

Effect of iodine application on antioxidants in tomato seedlings

Efecto de la aplicación de yodo sobre antioxidantes en plántulas de jitomate

Julia Medrano-Macías¹; Paola Leija-Martínez²; Antonio Juárez-Maldonado³; Alejandra Rocha-Estrada¹; Adalberto Benavides-Mendoza^{2*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Av. Manuel L. Barragán, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, MÉXICO.

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ²Departamento de Horticultura y ³Departamento de Botánica. Calzada Antonio Narro núm. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, C. P. 25315, MÉXICO. abenmen@gmail.com, tel.: 844 176 70 62 (*Corresponding author)

Abstract

Iodine is a beneficial micronutrient, but its metabolic function is still unknown. The aim of this study was to evaluate the effect of iodine application on biomass and antioxidant concentration in tomato seedlings. Iodine was applied in the form of iodide (I⁻) and potassium iodate (IO₃⁻), at concentrations of 1 μM daily and 100 μM biweekly, directly to the substrate or by foliar application to tomato var. Río Grande seedlings under greenhouse conditions. The effect of iodine on enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, and glutathione peroxidase), as well as the concentration of non-enzymatic antioxidants (ascorbate, glutathione, and total phenols) was analyzed. No treatment with I⁻ or IO₃⁻ had a negative effect on seedling biomass. In addition, the biweekly I⁻ treatments both by foliar and substrate application, as well as the daily IO₃⁻ and I⁻ treatments via foliar application showed a 54 to 86 % decrease in superoxide dismutase enzymatic activity, without showing changes in the other enzymes. On the other hand, in both cases with daily I⁻ foliar application, the non-enzymatic antioxidant concentrations for ascorbate and glutathione increased by 22 and 85 %, respectively. Phenolic compounds showed no changes in the different treatments.

Keywords: biofortification, oxidative stress, enzymes, ascorbate, glutathione.

Resumen

El yodo es un micronutriente benéfico; sin embargo, aún se desconoce su función metabólica. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de yodo sobre la biomasa y la concentración de antioxidantes en plántulas de jitomate. Se hicieron aplicaciones de yodo en forma de yoduro (I⁻) y yodato de potasio (IO₃⁻), a concentraciones de 1 μM diariamente y 100 μM cada dos semanas, directo al sustrato o por aspersión foliar a plántulas de jitomate var. Río Grande, bajo condiciones de invernadero. Se analizó el efecto del yodo sobre los antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa y glutatión peroxidasa, así como la concentración de antioxidantes no enzimáticos: ascorbato, glutatión y fenoles totales. Ningún tratamiento con I⁻ o IO₃⁻ tuvo efecto negativo sobre la biomasa de las plántulas. Además, se encontró que los tratamientos de I⁻ aplicado cada dos semanas, tanto vía foliar como al sustrato, así como IO₃⁻ y I⁻ empleados vía foliar diariamente, mostraron disminución de 54 al 86 % en la actividad enzimática de superóxido dismutasa, sin evidenciar cambios en las enzimas restantes. Por otro lado, en la concentración de los antioxidantes no enzimáticos, el ascorbato y glutatión presentaron un aumento de 22 y 85 %, respectivamente; en ambos casos con aplicación diaria de I⁻ por aspersión foliar. Los fenoles no mostraron cambios en los diferentes tratamientos.

Palabras clave: biofortificación, estrés oxidativo, enzimas, ascorbato, glutatión.



Introduction

Although a metabolic function of iodine in terrestrial plants is not known (Kabatas-Pendias, 2011; Mengel, Kosegarten, Kirkby, & Appel, 2001), its value as a beneficial micronutrient is well established (Borst-Pauwles, 1961). Various studies indicate that iodine increases the presence of antioxidants in plants, providing greater tolerance to some adverse factors (Blasco et al., 2008; Blasco et al., 2011; Gupta, Shukla-Bajpai, Singh-Majumdar, & Mishra, 2015; International Council for Control of iodine deficiency disorders [ICCIDD], 2009; Leyva et al., 2011). However, there is evidence of toxicity in plants as a result of the application of this element above certain concentration levels (Caffagni et al., 2011; Landini, Gonzali, & Perata, 2011; Mackowiak & Grossl, 1999; Zhu, Huang, Hu, & Liu, 2003). Other studies also indicate that food of plant origin is normally low in iodine concentration, hence, the need to better understand its effects in order to obtain biofortified plants with this element (White & Broadway, 2009).

There is little information about the form in which iodine is accumulated and metabolized in terrestrial species (Weng et al., 2008a); however, the process is better understood in marine species such as *Laminaria digitata* (kelp). This species is reported as an iodine accumulator, reaching up to 1% of its dry weight (Colin et al., 2003). It has been reported that the induction of cellular accumulation or volatilization of this element into the atmosphere is related to oxidative stress levels. In other words, under high production conditions of reactive oxygen species (ROS), this element is volatilized, while under low ROS concentration, iodine is stored for later use in case of increased stress (Küpper et al., 2008).

Venturi (2011) hypothesized that iodine was one of the first antioxidants used by photosynthetic organisms. Similarly, La Barre, Potin, Leblanc, and Delage (2010) suggested that iodine is used by marine algae as an antioxidant during oxidative stress events, a fact that could be similar in terrestrial plants. However, as far as it is known, this aspect of iodine use has not been investigated or applied in agriculture.

The aim of the present study was to evaluate the effect of applying iodine in its iodide (I) and potassium iodate (IO₃) forms on biomass and antioxidant concentration in tomato seedlings.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

The experiment was conducted in a greenhouse at Antonio Narro Agrarian Autonomous University, Saltillo,

Introducción

A pesar de que no se conoce una función metabólica del yodo en las plantas terrestres (Kabatas-Pendias, 2011; Mengel, Kosegarten, Kirkby, & Appel, 2001), su valor como micronutriente benéfico está bien establecido (Borst-Pauwles, 1961). Diversos trabajos de investigación indican que en las plantas el yodo induce mayor presencia de antioxidantes, aportando incremento en la tolerancia a algunos factores adversos (Blasco et al., 2008; Blasco et al., 2011; Gupta, Shukla-Bajpai, Singh-Majumdar, & Mishra, 2015; International Council for Control of iodine deficiency disorders [ICCIDD], 2009; Leyva et al., 2011). Sin embargo, existen evidencias de toxicidad en las plantas por la aplicación de este elemento por encima de ciertas concentraciones (Caffagni et al., 2011; Landini, Gonzali, & Perata, 2011; Mackowiak & Grossl, 1999; Zhu, Huang, Hu, & Liu, 2003). Diversos estudios indican que los alimentos de origen vegetal presentan normalmente baja concentración de yodo, de allí la necesidad de comprender mucho más sus efectos en los cultivos, con el objetivo de obtener cosechas biofortificadas con este elemento (White & Broadway, 2009).

