

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL



**CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL Y FISIOLÓGICO EN
PLANTAS DE JUDÍA (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) SOMETIDAS A UN ESTRÉS
POR NITRÓGENO**

ESTEBAN SÁNCHEZ CHÁVEZ
TESIS DOCTORAL

GRANADA, 2006

El presente trabajo de investigación titulado: **“Caracterización del estado nutricional y fisiológico en plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) sometidas a un estrés por nitrógeno”**, para aspirar al Grado de Doctor en Fisiología del desarrollo en plantas superiores que presenta el Ingeniero D. Esteban Sánchez Chávez, ha sido realizado en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo la dirección de los Profesores, Dr. Luis María Romero Monreal y Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez, a quienes deseo expresar mi más sincero agradecimiento.

Dr. Luis María Romero Monreal
Director de la Tesis Doctoral
Catedrático de la Universidad de Granada

Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez
Director de la Tesis Doctoral
Profesor Titular de la Universidad de Granada

D. Esteban Sánchez Chávez
Aspirante al Grado de Doctor

GRANADA, 2006

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD DE GRANADA** por la oportunidad que me brindo en mi formación como Universitario.

A la **SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA DE MÉXICO** a través del **Programa de Mejoramiento del Profesorado** por brindarme el apoyo económico para la realización de los Estudios Doctorales (Becario Promep UACHIH-22).

A la **FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA** por el gran apoyo que me brindo para realizar mis Estudios Doctorales.

Al **DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA** por el gran apoyo brindado para realizar mis Estudios Doctorales.

Al **Dr. Luis María Romero Monreal**, Director de tesis, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su Grupo de Investigación de Nutrición Vegetal, así como por el gran apoyo que me brindo durante el desarrollo de la tesis. Ha sido y será siempre un gran Maestro y un entrañable amigo.

Al **Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez**, Director de tesis, por brindarme su amistad y confianza plena en mi trabajo y en mi persona, así como por el gran apoyo brindado durante el desarrollo de la tesis.

A **todos los profesores** del Departamento de Fisiología Vegetal por darle la oportunidad de pertenecer a este Departamento.

A **mis compañeros, y sobre todo amigos** Rosa, Luis, Pablo, Fran, Gemma, Diego, Mourad, pertenecientes al Grupo de Investigación de Nutrición Vegetal, por su disposición y muestras de apoyo durante la realización de la parte experimental y teórica de este trabajo. A todos gracias.

DEDICATORIAS

A mi esposa: María Teresa por su amor, gran apoyo y comprensión.

A mis hijos: Esteban Alberto y Valeria Sofía, ya que son mi fortaleza y deseos de superación.

A mis padres: Conrado y María Dolores por su valioso apoyo para la realización de la tesis doctoral.

A mis hermanos: Martín, Isidro, Guillermo, Conrado, Juvenal, Armando, Vicente, María Dolores y Hugo, mil gracias por su gran apoyo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL NITRÓGENO.....	1
1.1.1. <i>GENERALIDADES</i>	1
1.1.1.1. <i>ABSORCIÓN DE NO₃⁻ Y NH₄⁺: MECANISMOS DE TRANSPORTE</i>	2
1.1.1.2. <i>TRANSLOCACIÓN DE NO₃⁻ Y NH₄⁺</i>	5
1.1.1.3. <i>ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO: GENERALIDADES</i>	6
1.1.1.3.1. <i>REDUCCIÓN DEL NITRATO: ENZIMAS IMPLICADAS</i>	6
1.1.1.3.1.1. Nitrato reductasa (NR).....	7
1.1.1.3.1.2. Nitrito reductasa (NiR).....	8
1.1.1.3.2. <i>ASIMILACIÓN DEL NH₄⁺: ENZIMAS IMPLICADAS</i>	9
1.1.1.3.2.1. Glutamina sintetasa (GS).....	9
1.1.1.3.2.2. Glutamato sintasa (GOGAT).....	10
1.1.1.3.2.3. Glutamato deshidrogenasa (GDH).....	12
1.1.1.3.2.4. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).....	13
1.1.1.3.3. <i>REGULACIÓN DE METABOLISMO NITROGENADO</i>	14
1.1.1.4. <i>FUNCIONES DEL NITRÓGENO</i>	17
1.1.1.5. <i>INTERVALO ADECUADO DE NITRÓGENO Y DESORDENES</i> <i>NUTRICIONALES</i>	17
1.1.1.5.1. Suficiencia de nitrógeno.....	17
1.1.1.5.2. Deficiencia de nitrógeno.....	18
1.1.1.5.3. Toxicidad de nitrógeno.....	18
1.1.1.6. <i>INFLUENCIA DEL NITRÓGENO SOBRE EL FÓSFORO Y POTASIO</i>	20
1.1.1.7. <i>INFLUENCIA DEL NITRÓGENO SOBRE LA PRODUCCIÓN Y</i> <i>CALIDAD DE LOS CULTIVOS</i>	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL Y MÉTODOS	26
3.1. <i>CONDICIONES AMBIENTALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL</i>	26
3.2. <i>RECOLECCIÓN</i>	27

3.3. ANÁLISIS DE LAS PLANTAS.....	28
3.3.1. MATERIAL SECO.....	28
3.3.1.1. LABOR PREPARATIVA DE LA MUESTRA.....	28
3.3.1.2. MACRONUTRIENTES: TOTALES.....	28
3.3.1.2.1. Mineralización.....	28
3.3.1.2.2. Cuantificación.....	28
a) Nitrógeno orgánico.....	28
b) Fósforo.....	29
c) Potasio, Calcio y Magnesio.....	30
3.3.1.3. MACRONUTRIENTES: SOLUBLES.....	31
3.3.1.3.1. Extracción.....	31
3.3.1.3.2. Cuantificación.....	31
a) Fósforo inorgánico.....	31
b) Potasio soluble.....	32
c) Calcio inorgánico y Magnesio clorofílico.....	32
d) Amonio.....	32
e) Nitratos.....	33
3.3.1.4. Fracciones de Fósforo.....	33
3.3.1.4.1. Órgano: raíz, tallo, pecíolo, hojas, vainas y semillas.....	34
3.3.1.5. Determinación de fitato.....	36
3.3.1.6. Determinación de Amonios cuaternarios totales y colina.....	38
3.3.2. MATERIAL FRESCO.....	40
3.3.2.1. PARÁMETROS NO ENZIMÁTICOS.....	40
3.3.2.1.1. Pigmentos foliares.....	40
3.3.2.1.2. Proteínas y aminoácidos solubles.....	41
3.3.2.1.3. Hidratos de carbono no estructurales y prolina.....	42
3.3.2.2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	45
3.3.2.2.1. Nitrato Reductasa “in vitro” (NR, EC 1.6.6.1).....	45
3.3.2.2.2. Nitrito Reductasa (NiR, EC 1.7.7.1.).....	47

3.3.2.2.3. Glutamato sintasa (GOGAT, EC 1.4.1.14.) y Glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2.).....	49
3.3.2.2.4. Glutamina Sintetasa (GS, EC 6.3.1.2.).....	52
3.3.2.2.5. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31).....	54
3.3.2.2.6. Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS, EC 2.4.1.14).....	55
3.3.2.2.7. Sacarosa Sintetasa (SS, EC 2.4.1.13).....	58
3.3.2.2.8. Fructosa 1,6-Bifosfatasa (F1,6-Bpasa, EC 3.1.3.11).....	58
3.3.2.2.9. Invertasa Ácida (EC 3.2.1.26) e Invertasa Alcalina(EC 3.2.1.27).....	60
3.3.2.2.10. Fosfatasa ácida (AFA, EC 3.1.3.2).....	62
3.3.2.2.11. Piruvato Kinasa (PK, EC 2.7.1.40).....	63
3.3.2.2.12. ATPasa de plasmalema (ATPasa, EC 3.6.1.35) en raíces.....	66
3.3.2.2.13. Fitasa (EC 3.1.3.8/3.1.3.26).....	70
3.3.2.2.14. Fenilalanina amônio-liasa (PAL, EC 4.3.1.5).....	71
3.3.2.2.15. Polifenol oxidasa (PPO, EC 1.14.18.1).....	73
3.3.2.2.16. Fenoles totales y Ortodifenoles.....	75
3.3.2.2.17. Extracción y cuantificación del H ₂ O ₂	77
3.3.2.2.18. Actividad enzimática Superóxido Dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1).....	79
3.3.2.2.19. Actividad Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6).....	81
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	82
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
4.1. <i>PRODUCCIÓN DE BIOMASA</i>	83
4.2. <i>PRODUCTIVIDAD</i>	86
4.3. <i>METABOLISMO NITROGENADO</i>	89
4.3.1. Raíces y Hojas.....	89
4.3.2. Vañas y Semillas.....	96
4.4. <i>METABOLISMO DEL FÓSFORO</i>	102
4.4.1. Raíces y Hojas.....	102
4.4.2. Vañas y Semillas.....	106

4.5. <i>METABOLISMO CATIONICO</i>	113
4.5.1. Raíces y Hojas.....	113
4.5.2. Vaínas y Semillas.....	121
4.6. <i>INDICADORES FISIOLÓGICOS</i>	131
4.6.1. Hidratos de carbono no estructurales y pigmentos fotosintéticos.....	131
4.6.1.1. Raíces y Hojas.....	131
4.6.2. Vaínas y Semillas.....	138
4.7. <i>METABOLISMOS RELACIONADOS CON ESTRÉS</i>	145
4.3.4.1. <i>METABOLISMO DE LA PROLINA</i>	145
4.3.4.1.1. Raíces y Hojas.....	145
4.3.4.1.2. Vaínas y Semillas.....	148
4.3.4.2. <i>COMPUESTOS DE AMONIOS CUATERNARIOS</i>	153
4.3.4.2.1. Raíces y Hojas.....	153
4.3.4.2.2. Vaínas y Semillas.....	154
4.3.4.3. <i>METABOLISMO DE LOS FENOLES</i>	154
4.3.4.3.1. Raíces y Hojas.....	156
4.3.4.3.2. Vaínas y Semillas.....	159
5. CONCLUSIONES	162
6. REFERENCIAS	165

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL NITRÓGENO

1.1.1. GENERALIDADES

El N es el nutriente más necesario para las plantas y por lo tanto con cierta frecuencia se convierte en un factor limitante para el desarrollo y crecimiento óptimo de las mismas (Mattson et al., 1991; McDonal et al., 1996; Lawlor, 2002). Dependiendo de las características del hábitat, las formas de N disponibles para las plantas van a variar, desde el nitrógeno molecular (N_2), formas inorgánicas (NO_3^- , NH_4^+ y urea [$CO(NH_2)_2$]), estructuras orgánicas (aminoácidos), y el NH_3^+ u óxidos de N (NO_x).

Por otro lado, la forma preferente de absorber el N por las plantas dependerá de sus propias características fisiológicas (calcícolas y calcífugas). Por ejemplo, Kronzucker (1997), indica la preferencia del NH_4^+ , sobre NO_3^- , en las plántulas de *Picea abies*. Sin embargo, las prioridades nutricionales de las plantas por una forma nitrogenada u otra, irán dirigidas a mantener un balance catión/anión lo más estable posible (van Beusichem et al., 1988).

En muchos suelos, especialmente en los destinados a la agricultura, los NO_3^- , es la forma nitrogenada más abundante, cuya concentración normalmente varía dentro de un rango aproximado de entre 0.5 mM y 10 mM (Benton Jones, 1997). Por el contrario, el NH_4^+ se encuentra en el suelo en una concentración de 10 a 100 veces menor (Marschner, 1995). A diferencia con el NO_3^- , el NH_4^+ predomina en aquellos suelos en los que la nitrificación está inhibida, por ejemplo en suelos encharcados o de climas fríos (Mengel y Kirkby, 2001).

Los procesos de absorción, translocación, y asimilación de NO_3^- aunque son independientes, muestran una regulación muy estrecha en las plantas superiores. Tanto la existencia de NO_3^- en el medio como las concentraciones intracelulares de estos, son los factores más importantes que determinan su absorción y asimilación en las plantas (Deane-Drummond, 1990; Redinbaugh y Campbell, 1991; Schjoerring et al., 2002).

Por lo general, el NO_3^- potencia de una manera más importante que el NH_4^+ el crecimiento de las plantas, puesto que éstas responden a esta forma nitrogenada alterando su metabolismo e induciendo y activando con mayor intensidad a los genes

que intervienen en los procesos de la asimilación del N (Crawford, 1995; Glass y Siddiqi, 1995; Owata, 1995). Estos genes codifican, por un lado a transportadores que son capaces de captar el NO_3^- desde el medio exterior, y por otro lado, codifican a todas las enzimas responsables de sintetizar, en las células, los compuestos orgánicos nitrogenados (von Wiren et al., 1997; Crawford y Glass, 1998; Stitt, 1999).

1.1.1.1. ABSORCIÓN DE NO_3^- Y NH_4^+ : MECANISMOS DE TRANSPORTE

Las plantas absorben N desde el suelo bajo sus formas inorgánicas: NO_3^- y NH_4^+ (Chaillou y Lamaze, 2001). La absorción de NO_3^- es el principal factor que determina su posterior asimilación e integración en el metabolismo nitrogenado (Crawford, 1995; Glass y Siddiqi, 1995; Sivasankar y Oaks, 1996; Stitt, 1999; Gastal y Lemaire, 2002; Stitt et al., 2002).

La mayoría de las plantas exhiben un sistema bifásico para la absorción de NO_3^- , definido como de alta y baja afinidad a la absorción de este anión (Glass y Siddiqi, 1995; Miller y Smith, 1996). En general, ambos sistemas de absorción requieren energía, incluso cuando la concentración externa de NO_3^- está en un rango bajo (mM) (Crawford y Glass, 1998; Sánchez-Guerrero et al., 1998). La energía para su absorción proviene de la creación de un gradiente de concentración, por medio del funcionamiento de las ATPasas de membranas. Además, la absorción de NO_3^- esta asociada con la despolarización de la membrana plasmática, es decir, con el aumento de las cargas positivas dentro de la célula (Crawford y Glass, 1998).

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

Las raíces poseen al menos tres sistemas de transporte de NO_3^- cinéticamente distintos (Crawford y Glass, 1998; Sánchez-Guerrero et al., 1998; Jeuffroy et al., 2002): (1) un sistema de transporte constitutivo de alta afinidad inducido rápidamente por la presencia de NO_3^- , y saturable a bajas concentraciones de NO_3^- en el medio (< 1 mM); (2) unos transportadores de alta afinidad que son inducidos entre horas y días después de la exposición a los NO_3^- ; y (3) finalmente, unos transportadores constitutivos de baja

afinidad, los cuales intervienen en la absorción de NO_3^- a partir de concentraciones en el rango de 250 μM hasta 50 mM (Faure, 2000; Guo et al., 2002).

Los dos sistemas de alta afinidad son regulados o inducidos en respuesta al NO_3^- , y también se ha comprobado su inducción por los NO_2^- (Kronzucker et al., 1995; Sánchez-Guerrero et al., 1998; Faure, 2000). Los transportadores de alta afinidad son rápidamente activados por la demanda de NO_3^- de la parte aérea, para posteriormente ser inactivados después de la exposición a los NO_3^- (Crawford y Glass, 1998; Sánchez-Guerrero et al., 1998). Estudios fisiológicos y moleculares en distintas especies de *Nicotiana* indican que varias formas nitrogenadas, incluyendo NO_3^- , NH_4^+ y aminoácidos, pueden participar en la inactivación de este sistema de transporte. Tal regulación es esencial para coordinar la absorción radicular y la demanda de N por la parte aérea durante el ciclo de crecimiento de la planta (Imsande y Touraine, 1994; Crawford y Glass, 1998).

Los efectos del NH_4^+ sobre la inhibición de la absorción de NO_3^- se producen tanto en periodos largos (horas a días) como en periodos cortos de unos pocos minutos. Por ejemplo, un estudio reciente usando ^{15}N en forma de NO_3^- en cebada, muestra que la entrada de NO_3^- disminuía, mientras que la salida de éstos incrementaba después de unos pocos minutos ante la exposición radicular de NH_4^+ (Crawford y Glass, 1998). Una explicación que se da en este sentido (inhibición rápida de la absorción de NO_3^- por la presencia de NH_4^+), es que el NH_4^+ produce la despolarización de la membrana plasmática, lo que induce la absorción activa de NO_3^- por el mecanismo simporte $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ (Ullrich, 1992). Sin embargo, y en contra de esta hipótesis, el K^+ es conocido también por su efecto de despolarización de la membrana plasmática sin que ello conlleve una reducción en la absorción de NO_3^- (Crawford y Glass, 1998).

La absorción de NO_3^- es sensible tanto a señales externas como internas. Una de estas señales internas que intervienen activamente en el metabolismo nitrogenado son los aminoácidos (Padgett y Leonard, 1996). Estos son un componente mayoritario como forma nitrogenada del floema en la mayoría de las plantas (Peuke y Jeschke, 1993; Peuke et al., 1994), particularmente en aquellas que no reducen ni asimilan los NO_3^- en las raíces (ejemplo plantas anuales) (Cooper y Clarkson, 1989). Las plantas que su

reducción mayoritariamente se realiza en las hojas, translocan el N reducido en estas hacia las raíces a través del floema en forma de aminoácidos (Li et al., 1995).

Algunos aminoácidos (principalmente glutamina, glutamato y asparagina) que se encuentran en el xilema pueden ser el resultado de la asimilación del N inorgánico en las raíces. Además, esto puede deberse a la movilidad del N desde la parte aérea hacia la raíz y regreso de nuevo a la parte aérea como propuso Cooper y Clarkson (1989). Por lo tanto, un exceso de aminoácidos podría significar una señal de exceso de N, lo que conduciría a una inhibición de la entrada de NO_3^- (Cooper y Clarkson, 1989; Imsade y Touraine, 1994; Padgett y Leonard, 1996).

Un estudio presentado por Muller y Touraine (1992) demostró la inhibición de un 50% en la absorción de esta forma nitrogenada cuando fueron aplicados al medio de cultivo los aminoácidos: alanina, glutamina, asparagina, y arginina, entre otros. La arginina inhibe la absorción de NO_3^- inmediatamente, siendo esta respuesta similar a la que produce el NH_4^+ . Los autores sugieren que este hecho puede ser el resultado de una respuesta, no metabólica, como es la alteración del potencial de membrana. Por el contrario, la alanina induce a una disminución en la absorción de NO_3^- lo que sugiere un componente metabólico, puesto que el proceso solamente se reduce y no se inhibe.

Finalmente, Padgett y Leonard (1996) han observado que las células de maíz tienen preferencia por la absorción de aminoácidos en relación a los NO_3^- , siempre que ambos estén presentes en el medio de cultivo. La adición de 2 mM de glutamina inhibe la entrada de NO_3^- y también produciéndose la extrusión de este anión al medio.

Con respecto a la absorción de NH_4^+ los mecanismos de regulación, como veremos a continuación, son muy distintos a los que operan en la absorción de NO_3^- . En el caso de NH_4^+ es más efectiva en un medio neutro y va disminuyendo a medida que se reduce el pH (Marschner, 1997). La captación de NH_4^+ esta influida también por el nivel de carbohidratos de las plantas, puesto que se ha comprobado que a elevados niveles de estos compuestos se favorece su absorción, debido probablemente a que estos compuestos están energéticamente enriquecidos (Mengel y Kirkby, 2001).

En oposición a lo que ocurre con los NO_3^- , la absorción de NH_4^+ no esta influida por la disponibilidad de N en la planta (Ryan y Walker, 1994) no existiendo una

relación directamente, proporcional, entre la concentración intracelular de NH_4^+ y su absorción. Sin embargo, y según varios autores los productos resultantes de la asimilación de NH_4^+ , como los aminoácidos, si podrían estar implicados en su absorción, de forma similar a lo que ocurre con los NO_3^- (Wang et al., 1993a).

El influjo de NH_4^+ depende en gran medida de las concentraciones de este catión en el medio externo. Dependiendo de las condiciones de saturación y de su afinidad por el NH_4^+ , existen dos sistemas de transporte, que a continuación se describen:

(a) **Sistema de transporte de alta afinidad (STAA)**, en el cual el componente de influjo depende de su saturación (Wang et al., 1994). Este sistema es constitutivo y puede ser inducible, particularmente por su sustrato después de una fase lag, en un periodo de pocos minutos (Märk y Tischner, 1994; Faure, 2000; Guo et al., 2002).

(b) **Sistema de transporte de baja afinidad (STBA)**, que corresponde a un sistema de elevada capacidad pero una baja afinidad para su sustrato. Este mecanismo es constitutivo y no es saturable a elevadas concentraciones en el medio (más de 40 mM de NH_4^+) (Chaillou y Lamaze, 2001; Guo et al., 2002).

