

ESTUDIO DEL EFLUJO NETO DE H⁺ POR RAICES AEROPONICAS ESTERILES DE PLANTULAS DE GIRASOL (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) BAJO CONDICIONES DE TOXICIDAD DE B

F. Espinosa y M. C. Alvarez-Tinaut

*U. E. Fisiología Vegetal. Dpto. Biología y Producción Vegetales.
Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. 06071 Badajoz*

RESUMEN

Se han realizado experimentos de corta (adicionando borato al medio de medida) y larga (adicionándolo al medio de cultivo) exposición a 50 y 100 mg L⁻¹ (toxicidad) de Boro, midiéndose el efecto sobre la capacidad tampón (β) y el eflujo neto de H⁺ de las raíces. El exceso de B reduce β de las raíces, y además, tanto 50 como 100 mg L⁻¹ de B inhiben el eflujo neto de H⁺, en una respuesta que depende del tiempo de exposición a la toxicidad: es más acusada en los experimentos de larga que de corta exposición, atenuándose además las diferencias entre ambas concentraciones (con el tiempo se observa un efecto de saturación). El pH final alcanzado es siempre menos ácido con 100 que con 50 mg L⁻¹, sin que influya el tiempo de exposición a la toxicidad. Se propone que la causa de la reducción del eflujo neto de H⁺ podría ser una menor eficiencia de los sistemas de extrusión de H⁺ junto con un aumento del influjo, siendo este último efecto especialmente acusado con 100 mg L⁻¹ de B, a pH < 6.0 y en los experimentos de larga exposición a la toxicidad.

Palabras clave: Eflujo de H⁺. Raíces. Girasol. Toxicidad de Boro.

SUMMARY

NET H⁺ EFFLUX BY AEROPONICALLY CULTURED STERILE SEEDLING ROOTS OF SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) UNDER BORON TOXICITY

Two kinds of B toxicity experiments were performed: short term (borate added to measure media) and long term (borate added to plant culture media) exposure to 50 and 100 mg L⁻¹ of B, measuring the effect on buffering power (β) and net H⁺ efflux by the roots. B toxicity reduced roots β and both 50 and 100 mg L⁻¹ B inhibited net H⁺ efflux rate by roots, this response depending on the exposition time to B toxicity: short exposition was less inhibitory than long exposition, the difference between the responses to both B concentrations being lesser in this last case (saturation was reached with time). Final pH was always less acidic with 100 than with 50 mg L⁻¹ B, the time of exposition to B toxicity being not involved in this effect. Net H⁺ efflux inhibition is proposed to be due to a lesser efficiency of H⁺ extrusion systems, together with an increase in H⁺ influx, this being specially pronounced with 100 mg L⁻¹ B, pH < 6.0 and with long term exposition to B toxicity.

Key words: H⁺ efflux. Roots. Sunflower. Boron toxicity.

Este trabajo ha sido realizado dentro del Proyecto de la DGICYT (número PB 87-0324).

INTRODUCCION

Entre los efectos que se atribuyen al B en las plantas, uno de los más ampliamente aceptados es el de su actuación a nivel de las membranas y/o paredes celulares, mediante la formación de complejos entre los grupos —OH de diferentes componentes de las mismas (polisacáridos de la pared y glucolípidos y gluco-proteínas de la membrana) y los iones borato (Augsten y Eichhorn, 1976).

Se ha propuesto que la base de la acción primaria del B estaría a nivel de las membranas, de las que podría ser un componente esencial (Parr y Loughman, 1983; Pilbeam y Kirkby, 1983; Pollard *et al.*, 1972; Smith y Dugger, 1980), ya que las plantas sometidas a deficiencia de este elemento presentan alteraciones en la absorción y transporte de otros nutrientes (Pollard *et al.*, 1977; Robertson y Loughman, 1974; Smith y Dugger, 1980), ya que desaparecen al añadir B al medio. Estas alteraciones han sido atribuidas a un efecto de la deficiencia de B sobre los sistemas de transporte activo de H^+ , directamente (Pollard *et al.*, 1977) o indirectamente (Parr y Loughman, 1983). En este campo destacan los resultados de Roldán *et al.* (1988), que detectan un efecto igualmente depresor de la deficiencia y toxicidad de B sobre la extrusión de H^+ por vesículas microsomaes de plántulas de girasol, demostrando, además, que la aplicación "in vitro" de B a dichas vesículas no tiene efecto alguno sobre su actividad ATPásica.

En cuanto a la causa molecular base de estas respuestas, se han propuesto diferentes hipótesis. Así,

Belver *et al.* (1988) han comprobado que la aplicación de B en exceso provoca cambios estructurales de las membranas, así como de los componentes lipídicos de microsomas de raíces de girasol, semejantes a los que se observan en tejidos senescentes. En esta misma línea, Parr y Loughman (1983) sugieren la posibilidad de que complejos entre componentes lípido-proteicos de las membranas y el B fueran la base de la funcionalidad de las mismas. Los resultados del equipo de Bonilla en cianofitas (García-González *et al.*, 1988; García-González *et al.*, 1990; Mateo *et al.*, 1986) les han llevado a proponer que la esencialidad del B para las plantas superiores estaría más bien relacionada con la parte glucídica de los glucolípidos y gluco-proteínas de las membranas, que serían la conexión entre estas membranas (por su cara externa) y la pared celular, y con quienes el borato formaría complejos capaces de mantener la integridad y funcionalidad de las biomembranas, la carga de su superficie y la regulación de su capacidad de transporte.

Por otra parte, Bonilla (1991) y Blaser-Grill *et al.* (1989) han propuesto que la toxicidad de B altera el pH intracelular y sus mecanismos de regulación, provocando un cortocircuito metabólico, ya que la entrada del ácido bórico (comportándose como un ácido permeante —Marré *et al.*, 1983; Reid *et al.*, 1985)— y su unión a grupos —OH del citosol formaría aniones borato o ésteres borato cargados negativamente, lo que provocaría la acidificación del citoplasma, que así se comportaría como un sumidero para los ácidos débiles

por su pH ligeramente alcalino. Finalmente, Marschner (1991) mantiene la hipótesis de que la acción del B estaría a nivel del apoplasto, pared celular y plasmalema por su cara externa, donde formaría complejos B—Ca—OH. Según esta hipótesis, el B se encontraría fuera de la membrana, protegiéndola y actuando como regulador de los canales de Ca.

En este contexto de opiniones diferentes, el presente trabajo se planteó para tratar de estudiar los efectos de la toxicidad de B sobre un proceso tan ligado a la actuación de las membranas celulares como la extrusión de H⁺, poniendo especial atención en la evaluación de los cambios en las propiedades tampoadoras del medio y de las paredes

celulares, que pueden enmascarar los cambios en el eflujo de H⁺. Asimismo, realizando experimentos de corta y larga exposición a la toxicidad, tratábamos de diferenciar los efectos inmediatos del exceso de B sobre los sistemas de extrusión de H⁺ normalmente desarrollados en cultivo sin B, de aquellos provocados por el desarrollo de las plántulas en exceso de B desde su germinación.