Se dispone de poca información acerca de la forma en que el yodo es acumulado y metabolizado en especies terrestres (Weng et al., 2008a); sin embargo, el proceso está mejor entendido en especies marinas como *Laminaria digitata* (kelp). Dicha especie se reporta como acumuladora de yodo, alcanzando hasta 1 % de su peso seco (Colin et al., 2003). Se ha encontrado que la inducción de acumulación celular, o volatilización, hacia la atmósfera de este elemento está relacionada con el nivel de estrés oxidativo. Es decir, bajo condiciones de producción alta de especies reactivas del oxígeno (ROS) este elemento es volatilizado; mientras que a concentración baja de ROS el yodo es almacenado para estar disponible en caso de aumento del estrés (Küpper et al., 2008).

Venturi (2011) propuso la hipótesis de que el yodo constituyó uno de los primeros antioxidantes utilizados por los organismos fotosintéticos. Del mismo modo, la Barre, Potin, Leblanc, y Delage (2010) plantearon que el yodo es usado por las algas marinas como antioxidante durante los eventos de estrés oxidativo; hecho que pudiera ser similar en las plantas terrestres. Sin embargo, hasta donde se sabe, esta faceta del uso del yodo no ha sido investigada ni aplicada en la práctica agrícola.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de yodo en forma de yoduro (I) y yodato (IO₃) de potasio sobre la biomasa y la concentración de antioxidantes en plántulas de jitomate.

Coahuila, Mexico, located at 25° 21' 12.8" NL and 101° 01' 51.9" WL. In 2013, tomato (*Solanum lycopersicum* L.) var. Rio Grande seeds were sowed in 355-mL polystyrene containers. Peat moss mixed with perlite at a 5:1 ratio was used as substrate. The average greenhouse temperature was 20.7 °C, with 741 W·m⁻² maximum radiation and 62.8 % relative humidity. Manual irrigation was carried out daily, applying 50 mL of 20 % Steiner solution (1961). The EC and pH of the nutrient solution were 1.0 dS·m⁻¹ and 6.5, respectively. General management and production practices were carried out according to the indications established by Villasanti (2013).

The treatments consisted in the direct application of Iodine (I) to the substrate (S) or by foliar application (F) at a concentration of 1 µM daily (D) or 100 µM biweekly (15D). The same design was used for the potassium iodate (IO₃) treatments. The application began four weeks after sowing (WAS), when the seedlings had developed four leaves, and continued until sampling (eight WAS).

Only nutrient solution was applied to the substrate containing the control seedlings.

Sampling

At eight WAS, sampling was conducted under a completely randomized experimental design. Three complete seedlings per treatment were taken to determine biomass and another three for leaf quantification of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. The experimental unit was one seedling. Analysis of variance ($P \leq 0.05$), using the statistical software InfoStat (2008), and Tukey's range test ($P \leq 0.05$) were performed with the obtained data.

Seedling analysis

Seedlings intended for biomass quantification were dried in an oven, while the leaves for non-enzymatic and enzymatic antioxidant quantification were lyophilized.

Once the plant material was prepared, the following variables were obtained:

Biomass. Seedlings were partitioned in stem, root, and leaves, and weighed using an OHAUS® digital scale. Subsequently, they were placed in a drying oven at 60 °C until constant weight. The initial and final weight was expressed in grams.

The extraction of biomolecules was made through the lyophilized seedling leaves grounded using a mortar and pestle. First, 200 mg of ground tissue, 20 mg of polyvinyl pyrrolidone and 1.5 mL of 0.1 M phosphate

Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

El experimento se llevó a cabo en un invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, ubicado a 25° 21' 12.8" latitud norte y 101° 01' 51.9" longitud oeste. La siembra se realizó en 2013 con semilla de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) var. Rio Grande en contenedores de poliestireno de 355 mL de capacidad. Como sustrato se usó peat moss mezclado con perlita en proporción 5:1. La temperatura promedio del invernadero fue de 20.7 °C, la radiación máxima de 741 W·m⁻² y la humedad relativa de 62.8 %. El riego se llevó a cabo diariamente de forma manual, aplicando 50 mL de solución Steiner (1961) al 20 %. La C.E. y pH de la solución nutritiva fueron 1.0 dS·m⁻¹ y 6.5, respectivamente. El manejo y cuidado del cultivo se hizo de acuerdo con lo establecido por Villasanti (2013).

Los tratamientos consistieron en la aplicación de yoduro (I) directo al sustrato (S) o foliar (F) a 1 µM de concentración diariamente (D) o 100 µM quincenalmente (15D). Lo mismo sucedió con los tratamientos de yodato de potasio (IO₃). La aplicación inició a las cuatro semanas después de la siembra (dds), cuando las plántulas presentaron cuatro hojas, y continuó hasta el momento del muestreo (ocho semanas dds).

Al sustrato de las plántulas testigo solamente se les aplicó solución nutritiva.

Muestreo

El muestreo se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar, transcurridas ocho semanas dds. Se tomaron tres plántulas completas por cada tratamiento para la determinación de biomasa y tres para la cuantificación foliar de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Siendo cada plántula una unidad experimental. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza ($P \leq 0.05$), usando el *software* estadístico InfoStat (2008), y prueba de comparación medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Análisis de las plántulas

Las plántulas destinadas a la cuantificación de biomasa se secaron en estufa; mientras que las hojas para la cuantificación de antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos fueron liofilizadas.

Una vez preparado el material vegetal, se obtuvieron las siguientes variables:

Biomasa. Las plántulas se dividieron en tallo, raíz y hojas, y se pesaron utilizando una balanza digital marca OHAUS®. Posteriormente, se colocaron en un horno de

buffer (pH 7-7.2) were placed in a centrifuge tube, and then subjected to sonification for 5 min. Subsequently, the homogenate was centrifuged at 12,500 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected, filtered with a nylon membrane (Ramos et al., 2010) and diluted at a 1:15 ratio with phosphate buffer.