1.1.1.2. TRANSPORTE DE NO_3^- Y NH_4^+

El transporte de los elementos minerales a través del xilema hacia la parte aérea está estrechamente relacionada con el transporte de agua. Este transporte ocurre cuando el movimiento del agua se produce por el proceso denominado “presión radicular” que da lugar a la exudación, o excreción xilemática, cuando las plantas son decapitadas (Barthes et al., 1996; Glass et al., 2001; Galvan et al., 2002; Orsell et al., 2002). Esta exudación xilemática se incrementa por la presencia de NO_3^- , explicándose este hecho posiblemente por un aumento de la diferencia de potenciales osmóticos entre el medio radicular y los vasos xilemáticos. Por otra parte los NO_3^- también podrían incrementar la conductancia hidráulica radicular. Ambos fenómenos facilitarían el transporte de estos NO_3^- hacia la parte aérea a través del movimiento del H_2O (Barthes et al., 1996; Glass et al., 2002).

Una vez que los NO_3^- son absorbidos por la raíz pueden ser asimilados en este órgano o bien, transportados hacia la parte aérea y asimilados en las hojas de la planta.

Además, existe la posibilidad de que los NO_3^- puedan ser almacenados en las vacuolas tanto de raíces como de la parte aérea. Los NO_3^- almacenados en las vacuolas pueden ser excretados al citoplasma y asimilados cuando sus niveles externos son limitantes (King et al., 1992; Sivasankar y Oaks, 1996; Galvan y Fernández, 2001).

Se ha comprobado que la carga de los NO_3^- en el xilema ocurre de forma pasiva, siguiendo los gradientes electro-químicos. El hecho de que la sustancia p-fluorofenilalanina, una molécula análoga estructuralmente a la fenilalanina, reduzca el contenido de NO_3^- en el xilema nos indica que la carga xilemática de NO_3^- requiere de la síntesis proteica, y por lo tanto, debe de ser mediada por transportadores (Morgan et al., 1985; William y Millar, 2001).

Finalmente, indicar que el N absorbido por las raíces es translocado en el xilema hacia las partes superiores de la planta. La forma de translocación del N depende de la fuente de absorción de N y del metabolismo de las raíces (Marschner, 1997). Por ejemplo, el NH_4^+ una vez absorbido es rápidamente, por lo general, asimilado en las raíces y redistribuido por lo tanto en la planta como aminoácidos. En definitiva, los NO_3^- y los aminoácidos son las principales formas en la cual el N es translocado en el sistema vascular (Glass et al., 2002; Schjoerring et al., 2002).

1.1.1.3. ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO: GENERALIDADES

El crecimiento de las plantas depende en gran medida de un adecuado aporte de N para formar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares necesarios para su desarrollo (Huber et al., 1996). La asimilación de N por las plantas requiere la absorción de NO_3^- , su reducción y la conversión de NO_2^- a NH_4^+ , y la incorporación de NH_4^+ inorgánico a compuestos orgánicos (Sivasankar y Oaks, 1996; Stitt, 1999; Lawlor, 2002; Stitt et al., 2002).

1.1.1.3.1. REDUCCIÓN DEL NITRATO: ENZIMAS IMPLICADAS

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

1.1.1.3.1.1. Nitrato reductasa (NR)

La NR cataliza la reducción de NO_3^- a NO_2^- (Warner, 1987; Druart et al., 2000). De acuerdo con su especificidad por el donador de electrones, existen dos clases principales de NR que pueden ser: (a) una NR ferredoxina-dependiente, la cual es típica de cianobacterias y bacterias fotosintéticas, y (b) una NR nucleotido piridina-dependiente que se encuentra en organismos eucariotas (Weber y Flugge, 2002).

Las diferencias entre estos dos tipos de NR se basan en sus grupos prostéticos y en sus propiedades físico-químicas. Otra diferencia importante es que mientras la NR ferredoxina-dependiente parece encontrarse exclusivamente en las membranas fotosintéticas, la NR piridina-dependiente es una enzima soluble (Guerrero et al., 1981; Solomonson y Barber, 1990). En este apartado nos dedicaremos exclusivamente a la NR presente en los eucariotas.

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

En general, la NR-NAD(P)H es una enzima con un peso molecular que oscila desde 197 a 460 Kdaltons (kDa), compuesta por varias subunidades aparentemente idénticas (Guerrero et al., 1987; Caboche y Rouze, 1990). En plantas superiores, cada monómero tiene tres dominios funcionales que corresponden a cada uno de sus tres centros redox formados por FAD, hemo (citocromo b557), y un cofactor de molibdeno (MoCo), los cuales se presentan en una relación 1:1:1 (Caboche y Rouze, 1990; Solomonson y Barber, 1990). Los centros redox transfieren dos electrones desde el NAD(P)H a los NO_3^- lo que facilita la reducción de éstos a NO_2^- .

La NR se encuentra en el citoplasma, sea este radicular o limbo foliar, hecho que se ha comprobado a través del fraccionamiento celular y técnicas bioquímicas o inmunocito-químicas (Fedovora et al., 1994). En el citoplasma de las células foliares, el

NADH requerido para el funcionamiento normal de la NR es suministrado a través de dos mecanismos. En uno de ellos esta involucrado un transportador 3-fosfogliceraldehído en las hojas y localizado en el cloroplasto, y en el otro esta involucrado un transportador malato-oxaloacetato localizado tanto en el cloroplasto como en la mitocondria (House y Anderson, 1980). En cuanto a las raíces, el suministro de NADH o NADPH se produce a través de las actividades glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa o 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (Bowsher et al., 1993), aunque el mecanismo comentado para las hojas malato-oxaloacetato también puede suministrar NADH a este órgano (Naik y Nicholas, 1984).

Los análisis moleculares y genéticos han revelado que la mayoría de las plantas tienen dos o más genes estructurales para la NR (Caboche y Rouze, 1990; Sivasankar y Oaks, 1996). La proteína NR y el RNAm son inducidos por la adición de NO_3^- (Sueyoshi et al., 1995), y esta inducción es reprimida por la glutamina o la asparagina (Vicentz et al., 1993; Sivasankar y Oaks, 1995). El suministro de sacarosa y la exposición a la luz también aumentan la inducción de la proteína NR y del RNAm (Li y Oaks, 1994; Sivasankar y Oaks, 1996), lo que sugieren que la actividad de la NR de las hojas se modula reversiblemente por luz/obscuridad mediante un mecanismo de desfosforilación (activación)/fosforilación (inactivación) (Li y Oaks, 1994; Sivasankar y Oaks, 1996; Agüera et al., 1997).

1.1.1.3.1.2. Nitrito reductasa (NiR)

Se han descrito dos tipos de NiR, las cuales se definen a partir de un donador específico de electrones: (a) ferredoxina-nitrito reductasa (EC 1.7.7.1), características de los organismos fotosintéticos, y (b) NAD(P)H-nitrito reductasa que se encuentra en organismos no fotosintéticos. Ambas enzimas catalizan la reducción de NO_2^- a NH_4^+ , lo que implica la transferencia de $6e^-$, al igual que ocurre en la reducción de N_2 a NH_4^+ catalizado por la nitrogenasa (Guerrero et al., 1987; Sivasankar y Oaks, 1996; Weber y Flugge, 2002).

La NiR se localiza en los cloroplastos de las hojas y en los plastidios en las raíces (Sechley et al., 1992). La NiR es una proteína con un peso molecular de 60 a 70

Kdaltons y compuesta por dos grupos prostéticos, uno hemo llamado “sirohaem” y otro un centro 4Fe4S (Siegel y Wilkerson, 1989).

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

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

1.1.1.3.2. ASIMILACIÓN DEL NH_4^+ : ENZIMAS IMPLICADAS

Una vez que el NH_4^+ ya se encuentra en el interior de la célula, bien procedente del medio u originado por la reducción de NO_3^- , éste es asimilado en varios pasos en los cuales participan distintas enzimas que a continuación pasamos a describir.

1.1.1.3.2.1. Glutamina sintetasa (GS)

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima clave en la asimilación del NH_4^+ en plantas (Leat et al., 1990; Brechlin et al., 2000; Miflin y Habash, 2002, Stitt et al., 2002; Weber y Flugge, 2002). En plantas superiores la GS es una proteína de ocho subunidades con un peso molecular aproximado de 350-400 kDa (Woodall y Forde, 1996). En hojas se han identificado dos isoformas de la enzima, la GS1 y la GS2, localizadas en el citoplasma y en el cloroplasto respectivamente, y cuya proporción puede variar en respuesta a distintas condiciones medioambientales o conforme la edad de la planta. Esta distribución de las isoformas de la enzima GS en las células foliares va en correlación con la estrategia fotosintética o fotorespiratoria que adopte en cada caso la planta (McNally et al., 1983). Distintos investigadores han constatado que la

concentración relativa de cada isoforma puede variar con la senescencia del tejido, con la edad de la planta, así como por la acción de algún tipo de estrés (Ireland y Lea, 1999).

Entre los factores que se encuentran con la capacidad de modificar el contenido y la actividad de la GS2 está la luz, la cual provoca un aumento considerable de los niveles de ARN mensajero y proteínas, implicando en este mecanismo de regulación a un fitocromo o a un receptor de luz azul (Edwards y Coruzzi, 1989; Elmlinger et al., 1994; Becker et al, 1992; Migge et al., 1996; Suárez et al., 2002).

Por otro lado, en *Arabidopsis* se ha comprobado que la sacarosa es capaz de reponer los niveles de ARN mensajero de la GS2 cloroplástica, cuya síntesis había sido previamente inhibida por la oscuridad (Melo-Oliveira et al., 1996). Los niveles de GS2 también se ven afectados por variaciones en la concentración de CO₂ y en el rango de temperaturas (Edwards y Coruzzi, 1989; Woodall et al., 1996).

Mack (1995) detectó la presencia de dos isoformas de la GS citosólica en las células radiculares de cebada, GS1a y GS1b, con dos y cinco subunidades respectivamente. En raíces de maíz, además se ha comprobado la existencia de otra isoforma, GSr, con un peso molecular aproximado de 43 kDa, y según Sakakibara et al. (1996) es la principal responsable de la asimilación de NH₄⁺ aplicado de manera exógena al medio nutritivo en las células radiculares de maíz.

1.1.1.3.2.2. Glutamato sintasa (GOGAT)

La glutamato sintasa (GOGAT) es una enzima clave en las primeras etapas de la asimilación de amonio en bacterias, algas y en plantas superiores (Temple et al., 1998; Dincturk y Knaff, 2000; Stitt et al., 2002; Weber y Flugge, 2002).

Las reacciones conjuntas de la GS y de la GOGAT se conocen como el ciclo GS/GOGAT, y son esenciales para la asimilación del NH₄⁺ en plantas. Las dos moléculas de glutamato sintetizadas por la actividad GOGAT pueden ser usadas como sustratos de la GS o pueden, a partir de su grupo amino, formar otra serie de derivados nitrogenados (Hodges, 2002).

En plantas superiores, la GOGAT aparece bajo dos isoformas distintas en función de la fuente reductora que utilicen: la Ferredoxina-GOGAT (Fd-GOGAT; EC

1.4.7.1.) y la NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14.), las cuales difieren en su peso molecular, en su composición, en su cinética enzimática y en sus funciones metabólicas (Vance, 1997; Temple et al., 1998; Ireland y Lea, 1999; Suárez et al., 2002).

La Fd-GOGAT es una flavoproteína con un grupo Fe-S que fue aislada por primera vez en cloroplastos de hojas de guisante. En combinación con la GS de los plastidios, la Fd-GOGAT cataliza la asimilación del NH_4^+ originado por la reducción de los NO_3^- dependiente de la luz y de la fotorrespiración (Lea et al., 1990).

El mayor regulador de la actividad Fd-GOGAT es la luz, y se ha propuesto que la respuesta de dicha actividad enzimática a este estímulo externo está mediada por un fitocromo y un receptor específico de luz azul/UV (Elmlinger y Mohr, 1991; Teller et al., 1996). Otros factores, además de la luz, que influyen en la actividad de la Fd-GOGAT son la fuente nitrogenada $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, la sacarosa y el estrés salino. Por ejemplo, Migge y Becker (1996) indicaron que en hojas de tabaco se producía un ligero descenso en el nivel de expresión de los genes que codifican las enzimas GS y Fd-GOGAT cuando se provocaba el cese del suministro de N, siendo ese descenso menos acusado para la NR y NiR.

La Fd-GOGAT también ha sido detectada en los plastos de las células radiculares de guisante, arroz, maíz, soja, cebada, donde el suministro del poder reductor lo realiza la ruta de las pentosas fosfato, no viéndose además su actividad influida por la disponibilidad de N (Yamaya et al., 1995). Sin embargo, y en relación con este último aspecto Redinbaugh y Campbell (1993) y posteriormente Oaks (1994) detectaron variaciones en los niveles de ARN mensajero y polipéptidos de la Fd-GOGAT en las raíces de maíz tras el aporte de NO_3^- o NH_4^+ .

La NADH-GOGAT es la forma que predomina en los tejidos de las plantas superiores, aunque su actividad en los tejidos fotosintéticos es menor en comparación con la Fd-GOGAT, y es capaz según las últimas investigaciones de utilizar también el NADPH como fuente de poder reductor (Oaks, 1994; Hodges, 2002; Suárez et al., 2002).

En arroz ha sido aislada una NADH-GOGAT cuya síntesis se ve inducida por la aplicación al medio de NO_3^- , NH_4^+ , glutamina o asparagina (Watanabe et al., 1996b;

Yamaya et al., 2002). La inducción de la actividad NADH-GOGAT queda de manifiesto cuando las plántulas de maíz son transferidas de un medio sin N a otro con cloruro amónico 1 mM. En esta situación la actividad y el contenido de la NADH-GOGAT aumentaba hasta diez veces más después de un día de tratamiento.

Esta enzima ha sido detectada en células parenquimáticas del metaxilema y metafloema y en las células meristemáticas de la vaina en hojas jóvenes de arroz. Hayakawa et al. (1994) propusieron que la NADH-GOGAT está implicada en el metabolismo de los tejidos que actúan fisiológicamente como sumidero de la glutamina que es transportada a través del sistema vascular desde las raíces y las hojas maduras.

1.1.1.3.2.3. Glutamato deshidrogenasa (GDH)

El papel de la GDH en la asimilación del NH_4^+ es todavía hoy motivo de discusión (Purnell et al. 1997; Lea y Ireland, 1999; Miflin y Habash, 2002).

La GDH se localiza principalmente en las mitocondrias de todos los tejidos vegetales estudiados. El número de subunidades por la que está compuesta varía entre 4 y 6, y el peso molecular oscila entre 230 y 300 kDa dependiendo de la especie vegetal. Del mismo modo se han encontrado hasta tres isoformas de la enzima GDH₁, GDH₂, GDH₃, ésta última localizada en hipocotilos y en raíces de soja (Turano et al., 1996).

Esta enzima posee una elevada K_m para el NH_4^+ (aproximadamente 1 mM), es decir, su afinidad por el sustrato es baja cuando la concentración de NH_4^+ es el factor limitante, no se produce su saturación.

Actualmente, existen distintos puntos de vista opuestos sobre la función de la GDH. En primer lugar, Oaks (1994) sugiere que la enzima cataliza la aminación reductiva de 2-oxoglutarato y funciona como una alternativa para el ciclo de la glutamato sintasa (GOGAT) (Yamaya et al., 1984). La segunda alternativa presentada por Robinson et al. (1992) es que la enzima cataliza la deaminación oxidativa del glutamato para proveer esqueletos carbonados al ciclo del ácido cítrico, particularmente bajo condiciones de limitación de carbono. Finalmente, también se ha sugerido que la GDH podría jugar un papel importante en la reasimilación del NH_4^+ bajo condiciones de estrés.

Entre los factores que regulan la actividad de la GDH, quizás el más importante y estudiado hasta el momento sea el NH_4^+ (Peeters y Vanlaere, 1992). El NH_4^+ provoca un aumento de la actividad aminadora de la GDH, mientras que la actividad desaminadora disminuye bruscamente. Por otro lado, azúcares como la sacarosa, glucosa o la fructosa pueden afectar de manera negativa a la actividad de la GDH como han comprobado distintos autores (Sahulka y Lisa, 1980; Robinson et al., 1992; Lawlor, 2002; Weber y Flugge, 2002).

1.1.1.3.2.4. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)

La enzima PEPC (EC 4.1.1.31) es una enzima esencial en el suministro de la estructura carbonada, derivada del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que es utilizada en la síntesis de glutamato y aspartato y de sus amidas. Es por lo tanto una pieza clave en la conjunción entre el metabolismo carbonado y metabolismo nitrogenado (Champing y Foyer, 1992).

La PEPC cataliza la β -carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) para generar oxalacetato (OAA) y P_i . Esta enzima ha sido muy estudiada en plantas C_4 y CAM en las que juega un papel esencial en el metabolismo fotosintético del carbono. En plantas C_3 los niveles de PEPC son menores y la enzima se encuentra distribuida en prácticamente todos los órganos de la planta llevando a cabo diferentes funciones. En cuanto a su regulación, la adición de NO_3^- o NH_4^+ activan la transcripción del gen PEPC en hojas de maíz. Asimismo, el NO_3^- aumenta el grado de fosforilación de la PEPC en hojas de trigo. Estos datos muestran la contribución de la PEPC en la asimilación del N (Champing y Foyer, 1992).

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

1.1.1.3.3. REGULACIÓN DEL METABOLISMO NITROGENADO

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

Actualmente se conocen un gran número de factores que pueden afectar directamente la asimilación de NO_3^- , y particularmente la actividad NR (Solomonson y Baber, 1990; Kaiser y Huber, 1994; Campbell, 1996; Sivasankar y Oaks, 1996; Stitt, 1999). La reducción de NO_3^- a NO_2^- por la NR es considerada tras muchas investigaciones la etapa limitante en la asimilación de NO_3^- en plantas superiores (Campbell, 1996; Gojon et al., 1998).

La actividad celular de dicha enzima puede ser regulada a través de sus niveles de síntesis y degradación, por la concentración de sustratos y otros factores, y a nivel del suministro intracelular de la enzima (Stitt, 1999). Factores que pueden influir en la actividad NR directamente o a través de señales son: la luz, el oxígeno, el CO_2 , el NO_3^- , el estado nutricional, otros metabolitos y condiciones medioambientales (Kaiser y Huber, 1994; Solomonson y Baber, 1990).

Las actividades NR y NiR están prácticamente ausentes en las células que utilizan NH_4^+ como fuente nitrogenada. Los NO_3^- han sido considerados como inductores de la síntesis de la primera enzima, mientras que el NH_4^+ o algún producto resultante de la asimilación de éste, como los aminoácidos, es considerado como un represor de su síntesis (Solomonson y Barber, 1990). En varias especies, sin embargo, los NO_3^- no parecen ser requeridos para la síntesis de dicha proteína enzimática, sino que es más bien la disminución o retirada de NH_4^+ lo que determina la síntesis (Zeiler y Solomonson, 1989).

Crawford y Glass (1986) mostraron que el ARNm de la NR era 120 veces mayor en cotiledones inducidos con NO_3^- que los no inducidos. Además, tanto la proteína como la actividad NR fueron mínimamente detectados en cotiledones no inducidos,

sugiriendo estos resultados que la inducción por NO_3^- de la enzima ocurre principalmente a nivel del ARN.

Oaks et al. (1988) mostraron que la inducción de la proteína NR inactiva en maíz ocurría en respuesta a la luz y en presencia de bajas concentraciones de NO_3^- , mientras que la máxima expresión de la actividad enzimática requería mayores niveles de dicho anión. Shuster et al. (1989) indicaron que una señal era requerida para la inducción por NO_3^- de las enzimas NR y NiR, denominando a esta señal: *señal plástica*. Por lo tanto, el fitocromo parece mediar en la estimulación de la expresión de la NR por la luz (Rajasekar et al., 1988).

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

En este sentido, Lillo (1994) sugieren que la actividad de la NR de hojas de pepino se modula reversiblemente por luz/oscuridad mediante un mecanismo de desfosforilación (activación)/fosforilación (inactivación). El 5'-AMP produjo además una activación de la NR que fue observada tanto en ausencia como en presencia de Mg^{2+} . La iluminación, en presencia de FAD, de extractos de hojas mantenidas en oscuridad ocasionó asimismo una activación parcial de la NR independiente de la presencia o no de Mg^{2+} en el ensayo. Ello sugiere que, además de fosforilación/desfosforilación, la actividad NR puede estar regulada por un mecanismo redox en respuesta a las transiciones luz/oscuridad.

La regulación de la síntesis de la NR por las hormonas vegetales no ha sido investigada de forma extensa. La síntesis de dicha enzima parece ser estimulada por las citoquininas (Gutteridge et al., 1983). Schmerder y Borriss (1986) indicaron que la actividad NR era también inducida por el etileno, y que la inducción por citoquininas solamente ocurría con la presencia de etileno. Ruiz et al. (1999c) estudiando el efecto que conlleva la aplicación de distintos biorreguladores sobre la asimilación de NO_3^- en

plantas de pimiento, observaron que la aplicación foliar conjunta de las hormonas giberelina, auxinas y citoquininas producían una activación de las actividades enzimáticas NR y NiR, potenciándose por lo tanto la eficiencia y utilización de los NO_3^- .