Todos los experimentos se realizaron usando raíces enteras aeropónicas, cultivadas en condiciones estériles, que constituyen un sistema muy apropiado donde poder evaluar simultáneamente los efectos sobre paredes y membranas (Espinosa, 1991).

MATERIAL Y METODOS

Cultivo

Se han utilizado semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.), variedad híbrido enano (Koipe, S. A., Sevilla), esterilizadas con etanol 96° (4 min.) e hipoclorito sódico (4.8 g L⁻¹, 20 min.), lavadas 3 veces con agua destilada estéril e imbibidas en solución estéril de CaCl₂ 1 mM (salvo las cultivadas con exceso de B, a las que además se adicionó la concentración correspondiente) durante 6 h., con agitación y aireación a través de torunda de algodón estéril. A continuación se sembraron en cajas herméticas de plástico con suficiente atmósfera interna, esterilizadas con hipoclorito sódico (40 g L⁻¹) y exposición a radiación UV, sobre doble

capa de papel de celulosa humedecido con solución fresca idéntica a la de imbibición, incubándose a 27 °C, en completa oscuridad durante 36 h. Al final de este periodo, que equivale a 48 h. desde el inicio de la esterilización de las semillas, se seleccionaron plántulas de tamaño homogéneo, seccionándose la porción apical (0.5-0.7 cm) de sus raíces (peso fresco medio 0.0125 g raíz⁻¹), que se utilizaron para las medidas. Las raíces así obtenidas correspondían al tipo de raíces "aeropónicas" descritas por Zsoldos *et al.* (1987). Todas las manipulaciones se llevaron a cabo en cámara de flujo laminar, los materiales fueron esterilizados en autoclave y los medios filtrados a través de filtro Millipore GV 22 µm.

Medidas del eflujo neto de H⁺ por las raíces

Aproximadamente 40 raíces (aprox. 50 de las cultivadas con exceso de B) con un peso exactamente medido de alrededor de 0.5 g, fueron preincubadas durante 60 min. a 4 °C con agitación y aireación. La medida se realizó en una cámara termostatazada a 30 °C, con 10 mL de medio que contenía tampón Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM y KCl 2 mM, al que se adicionaba o no H₃BO₃, llevándose a pH final 6.5, con agitación y aireación a través de filtro de bacterias, registrándose los cambios de pH con un electrodo combinado y un pHmetro Radiometer pHM84, con registrador y potenciómetro amplificador de escala.

Medida de la capacidad tampón del medio sin y con raíces

Se realizó mediante la titulación con 100 nmoles de H⁺ en adiciones sucesivas a los 10 mL de medio de medida, sin y con 0.5 g de raíces metabólicamente inactivadas por preincubación en NaCN 5 mM durante 180 min. (seguida de abundantes lavados con agua estéril), a lo largo de todo el intervalo de pH de medida (6.5 a 4.9). El cociente entre

los nmoles de H⁺ añadidos y la variación de pH observada indica el valor de la capacidad tampón $-\beta-$ para cada pH. Los datos correspondientes a 3 experimentos independientes cuando menos, en cada caso, se ajustaron a una parábola mediante ordenador Macintosh SE FD HD, obteniéndose la ecuación matemática, que era utilizada en un programa propio para calcular la velocidad de eflujo neto y el eflujo total de H⁺.

Medida del efecto de la toxicidad de Boro sobre el eflujo neto de H⁺

Se desarrollaron dos tipos diferentes de experimentos: en el primero (*experimentos de "corta exposición" a la toxicidad*) se midió el eflujo neto de H⁺ por raíces normales (cultivadas sin B en el medio) en presencia de 2 concentraciones tóxicas de B: B₅₀ y B₁₀₀ (50 y 100 mg L⁻¹ de B, respectivamente) adicionadas al medio de medida; en el segundo tipo (*experimentos de "larga exposición" a la toxicidad*) se adicionaban las mismas concentraciones de B al medio de germinación y cultivo de las plántulas, midiéndose el eflujo neto de H⁺ por las raíces así obtenidas en ausencia de B en el medio de medida.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para establecer las condiciones de normalidad en cuanto a nutrición de B de las plántulas, hemos tomado como referencia los experimentos de Belver (1986) con plántulas de girasol de idéntica procedencia que las nuestras, donde se puso de manifiesto que el cultivo hasta 10 días sin

aporte de B no provocaba síntomas de deficiencia aparente; estas observaciones y las de otros autores como Bohnsack y Albert (1977), Hirsch y Torrey (1980) y Kouchi y Kumazawa (1976), se explican porque las semillas contienen B en cantidad suficiente para estos primeros días de

cultivo (Belver, 1986; Belver *et al.*, 1988). En nuestro caso, el contenido de B en las semillas era de 52 ± 0.5 mg B kg⁻¹ peso seco, más que suficiente para que consideremos como plantas normales las cultivadas sin B en el medio, como demuestran el óptimo desarrollo de las raíces y la ausencia de síntomas de deficiencia. Por el contrario, la morfología de las raíces de las plántulas cultivadas con exceso de B (*experimentos de "larga exposición"*) se caracterizaba por una menor longitud, aumento del grosor y escaso desarrollo del sistema de pelos absorbentes. Estas alteraciones eran mucho más patentes en las raíces de las plántulas cultiva-

das con B₁₀₀, que además estaban muy curvadas y presentaban pardeamiento en el ápice. El peso fresco de estas raíces era menor que el de las normales, mientras el de las crecidas con B₅₀ era igual, al compensarse una menor longitud con un mayor grosor. Además, el exceso de B redujo el porcentaje de germinación de las semillas (92 % para las germinadas sin B frente al 72 % para las germinadas con B₁₀₀). Todas estas observaciones son similares a las descritas para el desarrollo radicular en condiciones de toxicidad de B (Belver, 1986; Kouchi y Kumazawa, 1975; Kouchi y Kumazawa, 1976).

