PSII} ; ver Fig. 3.9) a niveles normales que las plantas control a pesar del exceso de B en sus hojas; mientras que en citrange Carrizo al disminuir la concentración de GB pudo haber sufrido daños en el complejo de recolección de luz como muestran los valores del parámetro de fluorescencia de clorofilas Fv'/Fm' .

3.4.7. La concentración de azúcares solubles disminuyó por el exceso de boro, aunque la relación entre los azúcares reductores/azúcares totales dependió del portainjerto

Los azúcares solubles, especialmente la sacarosa, glucosa, y fructuosa, juegan un papel importante en la estructura y metabolismo de las células en los diferentes órganos de las plantas. Están involucrados en las respuestas a un gran número de estreses, y actúan como nutrientes y moléculas señal que activan vías de transducción específicas, resultando en modificaciones importantes de la expresión de genes y patrones proteómicos (Couée y col., 2006). En el caso del boro, Yokota y Konishi (1990) afirmaron que la acumulación de los hidratos de carbono solubles en las hojas era necesaria para aliviar los síntomas de su toxicidad y el hecho de que se acumulen parece estar más relacionado con que se limite su uso más que con el hecho de que se vea sobre-estimulada su síntesis. En nuestro experimento, los resultados de los análisis de carbohidratos apuntan a una idea totalmente contraria a la que dijeron estos investigadores. En la tabla 3.8 podemos ver que a los 119 días de riego con exceso de B, los tres portainjertos tienden a reducir la concentración de azúcares solubles en las hojas. Esto podría ser debido a la disminución en la tasa de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}) que se dio por la toxicidad del boro en las hojas. Está claro que una baja A_{CO_2} limita la síntesis de carbohidratos en las hojas. Sin embargo,

entre los tres portainjertos sí que se vio una diferente respuesta en la relación entre los azúcares reductores frente a los azúcares totales (AR/AS). Recordemos que los azúcares reductores son principalmente la glucosa y fructosa, y entre los no-reductores el azúcar mayoritario es la sacarosa. Pues bien, en el caso de naranjo Amargo, portainjerto que hemos clasificado como el más tolerante en este experimento, la relación AR/AS aumentó con el tratamiento de exceso de boro. Esto indicaría que estas plantas estarían invirtiendo más recursos en producir azúcares con un carácter antioxidante que podría ayudar a la planta a reducir el estrés oxidativo, aunque a expensas de reducir carbohidratos con función de transporte como la sacarosa. Mientras tanto, las plantas de citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* no cambia esta relación AR/AS, por lo que no se intuye en estos portainjertos una alteración en el metabolismo de carbono dirigida a paliar los efectos negativos de la toxicidad por boro. Esta hipótesis también podría quedar avalada por el hecho de que la concentración de almidón en las hojas se viera disminuida en las plantas de naranjo Amargo pero no en los otros dos portainjertos. La degradación de almidón podría suministrar carbohidratos para cubrir las necesidades por parte de la planta ante la posible inhibición de la síntesis de los mismos a consecuencia del exceso de B en las hojas. En la raíz también encontramos un aumento de los azúcares reductores en las plantas de naranjo Amargo. En el año 2007, Choi y col. (2007) observaron cambios morfológicos en el ápice de las raíces en especies tolerantes tras la exposición a altas concentraciones de boro, que se asociaron con un aumento de las concentraciones de azúcares reductores. Los resultados de estos investigadores junto con nuestros datos sugieren que los azúcares en su fase reductora pueden jugar un papel importante en los mecanismos que tienen las plantas para mitigar los efectos tóxicos del B.

3.4.8. El exceso de boro en la solución nutritiva disminuyó la concentración foliar de Ca y Mg pero sin llegar a rangos de deficiencia

Se sabe que en plantas se puede producir un antagonismo del P, K y Ca con el B, cuando la solución nutritiva contiene una alta concentración de este micronutriente. Este antagonismo entre el B y P ha sido vista en kiwis (Sotiropoulos y col., 1999) y maíz (Günes y Alpaslan, 2000), y para el K y Ca en las plantas de tomate (Kaya y col., 2009). En este experimento, hubo diferencias para las concentraciones de Ca y

Mg en las hojas de los tres portainjertos, observándose una disminución de la concentración de los mismos a consecuencia del exceso de B en la solución nutritiva (ver tabla 3.7), aunque ninguno de estos nutrientes llegó a un rango de deficiencia para cítricos. Por su parte, en raíces el único macronutriente afectado por el exceso de B fue el K que incrementó su concentración y se dio en los tres portainjertos (ver tabla 3.7). Aunque no se observaron rangos de deficiencia o toxicidad, el exceso de boro en el agua de riego sí que contribuyó a alterar los equilibrios nutricionales, lo que podrían haber provocado una reducción del crecimiento (Grattan y Grieve, 1992), aunque esta idea debería ser contrastada en futuros experimentos.

3.5. Bibliografía

- Ali, G., Srivastava, P.S., Iqbal, M. (1999). Proline Accumulation, Protein Pattern and Photosynthesis in *Bacopa Monniera* Regenerants Grown under NaCl Stress. *Biologia Plantarum* **42**: 89-95
- Ardic, M., Sekmen, A.H., Turkan, I., Tokur, S., Ozdemir, F. (2009). The effects of boron toxicity on root antioxidant systems of two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Plant and Soil* **314**: 99-108
- Ashraf, M., Wu, L. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**: 17-42
- Badger, M.R. (1985). Photosynthetic oxygen exchange. *Annual Review of Plant Physiology* **36**: 27-53
- Bates, L., Waldren, R., Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* **39**: 205-207
- Bellaloui, N., Brown, P.H. (1998). Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Plant and Soil* **198**: 153-158
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* **14**: 89-97
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254
- Brown, P.H., Hu, H. (1996). Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol rich species. *Annals of Botany* **77**: 497-506
- Brown, P.H., Shelp, B.J. (1997). Boron mobility in plants. *Plant and Soil* **193**: 85-101
- 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. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1259-1266
- Cakmak, I., Römheld, V. (1997). Boron deficiency induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil* **193**: 71-83
- Cervilla, L. (2009). Respuesta fisiológica y metabólica a la toxicidad por boro en plantas de tomate. Estrategias de tolerancia. Universidad de Granada
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Ríos, J.J., Romero, L., Ruiz, J.M. (2007). Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany* **100**: 747-756
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 449-459
- Chance, B., Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* **2**: 764-775
- Chatzissavvidis, C., Therios, I. (2010). Response of four olive (*Olea europaea* L.) cultivars to six B concentrations: Growth performance, nutrient status and gas exchange parameters. *Scientia Horticulturae* **127**: 29-38
- Choi, E.-Y., Kolesik, P., McNeill, A., Collins, H., Zhang, Q., HUYNH, B.L., Graham, R., Stangoulis, J. (2007). The mechanism of boron tolerance for maintenance of root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant, Cell & Environment* **30**: 984-993
- Choi, E.-Y., McNeill, A., Coventry, D., Stangoulis, J. (2006). Whole plant response of crop and weed species to high subsoil boron. *Crop and Pasture Science* **57**: 761-770
- El-Motaium, R., Hu, H., Brown, P.H. (1994). The relative tolerance of six *Prunus* rootstocks to boron and salinity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **119**: 1169-1175
- Elstner, E.F. (1982). Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 73-96
- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., Alpaslan, M. (2007). Boron toxicity alters nitrate reductase activity, proline accumulation, membrane permeability, and mineral constituents of tomato and pepper plants. *Journal of plant nutrition* **30**: 981-994
- Fallon, K., Phillips, R. (1989). Responses to water stress in adapted and unadapted carrot cell suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* **40**: 681-687
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 317-345
- Fernandez-Ballester, G., Garcia-Sanchez, F., Cerda, A., Martinez, V. (2003). Tolerance of citrus rootstock seedlings to saline stress based on their ability to regulate ion uptake and transport. *Tree Physiology* **23**: 265-271
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia plantarum* **92**: 696-717

- Foyer, C.H., Noctor, G. (2000). Tansley Review No. 112. *New Phytologist* **146**: 359-388
- García-Sánchez, F., Botia, P., Fernández-Ballester, G., Cerdá, A., Lopez, V.M. (2005). Uptake, transport, and concentration of chloride and sodium in three citrus rootstock seedlings. *Journal of plant nutrition* **28**: 1933-1945
- Genard, H., Le Saos, J., Billard, J.-P., Tremolieres, A., Boucaud, J. (1991). Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. *Plant physiology and biochemistry* **29**: 421-427
- Gimeno, V., Simón, I., Nieves, M., Martínez, V., Cámara-Zapata, J.M., García, A.L., García-Sánchez, F. (2012). The physiological and nutritional responses to an excess of boron by Verna lemon trees that were grafted on four contrasting rootstocks. *Trees* **26**: 1513-1526
- Goldberg, S., Shouse, P., Lesch, S., Grieve, C., Poss, J., Forster, H., Suarez, D. (2003). Effect of high boron application on boron content and growth of melons. *Plant and Soil* **256**: 403-411
- Grattan, S., Grieve, C. (1992). Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agriculture, ecosystems & environment* **38**: 275-300
- Grieve, C., Grattan, S. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil* **70**: 303-307
- Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., Chaïbi, W., Zarrouk, M. (2009). Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* **119**: 257-263
- Günes, A., Alpaslan, M. (2000). Boron uptake and toxicity in maize genotypes in relation to boron and phosphorus supply. *Journal of plant nutrition* **23**: 541-550
- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E., Coban, S., Sahin, O. (2006). Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **110**: 279-284
- Guo, Y.-P., Zhou, H.-F., Zhang, L.-C. (2006). Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Scientia Horticulturae* **108**: 260-267
- Haissig, B.E., Dickson, R.E. (1979). Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Physiologia plantarum* **47**: 151-157
- Halliwell, B., Foyer, C.H. (1976). Ascorbic-acid, metal-ions and superoxide radical. *Biochemical Journal* **155**: 697-700
- Han, S., Tang, N., Jiang, H.-X., Yang, L.-T., Li, Y., Chen, L.-S. (2009). CO₂ assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress. *Plant Science* **176**: 143-153

- Hanson, A.D., Scott, N.A. (1980). Betaine synthesis from radioactive precursors in attached, water-stressed barley leaves. *Plant physiology* **66**: 342-348
- Hodge, J., Hofreiter, B. (1962). Determination of reducing sugars and carbohydrates. In R Whistler, M Wolfrom, eds, *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol I. NY:Academic Press, New York, pp 380-394.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**: 604-611
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P.S. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant physiology* **122**: 1129-1136
- Hsu, S., Hsu, Y., Kao, C. (2003). The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum* **46**: 73-78
- Kastori, R., Plesničar, M., Panković, D., Sakač, Z. (1995). Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrates in sunflower leaves as affected by boron deficiency. *Journal of plant nutrition* **18**: 1751-1763
- Kaur, S., Nicolas, M., Ford, R., Norton, R., Taylor, P. (2006). Selection of Brassica rapa genotypes for tolerance to boron toxicity. *Plant and Soil* **285**: 115-123
- Kaya, C., Tuna, A.L., Dikilitas, M., Ashraf, M., Koskeroglu, S., Guneri, M. (2009). Supplementary phosphorus can alleviate boron toxicity in tomato. *Scientia Horticulturae* **121**: 284-288
- Kishor, P.K., Sangam, S., Amrutha, R., Laxmi, P.S., Naidu, K., Rao, K., Rao, S., Reddy, K., Theriappan, P., Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* **88**: 424-438
- Lovatt, C.J., Bates, L.M. (1984). Early effects of excess boron on photosynthesis and growth of *Cucurbita pepo*. *Journal of Experimental Botany* **35**: 297-305
- Martínez-Cuenca, M.-R., Martínez-Alcántara, B., Quiñones, A., Ruiz, M., Iglesias, D.J., Primo-Millo, E., Forner-Giner, M.Á. (2015). Physiological and Molecular Responses to Excess Boron in *Citrus macrophylla* W. *PloS one* **10**: e0134372
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668
- McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *Biological Chemistry* **244**: 6056-6063
- McCue, K.F., Hanson, A.D. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology* **8**: 358-362

- Miyake, C., Yokota, A. (2000). Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water-water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **41**: 335-343
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., Therios, I. (2006). Boron induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM 9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental and Experimental Botany* **56**: 54-62
- Nable, R.O., Bañuelos, G.S., Paull, J.G. (1997). Boron toxicity. *Plant and Soil* **193**: 181-198
- Nakano, Y., Asada, K. (1987). Purification of Ascorbate Peroxidase in Spinach chloroplasts. Its inactivation in Ascorbate depleted medium and reactivation by Monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology* **28**: 131-140
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* **153**: 375-380
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C.H. (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* **89**: 841-850
- Öztürk, L., Demir, Y. (2002). In vivo and in vitro protective role of proline. *Plant Growth Regulation* **38**: 259-264
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Giannakoula, A. (2004a). Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant Science* **166**: 539-547
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Giannakoula, A. (2004b). Effects of B excess on some physiological and anatomical parameters of 'Navelina' orange plants grafted on two rootstocks. *Environmental and Experimental Botany* **51**: 247-257
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Therios, I.N. (2003). Response of two citrus genotypes to six boron concentrations: concentration and distribution of nutrients, total absorption, and nutrient use efficiency. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**: 571-580
- Parvaiz, A., Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants a review. *Plant Soil and Environment* **54**: 89-99
- Peñuelas, J., Filella, I. (1998). Visible and near infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status. *Trends in plant science* **3**: 151-156
- Perez-Perez, J.G., Syvertsen, J.P., Botia, P., Garcia-Sanchez, F. (2007). Leaf water relations and net gas exchange responses of salinized Carrizo citrange seedlings during drought stress and recovery. *Annals of Botany* **100**: 335-345
- Pitman, M.G. (1988). Whole plant. In DA Baker, JL Hall, eds, In Ion Transport in Plant Cells and Tissues. Longman Scientific & Technical, Harlow, U.K, pp 346-391
- Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R., Graham, R.D. (2004). A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1405-1414

- Rhodes, D., Hanson, A. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual review of plant biology* **44**: 357-384
- Rhodes, D., Verslues, P.E., Sharp, R.E. (1999). Role of amino acids in abiotic stress resistance. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology* **12**: 319-356
- Rivero, R., Ruiz, J., Romero, L. (2004). Importance of N source on heat stress tolerance due to the accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in tomato plants. *Plant Biology* **6**: 702-707
- Robinson, S., Jones, G. (1986). Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Functional Plant Biology* **13**: 659-668
- Ruuska, S.A., Badger, M.R., Andrews, T.J., von Caemmerer, S. (2000). Photosynthetic electron sinks in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco: little evidence for significant Mehler reaction. *Journal of Experimental Botany* **51**: 357-368
- Serraj, R., Sinclair, T. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell & Environment* **25**: 333-341
- Sheng, O., Zhou, G., Wei, Q., Peng, S., Deng, X. (2010). Effects of excess boron on growth, gas exchange, and boron status of four orange scion rootstock combinations. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **173**: 469-476
- Simón, I. (2012). Estudio de la tolerancia a la salinidad, toxicidad por boro e inundación en plantas de *Jatropha curcas* L. Univesidad Miguel Hernández
- Somogy, A.I. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* **195**: 19
- Sotiropoulos, T.E., Therios, I.N., Dimassi, K.N. (1999). Calcium application as a means to improve tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **81**: 443-449
- Stiles, A.R., Bautista, D., Atalay, E., Babaoğlu, M., Terry, N. (2010). Mechanisms of boron tolerance and accumulation in plants: A physiological comparison of the extremely boron-tolerant plant species, *Puccinellia distans*, with the moderately boron-tolerant *Gypsophila arrostil*. *Environmental science & technology* **44**: 7089-7095
- Takano, J., Miwa, K., Fujiwara, T. (2008). Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in plant science* **13**: 451-457
- Torun, A.A., Yazici, A., Erdem, H., ÇAKMAK, İ. (2006). Genotypic variation in tolerance to boron toxicity in 70 durum wheat genotypes. *Turkish journal of agriculture and forestry* **30**: 49-58
- Torun, B., Kalayci, M., Ozturk, L., Torun, A., Aydin, M., Cakmak, I. (2002). Differences in Shoot Boron Concentrations, Leaf Symptoms, and Yield of Turkish Barley Cultivars Grown on Boron-Toxic Soil in Field. *Journal of plant nutrition* **26**: 1735-1747

- Weimberg, R., Lerner, H., Poljakoff-Mayber, A. (1984). Changes in growth and water-soluble solute concentrations in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium salts. *Physiologia plantarum* **62**: 472-480
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222
- Yang, S.-H., Wang, L.-J., Li, S.-H., Duan, W., Loescher, W., Liang, Z.-C. (2007). The effects of UV-B radiation on photosynthesis in relation to Photosystem II photochemistry, thermal dissipation and antioxidant defenses in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings at different growth temperatures. *Functional Plant Biology* **34**: 907-917
- Yang, W.-J., Rich, P.J., Axtell, J.D., Wood, K.V., Bonham, C.C., Ejeta, G., Mickelbart, M.V., Rhodes, D. (2003). Genotypic variation for glycinebetaine in sorghum. *Crop Science* **43**: 162-169
- Yokota, H., Konishi, S. (1990). Effect of the formation of a sugar-borate complex on the growth inhibition of pollen tubes of *Camellia sinensis* and cultured cells of *Nicotiana tabacum* by toxic levels of borate. *Soil Science and Plant Nutrition* **36**: 275-281



Capítulo 4

**Estudio de la Tolerancia de
los Portainjertos Citrange
Carrizo, Mandarino
Cleopatra y Forner-
Alcaide nº 5 a la Toxicidad
por Boro**

Hernández

4.1. Introducción

El cultivo de los cítricos en el levante español puede sufrir distintos tipos de estrés abiótico, como: salinidad y alcalinidad de los suelos, heladas, sequía, altas temperaturas, etc. También, son susceptibles al ataque de numerosas plagas y enfermedades provocadas por hongos, bacterias, spiroplasmas, fitoplasmas, virus, viroides y otros agentes patógenos de etiología desconocida. Además, la aparición de nuevas enfermedades como el HLB (enfermedad Huanglongbing, también conocida como enverdecimiento de los cítricos), o nuevos problemas medioambientales, como es el exceso de boro en las aguas de riego, está obligando a realizar cambios importantes en la citricultura, fundamentalmente la sustitución de los portainjertos tradicionales por otros tolerantes a dichas situaciones. Esto hace necesario el establecimiento de programas de mejora genética, para obtener nuevos genotipos más resistentes a estreses tanto bióticos como abióticos, y que proporcionen fruta de mayor calidad. Sin embargo, la mejora genética de plantas leñosas, es un proceso muy lento, por lo que es ahora cuando se empiezan a obtener los primeros resultados.

Como ya hemos visto en el capítulo anterior de esta memoria, los tres portainjertos de cítricos más utilizados en España (naranja Amarga, *Citrus macrophylla* y citrange Carrizo) difieren en su tolerancia al exceso de boro en el agua de riego. De los tres, citrange Carrizo es el que peor se adapta al exceso de boro. Sin embargo, en condiciones normales de cultivo con aguas de buena calidad es uno de los portainjertos que dan mejor resultado en cuanto a la producción, calidad de la fruta, longevidad de los árboles, etc.

El programa de mejora del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) obtuvo un híbrido combinando el citrange Carrizo (híbrido entre *Poncirus trifoliata* [L.] Raf. × *Citrus sinensis* L.) con el mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* L.) llamado Forner-Alcaide nº 5. Este nuevo portainjerto, obtenido por primera vez en 1978, se caracteriza por: i) ser resistente al virus de la tristeza y al nematodo de los cítricos *Tylenchulus semipenetrans* Cobb.; ii) poseer buena resistencia a los hongos del género *Phytophthora*; iii) ser más tolerante que el citrange Carrizo a la caliza, a la salinidad y al encharcamiento; iv) puede ser calificado entre semienanizante y subestándar; v) los árboles establecidos sobre este patrón alcanzan una altura menor que los injertados sobre los patrones convencionales actualmente utilizados (los citranges Troyer y Carrizo, mandarino Cleopatra, etc.), lo que supone una reducción de los gastos de poda, de tratamientos

fitosanitarios y de recolección, mejorando la rentabilidad de los huertos; vi) el injerto y el patrón alcanzan diámetros similares en la unión; vii) la productividad de las variedades injertadas es muy alta y la calidad de la fruta excelente; y viii) la maduración se adelanta ligeramente respecto a la inducida por el citrange Carrizo.

Sin embargo, aún no se ha caracterizado el comportamiento que tendría este portainjerto cuando se riega con aguas que sobrepasan la concentración de boro idónea para los cítricos. Es por ello, que se planteó un experimento para estudiar y comparar la tolerancia relativa al exceso de boro de este portainjerto con sus progenitores, citrange Carrizo y mandarino Cleopatra (concentraciones de boro: 0,25 (control), 5 y 10 mg L⁻¹). Para evaluar el comportamiento de las plantas se realizaron medidas de parámetros de crecimiento, intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas, nutrición mineral, solutos orgánicos y carbohidratos en los diferentes tejidos de la planta, y medidas del metabolismo antioxidante.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Material Vegetal

Para realizar este experimento se usaron plantas de 0,5 m de altura de los portainjertos citrange Carrizo (híbrido entre *Poncirus trifoliata* [L.] Raf. × *Citrus sinensis* L.), mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* [L.] Hort. ex Tan.) y Forner-Alcaide nº 5 (híbrido de mandarino Cleopatra por *Poncirus trifoliata* [L.] Raf., obtenido en 1978) adquiridos en un vivero comercial (vivero comercial Vivercitrus 2000, S.L., España) con su certificado y su etiqueta oficial de calidad (Imagen 4.1). De todas las plantas adquiridas en el vivero, las plántulas se seleccionaron basándose en la uniformidad de la altura. Una vez realizada la selección, se procedió al trasplante a macetas cuadradas de 7 L de volumen con sustrato universal de granulometría fina, libre de patógenos y de semillas de malas hierbas con una composición basada en una mezcla de turba rubia y negra, fibra de coco y perlita (5:4:1 Projar, España).



Imagen 4.1. Vista parcial del vivero comercial (Vivercitrus 2000, S.L., España) donde se obtuvieron los plantones y etiqueta oficial del certificado de calidad de los mismos.

4.2.2. Descripción del invernadero y condiciones de cultivo

El experimento se realizó en la finca experimental del CEBAS situada en La Matanza, en el término municipal de Santomera (a 18 km de Murcia), en un invernadero cuya descripción se encuentra en el apartado “3.2.1. Descripción del invernadero y condiciones del cultivo”. Durante el experimento, desde Mayo a Septiembre del 2013 (incluyendo el período de aclimatación), las condiciones climáticas fueron las siguientes: temperatura del aire (media, mínima y máxima) = 24,4/12,5/32,9 °C; humedad relativa (media, mínima y máxima) = 65/52/94,7%; irradiación (media, mínima y máxima) = 388/127/588 W m⁻² (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Valores medios, mínimos y máximos de temperatura (T^a), humedad relativa (HR) e irradiación en el interior del invernadero durante el experimento.

| | T ^a (°C) | | | HR (%) | | | Irradiación (W m ⁻²) | | |
|-------------|---------------------|------|------|--------|------|------|----------------------------------|-----|-----|
| | Med | Min | Max | Med | Min | Max | Med | Min | Max |
| 2013 | | | | | | | | | |
| Mayo | 20,2 | 12,5 | 28,6 | 67,3 | 53,3 | 91,5 | 325 | 122 | 400 |
| Junio | 22,1 | 16,4 | 29,7 | 68,2 | 59,2 | 86,7 | 358 | 135 | 440 |
| Julio | 26,4 | 20,8 | 32,9 | 64,7 | 52,6 | 92,2 | 410 | 131 | 533 |
| Agosto | 27,4 | 22,3 | 32,4 | 65,1 | 52,0 | 94,7 | 431 | 135 | 588 |
| Septiembre | 26,1 | 21,2 | 28,9 | 64,6 | 52,6 | 92,4 | 418 | 127 | 538 |

4.2.3. Concentraciones de boro en la solución nutritiva

Una vez realizado el trasplante de las plantas a macetas de 7 L, estas se regaron una vez por semana con agua procedente del trasvase Tajo-Segura durante 2 semanas. Después de este período de tiempo, las plántulas se regaban tres veces por semana con solución nutritiva Hoagland (ya descrita en el apartado “3.2.1. Descripción del invernadero y condiciones del cultivo”). El riego se aplicaba mediante un sistema de goteros autocompensantes de 4 L h^{-1} con un volumen de riego suficiente para que se produjera un 15% de volumen drenado en cada evento de riego. Tras un mes en estas condiciones, se realizaron medidas de fotosíntesis y fluorescencia de clorofilas, y se cosecharon hojas de los tres portainjertos (citrange Carrizo, CC; mandarina Cleopatra, CL; y Forner-Alcaide nº 5, F5) para establecer cómo se encontraban las plantas al inicio del experimento (día 0). Posteriormente se iniciaron los diferentes tratamientos de B adicionando a la solución nutritiva de cada tratamiento la siguiente concentración de boro (Imagen 5.3):

- **Control o B0** ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de B procedente del complejo de micronutrientes Kelkat, Atlántica Agrícola S.L.)
- **B5** (5 mg L^{-1} de B aplicado como ácido bórico; H_3BO_3).
- **B10** (10 mg L^{-1} de B aplicado como ácido bórico; H_3BO_3).



Imagen 4.2. Vista parcial del sistema de riego y de las cubas con los distintos tratamientos de B (**B0 o control**: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$; **B5**: 5 mg L^{-1} ; y **B10**: 10 mg L^{-1}) que se emplearon para el experimento.

Durante el experimento se realizando medidas periódicas de parámetros de intercambio gaseosos y se tomaron muestras de hojas. Al final del experimento todas las plantas fueron cosechadas por completo.

4.2.4. Determinaciones analíticas

4.2.4.1. *Parámetros de crecimiento*

Al final del experimento se cosecharon las plantas separando y pesando las hojas, tallo y raíz de cada planta individualmente (8 plantas por tratamiento) mediante una balanza de precisión electrónica portátil. Cada una de estas partes se introdujo en una estufa a 65 °C durante 3-4 días, previamente lavadas con abundante agua destilada. Una vez seco el material vegetal, se volvió a pesar para conocer el peso seco de cada uno de los tejidos de la planta. A partir del peso seco foliar, tallo y raíz, se calculó la biomasa total (BT = peso seco hoja + peso seco tallo + peso seco raíz) y la relación parte aérea:raíz ((peso seco hoja + peso seco tallo)/peso seco raíz).

4.2.4.2. *Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas*

Al inicio del experimento (día 0), durante y al final del mismo, se midieron los parámetros de intercambio gaseoso y de fluorescencia de clorofilas, tal y como se describen en los apartados “3.2.4.2. *Parámetros de intercambio gaseoso* y 3.2.4.3. *Parámetros de fluorescencia de clorofilas*”.

4.2.4.3. *Determinación de la concentración de nutrientes minerales*

Para estudiar cómo evolucionó la concentración de B_{foliar} y determinar al final del experimento la concentración del resto de nutrientes en hojas y raíz), se analizaron las muestras cosechadas tal y como se describe en el apartado “3.2.4.4. *Determinación de la concentración de nutrientes minerales*”.

4.2.4.4. *Determinación de la concentración de prolina, compuestos amoniocuaternarios (CAQ) y carbohidratos*

En las muestras, una vez secas y molidas, se midió la concentración de prolina, CAQ y carbohidratos, tal y como se describe en los apartados “3.2.4.5. *Determinación de la concentración de prolina*”, “3.2.4.6. *Determinación de la concentración de compuestos de amonio cuaternarios (CAQ)*” y “3.2.4.7. *Determinación de la concentración de carbohidratos*”.

4.2.4.5. *Determinación del metabolismo antioxidante en hoja*

Al final del experimento, se tomaron muestras de hojas en fresco para analizar productos relacionados con el estrés oxidativo, tales como: H_2O_2 y MDA, cuantificadas tal y como se describe en el apartado “3.2.4.8.1. *Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de malonildialdehído (MDA)*”; y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, tales como: CAT, APX, GR y SOD cuantificadas tal y como se describe en el apartado “3.2.4.8.2. *Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes*”.

4.2.5. Análisis estadístico

El diseño experimental de este ensayo fue bifactorial con tres tipos de portainjertos (citrango Carrizo, CC; mandarino Cleopatra, CL; y Forner-Alcaide nº 5, F5) \times tres tratamientos de boro (0,25 (control), 5 y 10 mg L⁻¹), con 8 plantas para cada combinación Portainjerto \times Boro, que estaban distribuidas al azar en las mesas de cultivo del invernadero ($n=8$). El análisis estadístico incluyó un ANOVA bifactorial (Portainjerto \times Boro) mediante el paquete estadístico SPSS versión 19. Cuando en el ANOVA resultó significativo ($P<0.05$), se aplicó el test de rangos múltiples de Duncan para la separación de medias entre los diferentes tratamientos. Los valores que se presentan en las tablas y figuras para cada tratamiento son las medias de 8 plantas seguidas del error estándar de la media (\pm ES). En el caso de las figuras y tablas, cuando la interacción Portainjerto \times Boro fue significativa, para cada portainjerto las *letras minúsculas* (a,b,c para Carrizo; d,e,f para Cleopatra; x,y,z para Forner-Alcaide nº 5) indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos de boro establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan.

4.3. Resultados

4.3.1. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro

En los tres portainjertos (CC, CL y F5), los síntomas de toxicidad por B comenzaron por un amarilleamiento del ápice y de los bordes de las hojas, seguido de quemaduras y posterior caída prematura de las mismas. En general, esa necrosis fue tanto apical como marginal (Imagen 4.3). A los 36 días de experimento, las plantas regadas con 10 mg L⁻¹ de B, independientemente del portainjerto, mostraron síntomas de toxicidad en las hojas basales. Por la misma fecha, también se empezó a apreciar una

clorosis en las hojas de F5 regadas con 5 mg L^{-1} de B. A los 45 días de riego, las plantas restantes, CC/ 5 mg L^{-1} y CL/ 5 mg L^{-1} de B, mostraron ya síntomas de toxicidad por boro, siendo más severos en citrange Carrizo que en mandarina Cleopatra.

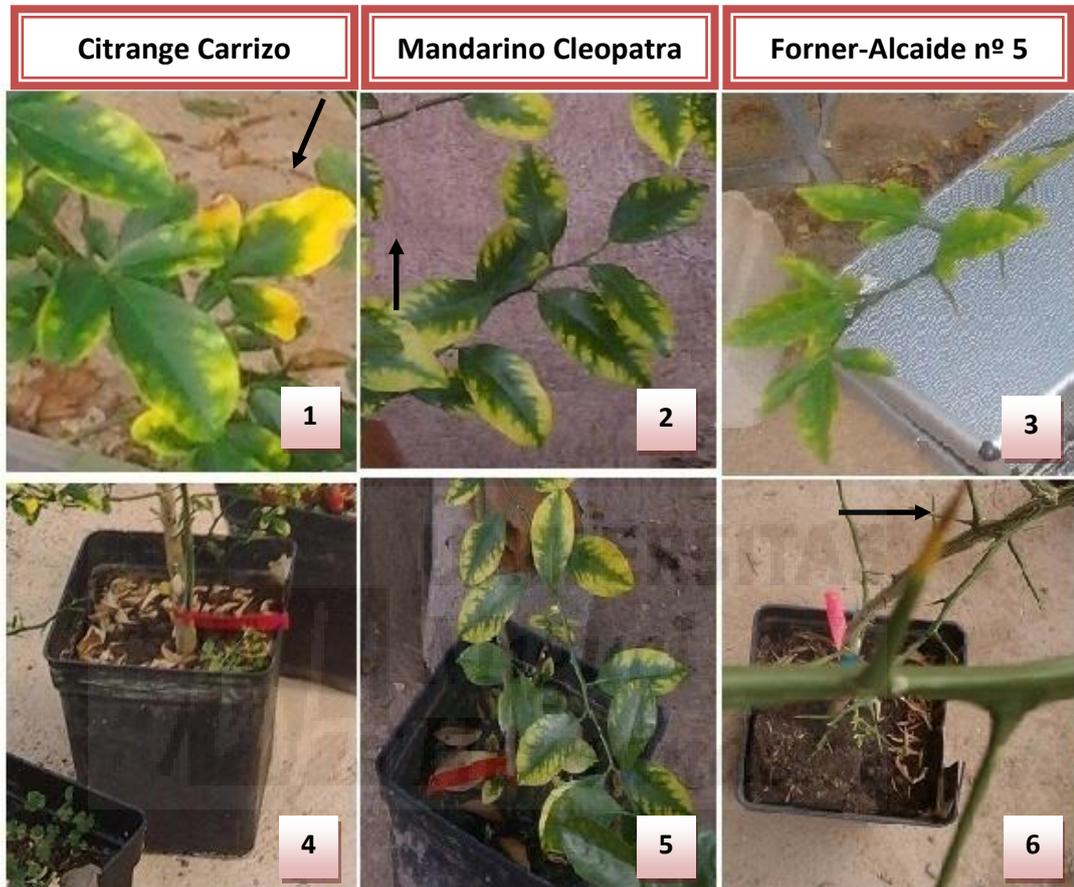


Imagen 4.3. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro en citrange Carrizo (1 y 4), mandarina Cleopatra (2 y 5) y Forner-Alcaide n° 5 (3 y 6). 1, 2 y 3: amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja. 1 y 6: quemaduras (flechas negras). 4, 5 y 6: Necrosis y defoliación prematura.

4.3.2. Parámetros de crecimiento

En la figura 4.1 se muestran los resultados obtenidos para la biomasa seca total, así como para el peso seco de hoja, tallo y raíz, y la relación parte aérea:raíz de los tres portainjertos estudiados. Comenzando por las plantas control (sin exceso de boro en la solución nutritiva), se observó que el portainjerto citrange Carrizo fue el que presentó la mayor biomasa total (261,3 g ps), seguida del híbrido Forner n° 5 (158 g ps), y por último mandarina Cleopatra (128,6 g ps). Los tratamientos con boro afectaron a las plantas de citrange Carrizo, reduciendo su biomasa total en un 20% para las regadas con 5 mg L^{-1} de B y en un 47% para las de 10 mg L^{-1} de B; el

tratamiento de 10 mg L⁻¹ también afectó a la biomasa seca total de la plantas de F5 reduciendo este parámetros hasta el valor de 124,6 g ps. Por su parte, el portainjerto CL no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Figura 4.1).

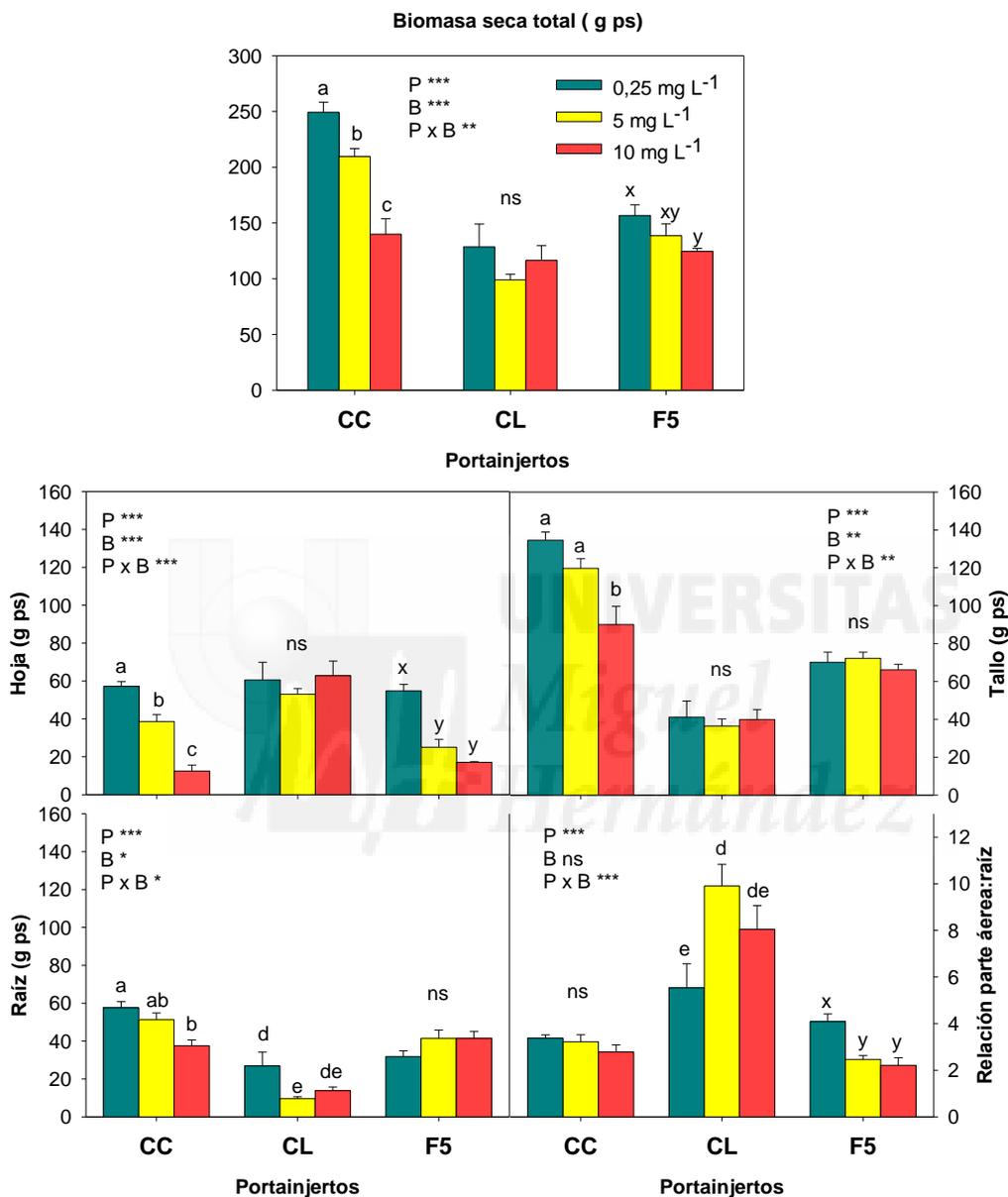


Figura 4.1. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la biomasa seca total, foliar, tallo y radicular y relación parte aérea:raíz en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) a los 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

En cuanto a la biomasa foliar, los tres portainjertos en condiciones control mostraron valores muy similares dentro del rango de 54-60 g ps (Figura 4.1).