Superoxide dismutase (SOD). The activity of this enzyme from the biomolecules extract was quantified in a microplate reader using the SOD determination kit (SIGMA-ALDRICH, 2014). This method is based on quantifying by spectrophotometry; the conversion of WST (water soluble tetrazolium salt) to WST-formazan dye takes place upon oxidation by superoxide ions formed by the set of xanthine (XO)/xanthine oxidase (X). The inhibition in the oxidation of WST is attributed to the neutralization of superoxide radicals caused by SOD. The units were expressed as inhibition percentage.

Catalase (CAT). Catalase activity was quantified using spectrophotometry, which was measured in two reaction times: time 0 (T0) and time 1 (T1). The control reaction mixture was prepared with 0.1 mL biomolecules extract, 1 mL phosphate buffer (pH 7.2) and 0.4 mL 5 % H₂SO₄, while the T0 reaction mixture was prepared with 0.1 mL biomolecules extract and 1 mL 100 mM H₂O₂, after which 0.5 mL 5 % H₂SO₄ were immediately added. T1 was prepared in the same manner as T0, with the exception that 0.5 mL 5 % H₂SO₄ were added after 1 min of reaction between the extract and the peroxide. The reaction was conducted under constant shaking at 20 °C. Finally, H₂O₂ consumption was read at 270 nm in the UV-VIS spectrum. The activity units (UI) were expressed in H₂O₂ mM per minute by total proteins (Cansev, Gulen, & Eris, 2011).

Ascorbate peroxidase (APX). First, 0.1 mL biomolecules extract, 0.5 mL ascorbate at a 10 mg·L⁻¹ concentration and 1 mL 100 mM H₂O₂ were added to a centrifuge tube at 22 °C (Nakano & Asada, 1987). After 1 min the reaction was terminated with 0.4 mL 5 % H₂O₂. The ascorbate consumption rate was quantified by spectrophotometry at 266 nm. The UI were expressed in mM ascorbate per minute by total proteins.

Glutathione peroxidase (GPX). This was measured using the method established by Xue, Hartikainen, and Piironen (2001), where H₂O₂ is used as substrate. First, 0.2 mL biomolecules extract, 0.4 mL of glutathione reduced to 0.1 M and 0.2 mL 0.067 M Na₂HPO₄ were placed in a test tube. This mixture was pre-heated in a water bath at 25 °C for 5 min, then 0.2 mL H₂O₂ (1.3 mM) were added to initiate the catalytic reaction. The reaction was conducted for 10 min and stopped by adding 1 mL of trichloro acetic acid (1 %); the mixture was placed in an ice bath for 30 min and then centrifuged for 10 min at 3,000 rpm. Then 0.48 mL were taken from the supernatant and placed in a test tube, to which 2.2 mL Na₂HPO₄ (0.32 M) and 0.32 mL of

secado, hasta obtener peso constante, a 60 °C. El peso inicial y final se expresó en gramos.

La extracción de biomoléculas se hizo a través de las hojas de las plántulas liofilizadas maceradas con mortero de mano. En un tubo para centrifuga se colocaron 200 mg del tejido macerado, 20 mg de polivinil pirrolidona y 1.5 mL de 0.1 M de buffer de fosfatos (pH 7-7.2), se sometió a sonificación por 5 min, y posteriormente se centrifugó a 12,500 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recolectó y filtró con una membrana de nylon (Ramos et al., 2010). Se diluyó a una proporción 1:15 con buffer de fosfatos.

Superóxido dismutasa (SOD). Se cuantificó la actividad de esta enzima del extracto de biomoléculas en microplaca, utilizando el kit para determinación de SOD (SIGMA-ALDRICH, 2014). El principio de la metodología empleada es la cuantificación por espectrofotometría de la oxidación del colorante WST (water soluble tetrazolium salt) a WST-formazan por los iones superóxido formados mediante el conjunto xantina (XO)/xantina (X) oxidasa. La inhibición en la oxidación del WST es atribuida a la neutralización de los radicales superóxido por la SOD. Las unidades se expresan en porcentaje de inhibición.

Catalasa (CAT). La actividad de la catalasa se cuantificó mediante espectrofotometría; la cual se realizó midiendo dos tiempos de reacción, tiempo 0 (T0) y tiempo 1 (T1). La mezcla de reacción para el blanco se preparó con 0.1 mL del extracto de biomoléculas, 1 mL de buffer de fosfatos con pH 7.2 y 0.4 mL de H₂SO₄ al 5 %, y la mezcla de reacción para el T0 con 0.1 mL de extracto de biomoléculas, 1 mL de H₂O₂ 100 mM e inmediatamente después se añadieron 0.5 mL de H₂SO₄ al 5 %; del mismo modo sucedió para el T1, salvo que los 0.5 mL del H₂SO₄ al 5 % se aplicaron después de 1 min de reacción entre el extracto y el peróxido. La reacción se efectuó a 20 °C bajo agitación constante. Finalmente, el consumo de H₂O₂ se leyó a 270 nm en el espectro de UV-VIS. Las unidades de la actividad (UI) se presentaron en mM de H₂O₂ por minuto entre el total de proteínas (Cansev, Gulen, & Eris, 2011).

Ascorbato peroxidasa (APX). En un tubo para centrifuga se agregó 0.1 mL del extracto de biomoléculas, 0.5 mL de ascorbato a 10 mg·L⁻¹ de concentración y 1 mL 100 mM de H₂O₂, a 22 °C (Nakano & Asada, 1987). Después de 1 min la reacción fue detenida con 0.4 mL de H₂SO₄ al 5 %. La tasa de consumo del ascorbato se cuantificó por espectrofotometría a 266 nm. Las UI fueron se expresaron en mM de ascorbato por minuto entre el total de proteínas.

Glutación peroxidasa (GPX). La medición se realizó con el método establecido por Xue, Hartikainen, y Piironen (2001), usando H₂O₂ como sustrato. En un

1.0 mmol solution of 5,5-DiThiobis(2-NitroBenzoic acid) (DTNB) were added for color development. Absorbance was measured at a wavelength of 412 nm with a UV-VIS spectrophotometer. The UI were expressed in glutathione (mM) per minute by total proteins.