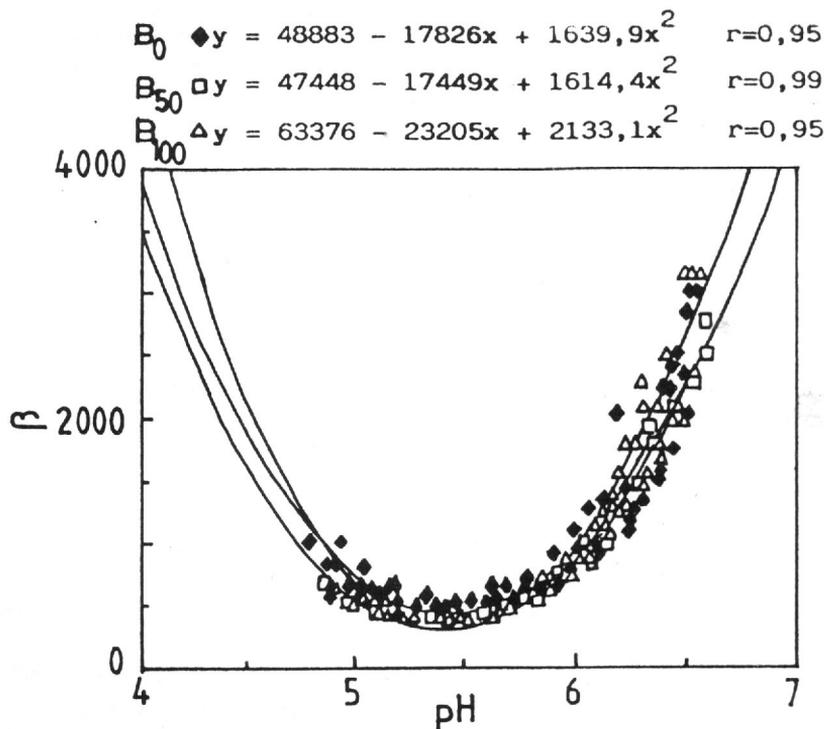


FIG. 1.—Comparación de la capacidad tampón ($\beta = \text{nmoles de H}^+ \Delta\text{pH}^{-1}$) del medio de medida sin y con 50 y 100 mg l.⁻¹ de B. (Datos de 3 experimentos independientes para cada nivel de B).

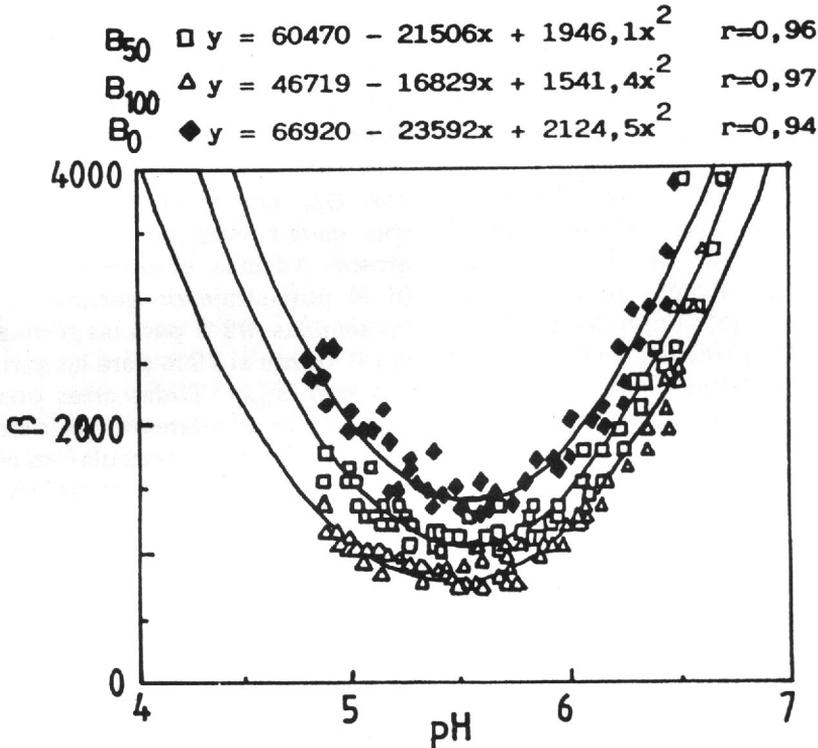


FIG. 2.—Comparación de la capacidad tampón ($\beta = \text{nmoles de H}^+ \Delta\text{pH}^{-1}$) del medio con 40 raíces normales (cultivadas sin B) y preincubadas en 5 mM de NaCN durante 3 h, medida en ausencia de B, y en presencia de 50 y 100 mg L⁻¹ de B ("Corta exposición" a la toxicidad). (Datos de 4 experimentos independientes para cada nivel de B).

Analogías y diferencias entre las respuestas de las raíces a la toxicidad de B, en experimentos de corta y larga exposición

La toxicidad de B, tanto si se aplica en experimentos de corta como de larga exposición, produce efectos esencialmente semejantes, aunque con algunas diferencias, sobre el eflujo neto de H⁺ de las raíces:

a) Puesto que la capacidad tampón del medio (β) no se modifica significativamente por el exceso de B (Fig. 1), siendo necesaria la presencia de raíces metabólicamente inactivas

para que se observe una modificación (Figs. 2 a 4), hemos de concluir que la disminución de β se debe, presumiblemente, a la combinación del borato con los componentes de las paredes celulares de las mismas, al menos en los experimentos de corta exposición (Fig. 2). En los experimentos de larga exposición a la toxicidad de B (Fig. 3), los cambios podrían afectar, además, la composición y/o estructura de dichas paredes, ya que la disminución de β es más acusada. Puesto que β es siempre menor, sea cual sea la causa, siempre actúa en el sentido

de disminuir el número de cargas negativas susceptibles de retener los H⁺ en la fase de Donnan de las paredes celulares. Las diferencias entre B₅₀ y B₁₀₀ sólo son apreciables en los experimentos de corta exposición (Fig. 2), en las que presumiblemente 50 mg L⁻¹ de B, actuando durante tan poco tiempo, no permiten completarse en las paredes los cambios responsables de la disminución de la capacidad tampón de las mismas; en los experimentos de larga exposición dichos cambios sí se completan con 50 mg L⁻¹, no apreciándose diferencias entre las

respuestas a B₅₀ y B₁₀₀ (Fig. 3), ni siquiera cuando, además, se añaden las mismas concentraciones tóxicas de B al medio de medida (Figs. 4A-4B).

b) Como puede deducirse de los "blancos" con B₁₀₀ del medio con y sin raíces metabólicamente inactivadas por preincubación con NaCN, mantenidos en idénticas condiciones y por el mismo tiempo que dura la cinética de las raíces metabólicamente activas, en ambos tipos de experiencias sólo las raíces metabólicamente activas son capaces de acidi-