Después de 83 días de riego con exceso de B, las plantas de CC y F5 vieron reducida su biomasa foliar; CC la redujo en un 32% y 78% para 5 y 10 mg L⁻¹ de B, respectivamente, y F5 en un 54% y 71%, respectivamente (Figura 4.1). Las plantas de CL regadas con B, no mostraron diferencias significativas con respecto a su control.

Respecto al tallo, se observa en la figura 4.1 como las plantas control que mostraron el valor más alto fueron las pertenecientes al portainjerto citrange Carrizo (134,5 g ps), seguidas de las Forner n° 5 (71,4 g ps) y mandarino Cleopatra (41,1 g ps). Los tratamientos con B afectaron a CC que vio reducido este parámetro en un 11% en las plantas regadas con 5 mg L⁻¹ de B y en un 33% en las regadas con 10 mg L⁻¹ de B; por su parte, CL y F5 tratadas con B no mostraron diferencias significativas con respecto a sus respectivos controles (Figura 4.1).

Por último, en lo referente a la biomasa radicular, se observó que de nuevo en las plantas control el portainjerto carrizo Citrange fue el que presentó el valor más alto (69,6 g ps), seguido de Forner n° 5 (31,8 g ps) y de mandarino Cleopatra (26,89 g ps). En las plantas de CC, tras los 83 días de ser regadas con exceso de B, el tratamiento que más afectó al crecimiento radicular fue el de 10 mg L⁻¹ de B, reduciéndolo en un 50% respecto al control; sin embargo, las plantas de CL/5 mg L⁻¹ y CL/10 mg L⁻¹ de B redujeron el crecimiento en un 64%, ambas con respecto al control. En las planta F5 no hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos de B (Figura 4.1).

Observando los resultados obtenidos en la figura 4.1, se puede comprobar cómo en el caso del portainjerto citrange Carrizo la disminución de la biomasa total, independientemente de la dosis de boro aplicada, fue a consecuencia de una disminución tanto de la parte aérea (hojas + tallo) como de la radicular, por lo que la relación parte aérea:raíz no se alteró. En el caso de mandarino Cleopatra, el boro afectó a la raíz pero no a la parte aérea lo que originó que la relación parte aérea:raíz aumentará a consecuencia del exceso de B (Figura 4.1). Por el contrario, en las plantas del portainjerto Forner n° 5, sí se vio afectada su biomasa folia, pero no la raíz; en consecuencia, la relación parte aérea:raíz en estas plantas regadas con exceso de B se redujo con respecto a la de las plantas control (Figura 4.1).

4.3.3. Concentración boro en los diferentes tejidos de las plantas

En los tres portainjertos estudiados, el empleo de aguas con exceso de B (5 y 10 mg L⁻¹) supuso un incremento gradual en la concentración de B_{foliar} a lo largo de todo el experimento, como se puede ver en la figura 4.2. En condiciones de no estrés (sin B), se observó que los tres portainjertos se movieron en valores estables de boro en hojas (B_{foliar}) entre 32-53 mg kg⁻¹ ps a lo largo de los 83 días de experimento.

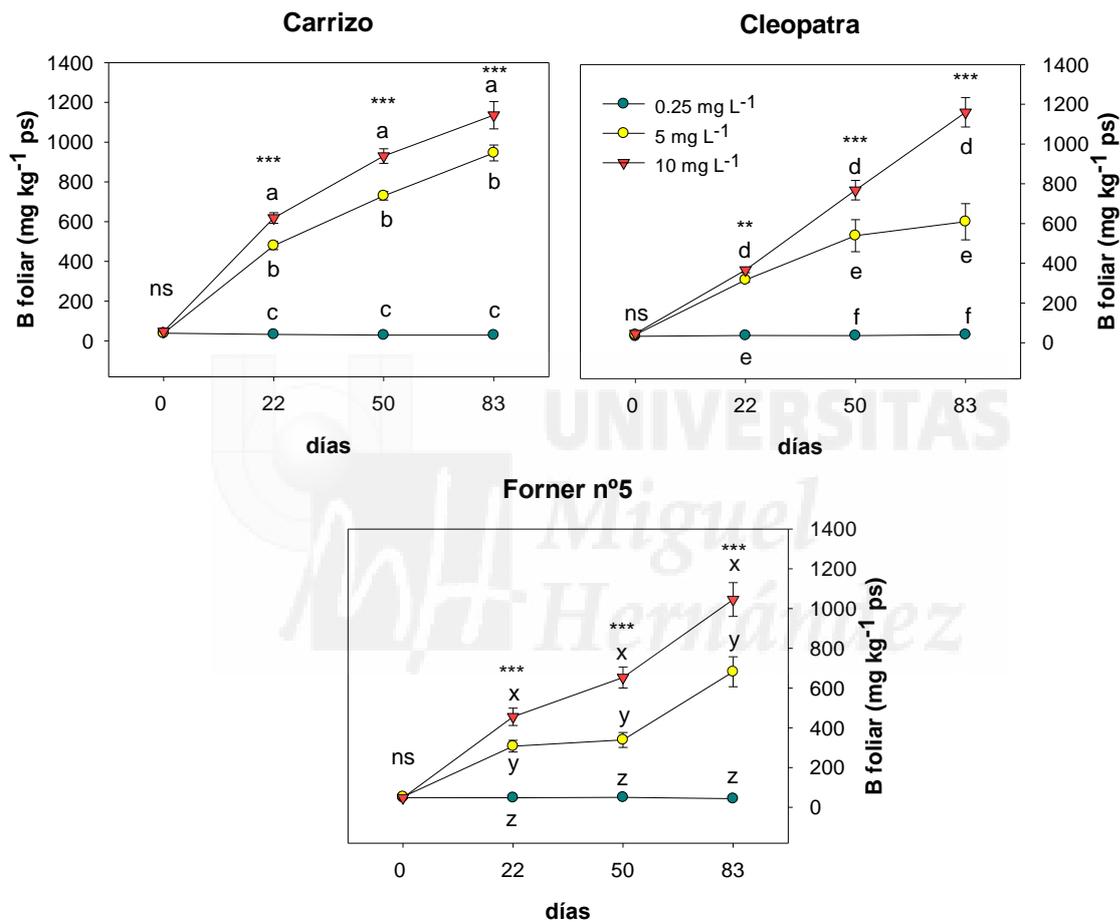


Figura 4.2. Evolución de la concentración de B_{foliar} en respuesta al exceso de B en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide nº 5 durante los 83 días que duró el experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para P<0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media (n=8).

Tabla 4.2. Análisis de la varianza de la concentración de B_{foliar} para los factores: portainjerto, tratamientos de boro (B) y su interacción.

| Factor Principal | ANOVA - B foliar (mg kg ⁻¹ ps) | | | |
|---------------------|---|---------|---------|---------|
| | 0 días | 22 días | 50 días | 83 días |
| Portainjerto | ns | *** | *** | * |
| Boro | ns | *** | *** | *** |
| Port. × Boro | ns | *** | *** | * |

“ns” indica significa diferencias no significativas al 95% (n=8); * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente.

Por su parte, como era de esperar, en las plántulas con exceso de B fue donde se observaron las diferencias entre portainjertos (Figura 4.2). A los 22 días de experimento, las plantas de mandarina Cleopatra regadas con exceso de B, independientemente de la dosis empleada, no presentaron valores superiores a los $400 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ de B_{foliar} , al igual que ocurrió con las plantas de F5/5 mg L^{-1} de B ($307 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$). Las plantas de Forner n° 5 regadas con agua que contenían 10 mg L^{-1} de B, presentaron una concentración de B_{foliar} en torno a los $455 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ (Figura 4.2). Citrange Carrizo, por su parte, fue el portainjerto que presentó los valores más altos de B_{foliar} por esa fecha, siendo una concentración de $480 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ para las plantas CC/5 mg L^{-1} y de $620 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ para las CC/10 mg L^{-1} (Figura 4.2).

A los 50 días de experimento, en la figura 4.2, se observó como las plantas de citrange Carrizo regadas con 5 y 10 mg L^{-1} de B volvieron a ser las que presentaron la mayor concentración de B_{foliar} (730 y $930 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$, respectivamente). Mandarino Cleopatra sufrió un incremento bastante pronunciado del B_{foliar} durante este periodo, pasando a alcanzar los $539 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ en las plantas regadas con 5 mg L^{-1} de B y los $768 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ en las regadas con 10 mg L^{-1} de B (Figura 4.2). Por último, se observó que las plantas de Forner n° 5, tanto las regadas con 5 mg L^{-1} como las de 10 mg L^{-1} de B, fueron las que menos incrementaron la concentración de B_{foliar} respecto a la cosecha anterior, presentando valores de 339 y $653 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$, respectivamente (Figura 4.2).

Al final del experimento, tras 83 días de tratamientos con exceso de B, se mantuvo estas diferencias en la concentración de B_{foliar} en los tres portainjertos, siendo ese incremento mayor en las plantas regadas con 10 mg L^{-1} de B que en las regadas con 5 mg L^{-1} de B, independientemente del portainjerto (Figura 4.2). En el portainjerto citrange Carrizo las plantas regadas con 5 y 10 mg L^{-1} de B alcanzaron valores de B_{foliar} de $945,8$ y $1135,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$, respectivamente, es decir,

incrementaron su concentración aproximadamente unas 32 y 38 veces más que su control (29,57 mg de B kg⁻¹ ps), respectivamente. Por su parte, las plantas de mandarina Cleopatra regadas con 5 y 10 mg L⁻¹ de B alcanzaron valores de B_{foliar} de 608,1 y 1154,5 mg kg⁻¹ ps, respectivamente; así que, incrementaron su concentración aproximadamente unas 15 y 28 veces más que su control (41,22 mg kg⁻¹ ps de B_{foliar}), respectivamente. Por último, las plantas del híbrido Forner n° 5 regadas con 5 y 10 mg L⁻¹ de B alcanzaron valores de B_{foliar} de 681,9 y 1045,3 mg kg⁻¹ ps, respectivamente; por lo que, incrementaron su concentración aproximadamente unas 16 y 24 veces más que su control (43,90 mg de kg⁻¹ ps de B_{foliar}), respectivamente.

Respecto al tallo, las plantas control que mostraron los valores más bajo de B fueron las de citrange Carrizo (14,8 mg kg⁻¹ ps); por su parte, mandarina Cleopatra y Forner n° 5 mostraron los valores más altos en torno a los 28,8 y 28,53 mg kg⁻¹ ps de B, respectivamente (Figura 4.3).

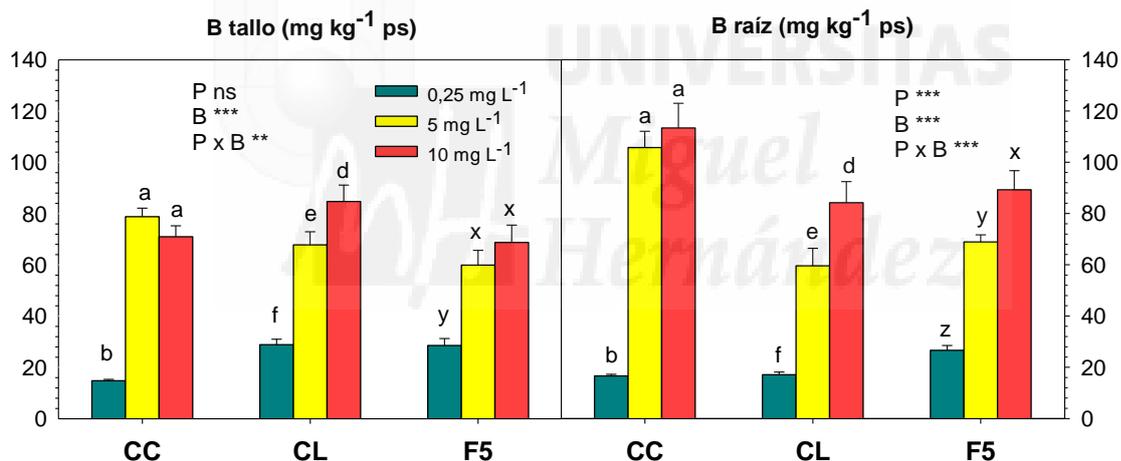


Figura 4.3. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de boro en tallo y raíz en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide n° 5 (F5) a los 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.01$ y 0.001 , respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

En el portainjerto mandarina Cleopatra, se observó que los dos tratamientos con B afectaron a la concentración de este elemento en el tallo; mientras que el tratamiento con 5 mg L⁻¹ lo incrementó hasta 2 veces más que el control, el tratamiento de 10 mg L⁻¹ lo incremento en 3 veces más (Figura 4.3). En el caso de citrange Carrizo y Forner n° 5, la concentración de boro en el tallo fue similar para

los dos tratamientos con exceso de B, siendo para citrange Carrizo una media de 74,89 mg kg⁻¹ ps mientras que para Forner n° 5 fue de 64,35 mg kg⁻¹ ps (Figura 4.3).

Por último, en relación a la concentración de B_{radicular}, se observó en el tratamiento control que los portainjertos con los valores más bajos fueron portainjerto CC (16,6 mg kg⁻¹ ps) y CL (17,1 mg kg⁻¹ ps); F5, por su parte, mostró el valor más alto en torno a los 27 mg kg⁻¹ ps de B_{radicular} (Figura 4.3). En el patrón mandarina Cleopatra y en su híbrido Forner n° 5, se observó que los dos tratamientos con B afectaron a la concentración radicular de este elemento incrementándolo de manera proporcional a la concentración de solución nutritiva (Figura 4.3). Las plantas CL/5 mg L⁻¹ y CL/10 mg L⁻¹ de B incrementaron hasta 3 y 5 veces, respectivamente, en comparación a su control; mientras que las plantas F5/5 mg L⁻¹ y F5/10 mg L⁻¹ de B la incrementaron hasta 2 y 3 veces más, respectivamente, que su control (Figura 4.3). En el caso de las plantas de citrange Carrizo, el exceso de B incrementó en 6 veces este elemento con respecto a su control en los dos tratamientos (Figura 4.3). De lo comentado anteriormente, hay que destacar que las hojas fueron el tejido donde más se acumuló el boro, seguidas de la raíz y el tallo (hoja > raíz > tallo).

4.3.4. Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas

A largo del experimento se hicieron medidas de los parámetros de intercambio gaseoso tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y transpiración foliar (E_{leaf}), y con estos datos se calcularon el uso eficaz del agua (UEA= A_{CO2}/E_{leaf}) y la concentración de CO₂ subestomático (C_i). En la tabla 4.3 se indican los datos de todos estos parámetros como media de los valores obtenidos en todos los muestreos para cada portainjerto en el tratamiento control. Se puede observar que el portainjerto que en condiciones control mantuvo una mayor actividad fotosintética fue Forner n° 5 (15,85 μmol m⁻² s⁻¹), seguido de citrange Carrizo (10,04 μmol m⁻² s⁻¹) y, por último, mandarina Cleopatra (8,18 μmol m⁻² s⁻¹). Centrándonos en la transpiración de los portainjertos, observamos que las plantas de Forner n° 5 presentan la tasa de transpiración más alta (4 mmol m⁻² s⁻¹), mientras que las plantas de mandarina Cleopatra y citrange Carrizo la tienen en torno a 3 mmol m⁻² s⁻¹.

Tabla 4.3. Efecto del portainjerto sobre la tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}), la transpiración foliar (E_{leaf}), la conductancia estomática (g_s), el uso eficiente de agua (WUE) y la concentración de CO₂ subestomática (C_i) en plantas del tratamiento control (0,25 mg L⁻¹ de B) en el tramo final del experimento.

| Portainjerto | Tratamiento de 0,25 mg L ⁻¹ de B | | | | |
|---------------------|---|-------------------|----------------|---------|----------------|
| | A _{CO2} | E _{leaf} | g _s | WUE | C _i |
| Citrango Carrizo | 10,04 b | 3,06 b | 185,5 b | 3,42 ab | 236,2 b |
| Mandarino Cleopatra | 8,18 c | 2,96 b | 225,3 b | 3,05 b | 270,1 a |
| Fornier-Alcaide nº5 | 15,85 a | 4,00 a | 362,3 a | 4,03 a | 252,1 ab |
| ANOVA | *** | ** | *** | * | ** |

*** indican diferencias significativas para $P < 0.001$. Para cada columna, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan ($n=6$).

En la figura 4.4 se representan la A_{CO2} y E_{leaf} de cada portainjerto regados con los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B, como porcentaje relativo a los valores del tratamiento control (0,25 mg L⁻¹ de B; tabla 4.3) para cada uno de los días que se hicieron las medidas. Respecto a la evolución de la tasa de asimilación neta de CO₂ y de la transpiración a lo largo de todo experimento, se puede observar como los portainjertos se comportaron de forma diferente ante el exceso de boro en cuanto a la fecha de medida y la disminución de estos parámetros.

A los 22 días de empezar los tratamientos de B, las plantas de citrango Carrizo disminuyeron la transpiración foliar en los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B; mientras que en las otros dos portainjertos no se observaron alteraciones ni en la A_{CO2} ni en la E_{leaf}. A los 50 días es cuando ya se ven afectados notablemente estos parámetros en las plantas de citrango Carrizo y Fornier nº 5, que se intensificaron aún más en las medidas al final del experimento (día 83). En el caso de las plantas de mandarino Cleopatra fue en esta fecha, a los 83 días, donde observamos que la A_{CO2} y E_{leaf} disminuyeron significativamente.

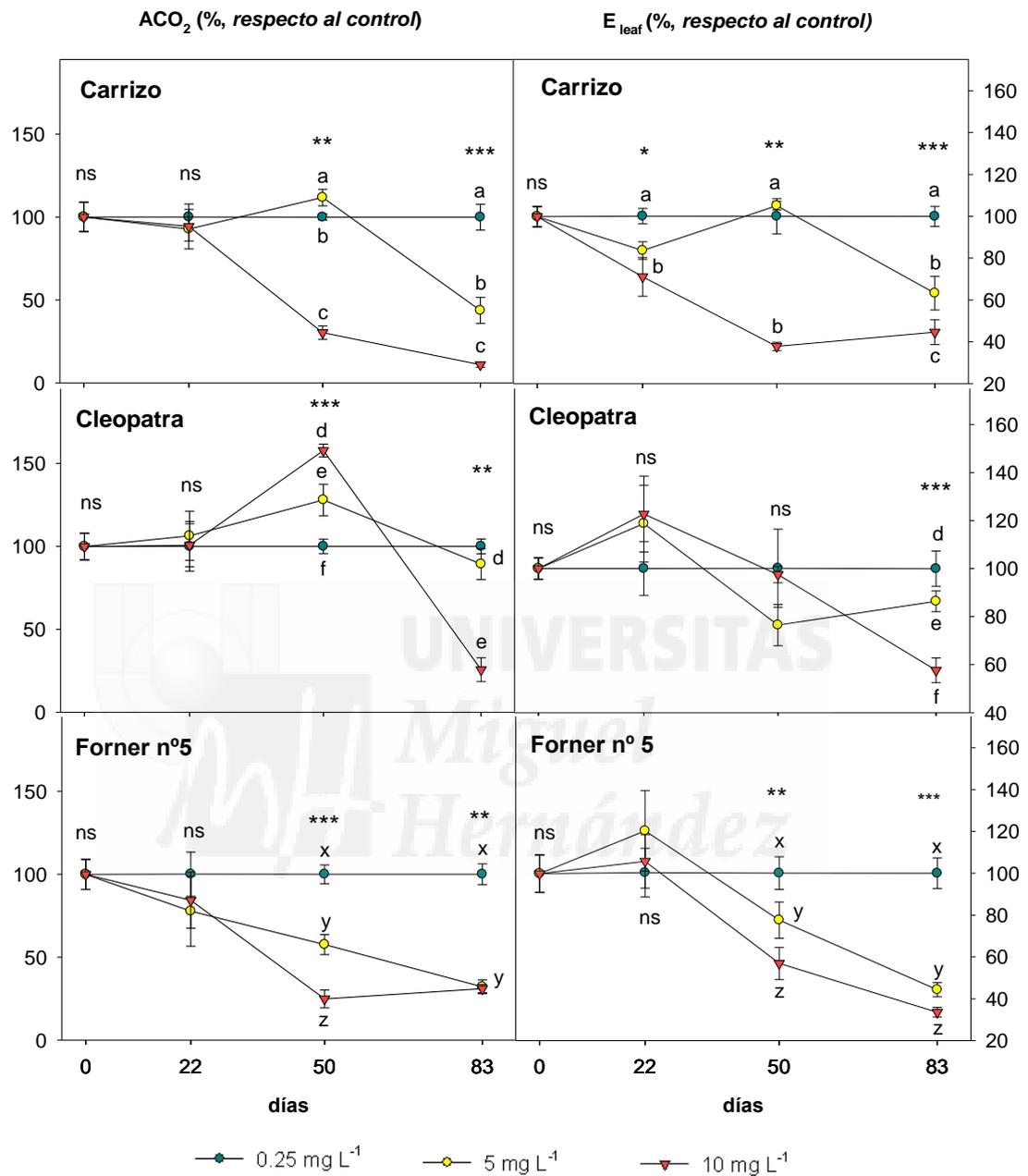


Figura 4.4. Evolución de la tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y en la transpiración en respuesta al exceso de B en citrango Carrizo, mandarino Cleopatra y Forner-Alcaide n° 5 durante los 83 días que duró el experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las *letras minúsculas* a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media (n=6).

Tabla 4.4. Análisis de la varianza de la asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y de la transpiración foliar (E_{leaf}) para los factores: portainjerto, tratamientos de boro (B) y su interacción.

| | 0 días | 22 días | 50 días | 83 días |
|-------------------------|---|---------|---------|---------|
| Factor Principal | ANOVA-Asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) | | | |
| Portainjerto | ns | ns | *** | *** |
| Boro | ns | *** | * | *** |
| Port. × Boro | ns | ns | *** | ** |
| | ANOVA-Transpiración foliar (E_{leaf}) | | | |
| Portainjerto | ns | ns | * | *** |
| Boro | ns | ns | ** | ** |
| Port. × Boro | ns | ns | * | *** |

“ns” significa diferencias no significativas al 95% (n=6); *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente.

Centrándonos en los datos de A_{CO2} que se obtuvieron al final del experimento, se observó que en las plantas sometidas a exceso de B, en CC se vio una disminución del 56% y del 89% para los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B, respectivamente, en comparación con el control (A los 83 días; figura 4.5). Para CL, en los tratamientos control y 5 mg L⁻¹ de B, no se observaron diferencias significativas entre ambos; pero sí de estos con el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B, que vio reducida su A_{CO2} en un 74% con respecto a los otros dos (Figura 4.5). En el portainjerto F5, se vio que el exceso de B afectó de manera drástica a la A_{CO2} disminuyéndola en un 69% en los dos tratamientos.

Para la conductancia estomática (g_s), el portainjerto CC en condiciones de exceso de B, independientemente del tratamiento, vio reducida g_s en un 66% con respecto al control (Figura 4.5). Por su parte CL, no mostró diferencias significativas entre el control y el tratamiento de B intermedio (5 mg L⁻¹); pero si existieron diferencias significativas entre estos y el tratamiento de máximo estrés (10 mg L⁻¹), que redujo este parámetro en un 55% (Figura 4.5). En cambio, F5 mostró una reducción del 48% para el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B y del 82% para el de 10 mg L⁻¹ de B.

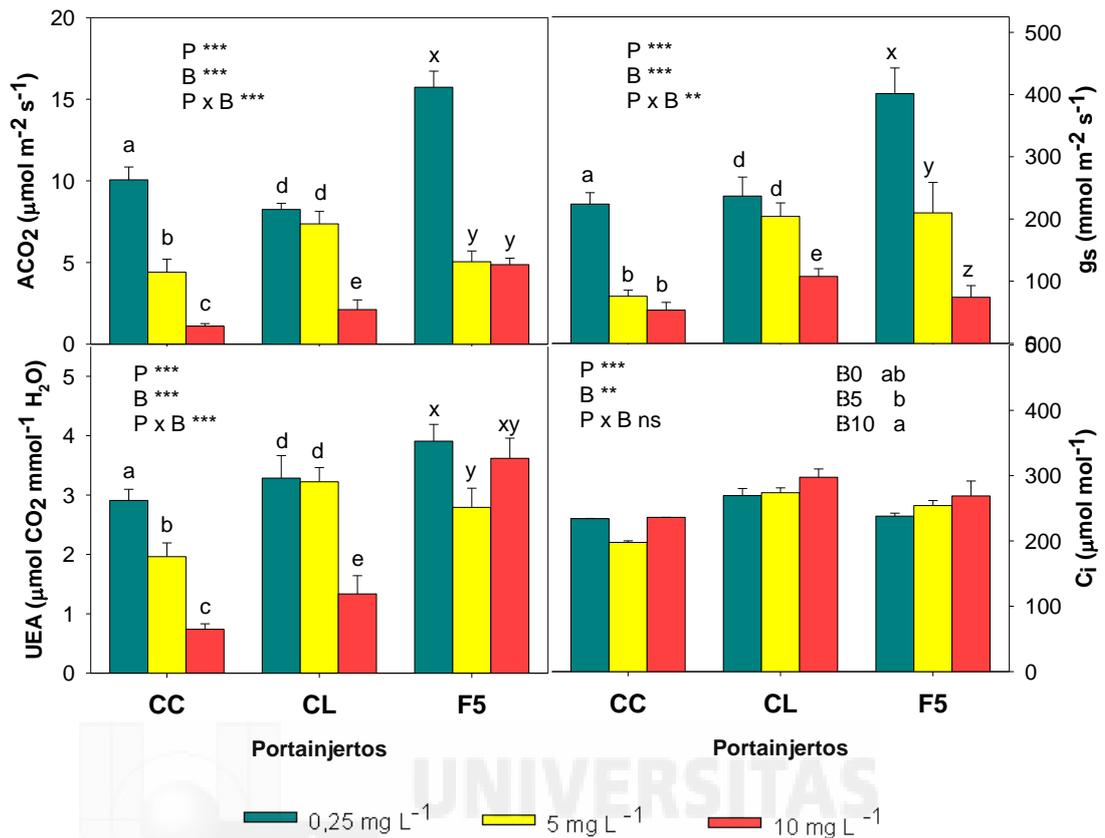


Figura 4.5. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la conductancia estomática (g_s), uso eficiente del agua fisiológico ($UEA_{\text{fisiológico}} = A_{CO_2}/E_{\text{leaf}}$) y concentración de CO_2 subestomático (C_i) en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide n° 5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=6$).

Con respecto al UEA, tras los 83 días con exceso de B, las plantas de citrange Carrizo redujeron este parámetro un 33% y un 75% para los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B, respectivamente (Figura 4.5). En cambio, mandarina Cleopatra solo redujo este parámetro en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B (un 59% respecto al control y a 5 mg L⁻¹); mientras que Forner n° 5 solo redujo su UEA en el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B (un 29% respecto a los otros dos tratamientos; figura 4.5).

En cuanto a la concentración de CO_2 subestomático (C_i), no hubo diferencias significativas para la interacción Portainjerto \times Boro, pero sí para ambos factores de forma independiente (Figura 4.5). El portainjerto que presentó el valor más alto de C_i fue mandarina Cleopatra (280 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), seguido de Forner n° 5 (254 $\mu\text{mol mol}^{-1}$)

y por último citrange Carrizo ($223 \mu\text{mol mol}^{-1}$). En cuanto al tratamiento de B que presentó el valor más alto de CO_2 intercelular fue el de mayor concentración de B (10 mg L^{-1}) con un valor en torno a los $268 \mu\text{mol mol}^{-1}$, por su parte el control y el de 5 mg L^{-1} de B presentaron valores por debajo de los $250 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (Figura 4.5).

En cuanto a los parámetros de fluorescencia estudiados, se observó que para la Φ_{PSII} en condiciones control, el único portainjerto que sobrepasó la barrera de los 0,4 fue citrange Carrizo; mandarina Cleopatra y el híbrido Forner nº 5 se quedaron por debajo (0,352 y 0,394, respectivamente). El tratamiento de B que más afectó a la eficacia fotoquímica del PSII en CL fue el de 10 mg L^{-1} de B, que vio reducido este parámetro a la mitad con respecto a su control; por su parte las plantas de CL regadas con 5 mg L^{-1} de B no mostraron diferencias significativas con el control (Figura 4.6). En el híbrido F5, se comprobó que en el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B aumentó este parámetro en un 28% con respecto al control (Figura 4.6). Por su parte, citrange Carrizo no mostró diferencias significativas entre los tres tratamientos de boro.

Para qP en condiciones control, se observó que los tres portainjertos presentaban valores próximos a 0,63 (CC = 0,679; CL = 0,593; y F5 = 0,609), tal y como muestra la figura 4.6. Una vez finalizada la experiencia, el tratamiento que más afectó al qP en CL fue el de 10 mg L^{-1} de B que vio reducido este parámetro a la mitad con respecto al control (0,264); las plantas de CL regadas con 5 mg L^{-1} de B no mostraron diferencias significativas con el control (Figura 4.6). En F5 se comprobó, al igual que pasaba con Φ_{PSII} , que en el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B aumentó el “Quenching fotoquímico” en un 21% con respecto al control (Figura 4.6). Por el contrario, en las plantas de citrange Carrizo regadas con 5 mg L^{-1} de B, redujeron su valor en un 28% con respecto al control (Figura 4.6).

Por último, en lo referente a la eficiencia de las antenas en el PSII (F_v'/F_m'), se comprobó que los portainjertos con los valores más altos fueron citrange Carrizo (0,688) y Forner nº 5 (0,676); por su parte, mandarina Cleopatra apenas supera el valor de 0,6 (Tabla 4.1), donde los tratamientos de boro no alteraron este parámetro en ningún portainjerto.

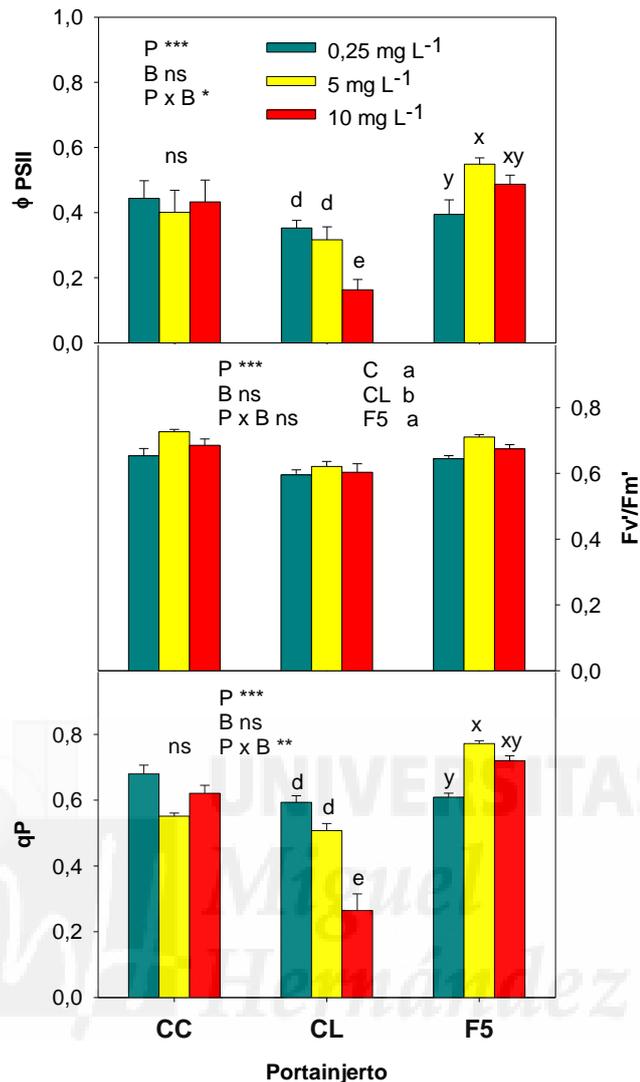


Figura 4.6. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la eficacia fotoquímica del PSII (Φ_{PSII}), la eficiencia de las antenas en el PSII (F_v/F_m') y el coeficiente “Quenching Fotoquímico” (qP) en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide n° 5 (F5) tras 83 días de experimento. “*ns*” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=6$).

4.3.5. Concentración de nutrientes minerales

Como hemos visto en el capítulo anterior en condiciones normales de riego la concentración mineral es diferente según el portainjerto. En general, podemos decir que las plantas de CC y F5 tuvieron mayor concentración foliar de K que CL; y que plantas de CC tuvieron la mayor concentración de P (Tabla 4.5). Al incrementar la concentración de B en la solución nutritiva se incrementó progresivamente la

concentración foliar de Mg, y la concentración de K, aunque en este elemento no hubo diferencias significativas entre 5 y 10 mg L⁻¹ de B (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Efectos de la concentración de boro en la solución nutritiva sobre la concentración de macronutrientes (K, Ca, Mg y P) foliar en citrange Carrizo, mandarino Cleopatra y Forner-Alcaide n° 5 tras 83 días de experimento.

| Factor Principal | | Hoja (mg g ⁻¹ ps) | | | |
|----------------------------|-------------------------|------------------------------|---------|-------|--------|
| | | K | Ca | Mg | P |
| Portainjerto | Carrizo | 22,0 a | 21,4 a | 3,4 | 2,1 a |
| | Cleopatra | 18,5 b | 17,1 b | 3,1 | 1,5 c |
| | Forner n° 5 | 21,5 a | 15,3 b | 3,4 | 1,8 b |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 19,3 b | 17,3 b | 2,9 c | 1,8 ab |
| | 5 mg L ⁻¹ | 20,4 b | 19,5 a | 3,3 b | 1,6 b |
| | 10 mg L ⁻¹ | 22,3 a | 17,0 b | 3,7 a | 2,0 a |
| Portainjerto × Boro | | | | | |
| Carrizo | 0.25 mg L ⁻¹ | 21,8 | 16,8 a | 3,2 | 2,1 b |
| | 5 mg L ⁻¹ | 21,3 | 18,5 a | 3,2 | 1,8 b |
| | 10 mg L ⁻¹ | 23,0 | 10,7 b | 3,8 | 2,5 a |
| Cleopatra | 0.25 mg L ⁻¹ | 15,8 | 19,9 e | 2,6 | 1,5 d |
| | 5 mg L ⁻¹ | 18,8 | 23,7 d | 3,2 | 1,5 d |
| | 10 mg L ⁻¹ | 21,0 | 20,6 de | 3,5 | 1,4 d |
| Forner n° 5 | 0.25 mg L ⁻¹ | 20,3 | 15,1 y | 3,0 | 1,8 x |
| | 5 mg L ⁻¹ | 21,2 | 16,2 y | 3,4 | 1,5 y |
| | 10 mg L ⁻¹ | 22,9 | 19,8 x | 3,8 | 2,1 x |
| Portainjerto | | *** | *** | ns | *** |
| Boro | | ** | * | *** | *** |
| Port. × Boro | | ns | *** | ns | * |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los factores Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones.

Este comportamiento del Mg y K, ante los tratamientos altos de boro no dependieron del portainjerto. Lo que sí sucedió en el caso de Ca y P; así la concentración de Ca disminuyó significativamente para las plantas de citrange CC a 10 mg L⁻¹ de B; aumentó en CL en el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B; e incrementó significativamente en el caso de F5 en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B con respecto al control (Tabla 4.5). En la concentración foliar de P observamos que aumentó la concentración en plantas CC/10 mg L⁻¹ de B, no fue alterado en las plantas de CL con los tratamientos de boro y disminuyó en las plantas de F5/5 mg L⁻¹ de B.

Respecto a la concentración mineral de la raíz, en las plantas control hubieron de nuevo diferencias significativas entre los portainjertos (Tabla 4.6). En general podemos observar que las raíces de las plantas de CC mostraron la concentración

más alta en K, Ca, Mg y P, aunque este último no varió con respecto a las plantas de CL. Con respecto a los tratamientos de boro observamos que el de mayor concentración (10 mg L⁻¹) disminuyó la concentración de Mg en los tres portainjertos (Tabla 4.6). En el caso del P, se observa que el incremento progresivo de boro en la solución nutritiva disminuyó paralelamente la concentración de este elemento en citrange Carrizo, no observándose alteraciones de este nutriente con los tratamientos de boro en los otros dos portainjertos (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Efectos de la concentración de boro en la solución nutritiva sobre la concentración de macronutrientes (K, Ca, Mg y P) radicular en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide n° 5 tras 83 días de experimento.

| Factor Principal | | Raíz (mg g ⁻¹ ps) | | | |
|----------------------------|-------------------------|------------------------------|--------|-------|-------|
| | | K | Ca | Mg | P |
| Portainjerto | Carrizo | 21,1 a | 13,7 a | 2,3 b | 2,0 a |
| | Cleopatra | 16,0 b | 9,3 b | 2,6 a | 2,0 a |
| | Forner n° 5 | 13,2 b | 9,0 b | 1,8 c | 1,6 b |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 16,8 | 11,0 | 2,3 a | 2,1 a |
| | 5 mg L ⁻¹ | 16,2 | 11,2 | 2,3 a | 1,9 b |
| | 10 mg L ⁻¹ | 17,4 | 9,8 | 2,0 b | 1,6 b |
| Portainjerto × Boro | | | | | |
| Carrizo | 0.25 mg L ⁻¹ | 22,2 | 14,3 | 2,5 | 2,5 a |
| | 5 mg L ⁻¹ | 20,5 | 15,3 | 2,5 | 2,0 b |
| | 10 mg L ⁻¹ | 20,7 | 11,6 | 1,9 | 1,5 c |
| Cleopatra | 0.25 mg L ⁻¹ | 14,3 | 10,1 | 2,7 | 2,1 d |
| | 5 mg L ⁻¹ | 14,0 | 9,4 | 2,7 | 1,9 d |
| | 10 mg L ⁻¹ | 19,9 | 8,5 | 2,3 | 1,9 d |
| Forner n° 5 | 0.25 mg L ⁻¹ | 14,0 | 8,8 | 1,7 | 1,8 x |
| | 5 mg L ⁻¹ | 14,2 | 8,9 | 1,8 | 1,7 x |
| | 10 mg L ⁻¹ | 11,4 | 9,4 | 1,7 | 1,4 x |
| Portainjerto | | *** | *** | *** | *** |
| Boro | | ns | ns | ** | *** |
| Port. × Boro | | ns | ns | ns | * |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los factores Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones.