Glutathione (GSH). Glutathione was quantified following the spectrophotometric technique established by Xue et al. (2001), by the reaction with 5,5-DiThiobis(2-NitroBenzoic acid) (DTNB). First, 0.48 mL extract, 2.2 mL sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4 at 0.32 M) and 0.32 mL 1 mM DTNB dye were placed in a centrifuge tube. It was mixed and read in a UV-VIS spectrophotometer at 412 nm. The values were expressed in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Ascorbate (Asa). For ascorbate extraction, 200 mg lyophilized leaves were weighed and 1 mL of solution water:acetone 1:1 was added (Yu & Dahlgren, 2000). The mixture was vortexed for 30 s, then sonicated for 5 min and finally ultracentrifuged at 4 °C at 12,500 rpm for 10 min; the supernatant was removed in this process. Quantification was carried out using a Thermo *Spectra system P4000*® high-performance liquid chromatography (HPLC) instrument under the following conditions: 230 nm wavelength, NaH_2PO_4 mobile phase at 50 mM (pH 2.8), flow rate $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and an AQUASIL C-18 HPLC column was used at 60 °C. The results were expressed in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Total Phenols (Ft). Quantification was performed by UV-VIS spectrophotometry using extraction solution water:acetone 1:1 with Folin-Ciocalteu reagent. The concentration units were expressed in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Nsor-Atindana, Zhong, Mothibe, Bangoura, & Lagnika, 2012; Sultana, Anwar, & Ashraf, 2009).

Results and discussion

Below, results of evaluated variables are shown and discussed, posterior to the application of treatments.

Biomass

In the present study, the daily treatments received a total of 30 μM iodine and the biweekly ones 300 μM . None of the treatments caused a reduction of biomass compared to the control. Otherwise, daily applications showed increased biomass (Table 1). Reduced plant biomass is one of the clearest indicators of stress damage (Blasco et al., 2008; Sairam, Rao, & Srivastava, 2002).

Weng et al. (2008b) observed increased biomass in spinach grown hydroponically with I and IO_3^- concentrations of up to 3.3 μM and 12.5 μM respectively, which were lower than those obtained in this research. For their part, Landini et al. (2011) used high I concentrations ranging from 5,000 to 20,000 μM in tomato plants grown hydroponically and noted that,

tubo de ensayo se colocaron 0.2 mL del extracto de biomoléculas, 0.4 mL de glutatión reducido a 0.1 M y 0.2 mL de Na_2HPO_4 a 0.067 M. Esta mezcla se pre-calentó en baño de agua a 25 °C por 5 min, posteriormente se le agregaron 0.2 mL de H_2O_2 a 1.3 mM para iniciar la reacción catalítica. Se dejó reaccionar por 10 min y se detuvo mediante la adición de 1 mL de ácido tricloroacético al 1 %. Esta mezcla se llevó a baño de hielo por 30 min. Enseguida, la mezcla se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min. Se tomaron 0.48 mL del sobrenadante y se colocaron en un tubo de ensayo, se adicionó 2.2 mL de Na_2HPO_4 a 0.32 M y 0.32 mL de una solución 1 mM del colorante ácido 5,5 ditio-bis-2-nitro benzoico (DTNB). Se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm. Las UI se expresaron en mM de glutatión por minuto entre el total de proteínas.

Glutatión (GSH). El glutatión se cuantificó siguiendo la técnica espectrofotométrica establecida por Xue et al. (2001), mediante la reacción con ácido 5,5 ditio-bis-2 nitro benzoico (DTNB). En un tubo para centrífuga se colocaron 0.48 mL del extracto, 2.2 mL de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4 a 0.32 M) y 0.32 mL del colorante DTNB a 1 mM. Se mezcló y se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm. Los valores se reportaron en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Ascorbato (Asa). Para la extracción del ascorbato se pesaron 200 mg de las hojas liofilizadas y se les adicionó 1 mL de solución agua:acetona en proporción 1:1 (Yu & Dahlgren, 2000). La mezcla se sometió a vórtex por 30 s, se sonificó por 5 min y finalmente se ultracentrifugó a 4 °C a 12,500 rpm durante 10 min; de este proceso se extrajo el sobrenadante. La cuantificación se llevó a cabo mediante el uso del cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Thermo *Spectra system P4000*®, bajo las siguientes condiciones: longitud de onda 230 nm, fase móvil NaH_2PO_4 a 50 mM con pH de 2.8, flujo a $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y la columna utilizada fue aquasil C-18 a 60 °C. Los resultados se reportaron en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Fenoles totales (Ft). La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría UV-VIS del extracto agua:acetona, relación 1:1, mediante el uso del reactivo Folin-Ciocalteu. Las unidades de concentración se reportaron en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Nsor-Atindana, Zhong, Mothibe, Bangoura, & Lagnika, 2012; Sultana, Anwar, & Ashraf, 2009).

Resultados y discusión

A continuación se muestran y discuten los resultados de las variables evaluadas, posterior a la aplicación de tratamientos.

Biomasa

En el presente trabajo, los tratamientos con aplicación diaria recibieron en total 30 μM de yodo y los

Table 1. Comparison of means of the response of the evaluated variables to the different iodine treatments in tomato seedlings.**Cuadro 1. Comparación de medias de la respuesta de las variables evaluadas frente a los diferentes tratamientos con yodo en las plántulas de jitomate.**