Por otro lado, la actividad NR puede ser modulada por varios factores internos en respuesta a particulares condiciones medioambientales, lo que conduce en algunos casos a una inactivación reversible de la enzima cuando reacciona con moléculas tales como cianida, hidroxilamina, o radicales superóxido (Solomonson y Barber, 1990).

La reactivación enzimática puede ser medida por la exposición a sistemas oxidantes, tales como la luz azul, flavinas u oxígeno (Solomonson y Barber, 1990). Otros factores que pueden inactivar a la NR son proteínas, concretamente endopeptidasas que parecen unirse específicamente a la NR inactivandolas (Guerrero et al., 1981; Hamano et al., 1985).

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

Recientemente se han obtenido evidencias que indican que la actividad NR de hojas de cebada se modula por los niveles intracelulares de productos procedentes de la asimilación de CO_2 , que actuarían condicionando la respuesta de la enzima a la capacidad fotosintética de la hoja. Se ha demostrado la existencia de una correlación positiva entre el estado de activación de la NR foliar y los niveles de hexosas-fosfato. Asimismo, se ha encontrado que los productos de la asimilación del carbono, especialmente la sacarosa, estimulan la actividad GS. De todo ello se sugiere que la asimilación del NH_4^+ , en girasol, puede estar regulada, mediante la actividad GS, por la velocidad de fijación de CO_2 , y actuando la sacarosa como metabolito regulador (Hodges, 2002).

Finalmente, indicar que los factores que influyen en la regulación de las enzimas responsables de la asimilación del N (NR, NiR, GS, GOGAT, GDH y PEPC) son: la

etapa fenológica de la planta (Ireland y Lea, 1999); la luz (Lea et al., 1990; Becker et al., 1992; Migge et al., 1996); la sacarosa (Sahulka y Lisa, 1980; Robinson et al., 1992; Melo-Oliveira et al., 1996); la fuente nitrogenada: NO_3^- y NH_4^+ (Peeters y Vanlaere, 1992; Oaks, 1994; Migge y Becker, 1996; López-Lefebre et al., 2000); el nivel de CO_2 (Edwards y Coruzzi, 1989; Robinson et al., 1992; Woodall et al., 1996); la temperatura (Edwards y Coruzzi, 1989; Woodall et al., 1996); los biorreguladores (Belakbir et al., 2000; Takei et al., 2002) y la concentración de glutamina o asparagina (Oaks, 1994; Watanabe et al., 1996; Kaiser et al., 2002).

1.1.1.4. FUNCIONES DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es uno de los mayores constituyentes de aminoácidos y proteínas, los cuales juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Mengel y Kirkby, 2001). De todos los elementos esenciales, el N tiene una gran influencia sobre el crecimiento de las plantas, debido a que su deficiencia y/o exceso marcadamente afecta el crecimiento de la planta, el rendimiento y calidad de los cultivos (Benton Jones, 1997).

1.1.1.5. INTERVALO ADECUADO Y DESORDENES NUTRICIONALES

1.1.1.5.1. Suficiencia de nitrógeno

Según la especie vegetal, su estado de desarrollo y el órgano analizado, el contenido de N requerido para el crecimiento óptimo de la planta varía entre el 2 y 5% del peso seco (Marschner, 1995). Cuando el aporte no es óptimo se retrasa el crecimiento, transportándose el N desde las hojas maduras hacia áreas en crecimiento, apareciendo por lo tanto los síntomas típicos de deficiencia de N (Benton Jones, 1997). Un aumento en el aporte de N, no sólo retrasa la senescencia y estimula el crecimiento, sino que también altera la morfología de la planta de una forma típica, particularmente si la disponibilidad de N es elevada en la zona radicular durante el crecimiento inicial. Un incremento de la razón brote/raíz se debe al aporte de N y ello ocurre tanto en plantas anuales como en perennes (Marschner, 1995).

El N altera la composición de las plantas mucho más que cualquier otro nutriente mineral. Así, mientras la producción de materia seca y el contenido total de N aumenta con su aporte, la concentración de carbohidratos principales que se almacenan en las plantas, como son polifruetosanos y almidón, decrecen drásticamente y sobretodo en herbáceas (Lawlor et al 2001).

La alteración en la composición de la planta con aportes crecientes de N refleja una competencia por los fotoasimilados entre varias vías metabólicas. Esta competición esta modulada por factores internos y externos. Cuando el aporte es subóptimo, la asimilación de NH_4^+ incrementa tanto el contenido de proteínas como el crecimiento del limbo foliar. En este rango de concentración, la composición de la planta no cambia sustancialmente pero la producción total de los constituyentes por unidad de superficie foliar aumenta. Según aumenta el aporte de N, una elevada proporción de este en su forma asimilada es almacenado, por ejemplo en forma de amidas (Foyer y Galtier, 1996).

1.1.1.5.2. Deficiencia de nitrógeno

Todas las formas de N son móviles en la planta, por lo tanto, los primeros síntomas de deficiencia de N aparecen sobre las hojas más viejas. Por debajo de los límites necesarios, las plantas crecen lentamente, débiles y mal desarrolladas. Las hojas son pequeñas y el color de las ramas es verde claro o amarillo. Las hojas más viejas frecuentemente mueren prematuramente. La necrosis en las hojas o en partes de la hoja ocurre en una etapa más bien tardía y aumenta con el desarrollo de la deficiencia. El crecimiento de la raíz se reduce y la ramificación se restringe. Se da un aumento en la razón raíz/tallo. El rendimiento y la calidad se reducen significativamente (Benton Jones, 1997).

1.1.1.5.3. Toxicidad de nitrógeno

Las plantas pueden tolerar un exceso de NO_3^- en mucho mayor grado que el exceso de amonio (Rideout et al., 1995). Los niveles de NH_4^+ pueden ser tóxicos para las plantas si no son incorporados a compuestos de carbono-nitrógeno después de la

absorción. El amonio puede restringir también la captación de K por competir por los lugares de absorción en la raíz. Cuando el amonio es la forma dominante y disponible para la captación de la planta, se puede desarrollar una condición de toxicidad, y que está caracterizada por el crecimiento restringido de la raíz, la cual se ve reflejada en un mal funcionamiento del tejido vascular y una peor captación de agua. Los síntomas en las hojas pueden incluir clorosis y necrosis. Sin embargo, una aplicación pequeña de amonio como fertilizante, al final de la temporada de crecimiento de las plantas, da como resultado un color de hoja verde más deseable, sin reducción en el crecimiento. Fertilizantes como NH_4^+ producen problemas secundarios con frecuencia, tales como deficiencias de K, Ca o Mg. En los frutales se puede desarrollar pudriciones en las yemas florales, así como una pobre fructificación (Benton Jones, 1997).

En definitiva, existen pocos estudios realizados a nivel fisiológico sobre el efecto negativo de la toxicidad de N, y en ellos se menciona que dicho fenómeno pudiera ser debido a la acumulación de iones NO_3^- y NH_4^+ . En el caso del anión NO_3^- , Andreeva et al. (1998) encontraron que elevadas aplicaciones de NO_3^- a la solución nutritiva ($>$ de 15 mM), tuvo un efecto estresante para las plantas. Estos autores observaron que el incremento del contenido foliar de NO_3^- disminuyó sustancialmente los procesos claves para su desarrollo como son la síntesis y acumulación de almidón, asimilación de N y la fotosíntesis, lo que condujo a una reducción importante de la productividad.

Con respecto al catión NH_4^+ , se ha demostrado en diversos estudios que un gran aporte de NH_4^+ perjudica el crecimiento y producción, en comparación a las plantas que han sido nutridas con NO_3^- (Harada et al., 1968; Wilcox et al., 1985; Cramer y Lewis, 1993). La toxicidad de este puede ser producida por las siguientes causas: (1) inducción de deficiencias de nutrientes; (2) inhibición del crecimiento secundario originado por la acidificación del medio radicular; (3) alteraciones en el pH intracelular y balance osmótico; (4) desacoplamiento del transporte de electrones en la fotofosforilación, seguida por la acumulación de NH_4^+ en las hojas; y (5) alteración del metabolismo de las poliaminas y fitohormonas (Gerendás et al., 1997).

1.1.1.6. INFLUENCIA DEL NITRÓGENO SOBRE FÓSFORO Y POTASIO

El fósforo (P), después del N, es el segundo elemento nutricional limitante para el crecimiento de las plantas, oscilando su concentración alrededor del 0.2% del peso seco de la planta (Jeschke et al., 1996; Raghothama, 1999). Este macronutriente es un componente clave para muchas moléculas que participan en procesos básicos para las plantas, tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP (Schachtman et al., 1998). Además, el P en su forma inorgánica (P_i) está involucrado en el control de muchas reacciones enzimáticas y en la regulación de distintos procesos metabólicos (Theodorou y Plaxton, 1993). Los principales efectos de la deficiencia de P incluyen la reducción en el número de hojas (Lynch et al., 1991) y la pérdida en la eficiencia fotosintética (Lauer et al., 1989).

Los macronutrientes, N y P, están íntimamente involucrados en el metabolismo y crecimiento de las plantas, en donde estos nutrientes participan de manera conjunta en diferentes procesos bioquímicos de las plantas. En el caso del nitrógeno, este participa directamente en la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares necesarios para el desarrollo de la planta.

El papel del P en el metabolismo nitrogenado ha sido estudiado en detalle, aunque casi siempre desde el punto de vista de los efectos de deficiencia de este elemento. La asimilación de NO_3^- es alterada cuando las plantas son deficientes en P. Los más comunes efectos descritos son: (1) reducción en la absorción de NO_3^- a través de las raíces (Rufty et al., 1991; Pilbeam et al., 1993; Jeschke et al., 1996; Jeschke et al., 1997), posiblemente debido a la disminución de la disponibilidad radicular de ATP y a la limitación en la síntesis del sistema de transporte de membranas para NO_3^- (Rufty et al., 1993); (2) disminución en la translocación de NO_3^- desde las raíces hacia la parte aérea (Rufty et al., 1991; Pilbeam et al., 1993; Jeschke et al., 1997), relacionado con la caída en la presión hídrica vía la raíz y xilema (Rufty et al., 1993); y (3) aumento en la acumulación de aminoácidos, principalmente en las hojas (Rufty et al., 1991; Rufty et al., 1993; Jeschke et al., 1997). Estos factores conducen a una disminución de la actividad nitrato reductasa y por lo tanto ocurre una disminución en la asimilación de NO_3^- .

En general, la asimilación de N es alterada cuando las plantas crecidas con NO_3^- son privadas de un nivel adecuado de P. No obstante, los mecanismos regulatorios asociados con la asimilación de N que responden bajo condiciones de estrés por P, no han sido completamente aclarados.

Al igual que el N, el K^+ es el nutriente que se necesita en concentraciones elevadas para un adecuado crecimiento de las plantas, oscilando su concentración en un rango de 2 a 5 % de materia seca de la planta, tanto en partes vegetativas, frutos o tubérculos (Daliparty *et al.*, 1994; Marschner, 1995). Este macronutriente juega un papel esencial en el crecimiento y metabolismo de la planta, puesto que actúa activando enzimas (Evans y Sorger, 1966), funciona como un osmorregulador para mantener la presión de turgencia de los tejidos (Kaiser, 1982), regula la apertura y cierre estomático de los estomas (Humble y Raschke, 1971), y equilibra la carga de los aniones (Streeter y Barta, 1984). Una deficiencia de K^+ puede disminuir la fotosíntesis de la planta mediante la reducción del área foliar (Huber, 1985) y la fijación neta de CO_2 (Ozbun *et al.*, 1965).

Los macronutrientes, N y K^+ , están íntimamente involucrados en el metabolismo y crecimiento de las plantas, en donde estos nutrientes participan de manera conjunta en diferentes procesos bioquímicos de las plantas (Ruiz y Romero, 2002).

Por otro lado, un adecuado aporte de K^+ puede ser necesario para el uso eficiente de la fertilización nitrogenada. Dado que el uso del N, esencialmente en la forma de NO_3^- , como fertilizante es un tema importante en la agricultura actual, ya que el NO_3^- como fertilizante es relativamente caro y sino se emplea de manera adecuada puede contribuir a la contaminación de las aguas subterráneas y superficiales a través de la lixiviación y erosión del suelo (Sisson *et al.*, 1991), por lo que ha obligado hoy en día a buscar nuevos cultivos, genotipos y sistemas de producción que hagan más eficiente el uso de los nitratos aplicados como fertilizantes.

Diferentes trabajos han mostrado el directo involucramiento del K^+ en la absorción, translocación y asimilación de los NO_3^- en las plantas. Rufty *et al.* (1981) ha demostrado la estrecha relación entre K^+/NO_3^- a nivel de absorción y transporte. Por otro lado, se ha demostrado que la ausencia de K^+ afecta también la asimilación de NO_3^-

, ya que los NO_3^- son absorbidos y en gran parte asimilados por las raíces (Föster y Jeschke, 1993; Siebrecht y Tischner, 1999). En resumen, un adecuado aporte de K^+ incrementó la absorción y transporte de NO_3^- hacia la parte aérea y condujo a una alta acumulación de NO_3^- (Ruiz et al., 2000b) y consecuentemente una elevada actividad NR *in vivo* en hojas (Blevins, 1989), mientras que la actividad NR en las raíces declinó con la presencia de K^+ (Blevins, 1989; Föster y Jeschke, 1993). Sin embargo, pese al efecto directo del K^+ sobre la absorción, translocación y asimilación de NO_3^- , poca información es disponible sobre la relación entre estos dos nutrientes inorgánicos, los cuales son básicos para el crecimiento y desarrollo de la planta. Además, la literatura disponible esta enfocada sobre el efecto que tiene la deficiencia de K^+ sobre el metabolismo de los NO_3^- , examinando solamente la relación raíz-hoja.

1.1.1.7. INFLUENCIA DEL NITRÓGENO SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LOS CULTIVOS

El crecimiento de la planta depende de un adecuado aporte de N para formar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. Se ha comprobado que el crecimiento de la planta y el nivel de rendimiento son a menudo dependientes del aporte de dicho nutriente (Mattson et al., 1991; McDonald et al., 1996; López-Cantarero et al., 1997). Estos hechos indican la estrecha relación entre el rendimiento y el metabolismo del nitrógeno (Ruíz y Romero, 1998a), sin embargo el exceso de este a menudo da como resultado una pobre calidad de los frutos y una disminución del rendimiento comercial (Davenport, 1996; López-Cantarero et al., 1997).

Por otro lado, se han encontrado diferentes resultados entre la aplicación de N y la calidad de fruto en diversos cultivos (Miners y Sims, 1983), no obstante, el exceso de N a menudo da como resultado una baja calidad del fruto y disminución del rendimiento comercial (Davenport, 1996; López-Cantarero et al., 1997; Ruiz y Romero, 1998).

Los efectos del N en los niveles de crecimiento vegetativo y en su calidad son importantes. Si los cultivos han crecido con niveles de N insuficientes, el aspecto, el tamaño y la calidad del fruto se reduce en general (Ruiz y Romero, 1998). En cultivos

como lechuga, espinaca, col y apio, donde la parte vegetativa de la planta es la económicamente importante, la reducción en la calidad se manifiesta con un drástico descenso de la producción y un deterioro de su aspecto visual (morfología). Cuando se produce una deficiencia de este nutriente, ésta provoca un incremento en el porcentaje de materia seca, por disminución en la succulencia, y en cultivos como brécol, espárrago y coliflor, se hacen muy fibrosos y menos sabrosos. Por ejemplo, en lechuga se obtiene un óptimo de producción con niveles de aplicación de N de 150 kg/ha, aumentando significativamente el contenido de NO_3^- y disminuyendo el contenido de vitamina C. Según esto, las lechugas cultivadas con bajos niveles de dicho macronutriente y recogidas prematuramente presentan un elevado contenido en otros nutrientes y vitamina C (Huet y Dettmann, 1991). Para obtener lechugas que no se alteren durante largos periodos de almacenamiento y que conserven un elevado contenido en materia seca, hidratos de carbono, vitamina C y bajo contenido en nitratos, el aporte de N y el tiempo de almacenaje han de ser muy controlados. Con lo que respecta a los frutos de tomate, pimiento, sandía y melón verán reducidos el tamaño, su número y su color en plantas deficientes en este ion si las comparamos con plantas en las que se ha aplicado de forma óptima. Por ejemplo, en tomates, el elevado contenido en sólidos solubles y materia seca se produce con la aplicación de elevados niveles de él, obteniéndose un aumento de la producción total si los niveles de N aplicados son moderados (Papadopoulos y Khosla, 1993).

Por su parte, en patatas, el N aplicado afecta tanto a la producción como a la calidad. Así, afecta al tamaño, producción, gravedad específica y color en fresco del tubérculo, disminuyéndolo su contenido de hidratos de carbono y sobre todo de almidón, cuando las dosis son altas (Maier et al., 1994).

Los niveles de aplicación favorecen una buena relación entre el rendimiento comercial y la calidad del fruto en el cultivo de tomate. Dosis elevadas de N dieron como resultado una baja producción comercial y calidad, presentando los frutos gran concentración de NO_3^- y mínimos de Ca^{2+} , lo que afectó a su firmeza. Finalmente, las dosis bajas produjeron pobres rendimientos y pobre calidad comercial en tomate (Ruíz y Romero, 1998b).

Elevados contenidos de NO_3^- , en ciertas especies y en ciertos órganos, indican un desajuste entre aporte y demanda para el crecimiento. Estos contenidos en plantas, al ser cosechadas, no serían rentables en términos de eficacia del N y también serían indeseables nutricionalmente. Los NO_3^- se pueden formar a partir de NO_2^- durante el almacenamiento de los vegetales. Para eliminar los elevados contenidos de NO_3^- en la cosecha se han efectuado diversos procesos, como el ajuste del aporte de N durante el periodo de crecimiento, sustituyéndolos parcialmente por Cl^- o NH_4^+ , mejor control del N presente en la reserva del suelo y los fertilizantes y, en general, utilización del conocimiento metabólico de la acumulación de NO_3^- en planta (Alt y Stuwe, 1982).

En la mayoría de los vegetales la capacidad de almacenamiento y la calidad de los frutos se ve influida por el exceso de una fertilización nitrogenada. El alto contenido de NH_4^+ interfiere en la nutrición de otros nutrientes como el Ca^{2+} , causando pérdidas importantes en el almacenamiento por desórdenes fisiológicos o bien presentar antagonismos con K^+ y Ca^{2+} , lo cual provoca una mayor sensibilidad a enfermedades durante el periodo de poscosecha (Marschner, 1995).

2. OBJETIVOS

Dado el desarrollo tecnológico de la agricultura en el Sureste de España y la elevada aplicación de fertilizantes, se hace necesario evaluar el efecto de dicho fenómeno sobre la fisiología de la planta. Es preocupante la ausencia de amplia información sobre el efecto que tienen los nutrientes aplicados en exceso en el desarrollo de los sumideros fisiológicos (frutos y semillas). Por otra parte, es necesario realizar estudios más minuciosos en relación a la optimización en el uso de los fertilizantes, así como analizar como se ven afectados los procesos fisiológicos de la planta, con la finalidad de reducir la contaminación del medio ambiente, hacer más eficiente el uso de los fertilizantes, incrementar la productividad y calidad del cultivo. En base a lo antes mencionado se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la influencia de las distintas dosis de N sobre la producción y distribución de la biomasa en las plantas de judía.
- 2) Estudiar la respuesta de la aplicación de diferentes dosis de N sobre el metabolismo nitrogenado, así como su influencia sobre el metabolismo fosfórico y catiónico, indicadores fisiológicos y algunos metabolismos relacionados con el estrés.
- 3) Analizar el efecto de las distintas dosis de N sobre los parámetros de calidad en las plantas de judía y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, intentaremos definir que tratamientos son los más adecuados y beneficiosos para el cultivo de judía bajo las condiciones de nuestra experiencia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CONDICIONES AMBIENTALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike germinaron en una estufa a 28°C durante 48 h. Posteriormente se transfirieron a una cámara de cultivo donde crecieron en condiciones ambientales controladas, con una humedad relativa de 60-80%, temperatura 28/22°C (día/noche), su fotoperiodo fue de 16/8 h (día/noche) y una intensidad luminosa de 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas se desarrollaron en macetas individuales que tenían un volumen de 8 L y que se llenaron de material inerte (vermiculita).

Durante los primeros 20 días se les aplicó una solución nutritiva completa según Hoagland y Arnon (1950) pero adaptada a nuestras condiciones experimentales, y cuya composición fue:

Macronutrientes:

- 6 mM NH_4NO_3
- 1.6 mM K_2HPO_4
- 2.4 mM SO_4K_2
- 1.25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 1.4 mM MgSO_4

Micronutrientes:

- 5 μM Fe-EDDHA
- 2 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 1 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.25 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0.3 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 5 μM H_3BO_3

Siendo su pH 6.0 ± 0.1 .