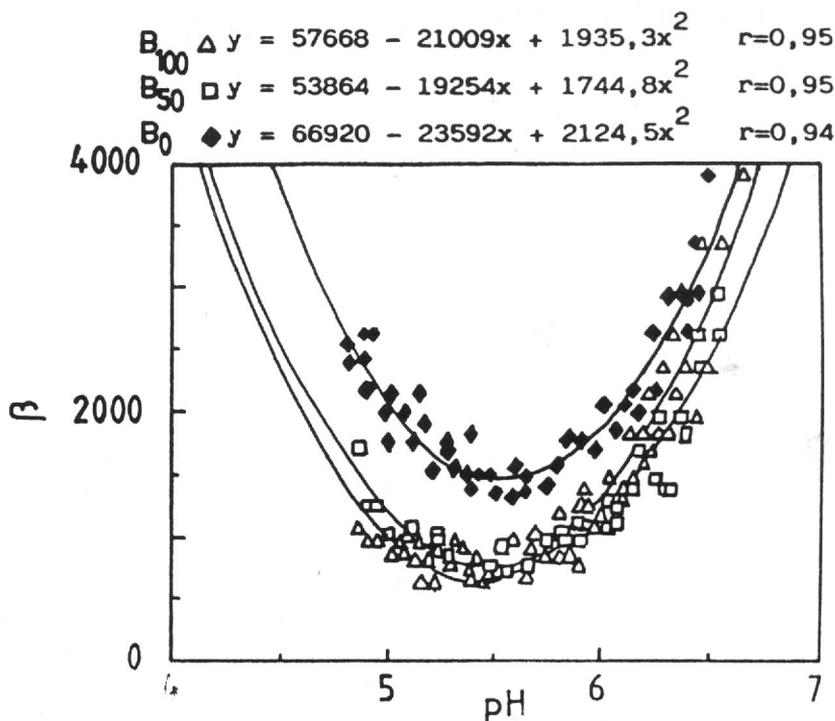
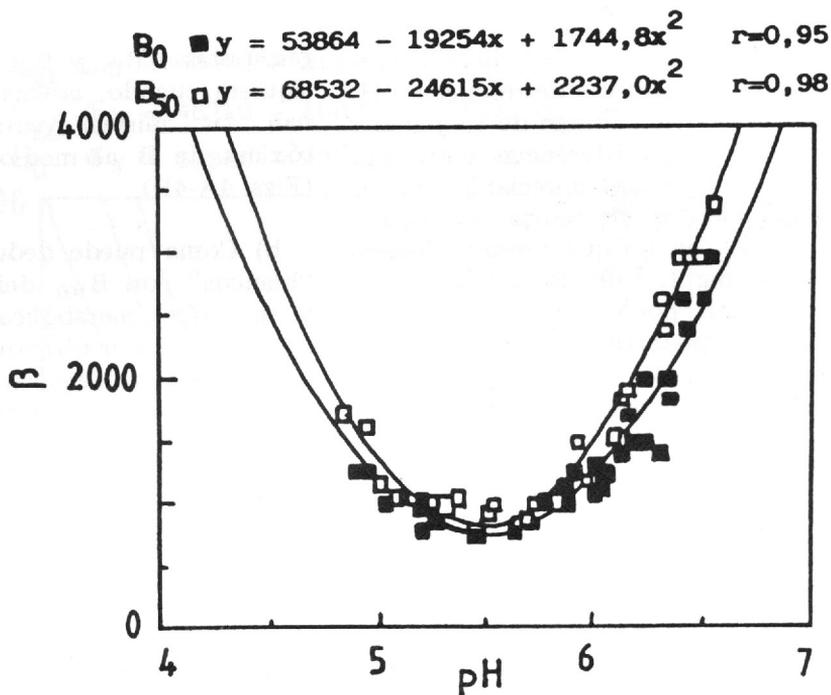


FIG. 3.—Capacidad tampón ($\beta = \text{nmoles de H}^+ \Delta\text{pH}^{-1}$) del medio con 40 raíces normales (cultivadas sin B) en comparación con igual peso fresco de raíces cultivadas con 50 y 100 mg L⁻¹ de B ("Larga exposición" a la toxicidad), metabólicamente inactivadas por preincubación en 5 mM NaCN durante 3 h, y medidas en condiciones standard (sin B en el medio de medida). (Datos de 4 experimentos independientes para cada nivel de B).

A



B

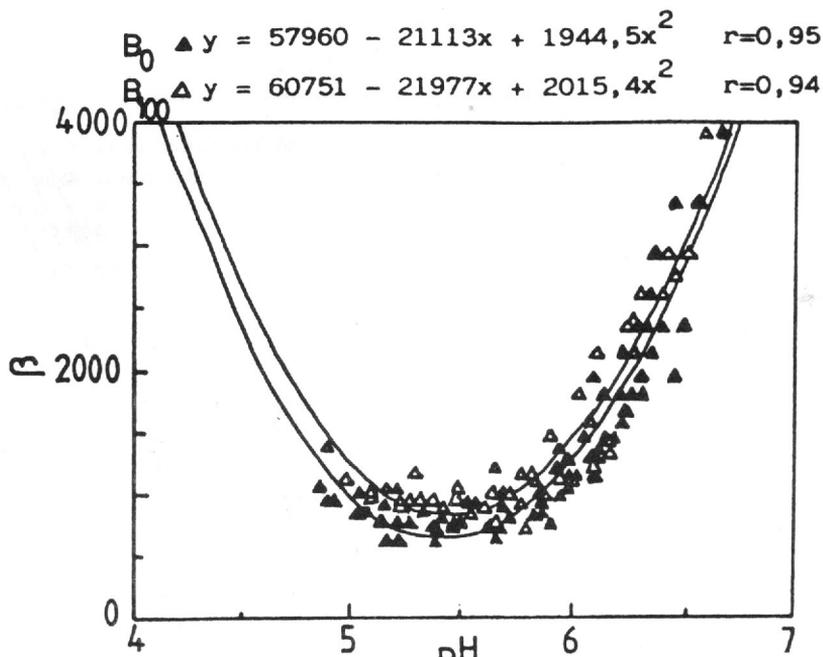


FIG. 4.—Capacidad tampón del medio ($\beta = \text{nmoles de } H^+ \Delta \text{pH}^{-1}$) con raíces metabólicamente inactivadas por preincubación en 5 mM NaCN durante 3 h, provenientes de plántulas cultivadas con 50 mg L⁻¹ de B y medidas en ausencia y presencia de 50 mg L⁻¹ de B (A), y de plántulas cultivadas con 100 mg L⁻¹ de B y medidas en ausencia y presencia de 100 mg L⁻¹ de B (B). (Datos de, al menos, 3 experimentos independientes para cada nivel de B).

ficar el medio (Figs. 5 y 6). Este resultado es particularmente interesante, ya que se ha propuesto que los efectos del H³BO₃ sobre el pH del medio pudieran deberse a una simple reacción química del ácido bórico con los componentes extracelulares, con la consiguiente liberación de H⁺. Tal hecho no ocurre en nuestro caso, como demuestran los referidos blancos, realizados con raíces con paredes intactas, que sólo se diferencian de las utilizadas en nuestros experimentos de extrusión de H⁺ por su nula actividad metabólica.