Treatment/Tratamiento			Biomass (g)/ Biomasa (g)	SOD (% inh.)	CAT (UI)	APX (UI)	GPX (UI)	GSH (mg·L ⁻¹)	Asa (mg·L ⁻¹)	Ft (mg·L ⁻¹)
IO ₃ ⁻	Foliar	biweekly/ quincenal	1.03 b ^z	25.67 abc	9.7 10 ⁻⁷ a	5.2 10 ⁻⁶ a	5.1 10 ⁻⁵ a	7.36 cd	35.39 ab	8.38 a
IO ₃ ⁻	Substrate/ Sustrato	biweekly/ quincenal	1.24 ab	40.91 ab	4.7 10 ⁻⁷ a	9.0 10 ⁻⁷ a	7.6 10 ⁻⁵ a	9.11 bc	22.79 ab	9.62 a
I	Foliar	biweekly/ quincenal	1.40 ab	6.39 c	6.6 10 ⁻⁷ a	2.4 10 ⁻⁶ a	2.8 10 ⁻⁴ a	8.11 bcd	34.41 ab	7.42 a
I	Substrate/ Sustrato	biweekly/ quincenal	1.48 ab	17.77 bc	9.2 10 ⁻⁷ a	6.1 10 ⁻⁶ a	6.2 10 ⁻⁴ a	12.98 a	23.54 ab	6.13 a
IO ₃ ⁻	Foliar	daily/ diario	1.95 ab	20.86 bc	1.5 10 ⁻⁷ a	7.8 10 ⁻⁶ a	1.7 10 ⁻⁴ a	6.87 cd	30.59 ab	6.85 a
IO ₃ ⁻	Substrate/ Sustrato	daily/ diario	2.25 a	24.53 abc	1.7 10 ⁻⁷ a	5.7 10 ⁻⁶ a	2.6 10 ⁻⁴ a	8.43 bcd	15.64 ab	7.23 a
I	Foliar	daily/ diario	1.33 ab	19.4 bc	1 10 ⁻⁶ a	1.1 10 ⁻⁶ a	2.4 10 ⁻⁴ a	10.47 ab	41.69 a	8.61 a
I	Substrate	daily/ diario	2.26 a	41.81 ab	2.5 10 ⁻⁶ a	4.8 10 ⁻⁶ a	2.8 10 ⁻⁴ a	5.85 d	28.16 ab	6.17 a
Control/Testigo			0.93 b	45.45 a	1.5 10 ⁻⁶ a	5.3 10 ⁻⁶ a	8.2 10 ⁻⁵ a	5.65 d	18.71 b	6.2 a
Analysis of var. (p value)/ Análisis de var. (valor de p)			<0.01**	<0.01**	0.09 ns	0.28 ns	0.8 ns	<0.01**	<0.01**	0.28 ns

SOD = superoxide dismutase; CAT = catalase; APX = ascorbate peroxidase; GPX = glutathione peroxidase; GSH = glutathione; Asa = ascorbate; Ft = total phenols. Significance levels are represented by P values (P > 0.05 = not significant (ns), P < 0.05 = *significant and P < 0.01 = **highly significant).

^zWithin columns, means followed by the same letter are not statistically different (P ≥ 0.05). IO₃⁻ (iodate), I (iodide). Small UI values were recorded by the base 10 scientific notation.

SOD = superóxido dismutasa; CAT = catalasa; APX = ascorbato peroxidasa; GPX = glutatión peroxidasa; GSH = glutatión; Asa = ascorbato; Ft = fenoles totales. Los niveles de significancia se presentan por el valor de P. P > 0.05 = no significativo (ns), P < 0.05 = *significativo y P < 0.01 = **altamente significativo.

^zMedias con la misma letra dentro de columna no difieren estadísticamente (P ≥ 0.05). IO₃⁻ (yodato), I (yoduro). Los valores pequeños de UI se anotaron con notación científica base 10.

despite toxicity symptoms such as chlorosis and leaf tip burn, the plants survived and produced fruits; therefore, they concluded that tomato plants are resistant to high iodine concentrations. Similarly, Kiferle, Gonzali, Holwerda, Real-Ibaceta, and Perata (2013) carried out an experiment in tomato plants applying iodine to the soil on a weekly basis. They found that at concentrations of 1,000, 2,000 and 5,000 μM I, and of 500, 1,000 and 2,000 μM IO₃⁻, plant biomass did not decrease with respect to the control, with the exception of 5,000 μM I applications.

Other crop species such as lettuce grown hydroponically showed higher susceptibility to the presence of iodine, with reduced biomass being reported when I concentrations were equal to or higher than 40 μM, but without displaying any negative effects with the application of 240 μM IO₃⁻ (Blasco et al., 2008).

Superoxide dismutase

SOD enzymatic activity decreased in half of the treatments compared to the control plants. The

quincenales 300 μM. Ninguno de los tratamientos mostró reducción de biomasa respecto de las plantas testigo; por el contrario, las aplicaciones diarias mostraron incremento en la biomasa (Cuadro 1). La reducción de biomasa en las plantas es uno de los indicadores más claros de daño por estrés (Blasco et al., 2008; Sairam, Rao, & Srivastava, 2002).

Weng et al. (2008b) observaron aumento en la biomasa de espinaca cultivada en hidroponía con concentraciones de I hasta de 3.3 μM y de IO₃⁻ hasta 12.5 μM; las cuales fueron inferiores a las empleadas en esta investigación. Por otra parte, Landini et al. (2011) usaron altas concentraciones de I, que van de 5,000 a 20,000 μM, en plantas de jitomate cultivadas en hidroponía, y observaron que, a pesar de sufrir signos de toxicidad como clorosis y quemaduras en el borde de las hojas, las plantas sobrevivieron y produjeron frutos; por lo que concluyeron que las plantas de jitomate son resistentes a concentraciones elevadas de yodo. De modo similar, Kiferle, Gonzali, Holwerda, Real-Ibaceta, y Perata (2013) llevaron a cabo un experimento con plantas de jitomate aplicando yodo semanalmente al

treatments that showed such behavior were biweekly I foliar application and I applied to the substrate, as well as daily IO_3^- and I foliar application (Table 1). These results are similar to those obtained in lettuce by Blasco et al. (2011) for treatments applied with 20, 40 and 80 μM I, which showed reduced SOD activity compared to the control plants. However, the same authors found that IO_3^- at 40 μM presented increases in SOD enzymatic activity. Leyva et al. (2011) obtained increased enzymatic activity after applying 80 μM IO_3^- . Furthermore, Gupta et al. (2015) found that this same activity increased in treatments with 40 μM IO_3^- , but not with 20 or 80 μM .

Superoxide anion is usually the first free radical formed naturally in photosynthesis and respiration; therefore, SOD represents the primary control line against oxidative stress (Gill & Tuteja, 2010). However, in the present experiment the SOD activity of this enzyme was decreased. Although there are few reports in this regard about terrestrial plants, in marine plants it has been found that iodide is able to react quickly and directly with free radicals from biochemical energy systems, such as superoxide, singlet oxygen and even hydroxyl, at rates 12 to 500 times higher than ascorbate or glutathione (Küpper, et al, 2008; Luther, Wu, & Cullen, 1995). There is a possibility exist that the same could happen in the case of tomato plants, resulting in direct neutralization of free radicals, thus, causing decreased SOD activity.