Pasado dicho tiempo se aplicaron dosis diferenciadas de N en forma de NH_4NO_3 . Las dosis de cada tratamiento fueron: N_1 : 1.5 mM, N_2 : 3 mM, N_3 : 6 mM, N_4 : 12 mM, N_5 : 18 mM y N_6 : 24 mM.

La aplicación diferenciada de Nitrógeno se realizó a partir de los 20 días de su germinación y se aplicó durante 40 días.

El tratamiento óptimo correspondió a N_3 que fue coincidente sus dosis con la disolución nutritiva aportada en la primera fase del cultivo. Por otra parte los tratamientos con números inferiores a este tratamiento se corresponden con estados subcarentiales o muy carenciales, y los dígitos superiores con dosis tóxicas o muy tóxicas.

Las repeticiones, seis por tratamiento, fueron distribuidas al azar en la cámara de cultivo, y cada una de ellas tenía cuatro plantas.

3.2. RECOLECCIÓN

A los 40 días de la aplicación de los diferentes tratamientos, y en los 3 experimentos, se puso fin al cultivo puesto que este había alcanzado la madurez fisiológica.

Las diferentes plantas de las repeticiones correspondiente a un tratamiento fueron homogeneizadas y después subdivididas en dos grupos: uno fue destinado para el análisis de diversas enzimas y otros parámetros, y que denominamos como “material fresco”, mientras que el otro lo empleamos para determinar el peso fresco, peso seco y constituyentes iónicos y otros parámetros, y lo llamamos “material seco”.



3.3. ANÁLISIS DE LAS PLANTAS

3.3.1. MATERIAL SECO

3.3.1.1. Labor preparativa de la muestra

Una vez terminado el experimento se procedió de la forma siguiente con las plantas que se utilizan como material seco.

Los diferentes órganos aéreos de las plantas se pesaron (peso fresco), seguidamente se procedió a un proceso de descontaminación y para ello se limpiaron con un jabón no iónico y posteriormente se lavaron con abundante agua desionizada. Las raíces fueron lavadas en un medio ácido (1 N de HCl) durante 3 a 4 minutos y rápidamente enjuagadas en H₂O normal y tres veces en H₂O desionizada. A continuación se introdujeron en una estufa con corriente de aire a una temperatura de 70/80°C y hasta su total desecación (16/24 horas), para posteriormente proceder a pesar los diferentes órganos (peso seco). Finalmente, los órganos fueron molidos y guardados en bolsas de plástico para su posterior análisis.

3.3.1.2. MACRONUTRIENTES: TOTALES

3.3.1.2.1. Mineralización

Para la determinación de los nutrientes N orgánico, P, K, Ca y Mg, se tomó una cantidad de material seco y molido (0.1- 0.2 g) el cual fue sometido a un proceso de mineralización con H₂SO₄ 12 N y H₂O₂ al 30% libre de P, y a una temperatura comprendida entre los 275 y los 300°C. A partir del mineralizado resultante, y tras la adición de 20 ml de H₂O desionizada, se determinaron todos los nutrientes anteriormente citados (Ruiz, 1999).

3.3.1.2.2. Cuantificación

a) Nitrógeno orgánico

Fundamento:

El N orgánico se determinó por espectrofotometría de absorción molecular (colorimetría) y se basó en la reacción de Berthelot con ligeras modificaciones (Krom,

1980), en donde el N reacciona con un compuesto fenólico y un reactivo donador de Cl^- , a un pH elevado.

Reactivos:*- Reactivo A*

Disolver en H_2O desionizada 8.5 g de salicilato sódico [$\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$] y 0.06 g de nitroprusiato sódico [$\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$] y llevar a 100 ml con H_2O .

- Reactivo B

Disolver en H_2O desionizada 4 g de NaOH y 0.625 g de dicloroisocianurato-sódico [$\text{C}_3\text{Cl}_2\text{NaO}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$] y llevar a 100 ml con H_2O .

Procedimiento:

- 1) Poner en un tubo de ensayo 0.1 ml del mineralizado
- 2) Añadir 1 ml del reactivo A y 1 ml del reactivo B
- 3) Agitar y esperar 45 min.
- 4) Pasado ese tiempo proceder a su cuantificación por colorimetría a una longitud de onda de 630 nm, frente a una curva patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que estaba en iguales condiciones que las muestras problema.

La concentración de N orgánico se expresó como mg por g de peso seco.

b) Fósforo**Fundamento:**

Se usó el método colorimétrico del nitrovanadomolibdico (Hogue et al., 1970).

Reactivos:*- Reactivo de P*

En un vaso de precipitado disolver en 800 ml de H_2O desionizada caliente, casi en ebullición, 10 g de molibdato-amónico [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$], 0.5 g de vanadato-amónico [NH_4VO_3]. Seguidamente se añaden, ya en frío, 4 ml de HNO_3 , al principio gota a gota y con agitación continua. Posteriormente

se adicionan 134 ml de HNO₃. Enrasar con H₂O desionizada hasta un volumen final de 1 L.

Procedimiento:

- 1) Poner 0.1 ml del mineralizado en un tubo de ensayo.
- 2) Añadir 3.9 ml de H₂O desionizada.
- 3) Posteriormente se adicionaron 6 ml del reactivo de P.
- 4) Agitar y esperar 60 minutos.
- 5) Pasado ese tiempo se procedió a su lectura ($\lambda = 430$ nm) frente a una curva patrón de K₂HPO₄ que estaba en iguales condiciones que las muestras problema.

La concentración de P se expresó como mg por g de peso seco.

c) Potasio, Calcio y Magnesio

Fundamento:

Para el K se usó el método de fotometría de llama (Lachica et al., 1973); mientras que para Mg y Ca fueron cuantificados por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977).

Reactivos:

- *Soluciones de óxido de Lantano.*

Solución madre al 3%

Pesar 35.18 g de La₂O₃ y se agregan 60 ml de HCl concentrado, calentando suavemente hasta su disolución completa. Una vez fría la mezcla enrasar hasta 1 L con H₂O desionizada.

Solución de trabajo al 0.003%

Tomar 100 ml de la solución madre al 3% y ponerlos en un matraz aforado, añadir H₂O desionizada hasta completar un volumen final de 1 L, así obtendremos una solución de trabajo de óxido de lantano al 0.003%.

Procedimiento:

- 1) En un tubo de ensayo se puso 0.1 ml del mineralizado y se le añadió 10 ml de la solución de trabajo.

- 2) El Mg y Ca total fueron cuantificados directamente en la dilución anterior por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977).
- 3) El K se midió directamente en la disolución anterior por fotometría de llama (Lachica et al., 1973).
- 4) Las lecturas obtenidas se interpolaron frente a sus curvas patrón leídas bajo las mismas condiciones.

Las concentraciones de K, Ca y Mg fueron expresadas como mg por g de peso seco.

3.3.1.3. MACRONUTRIENTES: SOLUBLES

3.3.1.3.1. Extracción

Las formas solubles de: P, K, Ca y Mg, y del nitrógeno (NO_3^- y NH_4^+) se determinaron a partir de una extracción acuosa. Para ello se llevo a cabo por el método propuesto por Cataldo et al. (1975) con ligeras modificaciones adaptadas a nuestras condiciones. En un tubo de ensayo, herméticamente cerrado, se introdujeron 0.15 a 0.2 g de material seco y molido, añadiéndole 10 ml de H_2O desionizada. Seguidamente se procedió a una agitación vuelta-vuelta durante 120 min y transcurrido este tiempo se centrifugó a 772 g durante 10 min. Finalmente, el extracto obtenido fue filtrado (Whatman n° 4) y en él se cuantificaron las formas solubles de los macronutrientes: P inorgánico (Hogue et al., 1970), K soluble (Lachica et al., 1973), Ca inorgánico y Mg clorofílico (Hocking y Pate, 1977), NO_3^- (Cataldo et al., 1975) y NH_4^+ (Krom, 1980).

3.3.1.3.2. Cuantificación

a) Fósforo inorgánico

Fundamento:

En una alícuota del extracto se determina esta forma soluble por medio de la colorimetría (Hogue et al., 1970).

Reactivos:

Su descripción se encuentra en el apartado 3.3.1.2.2.

Procedimiento:

Se encuentra descrito en el apartado 3.3.1.2.2.

b) Potasio soluble

Fundamento:

Se basa en la espectrofotometría de llama y para ello se utiliza una alícuota del extracto (Lachica et al., 1973).

Reactivos:

Su descripción se encuentra en el apartado 3.3.1.2.2.

Procedimiento:

Se encuentra descrito en el apartado 3.3.1.2.2.

c) Calcio inorgánico y Magnesio clorofílico

Fundamento:

Ambos cationes se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977).

Reactivos:

Su descripción se encuentra en el apartado 3.3.1.2.2.

Procedimiento:

Se encuentra descrito en el apartado 3.3.1.2.2.

d) Amonio

Fundamento:

La cuantificación de ésta forma nitrogenada se basa en una reacción colorimétrica (Krom, 1980).

Reactivos:

Su descripción se encuentra en el apartado 3.3.1.2.2.

Procedimiento:

El protocolo seguido se encuentra ampliamente descrito en el apartado 3.3.1.2.2.

e) Nitratos

Fundamento:

Se basa en una reacción colorimétrica formada por la unión de los NO_3^- con el salicilato en un medio básico (Cataldo et al., 1975).

Reactivos:

A.- Solución de salicilato al 10%.

Disolver 10 g de ácido salicílico en 100 ml de ácido sulfúrico al 96%.

B.- Solución de NaOH 2N.

Pesar 80 g de NaOH y diluir en 1000 ml de H_2O destilada.

Procedimiento:

- 1) Poner en un tubo de ensayo 0.1 ml de alícuota del extracto.
- 2) Añadir 0.4 ml del reactivo A. Agitar.
- 3) Posteriormente, se adiciona 9.5 ml del reactivo B. Agitar.
- 4) Dejar reposar 5 minutos.
- 5) Pasado ese tiempo, se cuantificó la concentración de NO_3^- por colorimetría ($\lambda = 410 \text{ nm}$) frente a una curva patrón de KNO_3 que estaba en iguales condiciones que las muestras problema.

La concentración de NO_3^- se expresó como mg por g de peso seco.

3.3.1.4. Fracciones de fósforo

Algunos nutrientes (P, Ca y Mg) se encuentran en las plantas siempre en forma de radicales, bien como P, Ca o Mg inorgánicas, bien combinados con numerosos compuestos orgánicos o formando parte de estructuras del vegetal.

Con las muestras bien molidas y secas se procedió a realizar diferentes extracciones con distintos agentes químicos y su posterior valoración. Cada una de las extracciones libera la fracción fosforada que se encuentra en una estructura o compuesto determinado.

3.3.1.4.1. Órgano: raíz, tallo, pecíolo, hojas, vainas y semillas

Fundamento:

Se utilizó el método propuesto por Hogue et al. (1970), modificado por Carpena et al. (1973) y con las adaptaciones oportunas requeridas para nuestro material y cuyo proceso fue el siguiente.

Reactivos:

- *Ácido Perclórico 0.2 N.*
Tomar 21.75 ml de Ácido Perclórico al 60% y llevarlo a 1 L con agua desionizada.
- *Mezcla Etanol-Eter-Cloroformo (2-2-1).*
Mezclar 400 ml de etanol, 400 ml de éter-etílico y 200 ml de cloroformo y agitar hasta su completa disolución.
- *Hidróxido potásico 0.5 M.*
Pesar 33 g de KOH al 85% y disolverlos en 1 L de agua desionizada.
- *Ácido Perclórico al 5%.*
Tomar 83.3 ml de Ácido Perclórico al 60 % y llevarlos a 1 L con agua desionizada.
- *Reactivo del Fósforo.*
La obtención de este reactivo se encuentra descrita en el apartado 3.3.1.2.2.

Primera extracción:

- En un tubo de vidrio con cierre hermético se puso 0.2 g de material vegetal y 10 ml de HClO₄.
- Seguidamente se procedió a su agitación vuelta-vuelta durante 60 minutos.
- Pasado dicho tiempo se realizó una centrifugación de 3000 g durante 5 minutos.

- A continuación se tomo una alícuota del sobrenadante y se procedió a su cuantificación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1.2.2. De esta forma obtenemos la fracción denominada: **P-inorgánico**.
- Con otra alícuota del extracto (5 ml) se sometió a un proceso de desecación para a continuación mineralizar como se procedió en en el apartado 3.3.1.2.2. para el P total. Finalizada la mineralización se le añadió 10 ml de H₂O desionizada. Una alícuota del mineralizado es utilizada para determinar la fracción: **P-orgánico soluble**.

Segunda extracción:

- El residuo resultante de la primera extracción fue sometido a un proceso de desecación total en estufa de corriente de aire forzado.
- El residuo vegetal fue sometido a un proceso de extracción con etanol-éter-cloroformo (2-2-1) a 50°C durante 60 minutos.
- Pasado dicho tiempo se procedió a una centrifugación de 3000 g y durante 5 minutos.
- Una alícuota del extracto fue desecada y posteriormente mineralizado.
- Con otra alícuota del mineralizado resultante se determino la fracción: **P-lipídico**.

Tercera extracción:

- El residuo fue sometido a un proceso de desecación como en la extracción anterior.
- Al residuo seco se le añadió 10 ml de KOH 0.5 M y se agito vuelta-vuelta durante 17 horas.
- A continuación se centrifugo a 3000 g durante 5 minutos.
- Una alícuota se deseco y seguidamente se mineralizo como en las extracciones anteriores.
- Con una alícuota del mineralizado se determino el P que forma la fracción: **P de ARN**.

Cuarta extracción:

- El residuo fue sometido a un proceso de desecación.
- Al residuo seco se le añadieron 10 ml de HClO₄ al 5%, se agitó durante 60 minutos.
- Transcurrido dicho tiempo se procedió a una centrifugación de 3000 g y durante 5 minutos.
- Un volumen determinado se deseco y se mineralizo, como en las extracciones anteriores.
- Se tomo una alícuota del mineralizado y se cuantificó el P, obteniéndose la fracción: **P de ADN**.

Quinta extracción:

- El residuo final fue desecado en estufa a 100°C.
- Una vez bien desecado se le añadieron 5 ml de HSO₄ concentrado al residuo y se procedió a su digestión.
- Finalizada la digestión sulfúrica se adiciono 15 ml de agua desionizada.
- Con una alícuota del mineralizado se determinó la fracción: **P-proteico**.

Las distintas fracciones de P se expresaron como mg por g de peso seco.

3.3.1.5. Determinación de fitato

Fundamento:

Se basa en la extracción del fitato en un medio fuertemente ácido y la posterior formación del complejo fitato-Fe debido al alto contenido de Fe en forma de Sulfato Amónico Férrico presente en el medio de reacción y la posterior valoración con 2,2'-Bipiridina del Fe del sobrenadante. El proceso anterior fue descrito por Gaf y Dintzis (1982) y Haug y Lantzsch (1983) y adaptado a nuestro material vegetal.

Reactivos:

- *Medio de extracción (HCl 0.2 N):*

Disolver 16.2 ml de HCl en 1 L ml de H₂O desionizada, obteniéndose así una concentración de HCl 0.2 N (pH 3).

- *Solución férrica:*

- Disolver 162.66 ml HCl en 1000 ml de H₂O desionizada, posteriormente se toman 100 ml de esta disolución y en él se disuelven 0.2 g de sulfato de amonio férrico [FeH₄NO₈S₂·12H₂O], finalmente se enraza a 1 L con H₂O desionizada.

- *Solución de Bpiridina:*

Disolver 10 g de 2,2'-Bpiridina junto con 10 ml de ácido tioglicólico en 1 L de agua desionizada.

- *Solución madre de fitato:*

Pesar 0.15 g de fitato sódico y disolver en 100 ml de agua destilada.

- *Curvas de trabajo:*

Los puntos de la curva fueron preparados diluyendo la solución madre de fitato sódico con HCl en un rango de 3 a 30 µg ml⁻¹ (aproximadamente de 1.2 a 11.7 ml de la solución madre en 100 ml). La concentración HCl final en los puntos de la curva fue de 0.2 N.

Procedimiento:

- 1) En un tubo hermético se introdujo entre 0.1-0.2 g de semillas secas y molidas.
 - 2) Seguidamente se adiciono 10 ml de HCl 0.2 N y se agitaron durante 120 min.
 - 3) Posteriormente se filtro con papel Whatman N° 934-AH.
 - 4) En un tubo de ensayo se puso 1 ml del extracto y 2 ml de la solución férrica.
 - 5) A continuación se introdujeron los tubos de ensayo en un baño de agua hirviendo durante 30 min.
 - 6) Una vez pasado este tiempo se enfrían las muestras durante 15 min.
 - 7) Pasado dicho tiempo se centrifugaron a 3750 g durante 30 min.
 - 8) Tomamos 1 ml del sobrenadante y lo transferimos a otro tubo de ensayo y se le adicionó 1.5 ml de la solución de Bpiridina. Agitar vigorosamente.
 - 9) Finalmente, pasado 5 min se procedió a su lectura ($\lambda = 519$ nm) frente a una curva patrón de fitato que estaba en iguales condiciones que las muestras problemas. El color permanece estable durante 30 minutos.
- La concentración de fitato se expresó en g por g de peso seco.

3.3.1.6. Determinación de Amonios cuaternarios totales y colina

Fundamento:

Algunos compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (amonios cuaternarios) presentan un alto contenido en plantas cuando estas se encuentran en condiciones de estrés (Jolivet et al., 1982). Por ello su valoración se basa en un proceso inicial de extracción con un agente químico y su posterior cuantificación gracias al complejo formado por una sal yodada y los amonios cuaternarios, el cual reacciona con el elemento químico: 1,2-Dicloroetano dando una reacción colorimétrica fácilmente cuantificable. El método fue publicado por Grive y Gatton en 1983, y nosotros lo hemos adaptado a nuestro material vegetal.

Reactivos:

- H_2SO_4 2 N.
Disolver 19.61 ml de H_2SO_4 en 100 ml de agua desionizada.
- *Mezcla de reacción:*
Disolver 15.7 g de yodo y 20 g de KI en 100 ml de agua desionizada.
- *1,2-Dicloroetano (se utiliza puro).*
- *Tampon fosfato potásico (0.2 M, pH 6.8):*
Pesar 34.83 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y disolverlo en 1 L de agua desionizada y ajustar el pH a 6.8 con la dilución preparada con 27.21 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4).

Procedimiento de extracción:

- 1) Se pesaron entre 0.1000 y 0.2000 g de material vegetal molido y seco.
- 2) El material vegetal se introdujo en tubos de ensayo, que tenían tapón de rosca, y se le adiciono 10 ml de H_2O desionizada.
- 3) Las diferentes muestras fueron sometidas a un proceso de agitación vuelta-vuelta durante 24 horas.
- 4) Transcurrido dicho tiempo se procedió a su filtrado con papel Whatman n° 4.

Procedimiento de cuantificación

a) Amonios cuaternarios totales

- 1) A 1 ml del extracto obtenido se le añadió 1 ml de $\text{SO}_4\text{H} 2 \text{ N}$.
- 2) Seguidamente, se puso 0.5 ml de la dilución anterior en los tubos, de tapa, de centrifuga y se le añadieron 0.2 ml de la mezcla de reacción.
- 3) Se agitaron vigorosamente y se dejó reposar durante 16 horas a 4°C en oscuridad.
- 4) Posteriormente se procedió a centrifugar a 12360 g durante 15 minutos y a 0°C .
- 5) Finalizada la centrifugación se procedió a eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, quedando en el fondo unos pequeños cristales de color parduzco y con este residuo se prosiguió el proceso.
- 6) Al residuo se le adicionaron 9 ml de 1,2-Dicloroetano.
- 7) A continuación se taparon los tubos y se agitaron hasta lograr la resuspensión del residuo.
- 8) Finalmente se dejó reposar y pasado 2 h y 30 min se procedió a su lectura ($\lambda = 365 \text{ nm}$) frente a una curva de trabajo de betaína que se sometió a las mismas condiciones que las muestras problema.

b) Colina

- 1) Con el extracto obtenido (ver apartado 3.3.1.6.) se realizó una dilución (1-1) con un Tampón fosfato potásico (0.2 M, pH 6.8).
- 2) Los diferentes pasos realizados fueron similares que para los amonios cuaternarios totales (ver apartado 3.3.1.6.).
- 3) Pasado 2 horas y 30 minutos se procedió a su lectura ($\lambda = 365 \text{ nm}$) frente a una curva de trabajo de colina y que fue sometida a las mismas condiciones que las muestras problema.

La concentración de amonios cuaternarios totales se expresaron como μg de betaína por g de peso seco; y la de colina como μg de colina por g de peso seco.

3.3.2. MATERIAL FRESCO

Los procesos de maceración y centrifugación para la determinación de todas las actividades enzimáticas, así como para la determinación de las concentraciones de los distintos compuestos que se describen en este apartado, se realizaron a una temperatura comprendida entre 0 y 4°C. Por otro lado, todas las actividades enzimáticas se expresaron en mg de proteína g peso fresco⁻¹.