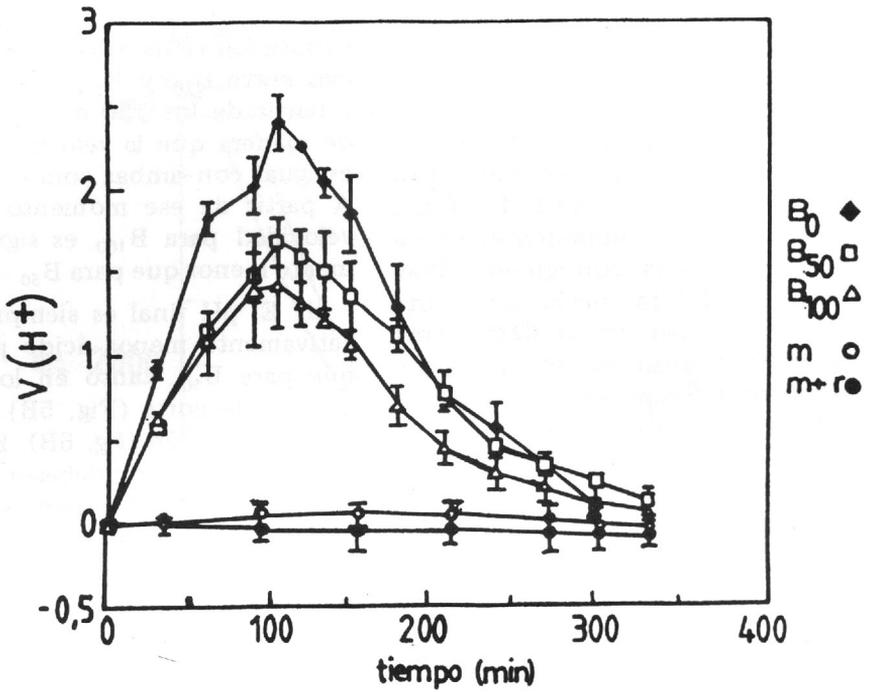
c) La toxicidad de B, en ambos tipos de experimentos, hace disminuir tanto la velocidad de eflujo (Figs. 5 y 6), como el eflujo neto total de H⁺ (Fig. 7). Este último refleja los cambios en la capacidad tampón, ya que está calculado a partir de ésta y el pH inicial y final alcanzado. Por ello, como en el caso de β , las diferencias entre B₅₀ y B₁₀₀ sólo son apreciables en los experimentos de corta exposición a la toxicidad. Sin embargo, en el cálculo de la velocidad de eflujo neto de H⁺ están corregidas las diferencias de β , así que los cambios detectados han de atribuirse a una disminución directa de la velocidad de eflujo de H⁺, a un aumento de la de influjo o a ambas causas. Aquí también se observa que las diferencias entre B₅₀ y B₁₀₀ son más acusadas en los experimentos de corta exposición (Figs. 5A-5B). Las diferencias son apreciables desde prácticamente los 100 min. —pH 6.2—, donde se da la meseta de velocidades máximas, y en consecuencia éstas son apreciablemente menores para B₁₀₀ que para B₅₀. En los experimentos de larga

exposición (Figs. 6A-6B) las diferencias entre B₅₀ y B₁₀₀ sólo aparecen a partir de los 150 min. —pH 6.0—, de manera que la velocidad máxima es igual con ambas concentraciones. A partir de ese momento y pH, la velocidad para B₁₀₀ es significativamente menor que para B₅₀.

d) El pH final es siempre significativamente menos ácido para B₁₀₀ que para B₅₀, tanto en los experimentos de corta (Fig. 5B) como de larga exposición (fig. 6B). Este efecto tampoco puede deberse a la diferente capacidad tampón: en primer lugar porque en los experimentos de corta exposición β es menor para B₁₀₀ que para B₅₀, y por tanto el pH final debería ser más ácido para B₁₀₀ que para B₅₀, y no al revés; en segundo lugar, porque en los experimentos de larga exposición, en que β es prácticamente idéntica para ambas concentraciones, se mantienen las diferencias de pH final. Goldbach (1985, 1986, 1989, 1990) ha propuesto que el afecto del B podría ser aumentar el influjo de H⁺, más que disminuir su eflujo. Nuestros resultados serían congruentes con esta hipótesis, al menos para B₁₀₀, ya que ello llevaría a un pH final (de equilibrio entre eflujo e influjo) superior al esperado según la capacidad tampón de las raíces.

Los resultados incluidos en los puntos c y d, nos permiten concluir que aparentemente los cambios del sistema que dirige el eflujo neto de H⁺ dependen del tiempo de exposición a la toxicidad de B, siendo progresivamente más acusados, y atenuándose las diferencias entre B₅₀ y B₁₀₀ cuando éste aumenta. Estos cambios podrían consistir en

A



B

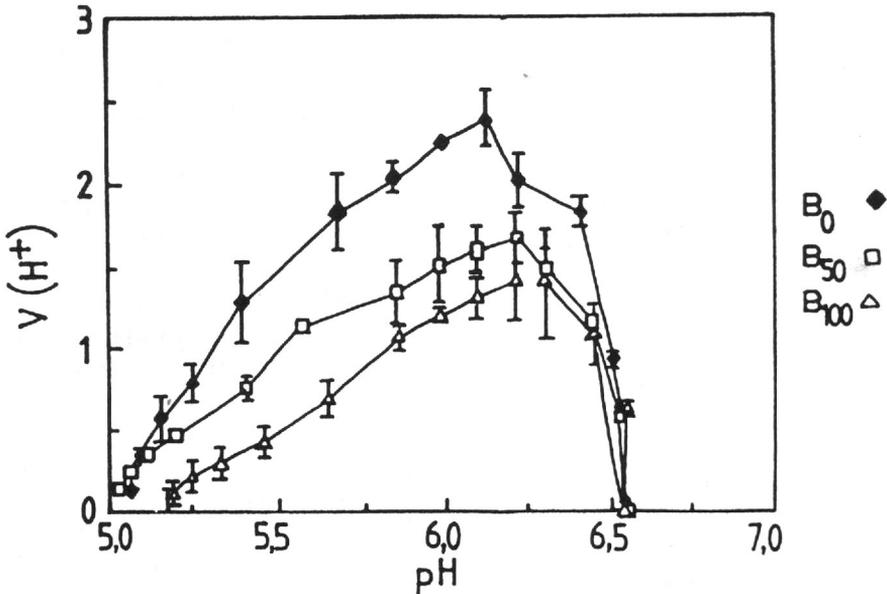


FIG. 5.—Cinética de velocidad de eflujo neto de H^+ ($V_{H^+} = nmol\ H^+ mg^{-1}\ peso\ fresco\ h^{-1}$) (A) y velocidad de eflujo neto de H^+ frente al pH del medio externo (B) por raíces normales (cultivadas sin B), medida en presencia de 0, 50 y 100 $mg\ L^{-1}$ de B (experimentos de "corta exposición" a la toxicidad). Se incluyen los "blancos" del medio sin (m) y con raíces preincubadas en NaCN ($m+r$), mantenidas en idénticas condiciones y durante el tiempo que dura la cinética de las raíces metabólicamente activas. Medias de 5 experimentos independientes, con SD.