Catalase

In regard to catalase activity, no statistically significant differences were found between treated and control plants. This result differs to those obtained by other authors such as Blasco et al. (2011), who observed increased enzymatic activity at concentrations higher than 80 μM for both I and IO_3^- treatments, finding severe toxicity damage and biomass reduction. Gupta et al. (2015) also reported increased catalase activity for IO_3^- treatments at 40 μM combined with 100 μM CdCl_2 , possibly due to stress induced by the heavy metal. The function of catalase is to reduce peroxide to oxygen and water to prevent the formation of OH radical (Asada, 1999). It is likely that by decreasing SOD activity, H_2O_2 formation is also reduced while maintaining CAT activity at a basal level, which could explain the absence of differences.

Ascorbate peroxidase

Like CAT, APX showed no significant differences compared to control plants. This result contradicts those obtained in lettuce plants by Blasco et al. (2011), who observed increased APX activity after applying IO_3^- concentrations of 20, 40 and 80 μM , without biomass reduction.

Meanwhile, Gupta et al. (2015) reported increased APX activity after applying 20 and 40 μM IO_3^- to plants

suelo en concentraciones de 1,000, 2,000 y 5,000 μM de I, y 500, 1,000 y 2,000 μM de IO_3^- , encontrando que la biomasa de las plantas no se vio disminuida respecto de los testigos salvo con las aplicaciones de 5,000 μM de I.

Otras especies de cultivo, como la lechuga, muestran mayor susceptibilidad a la presencia de yodo, reportándose disminución de la biomasa en concentraciones iguales o mayores a 40 μM de I en hidroponía, pero sin mostrar afectación hasta con 240 μM de IO_3^- (Blasco et al., 2008).

Superóxido dismutasa

La actividad enzimática de SOD presentó disminución en la mitad de los tratamientos, comparados con las plantas testigo. Los tratamientos que mostraron tal comportamiento fueron: I foliar y I al sustrato aplicados cada quince días, así como en IO_3^- y I foliar aplicado diariamente (Cuadro 1). Estos resultados son similares a los reportados por Blasco et al. (2011) para el caso de los tratamientos con I a 20, 40 y 80 μM , los cuales evidenciaron reducción en la actividad de SOD respecto de las plantas testigo de lechuga. No obstante, los mismos autores encontraron que el IO_3^- , a concentraciones mayores de 40 μM , presentó aumento en dicha actividad. Leyva et al. (2011) obtuvieron incremento en la actividad de esta enzima tras la aplicación de IO_3^- a 80 μM . Por otro lado, Gupta et al. (2015) encontraron que esta misma actividad aumentó en los tratamientos con IO_3^- a 40 μM , pero no con 20 ni 80 μM .

El anión superóxido es usualmente el primer radical libre formado de manera natural en la fotosíntesis y respiración; por lo tanto, la SOD representa la línea primaria de control del estrés oxidativo (Gill & Tuteja, 2010). A pesar de ello, en este experimento se encontró disminución en la actividad de esta enzima. Aunque en plantas terrestres existen pocos reportes al respecto, en plantas marinas se ha encontrado que el yoduro es capaz de reaccionar de manera rápida y directa con radicales libres provenientes de los sistemas bioquímicos energéticos, tales como el superóxido, el oxígeno singlete e incluso sobre el hidroxilo, a tasas de 12 a 500 veces más altas que el ascorbato o el glutatión (Küpper et al., 2008; Luther, Wu, & Cullen, 1995). Es posible que eso mismo pueda ocurrir en el caso de plantas de jitomate, dando lugar a una neutralización directa de dichos radicales libres formados y originando, por ello, una disminución en la actividad de SOD.

Catalasa

En lo que respecta a la actividad de la catalasa, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas tratadas y las testigo. Este resultado es contrario a lo obtenido por otros autores, como Blasco et al. (2011), quienes observaron incremento en

treated with CdCl_2 at 100 μM . It is known that APX is involved in H_2O_2 detoxification, using ascorbate (AA) as the electron donor. In this study, the iodine treatments apparently did not alter the basal status of this enzyme, possibly due to the previously explained effect whereby SOD decreases and hence reduces H_2O_2 production.

Glutathione peroxidase

Similar to what was described above for APX and catalase, GPX activity showed no differences among treatments. The absence of differences among treatments is probably because this enzyme also degrades H_2O_2 , which explains the decrease in SOD activity.

Glutathione

In the GSH results, an increase in two of the four biweekly IO_3^- and I^- treatments applied to the substrate were found, while the effect was considerable in the daily I^- foliar application treatment, which coincides with the decrease in SOD activity.

Although no information was found about the relationship between iodine and glutathione in tomato plants, Leyva et al. (2011) obtained an increased glutathione concentration after applying IO_3^- at 20 μM in lettuce plants grown hydroponically. The response, however, was different in the study carried out by Blasco et al. (2011), who found decreased glutathione concentration when IO_3^- was applied at 80 μM in lettuce plants. This indicates that the influence of iodine varies according to the plant species, its chemical forms and applied concentrations, among other factors.

Ascorbate

Ascorbate concentration increased after daily foliar I^- application, the same treatment in which SOD activity decreased and GSH concentration increased (Table 1). Meanwhile, Weng et al. (2008b) reported an increase in ascorbate concentration in spinach grown hydroponically by adding I^- at 0.33 and 0.66 μM , but the same did not happen for IO_3^- . On the other hand, Blasco et al. (2011) reported the highest ascorbate concentration in lettuce plants for I^- treatments at 80 μM , the same concentration at which the plants showed a severe biomass decrease. Also, Leyva et al. (2011) found increased ascorbate in lettuce plants by applying IO_3^- at concentrations below 40 μM . The discrepancy in the results may be explained by the use of different plant species and chemical forms of iodine.

Total phenols

Total phenols showed no significant statistical differences between treatments and control. Furthermore, no other studies in which these compounds were quantified

la actividad de esta enzima a concentraciones mayores de 80 μM , tanto de I^- como IO_3^- , encontrando, además, graves daños de toxicidad y reducción de biomasa. Gupta et al. (2015) también reportaron aumento en la actividad de catalasa en tratamientos con IO_3^- a 40 μM , pero en combinación con CdCl_2 a 100 μM ; lo cual posiblemente sea debido al estrés inducido por el metal pesado. La función de la catalasa es reducir el peróxido a oxígeno y agua para impedir la formación del radical OH (Asada, 1999). Es probable que al disminuir la actividad de SOD la formación de H_2O_2 también se redujera, manteniendo la actividad de la CAT en un nivel basal; lo que podría explicar la ausencia de diferencias.