3.3.2.1. PARÁMETROS NO ENZIMÁTICOS

3.3.2.1.1. Pigmentos foliares

Fundamento:

El método utilizado se basa en la utilización de un agente químico que extrae los distintos pigmentos foliares y fue descrito por Wellburn (1994).

Reactivos:

- Metanol (CH_3OH) concentrado al 99.9 %

Procedimiento:

- 1) Se recolectaron discos foliares, libres de nervios de un diámetro de 7 mm correspondientes a un peso aproximado de 0.125 g y se colocaron en tubos de ensayo.
- 2) Seguidamente se adiciono 10 ml de metanol a cada tubo de ensayo y se dejo reposar durante 24 h en oscuridad.
- 3) Pasado este tiempo se procedió a la lectura a las longitudes de onda 666, 653, y 470. Se realizó un blanco que contenía exclusivamente metanol.

Las concentraciones de los pigmentos se expresaron como mg/100 g de peso fresco.

3.3.2.1.2. Proteínas y aminoácidos solubles

Fundamento:

Se basa en la reacción colorimétrica desarrollada por el Azul de Coomassie en el caso de las proteínas y el reactivo de ninhidrina para los aminoácidos. En el primer caso se basa en el método de Bradford (1976) y en el segundo en el de Yemm y Cocking (1955). Ambos métodos fueron adaptados a nuestras condiciones experimentales.

Reactivos:

- *Reactivo de ninhidrina.*

Que se prepara mezclando 50 ml de cloruro de estaño [$\text{Cl}_2\text{Sn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$] (80 mg de cloruro de estaño disueltos en 50 ml de Tampón citrato 200 mM pH 5), con 50 ml de ninhidrina (2 g de ninhidrina [$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$] disueltos en 50 ml de etilenglicol [$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$]).

- *Tampón citrato 200 mM pH 5.*

Pesar y disolver 59.41 g citrato sódico tribásico [$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$] en 1 L de H_2O desionizada; ajustar el pH con 38.81 g ácido cítrico anhidro [$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$] disueltos en 1 L de H_2O desionizada.

- *Propanol al 50%.*

En un matraz aforado de 200 ml mezclar convenientemente 100 ml de propanol [$\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$] con 100 ml de H_2O desionizada.

- *Tampón fosfato 50 mM pH 7.0.*

Disolver 6.80 g de K_2HPO_4 en 1 L de H_2O desionizada y mezclar con 8.709 g de KH_2PO_4 disueltos en 1 L de H_2O desionizada para ajustar a un pH 7.0.

- *Solución madre de glicina.*

Pesar 10 mg de glicina [$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$] y disolverlo en 50 ml de H_2O desionizada.

- *Azul de coomassie.*

En un vaso de precipitado poner unos 250 ml de H_2O desionizada, 50 ml de etanol del 96% [$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$], 100 ml de H_3PO_4 del 85% y 100 mg de azul de coomassie [$\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$], disolver completamente y añadir H_2O desionizada hasta obtener un volumen final de 1 L.

- *Solución madre de albúmina.*

Pesar 10 mg de albúmina y disolverlo en 50 ml de H_2O desionizada.

Procedimiento:

- 1) Se peso aproximadamente 0.5 g de material vegetal y se homogeneizo con 5 ml de Tampón fosfato 50 mM pH 7.0.
- 2) El homogenado se filtro con 4 capas de gasa y posteriormente se centrifugo a 12360 g durante 15 min.
- 3) El sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de los aminoácidos y proteínas solubles.

Cuantificación

a) Proteínas

- 1) Una alícuota de 0.1 ml del sobrenadante se puso en un tubo de ensayo.
- 2) Posteriormente se añadieron 0.9 ml de Tampón fosfato 50 mM pH 7.0.
- 3) Y 5 ml de azul de coomassie. Todo ello se agito energéticamente.
- 4) Transcurridos 20 min, las muestras se midieron una longitud de onda de 595 nm, frente a una curva patrón de albúmina.

b) Aminoácidos

- 1) En un tubo de ensayo se pusieron 0.1 ml del sobrenadante.
- 2) Seguidamente se adiciono 1.5 ml de reactivo de ninhidrina.
- 3) Esta mezcla se introdujo en un baño termostatzado a 100°C durante 20 min.
- 4) A continuación, y una vez enfriada la mezcla, se le añadió 8 ml de propanol al 50%.
- 5) Pasados 30 min se procedió a su lectura a una longitud de onda de 570 nm, frente a una curva patrón de glicina.

La concentración de aminoácidos y proteínas solubles se expresaron como mg por g de peso fresco.

3.3.2.1.3. Hidratos de carbono no estructurales y prolina

Fundamento:

Los carbohidratos no estructurales y la prolina se cuantificaron siguiendo el método de Irigoyen et al. (1992).

Reactivos:

- *Etanol al 96%.*
- *Etanol al 70%.*
- *Antrona:*
Se pesa 1g de Antrona y se disuelve en 100 ml de H₂SO₄ al 70%.
- *Tampón acetato 4 M pH 4.5*
Con 32.812 g de acetato sódico anhidro [C₂H₄OOHNa] disueltos en 100 ml de H₂O desionizada y se ajusta el pH hasta 4.5 con 22.83 ml ácido acético glacial [C₂H₃OOH] disueltos en 100 ml de H₂O desionizada.
- *α-glucoamilasa (amiloglucosidasa)*
Disolver 0.5 g en 100 ml de H₂O desionizada.
- *Ácido acético glacial al 99%.*
- *Benceno al 99%.*
- *Reactivo de Ninhidrina.*
Se pesa 6.25 g de ninhidrina y se disuelve en 100 ml de ácido fosfórico 6 M junto con 150 ml de ácido acético glacial al 60 %.

Procedimiento:

- 1) Una cantidad aproximada de 0.5 g de material vegetal fue homogeneizada inicialmente con 5 ml de etanol al 96% y posteriormente dos veces con 5 ml de etanol al 70%.
- 2) El homogeneizado fue centrifugado a 3740 g durante 10 min y el sobrenadante resultante se utilizó para las distintas determinaciones.

Cuantificación**a) Sacarosa, glucosa y fructosa.**

- 1) Se tomó un volumen de 0.1 ml y fue agregado en un tubo de ensayo.
- 2) Seguidamente se adicionó 3 ml de Antrona.
- 3) Y a continuación los tubos se introdujeron en un baño de agua a 100°C durante 10 min, transcurrido este tiempo, y una vez enfriados, se procedió a su lectura ($\lambda = 650$ nm), frente a las respectivas curvas patrones de sacarosa, glucosa y fructosa.

b) Almidón

Para su determinación se utilizó el residuo procedente de la centrifugación descrita anteriormente en el apartado 3.3.2.1.3 y tras su desecación, a 40°C durante 48 h se procedió a su cuantificación.

- 1) Al tubo de ensayo con el residuo seco se le añadió 2.5 ml de H₂O desionizada
- 2) Más 2.5 ml de Tampón acetato 4 M pH 4.5.
- 3) Finalmente 2.5 ml de α -glucoamilasa al 0.5% (p/v).
- 4) Se procedió, seguidamente a su resuspensión. Esta mezcla de reacción se incubó en oscuridad durante 48 h a 38°C.
- 5) Transcurrido ese tiempo la solución se filtró y se utilizó para determinar el almidón, siguiendo el procedimiento descrito para los otros hidratos de carbono no estructurales frente a una curva patrón de glucosa. El valor resultante se multiplicó por un factor.

Los hidratos de carbono no estructurales se expresaron como mg por g de peso fresco.

c) Cuantificación de la prolina

- 1) Del extracto resultante de los hidratos de carbono no estructurales (ver apartado 3.3.2.1.3), se tomó un volumen de 2 ml y se depositó en un tubo de ensayo.
- 2) A continuación se procedió a adicionar los siguientes reactivos: 2.5 ml de reactivo de ninhidrina, 2.5 ml de ácido acético glacial del 99% y 4 ml de agua desionizada. Se agitó energéticamente.
- 3) La mezcla resultante se introdujo en un baño de agua a 100°C durante 45 min.
- 4) Para posteriormente añadir 5 ml de benceno al 99%.
- 5) Pasados 15 min se procedió a la lectura de las muestras ($\lambda = 515$ nm) frente a una curva patrón de prolina.

Las concentraciones de prolina se expresaron como μ g por g de peso fresco.

3.3.2.2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

En este apartado se describe de forma pormenorizada los procesos de extracción y cuantificación de las diversas actividades enzimáticas utilizadas en esta investigación.

Por lo tanto, para no ser reiterativo en ciertas condiciones procedimentales con las enzimas se ha de resaltar que todas ellas fueron extraídas en condiciones ambientales de frío (0-4°C) y que su centrifugación fue igual.

Así mismo, para evitar valores diferenciales, entre ellas, se procedió a unificar el valor final de la actividad. Ello nos facilitó una mejor comprensión de los valores resultantes y una optimización en su estudio comparativo. La expresión para las diferentes actividades enzimáticas fue: mg de proteína · gmo peso fresco⁻¹ y según el valor de la transformación del substrato o producto inicial o final y en un tiempo de 60 minutos.

3.3.2.2.1. Nitrato Reductasa “*in vitro*” (NR, EC 1.6.6.1)

Fundamento:

La actividad de la NR transforma los NO₃⁻ en NO₂⁻ en un proceso de reducción que es lo que se cuantifica por medio de una reacción colorimétrica (Kaiser y Lewis, 1984; Singh y Srivastava, 1986).

Reactivos:

- *Tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7.5.*
Pesar 17.907 g de fosfato dipotásico (K₂HPO₄) y disolverlo en 1 L de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.5 con la dilución preparada con 13.609 g de fosfato monopotásico (KH₂PO₄) en 1 L de agua desionizada. Añadir 2.5 ml de propanol.
- *Nitrato potásico 100 mM.*
Disolver 1.01 g de nitrato potásico en 100 ml de agua desionizada.
- *Cisteína 10 mM.*
Pesar 0.121 g de cisteína y disolverlo en 100 ml de agua desionizada.
- *NADH 2 mM.*
Disolver 0.1418 g de NADH en 100 ml de agua desionizada.

- *Acetato de cinc 1M.*
Disolver 21.35 g de acetato de cinc en 100 ml de agua desionizada.
- *Sulfanilamida al 1%.*
Un g de sulfanilamida y 20 ml de HCl y se disuelven en 100 ml de agua desionizada.
- *NNEDA al 0.02%.*
Pesar 20 mg de NNEDA (N-1-naftil-etilendiamida) y se disuelve en 100 ml de HCl 0.2 N.

Procedimiento:

- 1) Se pesó entre 0.5 a 1.0 g, aproximadamente, según el material vegetal fresco y se homogeneizó en un medio tamponado de fosfato potásico 50 mM pH 7.5.
- 2) El homogenado resultante fue filtrado con 4 capas de gasa y centrifugado a 27800 g durante 20 min.
- 3) A cada tubo de ensayo se le agregó, en este orden, la siguiente mezcla de reacción:
 - a) 0.6 ml del Tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.5.
 - b) 0.2 ml de nitrato potásico 100 mM.
 - c) 0.2 ml de cisteína 10 mM.
 - d) 0.2 ml de NADH 2 mM.
 - e) 0.6 ml de extracto enzimático.
- 4) Las muestras fueron incubadas a 30°C en oscuridad durante 30 min.
- 5) Seguidamente la reacción fue parada por la adición de 0.1 ml de acetato de cinc 1M.
- 6) Y se agitaron vigorosamente los tubos
- 7) Posteriormente se centrifugaron a 500 g durante 15 min.
- 8) Del sobrenadante obtenido se tomó 0.5 ml de alícuota y se le añadió:
 - 1 ml de sulfanilamida al 1%.
 - 1 ml de NNEDA al 0.02%.
- 9) Y se agitaron los tubos de ensayo y pasados 20 min se procedió a su lectura ($\lambda = 540 \text{ nm}$) frente a una curva patrón de NO_2^- .

La actividad NR “*in vitro*” fue expresada como μmol de NO_2^- formados por mg proteínas por hora.

3.3.2.2.2. Nitrito Reductasa (NiR, EC 1.7.7.1.)

Fundamento:

La NiR su actividad se basa en la reducción de los NO_2^- a NH_4^+ y este producto final es el que se cuantifica por un procedimiento colorimétrico (Lillo, 1984).

Reactivos:

- *Nitrito potásico 20 mM.*
Disolver 0.170 g de nitrito potásico en 100 ml de agua desionizada.
- *Solución de ditionito sódico.*
Pesar 2.52 g de bicarbonato sódico (HCO_3Na) en 100 ml de agua desionizada. En dicha solución se disuelven 2.5 g de ditionito sódico.
- *Dimetil-viológeno 5 mM.*
Pesar 0.155 g de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dicloride en 100 ml de agua desionizada.
- *Sulfanilamida al 1%.*
Pesar 1 g de sulfanilamida y 20 ml de HCl y disolverlo en 100 ml de agua desionizada.
- *NNEDA al 0.02%.*
Se pesan 20 mg de NNEDA (N-1-naftil-etilendiamida) y se disuelven en 100 ml de HCl 0.2 N.

Procedimiento:

El procedimiento de extracción es igual para la NR (ver apartado 3.3.2.2.1).

a) *Muestra problema:* Agregar la siguiente mezcla de reacción:

- 1) 0.25 ml de Tampón de maceración.
- 2) 0.05 ml de nitrito potásico 20 mM.
- 3) 0.075 ml de ditionito sódico disuelto en bicarbonato sódico 0.3 M.
- 4) 0.075 ml de dimetil-viológeno (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dicloride) 5 mM.

5) 0.05 ml de extracto enzimático.

b) *Controles*: Agregar la siguiente mezcla de reacción:

- 1) 0.8 ml de Tampón de maceración.
- 2) 0.075 ml de ditionito sódico disuelto en bicarbonato sódico 0.3 M.
- 3) 0.075 ml de dimetil-viológeno (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dicloride) 5 mM.
- 4) 0.05 ml de extracto enzimático.

c) *Blanco*: Agregar la siguiente mezcla de reacción:

- 1) 1.35 ml de Tampón de maceración.
- 2) 0.075 ml de ditionito sódico disuelto en bicarbonato sódico 0.3 M.
- 3) 0.075 ml de dimetil-viológeno (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dicloride) 5 mM.

d) *Estándar*: Agregar la siguiente mezcla de reacción:

- 1) 0.8 ml de Tampón de maceración o extracción.
- 2) 0.05 ml de nitrito potásico 20 mM.
- 3) 0.075 ml de ditionito sódico disuelto en bicarbonato sódico 0.3 M.
- 4) 0.075 ml de dimetil-viológeno (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dicloride) 5 mM.

Una vez preparados todos, se incuban a 30°C durante 30 min en oscuridad. Tras la incubación los tubos son agitados vigorosamente de manera que el color azul inicial pasa a ser un color blanco lechoso. Posteriormente se añade a cada tubo 5 ml de agua desionizada y se determina la actividad NiR, para lo que se toma:

- 1) 0.5 ml de alícuota.
- 2) 1 ml de sulfanilamida al 1% disuelta en HCl 1.5 N.
- 3) 1 ml de NNEDA al 0.02%, disuelta en HCl 0.2 N.
- 4) Tras 20 minutos, se procede a la lectura de la absorbancia a 540 nm.

La actividad NiR fue expresada como $\mu\text{mol NO}_2^-$ transformados por mg de proteínas por hora.

3.3.2.2.3. *Glutamato sintasa (GOGAT, EC 1.4.1.14.) y Glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2.)*

Fundamento:

La GOGAT es la enzima que facilita la transferencia, dependiente de un aporte de poder reductor (NADH), del grupo amino desde la glutamina hasta el 2-oxoglutarato, obteniéndose dos moléculas de glutamato (Goat y Vance, 1981).



Mientras que la GDH es la responsable de catalizar la siguiente reacción:



En ambas reacciones se cuantifica el grado de oxidación del NADH presente en el medio de reacción.

Reactivos:

- *Tampón de maceración.*

Preparar un Tampón fosfato 50 mM pH 7.5 (disolver 6.8 g de K_2HPO_4 en 1 L de H_2O desionizada ajustando el pH con KH_2PO_4 : 8.709 g disueltos en 1 L de H_2O desionizada). Además el Tampón lleva disuelto los siguientes reactivos:

- a) *EDTA-Na 2 mM* [$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]: pesar 0.672 g de EDTA-Na y disolverlo en el tampón de fosfato 50 mM pH 7.5 previamente preparado.
- b) *Caseína soluble al 1.5%*: pesar 15 g de Caseína y disolverlo en la mezcla.
- c) *DTT 2 mM*: pesar 0.308 g de DTT y disolverlo en el tampón anterior
- d) *PVPP soluble al 1%*: pesar 1 g de PVPP y disolverlo en la mezcla anterior.

El Tampón de maceración se lleva a 1 L y con un pH final de 7.5.

- *Tampón de reacción.*

En el Tampón de maceración se le adiciona:

- a) *Mercaptoetanol al 0.1%*: disolver 1 ml de Mercaptoetanol [$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$] en 1 L de Tampón fosfato 50 mM pH 7.5.
- b) *EDTA-Na 1 mM*: pesar 0.372 g de EDTA-Na [$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] y añadirlos a la mezcla anterior.

- *2-oxoglutarato 18.75 mM.*
Pesar 0.274 g de 2-oxoglutarato [$C_5H_6O_5$] y disolverlos en 100 ml de H_2O desionizada.
- *Carboximetilhidroxilamino hemihidrocloride 15 mM.*
Se pesan 0.163 g de Carboximetilhidroxilamino hemihidrocloride [$C_2H_5NO_3 \cdot 5HCl$] y disolverlos en 100 ml de H_2O desionizada.
- *NADH 1.5 mM.*
Pesar 0.106 g de NADH [$C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}P_2$] y disolverlo en 100 ml de H_2O desionizada.
- *L-glutamina 75 mM.*
Pesar 1.096 g de L-glutamina y disolverlo en 100 ml de H_2O desionizada.
- *$SO_4(NH_4)_2$ 200 mM.*
Pesar 2.642 g de sulfato amónico y disolverlo en 100 ml de H_2O desionizada.
- *NADH 100 mM.*
0.0071 g de NADH se disuelven en 100 ml de H_2O desionizada.
- *2-oxoglutarato 2.5 mM.*
Pesar 0.0365 g de 2-oxoglutarato y disolverlo en 100 ml de H_2O desionizada.

Procedimiento general:

- 1) Entre 0.5 y 1 g de material vegetal fresco se homogeneizo en el Tampón de maceración.
- 2) El extracto resultante fue filtrado y centrifugado a 3100 g durante 5 min.
- 3) El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 27800 g durante 20 min, obteniéndose de esta manera el extracto enzimático utilizado para medir las actividades de las enzimas.
- 4) La actividad de dichas enzimas fue cuantificada espectrofotométricamente ($\lambda = 340$ nm), basándonos en la disminución de la absorbancia durante 3 min. Este cambio de absorbancia se debe al proceso de oxidación del NADH presente en el medio.

a) Ensayo con la enzima GOGAT:

El procedimiento, estricto, de adición en el tubo de reacción de los diferentes elementos fue:

- a) 0.75 ml de Tampón de reacción.
- b) 0.2 ml de 2-oxoglutarato 18.75 mM.
- c) 0.1 ml de amino-oxiacetato 15 mM .
- d) 0.1 ml de NADH 1.5 mM.
- e) 0.15 ml de extracto enzimático.
- f) 0.2 ml de L-glutamina 75 mM.

La L-glutamina es el último compuesto que se añade a la mezcla de reacción ya que es el que inicia la reacción enzimática.

Se hicieron dos controles, el primero sin 2-oxoglutarato y el segundo sin L-glutamina, con el fin de corregir la oxidación endógena del NADH.

b) Ensayo con la enzima GDH:

En un tubo de ensayo se puso la mezcla de reacción que consistía, en el siguiente orden, de estos compuestos:

- a) 0.75 ml de Tampón de reacción.
- b) 0.2 ml de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 200 mM.
- c) 0.15 ml de NADH 100 mM.
- d) 0.15 ml de extracto enzimático.
- e) 0.2 ml de 2-oxoglutarato 2.5 mM.

Al igual que en el caso anterior, el 2-oxoglutarato se adiciona al último ya que inicia la reacción.

Se hicieron dos controles, el primero sin $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y el segundo sin 2-oxoglutarato, con el fin de corregir la oxidación endógena del NADH.

Las actividades GOGAT y GDH se expresaron como μmol NADH oxidados por mg proteína y hora.

3.3.2.2.4. Glutamina Sintetasa (GS, EC 6.3.1.2.)

Fundamento:

La actividad de la GS cataliza la conversión del aminoácido, glutamato, hacia la amida, glutamina, en este proceso hay liberación de fósforo inorgánico en el medio de reacción el cual se determina colorimetricamente usando el método del “Verde Malaquita” (Geladopoulos et al., 1991).