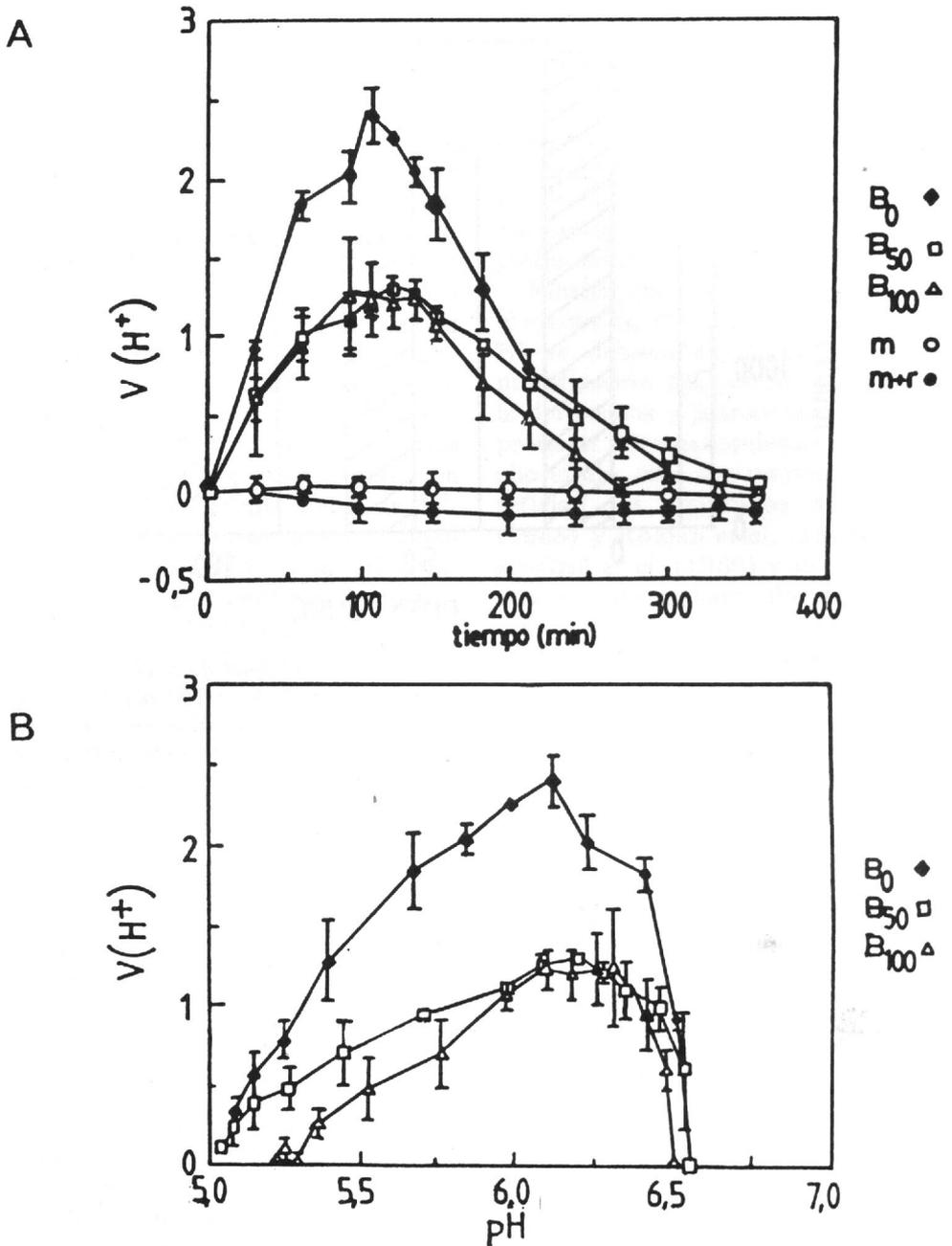


FIG. 6.—Cinética de eflujo neto de H⁺ ($V_{H^+} = \text{nmoles H}^+ \text{ mg}^{-1} \text{ peso fresco h}^{-1}$) (A) y velocidad de eflujo neto de H⁺ frente al pH del medio externo (B) por raíces cultivadas sin, con 50 y 100 mg L⁻¹ de B, y medida sin B en el medio (experimentos de "larga exposición" a la toxicidad). Se incluyen los "blancos" del medio sin (m) y con raíces preincubadas en NaCN (m + r), mantenidas en idénticas condiciones y durante el tiempo que dura la cinética de las raíces metabólicamente activas. Medias de 5 experimentos independientes, con SD.

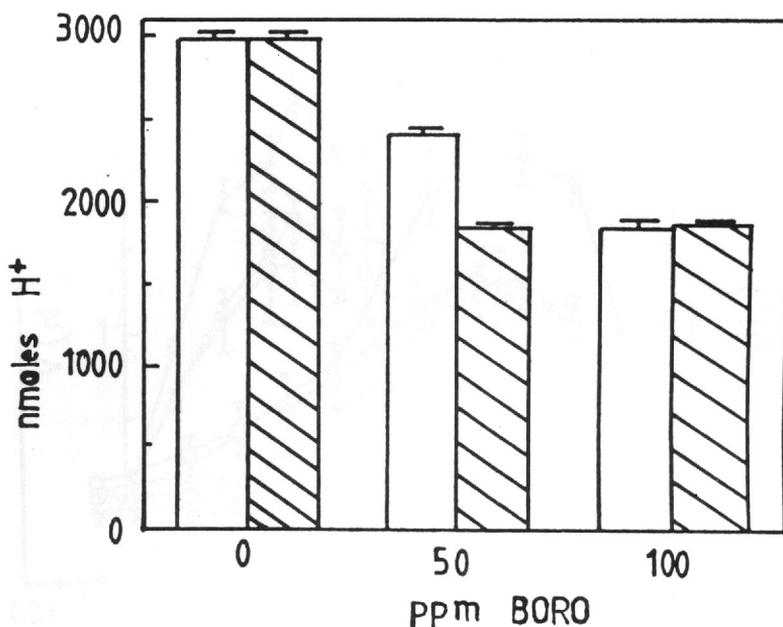


FIG. 7.—Eflujo neto total de H^+ (nmoles de H^+ extruidos al final de la conética) por raíces normales (cultivadas sin B), medido en presencia de 0, 50 y 100 $mg L^{-1}$ de B (barras vacías, experimentos de "corta exposición" a la toxicidad), y raíces cultivadas con 0, 50 y 100 $mg L^{-1}$ de B y medido sin B en el medio (barras rayadas, experimentos de "larga exposición" a la toxicidad). Medias de 5 experimentos independientes, con SD.

una disminución de la eficiencia de los sistemas de extrusión de H^+ , tanto con B_{50} como con B_{100} , y tanto en los experimentos de corta como de larga exposición, y simultáneamente en un aumento del influjo, que lógicamente será especialmente acusado para B_{100} y a pH ácidos. Así, los efectos más acusados se observarían con B_{100} , en los experimentos de larga duración y a $pH < 6.0$, tal como hemos descrito que sucede en nuestro caso.

Se han propuesto dos hipótesis para explicar a nivel celular la disminución del eflujo neto de H^+ bajo condiciones de nutrición anormal de B: 1.^a) que el efecto del B sea aumentar o disminuir las disponibilidades

de sustrato endógeno de las bombas de extrusión de H^+ (el $pH -H^+$ libres— del citoplasma), lo que haría cambiar el flujo sin afectar a los transportadores; y 2.^a) que el efecto del B sea modificar directamente el óptimo funcionamiento de los sistemas de transporte de H^+ (de eflujo y/o influjo), bien porque el B afecte directamente a la molécula del transportador, bien porque provoque cambios en la bicapa o en el exterior de la membrana (paredes celulares incluidas) que afecten el funcionamiento de dichos transportadores.