Ascorbato peroxidasa

Al igual que para la CAT, la APX no mostró diferencias significativas en comparación con las plantas testigo. Resultado contrario a lo obtenido en plantas de lechuga por Blasco et al. (2011), quienes observaron incremento en la actividad de APX tras la aplicación de yodo en forma de IO_3^- con todas las concentraciones (20, 40 y 80 μM), sin observar reducción de biomasa.

Por su parte, Gupta et al. (2015) evidenciaron aumento en la actividad de APX tras la aplicación de IO_3^- a 20 y 40 μM en plantas tratadas con CdCl_2 a 100 μM . Se sabe que la APX está involucrada en la detoxificación del H_2O_2 , usando como donador de electrones al ascorbato (AA). En este trabajo los tratamientos con yodo, aparentemente, no modificaron el estatus basal de esta enzima, posiblemente por el efecto antes explicado de la disminución de la SOD y por ende menor producción de H_2O_2 .

Glutati6n peroxidasa

De modo similar a lo descrito anteriormente para APX y catalasa, la actividad de GPX no mostró diferencias entre tratamientos. Dado que esta enzima también degrada H_2O_2 , probablemente la ausencia de diferencias entre tratamientos también pueda explicarse como consecuencia de la menor actividad de SOD.

Glutati6n

En los resultados obtenidos de GSH, se encontró incremento en dos de los cuatro tratamientos con aplicaci6n quincenal de IO_3^- y I^- al sustrato. Mientras que, el efecto fue notable en el tratamiento de aplicaci6n diaria de I^- foliar; el cu6l coincide con la disminuci6n de la actividad de la SOD.

Si bien no se encontr6 informaci6n acerca de la relaci6n entre el yodo y el glutati6n en tomate, en plantas de lechuga cultivadas en hidroponi6a, Leyva et al. (2011) obtuvieron aumento en la concentraci6n de glutati6n tras la aplicaci6n de IO_3^- a 20 μM . La respuesta, sin embargo,

after applying iodine were found. However, part of the reason why iodine did not change the basal status of these compounds may be related to the fact that phenol accumulation is induced in response to increased H_2O_2 resulting from oxidative stress (Sakihama, Cohen, Grace, & Yamasaki, 2002). Once again, the reduced SOD activity probably resulted from an antioxidant iodine effect, which could have been the reason for the absence of differences among treatments.

Conclusions

The daily I and IO_3^- treatments applied to the substrate increased tomato seedling biomass, while the rest did not produce negative effects on biomass. On the other hand, the biweekly I-foliar and substrate applications, the biweekly IO_3^- foliar application and the daily I foliar application treatment showed a decrease in SOD activity compared to the control plants.

No statistically significant differences were found between iodine and control treatments in terms of catalase, ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase activities, and phenol concentration.

Biweekly I foliar and IO_3^- substrate treatments are recommended as part of tomato seedling production management because they increase glutathione antioxidant concentration. Similarly, daily I foliar application is recommended as part of tomato seedling management, because it increases the amount of glutathione and ascorbate antioxidants.

End of English version

References / Referencias

- Asada, K. (1999). The water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601-639. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.601
- Blasco, B., Ríos, J. J., Cervilla, L. M., Sánchez-Rodríguez, E., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2008). Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: Potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology*, 152(3), 289-299. doi:10.1111/j.1744-7348.2008.00217.x
- Blasco, B., Ríos, J. J., Leyva, R., Cervilla, L. M., Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M., Rosales, M. A., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2011). Does iodine biofortification affect oxidative metabolism in lettuce plants? *Biological Trace Element Research*, 142(3), 831-842. doi: 10.1007/s12011-010-8816-9
- Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1961). Iodine as a micronutrient for plants. *Plant Soil*, 14(4), 377-392. doi: 10.1007/BF01666295

fue diferente en el estudio de Blasco et al. (2011) quienes encontraron, también en la lechuga, disminución en la concentración del glutatión con IO_3^- a 80 μ M. Lo anterior pone en evidencia que la influencia del yodo varía de acuerdo con la especie vegetal, formas químicas y concentraciones aplicadas, entre otros factores.

Ascorbato

La concentración del ascorbato incrementó tras la aplicación diaria de I foliar. Mismo tratamiento en el cual se evidenció disminución de la actividad de SOD e incremento en la concentración de GSH (Cuadro 1). Por su parte, Weng et al. (2008b) reportaron aumento en la concentración del ascorbato en espinacas cultivadas en hidroponía al añadir I a 0.33 y 0.66 μ M, pero no ocurrió lo mismo con IO_3^- . Por otro lado, Blasco et al. (2011) presentaron la mayor concentración de ascorbato en lechuga con los tratamientos de I a 80 μ M; misma concentración en la cual las plantas presentaron severa disminución en la biomasa. Asimismo, Leyva et al. (2011) encontraron incremento de ascorbato en plantas de lechuga al aplicar IO_3^- a concentraciones menores de 40 μ M. La discrepancia en los resultados quizá pudiera explicarse por el uso de diferentes especies vegetales y formas químicas de yodo.

Fenoles totales

Los fenoles totales no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y el testigo. Además, no se encontraron trabajos en los cuales cuantificaran estos compuestos tras la aplicación de yodo. Sin embargo, parte de la explicación del por qué el yodo no modificó el estatus basal de estos compuestos pudiera relacionarse con el hecho de que la acumulación de fenoles es inducida en respuesta a la mayor cantidad de H_2O_2 resultante del estrés oxidativo (Sakihama, Cohen, Grace, & Yamasaki, 2002). De nuevo, la menor actividad de SOD, posiblemente derivada de un efecto antioxidante del yodo, pudo ser la causal de la ausencia de diferencias entre tratamientos.

Conclusiones

Los tratamientos de I y IO_3^- al sustrato, aplicados diariamente, aumentaron la biomasa de las plántulas de jitomate. Mientras que el resto no ejercieron efecto negativo sobre la biomasa. Por otro lado, la aplicación quincenal de I foliar, I al sustrato y IO_3^- foliar, así como el tratamiento de I foliar, aplicado diariamente, mostraron disminución en la actividad de SOD, al compararlos con las plantas testigo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa y en la concentración de fenoles, entre los tratamientos con yodo y el testigo.