Pasando a analizar los principales micronutrientes en hojas de cítricos, en el tratamiento control, vemos que las plantas de citrange Carrizo tienen la mayor concentración de Fe, Cu, Mn y Zn; aunque en este nutriente no existen diferencias con respecto a las plantas de F5 (Tabla 4.7). Con respecto a los tratamientos de alta concentración de boro vemos que en el Fe y el Cu el comportamiento es similar para

los tres portainjertos; en el Fe se observa una mayor concentración en plantas regadas con 5 mg L⁻¹ de B respecto a aquellas procedentes del tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B; y la concentración Cu aumenta para el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B. En el Mn y Zn sí que se dio una interacción positiva portainjerto × boro (Tabla 4.7). En el Mn, las plantas de citrange Carrizo y Forner n° 5 el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B incrementaron la concentración, mientras que en mandarino Cleopatra disminuyó respecto a los otros dos tratamientos. En el caso del Zn, también vemos que las alteraciones se producen en este tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B, incrementando la concentración en plantas de citrange Carrizo y mandarino Cleopatra, mientras que en Forner n° 5 fue mayor en el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B respecto al tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B.

Tabla 4.7. Efectos de la concentración de boro en la solución nutritiva sobre la concentración de micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Na, S y Zn) foliar en citrange Carrizo, mandarino Cleopatra y Forner-Alcaide n° 5 tras 83 días de experimento.

| Factor Principal | | Hoja (mg kg ⁻¹ ps) | | | |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------|---------|----------|
| | | Fe | Cu | Mn | Zn |
| Portainjerto | Carrizo | 309,0 a | 4,81 b | 56,0 a | 27,26 a |
| | Cleopatra | 90,6 c | 2,56 c | 34,7 c | 20,10 b |
| | Forner n° 5 | 172,9 b | 6,85 a | 45,2 b | 28,35 a |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 209,1 ab | 4,12 b | 51,0 a | 22,58 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 266,5 a | 4,69 b | 46,8 a | 27,38 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 168,8 b | 5,41 a | 38,0 b | 25,76 |
| Portainjerto × Boro | | | | | |
| Carrizo | 0.25 mg L ⁻¹ | 375,1 | 3,58 | 69,8 a | 22,49 b |
| | 5 mg L ⁻¹ | 463,3 | 4,38 | 60,1 a | 25,58 b |
| | 10 mg L ⁻¹ | 304,5 | 6,48 | 38,1 b | 33,72 a |
| Cleopatra | 0.25 mg L ⁻¹ | 73,2 | 2,48 | 33,2 d | 17,62 e |
| | 5 mg L ⁻¹ | 101,7 | 2,41 | 33,9 de | 20,41 de |
| | 10 mg L ⁻¹ | 96,9 | 2,79 | 37,0 e | 22,65 d |
| Forner n° 5 | 0.25 mg L ⁻¹ | 179,2 | 6,30 | 50,1 x | 27,64 xy |
| | 5 mg L ⁻¹ | 234,4 | 7,29 | 46,6 x | 36,14 x |
| | 10 mg L ⁻¹ | 105,1 | 6,97 | 38,9 y | 21,29 y |
| Portainjerto | | *** | *** | *** | *** |
| Boro | | *** | * | *** | ns |
| Port. × Boro | | ns | ns | *** | *** |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para P<0.05 y 0.001, respectivamente. Para los factores Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones.

En cuanto los micronutrientes en la raíz, en el tratamiento control, fueron las plantas de Forner n° 5 quienes mostraron la mayor concentración de Fe y Cu,

mientras que en las plantas de citrange Carrizo se observó la mayor concentración de Zn (Tabla 4.8). Los tratamientos de boro afectaron a la concentración de Fe, aunque este efecto dependió del portainjerto. En plantas de CC/10 mg L⁻¹, F5/5 mg L⁻¹ y F5/10 mg L⁻¹ disminuyó la concentración respecto al tratamiento control; mientras que en plantas de CL/10 mg L⁻¹ la concentración de Fe se incrementó en relación a CL/5 mg L⁻¹ y CL/0,25 mg L⁻¹ (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Efectos de la concentración de boro en la solución nutritiva sobre la concentración de micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Na, S y Zn) radicular en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide n° 5 tras 83 días de experimento.

| Factor Principal | | Raíz (mg kg ⁻¹ ps) | | | |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------|-------|---------|
| | | Fe | Cu | Mn | Zn |
| Portainjerto | Carrizo | 796,6 a | 22,08 b | 330,8 | 50,89 a |
| | Cleopatra | 566,2 b | 14,35 b | 288,8 | 32,84 c |
| | Forner n° 5 | 913,0 a | 56,82 a | 240,3 | 43,28 b |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 809,1 | 32,14 | 251,8 | 42,92 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 761,1 | 30,12 | 285,5 | 40,87 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 705,6 | 30,99 | 322,7 | 43,23 |
| Portainjerto × Boro | | | | | |
| Carrizo | 0.25 mg L ⁻¹ | 838,2 a | 17,19 | 317,4 | 51,21 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 972,3 a | 20,56 | 337,4 | 50,29 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 579,4 b | 28,49 | 337,6 | 51,18 |
| Cleopatra | 0.25 mg L ⁻¹ | 533,1 e | 14,12 | 164,5 | 31,89 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 507,7 e | 14,76 | 299,5 | 28,85 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 657,8 d | 14,16 | 402,4 | 37,79 |
| Forner n° 5 | 0.25 mg L ⁻¹ | 1056,1 x | 65,11 | 273,5 | 45,65 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 803,2 y | 55,03 | 219,6 | 43,47 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 879,7 y | 50,33 | 228,0 | 40,72 |
| Portainjerto | | *** | *** | ns | *** |
| Boro | | ns | ns | ns | ns |
| Port. × Boro | | ** | ns | ns | ns |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para P<0.01 y 0.001, respectivamente. Para los factores Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones.

4.3.6. Concentración de carbohidratos

En lo que respecta al análisis de azúcares solubles en hoja (AS_{foliar}) al final del experimento (a los 83 días), se observó que CL fue la que presentó la concentración más alta (41,3 mg g⁻¹ ps), seguida de F5 y de CC (32,8 y 32,4 mg g⁻¹ ps, respectivamente).

Por su parte, el tratamiento de B de 5 mg L⁻¹ de B en plantas de citrange Carrizo redujo los AS_{foliar} en un 29%, con respecto a su control (Figura 4.7). Por el contrario, en plantas de mandarino Cleopatra y del híbrido Forner n° 5, el tratamiento que más afectó a la concentración de AS_{foliar} fue el de 10 mg L⁻¹, que las redujo en un 57 y 36%, respectivamente, en comparación a sus controles (Figura 4.7). En cuanto al análisis de azúcares reductores en hoja (AR_{foliar}), éste reveló que CL fue el portainjerto que mostró el valor más alto, por encima de los 40 mg g⁻¹ ps, en condiciones normales de B (0,25 mg L⁻¹; figura 4.7); y muy por debajo encontramos al híbrido F5 (21,4 mg g⁻¹ ps) y a CC (18,53 mg g⁻¹ ps). En condiciones de exceso de B, los tratamientos F5/5 mg L⁻¹ y F5/10 mg L⁻¹ presentaron una disminución del 15 y del 37%, respectivamente; a CL solo le afectó el tratamiento de mayor concentración de B (10 mg L⁻¹), reduciendo los AR_{foliar} hasta la mitad, respecto a los otros dos tratamientos (0,25 y 5 mg L⁻¹; Figura 4.7). En CC, no se observaron diferencias significativas para este parámetro entre los distintos tratamientos ensayados.

Tal y como muestra la figura 4.8, es importante señalar que en las hojas de mandarino Cleopatra la mayoría de los azúcares solubles están en fase reductora (relación AR/AS ≈ 1,0; *en tanto por 1*); mientras que citrange Carrizo y Forner n° 5 presentaron la relación AR/AS (*en tanto por 1*) en torno a 0,69 y 0,66, respectivamente. Es decir, alrededor del 66-69% de los azúcares solubles totales están en forma de azúcares reductores. Esta relación no se vio afectada por los tratamientos de boro en ninguno de los tres portainjertos.

Pasando al tallo, para los AS de este tejido, apenas se vieron diferencias entre los tres portainjertos en condiciones control (CC = 39,65 mg g⁻¹ ps; CL = 32,35 mg g⁻¹ ps; y F5 = 32,84 mg g⁻¹ ps). No obstante, las plantas regadas con B a niveles altos sí que mostraron diferencias, aunque el efecto dependió del portainjerto. En primer lugar, las plantas de CC/5 mg L⁻¹ y CC/10 mg L⁻¹ de B sufrieron una disminución en la concentración de AS del 14 y 28%, respectivamente (Figura 4.7). En segundo lugar, en CL el único tratamiento que afectó a los AS fue el de 5 mg L⁻¹ de B, que indujo un aumento en la concentración de éstos hasta alcanzar el valor de 41,57 mg g⁻¹ ps. Por último, en F5 el exceso de B produjo una disminución de los AS, pasando a una concentración de 27,17 mg g⁻¹ ps, independientemente del tratamiento con exceso de B que se aplicara (Figura 4.7). En cuanto a los azúcares reductores (AR) en tallo, se observó en condiciones control que el portainjerto que presentó la concentración más alta en este tejido fue

CL (9,34 mg g⁻¹ ps), seguido de CC (6,58 mg g⁻¹ ps) y, por último, F5 con un valor por debajo de los 2 mg g⁻¹ ps (Figura 4.7). En las plantas de mandarino Cleopatra, se comprobó que los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ afectaron a la concentración de AR aumentándola en un 45 y disminuyéndola en un 79%, respectivamente (Figura 4.7). En CC y F5, el único tratamiento con B que afectó fue el de 5 mg L⁻¹ de B, pero de manera diferente; mientras que en plántulas de CC disminuyó la concentración con respecto al control, en F5 la aumentó hasta alcanzar aproximadamente el doble que su control (Figura 4.7).

Volviendo a la figura 4.8 se puede observar como la relación AR/AS en el tallo fue afectada tanto por el portainjerto como por el tratamiento de boro. En condiciones control, en las plantas de mandarino Cleopatra los AR representaron el 30% de todos los azúcares solubles totales; mientras que en citrange Carrizo y Forner n° 5 este porcentaje fue mucho más bajo, 15% y 5%, respectivamente. En las plantas que fueron tratadas con exceso de B, esa relación también varió. En citrange Carrizo, se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos de exceso de B, en donde las plantas regadas con 5 mg L⁻¹ mostraron una relación AR/AS del 0,14 y las regadas con el doble de B (10 mg L⁻¹) mostraron una relación de 0,21 (Figura 4.8). En mandarino Cleopatra, los dos tratamientos con exceso de B mostraron diferencias con el control; mientras CL/5 mg L⁻¹ aumentó la relación AR/AS hasta alcanzar el 0,41, las de CL/10 mg L⁻¹ lo redujeron por debajo de 0,1 (Figura 4.8). Por último, en las plantas de Forner n° 5 se observó que el único tratamiento que tuvo algún efecto sobre esta relación fue el de 5 mg L⁻¹ de B que la aumentó hasta 0,11 (Figura 4.8).

En lo referente a la concentración de azúcares solubles totales en raíz (AS_{radicular}), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ni en CL ni en F5, estando todos los valores comprendidos dentro del rango 16,0-23,5 mg g⁻¹ ps (Figura 4.7). Por su parte, CC sí que presentó diferencias significativas, entre las plantas control (21,36 mg g⁻¹ ps) y las regadas con 5 mg L⁻¹ de B (16,06 mg g⁻¹ ps). En cuanto a los AR_{radicular}, se observó que en condiciones estándar el portainjerto que mostró la concentración más alta fue CC con 5,20 mg g⁻¹ ps, seguido de F5 con 4,74 mg g⁻¹ ps y de CL con 4,54 mg g⁻¹ ps (Figura 4.7). En las plantas de CC, el único tratamiento que afectó a la concentración de AR_{radicular}, disminuyéndola hasta 3,40 mg g⁻¹ ps, fue el de 5 mg L⁻¹ de B. En el resto de portainjertos, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 4.7). Para la relación AR/AS en raíz, se comprobó que independientemente

del portainjerto y del tratamiento aplicado, los valores se situaban dentro del intervalo 0,20-0,26 (Figura 4.8) y no fueron afectados por estos factores.

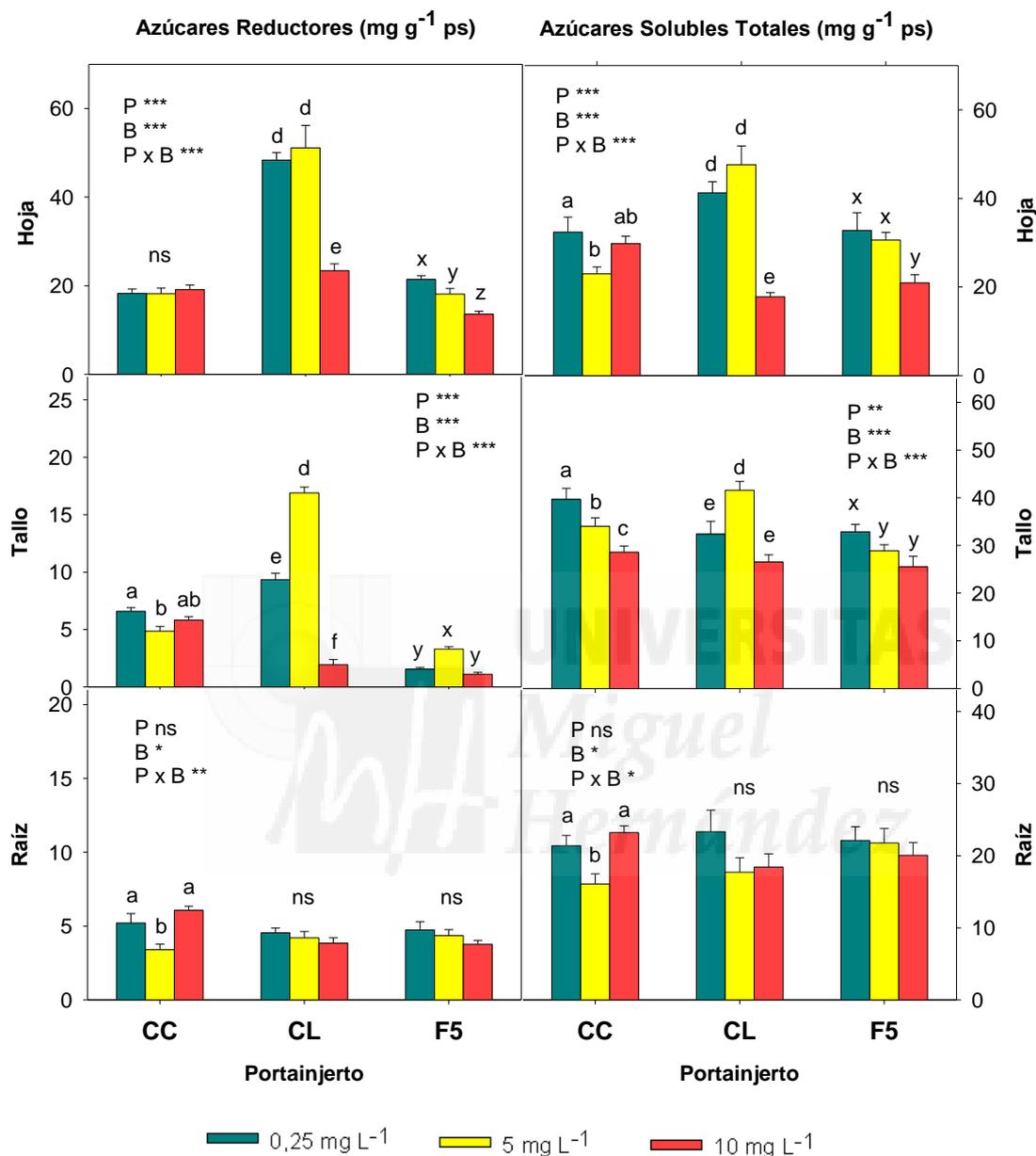


Figura 4.7. Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de azúcares reductores y azúcares solubles totales en hoja, tallo y raíz en cítrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

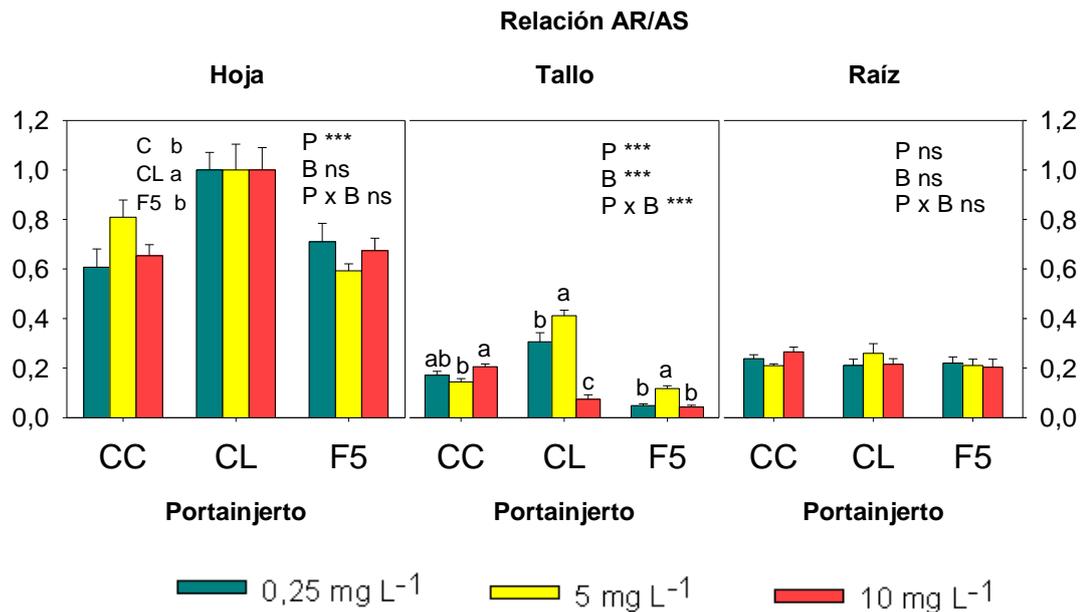


Figura 4.8. Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la relación AR/AS en hoja, tallo y raíz en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95% y *** indica diferencias significativas para $P < 0.001$, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

En cuanto al almidón foliar y teniendo en cuenta como factor principal al portainjerto, en la tabla 4.9 se observó como el patrón que presentó más almidón, independientemente del tratamientos, fue CC con $19,7 \text{ mg g}^{-1}$ ps, seguido de F5 con $15,6 \text{ mg g}^{-1}$ ps y, por último, CL con $11,9 \text{ mg g}^{-1}$ ps. Por otro lado, teniendo en cuenta como factor principal a los tratamientos de B (independientemente del portainjerto), las plantas regadas con la mayor concentración de boro (10 mg L^{-1}), fueron las que mostraron los niveles más altos de este azúcar de reserva ($17,1 \text{ mg g}^{-1}$ ps); mientras que las plantas control fueron las que presentaron los más bajos, siendo estos inferiores a 15 mg g^{-1} ps (Tabla 4.9). En el tejido radicular en condiciones de no exceso de B (control), citrange Carrizo presentó aproximadamente entre 3-3,5 veces menos almidón que mandarina Cleopatra y que su híbrido Forner nº 5 ($18,1$ y $15,7 \text{ mg g}^{-1}$ ps, respectivamente). En CC, el tratamiento que mostró el valor más alto de almidón radicular fue el de 5 mg L^{-1} de B; por su parte, las plantas control y las tratadas con 10 mg L^{-1} de B no mostraron diferencias significativas entre ellas (Tabla 4.9). En el caso de F5, se detectó más concentración de almidón en el tratamiento de máxima concentración de B (10 mg L^{-1}) con un valor entorno a los 22 mg g^{-1} ps; las plantas control y las de 5 mg L^{-1} de B no mostraron diferencias entre

ellas (15,7 y 16,3 mg g⁻¹ ps, respectivamente; tabla 4.9). Por último, en CL el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los tres tratamientos (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de almidón y compuestos amoniocuaternarios (CAQ) foliar y radicular en citrange Carrizo, mandarino Cleopatra y Forner-Alcaide n° 5 tras 83 días de experimento.

| | | Almidón_Hoja (mg g ⁻¹ ps) | Almidón_Raíz (mg g ⁻¹ ps) | CAQ_Hoja (mg g ⁻¹ ps) | CAQ_Raíz (mg g ⁻¹ ps) |
|----------------------------|-------------------------|---|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Portainjerto | Carrizo | 19,70 a | 5,91 b | 6,50 | 4,56 a |
| | Cleopatra | 11,89 c | 18,86 a | 6,30 | 1,88 b |
| | Forner n° 5 | 15,62 b | 18,02 a | 6,65 | 1,81 b |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 14,70 b | 12,97 | 6,46 | 2,67 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 15,38 ab | 14,86 | 6,58 | 2,81 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 17,14 a | 14,96 | 6,40 | 2,77 |
| Portainjerto × Boro | | | | | |
| Carrizo | 0.25 mg L ⁻¹ | 18,43 | 5,11 b | 6,33 | 4,46 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 19,47 | 7,11 a | 6,77 | 4,44 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 21,19 | 5,49 b | 6,39 | 4,79 |
| Cleopatra | 0.25 mg L ⁻¹ | 10,91 | 18,08 e | 6,16 | 1,71 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 11,49 | 21,16 e | 6,55 | 2,00 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 13,29 | 17,34 e | 6,19 | 1,92 |
| Forner n° 5 | 0.25 mg L ⁻¹ | 14,75 | 15,70 y | 6,90 | 1,84 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 15,19 | 16,30 y | 6,43 | 2,00 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 16,93 | 22,06 x | 6,61 | 1,60 |
| Portainjerto | | *** | *** | ns | *** |
| Boro | | *** | ns | ns | ns |
| Port. × B | | ns | * | ns | ns |

“ns” indica diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. Para los factores Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones.

4.3.7. Concentración de CAQ y prolina

En lo relativo a los compuestos amoniocuaternarios (CAQ) cuantificados en hoja, tal y como muestra la tabla 4.9, no se observaron diferencias significativas ni a nivel de portainjerto ni a nivel de tratamientos de B. Para los compuestos amoniocuaternarios en raíz (CAQ_{radiculares}) solo se observaron diferencias significativas a nivel de portainjerto, donde citrange Carrizo presentó hasta 2,5 veces más de CAQ_{radiculares}

que mandarina Cleopatra (1,88 mg g⁻¹ ps) y Forner n° 5 (1,81 mg g⁻¹ ps), los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 4.9).

Para la prolina, y comenzando por el tejido foliar en condiciones control, se observó que las plantas de citrange Carrizo mostraron los valores más altos para este osmolito (19,2 mg g⁻¹ ps), seguido de Forner n° 5 (14,9 mg g⁻¹ ps) y, por último, mandarina Cleopatra (11,9 mg g⁻¹ ps). Tal y como muestra la figura 4.9, citrange Carrizo fue el que presentó la respuesta más gradual, disminuyendo la concentración de prolina en hoja a medida que se aumenta la concentración de B en la solución nutritiva (disminución del 20 y 33% para 5 y 10 mg L⁻¹ de B, respectivamente). En mandarina Cleopatra el único tratamiento con B que afectó a la concentración de prolina fue el de 10 mg L⁻¹ de B, disminuyéndola en un 30% con respecto a su control (Figura 4.9). En Forner n° 5 ambas dosis de B (5 y 10 mg L⁻¹) indujeron una disminución de aproximadamente un 13% con respecto a su control (Figura 4.9).

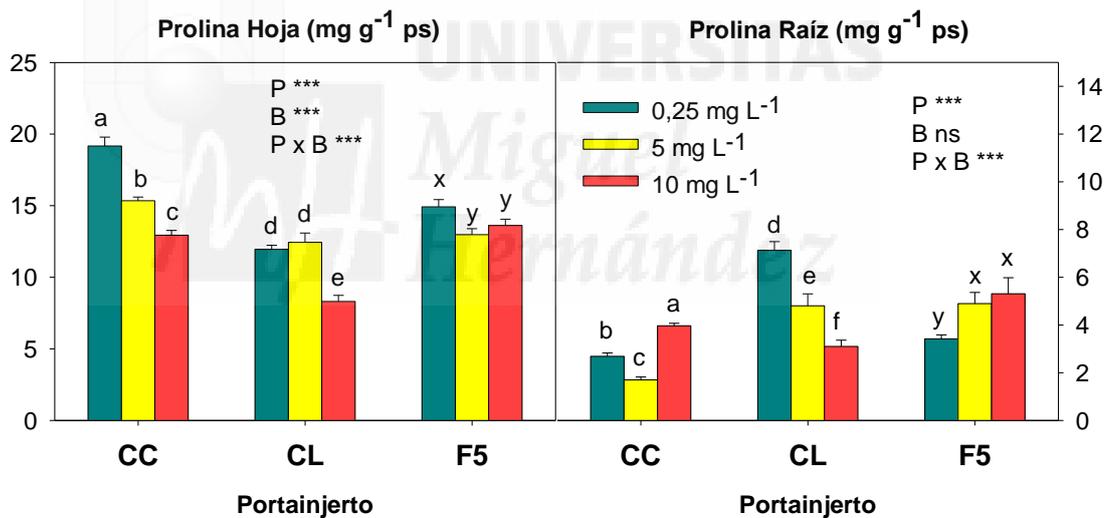


Figura 4.9. Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de prolina foliar y radicular en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide n° 5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95% y *** indica diferencias significativas para $P < 0.001$. Para cada portainjerto, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

En cuanto a la raíz, en condiciones normales las plantas de CL mostraron más del doble de prolina que las de los otros dos portainjertos (2,68 mg g⁻¹ ps para CC y 3,42 mg g⁻¹ ps para F5; Figura 4.9). Tras 83 días de riego con exceso de B, los tres portainjerto se comportaron de maneras diferentes. Las plantas de citrange Carrizo regadas con solución nutritiva que contenía 5 mg L⁻¹ de B mostraron una

disminución del 37%, mientras que las regadas con 10 mg L⁻¹ de B incrementaron su concentración en un 32%, respecto a su control (Figura 4.9). El portainjerto mandarina Cleopatra, disminuyó gradualmente la concentración radicular de este osmolito en un 33 y 56% para 5 y 10 mg L⁻¹ de B, respectivamente (Figura 4.9). Por su parte, su híbrido Forner nº 5, la incrementó en un 33% ante el exceso de B, independientemente de la concentración aplicada (Figura 4.9).

4.3.8. Concentración de H₂O₂ y MDA

Tras los 83 días de experiencia y en lo referente a la concentración de H₂O₂ en hoja, se observó que el portainjerto que presentó mayor concentración de H₂O₂ en condiciones control fue mandarina Cleopatra (18,5 nmol g⁻¹ pf), seguido de Forner nº 5 (9,7 nmol g⁻¹ pf) y, por último, citrange Carrizo (2,5 nmol g⁻¹ pf), tal y como se observa en la figura 4.10. En el caso de las plantas de CC/5 mg L⁻¹ y CC/10 mg L⁻¹ de B, estas no mostraron diferencias significativas entre sí, pero sí que aumentaron su valor un 28,6 y 37,5%, respectivamente, con respecto a su control (Figura 4.10).

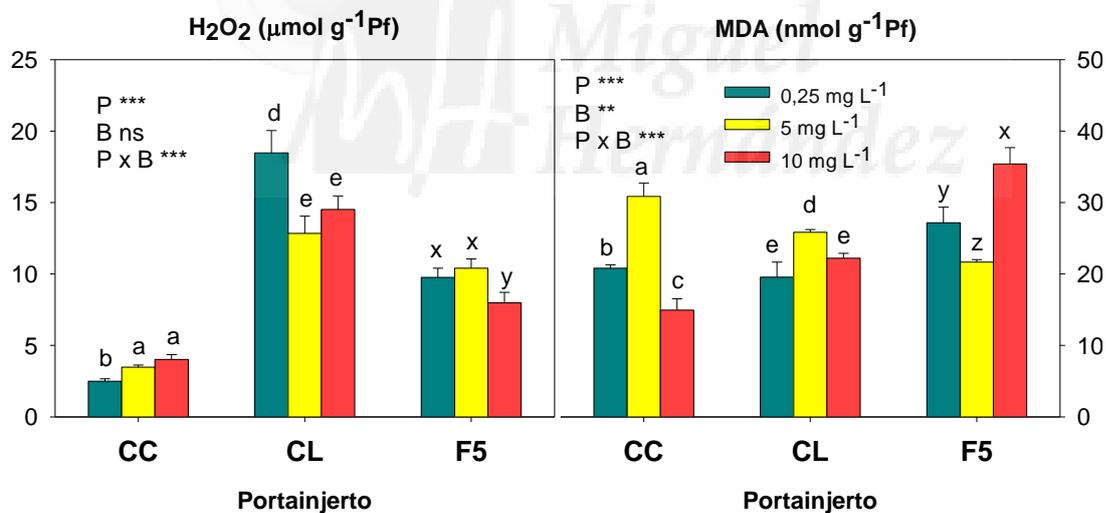


Figura 4.10. Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y malonildialdehído (MDA) en hojas de citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para P<0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media (n=8).

Las plantas de los tratamientos CL/5 mg L⁻¹ y CL/10 mg L⁻¹ de B fueron la que presentaron la respuesta más drástica, disminuyendo la concentración de

peróxido, en comparación a su control, hasta una media de aproximadamente 13,5 nmol g⁻¹ pf (Figura 4.10). Forner n° 5, por su parte, mostró diferencias significativas entre el tratamiento control y el del exceso de B de 10 mg L⁻¹ pasando de 9,76 a 7,99 nmol g⁻¹ pf, respectivamente. Por su parte, las plantas F5/5 mg L⁻¹ de B no mostraron diferencias significativas con respecto a su control.

En el caso del MDA, en los tratamientos control, los portainjertos citrange Carrizo y mandarina Cleopatra mostraron valores de MDA en torno a los 20 nmol g⁻¹ pf, mientras que Forner n° 5 presentó un valor próximo a los 30 nmol g⁻¹ pf (Figura 4.10). En las plantas de CC tratadas con exceso de B, se observó un incremento en la concentración de MDA en las regadas con el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B (30,8 nmol g⁻¹ pf) y una disminución en las regadas con 10 mg L⁻¹ de B (14,9 nmol g⁻¹ pf), con respecto a su control (Figura 4.10). En el caso de CL, el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B fue el único tratamiento con exceso de B que indujo una respuesta significativa, incrementando el MDA, con respecto a los otros dos tratamientos (0,25 y 10 mg L⁻¹ de B), un 23,1%, aproximadamente. Por su parte, en el híbrido F5, los tratamientos con exceso de B afectaron de diferente manera a este parámetro, mientras que el de 5 mg L⁻¹ de B presentó menor concentración de MDA (aproximadamente 22 nmol g⁻¹ pf), el de mayor concentración de B (10 mg L⁻¹), la incrementó un 15,3%, aproximadamente (Figura 4.10).

4.3.9. Actividad de las enzimas antioxidantes

Para la catalasa (CAT) en condiciones control, se observó que el portainjerto que más actividad enzimática tenía fue mandarina Cleopatra (1,1 U g⁻¹ pf); y muy por debajo citrange Carrizo y Forner n° 5, ambos con valores en torno a los 0,3 U g⁻¹ pf (Figura 4.11). Las plantas del tratamiento CC/5 mg L⁻¹ de B no mostraron diferencias significativas con su control, pero las de CC/10 mg L⁻¹ de B sí que vieron reducida la actividad de la CAT hasta 0,15 U g⁻¹ pf (Figura 4.11). Las plantas de los tratamientos CL/5 mg L⁻¹ y CL/10 mg L⁻¹ de B disminuyeron la actividad de la CAT en un 19 y 54%, respectivamente, con respecto a su control (Figura 4.11). Por último, las plantas del tratamiento F5/10 mg L⁻¹ de B no mostró diferencias con su control; sin embargo, las de F5/5 mg L⁻¹ de B vieron incrementada la actividad de esta enzima hasta más del doble (Figura 4.11).

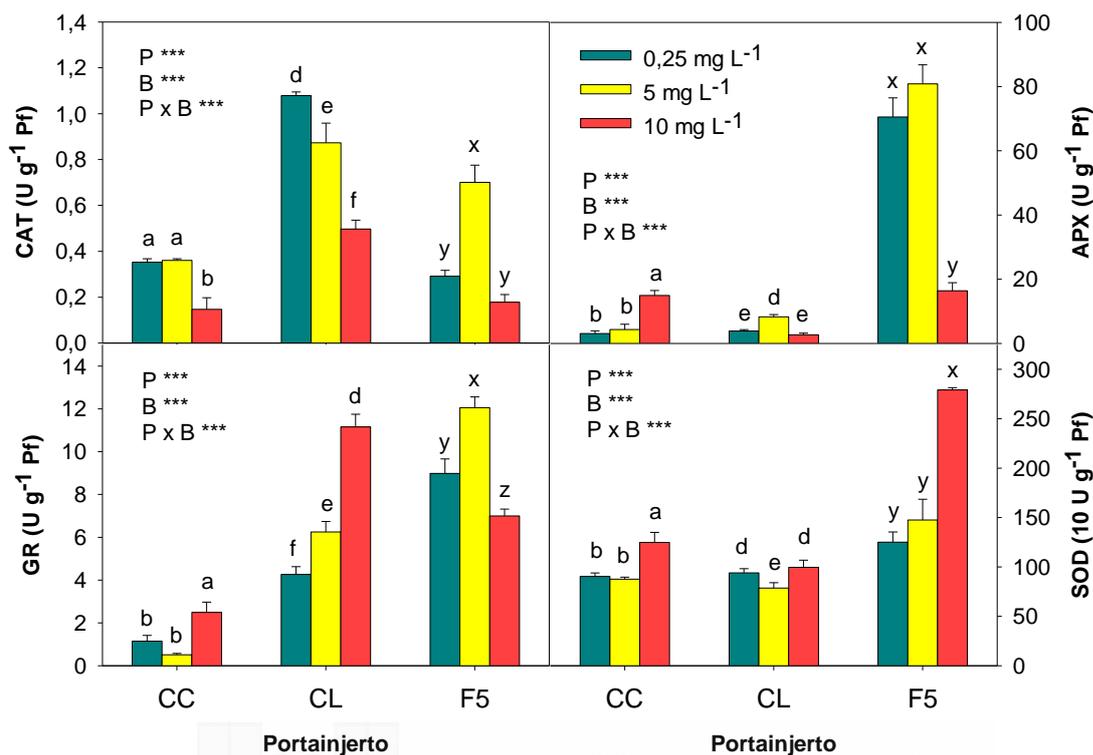


Figura 4.11. Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD) en hojas de citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide n° 5 (F5) tras 83 días de experimento. *** indica diferencias significativas para $P < 0.001$, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

Para la actividad de la ascorbato peroxidasa (APX) en condiciones normales, se observó que entre los portainjertos CC y CL no hubieron diferencias significativas entre ellos (3,1 y 3,9 U g⁻¹ pf, respectivamente); mientras que en F5 la actividad de la APX detectada en hoja fue mucho mayor, en torno a 70 U g⁻¹ pf (Figura 4.11). En cuanto a las plantas tratadas con exceso B, se observó que las plantas de CC/5 mg L⁻¹ de B no mostraron diferencias significativas con su control, mientras que las plantas regadas con 10 mg L⁻¹ de B incrementaron la actividad de esta enzima hasta alcanzar las 15 U g⁻¹ pf (Figura 4.11). Las plantas CL/10 mg L⁻¹ de B no mostraron diferencias significativas con su control (Figura 4.11); pero en las de CL/5 mg L⁻¹, se observó un incremento de aproximadamente el doble en la actividad de la APX (8,2 U g⁻¹ pf). Por último, las plantas F5/5 mg L⁻¹ de B tampoco mostraron diferencias significativas con su control; pero a diferencia de citrange Carrizo, en las plantas

regadas con 10 mg L^{-1} de B se produjo una drástica reducción de la actividad de la APX, pasando de $70,52$ a $16,4 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$ (Figura 4.11).

La figura 4.11 muestra cómo la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) en las plantas control de Forner nº 5 es mucho mayor ($8,9 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$) que la de las plantas control de mandarina Cleopatra y citrange Carrizo ($4,3$ y $1,1 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$, respectivamente). Para CC, no se observaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B; sin embargo, en el de 10 mg L^{-1} de B la actividad de la enzima GR aumentó hasta alcanzar los $2,3 \text{ U mg}^{-1} \text{ pf}$. En el caso de las plantas de CL/ 5 mg L^{-1} de B la actividad de GR aumentó aproximadamente 1,5 veces y para las plantas CL/ 10 mg L^{-1} de B aumentó unas 2,6 veces, con respecto al control. En las plantas F5/ 5 mg L^{-1} de B la actividad de esta enzima aumentó ($12 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$), mientras que en las F5/ 10 mg L^{-1} se redujo hasta $7 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$.

En cuanto a la actividad de la enzima SOD cuantificada en las plantas control, se observó que el portainjerto que mostró el valor más alto fue Forner nº5 ($125 \times 10 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$); por su parte, citrange Carrizo y mandarina Cleopatra mostraron valores por debajo de las $100 \times 10 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$ (Figura 4.11). Las plantas de CC/ 5 mg L^{-1} de B no mostraron diferencias significativas con su control; sin embargo, las regadas con solución que contenía 10 mg L^{-1} de B, incrementaron la actividad de SOD ($124,8 \times 10 \text{ U g}^{-1} \text{ pf}$). En el caso de mandarina Cleopatra, solo existieron diferencias significativas entre el tratamiento control y el de 10 mg L^{-1} de B con el de 5 mg L^{-1} de B, presentando mayor actividad de la enzima SOD las plantas regadas con los tratamientos de $0,25$ y 10 mg L^{-1} de B. Por su parte, en el híbrido Forner nº 5, las plantas de los tratamientos de $0,25$ y 5 mg L^{-1} de B no mostraron diferencias significativas entre ellas; sin embargo, las plantas regadas con 10 mg L^{-1} de B sí presentaron diferencias significativas con los otros dos tratamientos, incrementando estas últimas la actividad de la SOD hasta 2,2 veces más que la de los otros dos tratamientos (Figura 4.11).