Nuestros resultados con concentraciones tóxicas de B resultan ser semejantes a los de Blaser-Grill *et al.* (1989) con células de *Daucus carota*

L. deficientes en B, donde observan un menor eflujo neto de H^+ y un pH final menos ácido, que se recuperan a valores normales por la adición de B al medio. Estos autores proponen que el efecto del B podría basarse en los cambios del pH citoplasmático que provocarían la entrada o salida del ácido bórico, que se comportaría de manera semejante a los ácidos orgánicos débiles fácilmente permeantes, como el acético o el láctico. En nuestro caso, la adición de H_3BO_3 al medio de medida (experimentos de "corta exposición") provoca la inhibición del eflujo neto de H^+ , como hemos descrito, lo cual coincide con los resultados obtenidos por el equipo de Del Valle con ácido acético (Paredes, 1989; Salguero, 1989). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el ácido acético, la adición de ácido bórico no produce un aumento de la tamponación del medio con raíces, sino una clara disminución de la misma, por lo que el menor eflujo neto no puede ser atribuido a un aumento de β , como en su caso, sino a un efecto sobre los sistemas responsables de dicho eflujo. Por otra parte, nuestras experiencias de "larga exposición" (en que el ácido bórico está presente en el medio de cultivo durante las 48 horas que dura éste, se lavan las raíces durante al menos 1 hora en medio exento de B, y se mide el eflujo neto de H^+ en medio fresco igualmente exento de B) se parecen más bien a los experimentos "de lavado" de Paredes (1989), aunque a tiempo más largo. Sin embargo, los resultados son similares a los obtenidos tras la adición de las mismas concentraciones de B directamente al medio de medida. Obviamente, la

disminución del eflujo neto de H^+ bajo ambas condiciones experimentales es difícilmente atribuible a cambios del pH citoplasmático que, si los hay, deberían ser opuestos en los dos tipos de experimentos, y que, sin embargo, producen efectos semejantes sobre el eflujo neto de H^+ .

Finalmente, es indudable que, si el efecto del B sobre el eflujo neto de H^+ se debiera exclusivamente a la modificación del pH citoplasmático, la deficiencia y la toxicidad deberían producir efectos opuestos sobre dicho eflujo, cosa que no ocurre, como reflejan los resultados de Roldán (1988) y Roldán *et al.* (1988), Blasler-Grill *et al.* (1989) y los presentados en este trabajo. Por todo ello, tenemos serias dudas de que el B actúe sobre el eflujo neto de H^+ , al menos exclusivamente, a través de posibles modificaciones del pH citoplasmático.

Así, nos decantamos por la segunda hipótesis, según la cual la base del efecto del B sería modificar directamente el óptimo funcionamiento de los transportadores de H^+ de la membrana. En este contexto, no resulta sorprendente que el exceso de B provoque efectos semejantes a los de la deficiencia. La explicación sugerida en otros casos (Gómez Rodríguez, 1984), es que los complejos del B con los componentes celulares, cualesquiera que éstos sean, sólo son óptimos y funcionales cuando presentan un determinado índice de coordinación (el que se establece en presencia de las concentraciones óptimas de B), siendo igualmente disfuncionales los de índice de coordinación inferior y superior. Si admitimos la hipótesis de que el B afecta directamente el funcionamiento

de los transportadores de H^+ en las membranas, sea por efecto directo (interaccionando con la molécula del transportador) o indirecto (afectando la bicapa lipídica o los glúcidos del exterior de la membrana y paredes celulares), existen varias posibilidades no excluyentes, que podrían explicar la disminución del eflujo neto de H^+ en condiciones de toxicidad de B:

a) Que el exceso de B inhiba el funcionamiento de los transportadores activos (H^+ -ATPasa y/o los sistemas redox). En el caso de la H^+ -ATPasa, existen pruebas de que el efecto no sería directo, ya que la adición de un exceso de B "in vitro" a vesículas microsomales de raíces de girasol desarrolladas en medios normales de boro (Roldán, 1988) o al enzima purificado (Goldbach, 1985) no provoca modificación de la actividad ATP-ásica. En otros trabajos de

nuestro laboratorio (Espinosa, 1991), usando inhibidores específicos, hemos comprobado que, en efecto, el mayor efecto deletéreo de la toxicidad de B parece centrarse sobre la actividad de la cadena redox, y no sobre la ATPasa.

b) También puede ocurrir que el exceso de B aumente el influjo de H^+ . Usando DCCD para provocar una anulación rápida del eflujo, hemos hecho estimaciones del influjo de H^+ cuyos resultados son congruentes con esta hipótesis (Espinosa, 1991). Puesto que no son excluyentes, ambos efectos —inhibición del eflujo y estimulación del influjo de H^+ — pueden estar ocurriendo simultáneamente. De todas formas, no podemos rechazar la posibilidad de que, aunque no exclusivamente, cambios en el pH citoplasmático puedan también estar implicados en las respuestas.

CONCLUSIONES

El exceso de B (50 y 100 mg L^{-1}), tanto adicionado al medio de medida como al medio de cultivo de las plantas, hace disminuir la capacidad tampón (β) de las raíces, aunque en este segundo caso el efecto es más acusado y además se satura con 50 mg L^{-1} ; puesto que β del medio no varía por la presencia de B, hemos de concluir que el efecto se debe a la combinación del borato con los componentes de las paredes celulares y el exterior de las membranas presumiblemente por reducción del número de cargas negativas fijas susceptibles de fijar H^+ en la fase de Don-

nan de dichas estructuras; durante el cultivo con exceso de B podrían haber ocurrido, además, alteraciones de la composición y/o estructura de dichas paredes celulares que reforzarían el mismo efecto.

Ni los efectos del borato sobre la capacidad tampón (β) de las paredes celulares, ni ningún otro efecto puramente químico del borato con los componentes del medio de medida son responsables de los cambios de pH del medio que ocurren cuando están presentes raíces metabólicamente activas, y que sólo pueden ser atribuidos a la actividad de los siste-

mas de transporte de H⁺ de dichas raíces.

Tanto B₅₀ como B₁₀₀ hacen disminuir la velocidad de eflujo neto de H⁺ por las raíces, en una respuesta que depende del tiempo de exposición a la toxicidad: es más acusada en los experimentos de larga que de corta exposición, atenuándose además las diferencias entre ambas concentraciones de B (es decir, con el tiempo se produce un efecto de saturación).

El pH final del medio, alcanzado

tras la actuación de las raíces, es siempre menos ácido con B₁₀₀ que con B₅₀, sin que influya el tiempo de exposición a la toxicidad.