Reactivos:

- *Tampón HEPES 0.2 M pH 7.9.*
Disolver 13.015 g de Hepes-Na [C₈H₁₂N₂NaO₉S] en 250 ml H₂O desionizada y ajustar el pH con ácido HCl de la misma molaridad.
- *MgCl₂ 50 mM.*
Pesar y disolver 1.016 g de MgCl₂ en 100 ml de H₂O desionizada.
- *EDTA-Na 5 mM.*
Se peso 0.186 g de EDTa-Na [C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O] y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.
- *Glutamato potásico 100 mM.*
En un vaso de precipitado disolver 1.8714 g de Glutamato potásico [C₅H₈NKO₄·H₂O] en 100 ml de H₂O desionizada.
- *Acetato amónico 50 mM.*
Pesar 0.385 g de Acetato amónico [C₂H₇NO₂] y disolverlo en 100 ml de H₂O desionizada.
- *ATP 8 mM.*
Se pesa 0.405 g de ATP [C₁₀H₁₄N₅Na₂O₁₃P₃] en 100 ml de H₂O desionizada.
- *H₂SO₄ 1 N.*
Un volumen de 26.48 ml de ácido se puso en un matraz aforado de 1 L y se llevo a un volumen final de 1000 ml de H₂O desionizada.
- *Reactivo “Verde Malaquita”.*
Se preparó disolviendo 0.44 g de dicho colorante [C₂₅H₂₆N₂O₄] en 60 ml de H₂SO₄ y 300 ml de H₂O desionizada. Posteriormente se tomaron 20 ml

de este reactivo al que se le añadieron:

- a) 0.5 ml de *Molibdato amónico al 3%*: 3 g de Molibdato amónico $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ en 100 ml de H_2O desionizada.
 - b) Y 0.5 ml de *Tween 20 al 11%*: 2.75 ml en 25 ml de H_2O desionizada.
- *Citrato trisódico 1.3 M*
Disolver 4.779 g de Citrato trisódico $[\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ en 25 ml de H_2O desionizada.

Procedimiento:

- 1) Se pesó entre 0.5 y 1 g de material vegetal fresco y se homogeneizó con 5 ml de Tampón HEPES 0.2 M pH 7.9.
- 2) El homogeneizado se centrifugó a 31650 g durante 20 min, y el sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la actividad de la enzima.
- 3) Seguidamente en un tubo de ensayo se le adiciono la siguiente mezcla de reacción:
 - a) 0.6 ml de MgCl_2 50 mM.
 - b) 0.2 ml de EDTA-Na 5 mM.
 - c) 0.4 ml de glutamato potásico 100 mM.
 - d) 0.15 ml acetato amónico 50 mM.
 - e) 0.4 ml de extracto enzimático.
 - f) 0.25 ml de ATP 8 mM.
- 4) Lo anterior con un volumen final de 2 ml, fue incubado en presencia de luz y en un baño termostatizado a 30°C durante 15 min.
- 5) Se detuvo la reacción enzimática por la adición de 0.25 ml de H_2SO_4 1 N.
- 6) Posteriormente se procedió a una segunda centrifugación de 15000 g durante 2 minutos y del sobrenadante resultante se tomaron 0.05 ml para cuantificar el P_i procedente de la reacción enzimática.
- 7) A los 0.05 ml de alícuota se le añadieron 0.25 ml del Verde Malaquita.
- 8) A los 2 minutos después se añadieron 0.05 ml de citrato trisódico 1.3 M para evitar una sobreestimación del P_i resultante de la hidrólisis del ATP, provocada por la acidez del colorante.
- 9) Pasados 15 minutos se midieron las muestras ($\lambda = 630$ nm) frente a una curva patrón de fósforo.

La actividad GS se expresó como $\mu\text{mol P}_i$ por mg proteína por hora.

3.3.2.2.5. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31)

Fundamento:

La enzima PEPC (EC 4.1.1.31) es una enzima esencial en el suministro de la estructura carbonada, derivada del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que es utilizada en la síntesis de glutamato y aspartato y de sus amidas. La actividad PEPC fue ensayada espectrofotométricamente cuantificando el grado de oxidación del NADH presente en el medio de reacción (Ocaña et al., 1996).

Reactivos:

- *Tampón Maleico-KOH 100 mM pH 6.8.*
Disolver 1.160 g de Maleico en 100 ml H₂O desionizada y ajustar el pH con una solución de KOH 100 mM (pesar 5.611 g de KOH y disolver en 1 L de H₂O desionizada).
- *Sacarosa 100 mM.*
Pesarse y disolver 6.846 g de Sacarosa en 200 ml del Tampón Maleico-KOH 100 mM pH 6.8.
- *β -Mercaptoetanol al 2%.*
Pesarse 4 ml de β -Mercaptoetanol y disolverlo en 200 ml del Tampón Maleico-KOH 100 mM pH 6.8.
- *Etilenglicol 20%.*
Disolver 40 ml de Etilenglicol en los mismos 200 ml del Tampón Maleico-KOH 100 mM pH 6.8.
- *Tampón Bicina-KOH 0.1 mM pH 8.5.*
Disolver 4.0795 g de Bicina en 250 ml H₂O desionizada y ajustar el pH con una solución de KOH 0.1 mM (pesar 0.0056 g de KOH y disolver en 100 ml de H₂O desionizada).
- *NaHCO₃ 10 mM.*
Pesarse y disolver 0.168 g de NaHCO₃ en 200 ml del Tampón Bicina-KOH 0.1 mM pH 8.5.

- *MgCl₂ 5 mM.*

Pesar 0.197 g de MgCl₂ y disolverlo en 200 ml del Tampón Bicina-KOH 0.1 mM pH 8.5.

- *NADH 0.2 mM.*

Disolver 0.0283 g de NADH en los mismos 200 ml del Tampón Bicina-KOH 0.1 mM pH 8.5.

- *PEP 2 mM.*

Pesar 0.0824 g de PEP y disolverlo en 200 ml de Tampón Bicina-KOH 0.1 mM pH 8.5.

Procedimiento:

- 1) Una cantidad comprendida entre 0.25 y 0.5 g de material vegetal fresco fue homogeneizado con 5 ml de Tampón maleico-KOH 100 mM pH 6.8.
- 2) El homogenado se centrifugó a 2500 g durante 5 min.
- 3) Seguidamente se deshecha el residuo y el sobrenadante es centrifugado de nuevo a 31650 g durante 20 min.
- 4) En el tubo de ensayo se agrega 0.975 ml de la mezcla de reacción (Tampón bicina-KOH 0.1 M pH 8.5).
- 5) A continuación se adiciona 0.025 ml de extracto enzimático y se inicia la reacción.
- 6) Finalmente, se determinó la variación de absorbancia ($\lambda = 340$ nm) durante 3 min.

La actividad PEPC se expresó como μmol de NADH oxidados por mg proteína por hora.

3.3.2.2.6. Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS, EC 2.4.1.14)

Fundamento:

La actividad sacarosa fosfato sintasa es definida como la etapa limitante y clave en la regulación de la ruta fotosintética de la producción de sacarosa, por lo que la formación de este producto fue cuantificado colorimétricamente por el método de la Antrona frente a una curva de sacarosa (Irigoyen et al., 1992).

Reactivos:

- *Tampón HEPES-HCl 50 mM pH 7.5.*
Disolver 1.301 g de HEPES-Na [C₈H₁₂N₂NaO₉S] en 100 ml de H₂O desionizada y ajustar el pH con HCl a la misma molaridad.
- *MgCl₂ 0.5 mM.*
Pesar y disolver 0.1016 g de MgCl₂ en 100 ml de H₂O desionizada.
- *EDTA-Na 1 mM.*
Pesar 0.0372 g de EDTA-Na [C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O] y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.
- *DTT 2.5 mM.*
En un matraz aforado disolver 0.0385 g de DTT en 100 ml de H₂O desionizada.
- *Albúmina de suero de bovino (BSA) 0.5 mg/ml.*
Pesar 50 mg de BSA en 100 ml de H₂O desionizada.
- *Triton X-100 al 0.05 %.*
0.05 ml de Triton X-100 se disuelven en 100 ml de H₂O desionizada.
- *KOH al 30%.*
Pesar 34.84 g de KOH y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.
- *MgCl₂ 15 mM.*
Pesar y disolver 0.304 g MgCl₂ en 100 ml de H₂O desionizada.
- *D-Fructosa-6-fosfato 25 mM.*
Pesar y disolver 0.85 g de D-fructosa-6-fosfato [C₆H₁₁Na₂O₉P·2H₂O] en 100 ml de H₂O desionizada.
- *D-Glucosa-6-fosfato 25 mM.*
Pesar 0.705 g de D-glucosa-6-fosfato [C₆H₁₁Na₂O₉P·2H₂O] y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.
- *Uridina-5'-difosfo-glucosa (UDP-glucosa) 25 mM.*
En un vaso de precipitado disolver 1.525 g de UDP-glucosa [C₁₅H₂₂N₂Na₂O₁₇P₂] en 100 ml de H₂O desionizada.
- *Reactivo de Antrona.*
Se disolvieron 300 mg de Antrona en 300 ml de H₂SO₄ al 70%.

Procedimiento:

- 1) Se pesó entre 0.5-1.0 g de material vegetal fresco, se homogeneizó con 5 ml de Tampón HEPPEs-HCl 50 mM pH 7.5 el cual contenía MgCl₂ 0.5 mM, EDTA-Na 1 mM, DTT 2.5 mM, BSA 0.5 mg/ml y Triton X-100 al 0.05%.
- 2) El homogenado fue centrifugado a 16350 g durante 10 min, y el sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la actividad de la enzima.
- 3) La mezcla de reacción contenía los siguientes compuestos añadidos, en un tubo de ensayo, en el siguiente orden:
 - a) 0.1 ml de Tampón HEPPEs-HCl pH 7.5 50 mM.
 - b) 0.1 ml de MgCl₂ 15 mM.
 - c) 0.1 ml de D-Fructosa-6-fosfato 25 mM.
 - d) 0.1 ml de D-Glucosa-6-fosfato 25 mM.
 - e) 0.1 ml de UDP-glucosa 25 mM.
 - f) 0.4 ml de extracto.
- 4) La mezcla de reacción, con un volumen final de 0.9 ml fue incubada durante 30 min a 37°C. Parando la reacción por la adición de 0.1 ml de KOH al 30%.
- 5) Seguidamente se agitaron las muestras y se tomaron 0.025 ml de la mezcla de reacción y se le adicionaron 3 ml del Reactivo de Antrona, con el fin de cuantificar la actividad de la enzima.
- 6) Posteriormente se introdujeron las muestras en un baño de agua caliente a 100 °C durante 10 min.
- 7) Rápidamente se procedió a parar la reacción por enfriamiento de las muestras y se procedió a medirlas a una longitud de onda de 650 nm, y frente a una curva patrón de sacarosa.

La actividad enzimática Sacarosa fosfato sintasa fue expresada como μM de sacarosa por mg de proteína por hora.

3.3.2.2.7. Sacarosa Sintetasa (SS, EC 2.4.1.13)

Fundamento:

La actividad de la Sacarosa Sintetasa cataliza la reacción reversible: sacarosa + UDP originando UDP-glucosa y fructosa, estos productos finales fueron cuantificados colorimetricamente en el medio de reacción por el método de la Antrona frente a una curva patrón de sacarosa (Irigoyen et al., 1992).

**Reactivos:**

Los reactivos utilizados para esta enzima son los mismos que los descritos para la Sacarosa fosfato sintasa (ver apartado 3.3.2.2.6).

Procedimiento:

La actividad enzimática sacarosa sintetasa fue ensayada de la misma manera que la actividad enzimática SPS con las siguientes excepciones:

- 1) Substituir la D-fructosa-6-fosfato por D-fructosa [C₆H₁₂O₆] 25 mM.
- 2) No adicionar la D-glucosa-6-fosfato 25 mM.

La actividad enzimática sacarosa sintetasa fue expresada como μmol de sacarosa por mg de proteína y hora.

3.3.2.2.8. Fructosa 1,6-Bifosfatasa (F1,6Bpasa, EC 3.1.3.11)

Fundamento:

La actividad Fructosa 1,6-Bifosfatasa es definida como la etapa limitante y clave en la regulación de la ruta fotosintética de la producción de sacarosa, por lo que la formación de este producto fue cuantificado colorimétricamente por la liberación de fósforo inorgánico en el medio de reacción usando el método del “Verde Malaquita” (Geladopoulos et al., 1991).

Reactivos:

- *Ácido tricloroacético al 30 %.*
Pesar 30 g de Ácido tricloroacético y diluirlo en 100 ml de H₂O desionizada.
- *NaF 10 mM.*
Disolver 0.042 g de NaF en 100 ml de H₂O desionizada.
- *Reactivo del Verde Malaquita.*
Se preparó disolviendo 0.44 g de dicho colorante [C₂₅H₂₆N₂O₄] en 60 ml de H₂SO₄ y 300 ml de H₂O desionizada. Posteriormente se tomaron 20 ml de este reactivo al que se le añadieron:
 - a) Un volumen de 0.5 ml de *Molibdato amónico al 3%*: 3 g de Molibdato amónico [(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O] en 100 ml de H₂O desionizada.
 - b) Y 0.5 ml de *Tween 20 al 11%*: 2.75 ml en 25 ml de H₂O desionizada.
- *Citrato trisódico 1.3 M*
Disolver 4.779 g de Citrato trisódico [Na₃C₆H₅O₇·2H₂O] en 25 ml de H₂O desionizada.

Procedimiento:

- 1) Se utilizó el mismo extracto de maceración utilizado para la Sacarosa fosfato sintasa (ver apartado 3.3.2.2.6). La mezcla de reacción contenía los diferentes compuestos añadidos en el siguiente orden:
 - a) 0.01 ml de extracto.
 - b) 0.6 ml de Tampón HEPPEs-HCl 50 mM pH 7.5.
 - c) 0.1 ml de MgCl₂ 5 mM
 - d) 0.1 ml de Mercaptoethanol 10 mM
 - e) 0.1 ml de NaF 10 mM
 - f) 0.1 ml de D-fructosa-1,6-bifosfato (F1,6BP) [C₆H₁₁Na₃O₁₂P₂·8H₂O] 0.25 mM.
- 2) Paralelamente se llevo a cabo el mismo procedimiento pero con la excepción de que no se añadió MgCl₂. En ambos casos se realizó un blanco que contenía todos los reactivos a excepción del extracto, el cual fue substituido por el Tampón HEPPEs-HCl.
- 3) La mezcla de reacción, con un volumen final de 1.1 ml, fue incubada en oscuridad a 25°C durante 20 min.

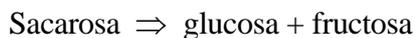
- 4) Posteriormente se paro la reacción con la adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 30%.
- 5) Luego se cuantificó la cantidad de P_i liberado siguiendo el método del “Verde Malaquita” (ver procedimiento de la actividad enzimática Glutamina Sintetasa, en el apartado 3.3.2.2.4).
- 6) Pasados 15 minutos se procedió a medir las muestras a una longitud de onda de 630 nm frente a una curva patrón de fósforo.

La actividad enzimática F1,6-BPasa fue reportada como μM de P_i por mg de proteína por hora.

3.3.2.2.9. *Invertasa Ácida (EC 3.2.1.26) e Invertasa Alcalina (EC 3.2.1.27)*

Fundamento:

Las actividades de las invertasas catalizan la reacción hidrolítica de la sacarosa originando glucosa y fructosa, por lo que estos azúcares reductores producidos en el medio de reacción fueron cuantificados colorimétricamente usando el ácido dinitrosalicílico ante una curva patrón de glucosa (Miller, 1959).



Reactivos:

- *Tampón fosfato-potásico 0.2 M pH 7.0.*
Disolver 17.418 g de K_2HPO_4 en 500 ml de H_2O desionizada ajustando el pH con KH_2PO_4 : 13.609 g disueltos en 500 ml de H_2O desionizada. Además el Tampón lleva disuelto 0.692 ml de 2-Mercaptoethanol para dar una concentración de 20 mM y se completa con el propio Tampón fosfato hasta un volumen final de 500 ml.
- *Tampón acetato sódico 0.1 M pH 4.5 0.1 M.*
Disolver 6.804 g de acetato sódico en H_2O en 500 ml de H_2O desionizada y ajustar el pH con HCl 0.1 M.
- *D (+)-Sacarosa 0.75 M.*
Pesar y disolver 64.18 g Sacarosa [$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$] en 250 ml de H_2O desionizada.

- *Solución de ácido dinitrosalicílico.*
Disolver 1 g de 3,5-ácido dinitrosalicílico [$C_7H_4N_2O_7$], junto con 0.2 g fenol, 0.05 g de sulfito sódico y 1.0 g de hidróxido sódico en 100 ml de H_2O desionizada. Preparar en el momento.
- *Solución de Sal de Rochelle al 40 %.*
Pesar 40 g de Potasio sódico tartrato tetrahidratado [$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$] en 100 ml de H_2O desionizada.
- *Tampón Citrato sódico 0.1 M pH 7.0.*
Disolver 8.709 g de K_2HPO_4 en 500 ml H_2O desionizada y ajustar el pH con Citrato sódico 0.1M (pesar 10.705 g de Citrato sódico en 500 ml de H_2O desionizada).

Procedimiento:**a) Invertasa ácida.**

- 1) Se pesó entre 0.5-1.0 g de material vegetal fresco y se homogeneizó con 5 ml de Tampón fosfato-potásico 0.2 M pH 7.0.
- 2) El homogenado fue filtrado y posteriormente centrifugado a 35750 g durante 15 min, y el sobrenadante obtenido se utilizó para determinar las actividades enzimáticas.
- 3) La mezcla de reacción contenía los diferentes compuestos añadidos en un tubo de ensayo y en el siguiente orden:
 - a) 0.2 ml de extracto.
 - b) 0.6 ml de acetato sódico 0.1 M pH 4.5.
 - c) 0.2 ml de sacarosa 0.75 M.
- 4) Esta mezcla, fue incubada en la estufa durante 30 min a 37°C.
- 5) La incubación finalizó por la adición de 1.0 ml de la solución de ácido dinitrosalicílico.
- 6) Se agitan las muestras y se incuban nuevamente durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo.
- 7) Posteriormente se produce un rápido enfriamiento.
- 8) Seguidamente se agrega 1 ml de la solución de sal de Rochelle a las muestras. Una vez frías, se mide colorimétricamente ($\lambda = 575$ nm) frente a una curva de glucosa.

La actividad Invertasa ácida fue expresada como μM de glucosa por mg de proteína por hora.

b) Invertasa Alcalina.

El procedimiento seguido para esta enzima fue similar al de la Invertasa Ácida, con la única salvedad de que se substituyó el Acetato sódico 0.1 M pH 4.5 por el citrato-sódico-fosfato 0.1 M pH 7.0, los demás pasos fueron iguales.

La actividad Invertasa alcalina fue expresada como μM de glucosa por mg de proteína y hora.

3.3.2.2.10. Fosfatasa ácida (AFA, EC 3.1.3.2)

Fundamento:

La actividad Fosfatasa Ácida cataliza la hidrólisis de los esteres fosfato, por lo que su cuantificación se basó en la hidrólisis del 4-nitrofenol fosfato disódico (p-NPP) que pasa a ser p-Nitrofenil-fosfato en el medio de reacción, siendo esto último cuantificado colorimetricamente (Besford, 1979).

Reactivos:

- *Tampón acetato sódico-ácido acético 0.1 M pH 5.8.*

Pesar 13.87 g de acetato sódico ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y disolverlo en 1 L de H_2O desionizada. Ajustar el pH a 5.8 con una solución que contiene 5.98 ml de ácido acético glacial (CH_3COOH) en 1 L de H_2O desionizada.

- *Hidróxido sódico 0.2 N.*

Pesar 8 g de NaOH en 1 L de H_2O desionizada.

- *4-nitrofenol fosfato disódico (p-NPP) 2 μM .*

Se pesa 0.526 g de 4-nitrofenil fosfato disódico [$\text{C}_6\text{H}_4\text{NNa}_2\text{O}_6\text{P}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$] y se disuelve en 100 ml de Tampón acetato sódico-ácido acético 0.1 M pH 5.8. Este reactivo se prepara el mismo día que se vayan a realizar las mediciones de la actividad enzimática.