4.4. Discusión

4.4.1. Mandarino Cleopatra fue el portainjerto más tolerante al exceso de boro, mientras que citrange Carrizo fue el más sensible

Usando, como ya hicimos en el capítulo anterior, la relación entre la biomasa seca total de los portainjertos regados en condiciones de exceso de boro (5 y 10 mg L⁻¹) frente a la biomasa seca total de los portainjertos en el tratamiento control (con 0,25 mg L⁻¹ de B) para determinar la tolerancia relativa al exceso de B de los tres portainjertos, podemos concluir que las plantas de mandarina Cleopatra parecen ser las más tolerantes al exceso de B. Por el contrario, Carrizo resultó ser el portainjerto menos tolerante, ya que su biomasa seca total se vio reducida a medida que aumentaba la concentración de B en la solución nutritiva (reducción del 20% en las plantas regadas con 5 mg L⁻¹ y del 47% en las regadas con 10 mg L⁻¹). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otro experimento donde se estudió la tolerancia al exceso de B de mandarina Cleopatra y citrange Carrizo injertados con limón Verna (Gimeno y col., 2012). En este ensayo previo las plantas de mandarina Cleopatra también resultaron ser más tolerantes que citrange Carrizo. Respecto al híbrido Forner nº 5, el hecho de que su biomasa seca total solamente se vio afectada en el tratamiento de mayor concentración de boro y con una reducción menor que citrange Carrizo (ver Fig. 4.1), indicaría que Forner nº 5 tiene una mayor tolerancia que su progenitor y debería ser tenido en cuenta para contrarrestar los efectos negativos del boro en árboles de cítricos.

Otra importante conclusión al observar los datos de crecimiento sería que dependiendo del portainjerto unos tejidos de la planta son más susceptibles que otros al exceso de boro. En las plantas de citrange Carrizo el exceso de boro produjo una reducción tanto de las hojas, como del tallo y la raíz; en mandarina Cleopatra se observó una reducción del crecimiento radicular; mientras que en Forner nº 5 se redujo la biomasa foliar pero no el tallo ni la raíz. El hecho de que en este portainjerto la raíz no se viera afectada por el exceso de boro, avala la idea comentada anteriormente de que Forner nº 5 podría ser un buen portainjerto para árboles de cítricos. Varios autores consideran que el factor principal que determina la tolerancia al exceso de boro en cítricos es la raíz. La inhibición del crecimiento radicular es un efecto típico de la toxicidad por boro en plantas supuestamente sensibles al boro, por lo que aquellas que son tolerantes no presentan alteración en el

crecimiento radicular (Reid y col., 2004; Choi y col., 2006; Sheng y col., 2010; Simón, 2012).

Respecto a los síntomas que presentaron las hojas, los tres portainjertos se comportaron de la misma manera, apareciendo los primeros síntomas con el tratamiento de boro más alto (10 mg L^{-1}) al mes de empezar los tratamientos; y a los dos meses con el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B. Sin embargo, los síntomas siempre fueron más severos en las plantas de citrange Carrizo. Estos síntomas de toxicidad de B aparecieron en las hojas medianas y adultas, desarrollándose clorosis en los bordes y centro de las mismas (ver imagen 4.3); en concordancia con las observaciones descritas en otras especies de plantas como melón (Goldberg y col., 2003), cítricos (Papadakis y col., 2004a; Papadakis y col., 2004b; Gimeno y col., 2012), olivos (Chatzissavvidis y Therios, 2010) y *Jatropha curcas* (Simón, 2012). Estos síntomas tan típicos de la toxicidad por boro, podrían ser debidos a desórdenes metabólicos relacionados con la formación de enlaces de B no deseados a las ribosas causando daños celulares (Gunes y col., 2006; Cervilla y col., 2007). Pero además de los síntomas de toxicidad, en nuestro experimento, también se observó una caída de las hojas. Los portainjertos que sufrieron una abscisión foliar bastante severa fueron: CC/ 10 mg L^{-1} ; y F5/5 y F5/ 10 mg L^{-1} (ver imagen 4.3-4 y 4.3-6), por lo que en ambos casos, la reducción de la parte aérea fue debida principalmente a dicha defoliación más que a la inhibición del crecimiento foliar.

4.4.2. La mayor concentración de boro en las hojas se dio en plantas del portainjerto citrange Carrizo, lo que se puede relacionar con su menor tolerancia al exceso de boro

Nuestros resultados mostraron que la concentración de B_{foliar} dependió del portainjerto (ver Fig. 4.2 y tabla 4.2) siendo citrange Carrizo quién alcanzó la mayor concentración y a una mayor velocidad que los otros dos portainjertos. Por ejemplo, podemos observar que concentraciones superiores a 600 mg kg^{-1} ps son alcanzadas a partir de 50 días en los tratamientos 5 y 10 mg L^{-1} en plantas de citrange Carrizo; mientras que en plantas de mandarina Cleopatra esta concentración se alcanzó a los 50 días en el tratamiento de 10 mg L^{-1} de B; y en plantas de Forner n° 5 solamente al final del experimento (a los 83 días) y para el tratamiento de 10 mg L^{-1} de B. Al final del experimento y a la máxima dosis de B (10 mg L^{-1}), los tres portainjertos superaron una concentración foliar de 1000 mg kg^{-1} ps de B. Sin embargo, a una

dosis de 5 mg L⁻¹ de B, el portainjerto citrange Carrizo fue el que más boro acumuló en sus hojas (945,8 mg kg⁻¹ ps), en comparación con mandarino Cleopatra y Forner n° 5 que no superaron los 690 mg kg⁻¹ ps de B.

Se ha observado que especies y genotipos sensibles al exceso de B, generalmente contienen concentraciones más altas en hojas y brotes que los genotipos tolerantes (Nable y col., 1997). Pero además, de la concentración que se acumula en la hojas, los efectos tóxicos del boro pueden marcar el grado de tolerancia a este estrés. En nuestro experimento podemos concluir que las plantas de citrange Carrizo fueron las más sensibles al exceso de boro en la solución nutritiva porque fueron las que más cantidad de B acumularon. Sin embargo, las plantas de mandarino Cleopatra y Forner n° 5 tuvieron una concentración de boro similar en las hojas, pero esta concentración fue mucho más tóxica en Forner n° 5. Así, una concentración de B_{foliar} de 609 mg kg⁻¹ ps disminuyó la biomasa foliar en un 54%, mientras que en Cleopatra una concentración de 681 mg kg⁻¹ ps de B la disminuyó tan solo en un 12%. En la raíz, también nos encontramos con una conclusión parecida, citrange Carrizo fue el portainjerto que más concentración acumuló y el que más disminuyó su crecimiento; en cambio, las raíces de Forner n° 5 y mandarino Cleopatra acumularon la misma concentración de B pero las raíces de Forner n° 5 apenas se vieron afectadas y las de mandarino Cleopatra se redujeron un 63%. En las plantas, se ha visto que el mecanismo para tolerar el exceso de B en la solución nutritiva incluye diversas estrategias como: i) la capacidad para restringir la entrada de B por las raíces, ii) inhibición del transporte de B desde la raíz a la parte aérea, y iii) la capacidad para tolerar elevadas concentraciones de B en las hojas y la raíz mediante la compartimentación y otros mecanismos bioquímicos (Torun y col., 2002; Torun y col., 2006; Stiles y col., 2010).

Como ya se ha mencionado anteriormente, en especies en las cuales no se sintetizan cantidades suficientes de alcoholes, entre las que se incluyen los cítricos (véase capítulo 3 de esta memoria), el B es poco móvil y su distribución hacia la parte aérea sigue fundamentalmente la corriente de transpiración (Takano y col., 2008), acumulándose fundamentalmente en los tejidos foliares, principalmente, en los márgenes de las hojas (Brown y Shelp, 1997). En el caso de los cítricos, se cree que el B entra a la planta principalmente por un transporte pasivo donde el flujo de transpiración es uno de los factores principales que determinan en gran medida la distribución y la concentración total de B total en la planta. Esta idea queda

confirmada en nuestros ensayos por el hecho de que la concentración de B_{foliar} incrementó al incrementar tanto la concentración de B en la solución nutritiva como el tiempo de exposición. Además en las plantas, la mayor concentración de B se observó en las hojas con respecto al tallo o la raíz, y los síntomas de toxicidad se observaron mayoritariamente en las hojas adultas (ver Fig. 4.2 y 4.3). Así, al final del experimento, la concentración mínima de boro en hojas fue de 600 mg kg^{-1} ps de B (plantas de $F5/5 \text{ mg L}^{-1}$), mientras que en ninguno de los demás tejidos, tallo o raíz, encontramos concentraciones superiores a 120 mg kg^{-1} ps de B.

Resumiendo lo expuesto anteriormente, la respuesta de los cítricos al exceso de boro en el agua de riego dependerá: i) de la concentración de B en el suelo, ii) del tiempo de exposición a dicha concentración, iii) y del portainjerto, ya que este influirá tanto en la concentración acumulada como en la sensibilidad a la toxicidad del boro en los diferentes tejidos (Figura 4.12).

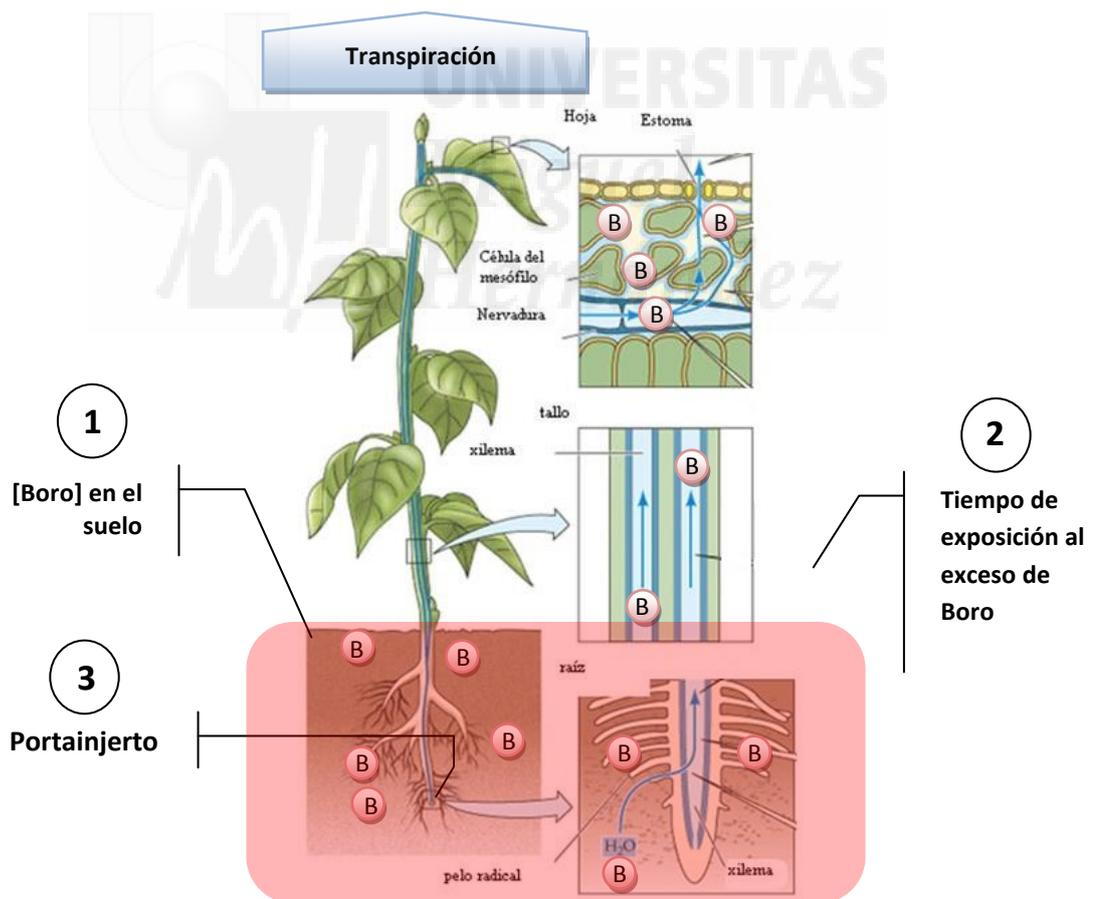


Figura 4.12. Factores que determinan la tolerancia al exceso de B en plantas de cítricos: concentración de B en el suelo (1), tiempo de exposición al exceso de B (2), y tipo de portainjerto, el cual determina la tasa de transpiración (3).

En este experimento se observa que los portainjertos tienen diferente capacidad de acumular boro en los diferentes tejidos de la planta, aunque los mecanismos en cuestión no quedan claros y serán tema de estudio en futuros experimentos. Factores como la transpiración, capacidad de absorción de B por las raíces, expulsión del B desde la raíz hacia la rizosfera, etc., podría influir en la cantidad final de B acumulado en las plantas. Además, también se observa que el efecto tóxico del boro difiere entre los portainjertos en donde tanto la compartimentación, distintas formas de boro acumuladas en la planta, como los procesos bioquímicos implicados en su detoxificación de especies reactivas de oxígeno podrían estar implicados.

4.4.3. Alta concentración de boro altera las funciones fotosintéticas de las hojas, aunque estas alteraciones dependen del portainjerto

La respuesta general de los parámetros de intercambio gaseoso, asimilación neta de CO₂ y transpiración foliar, a la toxicidad por boro fue una disminución con respecto a las plantas regadas en condiciones normales, como era de esperar; aunque esta respuesta es dependiente del portainjerto. Al final del experimento, nos encontramos que las plantas de citrange Carrizo fueron las más perjudicadas disminuyendo la A_{CO2} en un 70 y 89% (para los tratamientos 5 y 10 mg L⁻¹ de B), mientras que mandarino Cleopatra la disminuyó en un 75% pero solo en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B, y las plantas de Forner n° 5 un 70% en los dos tratamientos con exceso de boro. Esta diferente respuesta de los portainjertos tanto al final del experimento como durante el desarrollo del mismo podría estar condicionada por la concentración que se va acumulando en las hojas, así como su efecto tóxico para cada portainjerto. Representando los valores de B_{foliar} vs A_{CO2} (porcentaje de A_{CO2} de las plantas tratadas con exceso de boro con respecto al tratamiento control; *datos no mostrados*) podemos caracterizar la respuesta fotosintética de los portainjertos atendiendo al valor umbral a partir del cual la concentración de boro empieza a disminuir la A_{CO2}, y a partir de aquí en que porcentaje lo disminuye por cada 100 mg de B que se acumula en las hojas. Los resultados obtenidos para cada uno de los tres portainjertos fueron los siguientes: i) en citrange Carrizo: 536 mg kg⁻¹ ps y 14,5%, respectivamente; ii) en mandarino Cleopatra: 760 mg kg⁻¹ ps y 18%, respectivamente; y iii) en Forner n° 5: 350 mg kg⁻¹ ps y 8,5%, respectivamente. Entonces como citrange Carrizo fue el portainjerto que más rápido y en mayor

concentración acumula el boro en las hojas, llega antes a su valor umbral. Además, como su sistema fotosintético presenta una alta sensibilidad al B en las hojas podríamos explicar porque este portainjerto fue el más sensible al exceso de boro en la solución nutritiva. Estos datos también sugieren que las hojas de mandarina Cleopatra podrían inducir algún tipo de mecanismo bioquímico para hacer frente a la alta concentración de B_{foliar} y así evitar o retrasar los daños en su maquinaria fotosintética, ya que la A_{CO_2} no empezó a reducirse hasta que no se alcanzó una concentración de 760 mg kg^{-1} ps de B. Por otra parte, también se observó una correlación significativa al final del experimento entre la A_{CO_2} y el peso seco foliar, no así entre la A_{CO_2} y el peso seco total de la planta (*datos no mostrados*). Esto nos podría indicar que la toxicidad de B no solo podría inhibir el crecimiento a expensas de reducir la A_{CO_2} , sino que podrían también estar alterados los procesos de respiración celular. Así, la respiración de mantenimiento, que es el consumo de azúcares para mantener la actividad metabólica de los tejidos, puede incrementar dicho consumo para producir la energía necesaria para el transporte de iones, la compartimentalización de iones y la reparación de daños celulares (Rodríguez-Pérez, 2006).

4.4.4. La toxicidad por boro afectó a la eficiencia cuántica del PSII solamente en hojas del portainjerto mandarina Cleopatra

Las causas por las que se redujo la A_{CO_2} por exceso de B en los tres portainjertos parecen ser debidas a factores no-estomáticos como indican los valores de la concentración de CO_2 subestomático (C_i ; ver Fig. 4.5), ya que en ninguno de los tres portainjertos el exceso de B indujo una reducción de C_i (Farquhar y Sharkey, 1982). Resultados similares han sido descritos en *Cucurbitas pepo* (Lovatt y Bates, 1984), cítricos (Papadakis y col., 2004a; Papadakis y col., 2004b; Gimeno y col., 2012), kiwi (Sotiropoulos y col., 1999) y *Jatropha curcas* (Simón, 2012). La reducción de la A_{CO_2} debida a factores no estomáticos puede implicar cambios en: i) la eficiencia de carboxilación, ii) la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, iii) la concentración de clorofilas y/o iv) la actividad de las enzimas fotosintéticas (Nishiyama y col., 2006; Yordanova y Popova, 2007). El estudio de fluorescencia de clorofilas da información sobre las posibles alteraciones que se pueden dar en los procesos relacionados con la fotoquímica del fotosistema II. En este experimento los datos de fluorescencia de clorofilas mostraron que un exceso de B en las hojas pudo haber dañado la

maquinaria fotoquímica de las hojas del portainjerto mandarino Cleopatra regado con 10 mg L^{-1} de B (ver Fig. 4.6), disminuyendo la eficiencia de conversión de la energía luminosa captada por los pigmentos fotosintéticos en energía fotoquímica en el fotosistema II de los cloroplastos (Φ_{PSII}). Esta reducción del Φ_{PSII} fue debida sólo a los cambios que se produjeron en el parámetro qP; lo que indica que la pérdida de la eficiencia cuántica por parte del PSII en este portainjerto no fue a consecuencia de que el complejo de recolección de luz estuviera dañado, sino que lo que se vio afectado fue algún punto de la cadena de transporte de electrones. Esto supuso que disminuyeran las moléculas de ATP y NADP necesarias para la asimilación de CO_2 . Resumiendo, en el portainjerto mandarino Cleopatra tiene que estar pasando algo en la cadena de transporte de electrones que haga que se disminuya el parámetro qP y en consecuencia se reduzca la eficiencia cuántica por parte del PSII, lo que contribuiría a la gran sensibilidad al boro que se observa cuando se sobrepasan los valores umbrales de toxicidad como hemos visto anteriormente (pendiente B_{foliar} vs A_{CO_2} del 18%).

4.4.5. Las hojas del portainjerto mandarino Cleopatra tienen un potente sistema antioxidante tanto en condiciones control como con exceso de boro basado en una alta actividad CAT y GR

Otras de las relaciones interesantes que se obtienen al combinar los datos de la asimilación neta de CO_2 y la fluorescencia de clorofilas es la relación $A_{\text{CO}_2}/\Phi_{\text{PSII}}$. La reducción de esta relación significa que en el sistema fotosintético se genera un exceso de electrones que no pueden participar en la cadena de transporte de electrones, y por lo tanto tienen que ir dirigidos a un aceptor alternativo como es el O_2 dando lugar a la reacción de Mehler (Guo y col., 2006). En consecuencia, se generarán especies reactivas de oxígeno (ROS) que terminarán causando estrés oxidativo a nivel celular si no son neutralizadas (Cakmak, 1994; Cakmak y Römheld, 1997). En nuestros resultados pudimos comprobar que el exceso de B redujo la relación $A_{\text{CO}_2}/\Phi_{\text{PSII}}$, ya que la A_{CO_2} disminuyó mientras que Φ_{PSII} no fue afectada, salvo en el caso de mandarino Cleopatra a la dosis de 10 mg L^{-1} . Estos datos ponen de manifiesto que la reacción de Mehler se vio favorecida por el exceso de B y ello supuso la formación de las ROS con el consiguiente posible daño celular, lo que nos llevó a caracterizar el estrés oxidativo en las plantas de este ensayo.

En el estudio del estrés oxidativo del portainjerto mandarina Cleopatra, llama la atención que tanto en condiciones control como en los tratamientos de exceso de boro la concentración de H_2O_2 es muy alta en relación a los otros dos portainjertos, sin embargo los valores de MDA se mantienen en un rango similar a los otros genotipos. Esto nos sugiere que estas plantas tienen un sistema antioxidante muy eficaz en donde la acción combinada de las enzimas CAT y GR (ver Fig. 4.11) son lo suficientemente altas como para eliminar la mayor parte del H_2O_2 . Además parece ser que en condiciones control es la CAT quien tiene una mayor actividad antioxidante; mientras que en exceso de B es la enzima GR la encargada de disminuir la concentración de H_2O_2 .

Los datos en el portainjerto de citrange Carrizo sugieren que sus hojas no presentan un sistema antioxidante tan potente como el del mandarina Cleopatra, y apenas se ve potenciado con los tratamientos de B. Así para el tratamiento CC/5 mgL^{-1} de B, se observa un incremento importante de la concentración de MDA, indicando un fuerte daño oxidativo, debido quizás a que la actividad enzimática de CAT, APX, GR y SOD no aumentó. En el tratamiento CC/10 $mg L^{-1}$ de B sí que se observa que la concentración de MDA bajó con respecto a CC/0,25 $mg L^{-1}$ de B, y esto estuvo relacionado con un incremento de la actividad enzimática APX, GR y SOD. Con estos datos surge la cuestión de si en las hojas de citrange Carrizo la activación de estas enzimas se produce solamente cuando la concentración del boro es muy alta, o si los síntomas severos que presentaban las hojas podrían enmascarar los resultados de los parámetros medidos en este estudio. En el caso de Forner nº 5 en el tratamiento de 5 $mg L^{-1}$ de B vemos que no hay daño oxidativo, ya que los valores de MDA son incluso más bajo que aquellos de las plantas control, y esto se debe a que las hojas de este portainjerto potencian la actividad CAT y GR. Sin embargo, en el tratamiento de 10 $mg L^{-1}$ de B ya se observa daño oxidativo al incrementar los valores de MDA. La disminución drástica de la actividad de APX y GR, podría indicar que el exceso de B puede inhibir a estas enzimas.

4.4.6. La disminución de la concentración de prolina en las hojas parece ser que es una respuesta generaliza en plantas de cítricos en condiciones de toxicidad por boro

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, la sobreproducción de diferentes tipos de solutos orgánicos en respuesta a estreses, generalmente protegen a la planta: i) contribuyendo al ajuste osmótico celular, ii) mediante la desintoxicación de las

ROS, iii) protegiendo la integridad de la membrana y iv) mediante la estabilización de enzimas/proteínas (Yancey y col., 1982; Bohnert y Jensen, 1996; Serraj y Sinclair, 2002; Rivero y col., 2004; Parvaiz y Satyawati, 2008). Bien es conocido el papel de los solutos orgánicos, sobre todo el de la prolina y el de la GB, en la respuesta al estrés por altas temperaturas, sequía y salinidad en las plantas, pero no se conoce nada sobre su función frente al estrés producido por un exceso de B en cítricos. Parecía lógico pensar que ante una toxicidad que genera un fuerte estrés oxidativo podrían incrementar los valores de prolina y GB. Pero, lo que se ha visto hasta el momento en cítricos es que bajo condiciones de exceso de B, se produce una reducción de los niveles de prolina (Papadakis y col., 2004a), coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestro experimento, para los tres portainjertos estudiados (ver Fig. 4.9). El hecho de que en las hojas con alta concentración de boro muestren una concentración de prolina baja podría sugerir que en este tipo de estrés la prolina podría actuar como una fuente de nitrógeno extra con el objetivo o bien de incrementar la síntesis de proteínas específicas que podrían ayudar a tolerar la toxicidad por boro o para paliar la falta de nitrógeno en la plantas, ya que algunos autores han señalado que existe un antagonismo entre el boro y el nitrógeno a nivel radicular (Pollard y col., 1977; Francois, 1984; Sotiropoulos y col., 1999; Günes y Alpaslan, 2000; Kaya y col., 2009). Esta hipótesis debería ser contrastada en futuros experimentos estudiando cómo influye la fertilización nitrogenada en las respuestas de los cítricos al exceso de boro.

En cuanto a la GB, se sabe que juega un papel vital en el ajuste y la protección de la membrana tilacoidal, manteniendo de ese modo la eficiencia fotosintética (Robinson y Jones, 1986; Genard y col., 1991); por lo que se acumula en respuesta al estrés en muchas especies de plantas (Weimberg y col., 1984; Fallon y Phillips, 1989; McCue y Hanson, 1990; Rhodes y Hanson, 1993; Yang y col., 2003; Simón, 2012). Sin embargo, esta relación no es universal. Por ejemplo, no se observó correlación significativa entre la acumulación de GB y la tolerancia al exceso de boro en diferentes portainjertos de cítricos (Gimeno y col., 2012). De la misma manera, en nuestros resultados tampoco se observó una correlación significativa entre la concentración de GB_{foliar} y la tolerancia al exceso de B, en ninguno de los tres portainjertos estudiados (ver tabla 4.9).

Como ya hemos visto, los azúcares solubles (sacarosas, glucosa, y fructuosa) están involucrados en las respuestas a un gran número de estreses, y actúan como

nutrientes y moléculas señal que activan vías de transducción específicas, resultando en modificaciones importantes de la expresión de genes y patrones proteómicos (Couée y col., 2006). Yokota y Konishi (1990) afirmaban que la acumulación de los hidratos de carbono solubles en las hojas era necesaria para aliviar los síntomas de toxicidad en presencia de altas concentraciones de boro y el hecho de que se acumulen en exceso los hidratos de carbono parece estar más relacionado con que se limite su uso que con el hecho de que se vea sobre-estimulada su síntesis.

En nuestro experimento se comprobó que de los tres portainjertos regados con 5 mg L^{-1} de B, sólo citrange Carrizo vio reducida su concentración de $\text{AS}_{\text{foliar}}$; los otros dos portainjerto vieron reducido dicho parámetro cuando la solución nutritiva que se les aplicó contenía 10 mg L^{-1} de B. En cuanto a qué porcentaje de esos azúcares están en forma reductora, encontramos que las plantas de citrange Carrizo regadas con 5 mg L^{-1} de B mantienen la misma concentración de AR que las plantas control, a pesar de haber reducido la concentración de AS. Es decir, que en condiciones de 5 mg L^{-1} de B, a pesar de que las plantas de citrange Carrizo han sintetizado menos azúcares, este trata de mantener el mayor porcentaje en forma reductora para, probablemente, tratar de contrarrestar el daño oxidativo producido a consecuencia de las altas concentraciones de B en hoja. Por su parte, en mandarina Cleopatra y el Forner nº 5 no vemos variar esa relación AR/AS a consecuencia del exceso de B en la solución nutritiva (ver Fig. 4.7). En conjunto estos datos nos sugieren que, en condiciones de toxicidad por B, aunque se vea reducida la síntesis de azúcares solubles totales es importante que esos azúcares estén en fase reductora para poder reducir lo máximo posible los efectos negativos del exceso de B en la hoja.

4.4.7. Respuesta nutricional de los portainjertos al exceso de boro

En condiciones control la composición mineral de los macronutrientes analizados en las hojas no varió mucho entre los tres portainjertos ensayados en este experimento. Destaca quizá las diferencias en la concentración de K y Ca entre mandarina Cleopatra y los otros dos portainjertos (K: 15,8 y 21,5 mg g^{-1} ps; Ca: 19,9 y 15,95 mg g^{-1} ps, respectivamente), aunque estas diferencias no deberían ser suficientemente importantes como para determinar diferentes respuestas a la toxicidad por boro en las hojas, aunque en futuros experimentos podría ser

interesante analizar cómo influye el estado nutricional de los cítricos al exceso de boro.

Se sabe que la alta concentración de B en la zona radicular puede limitar la absorción de K, Ca y N por las raíces (Pollard y col., 1977; Francois, 1984; Sotiropoulos y col., 1999; Günes y Alpaslan, 2000; Kaya y col., 2009). En nuestro ensayo se observaron algunas alteraciones en el estado nutricional aunque dependieron tanto del portainjerto como de la concentración de B en la solución nutritiva. Sin embargo, estas alteraciones no provocaron ninguna deficiencia o toxicidad ya que todos los nutrientes se mantuvieron en un rango de normalidad para plantas de cítricos. En las plantas la concentración mineral en sus diferentes tejidos depende de una gran variedad de factores como la absorción de nutrientes por las raíces, los procesos de transporte desde la raíz a la parte aérea, el peso de la raíz, la relación en peso entre la parte aérea y la raíz, etc., que junto con la severa defoliación que se dio en los portainjertos citrange Carrizo y Forner nº 5 sería muy difícil saber exactamente porque se produce una determinada alteración nutricional. Lo que se observó en este experimento es una tendencia generalizada de que los tratamientos de exceso de boro incrementaron la concentración de K, P, Ca y Mg, salvo algunas excepciones. Esto no sería precisamente lo esperado ya que tanto el antagonismo del B con ciertos nutrientes, o la disminución de la transpiración foliar por la toxicidad del boro tendría que haber disminuido la concentración, por lo que todo apunta a que estos nutrientes se acumulan por un efecto de concentración al disminuir el desarrollo vegetativo de las plantas, siendo este factor mucho más determinante que aquellos factores que ante estas condiciones disminuyen la absorción y el transporte de los nutrientes hacia las hojas.

4.5. Bibliografía

- Azcón-Bieto, J., Talón, M. (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill/Interamericana. ISBN: 84-486-0258-7
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* **14**: 89-97
- Brown, P.H., Shelp, B.J. (1997). Boron mobility in plants. *Plant and Soil* **193**: 85-101
- 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. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1259-1266
- Cakmak, I., Römheld, V. (1997). Boron deficiency induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil* **193**: 71-83
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Ríos, J.J., Romero, L., Ruiz, J.M. (2007). Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany* **100**: 747-756
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 449-459
- Chatzissavvidis, C., Therios, I. (2010). Response of four olive (*Olea europaea* L.) cultivars to six B concentrations: Growth performance, nutrient status and gas exchange parameters. *Scientia Horticulturae* **127**: 29-38
- Choi, E.-Y., McNeill, A., Coventry, D., Stangoulis, J. (2006). Whole plant response of crop and weed species to high subsoil boron. *Crop and Pasture Science* **57**: 761-770
- Fallon, K., Phillips, R. (1989). Responses to water stress in adapted and unadapted carrot cell suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* **40**: 681-687
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 317-345
- Francois, L.E. (1984). Effect of excess boron on tomato yield, fruit size and vegetative growth. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **109**: 322-324
- Genard, H., Le Saos, J., Billard, J.-P., Tremolieres, A., Boucaud, J. (1991). Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. *Plant physiology and biochemistry* **29**: 421-427
- Gimeno, V., Simón, I., Nieves, M., Martínez, V., Cámara-Zapata, J.M., García, A.L., García-Sánchez, F. (2012). The physiological and nutritional responses to an excess of boron by Verna lemon trees that were grafted on four contrasting rootstocks. *Trees* **26**: 1513-1526
- Goldberg, S., Shouse, P., Lesch, S., Grieve, C., Poss, J., Forster, H., Suarez, D. (2003). Effect of high boron application on boron content and growth of melons. *Plant and Soil* **256**: 403-411
- Günes, A., Alpaslan, M. (2000). Boron uptake and toxicity in maize genotypes in relation to boron and phosphorus supply. *Journal of plant nutrition* **23**: 541-550
- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E., Coban, S., Sahin, O. (2006). Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **110**: 279-284
- Guo, Y.-P., Zhou, H.-F., Zhang, L.-C. (2006). Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Scientia Horticulturae* **108**: 260-267

- Kaya, C., Tuna, A.L., Dikilitas, M., Ashraf, M., Koskeroglu, S., Guneri, M. (2009). Supplementary phosphorus can alleviate boron toxicity in tomato. *Scientia Horticulturae* **121**: 284-288
- Lovatt, C.J., Bates, L.M. (1984). Early effects of excess boron on photosynthesis and growth of *Cucurbita pepo*. *Journal of Experimental Botany* **35**: 297-305
- Matoh, T. (1997). Boron in plant cell walls. *Plant and Soil* **193**: 59-70
- McCue, K.F., Hanson, A.D. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology* **8**: 358-362
- Nable, R.O., Bañuelos, G.S., Paull, J.G. (1997). Boron toxicity. *Plant and Soil* **193**: 181-198
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1757**: 742-749
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Giannakoula, A. (2004a). Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant Science* **166**: 539-547
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Giannakoula, A. (2004b). Effects of B excess on some physiological and anatomical parameters of 'Navelina' orange plants grafted on two rootstocks. *Environmental and Experimental Botany* **51**: 247-257
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Therios, I.N. (2003). Response of two citrus genotypes to six boron concentrations: concentration and distribution of nutrients, total absorption, and nutrient use efficiency. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**: 571-580
- Parvaiz, A., Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants a review. *Plant Soil and Environment* **54**: 89-99
- Pollard, A.S., Parr, A.J., Loughman, B.C. (1977). Boron in relation to membrane function in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **28**: 831-841
- Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R., Graham, R.D. (2004). A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1405-1414
- Rhodes, D., Hanson, A. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual review of plant biology* **44**: 357-384
- Rivero, R., Ruiz, J., Romero, L. (2004). Importance of N source on heat stress tolerance due to the accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in tomato plants. *Plant Biology* **6**: 702-707
- Robinson, S., Jones, G. (1986). Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Functional Plant Biology* **13**: 659-668
- Rodríguez-Pérez, L. (2006). Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agronomía Colombiana* **24**: 28-37
- Serraj, R., Sinclair, T. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell & Environment* **25**: 333-341

- Sheng, O., Zhou, G., Wei, Q., Peng, S., Deng, X. (2010). Effects of excess boron on growth, gas exchange, and boron status of four orange scion rootstock combinations. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **173**: 469-476
- Simón, I. (2012). Estudio de la tolerancia a la salinidad, toxicidad por boro e inundación en plantas de *Jatropha curcas* L. Univesidad Miguel Hernández
- Sotiropoulos, T.E., Therios, I.N., Dimassi, K.N. (1999). Calcium application as a means to improve tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **81**: 443-449
- Stiles, A.R., Bautista, D., Atalay, E., Babaoğlu, M., Terry, N. (2010). Mechanisms of boron tolerance and accumulation in plants: A physiological comparison of the extremely boron-tolerant plant species, *Puccinellia distans*, with the moderately boron-tolerant *Gypsophila arrostil*. *Environmental science & technology* **44**: 7089-7095
- Takano, J., Miwa, K., Fujiwara, T. (2008). Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in plant science* **13**: 451-457
- Torun, A.A., Yazici, A., Erdem, H., ÇAKMAK, İ. (2006). Genotypic variation in tolerance to boron toxicity in 70 durum wheat genotypes. *Turkish journal of agriculture and forestry* **30**: 49-58
- Torun, B., Kalayci, M., Ozturk, L., Torun, A., Aydin, M., Cakmak, I. (2002). Differences in Shoot Boron Concentrations, Leaf Symptoms, and Yield of Turkish Barley Cultivars Grown on Boron-Toxic Soil in Field. *Journal of plant nutrition* **26**: 1735-1747
- Weimberg, R., Lerner, H., Poljakoff-Mayber, A. (1984). Changes in growth and water-soluble solute concentrations in Sorghum bicolor stressed with sodium and potassium salts. *Physiologia plantarum* **62**: 472-480
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222
- Yang, W.-J., Rich, P.J., Axtell, J.D., Wood, K.V., Bonham, C.C., Ejeta, G., Mickelbart, M.V., Rhodes, D. (2003). Genotypic variation for glycinebetaine in sorghum. *Crop Science* **43**: 162-169
- Yokota, H., Konishi, S. (1990). Effect of the formation of a sugar-borate complex on the growth inhibition of pollen tubes of Camellia sinensis and cultured cells of Nicotiana tabacum by toxic levels of borate. *Soil Science and Plant Nutrition* **36**: 275-281
- Yordanova, R.Y., Popova, L.P. (2007). Flooding induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **29**: 535-541

Capítulo 5

Estudio de la Tolerancia del Portainjerto Citrange Carrizo Micorrizado a la Toxicidad por Boro

UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

5.1. Introducción

El portainjerto citrange Carrizo se caracteriza por dar una buena producción y calidad de fruta cuando se le injerta variedades de mandarina y naranjo, motivo por el cual es el portainjerto más utilizado en España. Sin embargo, citrange Carrizo es uno de los portainjertos de cítricos más sensible al exceso de boro, como ya hemos visto en los capítulos 3 y 4 de esta memoria. La consecuencia más importante de la toxicidad por boro en los cítricos es la reducción de la producción, lo que se traduce en pérdidas económicas importantes para el sector. Una alternativa para mitigar esta toxicidad en los árboles podría ser la incorporación de hongos formadores de micorrizas. Es bien conocido el efecto positivo de las micorrizas ante otros estreses ambientales que sufren los cultivos en las condiciones edafoclimáticas del levante español, como ciclos de sequía, salinidad excesiva, etc. (Navarro y col., 2014). Por lo tanto, en esta tesis se planteó un experimento con el objetivo de estudiar si plantas micorrizadas incrementan la tolerancia al exceso de boro con respecto a plantas no micorrizadas, y que posibles mecanismos fisiológicos, morfológicos y/o nutricionales hacen posible esta mayor tolerancia. Para ello se utilizaron plantas del portainjerto citrange Carrizo no micorrizadas y micorrizadas con la cepa *Glomus intraradices* que se regaron con soluciones nutritivas que contenían diferentes concentraciones de boro (0,25 (control), 5 y 10 mg L⁻¹). Y se realizaron medidas de crecimiento, intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas, nutrición mineral, solutos orgánicos y carbohidratos en los diferentes tejidos de la planta, medidas relacionadas con el metabolismo antioxidante y el porcentaje de colonización micorrícica.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Material Vegetal: citrange Carrizo

Para realizar este experimento se adquirieron plántones de 6 meses de edad, de aproximadamente de 0,5 m de altura, del portainjerto citrange Carrizo (híbrido entre *Poncirus trifoliata* [L.] Raf. × *Citrus sinensis* L.), con su correspondiente certificado y etiqueta oficial de calidad (vivero comercial Vivercitrus 2000, S.L.). La selección de las plantas utilizadas en el ensayo se realizó basándose en la uniformidad de la altura. Antes de empezar los tratamientos de boro, las plantas se trasplantaron a macetas de 7 L de volumen con sustrato

universal de granulometría fina, libre de patógenos y de semillas de malas hierbas. El sustrato utilizado consistió en una mezcla de turba rubia y negra, fibra de coco y perlita (5:4:1 Projar, España). Este sustrato permite una aireación y drenaje suficientes para el buen desarrollo del micelio fúngico (Honrubia y col., 1997), características que también son imprescindibles para un buen desarrollo de la planta (Peñuelas y Filella, 1998).