- Caffagni, A., Arru, L., Meriggi, P., Milc, J., Perata, P., & Pecchioni, N. (2011). Iodine fortification plant screening process and accumulation in tomato fruits and potato tubers. *Communications in Soil Science Plant Analysis*, 42(6), 706-718. doi: 10.1080/00103624.2011.550372
- Cansev, A., Gulen, H., & Eris, A. (2011). The activities of catalase and ascorbate peroxidase in olive (*Olea europaea* L. Cv. Gemlik) under low temperature stress. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52(2), 113-120. doi: 10.1007/s13580-011-0126-4
- Colin, C., Leblanc, C., Wagner, E., Delage, L., Leize-Wagner, E., Van Dorselaer, A., Kloareg, B., & Potin, P. (2003). The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23545-23552. doi:10.1074/jbc.M300247200
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gupta, N., Shukla-Bajpai, M., Singh-Majumdar, R., & Mishra, P. K. (2015). Response of iodine on antioxidant levels of *Glycine max* L. grown under Cd²⁺ stress. *Advances in Biological Research*, 9(1), 40-48. doi: 10.5829/idosi.abr.2015.9.1.9183
- InfoStat. (2008). InfoStat software estadístico. Córdoba, Argentina: Author.
- International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders (ICCID). (2009). *Iodine biofortifications in plants: an 'alternative' to iodized salt? IDD news Letter*, 32(2), 16. Retrieved from http://www.ign.org/cm_data/IDD-NL-2009-2.pdf
- Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace elements in soils and plants* (pp. 397-401). New York: CRC press Taylor and Francis Group.
- Kiferle, C., Gonzali, S., Holwerda, H. T., Real-Ibaceta, R., & Perata, P. (2013). Tomato fruits: a good target for iodine biofortification. *Frontiers in Plant Science*, 4(205), 1-10. doi: 10.3389/fpls.2013.00205
- Küpper, F. C., Carpenter, L. J., Mcfiggans, G. B., Palmere, C. J., Waiteh, T. J., Boneberg, E., Woitsch, S., Weiller, M., Abela, R., Grolimund, D., Potin, P., Butler, A., Luther, G. W., Kroneck, P. M. H., Meyer-Klaucke, W., & Feiters, M. C. (2008). Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), 6954-6958. doi: 10.1073/pnas.0709959105
- la Barre, S., Potin, P., Leblanc, C., & Delage, L. (2010). The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine Drugs*, 8(4), 988-1010. doi: 10.3390/md8040988
- Landini, M., Gonzali, S., & Perata, P. (2011). Iodine biofortification in tomato. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(3), 480-486. doi: 10.1002/jpln.201000395
- Leyva, R., Sánchez-Rodríguez, E., Ríos, J. J., Rubio-Wilhelmi, M. M., Romero, L., Ruiz, J. M., & Blasco, B. (2011). Beneficial effects of exogenous iodine in lettuce plants subjected to salinity stress. *Plant Science*, 181(2), 195-202. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.05.007
- Luther, G. W., Wu, J., & Cullen, J. B. (1995). Redox chemistry of iodine in seawater: Frontier molecular orbital theory considerations. In: Huang, C. P., O'Melia, C. R., & Morgan, J. J. (Eds.), *Advances in Chemistry* (pp. 135-155). Washington, DC: American Chemical Society. doi: 10.1021/ba-1995-0244.ch006
- Mackowiak, C. L., & Grossl, P. R. (1999). Iodate and iodide effects on iodine uptake and partitioning in rice (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture. *Plant Soil*, 212(2), 135-143. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11762382>
- Mengel, K., Kosegarten, H., Kirkby, E. A., & Appel, T. (2001). Further elements of importance. In: Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H., & Appel, T. (Eds.), *Principles of plant nutrition* (5th. ed., pp. 639-655). Netherlands: Springer. doi: 10.1007/978-94-010-1009-2
- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant & Cell Physiology*, 28, 131-140. Retrieved from <http://pcp.oxfordjournals.org/content/28/1/131.short>
- Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Mothibe, K. J., Bangoura, M. L., & Lagnika, C. (2012). Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(7), 574-579. doi: 10.3923/pjn.2012.672.677
- Ramos, S. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Castro, E. M., Ávila, F. W., Carvalho, G. S., Bastos, C. E. A., & Oliveira C. (2010). Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant soil environ*, 56(12), 584-588. Retrieved from <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/31992.pdf>
- Sairam, R. K., Veerabhadra-Rao, K., & Srivastava, G. C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163(5), 1037-1046. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00278-9
- SIGMA-ALDRICH. (2014). 19160 SOD determination kit. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/19160dat.pdf>

Fin de la versión en español

- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67-80. doi: 10.1016/S0300-483X(02)00022-7
- Steiner, A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and soil*, 15(2), 134-154. doi: 10.1007/BF01347224
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(2), 167-2180. doi: 10.3390/molecules14062167
- Venturi, S. (2011). Evolutionary significance of iodine. *Current Chemistry Biology*, 5(3), 155-168. doi: 10.2174/187231311796765012
- Villasanti, C. (2013). *El cultivo de tomate con buenas prácticas agrícolas en la agricultura urbana y periurbana*. Departamento Central, Paraguay: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
- Weng, H. X., Hong, C. L., Yan, A. L., Pan, L. H., Qin, Y. C., Bao, L. T., & Xie, L. L. (2008a). Mechanism of iodine uptake by cabbage: Effects of iodine species and where it is stored. *Biological Trace Element Research*, 125(1), 59-71. doi: 10.1007/s12011-008-8155-2
- Weng, H. X., Yan, A. L., Hong, C. L., Xie, L. L., Qin, Y. C., & Cheng, C. Q. (2008b). Uptake of different species of iodine by water spinach and its effect to growth. *Biological Trace Element Research*, 124(2), 184-194. doi: 10.1007/s12011-008-8137-4
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182(1), 49-84. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02738.x
- Xue, T., Hartikainen, H., & Piironen, V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*, 237(1), 55-61. doi: 10.1023/A:1013369804867
- Yu, Z., & Dahlgren, R. A. (2000). Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9), 2119-2140. doi: 10.1023/A:1005568416040
- Zhu, Y. G., Huang, Y. Z., Hu, Y., & Liu, X. Y. (2003). Iodine uptake by spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants grown in solution culture: effects of iodine species and solution concentrations. *Environment International*, 29(1), 33-37. doi: 10.1016/S0160-4120(02)00129-0