Procedimiento:

- 1) Pesar aproximadamente 0.25 g de material vegetal fresco y homogeneizarlo con 10 ml de Tampón acetato sódico-ácido acético 0.1 M pH 5.8.
- 2) El homogenado fue filtrado con 4 capas de gasa y centrifugado a 27800 g durante 12 min.
- 3) El sobrenadante se utiliza para el ensayo de la actividad de la enzima.
- 4) En un tubo de ensayo se agrega la mezcla de reacción que consiste en:
 - a) 0.2 ml de extracto.
 - b) 0.3 ml de H₂O desionizada.
 - c) 0.5 ml de Tampón acetato sódico-ácido acético 0.1 M pH 5.8.
 - d) 1 ml de p-NPP 2 µM.
- 2) Para cada una de las muestras se realiza un control que contiene además 8 ml de NaOH 0.2 N. Así mismo, se prepara un blanco que contiene: 8 ml de NaOH, 0.5 ml de H₂O desionizada, 0.5 ml de tampon acetato sódico-ácido acético 0.1 M pH 5.8 y 1 ml de p-NPP; y sigue el mismo procedimiento que los controles.
- 3) Los controles, las muestras y el blanco se incuban en oscuridad a 30°C durante 25 min.
- 4) Pasado ese tiempo, se añaden 8 ml de NaOH 0.2 N a las muestras y se agita.
- 5) Pasado 10 minutos se procede a la lectura de las muestras y controles a una longitud de onda de 405 nm.

La actividad AFA se expresó en µmol de p-NPP hidrolizados por mg proteína por hora.

3.3.2.2.11. Piruvato Kinasa (PK, EC 2.7.1.40)

Fundamento:

La actividad Piruvato Kinasa cataliza la síntesis de Piruvato y ATP a partir del PEP y el ADP, por lo que su ensayo fue determinado a través de formación de pirúvico en el medio de reacción frente a una curva patrón de ácido pirúvico (Singh y Srivastava, 1986).

Reactivos:*- Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.5.*

Disolver 3.027 g de Tris ($C_4H_{11}NO_3$) en 500 ml de H_2O desionizada y ajustar el pH a 7.5 con una disolución de HCl 0.05 M. Se toman 250 ml del Tampón Tris-HCl (0.05 M, pH 7.5), y se disuelven en él 0.35 ml de 2-mercaptoetanol 10 mM y se le añaden 250 ml de glicerol al 50%.

- Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.4.

Disolver 3.027 g de Tris ($C_4H_{11}NO_3$) en 500 ml de H_2O desionizada y ajustar el pH a 7.4 con una disolución de HCl 0.05 M. Disolver 0.03 g de molibdato sódico ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) en 500 ml de Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.4.

- Fosfoenolpiruvato monosódico (PEP) 2.5 mM.

Disolver 0.051 g de PEP ($C_3H_4NaO_6P \cdot H_2O$) en 100 ml de H_2O desionizada.

- Adenosina 5'-difosfato 5 mM.

Disolver 0.235 g de adenosina 5'-difosfato ($C_{10}H_{13}N_5Na_2O_{10}P_2$) en 100 ml de H_2O desionizada.

- Ácido clorhídrico 2 N.

En un matraz de 1 L se pone 400 ml de H_2O desionizada y se añade 176.5 ml de HCl al 35% y se lleva a 1 L con H_2O desionizada.

- 2,4-Dinitrofenil-hidrazina al 0.0125%.

Pesar 0.125 g de 2,4-Dinitrofenil-hidrazina ($C_6H_6H_4O_4$) en 1 L de HCl 2 N previamente preparado.

- Hidróxido sódico 2 N.

Pesar 80 g de NaOH y disolverlo en 1 L de H_2O desionizada.

- Sulfato magnésico 50 mM.

Disolver 6.91 g de Sulfato magnésico ($MgSO_4$) en 1 L de H_2O desionizada.

- Cloruro potásico 50 mM.

Pesar 3.728 g de KCl y disolverlo en 1 L de H_2O desionizada.

- Cloruro de calcio 50 mM.

Disolver 1.470 g de $CaCl_2$ y disolverlo en 100 ml de H_2O desionizada.

Procedimiento:

- 1) Pesar aproximadamente 0.25 g de material vegetal fresco y homogeneizarlo con 5 ml de Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.5.

- 2) El homogenado se filtro con 4 capas de gasa y se centrifugo a 3100 g durante 5 min, se aparta el sobrenadante y se centrifuga a 27800 g durante 15 min.
- 3) El sobrenadante obtenido se utilizó para medir la actividad de la enzima PK endógena, y la actividad PK en presencia de los cationes Mg (PK-Mg), K (PK-K) y Ca (PK-Ca).

a) Cuantificación de PK endógena

Se adicionaron en un tubo de ensayo los siguientes reactivos:

- 1) 0.7 ml de Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.4.
- 2) 0.1 ml de PEP 2.5 mM.
- 3) 0.1 ml de ADP 5 mM.
- 4) 0.1 ml de extracto enzimático.

b) Cuantificación de PK en presencia de Mg (PK-Mg)

Se adicionaron en un tubo de ensayo los siguientes reactivos:

- 1) 0.6 ml de Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.4.
- 2) 0.1 ml de PEP 2.5 mM.
- 3) 0.1 ml de ADP 5 mM.
- 4) 0.1 ml de MgSO₄ 50 mM.
- 5) 0.1 ml de extracto enzimático.

c) Cuantificación de PK en presencia de K (PK-K)

Se adicionaron en un tubo de ensayo los siguientes reactivos:

- 1) 0.6 ml de Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.4.
- 2) 0.1 ml de PEP 2.5 mM.
- 3) 0.1 ml de ADP 5 mM.
- 4) 0.1 ml de KCl 50 mM.
- 5) 0.1 ml de extracto enzimático.

d) Cuantificación de PK en presencia de Ca (PK-Ca)

Se adicionaron en un tubo de ensayo los siguientes reactivos:

- 1) 0.6 ml de Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.4.
- 2) 0.1 ml de PEP 2.5 mM.

- 3) 0.1 ml de ADP 5 mM.
- 4) 0.1 ml de CaCl₂ 50 mM.
- 5) 0.1 ml de extracto enzimático.

La determinación de la actividad de cada una de las enzimas sigue el mismo proceso que se describe a continuación:

- 1) Los tubos se incubaron a 37°C en oscuridad durante 10 min.
- 2) Se detiene la reacción con la adición de 1 ml de 2,4-dinitrofenil-hidrazina al 0.0125%.
- 3) Se vuelven a incubar las muestras a 37°C en oscuridad durante 15 min.
- 4) Posteriormente se añaden 2 ml de NaOH 2N y los tubos se agitan vigorosamente.
- 5) Se preparan 4 blancos para cada una de las enzimas en donde el extracto es sustituido por Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.5. Además, a estos blancos no se les agrega ADP, ni PEP, ni extracto enzimático; siendo éstos sustituidos por 0.3 ml de Tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.5.
- 6) Finalmente, se procede a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 510 nm frente a una curva patrón de ácido pirúvico que fue sometida a igual procedimiento que las muestras problema.

La actividad de las distintas formas de PK se expresaron como nmol de pirúvico por mg proteína por hora.

3.3.2.2.12. ATPasa de plasmalema (ATPasa, EC 3.6.1.35) en raíces

Fundamento:

La actividad ATPasa en las raíces, principalmente en el plasmalema, es reflejado en el transporte de iones. La concentración de P_i procedente del ATP degradado por la actividad de la enzima, fue determinado usando el método colorimétrico del vanadomolibdatofosfórico frente a una curva patrón de P (Hogue et al., 1970).

Reactivos:*- Medio de maceración:*

- *Albúmina de suero bovino (BSA) al 0.5 %.*

Disolver 0.5 g de BSA en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Tampón BTP-MES 25 mM pH 7.6.*

Disolver 0.705 g de BTP (1,3-Bis [Tris (hidroximetil) amino] propano) en 100 ml de H₂O desionizada y ajustar el pH a 7.6 con una disolución a una concentración 25 mM del reactivo MES (2-ácido Morfolino-etano-sulfónico-potásico), para lo cual se pesan 0.543 g y se disuelven en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Sacarosa 250 mM.*

Pesar 8.56 g de Sacarosa y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.

- *1,4-Ditio-DL-treitol (DTT) 2 mM.*

Disolver 0.0308 g de DTT en 100 ml de H₂O desionizada.

- *MgSO₄ 2 mM.*

Pesar 0.024 g de MgSO₄ y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.

- *ATP 2 mM.*

Disolver 0.1102 g de ATP en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Glicerol anhidro al 10%.*

Disolver 10 g de Glicerol anhidro en 100 ml de H₂O desionizada.

- *EGTA (ácido tetra-acético etilen glicol) 2 mM.*

Disolver 0.076 g de EGTA [C₁₄H₂₄N₂O₁₀] en 100 ml de H₂O desionizada.

- *PMSF (Fluoruro de fenilmetanosulfonil) 1mM.*

Pesar 0.0174 g de PMSF [C₇H₇FO₂S] en 100 ml de H₂O desionizada.

- Medio de conservación:

- *Glicerol anhidro al 10 %.*

Disolver 10 g de Glicerol anhidro en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Tampón BTP-MES 25 mM pH 7.6.*

Disolver 0.705 g de BTP (1,3-Bis [Tris (hidroximetil) amino] propano) en 100 ml de H₂O desionizada y ajustar el pH a 7.6 con una disolución a una concentración 25 mM del reactivo MES (2-ácido Morfolino-etano-sulfónico –sal de potasio), para lo cual se pesan 0.543 g y se disuelven en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Mezcla de reacción:*

- *Molibdato sódico 100 μ M.*

Disolver 0.0024 g de Molibdato sódico en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Tampon ATP-BTP 3 mM pH 6.5.*

Disolver 0.165 g de ATP en 100 ml de H₂O desionizada y ajustar el pH a 6.5 con una disolución concentrada a 3 mM del reactivo BTP, para lo cual se pesan 0.0847 g y se disuelven en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Tampón BTP-HCl 25 mM pH 6.5.*

Disolver 0.7058 g de BTP en 100 ml de H₂O desionizada y ajustar el pH a 6.5 con una disolución concentrada a 25 mM del reactivo HCl, para lo cual se toman 0.22 ml y se disuelven en 100 ml de H₂O desionizada.

- *LPC (3-sn-Lisofosfatidilcolina, 1-hexadecil) 0.1 mM.*

Disolver 0.005 ml de LPC [C₂₄H₅₂NO₆P] en 100 ml de H₂O desionizada.

- *KCl 50 mM.*

Pesar 0.372 g de KCl y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.

- *MgSO₄ 5 mM.*

Disolver 0.036 g de MgSO₄ en 100 ml de H₂O desionizada.

- *CaSO₄ 5 mM.*

Pesar 0.086 g de CaSO₄ y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Azida 1 mM.*

Disolver 0.0065 g de Azida en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Metavanadato sódico 0.25 mM.*

Pesar 0.003 g de Metavanadato sódico y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.

- *KNO₃ 100 mM.*

Disolver 1.01 g de KNO₃ en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Reactivo de Ames:*

- *Ácido ascórbico al 10%.*

Disolver 10 g de Ácido ascórbico en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Solución de molibdato amónico-H₂SO₄.*

Disolver 0.444 g de Molibdato amónico junto con 2.76 ml H₂SO₄ y enrazar a 100 ml de H₂O desionizada.

- SDS al 5%.

Pesar 5 g de SDS (Sulfato sódico dodecilo) y disolver en 100 ml de H₂O desionizada.

Procedimiento:

- 1) Macerar entre 0.5 a 1 g de material vegetal con 4.5 ml del medio de extracción.
- 2) Se filtra mediante 4 capas de gasa y se centrifuga a 13650 g durante 10 min.
- 3) Recoger el sobrenadante y volver a centrifugar a 49500 g durante 70 min.
- 4) El sobrenadante se desecha y al residuo se le añade 2.5 ml del medio de conservación.
- 5) Una vez que se ha resuspendido el residuo, se agita y se deja reposar durante 15 min en un medio frío.
- 6) El ensayo de la ATPasa plasmática se determina a pH 6.5, para ello se realizan dos subensayos: [PM+] = sin vanadato, inhibidor específico de la ATPasa y con KNO₃ y Ácida; y [PM-] = con vanadato y los restantes inhibidores, KNO₃ y Azida. Cada uno de estos subensayos presento 4 variantes: Endógena, e inducida con Mg, K y Ca. La ATPasa de plasmalema se determino por la diferencia entre [PM+] y [PM-].
- 7) A cada uno de los subensayos se le añaden los siguientes reactivos: 0.002 ml de extracto, 0.1 ml de ATP-BTP 3 mM pH 6.5, 0.1 ml de Molibdato-Na 100 µM, 0.1 ml de BTP-HCl 25 mM pH 6.5 y 0.1 ml de LPC a 100 µM.
- 8) Incubar las muestras durante 30 min a 30°C.
- 9) Una vez pasado este tiempo, se detiene la reacción mediante la adición de 1 ml de Reactivo de Ames compuesto de la mezcla 1:1:1 de los siguientes reactivos: Ácido ascórbico, Molibdato-NH₄ y SDS.
- 10) La actividad ATPasa plasmática fue determinada colorimetricamente ($\lambda = 820$ nm) frente a una curva patrón de P.

La actividad de las distintas formas de ATPasa se expresaron como µmol de P_i liberado por mg proteína por hora.

3.3.2.2.13. *Fitasa (EC 3.1.3.8/3.1.3.26)*

Fundamento:

La actividad fitasa es la responsable de degradar al fitato en mio-inositol y Pi. La cuantificación de esta enzima se baso en la determinación del P_i liberado por la actividad fitasa, a través del método colorimétrico del “Verde Malaquita” frente a una curva patrón de P (Geladopoulus et al., 1991).

Reactivos:

- *Tampón Acetato sódico-ácido acético 0.2 M pH 4.0.*

Disolver 1.640 g de Acetato sódico en 100 ml de H₂O desionizada y ajustar el pH con una solución de ácido acético glacial 0.2 M (pesar 1.20 ml de ácido acético glacial disuelto en 100 ml de H₂O desionizada).

- *Fitato sódico 0.01 M.*

Pesar 0.92 g de Fitato sódico y diluirlo en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Ácido perclórico al 60%.*

- *Reactivo del Verde Malaquita.*

Se preparó igual que para la enzima Glutamina Sintetasa (ver apartado 3.3.2.2.4).

Procedimiento:

- 1) Se macero de 0.1 a 0.5 g de material vegetal en 5 ml de Tampón acetato sódico-ácido acético 0.2 M pH 4.0.
- 2) Se filtro mediante 4 capas de gasa y se centrifugo a 5250 g durante 20 min.
- 3) Posteriormente se centrifugo a 49500 g durante 70 min.
- 4) A cada uno de las muestras se le añaden la mezcla de reacción que consiste en:
 - 0.7 ml de extracto.
 - 0.2 ml de Tampón acetato sódico-ácido acético 0.2 M pH 4.0
 - 0.1 ml de fitato sódico 0.01 M.
- 5) Y posteriormente se incubaron las muestras durante 30 min a 37°C.
- 6) Se para la reacción con 0.2 ml de ácido perclórico al 60%.
- 7) Y se centrifugo nuevamente 15000 g durante 2 min.

- 8) Finalmente, se determina el P_i liberado mediante el método del verde malaquita similarmente como se realizó en la enzima Glutamina sintetasa (ver apartado 3.3.2.2.4), midiendo colorimétricamente a 630 nm frente a una curva patrón de P.

La actividad enzimática fitasa fue expresada como μg de P_i por mg de proteína por hora.

3.3.2.2.14. Fenilalanina amonio-liasa (PAL, EC 4.3.1.5)

Fundamento:

Este método se basa la capacidad de producción de ácido cinámico de la enzima PAL, y se cuantificó de acuerdo con el procedimiento propuesto por Lister et al. (1996).

Reactivos:

- *Buffer de maceración: buffer fosfato sódico 50 mM pH=7:*

Pesar y disolver 8.95 g de Na_2HPO_4 en 500 ml de H_2O desionizada. Ajustar el pH a 7 con 3.90 g de NaH_2PO_4 disueltos en 500 ml de agua desionizada.

A 250 ml de dicho buffer se le añadió:

- 2.47 g de ascorbato sódico 50 mM
- 0.312 g de mercaptoetanol 18 mM
- 0.25 ml de Triton X-100 al 0.1%
- 0.077g de DTT 2 mM.

- *Buffer de resuspensión:*

A 250 ml de buffer fosfato sódico pH=7 se le añadió lo mismo que al anterior, excepto el Triton X-100.

- *Sulfato amónico al 35% (p/v):*

Pesar y disolver 4.624 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 100 ml de H_2O desionizada.

- *Sulfato amónico al 80% (p/v):*

Pesar y disolver 10.571 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 100 ml de H_2O desionizada.

- *Buffer borato sódico 0.06 M pH=8.8:*
Pesar y disolver 1.85 g de HBO_3 en 500 ml de H_2O desionizada. Ajustar el pH con 1.2 g de NaOH disueltos en 500 ml de H_2O desionizada.
- *L-fenilalanina 11 mM:*
Pesar y disolver 1.181 g de L-fenilalanina en 100 ml de H_2O desionizada.
- *Ácido trifluoroacético al 35% (v/v):*
Disolver 11.75 ml de ácido trifluoroacético concentrado en 50 ml de H_2O desionizada.

Procedimiento:

- 1) Entre 1-1.5 gr de material vegetal fresco, tanto en raíces como en hojas, fue homogenizado con 5 ml de buffer de maceración y PVPP.
- 2) El homogenizado fue filtrado y centrifugado a 13000 rpm durante 10 min.
- 3) Una vez terminada la centrifugación, desechamos el sobrenadante, adicionando al residuo que queda en el fondo del tubo 2 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 35% (p/v).
- 4) Seguidamente, se vuelve a centrifugar a 13000 rpm durante 20 min.
- 5) Posteriormente, adicionamos la cantidad de 2 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80%.
- 6) La mezcla resultante se vuelve a centrifugar a 13000 rpm durante 20 min.
- 7) Transcurrido ese tiempo, desechamos el sobrenadante. El residuo que queda en el fondo del tubo se resuspende en frío con 2 ml de buffer de resuspensión, obteniendo así el extracto donde mediremos la actividad de la enzima.

La mezcla de reacción consistió:

- 1) Se ponen 1.8 ml de buffer borato sódico 0.06 mM pH= 8.8 en un tubo de ensayo.
- 2) Se añadió 0.5 ml de extracto enzimático y
- 3) 0.5 ml de L-fenilalanina 11 mM.
- 4) Los tubos fueron incubados en oscuridad durante 60 min a 30°C.

- 5) La reacción fue parada por la adicción de 0.25 ml de ácido trifluoroacético al 35% (v/v).
- 6) Finalmente, esos tubos fueron centrifugados a 6500 rpm durante 5 min con el fin de retirar las proteínas desnaturalizadas.
- 7) La actividad PAL fue determianda a partir de la producción de ácido cinámico, estimado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 290 nm, frete a una curva patrón de ácido cinámico (5-40 μmol).

Se realizó un blanco, el cual presentaba todos los reactivos excepto el ácido cinámico, cuya cantidad fue sustituida por buffer borato sódico.

Por último, para cada muestra se hizo un control que llevaba todos los reactivos anteriormente descritos excepto L-fenilalanina, con el fin de evitar así el posible ácido cinámico presente en el extracto enzimático.

La actividad PAL se expresó como μmol de ácido cinámico formados $\times \text{mg prot}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

3.3.2.2.15. Polifenol oxidasa (PPO, EC 1.14.18.1)

Fundamento:

El método utilizado para la extracción de esta enzima fue el propuesto por Thipyapong et al. (1995) y está basado en la desaparición enzimática por oxidación del ácido cafeico a lo largo del tiempo.

Reactivos:

- *Buffer de maceración: buffer fosfato sódico 100 mM pH=7.0:*
Pesar y disolver 35.817 g de Na_2HPO_4 en 1000 ml de H_2O desionizada. Ajustar el pH=7.0 con 15.601 g de NaH_2PO_4 disueltos en 1000 ml de H_2O desionizada.
- *Triton X-100 al 0.58% (v/v):*
Disolver 0.58 ml de Triton X-100 en 100 ml de H_2O desionizada.

- *Ácido cafeico 30 μ M:*

Preparar una solución madre de ácido cafeico 3000 μ M. Para ello se disuelven 0.054 g de ácido cafeico en 100 ml de buffer de maceración. Posteriormente se toman 1 ml de solución madre de ácido cafeico 3000 μ M y se disuelven en 100 ml de buffer de maceración obteniendo de esta manera el ácido cafeico 30 μ M.

Procedimiento:

- 1) Entre 0.25-0.75 gr de material vegetal (raíces y hojas) fue homogenizado con 5 ml de buffer de maceración y PVPP.
- 2) El homogenado fue filtrado y centrifugado a 11500 rpm durante 15 min.
- 3) El sobrenadante resultante fue utilizado para el ensayo de la actividad PPO.

La mezcla de la reacción para el ensayo de la actividad PPO consistió en:

- 1) Poner 1.95 ml de buffer de maceración en un tubo de ensayo.
- 2) Se añadió 50 μ l de Tritón X-100 al 0.58% (v/v) y
- 3) 50 μ l de extracto enzimático.
- 4) La reacción se inició con la aplicación de 1 ml de ácido cafeico 30 μ M al medio de reacción.