5.2.2. Inoculación de las plantas con cepas de *Glomus intraradices*

Para la inoculación se empleó un preparado comercial de la cepa *Glomus intraradices* que se conoce con el nombre comercial de MYC 4000 (ITHEC, Castelmaurou-Francia; imagen 5.1). MYC 4000 es un polvo mojable que contiene un concentrado de 4.000 esporas de micorrizas por gramo en un soporte de arcilla de espesor de 150 micras que permite su aplicación con sistemas de filtros (goteros). El proceso de inoculación se realizó en el momento del trasplante de tal forma que se mezclaron 0,5 g del preparado comercial (cantidad recomendada por el fabricante) con la cantidad de sustrato necesaria para rellenar la maceta de 7 L de capacidad. Las dosis aplicadas se consideraron más que suficientes para producir una infección micorrícica, de forma que la cantidad de inóculo no fuese, en ningún caso, un factor limitante en el proceso de infección de la raíz por el hongo.



Imagen 5.1. Preparado comercial MYC 4000 (ITHEC, Castelmaurou-Francia) de la cepa *Glomus intraradices* usado en el ensayo.

5.2.3. Descripción del invernadero y condiciones de cultivo

El experimento se realizó en la finca experimental del CEBAS situada en La Matanza, término municipal de Santomera (a 18 km de Murcia), en un invernadero cuya descripción y condiciones de cultivo se encuentra en el apartado “4.2.2. *Descripción del invernadero y condiciones del cultivo*”.

5.2.4. Concentración de boro en la solución nutritiva

Una vez realizado el trasplante de las plantas a macetas con la mezcla del sustrato + cepa de *G. intraradices*, estas se regaron una vez por semana con agua procedente del trasvase Tajo-Segura durante 2 semanas. Después de este periodo de tiempo las plantas se regaban tres veces por semana con solución nutritiva Hoagland (ya descrita en el apartado “3.2.1. *Descripción del invernadero y condiciones del cultivo*”). El riego se aplicaba mediante un sistema de goteros autocompensantes de 4 L h⁻¹ con un volumen de riego suficiente para que se produjera un 15% de volumen drenado en cada evento de riego. El agua empleada para la preparación de las soluciones nutritivas provenía también del trasvase Tajo-Segura, y la composición de la solución nutritiva se ajustaba según la composición de esta agua.

Tras un mes en estas condiciones, se realizó una medida de fotosíntesis y fluorescencia de clorofila, y se cosecharon hojas tanto de las plantas micorrizadas (+MA) y como de las de sin micorrizar (-MA) para establecer cómo se encontraban las plantas al inicio del experimento (día 0). Posteriormente se iniciaron los diferentes tratamientos de B adicionando a la solución nutritiva de cada tratamiento la siguiente concentración (Imagen 5.2):

- **Control o B0**, (0,25 mg L⁻¹ de B procedente del complejo de micronutrientes Kelkat)
- **B5** (5 mg L⁻¹ de B aplicado como ácido bórico; H₃BO₃).
- **B10** (10 mg L⁻¹ de B aplicado como ácido bórico; H₃BO₃).

El experimento se desarrolló durante los meses de Junio, Julio, Agosto, y Septiembre de 2013. Durante este periodo se iban haciendo medidas periódicas de parámetros de intercambio gaseosos y tomando muestras de hojas, hasta el final del experimento en el que todas las plantas fueron cosechadas por completo.



Imagen 5.2. Vista parcial del sistema de riego y de las cubas con los distintos tratamientos de B (**B0** o **control**: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$; **B5**: 5 mg L^{-1} ; y **B10**: 10 mg L^{-1}) que se emplearon para el experimento.

5.2.5. Determinaciones analíticas

5.2.5.1. Parámetros de crecimiento

Al final del experimento, se cosecharon todas las plantas en donde se separaban y pesaban el peso fresco de hojas, tallo y raíz de cada planta individualmente (8 plantas por tratamiento) mediante una balanza de precisión electrónica portátil. Cada una de estas partes se introdujo en una estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3-4 días, previamente lavadas con abundante agua destilada. Una vez seco el material vegetal, se volvió a pesar para conocer el peso seco de cada uno de los tejidos de la planta. A partir del peso seco de hojas, tallo y raíz, se calculó:

- Biomasa total (BT): suma del peso seco (ps) de hojas, tallo y raíz.
- Fracción Foliar: relación entre el ps foliar y la biomasa total (ps foliar/biomasa total).
- Fracción Tallo: relación entre el ps tallo y la biomasa total (ps tallo/biomasa total).
- Fracción Radicular: relación entre el ps radicular y la biomasa total (ps radicular/biomasa total).

5.2.5.2. Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas

Al inicio del experimento (día 0), durante y al final del mismo, se midieron los parámetros de intercambio gaseoso y de fluorescencia de clorofilas, tal y como se

describen en los apartados “3.2.4.2. *Parámetros de intercambio gaseoso* y 3.2.4.3. *Parámetros de fluorescencia de clorofilas*”.

5.2.5.3. *Determinación de nutrientes minerales*

Para estudiar cómo evolucionó la concentración de B_{foliar} y determinar al final del experimento la concentración del resto de nutrientes en hojas y raíz, se analizaron las muestras cosechadas tal y como se describe en el apartado “3.2.4.4. *Determinación de la concentración de nutrientes minerales*”.

5.2.5.4. *Determinación de la concentración de prolina, compuestos amoniocuaternarios (CAQ) y carbohidratos*

En las muestras, una vez secas y molidas, se midió la concentración de prolina, CAQ y carbohidratos, tal y como se describe en los apartados “3.2.4.5. *Determinación de la concentración de prolina*”, “3.2.4.6. *Determinación de la concentración de compuestos amonio cuaternarios (CAQ)*” y “3.2.4.7. *Determinación de la concentración de carbohidratos*”.

5.2.5.5. *Determinación del metabolismo antioxidante en hoja*

Al final del experimento, se tomaron muestras de hojas en fresco para analizar productos relacionados con el estrés oxidativo, tales como: H_2O_2 y MDA, cuantificadas tal y como se describe en el apartado “3.2.4.8.1. *Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de malonildialdehído (MDA)*”; y de la actividad de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, tales como: CAT, APX, GR y SOD cuantificadas tal y como se describe en el apartado “3.2.4.8.2. *Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes*”.

5.2.5.6. *Determinación del porcentaje de colonización micorrícica*

De las muestras de raíz tomadas al final del experimento se determinó la colonización micorrícica siguiendo el método de Phillips y Hayman (1970).

Digestión de raíces

1. Se tomaron muestras de raíz y se lavaron con abundante agua desionizada y se cortaron segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud.

2. Se colocaron los segmentos en cassettes y se introdujeron en un vaso de precipitado con KOH al 10%.
3. Se introdujo el vaso con las muestras en un baño termostático a 95 °C durante aproximadamente 2 h. Transcurrido ese tiempo, se volvieron a lavar las raíces con agua desionizada.
4. Se sumergieron las muestras en H₂O₂ durante 3-4 min. Transcurrido ese tiempo se volvieron a lavar las raíces con agua desionizada.
5. Se sumergieron las muestras en HCl 0,1 N durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se eliminó el HCl con abundante agua desionizada.

Aplicación del tinte

1. Se sumergieron los cassettes en vasos con tinta Parker al 6% y se llevaron a un baño termostático a 95 °C durante aproximadamente 10 min.
2. Se eliminó el colorante y se añadió a las muestras glicerol ácido (1:1, v/v), para eliminar completamente el colorante restante y mantener las muestras.
3. Una vez concluido el lavado, se introdujeron los cassettes en un tarro y se conservaron en frío hasta su observación al microscopio.

Preparación de las muestras para su observación en el microscopio

1. Se tomaron fragmentos de 1 cm de longitud y se colocaron en los portaobjetos.
2. Se añadió una gota de solución de montaje y se les colocó los cubres.

Cuantificación de la colonización micorrízica

Para cuantificar la presencia de hifas en los segmentos de raíz de 1 cm de longitud se estableció un código numérico que iba de 0 a 4, donde el **0** indica que el hongo no estaba presente en la raíz y el **4** indica la presencia del micelio en la raíz en valores superiores al 90% (Tabla 5.1). Además se utilizó otro código para describir que estructuras fúngicas habían en la raíz: R (no presencia del hongo), H (hifas), HA (hifas y arbusculos), HV (hifas y vesículas) y HAV (hifas, arbusculos y vesículas). Para determinar el porcentaje de incidencia se empleó la siguiente fórmula según Hayman y col. (1976):

$$\% \text{ incidencia} = (\text{n}^\circ \text{ de raicillas infectadas} / \text{n}^\circ \text{ total de raicillas observadas}) \times 100$$

Tabla 5.1. Valores asignados a cada porcentaje de presencia de hifas en las raicillas (1 cm de longitud).

| Código numeración | Proliferación micelio fúngico | Presencia de micelio en raíz (%) |
|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| 0 | Nula | 0% |
| 1 | Baja | 1-39% |
| 2 | Normal | 40-69% |
| 3 | Alta | 70-89% |
| 4 | Muy alta | ≥90% |

5.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental de este ensayo fue bifactorial con dos tratamientos de micorrizas (-MA, plantas de citrange Carrizo sin micorrizar; y +MA, plantas de citrange Carrizo micorrizadas) × tres tratamientos de boro (0,25 (control), 5 y 10 mg L⁻¹), con 8 plantas por combinación Micorriza × Boro, las cuales estaban distribuidos al azar en las mesas de cultivo del invernadero. El análisis estadístico incluyó un ANOVA bifactorial (Micorrizas × Boro) mediante el paquete estadístico SPSS versión 19. Cuando en el ANOVA resultó significativo (P<0.05), se aplicó el test de rango múltiple de Duncan para la separación de medias entre los diferentes tratamientos. Los valores que se presentan en las tablas y figuras para cada tratamiento son las medias de 8 plantas seguidas del error estándar de la media (± ES). En el caso de las figuras y tablas, cuando la interacción fue significativa, se utilizaron para cada tratamiento de micorrizas las *letras minúsculas* (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA) para indicar diferencias significativas entre los tratamientos de boro establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan; mientras que para cada tratamiento de boro, se utilizaron las *letras mayúsculas* (A,B) para indicar las diferencias significativas entre plantas -MA y +MA.

5.3. Resultados

5.3.1. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro

Tanto en plantas de citrange Carrizo inoculadas con *Glomus intraradices* (+MA) como en las no inoculadas (-MA), los síntomas de toxicidad por boro comenzaron por un amarilleamiento del ápice y de los bordes de las hojas, seguido de quemaduras y posterior caída prematura. En las plantas regadas con 10 mg L⁻¹ de B, los síntomas se manifestaron a la vez tanto en plantas de +MA como en -MA a los 36 días de iniciarse el tratamiento. En el caso de las plantas sometidas al

tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B, se detectaron los síntomas antes en -MA (a los 45 días) que en las +MA, concretamente 12 días antes. Aunque no se realizaron medidas intermedias de la defoliación sufrida durante el tiempo que duró el experimento, se puede afirmar, según las observaciones visuales durante el mismo, que ésta fue más severa en las plantas -MA que en las +MA, independientemente de la dosis de boro aplicada (Imagen 5.3).

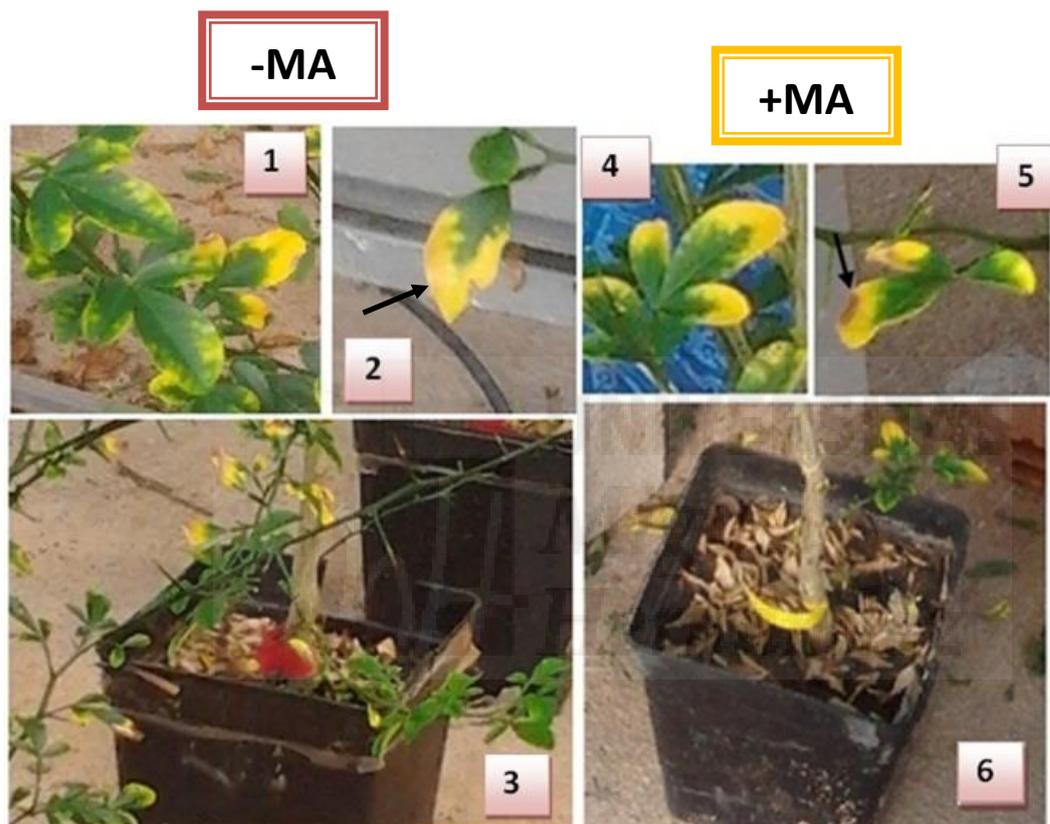


Imagen 5.3. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro en plantas de citrange Carrizo sin micorrizar (-MA) y micorrizado (+MA). 1: amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja. 2: quemaduras (*flecha negra*). 3: necrosis y defoliación prematura. 4: amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja. 5: quemaduras (*flecha negra*). 6: necrosis y defoliación prematura.

5.3.2. Porcentaje de colonización micorrícica

Las plantas de citrange Carrizo micorrizadas no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de colonización después de 84 días de tratamiento con respecto a los tratamientos de boro (Tabla 5.2). Donde sí se observó el efecto del boro fue en la proliferación del micelio intrarradial. Mientras que las +MA/0,25 mg L⁻¹ de B presentaban una proliferación del micelio normal (es decir, se detectó presencia de hifas en el 40-69% de la superficie de raíz observada), las

+MA sometidas a exceso de boro (5 y 10 mg L⁻¹) vieron reducida esa extensión de infección a porcentajes inferiores del 40% (1-39%), considerándose una infección baja (Tabla 5.2 e imagen 5.4). Tanto en las raíces del tratamiento control como en las regadas con exceso de B (5 y 10 mg L⁻¹), las estructuras fúngicas que más predominaban fueron los apresorios (modificación de las hifas para la infección de una célula epidérmica vegetal), lo que indica que el proceso de simbiosis se encontraba en las etapas tempranas de la infección (Imagen 5.4). En las muestras de raíz de las plantas control (0,25 mg L⁻¹ de B) se observaron algunas vesículas, pero no en las de exceso de B (5 y 10 mg L⁻¹); y en ningún tratamiento de B se pudo visualizar bien alguna estructura arbuscular.

Tabla 5.2. Colonización radicular y extensión de la infección de plantas citrange Carrizo micorrizadas (+MA) bajo condiciones de toxicidad por boro.

| Carrizo inoculado | Tratamientos de Boro (mg L ⁻¹) | | | ANOVA |
|-------------------------------|--|------|------|-------|
| | 0.25 | 5 | 10 | Boro |
| Colonización micorrizas (%) | 65,1 | 62,5 | 65,8 | ns |
| Proliferación del micelio (%) | 40-69 | 1-39 | 1-39 | * |

“ns” indica que no hay diferencias significativas al 95% y * indica diferencias significativas para $P < 0.05$ entre los tratamientos de boro ($n = 8$).

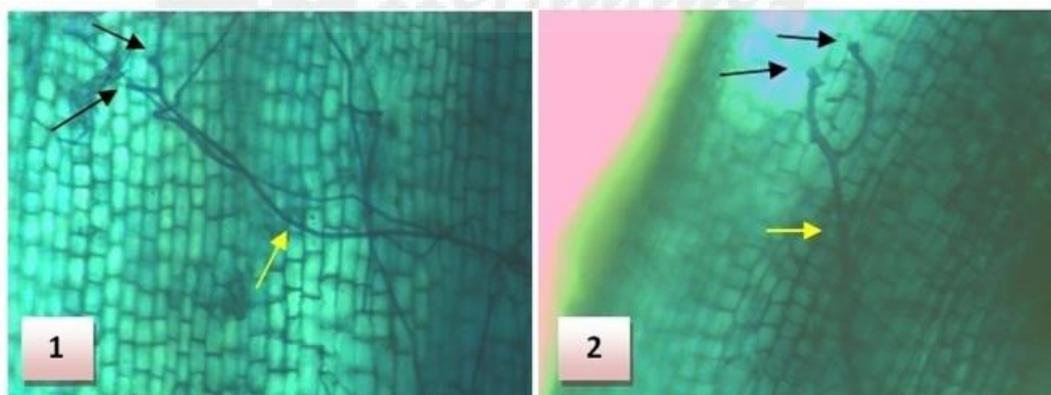


Imagen 5.4. Raíces micorrizadas sin B (1) y con B, independientemente de la dosis de boro aplicada (2). Hifas intracelulares de la raíz (flecha amarilla) y apresorios (flecha negra) a 10X.

5.3.3. Parámetros de crecimiento

Al final del experimento se cosecharon todas las plantas, y se midieron los parámetros de crecimiento vegetativo (Figura 5.1). En las plantas +MA del tratamiento control (plantas micorrizadas que no recibieron un exceso de boro) se

observó que las micorrizas produjeron una disminución del 34% de la biomasa seca total en relación a las plantas no micorrizadas (-MA), y esto fue debido a la disminución en el crecimiento de los tres órganos, aunque esta reducción fue mucho más acusada en las hojas (43%) y tallo (37%) que en la raíz (23%).

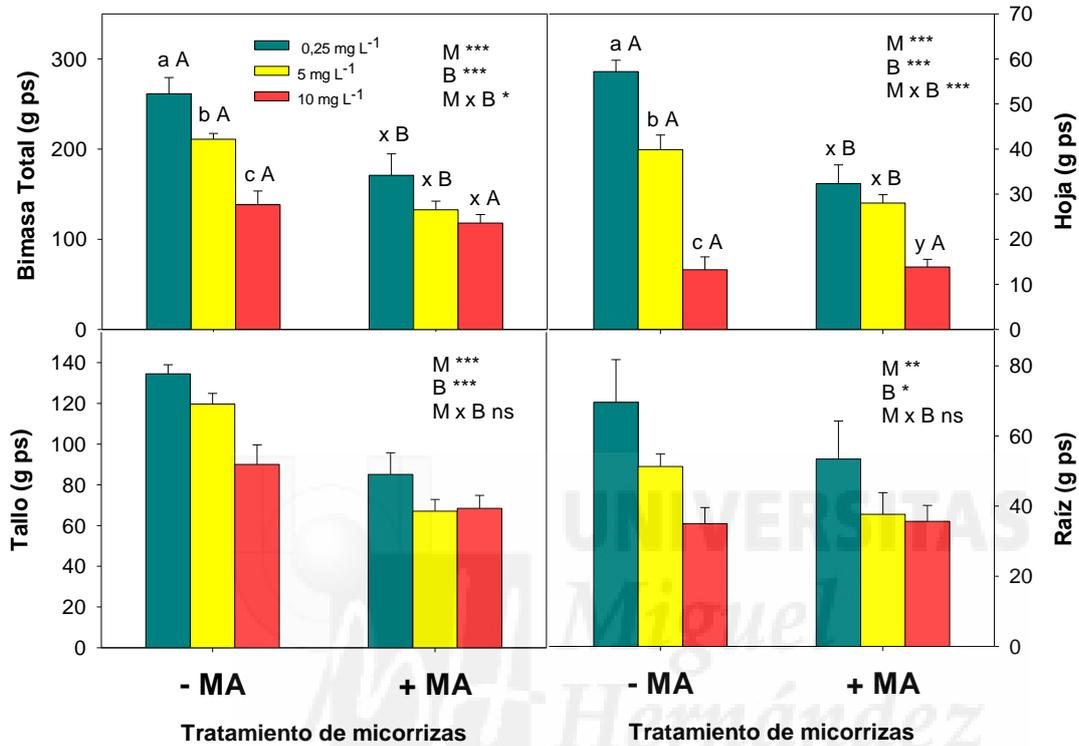


Figura 5.1. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la biomasa seca total, foliar, tallo y radicular en plantas citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA). “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). Letras mayúsculas diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

Los tratamientos de boro disminuyeron el peso seco de las hojas tanto en las plantas +MA como en las -MA. Sin embargo, esta disminución fue menor en las plantas +MA. Así, los tratamientos +MA/5 mg L⁻¹ y +MA/10 mg L⁻¹ de B redujeron el peso seco foliar en un 13% y 57%, respectivamente, frente a su control (+MA/0,25 mg L⁻¹ de B); mientras que los tratamientos -MA/5 mg L⁻¹ y -MA/10 mg L⁻¹ de B lo redujeron en un 30% y 77%, respectivamente.

Los pesos secos de la raíz y del tallo mostraron diferencias significativas tanto para la estrategia de micorrización (M) como para los tratamientos con boro

(B), pero no se observó una interacción significativa entre ambos factores. Independientemente de si las plantas estaban micorrizadas o no, al incrementar la concentración de boro en la solución nutritiva tendió a disminuir el peso seco del tallo y de la raíz. El peso seco del tallo fue el que se vio menos afectado de los dos tejidos, sufriendo una reducción del 15% en el tratamiento de 5 mg L⁻¹ y del 23% en el de 10 mg L⁻¹ de B; mientras que en la raíz, los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B no mostraron diferencias significativas entre ellos; reduciéndose en ambos casos en un 35% con respecto al tratamiento control (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva y la micorrización sobre el peso seco del tallo y la raíz de plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA).

| Factor principal. | | Tallo (g ps) | Raíz (g ps) |
|-------------------|-------------------------|--------------|-------------|
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 109,8 a | 61,51 a |
| | 5 mg L ⁻¹ | 93,38 ab | 44,46 b |
| | 10 mg L ⁻¹ | 79,23 b | 35,32 b |
| ANOVA | | *** | * |
| Micorriza | -MA | 51,96 | 114,8 |
| | +MA | 42,23 | 73,53 |
| ANOVA | | *** | ** |

** , ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada columna, valores con la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para n=24 y 16 repeticiones para los tratamientos de boro y micorrizas, respectivamente.*

Los efectos de los tratamientos de exceso de boro comentados anteriormente sobre las hojas, tallo y raíz dieron como resultado que en la biomasa seca total las plantas -MA redujeran este parámetro en proporción a la concentración de B aplicada (reducción del 19% para el tratamiento de 5 mg L⁻¹ y del 47% para el de 10 mg L⁻¹ de B), mientras que en las plantas +MA también hubo una tendencia a disminuir la biomasa seca total pero no de forma significativa entre estos y el tratamiento control (Figura 5.1).

Con los datos de peso seco de las hojas, tallo y raíz se calculó como se distribuyó la biomasa total de las plantas entre sus respectivos órganos (fracción de hoja, fracción de tallo, y fracción de raíz; tabla 5.4). En la fracción foliar el B afectó de manera diferente en función de si las plantas estaban micorrizada o no. Las plantas -MA fueron disminuyendo cada vez más la fracción de hoja a medida que

se aumentaba la concentración de B en la solución de riego, mientras que las +MA solamente la disminuyó en la de mayor dosis de B (10 mg L^{-1}).

Tabla 5.4. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la fracción foliar, tallo y radicular en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA).

| Factor principal | | Frac. Foliar | Frac. Tallo | Frac. Radicular |
|-------------------------|--------------------------|--------------|-------------|-----------------|
| Micorriza | -MA | 0,17 | 0,58 | 0,25 |
| | +MA | 0,17 | 0,53 | 0,29 |
| Boro | 0.25 mg L^{-1} | 0,21 a | 0,51 b | 0,28 |
| | 5 mg L^{-1} | 0,20 a | 0,54 b | 0,26 |
| | 10 mg L^{-1} | 0,11 b | 0,62 a | 0,28 |
| Micorrizas × Boro | | | | |
| -MA | 0.25 mg L^{-1} | 0,22 aA | 0,52 | 0,25 |
| | 5 mg L^{-1} | 0,19 bB | 0,57 | 0,24 |
| | 10 mg L^{-1} | 0,09 cB | 0,66 | 0,25 |
| +MA | 0.25 mg L^{-1} | 0,19 xB | 0,50 | 0,31 |
| | 5 mg L^{-1} | 0,21 xA | 0,51 | 0,28 |
| | 10 mg L^{-1} | 0,12 yA | 0,58 | 0,30 |
| Micorriza | | ns | ** | * |
| Boro | | *** | *** | ns |
| Micorriza × Boro | | * | ns | ns |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. Para el factor Boro y para cada estrategia de micorrización en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). En la interacción los valores son las medias de 8 repeticiones.

Respecto a la fracción del tallo, observamos que hubo diferencias tanto a nivel de estrategia de micorrización como de tratamiento de boro, pero no así su interacción. Las plantas -MA presentaron mayor fracción de tallo que las +MA ($0,58$ y $0,53$, respectivamente); y al aumentar la dosis de B en la solución nutritiva tendió a incrementar la fracción del tallo siendo solamente significativos los valores para el tratamiento de 10 mg L^{-1} de B con respecto al control. Por lo tanto las plantas que tuvieron una mayor fracción de tallo fueron las del tratamiento -MA/ 10 mg L^{-1} de B (Tabla 5.4).

Respecto a la fracción radicular observamos que dependió solamente de la micorrización; así independientemente del B aplicado a la solución nutritiva, las

plantas micorrizadas presentaron mayor fracción de raíz (0,29) que las no micorrizadas (0,25).

5.3.4. Concentración boro en los diferentes tejidos de las plantas

El uso de solución nutritiva con exceso de B supuso un incremento gradual en la concentración de boro en hoja (B_{foliar}) a lo largo de todo el experimento, observándose siempre una mayor concentración de boro en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B que en el de 5 mg L⁻¹ de B (Figura 5.2). Las diferencias significativas entre los tratamientos con exceso de boro (5 y 10 mg L⁻¹) y el tratamiento control se observaron en el segundo muestreo que se analizó (a los 23 días), y alcanzaron los valores máximos a los 84 días, por lo que la acumulación de B_{foliar} fue progresiva, no alcanzando ningún estado estacionario.

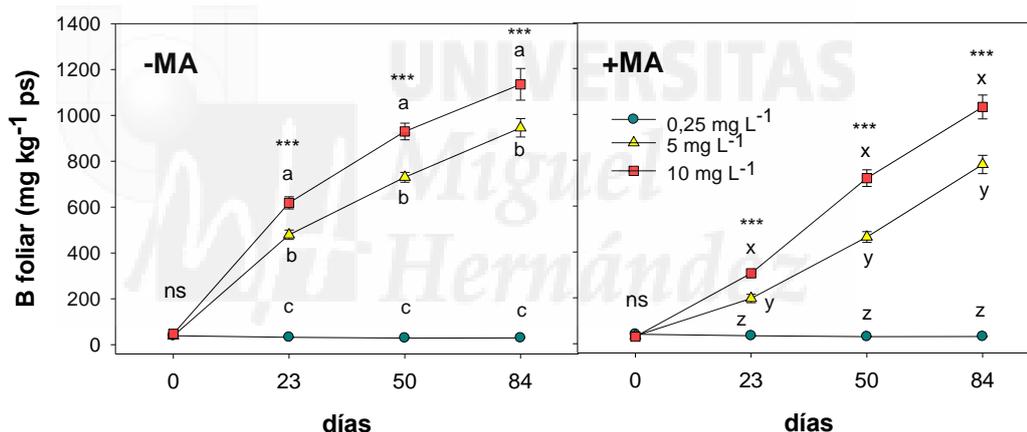


Figura 5.2. Evolución de la concentración de B_{foliar} en respuesta al exceso de B en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) durante los 84 días que duró el experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; *** indican diferencias significativas para $P < 0.001$, respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, y las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

Las micorrizas también jugaron un papel fundamental en la acumulación de boro en las hojas, ya que las plantas micorrizadas siempre tuvieron menor concentración de B_{foliar} que las plantas no micorrizadas. Por ejemplo, a los 23 días de tratamiento las plantas -MA/5 y -MA/10 mg L⁻¹ de B presentaron una concentración de B_{foliar} de 479,4 y 618,7 mg kg⁻¹ ps, respectivamente; mientras que las plantas +MA de ambos tratamientos presentaron valores muy por debajo, siendo 197,1 y 306,7 mg kg⁻¹ ps, respectivamente (Tabla 5.5). Al final del experimento

(a los 84 días) se observaron diferencias significativas para el boro y las micorrizas, aunque su interacción no fue significativa. Así, las hojas acumularon en los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B entre 28 y 36 veces más que su control, respectivamente. Teniendo presente como factor principal las micorrizas, las plantas -MA tuvieron más B_{foliar} (703,6 mg kg⁻¹ ps) que las plantas del tratamiento +MA (615,01 mg kg⁻¹ ps). Por lo tanto, comparando los 6 tratamientos, la combinación -MA/10 mg L⁻¹ fue la que alcanzó una mayor concentración de boro en hojas (1135 mg kg⁻¹ ps).

Tabla 5.5. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva a los 0, 23, 50 y 84 días de iniciarse el ensayo sobre la concentración B_{foliar} en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) o micorrizadas (+MA).

| Factor Principal | | B foliar (mg kg ⁻¹ ps) | | | |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|
| | | 0 días | 23 días | 50 días | 84 días |
| Micorriza | -MA | 41,76 | 376,9 | 563,1 | 703,6 |
| | +MA | 35,44 | 179,4 | 406,0 | 615,0 |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 40,18 | 33,48 c | 30,14 c | 30,44 c |
| | 5 mg L ⁻¹ | 36,40 | 338,3 b | 597,7 b | 863,7 b |
| | 10 mg L ⁻¹ | 39,22 | 426,7 a | 825,8 a | 1083,8 a |
| Micorriza × Boro | | | | | |
| -MA | 0.25 mg L ⁻¹ | 39,04 | 32,53 cA | 29,28 cA | 29,57 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 38,78 | 479,4 bA | 730,1 bA | 945,8 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 47,47 | 648,7 aA | 929,8 aA | 1135,5 |
| +MA | 0.25 mg L ⁻¹ | 41,32 | 34,44 zA | 30,99 zA | 31,31 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 34,01 | 197,1 yB | 465,3 yB | 781,6 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 30,98 | 306,7 xB | 721,7 xB | 1032,1 |
| Micorriza | | ns | *** | *** | * |
| Boro | | ns | *** | *** | *** |
| Micorriza × Boro | | ns | *** | *** | ns |

“ns” indica significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para P<0.05 y 0.001, respectivamente. Para el factor Boro y para cada estrategia de micorrización en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). En la interacción los valores son las medias de 8 repeticiones.

En el tallo y la raíz, al final del experimento (a los 83 días), la concentración de B aumentó también al aumentar la adición externa de B (Figura 5.3), pero la micorrización ayudó a disminuir la concentración. Para ambos tratamientos de boro, las plantas -MA tuvieron una concentración de 54,8 mg kg⁻¹ ps y 78,6 mg kg⁻¹ ps,

para tallo y raíz, respectivamente; mientras que las plantas +MA acumularon 48,43 mg kg⁻¹ ps de B en tallo y 66,73 mg kg⁻¹ ps de B en raíz (Tabla 5.6).

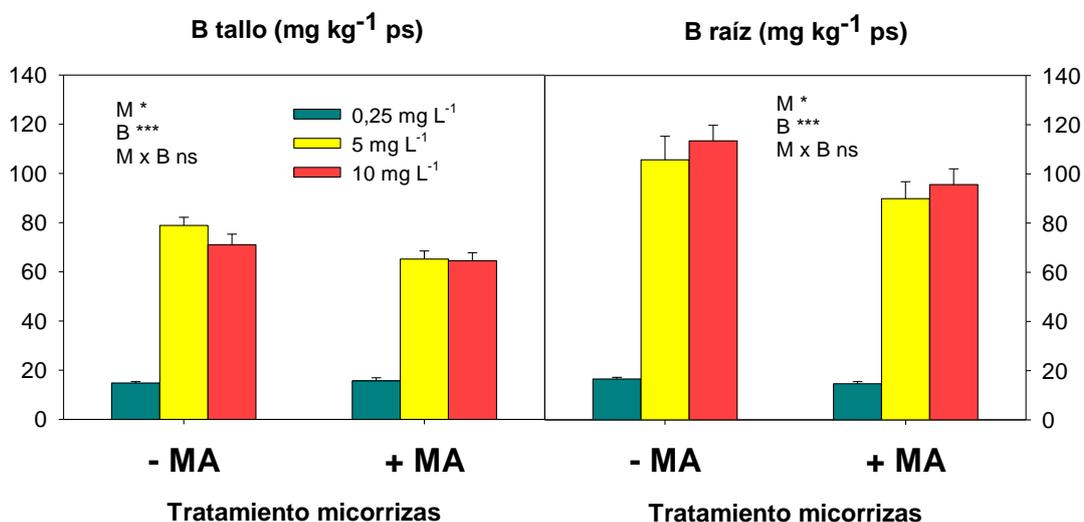


Figura 5.3. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B en tallo y raíz en plantas de citrange Carrizo no micorrizada (-MA) y micorrizada (+MA) a los 84 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

Tabla 5.6. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B en tallo y raíz en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento.

| Factor principal | | B tallo (mg kg ⁻¹ ps) | B radicular (mg kg ⁻¹ ps) |
|------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Micorriza | -MA | 54,86 | 78,57 |
| | +MA | 48,43 | 66,74 |
| ANOVA | | * | * |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 15,22 b | 15,65 b |
| | 5 mg L ⁻¹ | 71,97 a | 97,79 a |
| | 10 mg L ⁻¹ | 67,73 a | 104,5 a |
| ANOVA | | * | * |

* indica diferencias significativas para $P < 0.05$. Para cada columna, valores con la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=24$ y 16 repeticiones para los tratamientos de boro y micorrizas, respectivamente.

Tanto en el tallo como la raíz, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de boro (5 y 10 mg L⁻¹). En el tallo, la media de ambos tratamientos fue de 5 veces el valor de su control; mientras que en el caso de la raíz, fue de 6 veces más que el valor de su control (Tabla 5.6). Comparando la concentración de boro por tejidos se observa el siguiente orden de mayor a menor

concentración: hojas > raíz > tallo, y este orden se mantiene tanto para plantas -MA como para +MA.

5.3.5. Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas

A largo del experimento se hicieron medidas de los parámetros de intercambio gaseoso tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y transpiración foliar (E_{leaf}), y con estos datos se calcularon el uso eficaz del agua (UEA= A_{CO2}/E_{leaf}) y la concentración de CO₂ subestomático (C_i). En la tabla 5.7 hemos puestos los valores de A_{CO2} y E_{leaf} del tratamiento control. Aquí se puede ver cómo para el tratamiento de 0,25 mg L⁻¹ de B no existió un efecto significativo con la micorrización para la A_{CO2} y E_{leaf}, obteniéndose un valor promedio de 10,65 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ y 2,65 mmol m⁻² s⁻¹, respectivamente. En la figura 5.4 se representan la A_{CO2} y E_{leaf} como porcentaje relativo a los valores del tratamiento control (0,25 mg L⁻¹ de B) para cada uno de los días que se hicieron las medidas y tratamiento de micorrización. En la evolución de la A_{CO2} y E_{leaf} con el tiempo, se observó en las plantas -MA que estos parámetros se vieron afectados por el de boro a partir del día 50. En esa medida, se observó como en las plantas regadas con el tratamiento de boro de 10 mg L⁻¹ la A_{CO2} y E_{leaf} se vio reducida un 75 y 65%, respectivamente, relativo al tratamiento control.

Tabla 5.7. Efectos de la micorrización sobre la tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y transpiración foliar (E_{leaf}) en plantas del tratamiento control (0,25 mg L⁻¹ de B) a lo largo del experimento.

| Tratamiento de 0,25 mg L ⁻¹ de B | | | | | | | | |
|---|--|------|------|------|---|------|------|------|
| Micorrizas | A _{CO2} (μmol m ⁻² s ⁻¹) | | | | E _{leaf} (mmol m ⁻² s ⁻¹) | | | |
| | 0 d | 23 d | 50 d | 84 d | 0 d | 23 d | 50 d | 84 d |
| -MA | 10,1 | 11,2 | 10,0 | 12,3 | 1,7 | 2,9 | 2,7 | 3,6 |
| +MA | 9,6 | 9,4 | 12,5 | 10,2 | 1,8 | 2,2 | 2,6 | 3,7 |
| ANOVA | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

“ns” significa diferencias no significativas al 95% (n=6) entre plantas -MA (no micorrizadas) y +MA (micorrizadas).