Se propone que la causa de la reducción del eflujo neto de H⁺ podría ser una menor eficiencia de los sistemas de extrusión de H⁺ junto con un aumento del influjo, siendo este último efecto especialmente acusado para B₁₀₀, a pH < 6.0 y en los experimentos de larga exposición a la toxicidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Empresa Koipe, S. A. (Sevilla), por suministrarnos las semillas del girasol utilizadas en el trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- AUGSTEN, H. and EICHHORN, B., 1976. Biochemistry and physiology of the effect of boron in plants. *Biol. Rundsch.*, 14: 268-285.
- BELVER, A., 1986. Cambios metabólicos y estructurales inducidos por el B en raíces y cotiledones de plántulas de girasol (*Helianthus annuus*, L.). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- BELVER, A., ROLDAN, M., RODRIGUEZ, M. P. and DONAIRE, J. P., 1988. Plant senescence in relation to boron. *Plant Physiol. Biochem.*, 26: 383-388.
- BLASER-GRILL, J., KNOPPIK, D., AMBERGER, A. and GOLDBACH, H., 1989. Influence of boron on the membrane potential in *Elodea densa* L. and *Helianthus annuus* L. roots and H⁺ extrusion of suspension cultured *Daucus carota* L. cells. *Plant Physiol.*, 90: 280-284.
- BOHNSACK, C. W. and ALBERT, L. S., 1977. Early effects of boron deficiency on indolacetic acid oxidase levels of squash root tips. *Plant Physiol.*, 59: 1047-1050.
- BONILLA, I., 1991. Boron in cyanobacteria *Anabaena*. In: "Behaviour, Function and Significance of Boron in Agriculture", 23-24 (Report on the Boron Workshop, Oxford 90), Micronutrient Bureau and Borax Consolidated Ltd. Pub., London 1991.
- ESPINOSA, F., 1991. Estudio del eflujo neto de H⁺ por raíces de plántulas de girasol (*Helianthus annuus*, L.) en condiciones normales y de toxicidad de B. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- GARCIA-GONZALEZ, M., MATEO, P. and BONILLA, I., 1988. Boron protection for O₂ diffusion in heterocysts of *Anabaena* sp. *PCC 7119*. *Plant Physiol.*, 87: 785-789.
- GARCIA-GONZALEZ, M., MATEO, P. and BONILLA, I., 1990. Effect of boron defi-

- ciency on photosynthesis and reductant sources and their relationship with nitrogenase activity in *Anabaena sp. PCC 7119*. *Plant Physiol.*, 93: 560-565.
- GOLDBACH, H., 1985. Influence of boron nutrition on net uptake and efflux of ^{32}P and ^{14}C -glucose in *Helianthus annuus* L. roots and cell cultures of *Daucus carota* L. *J. Plant Physiol.*, 118: 431-438.
- GOLDBACH, H. and AMBERGER, A., 1986. Influence of boron deficiency on ^3H indole-3-acetic acid uptake and efflux in cell cultures of *Daucus carota* L. *Plant Growth Regul.*, 4: 81-86.
- GOLDBACH, H., HARTMANN, D. and ROTZER, T., 1990. Boron is required for the stimulation of the ferricyanide-induced proton release by auxins in suspension-cultured cells *Daucus carota* L. and *Lysopersicon sculentum* L. *Physiol. Plant.*, 80: 114-118.
- GOMEZ RODRIGUEZ, M. V., 1984. Estudio de la evolución en el tiempo de algunos parámetros bioquímicos en plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) cultivadas con distintos niveles de Boro. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- HIRSCH, A. M. and TORREY, J. G., 1980. Ultrastructural changes in sunflower root cells in relation to boron deficiency and added auxin. *Can. J. Bot.*, 58: 856-866.
- KOUCHI, H. and KUMAZAWA, K., 1975. Anatomical responses of root tip to boron deficiency. II. Effect of boron deficiency on elongation of root tips and their morphological characteristic. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 21: 137-150.
- KOUCHI, H. and KUMAZAWA, K., 1976. Anatomical responses of root tip to boron deficiency. III. Effect of boron deficiency on subcellular structure of root tips, particularly on morphology of cell wall and its related organelles. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 22: 53-71.
- MARRE, M. T., ROMANI, G. and MARRE, E. 1983. Transmembrane hyperpolarization and increase of K^+ uptake in maize roots treated with permeant weak acids. *Plant Cell Environ.*, 6: 617-623.
- MARSCHNER, H., 1991. Role of Boron in plants: a summary. In: "Behaviour, Function and Significance of Boron in Agriculture", 14-19 y 25, (Report on the Boron Workshop, Oxford 90). Micronutrient Bureau and Borax Consolidated Ltd. Pub., London 1991.
- MATEO, P., BONILLA, I., FERNANDEZ-VALIENTE, E. and SANCHEZMAESO, E., 1986. Essentiality of boron for dinitrogen fixation in *Anabaena sp. PCC 7119*. *Plant Physiol.*, 81: 430-433.
- PAREDES, M. A., 1989. La extrusión de H^+ dependiente de auxina en coleóptilos de *Avena sativa* L. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- PARR, A. D. and LOUGHMAN, B. C., 1983. Boron and membrane function in plants. In: "Metals and Micronutrients, uptake and utilization by plants", 87-107. Academic Press. New York.
- PILBEAM, D. J. and KIRKBY, E. A., 1983. The physiological role of boron in plants *J. Plant Nutr.*, 6: 563-582.
- POLLARD, A. S., PARR, A. D. and LOUGHMAN, B. C., 1977. Boron in relation to membrane function in higher plants. *J. Exp. Bot.*, 28: 831-841.
- REID, R. J., DEJAERGERE, R. and PITMAN, M. G. 1985. Regulation of electrogenic pumping in barley by pH and ATP. *J. Exp. Bot.*, 36: 535-549.
- ROBERTSON, G. A. and LOUGHMAN, B. C., 1974. Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba* L. *New Phytol.*, 73: 291-298.
- ROLDAN, M., 1988. Estudio de los mecanismos de acción del B a nivel de membrana en raíces de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- ROLDAN, M., RODRIGUEZ, M. P., BELVER, A. y DONAIRE, J. P., 1988. Extrusión de H⁺ en raíces de plántulas de girasol y actividad de H⁺-ATPasa en vesículas microsomales enriquecidas en plasmalema: acción del Boro. II Simp. Nac. Nutr. Mineral de las Plantas, 419-427.
- SALGUERO, J., 1989. La extrusión de H⁺ dependiente de auxina en coleoptilos de *Zea mays* L. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- SMYTH, D. A. and DUGGER, W. M., 1980. Effect of boron deficiency on ⁸⁶Rubidium uptake and photosynthesis in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. Plant Physiol., 66: 692-695.
- ZSOLDOS, F., VASHEGYI, A. and ERDEI, L., 1987. Lack of active K⁺ uptake in aeroponically grown wheat seedlings. Physiol. Plant., 71: 359-364.

Recibido: 2-3-92.

Aceptado: 27-7-92.