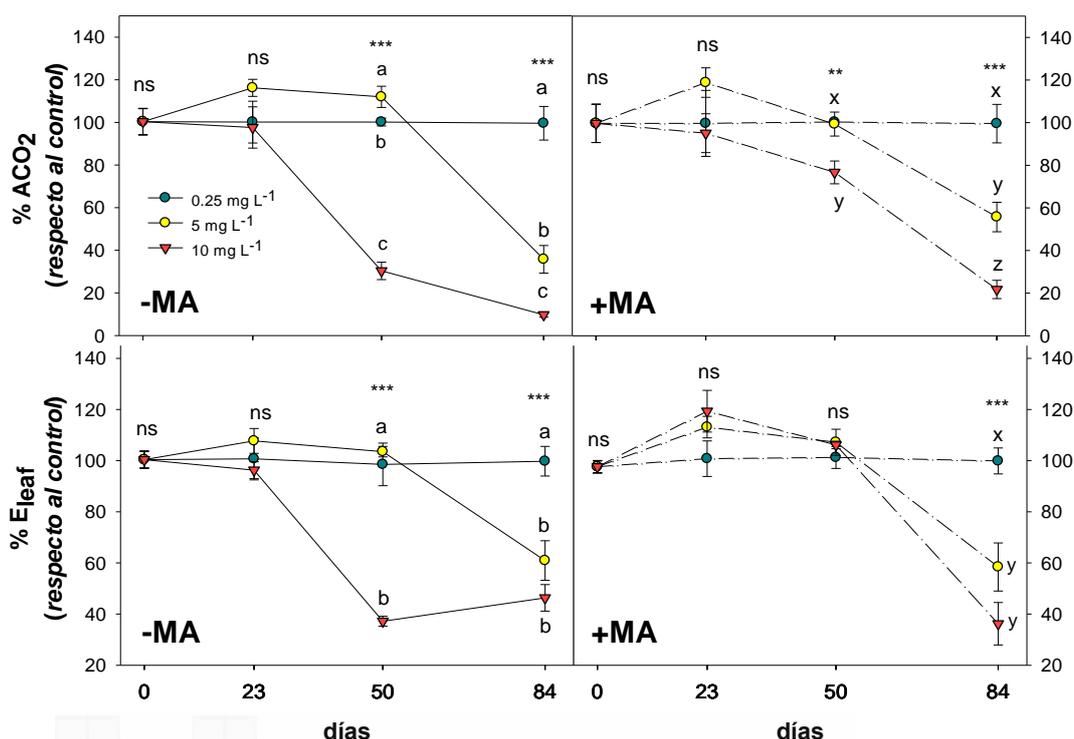


Figura 5.4. Evolución de la tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y de la transpiración foliar (E_{leaf}) en respuesta al exceso de B en la solución nutritiva en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) durante los 84 días que duró el experimento. Los datos son expresados como porcentaje relativo a los datos del tratamiento control. “ns” no diferencias significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para P<0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). La barra vertical indica el error estándar de la media (n=6).

Tabla 5.8. Análisis de la varianza de la asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y de la transpiración foliar (E_{leaf}) para los factores: micorriza, tratamientos de boro (B) y su interacción.

| | 0 días | 23 días | 50 días | 84 días |
|---|--------|---------|---------|---------|
| ANOVA - Asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) | | | | |
| Factor Principal | | | | |
| Micorriza | ns | * | *** | ns |
| Boro | ns | ns | *** | *** |
| Micorriza × Boro | ns | ns | *** | * |
| ANOVA - Transpiración foliar (E_{leaf}) | | | | |
| Micorriza | ns | *** | *** | ns |
| Boro | ns | ns | *** | *** |
| Micorriza × Boro | ns | ns | *** | ns |

“ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para P<0.05 y 0.001, respectivamente (n=6)

En la medida del día 84, continuó descendiendo la A_{CO_2} del tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B y de 5 mg L⁻¹ de B, aunque en este último en menor medida que el del tratamiento de mayor concentración. En esa misma medida, la E_{leaf} del tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B se mantuvo baja pero estable en relación a la del día 50, pero sí que disminuyó para el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B. En la evolución de las plantas +MA se observa una tendencia parecida al de las plantas -MA, pero las diferencias entre el tratamiento control y los tratamientos con exceso de boro son menores. En la medida hecha a los 50 días, las plantas +MA redujeron la A_{CO_2} significativamente solamente con el tratamiento de B de 10 mg L⁻¹ y ninguno de estos dos tratamientos afectó a la E_{leaf} . En la medida a los 84 días, los dos tratamientos de boro disminuyeron ambos parámetros (A_{CO_2} y E_{leaf}).

Centrándonos en los resultados obtenidos a los 84 días podemos ver claramente como la micorrización reduce los efectos negativos en los parámetros de intercambio gaseoso. Siendo, para la A_{CO_2} en el tratamiento de +MA/5 mg L⁻¹ de B el porcentaje de reducción del 44% con respecto a su control, mientras que el tratamiento -MA/5 mg L⁻¹ de B fue de casi el doble, 78%; lo mismo ocurre para el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B, mientras que las +MA vieron reducida su A_{CO_2} en un 64%, las -MA la vieron reducida en un 90% (Figura 5.5).

En el UEA, se observó como las plantas procedentes del tratamiento +MA/0,25 mg L⁻¹ de B reducían en un 20% su $UEA_{fisiológico}$ respecto a las -MA/0,25 mg L⁻¹ de B; sin embargo, cuando se añadió un exceso de B a la solución nutritiva, se comprobó que afectaba más a las -MA, viéndose reducido dicho parámetro en un 42% para el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B y un 78% para el de 10 mg L⁻¹ de B (Figura 5.5). En el caso de las plantas +MA, se observó que su $UEA_{fisiológico}$ no disminuyó en el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B, mientras que en el de 10 mg L⁻¹ de B su reducción fue del 36%.

Para el parámetro C_i , los controles de ambas estrategias de micorrización (-MA y +MA) presentaron valores muy similares, 234 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ para -MA y 235 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ para +MA (Figura 5.5). Por otro lado, mientras que en +MA no se observaron diferencias significativas para los distintos tratamientos de B, en plantas -MA el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B disminuyó este parámetro alcanzando un valor de 197,85 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; sin embargo, no hubo diferencias entre el control y el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B.

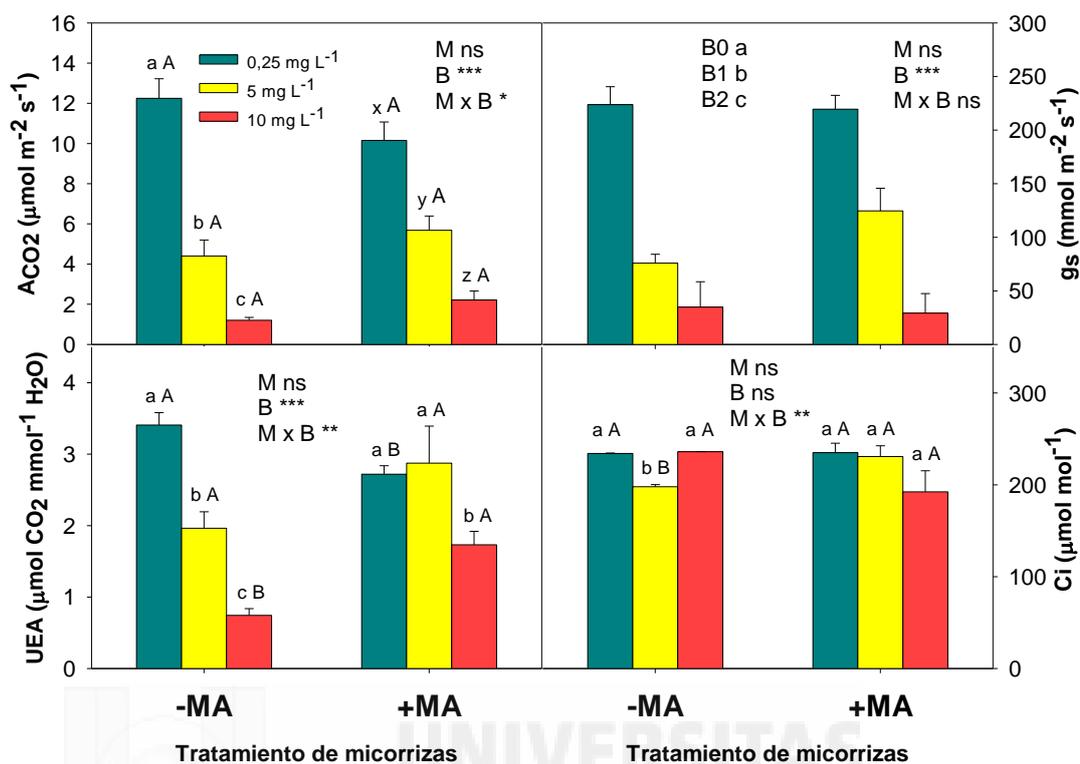


Figura 5.5. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}), conductancia estomática (g_s), uso eficiente del agua fisiológico (UEA_{fisiológico} = A_{CO2}/E_{leaf}) y concentración de CO₂ subestomático (C_i) en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). *Letras mayúsculas* diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media (n=6).

Para la conductancia estomática (g_s), ambas estrategias de micorrización se comportan de la misma forma ante el aumento de la concentración de B en la solución nutritiva, disminuyendo a medida que la concentración de B es mayor. Con el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B se produjo una reducción del 55% y para el de 10 mg L⁻¹ de B fue del 85%, respecto al control.

Respecto a los parámetros de fluorescencia, como se observa en la tabla 5.9, en ninguno de los tres parámetros estudiados (Fv'/Fm', qP y Φ_{PSII}) el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

Tabla 5.9. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la eficacia fotoquímica del PSII (Φ_{PSII}), la eficiencia de las antenas en el PSII (Fv'/Fm') y el coeficiente “Quenching Fotoquímico” (qP) en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) durante los 84 días que duró el experimento.

| Factor Pral. | | Fv'/Fm' | qP | Φ_{PSII} |
|--------------------------|-------------------------|---------|-------|---------------|
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 0,672 | 0,677 | 0,457 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 0,699 | 0,581 | 0,407 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 0,690 | 0,629 | 0,440 |
| Micorriza | -MA | 0,682 | 0,615 | 0,422 |
| | +MA | 0,692 | 0,644 | 0,447 |
| Micorrizas × Boro | | | | |
| -AM | 0.25 mg L ⁻¹ | 0,660 | 0,686 | 0,453 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 0,715 | 0,564 | 0,404 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 0,671 | 0,595 | 0,409 |
| +AM | 0.25 mg L ⁻¹ | 0,684 | 0,669 | 0,461 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 0,684 | 0,599 | 0,411 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 0,710 | 0,664 | 0,471 |
| Micorrizas | | ns | ns | ns |
| Boro | | ns | ns | ns |
| Micorriza × Boro | | ns | ns | ns |

“ns” indica que no hay diferencias significativas al 95% entre los tratamientos. En la interacción los valores son la media de 6 repeticiones.

5.3.6. Concentración mineral foliar y radicular en la planta

En las hojas, de todos los minerales analizados aquellos que presentaron diferencias significativas en alguno de los factores estudiados fueron: Ca, P, Na, Cu y Mn (Tabla 5.10). Cu y Mn fueron los únicos que mostraron diferencias significativas para la interacción M × B. Respecto al Cu, las -MA y las +MA del tratamiento control presentan valores muy similares, siendo de 3,58 y 3,10 mg kg⁻¹ps, respectivamente (Tabla 5.10). Las plantas +MA en los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B incrementaron significativamente la concentración de Cu respecto a su control, pero no se observó diferencias significativas entre ellos (4,44 y 4,23 mg kg⁻¹ ps, respectivamente). En las plantas -MA, el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B también aumentó ligeramente, pero el análisis estadístico no mostró diferencias significativas respecto a su control (4,38 mg kg⁻¹ ps); sin embargo el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B, incrementó la concentración de Cu duplicándola con respecto al control (Tabla 5.10).

Tabla 5.10. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de Ca, P, Na, Cu y Mn foliar y radicular en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento.

| | | Hoja | | | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Factor principal | | Ca (mg g ⁻¹ ps) | P (mg g ⁻¹ ps) | Na (mg g ⁻¹ ps) | Cu (mg kg ⁻¹ ps) | Mn (mg kg ⁻¹ ps) |
| Micorriza | -MA | 21,4 | 2,1 | 0,15 | 4,81 | 55,99 |
| | +MA | 19,4 | 2,0 | 0,14 | 3,92 | 42,26 |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 19,1 b | 2,0 b | 0,13 b | 3,34 c | 57,39 a |
| | 5 mg L ⁻¹ | 23,4 a | 1,8 b | 0,13 b | 4,41 b | 52,45 a |
| | 10 mg L ⁻¹ | 18,5 b | 2,3 a | 0,19 a | 5,36 a | 37,55 b |
| | | Micorriza × Boro | | | | |
| -MA | 0.25 mg L ⁻¹ | 18,2 | 2,0 | 0,15 | 3,58 bA | 69,78 aA |
| | 5 mg L ⁻¹ | 23,2 | 1,9 | 0,13 | 4,38 bA | 60,06 aA |
| | 10 mg L ⁻¹ | 16,7 | 2,1 | 0,20 | 6,19 aA | 36,54 bA |
| +MA | 0.25 mg L ⁻¹ | 19,9 | 2,1 | 0,11 | 3,10 yA | 45,00 xB |
| | 5 mg L ⁻¹ | 23,7 | 1,8 | 0,13 | 4,44 xA | 44,84 xB |
| | 10 mg L ⁻¹ | 20,6 | 2,5 | 0,18 | 4,23 xB | 36,96 xA |
| Micorriza | | ns | ns | ns | * | *** |
| Boro | | ** | *** | * | *** | *** |
| Micorriza × Boro | | ns | ns | ns | * | ** |
| | | Raíz(mg g⁻¹ps) | | | | |
| Factor principal | | K | Ca | Mg | P | Na |
| Micorriza | -MA | 21,1 | 13,7 | 2,3 | 2,0 | 1,2 |
| | +MA | 15,4 | 14,0 | 2,0 | 2,4 | 0,7 |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 18,4 | 14,9 a | 2,3 a | 2,5 a | 0,8 b |
| | 5 mg L ⁻¹ | 19,7 | 14,9 a | 2,4 a | 2,3 a | 1,1 a |
| | 10 mg L ⁻¹ | 16,7 | 11,7 b | 1,8 b | 1,8 b | 0,8 b |
| | | Micorriza × Boro | | | | |
| -MA | 0.25 mg L ⁻¹ | 14,6 | 15,9 | 2,1 | 2,6 | 0,5 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 18,8 | 14,6 | 2,3 | 2,7 | 0,8 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 12,6 | 11,9 | 1,7 | 2,1 | 0,7 |
| +MA | 0.25 mg L ⁻¹ | 22,2 | 14,3 | 2,5 | 2,5 | 1,0 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 20,5 | 15,1 | 2,4 | 2,0 | 1,4 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 20,3 | 11,5 | 1,9 | 1,5 | 1,0 |
| Micorriza | | *** | ns | ** | ** | *** |
| Boro | | ns | * | *** | ** | ** |
| Micorriza × Boro | | ns | ns | ns | ns | ns |

“ns” indica diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para el factor Boro y para cada estrategia de micorrización en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). En la interacción los valores son las medias de 8 repeticiones.

Para el Mn, se observó diferencias entre los dos tratamientos de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de B; mientras que -MA presentó un valor de casi 70 mg kg^{-1} ps, las +MA vieron reducido dicho valor en un 38%. Además, las plantas del tratamiento +MA no presentaron diferencias significativas entre los tres tratamientos de B, pero las plantas -MA mostraron diferencias significativas con la concentración de 10 mg L^{-1} de B con respecto a los otros dos tratamientos (Tabla 5.10). En este caso ocurrió de forma contraria a la observada en el Cu, el Mn aquí ve reducido su valor a casi la mitad del valor de su control.

Ca, P, y Na presentaron diferencias significativas solo cuando el factor principal fue el B (Tabla 5.10). En el caso de P y Na, no presentaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B (Tabla 5.10), mientras que en el de 10 mg L^{-1} de B, tanto el P como el Na incrementaron su concentración alcanzando un valor de 2,3 y $0,19 \text{ mg g}^{-1}$ ps, respectivamente. El Ca, por su parte, no mostró diferencias significativas entre el control y el tratamiento de 10 mg L^{-1} ; y fue el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B, el que acumuló más Ca en las hojas ($23,4 \text{ mg g}^{-1}$ ps; Tabla 5.10).

En la raíz teniendo en cuenta como factor principal el B, se observó que Ca, Mg y P respondieron igual tras los 84 días de tratamiento, no presentando diferencias significativas entre el tratamiento control y el de 5 mg L^{-1} (Tabla 5.10), pero si disminuyendo sus respectivas concentraciones en el tratamiento de 10 mg L^{-1} (21, 22, y 26%, respectivamente) respecto a los otros dos tratamientos. En el caso del Na, se observó que las plantas que lo acumularon más en raíz fueron las tratadas con 5 mg L^{-1} de B ($0,11 \text{ mg g}^{-1}$ ps).

Pasando a analizar los datos según el factor de micorrizas, se observaron diferencias significativas para K, Mg, P y Na, en donde las plantas -MA tienen una mayor concentración de K, Mg y Na, y menor concentración de Ca y P que las plantas +MA.

5.3.7. Concentración de solutos orgánicos

En cuanto a la concentración de carbohidratos en hojas se observó que los azúcares solubles (AS) solo presentaron diferencias significativas cuando el factor principal fue el B (Figura 5.6).

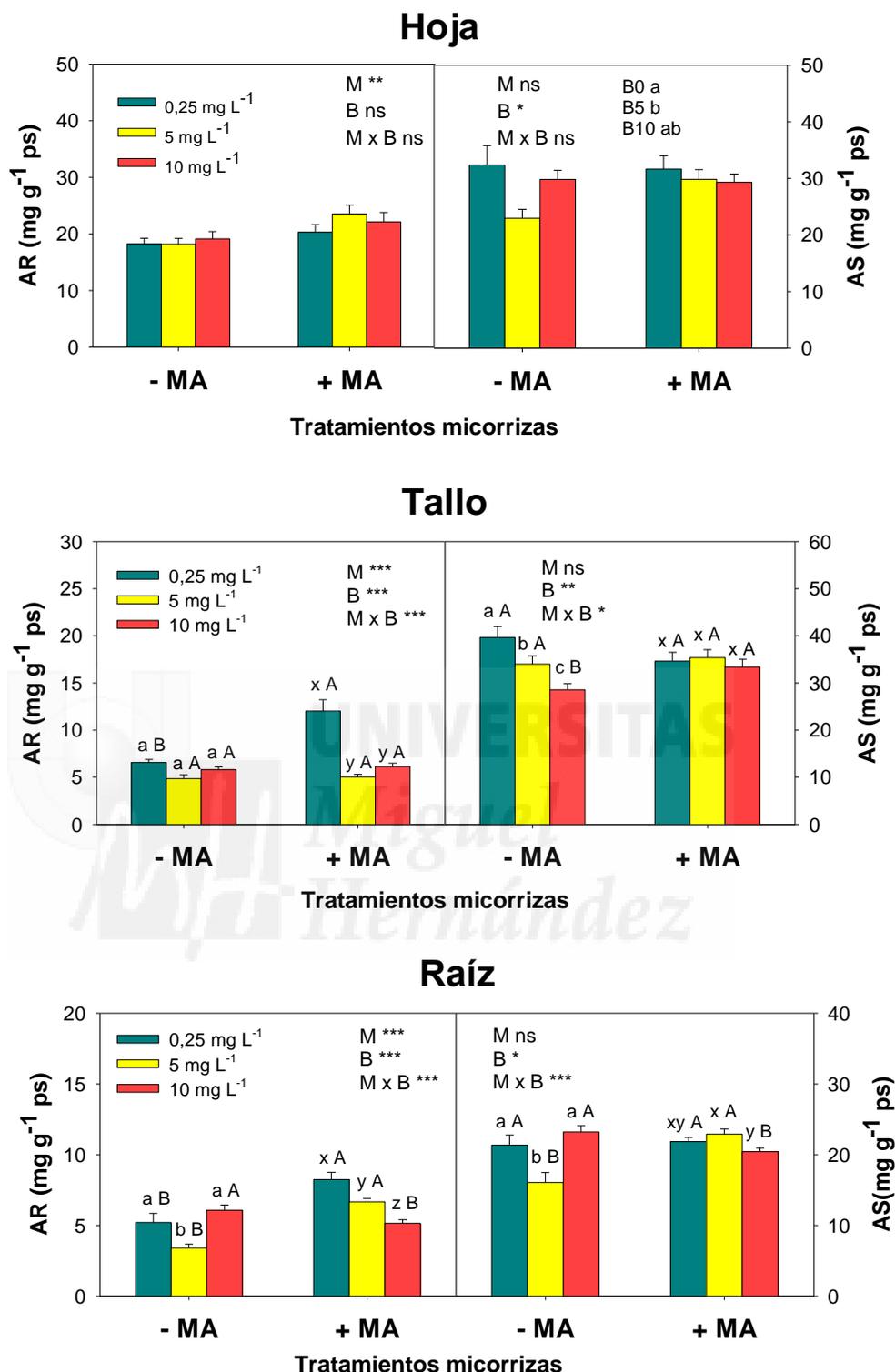


Figura 5.6. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de azúcares reductores (AR) y azúcares solubles (AS) en los diferentes tejidos de la plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). *Letras mayúsculas* diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

Los tratamientos con exceso de B (5 y 10 mg L⁻¹) afectaron a la concentración foliar de AS disminuyéndola ligeramente respecto al control en un 18% y un 8%, respectivamente (Figura 5.6). En cuanto a los azúcares reductores (AR) en el tejido foliar, sólo se observaron diferencias significativas a nivel de micorriza, en donde las plantas +MA mostraron mayor concentración (21,99 mg g⁻¹ ps) que las -MA (18,53 mg g⁻¹ ps).

Por su parte en el tallo, se observó que mientras que en las plantas -MA se producía una disminución de AS en los tratamientos de boro (5 y 10 mg L⁻¹) del 13% y 28%, respectivamente, con respecto al control; en las plantas +MA no se observaron diferencias significativas entre tratamientos con B y control (Figura 5.6). En cuanto a los AR en tallo, se vio que +MA/0,25 mg L⁻¹ de B dobló su valor respecto tanto a los otros dos tratamientos de boro (12,02 mg g⁻¹ ps; figura 5.6), mientras que en las plantas -MA no hubieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En la raíz se observó que tanto los AS como los AR presentaron diferencias significativas para la interacción Micorriza × Boro (Figura 5.6). Empezando por los AS, solo se observó diferencias significativas para el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B de las plantas -MA, donde se vio como en los AS presentaron el valor más bajo (16,06 mg g⁻¹ ps) y como consecuencia también presentaron el valor más bajo en AR (3,40 mg g⁻¹ ps; figura 5.6). En las plantas de citrange Carrizo +MA, se observaron diferencias para la concentración de AR_{radicular} entre los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B, siendo mayor para el tratamientos de 5 mg L⁻¹ de B. Sin embargo en esas mismas raíces, se observó una disminución gradual de los AR_{radiculares} conforme se aumentaba la dosis de B en el agua de riego, siendo la reducción de un 19% para el tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B y un 38% para la de 10 mg L⁻¹ de B (Figura 5.6).

Para la concentración de almidón foliar, se observó que las -MA/0,25 mg L⁻¹ de B presentaron un 15% menos de este azúcar de reserva que las +MA/0,25 mg L⁻¹ de B. En la figura 5.7, se observa como en las plantas +MA se produce una disminución de la concentración foliar de almidón al aumentar la concentración de B en el agua de riego, independientemente de la dosis de B aplicada (disminución de aproximadamente el 23,5% del valor medio). En las plantas -MA no hay diferencias significativas entre los tratamientos con exceso de B y su control (Figura 5.7).

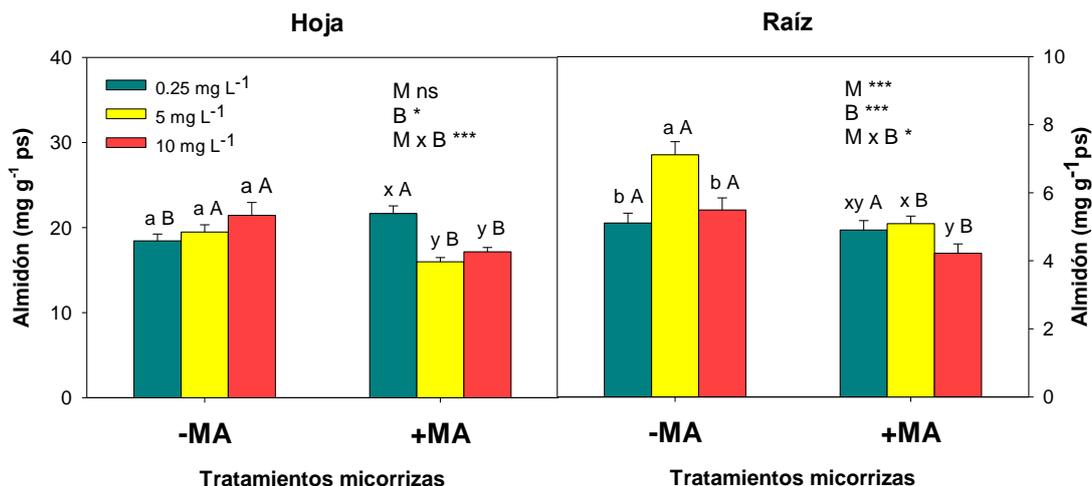


Figura 5.7. Efectos del exceso de B sobre la concentración de almidón en hojas y raíz de la plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). *Letras mayúsculas* diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).

Por otro lado, en la raíz se observó que el almidón presentó diferencias significativas para la interacción Micorriza \times Boro (Figura 5.7). La diferencia la encontramos en el tratamiento de B de 5 mg L^{-1} de las plantas -MA, donde se dio el valor más alto de almidón ($7,12 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$), en comparación con la control y con el tratamiento de 10 mg L^{-1} de B (en torno a $5,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$). En las plantas +MA el único tratamiento de B que afectó a la concentración de almidón radicular disminuyéndola respecto a la de los otros dos tratamientos fue la de 10 mg L^{-1} de B.

En lo relativo a la concentración foliar de prolina, se observó que en plantas +MA no existieron diferencias significativas para los diferentes tratamientos de boro; lo mismo ocurrió para la concentración radicular (Tabla 5.11). Sin embargo, en plantas -MA se observó como la concentración foliar disminuyó progresivamente: un 20% para el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B y un 33% para el de 10 mg L^{-1} de B. Por su parte, la concentración radicular de prolina en -MA, disminuyó hasta casi la mitad en las plantas regadas con aguas de 5 mg L^{-1} de B ($1,69 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$) y aumentó con el tratamiento de 10 mg L^{-1} de B ($3,97 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$), en ambos casos con respecto a su control (Tabla 5.11).

Tabla 5.11. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de prolina y compuestos amoniocuaternarios (CAQ) tanto foliar como radicular en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento.

| Factor principal | | Prolina_hoja (mg g ⁻¹ ps) | CAQ_hoja (mg g ⁻¹ ps) | Prolina_raíz (mg g ⁻¹ ps) | CAQ_raíz (mg g ⁻¹ ps) |
|--------------------------|-------------------------|---|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Micorriza | -MA | 15,82 | 6,50 | 2,72 | 4,57 |
| | +MA | 17,31 | 6,51 | 3,08 | 3,72 |
| Boro | 0.25 mg L ⁻¹ | 18,56 a | 6,28 b | 2,86 ab | 4,06 |
| | 5 mg L ⁻¹ | 15,90 b | 6,27 b | 2,44 b | 4,42 |
| | 10 mg L ⁻¹ | 15,23 b | 6,99 a | 3,39 a | 3,97 |
| Micorrizas × Boro | | | | | |
| -MA | 0.25 mg L ⁻¹ | 19,17 aA | 6,33 aA | 2,50 bB | 4,46 aA |
| | 5 mg L ⁻¹ | 15,35 bA | 6,77 aA | 1,69 cB | 4,44 aA |
| | 10 mg L ⁻¹ | 12,94 cB | 6,39 aB | 3,97 aA | 4,79 aA |
| +MA | 0.25 mg L ⁻¹ | 17,96 xA | 6,22 yA | 3,23 xA | 3,60 yB |
| | 5 mg L ⁻¹ | 16,45 xA | 5,78 yB | 3,19 xA | 4,39 xA |
| | 10 mg L ⁻¹ | 17,52 xA | 7,51 xA | 2,81 xB | 3,15 yB |
| Micorriza | | ** | ns | * | *** |
| Boro | | *** | * | *** | ns |
| Micorriza × Boro | | *** | ** | *** | ** |

“ns” indica diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. Para el factor Boro y para cada estrategia de micorrización en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). En la interacción los valores son las medias de 8 repeticiones.

Respecto a los CAQ en hoja, se comprobó que +MA/10 mg L⁻¹ de B presentó la concentración más alta (7,51 mg g⁻¹ ps) respecto tanto a sus otros dos tratamientos como a los tres tratamientos de B con -MA (Tabla 5.11). En raíz, las plantas -MA no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de boro, estando sus valores dentro del rango 4,4-4,8 mg g⁻¹ ps; por el contrario las plantas +MA sí que mostraron diferencias en los tres tratamientos de boro, donde las únicas que sobrepasaron el valor de 4 mg g⁻¹ ps fueron las del tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B, mientras que las controles y las de 10 mg L⁻¹ de B vieron reducida su concentración en un 18 y 28%, respectivamente (Tabla 5.11), relativo al tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B.

5.3.8. Concentración de MDA y H₂O₂

En lo referente a la concentración de MDA cuantificada, en la figura 5.8 se puede comprobar que en el tratamiento sin exceso de B, en las plantas +MA la concentración foliar fue la mitad que en las plantas -MA control (10,67 y 20,80 nmol g⁻¹ pf), respectivamente.

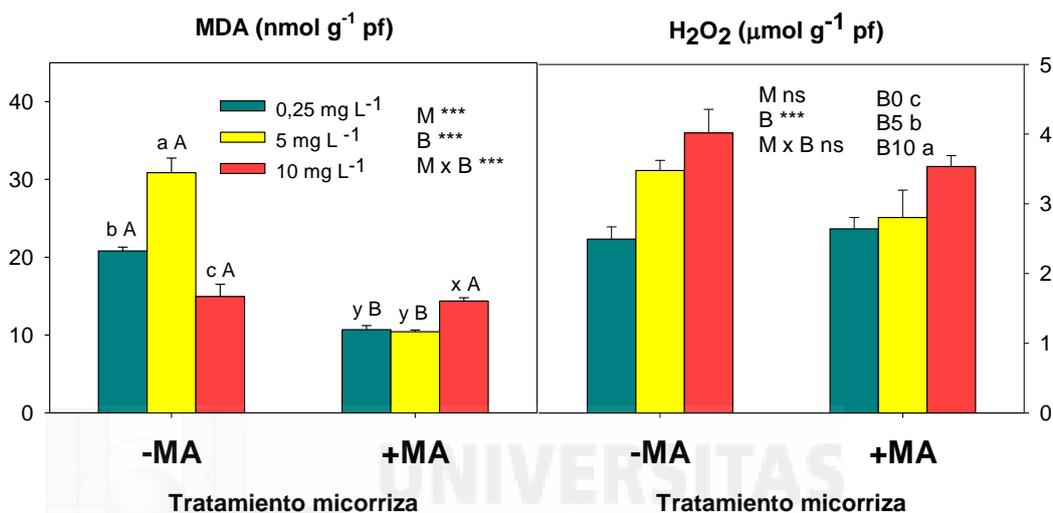


Figura 5.8. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de malonildialdehído (MDA) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en hojas de plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; *** indica diferencias significativas para $P < 0.001$. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). *Letras mayúsculas* diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

Ahora bien, los efectos de los tratamientos de boro sobre la concentración de MDA dependieron de si las plantas estaban micorrizadas o no. Así, en plantas -MA, el tratamiento de boro de 5 mg L⁻¹ incrementó la concentración hasta alcanzar una concentración de 30,85 nmol g⁻¹ pf; mientras que el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de B la disminuyó un 28%, con respecto a su control (Figura 5.8). Analizando los datos de las plantas +MA, observamos que el tratamiento de B de 10 mg L⁻¹ de B incrementó la concentración con respecto a los otros dos tratamientos, pero no se produjeron diferencias significativas entre ellos.

La concentración foliar de H₂O₂ aumentó a medida que la concentración de B en la solución nutritiva fue mayor, independientemente de si citrange Carrizo estaba micorrizado o no, alcanzando los valores promedio de 3,14 y 3,78 μmol g⁻¹

pf en los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B, respectivamente, mientras que en las plantas control tuvieron una concentración de 2,7 μmol g⁻¹ pf.

5.3.9. Actividad de las enzimas antioxidantes.

En lo referente a las enzimas antioxidantes y comenzando por la CAT, se observó que las +MA/0,25 mg L⁻¹ de B contenían un 26% menos de actividad que la -MA/0,25 mg L⁻¹ de B, aunque estos valores fueron no significativos. En las plantas +MA no existieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de B (Figura 5.9). Mientras que en las -MA, las plantas sometidas a 10 mg L⁻¹ de B se vieron reducida la actividad de CAT en un 58% con respecto tanto al control como al tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B (Figura 5.9).

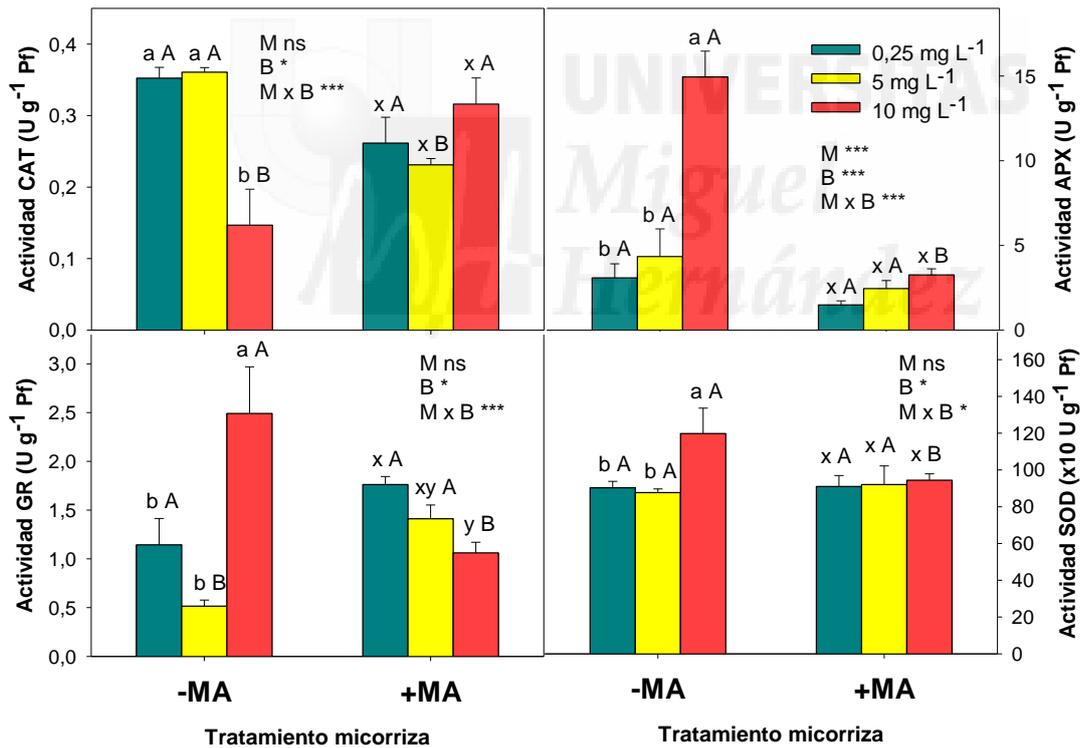


Figura 5.9. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD) en hojas de plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). *Letras mayúsculas* diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).

En lo que respecta a la actividad de APX, se observó que las plantas +MA/0,25 mg L⁻¹ de B tuvieron una actividad enzimática de 1,5 U g⁻¹ pf, aproximadamente la mitad de la que tenían las -MA/0,25 mg L⁻¹ de B (3,1 U g⁻¹ pf). Como en el caso anterior, observamos que en las plantas +MA no existieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de B (Figura 5.9); mientras que en las -MA, las plantas sometidas a 10 mg L⁻¹ de B vieron aumentada en 5 veces, aproximadamente, dicha actividad con respecto al control y al tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B (Figura 5.9).

Para la enzima GR, se observó que las plantas +MA/0,25 mg L⁻¹ de B mostraron un 35% más de actividad de esta enzima que las -MA/0,25 mg L⁻¹ de B. En las plantas +MA, se observó cómo disminuía la actividad de la GR en los tratamientos con B respecto a su control, siendo una reducción del 20% y del 40% para 5 y 10 mg L⁻¹ de B, respectivamente (Figura 5.9). En las -MA, se observó que los dos tratamientos con B respondían de forma diferente respecto a su control; mientras que el de 5 mg L⁻¹ de B vio reducida la actividad de la enzima GR a prácticamente la mitad (0,51 U g⁻¹ pf), el de 10 mg L⁻¹ de B la vio incrementada hasta el doble (2,49 U g⁻¹ pf; figura 5.9).

Por último, en el caso de la SOD, no se observaron diferencias significativas entre las plantas +MA y -MA para el tratamiento control (910,2 y 902,9 U g⁻¹ pf, respectivamente). En las plantas +MA no existieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de B (Figura 5.9). Por el contrario, en las -MA, las plantas sometidas a 10 mg L⁻¹ de B vieron aumentada la actividad de la SOD en un 25% con respecto al control y al tratamiento de 5 mg L⁻¹ de B (Figura 5.9).

5.4. Discusión

5.4.1. Las altas concentraciones de boro en la solución nutritiva no afectaron al porcentaje de micorrización, pero sí a la proliferación del hongo en las raíces

La influencia positiva de la fertilización con B en la formación de micorrizas se observó por primera vez en plantas de alfalfa y trébol rojo en el año 1980 (Lambert y col., 1980). En los cítricos se demostró unos años más tarde con el trabajo llevado a cabo por Dixon y col. (1989) en plantas de *Citrus jambhiri*. Pero poco se sabe del efecto que podría tener el exceso de B en la simbiosis o en la relación entre hongo-planta. Por eso, hicimos, al final del ensayo, un estudio sobre el estado de la

colonización de las micorrizas en las raíces de citrange Carrizo regadas con exceso de boro. En este estudio se observó que el porcentaje de colonización de la micorriza no se vio significativamente alterado (ver tabla 5.3 y Fig. 5.5). Donde sí observamos que tuvo un efecto negativo el exceso B fue sobre la proliferación (extensión) del micelio dentro de la raíz (intrarradial). Nuestros resultados mostraron que en condiciones de exceso de este micronutriente, se redujo el crecimiento del micelio dentro de la raíz micorrizada en un porcentaje mayor al 60%.

En condiciones normales el proceso de simbiosis entre el hongo y la raíz se puede describir brevemente de la siguiente manera. Cuando el hongo encuentra una raíz susceptible de ser micorrizada, experimenta una notable estimulación que se manifiesta en una abundante proliferación y ramificación del micelio. Esto le permite a la hifa contactar con la raíz adhiriéndose a su superficie, y formando un apresorio, estructura de precolonización a partir de la cual, dos o tres días después, se iniciará la penetración en la raíz de la planta. Una vez establecida la asociación hongo-planta la célula vegetal hospedadora aporta sacarosa a la matriz interfacial mediante transporte pasivo, éste se hidrolizaría en glucosa y fructosa (azúcares reductores) y, finalmente, la glucosa se absorbe por el hongo mediante un proceso de transporte activo en los arbúsculos donde será transformado a una forma aprovechable para el mismo (polialcoholes, trehalosas y glucógeno, principalmente). Teniendo en cuenta lo anterior, nos planteamos tres hipótesis de por qué el exceso de B en la solución nutritiva podría haber afectado negativamente a dicha proliferación del micelio intrarradial:

I) El B podría ser tóxico para el hongo, afectando a la formación de las estructuras arbusculares o al transporte activo que se da en ellas (Figura 5.10). Gianinnazi-Pearson y col. (1991) observaron que las H^+ -ATP_{asas} fúngicas, implicadas posiblemente en este transporte activo de carbohidratos desde el apoplasto, están localizadas fundamentalmente en el tronco de los arbúsculos y en las hifas intercelulares, apoyando la absorción de carbohidratos por estas estructuras.

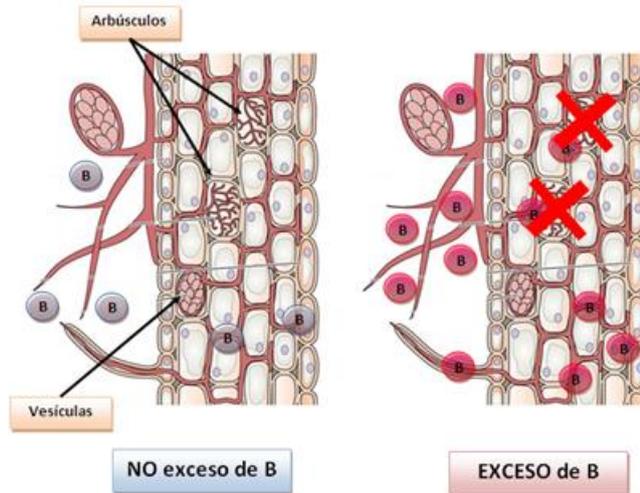


Figura 5.10. Reducción de la proliferación del micelio intrarradial. Hipótesis I: el B en exceso podría afectar al desarrollo de las estructuras micorrícicas (vesículas, arbúsculos, etc.). Ilustración recuperada y modificada de *Plant Physiology. Third Edition. Figure 5.11* © 2002. Sinauer Associates, Inc.

II) La alta toxicidad que tiene el B sobre la A_{CO_2} de las plantas de citrange Carrizo afectaría al aporte de azúcares que tiene que recibir el hongo para su crecimiento óptimo (Figura 5.11). Como ya hemos comprobado en los dos experimentos previos de esta memoria, el portainjerto citrange Carrizo es uno de los más sensibles al exceso de boro.

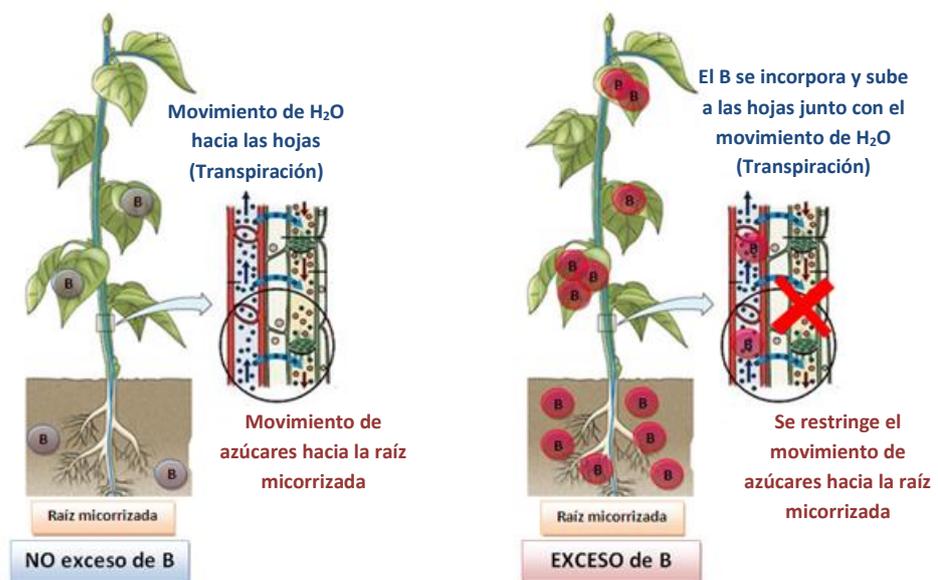


Figura 5.11. Reducción de la proliferación del micelio intrarradial. Hipótesis II: el B en exceso afecta al transporte de azúcares desde las hojas de la planta hacia la raíz micorrizada.

III) Formación de complejos B-poliololes en el micelio extrarradial que impedirían el aprovechamiento de los azúcares que llega de la planta por parte de las micorrizas (Figura 5.12). Estos organismos destinan la mayor parte de los azúcares procedentes de la planta al micelio extrarradial donde son transformados a poliols. Estos hidratos de carbono fúngicos tienen alta afinidad por la formación de complejos con B (forma inmóvil) y de este modo no podrían ser usados por el hongo como fuente de energía para su crecimiento.

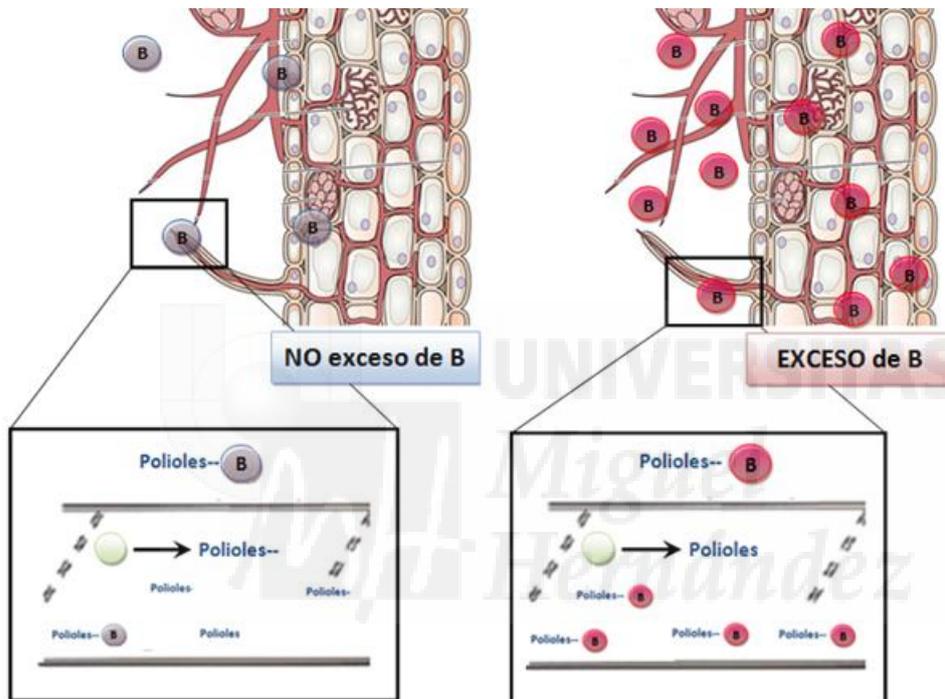


Figura 5.12. Reducción de la proliferación del micelio intrarradial. Hipótesis III: el B en exceso, debido a la alta afinidad que presenta por los hidratos de carbono fúngicos (polialcoholes), forman los complejos B-poliol, por lo que éstos ya no están disponibles para que el hongo los utilice como fuente de energía (reducción de su crecimiento). Ilustración recuperada y modificada de *Plant Physiology. Third Edition. Figure 5.11 © 2002. Sinauer Associates. Inc.*

De estas tres hipótesis, según los resultados obtenidos y analizados en este experimento, parece ser que la última es la que cobra más fuerza. El hecho de que en las raíces control, al igual que en las tratadas con B, la estructura que predominara fuera el apresorio y algunas vesículas fueran visualizadas, nos está indicando que la colonización micorrícica se encontraba en las fases más tempranas de la colonización y descarta por tanto la primera hipótesis. Los resultados de los azúcares solubles (AS) nos permiten descartar la segunda opción, ya que el suministro de carbohidratos a la raíz no se vio interrumpido (ver Fig. 5.6). Sin

embargo, la reducción de los azúcares reductores con los tratamientos de exceso de B, podría indicar que estos han sido transformados a polioles y una vez complejados con el B dejarían de ser funcionales para las micorrizas, dificultando el crecimiento de la micorriza.

5.4.2. Las plantas micorrizadas fueron más tolerantes al exceso de boro que las no-micorrizadas, debido a que las +MA tuvieron una menor concentración de boro en las hojas

Basados en los datos de la biomasa seca foliar podemos afirmar que la micorrización mejoró la tolerancia de las plantas de citrange Carrizo al exceso de boro en la solución nutritiva. Los tratamientos de B de 5 y 10 mg L⁻¹ redujeron este parámetro, con respecto al tratamiento sin B, en un 13 y 57%, respectivamente, en las plantas +MA; mientras que para las plantas -MA fue reducido un 30 y 77%. Además, este hecho fue también corroborado visualmente, donde los síntomas de toxicidad (clorosis tanto en parte apical como en bordes, quemaduras y necrosis en las hojas viejas y de la parte media) fueron mucho más agresivos en las plantas -MA. Aunque no se conoce específicamente a que se debe la toxicidad del B en las plantas se creen que pueden ser debidos a desórdenes metabólicos relacionados con la formación de enlaces de B a las ribosas causando daños celulares (Gunes y col., 2006; Cervilla y col., 2007), entre otros factores.

Por otro lado, la relación lineal entre la concentración foliar de boro y la reducción del crecimiento de las hojas (% relativo a las plantas control) fue altamente significativa ($P < 0,001$; $r^2 = 0,95$; pendiente = 0,18; *datos no mostrados*). Lo que indica que los rangos de concentración foliar de 781-1135 mg kg⁻¹ ps (al final del experimento), son muy sensibles para citrange Carrizo, ya que por cada 100 mg kg⁻¹ ps que se acumula en las hojas se produce una reducción del peso seco foliar del 18%. Además esta relación lineal indica también, que la mayor tolerancia de las plantas micorrizadas se debió a que estas acumularon menor concentración de boro en las hojas que las plantas no micorrizadas. Estos datos concuerdan con los resultados reportados descritos por Sonmez y col. (2014) que observaron como en plantas de trigo inoculadas con micorrizas disminuyó la concentración foliar de B en plantas de trigo con respecto a las plantas no micorrizadas. Además comprobaron que las micorrizas redujeron

significativamente la absorción de B por parte de la raíz en cada nivel de toxicidad ensayado (3 y 6 mg L⁻¹ de B).

La concentración foliar de boro que se acumula en las plantas puede depender de varios factores como son la transpiración foliar, el uso eficaz del agua, la relación parte área:raíz, absorción neta de B por las raíces, etc. Las plantas de citrange Carrizo son uno de los portainjertos de cítricos más sensibles al boro porque acumula grandes concentraciones de este micronutriente en las hojas, debido, entre otras causas, a que su tasa de transpiración por unidad de área foliar es muy alta, y su uso eficaz de agua (relación entre la tasa de asimilación neta de CO₂ y transpiración foliar) es muy bajo. Teniendo en cuenta todas las variables analizadas en este ensayo, la reducción de la concentración de boro en las plantas +MA con respecto a las -MA podría ser debido a que las micorrizas podrían reducir la entrada del boro en las raíces. Ahora bien, no queda claro si la disminución en la absorción neta del boro por las micorrizas se puede deber a algún mecanismo que restringe la entrada o a que se favorece el eflujo de B desde el interior de la raíz hacia el medio externo, en donde una vez más los azúcares típicos de los hongos podrían tener un papel fundamental.

La disminución del crecimiento radicular es una respuesta típica de los cultivos sensibles al exceso de B, y se cree que esto es debido a la alta sensibilidad que muestran las zonas meristemáticas de la raíz (Lovatt y Bates, 1984; Nable, 1988; Reid y col., 2004; Choi y col., 2006; Sheng y col., 2010; Simón, 2012). Nuestros resultados muestran que las raíces de las plantas de citrange Carrizo son muy sensibles al exceso de B en la solución nutritiva. Pero además, también muestran dos aspectos importantes como es que: i) la concentración del boro en la solución nutritiva, más que la concentración acumulada en la raíz, podría estar inhibiendo el crecimiento de la raíz y, por otro lado, que ii) en el tratamiento más alto de B (10 mg L⁻¹) la inoculación de *G. intraradices* podría estar protegiendo a la raíz de sufrir efectos más severos. Esto queda respaldado por el hecho de que no se observó una relación directa entre la concentración de boro acumulado en la raíz y la reducción del crecimiento. Por ejemplo, en las plantas -MA la concentración de B en la raíz fue similar (110 mg kg⁻¹ ps) para los dos tratamientos de exceso de B, sin embargo, la reducción de la biomasa radicular fue del 26 y 50% para los tratamientos de 5 y 10 mg L⁻¹ de B. Con respecto al segundo punto comentado

anteriormente, esta idea queda avalada por el hecho de que la reducción de la raíz de las plantas +MA fue similar para ambos tratamientos de exceso de boro (5 mg L^{-1} y 10 mg L^{-1}) a pesar de la diferente concentración en la solución nutritiva.

5.4.3. El boro en las plantas de citrange Carrizo es poco móvil entre sus diferentes tejidos y su entrada parece que es mediada por un proceso pasivo

De los datos de la concentración de boro en los diferentes tejidos analizados para cada tratamiento de boro (ver Fig. 5.3 y tablas 5.6 y 5.7) y la evolución con el tiempo de la concentración de boro en las hojas (ver Fig. 5.2) se pueden sacar algunas conclusiones importantes. La primera de ellas es que las plantas de citrange Carrizo pertenecen al grupo de especies donde el B es poco móvil entre los diferentes tejidos de la planta, y su concentración depende de la transpiración, ya que la concentración de boro entre los diferentes tejidos de la planta incrementa en el orden tallo < raíz < hoja, y en las hojas esta concentración se va incrementando con el tiempo alcanzando concentraciones tan altas como 1135 mg kg^{-1} ps, propias incluso de un macronutriente como fósforo o potasio. Estos resultados son importantes a la hora de diseñar estrategias agronómicas destinadas a disminuir los efectos negativos del B cuando se encuentra en altas concentraciones en el agua de riego. Todas aquellas estrategias que disminuyan la tasa de transpiración foliar como estrategias de riego deficitario, mallas de sombreo, aplicación de caolinita, utilización de madera intermedia entre el portainjerto y la variedad, o incluso la disminución del déficit de presión de vapor en el caso de invernaderos podrían reducir la concentración de boro que se acumulan en las hojas (Syvertsen y Garcia-Sanchez, 2014).

Por otro lado, independientemente de las micorrizas, el aumento progresivo de la concentración foliar de B al incrementar la concentración de boro en la solución nutritiva muestra que su entrada a la planta es un proceso pasivo, donde las raíces no ejercen ningún tipo de control. Este tipo de cinéticas del tipo de Michaelis-Menten donde a concentraciones tan altas como las que hemos aplicado (5 y 10 mg L^{-1} de B) no se muestra ningún tipo de saturación en la acumulación indican claramente que el mecanismo que más predomina de entrada de B a la planta es pasivo, como también ocurre para el caso del Cl⁻. Moya y col. (Moya y

col., 1999; Moya y col., 2003) también observaron en este mismo portainjerto que la entrada de Cl^- en las plantas es de forma pasiva y está modulado por la corriente de transpiración. Para llegar a estas conclusiones los autores regaron las plantas con diferentes soluciones nutritivas que diferían en la concentración de NaCl en un rango entre $1,7 \text{ g L}^{-1}$ y 12 g L^{-1} , y observaron que la concentración foliar de Cl^- se incrementaba linealmente al incrementar la concentración de NaCl en la solución nutritiva. Además, estos autores para verificar que el cloruro dependía del flujo de transpiración y el uso del agua, modificaron estos parámetros defoliando parcialmente las plantas por lo que la el flujo de transpiración era diferente según el porcentaje de hojas defoliadas, y observaron una relación directa entre la tasa de transpiración y el cloruro acumulado en las hojas.

Otra de las semejanzas que encontramos entre el Cl^- y el B en portainjertos de cítricos es que las raíces tienen una capacidad limitada para acumular estos minerales. En nuestro ensayo el valor umbral se podría situar en torno a $120 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$. Una vez que se alcanza este valor las raíces ya no pueden acumular más boro como indica que después de 84 días de la aplicación de los dos tratamientos con una alta concentración de B la concentración sea igual para los dos tratamientos. Cámara y col. (2004) observaron en un experimento de 90 días de duración con plantas mandarino Cleopatra tratadas con 50 mM de NaCl, que a los 30 días de empezar el experimento la concentración de Cl^- de la raíz alcanzó un valor de $11 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$, y este valor se mantuvo constante durante el resto del ensayo.

5.4.4. La maquinaria fotosintética de las plantas no-micorrizadas es más sensible a la toxicidad por boro que la de las plantas micorrizadas

Como hemos comentado anteriormente en la introducción de esta memoria, el boro es un elemento muy tóxico para las plantas. Los motivos por lo que esto se produce no se conocen con detalle, pero se conjetura que la capacidad que tiene el boro para formar complejos con compuestos que tienen dos grupos $-\text{OH}$ como ribosas, azúcares del tipo polioliol, etc., puede hacer que estos pierdan su funcionalidad por lo que generan en la planta todo una serie de problemas bioquímicos (inhibición síntesis de proteínas, fallos replicación del ADN y ARN, pérdida de integridad de las membranas, etc.) que afectan de forma directa a los procesos fisiológicos, y entre ellos se encuentra la pérdida de la capacidad fotosintética de las hojas. En

nuestro experimento, se observó en las medidas de intercambio gaseoso que llevamos a cabo que los tratamientos de exceso de boro disminuyeron la tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO_2}) y la conductancia estomática (g_s), aunque se observaron algunas diferencias entre plantas micorrizadas y no-micorrizadas. Tanto en plantas +MA como en -MA se dio una relación lineal y significativa entre la concentración de B en las hojas *versus* a la asimilación neta de CO₂ (expresada como porcentaje con respecto al tratamiento control). En esta correlación se observa (*datos no mostrados*) en plantas +MA que la A_{CO_2} disminuye un 14% por cada 100 mg kg⁻¹ ps que se acumula en las hojas; mientras que en las plantas de citrange Carrizo -MA desciende a razón del 22% por cada 100 mg de B kg⁻¹ ps. Por lo tanto esto nos indica que la toxicidad del B es mucho más severa en plantas -MA que en +MA, y por lo tanto las micorrizas de alguna manera están protegiendo a la maquinaria fotosintética de las plantas de los efectos tóxicos del B. En otras especies de plantas como trigo, se ha descrito que la micorrización incrementa la tolerancia a la salinidad porque en estas plantas se activan una serie de mecanismos que protegen a las plantas de la toxicidad del Na, entre estos mecanismos destaca el ajuste osmótico, mejora de los sistemas antioxidantes, optimización del metabolismo del carbono y nitrógeno, etc. (Talaat y Shawky, 2014). Volviendo a nuestros resultados, hay que tener en cuenta que la acumulación de B en las hojas de las plantas -MA fue mucho mayor que en las plantas +MA por lo estas plantas sufrieron un mayor descenso de la A_{CO_2} lo que podría explicar las diferencias que hemos observado en la biomasa foliar entre plantas -MA y +MA.

A pesar de que A_{CO_2} y g_s disminuyeron con los tratamientos de exceso de boro, no quiere decir que la disminución de la A_{CO_2} fuera debido a un cierre estomático, ya que en general los valores de la concentración de CO₂ subestomático apenas se vieron afectados. Más bien todo indica que los factores principales de la disminución de la A_{CO_2} se debieron a factores no estomáticos si consideramos el modelo de Farquhar y Sharkey (1982). Esos factores no estomáticos implican cambios en: i) la eficiencia de carboxilación, ii) la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, iii) la concentración de clorofilas y/o iv) la actividad de las enzimas fotosintéticas (Pezeshki, 1994; Nishiyama y col., 2006; Yordanova y Popova, 2007). Nuestros resultados descartan que la maquinaria fotoquímica de las hojas (capacidad para captar la luz y convertirla en energía química) se encontrará

dañada, dado que el parámetro Φ_{PSII} no se vio alterado por el exceso de B, ni en las plantas micorrizadas ni en las no micorrizadas (ver tabla 5.10). Sin embargo, aunque este parámetro no se vio alterado por el boro, sí que se produjo una disminución de la relación $A_{\text{CO}_2}/\Phi_{\text{PSII}}$ al disminuir la A_{CO_2} , como ya comentamos anteriormente, lo que significa que en el proceso fotosintético hubo un exceso de electrones que no participan en la cadena de transporte de electrones, sino que fueron dirigidos a un aceptor alternativo como es el O_2 (ya sea la reacción de Mehler o la fotorrespiración). En consecuencia, se produjo la generación de especies reactivas de oxígeno que causan estrés oxidativo a nivel celular (Cakmak, 1994; Cakmak y Römheld, 1997). Nuestros resultados mostraron una reducción de la relación $A_{\text{CO}_2}/\Phi_{\text{PSII}}$ a consecuencia del exceso de B (*datos no mostrados*), tanto en plantas micorrizadas como no micorrizadas; no obstante esa reducción fue menor en las plantas micorrizadas, lo que podría haber tenido una consecuencia importante en la diferente respuesta de plantas micorrizadas y no micorrizadas al exceso de boro.

El hecho de que en las hojas de las plantas de citrange Carrizo micorrizadas las concentraciones de MDA (ver Fig. 5.8) no se vieran afectadas en el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B y muy poco afectadas en el de 10 mg L^{-1} de B, a pesar de la disminución en la relación de $A_{\text{CO}_2}/\Phi_{\text{PSII}}$, sugiere que estas plantas inoculadas con *G. intraradices* tienen que tener un sistema antioxidante bastante potente y eficiente capaz de hacer frente a las ROS que se han formado a consecuencia del exceso de B. No obstante, cuando vemos en nuestros resultados la respuesta de las enzimas antioxidantes en hojas de plantas micorrizadas al exceso de B, no se observan diferencias significativas con la respuesta de las controles micorrizadas (ver Fig. 5.8 y 5.9). La actividad de las enzimas SOD, CAT y APX en plantas inoculadas y con exceso de boro no mostraron diferencias significativas con respecto a su control; solamente para la GR se ve una tendencia a disminuir su actividad cuando se incrementa la concentración de B en la solución nutritiva (ver Fig. 5.9). Por lo que no se debe descartar que otros sistemas antioxidantes no enzimáticos estén activos para disminuir las ROS, de hecho, determinados carbohidratos que actúan en su forma reductora ejercen una actividad antioxidante, al menos desde un punto de vista químico.

Por su parte, los resultados obtenidos en plantas de citrange Carrizo sin inocular regadas con 10 mg L^{-1} de B muestran una mayor actividad enzimática en las enzimas SOD, APX y GR que las regadas con 5 mg L^{-1} de B e incluso mayor que las controles. Pero esto no debe llevarnos a error, recordemos que las plantas -MA/ 10 mg L^{-1} han sufrido una mayor defoliación y presentaron síntomas más severos que las -MA/ 5 mg L^{-1} al final del experimento. Por tanto, estos resultados lo que nos están indicando es que cuanto mayor sea la dosis de B en la solución nutritiva y más se mantenga esa condición de estrés en el tiempo antes se saturaran los sistemas antioxidantes y la planta será incapaz de poder contrarrestar los efectos nocivos del B en sus hojas, a pesar de que estos sistemas estén activados.

5.4.5. La relación entre los azúcares solubles y reductores parece ser que juega un papel decisivo en la mayor tolerancia de las plantas micorrizadas al exceso de boro

Las células de la raíz dependen del suministro de azúcares procedentes de las plantas para su crecimiento (sumidero de carbohidratos). Esos azúcares son sintetizados en la fotosíntesis, y se transportan a través del floema en forma de sacarosa hacia la raíz. En condiciones de toxicidad por B este suministro de azúcares cobra mayor importancia, sobre todo en su forma reductora (glucosa y fructosa), porque se ha comprobado que en especies tolerantes juegan un papel decisivo (Choi y col., 2007). Por su parte, cuando las plantas están micorrizadas esta demanda de azúcares por parte de la raíz aumenta todavía más (Douds y col., 1988; Tinker y col., 1994; Graham, 2000). Sin embargo, hay pocos estudios que arrojen luz sobre qué ocurre con la distribución de carbohidratos en plantas micorrizadas que soportan condiciones de exceso de B. En nuestro experimento se observa que los efectos de los tratamientos de exceso de boro sobre la concentración de azúcares solubles y reductores, y su relación entre sí, dependió de si las plantas están micorrizadas o no.

Repasando lo que ya hemos comentado en la sección de “resultados” de este capítulo, lo que se observa en las plantas micorrizadas es lo siguiente: los azúcares solubles totales no son afectados por los tratamientos con exceso de boro ni en hoja, tallo o raíz. Sin embargo, la concentración de azúcares reductores disminuyó con los tratamientos de exceso de boro de 5 y 10 mg L^{-1} en el tallo y la raíz. Como los azúcares solubles totales no han cambiado, quiere decir que lo que ha variado ha

sido la relación entre los azúcares reductores y no reductores que hay en el total de azúcares solubles. Esto podría dar una idea que en las plantas micorrizadas los azúcares reductores podrían haber sido transformado a azúcares del tipo –diol (Figura 5.13). Como ya hemos dicho anteriormente, el boro tiene una alta afinidad por estos azúcares formando complejos poliol-B. Esto supone por un lado que las micorrizas no pueden utilizar parte de los azúcares procedentes de la planta al estar en forma poliol-B por lo que su proliferación en el interior de la raíz se ve reducida, como ya hemos visto anteriormente (*véase el apartado 5.4.1 de este capítulo*); y por otra parte, al quedar el B complejado con los dioles o quedaría inmovilizado en las estructuras de la micorriza o, y por qué no, sería expulsado hacia el exterior de la planta, lo que haría que la absorción de B por las raíz disminuyera y por tanto la concentración de boro que llegaría a las hojas sería menor como también hemos comentado anteriormente (*véase la sección 5.4.2 de este capítulo*). Dixon y col. (1989) observó también en plantas de cítricos (*C. jambhiri*) que la fertilización con boro aumentó significativamente la exudación de azúcares reductores y aminoácidos por parte de la raíz dos semanas después de la germinación de las plantas.

En el caso de las plantas no micorrizadas, lo que más destaca es la disminución de los azúcares solubles con el exceso de boro en el tallo, y una disminución de los azúcares solubles totales con el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B en hoja y raíz que fue acompañado por una depleción de los azúcares reductores en la raíz para este tratamiento de boro. Esta respuesta un tanto ambigua que se da en el tratamiento de 5 mg L^{-1} de B con respecto a 10 mg L^{-1} de B no podemos explicar bien porque se produce, quizás es un intento de la planta para adaptarse a la concentración de boro de 5 mg L^{-1} , que no se da en el 10 mg L^{-1} porque a esta concentración tan alta las plantas ya están muy contaminadas por este nutriente y los posibles mecanismos de adaptación quedarían desactivados.

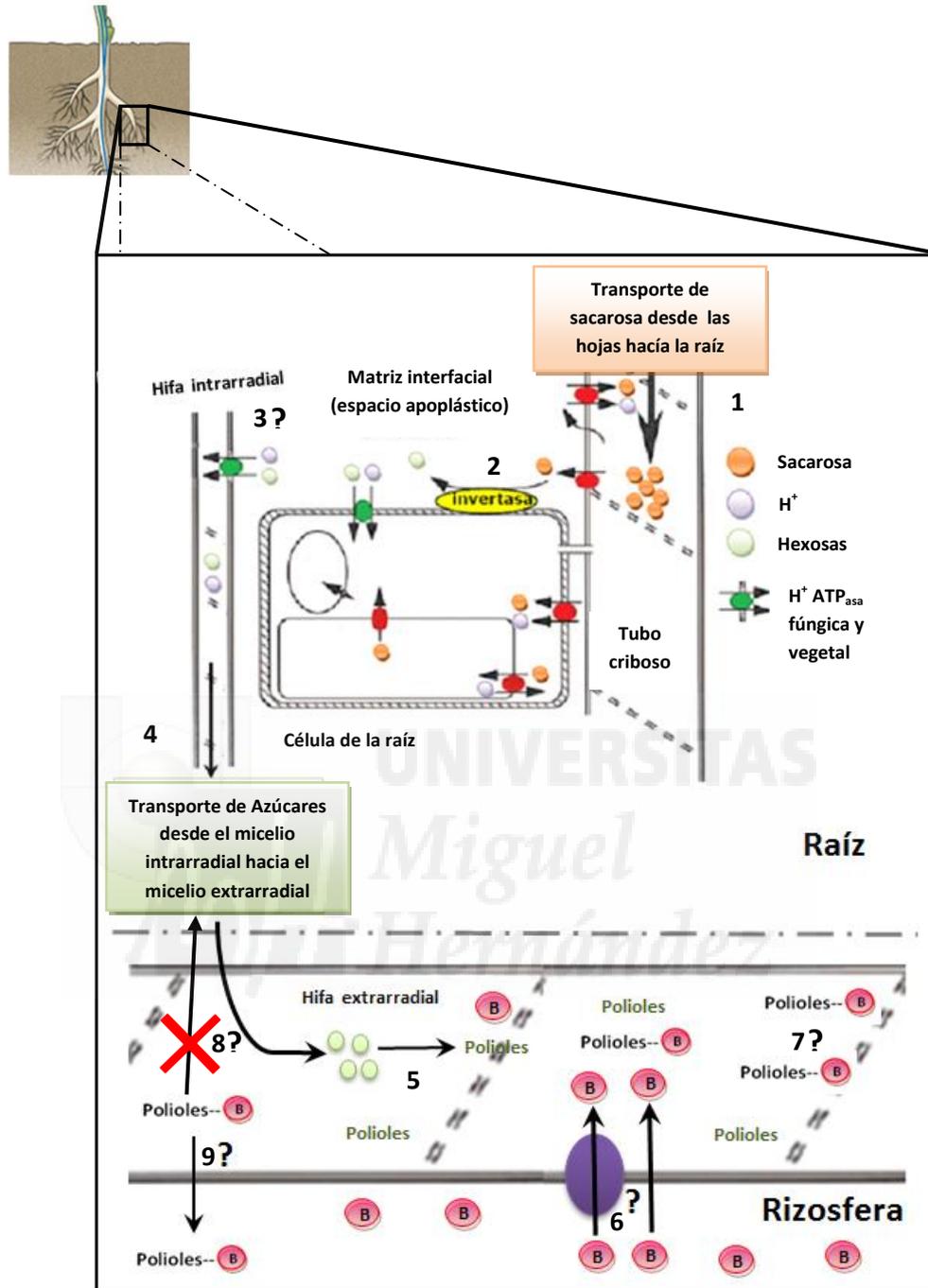


Figura 5.13. Esquema simplificado del posible papel que juegan las micorrizas en una mayor tolerancia al exceso de B en el portainjerto citrange Carrizo. 1: los azúcares son transportados desde las hojas hasta la raíz micorrizada en forma de sacarosa. 2: la sacarosa se libera al espacio intercelular mediante transporte pasivo y se hidroliza en glucosa y fructosa mediante la acción de una invertasa apoplástica. 3: las hexosas son absorbidas por el hongo mediante un proceso de transporte activo. 4: el destino metabólico de las hexosas tomadas por las estructuras fúngicas intrarradiales es ser transformadas principalmente a trehalosa o glucógeno y transferidas al micelio extrarradial. 5: en él, los compuestos se transformarán en azúcares tipo -diol. 6: el B absorbido por el hongo en la rizosfera, debido a su alta afinidad por este tipo de azúcares, formará complejos poliol-B dentro de la hifa extrarradial (7), pudiendo quedar inmóvilizados en el micelio extrarradial (8) e incluso pudiendo llegar a ser expulsados hacia el exterior de la planta (9). Esto explicaría que la absorción de B por parte de la raíz micorrizada fuera menor y, por tanto, la concentración de boro que llega a la parte aérea también lo fuera, reduciendo de ese modo su toxicidad en la planta de carrizo Citrange micorrizada.

5.4.6. La disminución de prolina por el exceso de boro en plantas no micorrizadas podría dar una idea de la enorme sensibilidad de citrange Carrizo a este estrés

La síntesis de solutos orgánicos como prolina y CAQ (GB) es una de las respuestas más comunes al estrés en las plantas (Serraj y Sinclair, 2002; Rivero y col., 2004; Ashraf y Foolad, 2007; Parvaiz y Satyawati, 2008). Protegen de muchas maneras, principalmente: i) ajuste osmótico celular, ii) desintoxicación de las ROS, iii) protegen la integridad de la membrana y iv) estabilizan la relación enzimas/proteínas (Yancey y col., 1982; Bohnert y Jensen, 1996).

De la prolina cabe destacar su papel en la detoxificación de las ROS y el de la protección de membranas frente a la peroxidación de lípidos (Hong y col., 2000). Bajo condiciones de exceso de B se ha observado una reducción de los niveles de prolina en hojas de cítricos (Papadakis y col., 2004a) y se ha sugerido que estos podrían estar relacionados con el aumento de los niveles de MDA independientemente de la actuación de otros mecanismos antioxidantes (Keles y col., 2004; Gunes y col., 2006; Molassiotis y col., 2006). Estos resultados también se han obtenido en experimentos presentados en esta memoria (*véase capítulo 3 y 4 de esta memoria*). Los resultados obtenidos en citrange Carrizo no micorrizado de este experimento coinciden con lo anterior, donde podemos comprobar que el exceso de B en la solución nutritiva contribuyó a reducir la concentración de prolina foliar (ver tabla 5.12). Por su parte, la concentración foliar de prolina en las plantas donde se inoculó *G. intraradices* no se vieron afectadas por el exceso de B, presentando por tanto la misma concentración que las plantas control. El hecho de que en las hojas con alta concentración de boro de nuestras plantas de citrange Carrizo no micorrizadas muestren una concentración de prolina inferior, puede estar relacionado con que se haya producido un aumento de la síntesis de proteínas o se haya visto interrumpida la ruta de síntesis de este osmolito; o bien, que en este tipo de estrés, la prolina podría actuar como una fuente de nitrógeno extra con el objetivo o bien de incrementar la síntesis de proteínas específicas que podrían ayudar a tolerar la toxicidad por boro o para paliar la falta de nitrógeno en la plantas, ya que algunos autores han señalado que existe un antagonismo entre el boro y el nitrógeno a nivel radicular (Pollard y col., 1977; Francois, 1984; Sotiropoulos y col., 1999; Günes y Alpaslan, 2000; Kaya y col., 2009). Esto no es

así en las plantas micorrizadas, porque como hemos mencionado anteriormente al parecer la simbiosis entre hongo-planta alivia los efectos del exceso de B.

5.4.7. El estado nutricional de las plantas fue apenas afectado por los tratamientos con exceso de B o la micorrización.

Uno de los efectos positivos de las micorrizas es que pueden mejorar el estado nutricional de los cultivos. En nuestro experimento se observan algunos cambios en el estado nutricional de las plantas con las micorrizas pero ninguno de ellos tan importantes como para afectar a los parámetros de crecimiento vegetativo. Así las plantas +MA en el tratamiento control sin B tuvieron mayor concentración de Mn en las hojas que las plantas -MA. En la raíz, las plantas -MA tuvieron mayor K, Mg y Na, y menor P que las plantas +MA. En cualquier caso estas diferencias no son suficientemente altas como para influir en el crecimiento de las plantas. Lo mismo pasó con los tratamientos de B, se observan diferencias en algunos nutrientes en hojas como raíces pero no relevantes para influir sobre el crecimiento de las plantas.

5.5. Bibliografía

- Ashraf, M., Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 206-216
- AVASA (2015). Agrupación de Viveristas de Agrios, S.A. (España).
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* **14**: 89-97
- 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. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1259-1266
- Cakmak, I., Römheld, V. (1997). Boron deficiency induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil* **193**: 71-83
- Cámara, J.M., García-Sánchez, F., Martínez, V., Nieves, M., Cerdá, A. (2004). Effect of NaCl on *Citrus* cultivars. *Agronomie* **24**: 155-160
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Ríos, J.J., Romero, L., Ruiz, J.M. (2007). Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany* **100**: 747-756

- Choi, E.-Y., McNeill, A., Coventry, D., Stangoulis, J. (2006). Whole plant response of crop and weed species to high subsoil boron. *Crop and Pasture Science* **57**: 761-770
- Choi, E.-Y., Kolesik, P., McNeill, A., Collins, H., Zhang, Q., HUYNH, B.L., Graham, R., Stangoulis, J. (2007). The mechanism of boron tolerance for maintenance of root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant, Cell & Environment* **30**: 984-993
- Dixon, R., Garrett, H., Cox, G. (1989). Boron fertilization, vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and growth of *Citrus jambhiri* Lush. *Journal of plant nutrition* **12**: 687-700
- Douds, D.D., Johnson, C.R., Koch, K.E. (1988). Carbon cost of the fungal symbiont relative to net leaf P accumulation in a split root VA mycorrhizal symbiosis. *Plant physiology* **86**: 491-496
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 317-345
- Francois, L.E. (1984). Effect of excess boron on tomato yield, fruit size and vegetative growth. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **109**: 322-324
- Genard, H., Le Saos, J., Billard, J.-P., Tremolieres, A., Boucaud, J. (1991). Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. *Plant physiology and biochemistry* **29**: 421-427
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E., Gianinazzi, S., Smith, F.A. (1991). Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mucorrhizas. Is H⁺-ATP_{ase} a component of ATP hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New Phytologist* **117**: 61-74
- Gimeno, V., Simón, I., Nieves, M., Martínez, V., Cámara-Zapata, J.M., García, A.L., García-Sánchez, F. (2012). The physiological and nutritional responses to an excess of boron by Verna lemon trees that were grafted on four contrasting rootstocks. *Trees* **26**: 1513-1526
- Graham, J.H. (2000). Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis agroecosystems fungi. . In GK Podila, DDJ Douds, eds, Current Advances in Mycorrhizae Research. APS Press, St. Paul, pp 127-140
- Günes, A., Alpaslan, M. (2000). Boron uptake and toxicity in maize genotypes in relation to boron and phosphorus supply. *Journal of plant nutrition* **23**: 541-550
- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E., Coban, S., Sahin, O. (2006). Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **110**: 279-284

- Hayman, D.S., Barea, J.-M., Azcon, R. (1976). Vesicular arbuscular mycorrhiza in southern Spain: its distribution in crops growing in soil of different fertility. *Phytopathologia mediterranea* **15**: 1-6
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P.S. (2000). Removal of feedback inhibition of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant physiology* **122**: 1129-1136
- Honrubia, M., Díaz, G., Gutiérrez, A. (1997). Micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero en función del tipo de inóculo y técnicas de cultivo. In II Congreso Forestal Español. Congresos-Carga Final,
- Kaya, C., Tuna, A.L., Dikilitas, M., Ashraf, M., Koskeroglu, S., Guneri, M. (2009). Supplementary phosphorus can alleviate boron toxicity in tomato. *Scientia Horticulturae* **121**: 284-288
- Keles, Y., Öncel, I., Yenice, N. (2004). Relationship between boron content and antioxidant compounds in citrus leaves taken from fields with different water source. *Plant and Soil* **265**: 345-353
- Lambert, D.H., Cole, H., Jr., Baker, D.E. (1980). The role of boron in plant response to mycorrhizal infection. *Plant and Soil* **57**: 431-438
- Lovatt, C.J., Bates, L.M. (1984). Early effects of excess boron on photosynthesis and growth of *Cucurbita pepo*. *Journal of Experimental Botany* **35**: 297-305
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., Therios, I. (2006). Boron induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM 9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental and Experimental Botany* **56**: 54-62
- Moya, J.L., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., Talon, M. (2003). Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. *Journal of Experimental Botany* **54**: 825-833
- Moya, J.L., Primo-Millo, E., Talon, M. (1999). Morphological factors determining salt tolerance in *Citrus* seedlings: the shoot-to-root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant, Cell and Environment* **22**: 1425-1433
- Nable, R.O. (1988). Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: a preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant and Soil* **112**: 45-52
- Navarro, J.M., Pérez-Tornero, O., Morte, A. (2014). Alleviation of salt stress in *Citrus* seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi depends on the rootstock salt tolerance. *Journal of Plant Physiology* **171**: 76-85
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1757**: 742-749

- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Giannakoula, A. (2004a). Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant Science* **166**: 539-547
- Parvaiz, A., Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants a review. *Plant Soil and Environment* **54**: 89-99
- Peñuelas, J., Filella, I. (1998). Visible and near infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status. *Trends in plant science* **3**: 151-156
- Pezeshki, S.R. (1994). Plant responses to flooding. In RE Wilkinson, ed, Plant-environment interactions. Marcel Dekker, New York, pp 289–321
- Phillips, J., Hayman, D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society* **55**: 158-IN118
- Pollard, A.S., Parr, A.J., Loughman, B.C. (1977). Boron in relation to membrane function in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **28**: 831-841
- Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R., Graham, R.D. (2004). A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1405-1414
- Rivero, R., Ruiz, J., Romero, L. (2004). Importance of N source on heat stress tolerance due to the accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in tomato plants. *Plant Biology* **6**: 702-707
- Robinson, S., Jones, G. (1986). Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Functional Plant Biology* **13**: 659-668
- Serraj, R., Sinclair, T. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell & Environment* **25**: 333-341
- Sheng, O., Zhou, G., Wei, Q., Peng, S., Deng, X. (2010). Effects of excess boron on growth, gas exchange, and boron status of four orange scion rootstock combinations. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **173**: 469-476
- Simón, I. (2012). Estudio de la tolerancia a la salinidad, toxicidad por boro e inundación en plantas de *Jatropha curcas* L. Univesidad Miguel Hernández
- Sonmez, O., Aydemir, S., Kaya, C. (2014). Mitigation effects of mycorrhiza on boron toxicity in wheat (*Triticum durum*) plants. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **37**: 99-104
- Sotiropoulos, T.E., Therios, I.N., Dimassi, K.N. (1999). Calcium application as a means to improve tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae* **81**: 443-449

- Syvertsen, J.P., Garcia-Sanchez, F. (2014). Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in *Citrus*. *Environmental and Experimental Botany* **103**: 128-137
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Plant physiology. 3rd. ed. Sinauer Associates. Inc. Sunderland, Ma. ISBN 0878938230
- Talaat, N.B., Shawky, B.T. (2014). Protective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants exposed to salinity. *Environmental and Experimental Botany* **98**: 20-31
- Tinker, P., Durall, D., Jones, M. (1994). Carbon use efficiency in mycorrhizas theory and sample calculations. *New Phytologist* **128**: 115-122
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222
- Yordanova, R.Y., Popova, L.P. (2007). Flooding induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **29**: 535-541



Capítulo 6

Conclusiones



6.1 Conclusiones experimento 1: *Estudio de la tolerancia de los portainjertos citrange Carrizo, Citrus macrophylla y naranjo Amargo a la toxicidad por boro.*

1. De los tres portainjertos estudiados, según los parámetros de crecimiento vegetativo, naranjo Amargo resultó ser el más tolerante al exceso de boro. Por el contrario, el menos tolerante fue citrange Carrizo ya que muestra una defoliación severa cuando se alcanza una concentración alta de boro en las hojas.
2. La tolerancia de naranjo Amargo sobre los otros dos portainjertos podría ser debida a que este portainjerto acumula en las hojas una menor concentración de boro que citrange Carrizo, y sus hojas son menos sensibles a la toxicidad por boro que las de *Citrus macrophylla*.
3. La menor acumulación de boro observada en las hojas de naranjo Amargo podría estar relacionada, entre otros factores, a que sus raíces muestran tanto una baja tasa de absorción como de transporte de boro hacia la parte aérea de las plantas.
4. La diferente sensibilidad a la toxicidad por boro entre las hojas *Citrus macrophylla* y naranjo Amargo podría ser debido a que este último portainjerto tiene un sistema antioxidante muy potente basado en una alta actividad de la ascorbato peroxidasa y de la superóxido dismutasa que evita el daño oxidativo.
5. Los efectos del exceso de boro sobre los solutos orgánicos en las hojas tienen como tendencia general una disminución de la concentración de prolina y azúcares solubles. Sin embargo, en la concentración de compuestos amoniocuaternarios se observó una disminución en citrange Carrizo y un aumento en naranjo Amargo y *Citrus macrophylla*. Por lo que este compuesto podría contribuir en cierta medida a evitar daños celulares en la maquinaria fotosintética de las hojas de estos dos portainjertos.

6.2 Conclusiones experimento 2: *Estudio de la tolerancia de los portainjertos citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y el híbrido Forner-Alcaide nº 5 a la toxicidad por boro.*

1. Mandarina Cleopatra, según los datos de la biomasa seca total, resultó ser el portainjerto más tolerante al exceso de boro con respecto a citrange Carrizo y Forner-Alcaide nº 5.
2. Forner-Alcaide nº 5 mejoró la tolerancia al exceso de boro con respecto a su progenitor citrange Carrizo, pero no con respecto a mandarina Cleopatra. No obstante este genotipo podría ser un buen portainjerto para cítricos cultivado con aguas con boro porque su raíz no muestra ninguna sensibilidad a la toxicidad del boro.
3. La mayor tolerancia de las plantas de mandarina Cleopatra, con respecto a los otros dos portainjertos estudiados, fue debido: i) a que el boro se acumula de forma más lenta y en menor concentración que en los otros dos portainjertos; ii) su sistema fotosintético es menos sensible a la toxicidad por boro, como demuestra que solamente a partir de una concentración de 760 mg kg^{-1} ps de boro empieza a disminuir la tasa de asimilación neta de CO_2 ; iii) tiene un sistema antioxidante eficaz como resultado de una actividad enzimática alta de la catalasa y de la glutatión reductasa; y iv) no es proclive a defoliaciones con altas concentraciones de boro en las hojas.
4. La toxicidad del boro causa una disminución de la asimilación neta de CO_2 debido a factores no estomáticos, en donde los datos de fluorescencia de clorofilas apuntan que no se producen daños ni en proceso de captación de la luz, ni en la fase de conversión de la energía lumínica en energía química.
5. Las plantas de cítricos no utilizan solutos orgánicos como prolina o compuestos amoniocuaternarios como compuestos para protegerse de los daños celulares causados por la toxicidad del boro en los tejidos, más bien estos compuestos podrían actuar como una fuente extra de nitrógeno.
6. El boro produce alteraciones nutricionales en las hojas de los cítricos, pero en ningún caso se llega a rangos de deficiencia o toxicidad de los nutrientes analizados.

6.3 Conclusiones experimento 3: *Estudio de la tolerancia del portainjerto citrange Carrizo micorrizado a la toxicidad por boro.*

1. Las altas concentraciones de boro en la solución nutritiva no afectan al porcentaje de micorrización de *Glomus intraradices*, pero si a la proliferación del hongo en las raíces de las plantas de citrange Carrizo.
2. Las plantas micorrizadas son más tolerantes al exceso de boro que las no micorrizadas, debido a que las plantas micorrizadas tuvieron una menor concentración de boro en las hojas y en consecuencia su maquinaria fotosintética parece verse menos afectada y ser menos sensible a la alta concentración de boro foliar.
3. El boro en las plantas de citrange Carrizo es poco móvil entre sus diferentes tejidos y su entrada parece que es debida a un proceso pasivo regulado por la corriente de transpiración.
4. La relación entre los azúcares solubles y reductores, y sobre todo la química del boro que tiene una alta afinidad por los azúcares tipo “diol”, parece ser que juega un papel decisivo en la mayor tolerancia de las plantas micorrizadas al exceso de boro.
5. El estado nutricional de las plantas fue apenas alterado por los tratamientos con exceso de boro o la micorrización, no afectando, por tanto, al crecimiento de las plantas en ninguno de los tratamientos ensayados.

Anexos



ANEXO I. Índice de Tablas

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1.1. Principales características físico-químicas del boro..... | 3 |
| Tabla 1.2. Productos de boro de mayor a menor uso (Who, 2004). N° CAS: número de registro para productos químicos..... | 9 |
| Tabla 1.3. Países con mayor producción de agua desalada del mundo. Fuente: http://desaldata.com/ | 10 |
| Tabla 1.4. Permeabilidad del ácido bórico relativo a otros solutos medidos en algas de células gigantes (Reid, 2014)..... | 17 |
| Tabla 1.5. Destino de las exportaciones españolas de cítricos por países (en miles de toneladas)..... | 36 |
| Tabla 1.6. Valores foliares de referencia de diferentes estados nutritivos de cítricos establecidos por Legaz y Primo-Millo (2000)..... | 39 |
| | |
| Tabla 3.1. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la TCR en citrange Carrizo, naranjo Amargo y <i>Citrus macrophylla</i> a los 45, 84 y 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P<0.05$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. Para cada columna, valores con diferente letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=12$ y $n=8$ repeticiones para los tratamientos de boro y para los portainjertos, respectivamente..... | 85 |
| Tabla 3.2. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la biomasa seca total, foliar, tallo y radicular en citrange Carrizo, naranjo Amargo y <i>Citrus macrophylla</i> a los 84 y 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P<0.01$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. Para cada columna, valores con diferente letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=12$ y $n=8$ repeticiones para los tratamientos de boro y para los portainjertos, respectivamente..... | 89 |
| Tabla 3.3. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B foliar en citrange Carrizo, naranjo Amargo y <i>Citrus macrophylla</i> a los 0, 45, 84 y 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P<0.01$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. Para cada columna, valores con diferente letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=12$ y $n=8$ repeticiones para los tratamientos de boro y para los portainjertos, respectivamente..... | 91 |
| Tabla 3.4. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B en tallo en citrange Carrizo, naranjo Amargo y <i>Citrus macrophylla</i> a los 119 días de experimento.* y *** indican diferencias significativas para $P<0.05$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos. Valores con | |

- distinta letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para n=12 y n=8 repeticiones para los tratamientos de boro y para los portainjertos, respectivamente.....* **94**
- Tabla 3.5.** Efecto del portainjerto sobre la tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y transpiración foliar (E_{leaf}) en plantas del tratamiento control (0,25 mg L⁻¹ de B) a lo largo del experimento. “ns” indica diferencias no significativas; * y ** indican diferencias significativas para P<0.05 y 0.001, respectivamente. Para cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas entre los portainjertos para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (n=4)..... **95**
- Tabla 3.6.** Análisis de la varianza de la asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) y de la transpiración foliar (E_{leaf}) para los factores: portainjerto, tratamientos de boro (B) y su interacción. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos (n=4). Para cada columna, valores con diferente letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan..... **97**
- Tabla 3.7.** Efecto del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de Ca, K, Mg y P foliar y radicular en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* a los 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. Para cada columna, valores con diferente letra presentan diferencias significativas al 5%, establecido por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores son la media de 4 repeticiones..... **101**
- Tabla 3.8.** Efecto del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de azúcares reductores (AR), azúcares solubles (AS) y sobre la relación AR/AS foliar a los 84 días de experimento y sobre la concentración de AS foliar y radicular en Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* a los 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. En la interacción Portainjerto × Boro, para cada portainjerto se indican las diferencias significativas entre los tratamientos de B al 95% o mayor con este símbolo: “γ”. Para los tratamientos de B (control y 10 mg L⁻¹), las letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas entre los portainjertos para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. En el factor Portainjerto, las letras diferentes indican diferencias significativas para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores son la media de 4 repeticiones..... **102**
- Tabla 3.9.** Efecto del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de almidón foliar a los 84 y 119 días y sobre la concentración de almidón radicular a los 119 días de experimento en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla*. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para P<0.05 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. En la interacción Portainjerto × Boro, para cada portainjerto se indican las diferencias significativas entre

- los tratamientos de B al 95% o mayor con este símbolo: “ γ ”. Para los tratamientos de B (control y 10 mg L⁻¹), las letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas entre los portainjertos para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. En el factor Portainjerto, las letras diferentes indican diferencias significativas para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores son la media de 4 repeticiones..... 105
- Tabla 3.10.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de prolina foliar y radicular en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* a los 84 y 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P< 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. En la interacción Portainjerto × Boro, para cada portainjerto se indican las diferencias significativas entre los tratamientos de B al 95% o mayor con este símbolo: “ γ ”. Para los tratamientos de B (control y 10 mg L⁻¹), las letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas entre los portainjertos para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. En el factor Portainjerto, las letras diferentes indican diferencias significativas para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores son la media de 4 repeticiones 107
- Tabla 3.11.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de compuestos amonio cuaternarios (CAQ) foliar y radicular en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus Macrophylla* a los 84 y 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para P<0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. En la interacción Portainjerto × Boro, para cada portainjerto se indican las diferencias significativas entre los tratamientos de B al 95% o mayor con este símbolo: “ γ ”; y para los tratamientos de B (control y 10 mg L⁻¹), las letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas entre los portainjertos para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. En el factor Portainjerto, las letras diferentes indican diferencias significativas para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. En la interacción los valores son la media de 4 repeticiones..... 109
- Tabla 4.1.** Valores medios, mínimos y máximos de temperatura, humedad relativa e irradiación en el interior del invernadero durante el experimento..... 135
- Tabla 4.2.** Análisis de la varianza de la concentración de B_{foliar} para los factores: portainjerto, tratamientos de boro (B) y su interacción. “ns” indica significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para P<0.05 y 0.001, respectivamente..... 143
- Tabla 4.3.** Efecto del portainjerto sobre la tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}), la transpiración foliar (E_{leaf}), la conductancia estomática (g_s), el uso eficiente de agua (UEA) y la concentración de CO₂ subestomática (C_i) en plantas del tratamiento control (0,25 mg L⁻¹ de B) en el tramo final del experimento. Para cada columna, las letras minúsculas diferentes indican diferencias

| | | |
|-------------------|---|------------|
| | <i>significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan ($n=12$).....</i> | 146 |
| Tabla 4.4. | Análisis de la varianza de la asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}) y de la transpiración foliar (E_{leaf}) para los factores: portainjerto, tratamientos de boro (B) y su interacción. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001, respectivamente..... | 148 |
| Tabla 4.5. | Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de macronutrientes (K, Ca, Mg y P) foliar en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide nº 5 tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para el factor Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones... | 152 |
| Tabla 4.6. | Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de macronutrientes (K, Ca, Mg y P) radicular en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide nº 5 tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los factores Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones..... | 153 |
| Tabla 4.7. | Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Na, S y Zn) foliar en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide nº 5 tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001, respectivamente. Para los factores Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones..... | 153 |
| Tabla 4.8. | Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Na, S y Zn) radicular en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide nº 5 tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.01$ y 0.001, respectivamente. Para los factores Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones)..... | 155 |

- Tabla 4.9.** Efectos de la concentración de B en la solución nutritiva sobre la concentración de almidón y compuestos amoniocuaternarios (CAQ) foliar y radicular en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide n° 5 tras 83 días de experimento. “ns”, * y *** indican diferencias no significativas al 95% y diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente, entre los tratamientos ($n=8$). Para los factores Portainjerto y Boro y para cada portainjerto en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para C; d,e,f para CL; x,y,z para F5. En la interacción los valores son la media de 8 repeticiones..... 160
- Tabla 5.1.** Valores asignados a cada porcentaje de presencia de hifas en las raicillas (1 cm de longitud)..... 189
- Tabla 5.2.** Colonización radicular y extensión de la infección de plantas citrange Carrizo micorrizado (+MA) bajo condiciones de toxicidad por B. “ns” indica que no hay diferencias significativas al 95% y * indica diferencias significativas para $P < 0.05$, entre los tratamientos de boro ($n= 8$)..... 191
- Tabla 5.3.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva y la micorrización sobre el peso seco del tallo y la raíz de plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA). *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. Para cada columna, valores con la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=24$ y 16 repeticiones para los tratamientos de boro y micorrizas, respectivamente’ 193
- Tabla 5.4.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la fracción foliar, tallo y radicular en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA). “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. Para el factor Boro y para cada estrategia de micorrización en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). En la interacción los valores son las medias de 8 repeticiones..... 194
- Tabla 5.5.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva a los 0, 23, 50 y 84 días de iniciarse el ensayo sobre la concentración foliar de B en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) o micorrizadas (+MA). “ns” indica significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente. Para el factor Boro y para cada estrategia de micorrización en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). En la interacción los valores son las medias de 8 repeticiones..... 196

- Tabla 5.6.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B en tallo y raíz en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. * indica diferencias significativas para $P < 0.05$. Para cada columna, valores con la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. Los valores son la media para $n=24$ y 16 repeticiones para los tratamientos de boro y micorrizas, respectivamente..... **197**
- Tabla 5.7.** Efectos de la micorrización sobre la tasa de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}) y transpiración foliar (E_{leaf}) en plantas del tratamiento control ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de B) a lo largo del experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95% entre plantas -MA (no micorrizadas) y +MA (micorrizadas)..... **198**
- Tabla 5.8.** Análisis de la varianza de la asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}) y de la transpiración foliar (E_{leaf}) para los factores: micorriza, tratamientos de boro (B) y su interacción. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente.. **199**
- Tabla 5.9.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la eficacia fotoquímica del PSII (Φ_{PSII}), la eficiencia de las antenas en el PSII (F_v/F_m') y el coeficiente “Quenching Fotoquímico” (qP) en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) durante los 84 días que duró el experimento. “ns” indica que no hay diferencias significativas al 95% entre los tratamientos. En la interacción los valores son la media de 6 repeticiones..... **202**
- Tabla 5.10.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de Ca, P, Na, Cu y Mn foliar y radicular en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “ns”, *, ** y *** indican diferencias no significativas al 95%o diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. Para el factor Boro y para cada estrategia de micorrización en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). En la interacción los valores son las medias de 8 repeticiones..... **203**
- Tabla 5.11.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de prolina y CAQ tanto foliar como radicular en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. Para el factor Boro y para cada estrategia de micorrización en la interacción, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (siendo en la interacción: a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). En la interacción los valores son las medias de 8 repeticiones..... **208**

ANEXO II. Índice de Figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1.1. Ester mono borato <i>cis</i> -diol (a), complejo monoborato (b) y complejo <i>bis</i> (diol) (c) <i>Fuente: (tomado de Bolaños y col., 2004)</i> | 4 |
| Figura 1.2. Dos moléculas de ramnagalacturonano-II se unen a través de un complejo borato <i>bis</i> (diol) formado entre los residuos de apiosa (a). Representación de dos residuos de apiosa unidos a través de un enlace borato éster dónde puede observarse como el átomo de B es quiral (b) <i>Fuente: (O'Neill y col., 2004)</i> | 13 |
| Figura 1.3. Esquema propuesto para el transporte de boro en las células vegetales. En ausencia de transporte activo, se trataría de equilibrar el B a través de la membrana plasmática por permeación de ácido bórico directamente a través de la bicapa lipídica (1) o a través de canales de tipo acuaporinas (2). También puede ser equilibrado mediante un sistema activo de transporte (antiporte) con H ⁺ (3). Debido a la entrada de H ⁺ y a la salida de borato se despolariza la membrana plasmática y se acidifica el citoplasma, por lo que el eflujo de H ⁺ electrogénico a través de la H ⁺ -ATP _{asa} es necesaria para mantener los gradientes. Flujos pasivos de membrana se indican mediante <i>línea discontinua</i> y las <i>flechas continuas</i> indican transporte activo. <i>Fuente: (Reid, 2014)</i> | 18 |
| Figura 1.4. Sensibilidad espacial (inhibición del crecimiento) en raíces de trigo en respuesta a la aplicación de 10 mM de B. El sombreado indica las regiones donde se aplicó el boro: (1) en ninguna, (2) en la zona apical, (3) en la sección madura y (4) tanto en la zona apical como en la sección madura. <i>Fuente: Reid y col. (2004)</i> | 28 |
| Figura 1.5. Variedades boro-tolerantes de cebada capaces de mantener concentraciones de boro en raíz por debajo del de la solución externa, mientras que variedades sensibles, las concentraciones en raíz y en solución externa son los mismos. Las líneas discontinuas indican la concentración externa equivalente (A). Transferencia de boro desde la raíz a la parte aérea en variedades boro-sensible y boro-tolerante (B). <i>Fuente: Hayes y Reid (2004)</i> | 30 |
| Figura 1.6. Destinos alternativos para los electrones bajo condiciones de estrés: fotorrespiración (en peroxisomas; Per) y reacción de Mehler (en cloroplastos; Chl). En ambos casos, esto conduce a la producción acelerada de especies reactivas de oxígeno (ROS). <i>Ilustración tomada y modificada de Velarde, A.M. (2009)</i> | 32 |
| Figura 1.7. Esquema general del metabolismo antioxidante. Generación de especies reactivas de oxígeno, tales como el oxígeno solo (¹ O ₂), anión superóxido (O ₂ ⁻), peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y radicales hidroxilo ([•] OH) y sistemas antioxidantes encargados de su detoxificación..... | 33 |
| Figura 1.8. Patrones de cítricos más utilizados en España..... | 38 |
| Figura 1.9. Esquema de la colonización de raíces por micorrizas arbusculares (MA)..... | 41 |

- Figura 3.1.** Diagrama simplificado de la transferencia del fotón durante la fase luminosa de la fotosíntesis desde que entra en contacto con la hoja hasta llegar al centro de reacción del PSII y pasar así a la cadena de transporte de electrones. *Ilustración recuperada y modificada de Mader, S. (2008) y Pearson Benjamin Cummings (eds.) 2005 (<http://es.paperblog.com>)*..... 75
- Figura 3.2.** Evolución de la tasa de crecimiento relativo (TCR) en respuesta al exceso de B en la solución nutritiva en citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) durante los 119 días que duró el experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 86
- Figura 3.3.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la biomasa seca total, foliar, tallo y radicular en citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 84 y 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los tratamientos de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 88
- Figura 3.4.** Evolución de la concentración de B foliar en respuesta al exceso de B en la solución nutritiva en citrange Carrizo, naranjo Amargo y *Citrus macrophylla* durante los 119 días que duró el experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *** indica diferencias significativas para $P < 0.001$ entre los tratamientos. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 90
- Figura 3.5.** Tasa de absorción neta (TAN) y transporte de boro a la parte aérea en respuesta al exceso de B en citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 0-45 y 45-84 días de experimento. En el ANOVA, “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los tratamientos de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 92
- Figura 3.6.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B en tallo y raíz en citrange Carrizo (CC), naranjo Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los tratamientos de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 93
- Figura 3.7.** Evolución de la tasa de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}) y en la transpiración foliar (E_{leaf}) en respuesta al exceso de B en citrange Carrizo,

naranja Amargo y *Citrus macrophylla* durante los 119 días que duró el experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente, entre los tratamientos. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 96

Figura 3.8. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la conductancia estomática (g_s), uso eficiente del agua fisiológico ($UEA_{\text{fisiológico}} = A_{CO_2}/E_{\text{leaf}}$) y concentración de CO_2 subestomático (C_i) en citrange Carrizo (CC), naranja Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los tratamientos de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 98

Figura 3.9. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la eficacia fotoquímica del PSII ($\Phi PSII$), la eficiencia de las antenas en el PSII (Fv'/Fm') y el coeficiente “Quenching Fotoquímico” (qP) en citrange Carrizo (CC), naranja Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los tratamientos de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 99

Figura 3.10. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de Azúcares Reductores y la relación AR/AS foliar y radicular en citrange Carrizo (CC), naranja Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los tratamientos de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 104

Figura 3.11. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y malondialdehído (MDA) en hojas de citrange Carrizo (CC), naranja Amargo (NA) y *Citrus macrophylla* (CM) a los 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los tratamientos de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L^{-1}) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$)..... 110

Figura 3.12. Efectos del exceso de B sobre la actividad de las enzimas catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) en hojas de citrange Carrizo (CC), naranja Amargo (NA) y *Citrus macrophylla*

(CM) a los 119 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para los tratamientos de B, las *letras minúsculas* (control) y *mayúsculas* (10 mg L⁻¹) indican diferencias significativas entre los portainjertos para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=4$).....

111

Figura 4.1. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la biomasa seca total, foliar, tallo y radicular y relación parte aérea raíz en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) a los 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).....

140

Figura 4.2. Evolución de la concentración de B foliar en respuesta al exceso de B en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide nº 5 durante los 83 días que duró el experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.01$ y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).....

142

Figura 4.3. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de boro en tallo y raíz en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) a los 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.01$ y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).....

144

Figura 4.4. Evolución de la tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO_2}) y en la transpiración en respuesta al exceso de B en citrange Carrizo, mandarina Cleopatra y Forner-Alcaide nº 5 durante los 83 días que duró el experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las *letras minúsculas* a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=6$).....

147

Figura 4.5. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la conductancia estomática (g_s), uso eficiente del agua fisiológico ($UEA_{\text{fisiológico}} = A_{CO_2}/E_{\text{leaf}}$)

y concentración de CO₂ subestomático (C_i) en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=6$).....

149

Figura 4.6. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la eficacia fotoquímica del PSII (Φ_{PSII}), la eficiencia de las antenas en el PSII (F_v'/F_m') y el coeficiente “Quenching Fotoquímico” (qP) en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=6$).....

151

Figura 4.7. Efectos de la concentración de boro en la solución nutritiva sobre la concentración de azúcares reductores y azúcares solubles totales en hoja, tallo y raíz en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).....

158

Figura 4.8. Efectos de la concentración de boro en la solución nutritiva sobre la relación AR/AS en hoja, tallo y raíz en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *** indica diferencias significativas para $P < 0.001$, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).....

159

Figura 4.9. Efectos de la concentración de boro en la solución nutritiva sobre la concentración de AR y AS en hoja, tallo y raíz en citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) tras 83 días de experimento. “ns” significa diferencias no significativas al 95%; *** indica diferencias significativas para $P < 0.001$, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el

- error estándar de la media ($n=8$)..... 161
- Figura 4.10.** Efectos de la concentración de boro en la solución nutritiva sobre la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y malonildialdehído (MDA) en hojas de citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) tras 83 días de experimento. “*ns*” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P<0.001$ y 0.001 , respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P<0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$)..... 162
- Figura 4.11.** Efectos de la concentración de boro en la solución nutritiva sobre la concentración de catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y superóxido reductasa (SOD) en hojas de citrange Carrizo (CC), mandarina Cleopatra (CL) y Forner-Alcaide nº 5 (F5) tras 83 días de experimento. *** indica diferencias significativas para $P<0.001$, respectivamente. Para cada portainjerto, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de B para $P<0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan, respectivamente. Las letras a,b,c se utilizan para CC; d,e,f para CL; x,y,z para F5. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$)..... 164
- Figura 4.12.** Factores que determinan la tolerancia al exceso de B en plantas de cítricos: concentración de B en el suelo (1), tiempo de exposición al exceso de B (2), y tipo de portainjerto, el cual determina la tasa de transpiración (3)..... 169
- Figura 5.1.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la biomasa seca total, foliar, tallo y radicular en plantas citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA). “*ns*” significa diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P<0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P<0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). *Letras mayúsculas* diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$)..... 192
- Figura 5.2.** Evolución de la concentración de B foliar en respuesta al exceso de B en plantas de citrange Carrizo -MA y +MA durante los 84 días que duró el experimento. “*ns*” indica diferencias no significativas al 95% *** indican diferencias significativas para $P<0.001$, respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P<0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$)..... 195
- Figura 5.3.** Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de B en tallo y raíz en plantas de citrange Carrizo no micorrizada (-MA) y

micorrizada (+MA) a los 84 días de experimento. “*ns*” significa diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).....

197

Figura 5.4. Evolución de la tasa de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}) y transpiración foliar (E_{leaf}) en respuesta al exceso de B en la solución nutritiva en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) durante los 84 días que duró el experimento. Los datos son expresados como porcentaje relativo a los datos del tratamiento control. “*ns*” significa diferencias no significativas al 95%; ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.01$ y 0.001 , respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=6$).....

199

Figura 5.5. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}), conductancia estomática (g_s), uso eficiente del agua fisiológico ($\text{UEA}_{\text{fisiológico}} = A_{\text{CO}_2}/E_{\text{leaf}}$) y concentración de CO_2 subestomático (C_i) en plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “*ns*” indica diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). *Letras mayúsculas* diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=6$).....

201

Figura 5.6. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de azúcares reductores (AR) y azúcares solubles (AS) en los diferentes tejidos de la plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “*ns*” indica diferencias no significativas al 95%; *, ** y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). *Letras mayúsculas* diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media ($n=8$).....

205

Figura 5.7. Efectos del exceso de B sobre la concentración de almidón en hojas y raíz de la plantas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “*ns*” indica diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para $P < 0.05$ establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). *Letras mayúsculas* diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media

| | |
|--|-----|
| (n=8)..... | 207 |
| Figura 5.8. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de malonildialdehído (MDA) y peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en hojas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; *** indica diferencias significativas para P<0.001. Para cada tratamiento de micorrizas, las <i>letras minúsculas</i> diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). <i>Letras mayúsculas</i> diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media (n=4)..... | 209 |
| Figura 5.9. Efectos del exceso de B en la solución nutritiva sobre la concentración de catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD) en hojas de citrange Carrizo no micorrizadas (-MA) y micorrizadas (+MA) a los 84 días de experimento. “ns” indica diferencias no significativas al 95%; * y *** indican diferencias significativas para P<0.05 y 0.001, respectivamente. Para cada tratamiento de micorrizas, las <i>letras minúsculas</i> diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de boro para P<0.05 establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (a,b,c para -MA; x,y,z para +MA). <i>Letras mayúsculas</i> diferentes, para cada tratamiento de boro, indican diferencias significativas entre -MA y +MA. La barra vertical indica el error estándar de la media (n=4)..... | 210 |
| Figura 5.10. Reducción de la proliferación del micelio intrarradial. <u>Hipótesis I</u> : el B en exceso podría afectar al desarrollo de las estructuras micorrícicas (vesículas, arbusculos, etc.). <i>Ilustración recuperada y modificada de Plant Physiology. Third Edition. Figure 5.11 © 2002. Sinauer Associates. Inc.</i> | 213 |
| Figura 5.11. Reducción de la proliferación del micelio intrarradial. <u>Hipótesis II</u> : el B en exceso afecta al transporte de azúcares desde la hoja hacia la raíz micorrizada..... | 213 |
| Figura 5.12. Reducción de la proliferación del micelio intrarradial. <u>Hipótesis III</u> : el B en exceso debido a la alta afinidad que presenta por los hidratos de carbono fúngicos (polialcoholes) forman los complejos poliol-B, por lo que éstos ya no están disponibles para que el hongo los utilice como fuente de energía (reducción de su crecimiento). <i>Ilustración recuperada y modificada de Plant Physiology. Third Edition. Figure 5.11 © 2002. Sinauer Associates. Inc.</i> | 214 |
| Figura 5.13. Esquema simplificado del posible papel que juegan las micorrizas en una mayor tolerancia al exceso de B en el portainjerto citrange Carrizo. 1: los azúcares son transportados desde las hojas hasta la raíz micorrizada en forma de sacarosa. 2: la célula hospedadora libera sacarosa a la matriz interfacial mediante transporte pasivo y se hidroliza en glucosa y fructosa mediante la acción de una invertasa apoplástica. 3: la glucosa es absorbida por el hongo mediante un proceso de transporte activo. 4: el destino metabólico de las hexosas tomadas por las estructuras fúngicas intrarradiales es ser transformadas principalmente a trehalosa o glucógeno y transferidas al micelio extrarradial. 5: en él, los compuestos lipídicos se | |

transformarán en azúcares tipo –diol. 6: el B absorbido por el hongo en la rizosfera, debido a su alta afinidad por este tipo de azúcares, formará complejos poliol-B dentro de la hifa extrarradial (7), pudiendo quedar inmovilizados en el micelio extrarradial (8) e incluso pudiendo llegar a ser expulsados hacia el exterior de la planta (9). Esto explicaría que la absorción de B por parte de la raíz micorrizada fuera menor y, por tanto, la concentración de boro que llega a la parte aérea también lo fuera, reduciendo de ese modo su toxicidad en la planta de carrizo Citrange micorrizada..... **223**

ANEXO III. Índice de Imágenes

| | |
|---|-----------|
| Imagen 1.1. Raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) cultivadas en hidropónico durante 1 hora con una solución nutritiva sin boro (-B) o con boro (+B), y teñidas con azul de Evans para identificar la viabilidad de las células (<i>el color azul oscuro identifica las células muertas</i>). Fuente: Oiwa y col. (2013)..... | 14 |
| Imagen 1.2. Síntomas de toxicidad por B en hojas de trigo (1) y en cítricos (2). Las flechas negras señalan las quemaduras..... | 24 |
| Imagen 1.3. Esquema modelo de la ultraestructura de una hoja (A). Micrografías de luz de secciones transversales de hoja de mandarina 'Clementina' cultivadas con 0,25 mg L ⁻¹ (B) y 2,50 mg L ⁻¹ de boro (C; Ampliado: ×170). ic: celda de cristal (idioblasto); pp: parénquima en empalizada; sp: parénquima esponjoso; st: estomas. Fuente: Papadakis y col. (2004a)..... | 25 |
| Imagen 1.4. Cloroplastos en las células del mesófilo de plantas de naranja "Navelina" cultivadas con 0,25 mg L ⁻¹ (A; Ampliado: ×15.000) y 2,50 mg L ⁻¹ de boro (B; Ampliado: ×22.000). Las flechas negras señalan los granos de almidón fotosintético. Fuente: Papadakis y col. (2004b)..... | 27 |
| Imagen 1.5. Imagen al microscopio de raíz colonizada por <i>Glomus intraradices</i> , donde se observan las vesículas y los arbuscúlos. Fuente: facultad de biología de Ludwig-Maximilians-Universität München(Schüßler, 2015)..... | 44 |
| Imagen 3.1. Plantas utilizadas en el experimento de portainjertos. 1: <i>Citrus macrophylla</i> ; 2: naranjo Amargo; y 3: citrange Carrizo..... | 68 |
| Imagen 3.2. Vista parcial del invernadero donde se realizó el experimento..... | 69 |
| Imagen 3.3. Cubas de 120 L empleadas en el experimento para regar con los distintos tratamientos de B (B0 o control: 0,25 mg L ⁻¹ ; y B10: 10 mg L ⁻¹)... | 71 |
| Imagen 3.4. Equipo portátil de fotosíntesis (PP System Ciras2, UK) empleado para hacer las medidas de intercambio gaseoso..... | 72 |
| Imagen 3.5. Equipo portátil de fluorescencia de clorofilas (fluorímetro de pulso modulado FMS-2 portátil; Hansatech Instruments Ltd., UK) empleado para hacer las medidas de cinética de emisión de la fluorescencia de la clorofila..... | 74 |

| | |
|--|------------|
| Imagen 3.6. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro. 1 y 4: citrange Carrizo (amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja; y defoliación severa). 2 y 5: <i>Citrus macrophylla</i> (amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja; y quemaduras (<i>flecha negra</i>)). 3 y 6: naranjo Amargo (síntomas ligeros de clorosis en las hojas basales)..... | 84 |
| Imagen 4.1. Vista parcial del vivero comercial (Vivercitrus 2000, S.L., España) donde se obtuvieron los plántones y etiqueta oficial del certificado de calidad de los mismos..... | 135 |
| Imagen 4.2. Vista parcial del sistema de riego y de las cubas con los distintos tratamientos de B (B0 o control : 0,25 mg L ⁻¹ ; B5 : 5 mg L ⁻¹ ; y B10 : 10 mg L ⁻¹) que se emplearon para el experimento..... | 136 |
| Imagen 4.3. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro en citrange Carrizo (1 y 4), mandarino Cleopatra (2 y 5) y Forner-Alcaide nº 5 (3 y 6). 1, 2 y 3: amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja. 1 y 6: quemaduras (<i>flechas negras</i>). 4, 5 y 6: Necrosis y defoliación prematura..... | 139 |
| Imagen 5.1. Preparado comercial MYC 4000 (ITHEC, Castelmaurou-Francia) de la cepa <i>Glomus intraradices</i> usado en el ensayo..... | 184 |
| Imagen 5.2. Vista parcial del sistema de riego y de las cubas con los distintos tratamientos de B (B0 o control : 0,25 mg L ⁻¹ ; B5 : 5 mg L ⁻¹ ; y B10 : 10 mg L ⁻¹) que se emplearon para el experimento..... | 186 |
| Imagen 5.3. Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro en citrange Carrizo sin micorrizar (1: amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja. 2: quemaduras (<i>flecha negra</i>). 3: necrosis y defoliación prematura) y micorrizado (4: amarilleamiento del ápice y bordes de la hoja. 5: quemaduras (<i>flecha negra</i>). 6: necrosis y defoliación prematura)..... | 190 |
| Imagen 5.4. Raíces micorrizadas sin B (1) y con B (2). Hifas sobre células de la raíz (<i>flecha amarilla</i>) y apresorios (<i>flecha negra</i>) a 10X..... | 191 |