La actividad PPO fue medida mediante el cambio de absorbancia durante 3 min, por desaparición enzimática por oxidación del ácido cafeico, a una longitud de onda de 390 nm y a una temperatura de 30°C.

Se realizó un blanco el cual presentaba todos los componentes de la mezcla de reacción citados anteriormente, excepto el extracto enzimático, cuya cantidad fue sustituida por buffer de maceración.

La actividad PPO fue expresada como $\text{mmol de ácido cafeico oxidado} \times \text{mg prot}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

3.3.2.2.16. Fenoles totales y Ortodifenoles

Fundamento:

Los fenoles totales fueron determinados por espectrofotométricamente frente una curva patrón de ácido cafeico (10-100 $\mu\text{gr/ml}$), gracias al complejo de color que forman estos compuestos con el reactivo Folin-Ciocalteau, siguiendo el método propuesto por Singlenton y Rossi (1965). El contenido en ortodifenoles fue determinado colorimétricamente ante una curva patrón de ácido cafeico (10-100 $\mu\text{gr/ml}$), como propone Singlenton et al. (1985).

Procedimiento:

Los fenoles del material vegetal fresco fueron extraídos con metanol.

- 1) Una cantidad entre 0.5-1 gr de material vegetal fresco (hojas y raíces) fue homogenizado con 5 ml de metanol, 5 ml de cloroformo y 2.5 ml de una solución de NaCl al 1%.
- 2) El homogenado fue filtrado y, tras una centrifugación a 5000 rpm durante 10 min.
- 3) Se obtuvieron las siguientes fases:
fase metanólica, que contiene ácidos fenólicos, azúcares solubles y compuestos de bajo peso molecular.
Interfase, formada por proteínas precipitadas por el NaCl.
Fase clorofórmica, constituida por lípidos disueltos.

La solución metanólica fue la que utilizamos para la cuantificación de los fenoles totales y ortodifenoles.

Cuantificación de fenoles totales

Reactivos:

- Carbonato sódico al 2% (p/v) disuelto en sosa 0.1 N:

Pesar y disolver 5 g de Na_2CO_3 en 250 ml de NaOH 0.1N, que se prepara disolviendo 4 g de NaOH en 1000 ml de H_2O desionizada.

- *Reactivo de Folin-Ciocalteu al 50% (v/v):*

50 ml de Reactivo de Folin-Ciocalteu + 50 ml de H₂O desionizada.

Procedimiento:

La mezcla de reacción consistió en:

- 1) Poner 1.5 ml de Na₂CO₃ al 2% en un tubo de ensayo.
- 2) 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50% y
- 3) 2.75 ml de H₂O desionizada, añadiendo
- 4) 0.5 ml del extracto enzimático.

Tras una incubación a temperatura ambiente durante 60 min se procedió a la determinación de los fenoles totales frente a una curva patrón de ácido cafeico (10-100 µg/ml) a una absorbancia de 725 nm.

Los resultados, tanto de fenoles totales como de ortodifenoles, fueron expresados en mgr de ác. cafeico × g⁻¹ p.f

Cuantificación de los ortodifenoles

Reactivos:

- *Metanol puro.*
- *Cloroformo puro.*
- *Cloruro sódico al 1%*

Pesar y disolver 2.5 gr de NaCl en 250 ml de H₂O desionizada.

- *Mezcla hidrometanólica 2:3*

Disolver 200 ml de metanol en 100 ml de H₂O desionizada.

- *Ácido sulfúrico 0.1 N:*

Disolver 663 µl de H₂SO₄ al 96% en 250 ml de H₂O desionizada.

- *Molibdato amónico al 10% (p/v):*

Pesar y disolver 53.09 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O en 500 ml de H₂O desionizada.

Procedimiento:

La mezcla de reacción contenía:

- 1) 1.8 ml de mezcla hidrometanólica (2/3 metanol + 1/3 H₂O desionizada).
- 2) 1 ml de H₂SO₄ 0.1 N, 3 ml de Mo₇O₂₄(NH₄)₆ al 10% (p/v).
- 3) 0.5 ml de extracto de la fase metanólica.
- 4) Tras una incubación a temperatura ambiente durante 30 min se procedió a la determinación de los ortodifenoles de la misma manera que se realizó la determinación de fenoles totales.

Los cálculos para la determinación de la concentración de ortodifenoles en la muestra vegetal fueron realizados de la misma manera que para la determinación de fenoles totales.

3.3.2.2.17. Extracción y cuantificación del H₂O₂**Fundamento:**

La extracción y cuantificación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), se realizó siguiendo el método de Brennan y Frenkel (1977), el cual está basado en el método propuesto por Mac Nevin y Urone. (1953). El ensayo está fundado en el complejo que forma el H₂O₂ al reaccionar con el titanio (Ti⁴⁺). Este complejo da un color amarillo, el cual, tras la precipitación con hidróxido de amonio (NH₄OH aq), separa el H₂O₂ del resto de hidroperóxidos. Por último, el complejo formado (precipitado), al resuspenderse en una solución de ácido sulfúrico [TiO₂(SO₄)₂²⁻], puede medirse por colorimetría.

Reactivos:

- *ClH 2N*:
Disolver 17.5 ml de ácido clorhídrico (ClH al 35%) en 100 ml de H₂O desionizada.
- *TiCl₄ al 20% (v/v)*:
Disolver 20 ml de tetracloruro de titanio (TiCl₄) en 100 ml de ClH concentrado (solución de ClH 2N descrita en el paso anterior).

- *Hidróxido de amonio al 20% (p/v):*
Disolver 20 ml de (NH₄OH) aq en 100 ml de H₂O desionizada.
- *H₂SO₄ 2N:*
Disolver 54.4 ml de ácido sulfúrico al 98% en 1L de H₂O desionizada.
- *Solución madre (1mM) de H₂O₂:*
Disolver 51 µl de peróxido de hidrógeno (perhidrol al 30%) en 500 ml de H₂O desionizada.
- *Acetona (pura).*

Procedimiento:

- 1) Una cantidad aproximada de 0.5 g de material vegetal fresco fue homogeneizada con 5 ml de acetona fría.
- 2) El homogeneizado fue filtrado, lavándolo con acetona fría un par de veces.
- 3) Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min.

La mezcla de reacción consistió en:

- 1) 2.5 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo.
- 2) Se adicionaron 0.5 ml de TiCl₄ al 20% y se agitó energicamente.
- 3) A continuación, se adicionaron 2.5 ml de NH₄OH al 20% gota a gota mezclándose minuciosamente.
- 4) La mezcla resultante, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min.
- 5) El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó varias veces con acetona fría (empleando un volumen aproximado de 5 ml), hasta que el sobrenadante (formado) quedaba decolorado.
- 6) El precipitado se solubilizó (resuspendió) en 7.5 ml de H₂SO₄ 2N.
- 7) Seguidamente se llevó a un volumen final de 12.5 ml de H₂O desionizada.
- 8) Finalmente, la solución obtenida se filtró (con embudos de papel).
- 9) Por último, se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 415 nm, frente a una curva patrón de H₂O₂ en el rango de 0.1 a 0.75 nM, la cual siguió el mismo procedimiento que las muestras.

La cantidad de H₂O₂ fue expresada en mmol H₂O₂ × g p.f.⁻¹

3.3.2.2.18. Actividad enzimática Superoxido Dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)

Fundamento:

La extracción y cuantificación de la enzima SOD se realizó siguiendo el método de Giannopolitis y Ries (1977) y Beyer y Fridovich (1987) con algunas modificaciones (Yu et al., 1998) optimizado para nuestras condiciones. La actividad SOD, fue determinada mediante la inhibición de la reducción fotoquímica del azul de nitrotetrazolio (NBT).

Reactivos:

- *Buffer Heppes-ClH 50 mM, pH: 7.6 que contiene EDTA sódico 0.1 mM:*

Disolver 6.507 g de Heppes-Na ($C_8H_{12}N_2NaO_9S$) en 500 ml de H_2O desionizada y ajustar el pH de esta solución hasta 7.6 adicionando otra solución que contiene 2.2 ml de ClH al 35% disueltos en 500 ml de H_2O desionizada. Una vez ajustado el pH disolver 0.186 g de EDTA-NA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) en 500 ml del buffer obtenido anteriormente.

- *Buffer CO_3Na_2 - CO_3HNa 50 mM pH: 10.2:*

Disolver 4.2 g de CO_3HNa en 1 L de H_2O desionizada y ajustar el pH hasta 10.2 adicionando a esta solución otra que contiene 5.3 g de CO_3HNa disueltos en 1 L de H_2O desionizada.

- *Buffer de reacción:*

Al buffer CO_3Na_2/CO_3HNa 50 mM pH 10.2, adicionar y disolver en el orden siguiente:

- 0.372 g de EDTA-Na.
- 1.795 g de L-metionina.
- 61 mg de azul de nitrotetrazolio.
- 0.7 mg de riboflavina.

Procedimiento:

- 1) Una cantidad entre 0.3-0.5 g de material vegetal fresco se homogeneizó en 5 ml de buffer Heppes-ClH 50 mM pH= 7.6.
- 2) Seguidamente, el homogenado se centrifugó a 11000 rpm durante 10 min.

- 3) El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la actividad de la enzima, previa dilución del mismo 1:4 con buffer Heppes-ClH 50 mM pH: 7.6 (buffer de maceración).

Para la determinación de la actividad SOD se procedió de la siguiente manera:

- 1) *Control*: En un tubo de ensayo se adicionaron:
 - 5 ml de “buffer de reacción”.
 - Seguidamente se agitó y guardó en oscuridad para ser utilizado durante el ensayo como control de todas las muestras.
- 2) *Blancos*: En tubos de ensayo se adicionaron:
 - 100 μ l de extracto enzimático de cada muestra (obtenido por dilución 1:4 previamente).
 - 5 ml de “buffer de reacción”.
 - Seguidamente los tubos se agitaron y guardaron en oscuridad.
- 3) *Muestras*: En tubos de ensayo se adicionaron:
 - 100 μ l de extracto enzimático de cada muestra.
 - 5 ml de “buffer de reacción”.
 - Seguidamente los tubos se agitaron y guardaron en oscuridad.

A continuación, se procedió a la lectura de todos los tubos a una longitud de onda de 560 nm (tiempo=0 min) en el siguiente orden: 1) *control*, 2) *blancos* y 3) *muestras*.

Posteriormente, los *blancos* se guardaron en oscuridad

Los *controles* y las *muestras* fueron iluminadas durante 15 min con una intensidad lumínica de $380 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$, mediante una lámpara de día azul (OSRAM, 40 watos).

Transcurridos los 15 min, se midieron de nuevo todos los tubos, en el mismo orden citado anteriormente, y a la misma longitud de onda (tiempo=15 min).

La actividad SOD fue expresada como Unidades de SOD \times mg prot⁻¹.

3.3.2.2.19. Actividad Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

Fundamento:

La extracción y ensayo se realizó siguiendo el método de Kalir et al. (1984) y Badiani et al. (1990) modificado y optimizado para nuestras condiciones. Este método se basa en determinar la cantidad de H_2O_2 oxidada por la actividad CAT a lo largo del tiempo.

Reactivos:

- *Buffer fosfato-Na 25 mM, pH:7* (mismo que el utilizado para la determinación de GPX).
- *EDTA-Na 0.8 mM:*
Disolver 29.6 g de EDTA-Na ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) en 100 ml de H_2O desionizada.
- *H_2O_2 20 mM:*
Disolver 61.5 μ l de H_2O_2 (perhidrol al 30%) en 100 ml de H_2O desionizada.

Procedimiento:

Para la extracción de esta enzima se procedió de la siguiente manera:

- 1) Se pesó una cantidad aproximada de 0.5-1 g de material vegetal fresco (raíces y hojas) y se homogeneizó con 5 ml de buffer Heppes-ClH 25 mM pH= 7.8
- 2) El homogenado resultante fue filtrado con 4 capas de gasa y se centrifugó a 11500 rpm durante 20 min.
- 3) El sobrenadante obtenido fue utilizado para medir la actividad enzimática CAT.

En un tubo de ensayo se adicionaron en el siguiente orden:

- 1) 0.75 ml de buffer fosfato sódico 25 mM (Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4) pH= 7 más
- 2) 0.75 ml de EDTA-Na 0.8 mM con
- 3) 1 ml de H_2O_2 20 mM y
- 4) 0.5 ml de extracto enzimático.

- 5) Seguidamente, tras agitar los tubos, se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 240 nm, siguiendo la disminución de absorbancia durante 3 min.

La actividad CAT se expresó como $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ reducidos} \times \text{mg prot}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un análisis de varianza convencional. Los datos mostrados en las tablas y en las figuras corresponden a las medias obtenidas entre las repeticiones, siendo $n = 6$. Las diferencias entre tratamientos se compararon utilizando el Test de Mínimas Diferencias Significativas (LSD) a un nivel de probabilidad de 0.05%.

Cuando fue necesario, se realizó un análisis de regresión simple con el fin de determinar las relaciones entre las variables estudiadas. Finalmente, los niveles de significación están representados como $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), y $P > 0.05$ (NS, no significativo).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA

El N es actualmente el nutriente más ampliamente usado y demandado para el crecimiento de las plantas cultivadas. El N es el componente esencial de proteínas y ácidos nucleicos, y cuando la cantidad de N en el medio de cultivo, no se encuentra disponible en un rango óptimo el crecimiento se ve reducido (Weinhold et al., 1995). En nuestro experimento, el tratamiento N3 presentó la máxima producción de biomasa total, aérea y foliar, con incrementos de 37%, 40% y 43% respectivamente, en relación al tratamiento N6 donde se presentaron los valores mínimos (Tabla 1). Con respecto a la producción de la biomasa radicular, el tratamiento N1 presentó la mayor producción, con un incremento de 51% en relación a N6, que de nuevo dio lugar a la menor producción de biomasa radicular. Asimismo, indicar que el mayor cociente obtenido de la relación biomasa radicular-aérea se presentó en el tratamiento N1, en comparación al menor cociente presentado en el tratamiento N3 (Figura 1).

Tabla 1. Influencia del Nitrógeno sobre la producción de biomasa (g p.s. planta⁻¹). Los datos son las medias \pm error estándar (n = 8).

Tratamiento	Biomasa			
	Total	Aérea (BA)	Foliar	Radicular (BR)
N1	2.039	1.358	0.903	0.681
N2	2.296	1.846	1.209	0.450
N3	2.589	2.157	1.420	0.432
N4	2.216	1.831	1.238	0.385
N5	1.782	1.437	0.901	0.345
N6	1.627	1.291	0.803	0.336
Significación	**	**	**	**

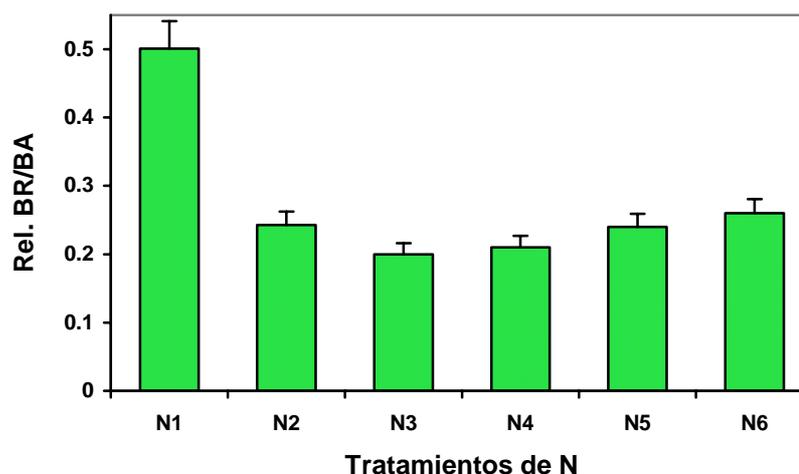


Figura 1. Influencia del N sobre la relación biomasa radicular (BR)/biomasa aérea (BA). Los datos son las medias \pm error estándar (n = 8).

La eficacia de los tratamientos de N en nuestro experimento se reflejó en la producción de la biomasa total, aérea, foliar y radicular (Tabla 1), presentando un efecto inversamente proporcional la producción de biomasa radicular con la producción biomasa total, aérea y foliar. Es decir, la producción de biomasa radicular fue disminuyendo a medida que se fue incrementando la dosis de N, ocurriendo lo contrario con la producción de la biomasa total, aérea y foliar, presentándose en el tratamiento N3, considerado como óptimo por Carbonell-Barrachina et al. (1997), la máxima biomasa total, aérea y foliar. Por el contrario, a partir de N3 se fue disminuyendo la producción de todos los órganos presentándose el mínimo crecimiento en N6 (24 mM de N).

Como indicamos en la introducción de este capítulo, Thornley (1972) fue el primer investigador que propuso un modelo para explicar los cambios en las distribuciones de la biomasa entre las raíces y la parte aérea. En este modelo, él propuso que el crecimiento es dependiente del suministro del carbon proveniente de la parte aérea y del N proveniente de la raíz. En este sentido en nuestro experimento, las dosis deficientes de N, como lo fueron N1 y N2, se caracterizaron por presentar un incremento en el cociente del peso seco entre la biomasa radicular-biomasa aérea (Figura 1). En condiciones de deficiencia de N distintos trabajos han comprobado que tanto la translocación de fotoasimilados vía floema hacia las raíces como el transporte por esta vía de compuestos nitrogenados hacia las raíces aumenta,

pudiendo llegar en la mayoría de los casos a superar al transporte del N vía xilema hacia la parte aérea, lo que explicaría así el mayor crecimiento radicular en condiciones deficientes de N (Peuke et al., 1994; Engels y Marschner, 1995; Mengel y Kirkby, 2001).

Estos resultados sugieren que bajo condiciones deficientes en N, no solamente una mayor proporción de nutrientes procedentes del substrato es retenido en las raíces, sino que también la recirculación de nutrientes desde la parte aérea hacia las raíces suple adicionalmente de N a éstas. Por tanto, los niveles de nutrientes superiores en las raíces pueden contribuir a que se produzca una translocación excesiva de fotoasimilados hacia este órgano, en detrimento de la parte aérea (Marschner et al., 1996). Esto explicaría que la deficiencia de N afectará de forma negativa al crecimiento de la parte aérea, mientras que la parte radicular se vería potenciada.

En cuanto a las dosis consideradas de elevadas a tóxicas de N, como lo fueron N4, N5 y N6, presentaron también cocientes superiores a los de N3, debido a que se caracterizaron por presentar un reducido crecimiento general de la planta, siendo más afectada la parte aérea que la radicular. Comparando los diferentes cocientes de la biomasa radicular-biomasa aérea obtenidos en los tratamientos deficientes de N (N1 y N2) con los obtenidos en los tratamientos elevados a tóxicos (N4, N5 y N6), observamos que los últimos fueron inferiores a los presentados con los tratamientos considerados deficientes de N (Figura 1).

En resumen, indicar que la aplicación de 6 mM de N (N3) resulto ser el tratamiento óptimo para una eficaz producción de biomasa total, aérea, foliar y radicular en las plantas de judía, mientras que los tratamientos por debajo de N3 (N1 y N2), pueden ser considerados como deficientes en N, caracterizándose por un aumento del crecimiento radicular, una reducción del crecimiento de la parte aérea y por lo tanto un incremento del cociente parte radicular-parte aérea. Por otro lado, las dosis por encima del óptimo, es decir N4, N5 y N6, se podrían considerar en nuestro experimento como de elevadas a tóxicas por la disminución que provocan del crecimiento de la parte radicular y parte aérea, siendo esta última la más afectada. Finalmente, comentar que: (1) la toxicidad de N tiene un efecto más negativo sobre la producción de biomasa comparado a la deficiencia; (2) el cociente parte radicular y parte aérea pudiera ser considerado un buen bioindicador de un estrés nutricional de N en las plantas de judía; y (3) las plantas de judía son más sensibles a la toxicidad de N que a la deficiencia.

4.2. PRODUCTIVIDAD

Al igual que lo observado para la producción de biomasa por efecto de la aplicación de N (Tabla 1), encontramos diferencias significativas en la producción total de frutos, producción comercial y producción no comercial (Figura 2), presentando el tratamiento N3, la máxima producción total y producción comercial, con incrementos de 54% y 87% respectivamente, en relación al tratamiento N6 donde se presentaron los valores mínimos (Figura 2). Con respecto a la producción de frutos no comerciales, el tratamiento N3 presentó la mínima producción, con una disminución de casi tres veces en relación a N6, que presentó la máxima producción no comercial (Figura 2).

El N es uno de los nutrientes que afecta de forma más significativa tanto a la producción como a la calidad de los productos agrícolas (Ruiz y Romero, 1999; VÍllora et al., 2004). Así, un empleo excesivo de N puede provocar un descenso en la producción y calidad, con lo que el rendimiento económico disminuirá considerablemente (Huett y Dettmann, 1991), mientras que si el aporte de N es el adecuado, la producción total y comercial aumenta (Papadopoulus y Khosla, 1993; Maier et al., 1994). En nuestro experimento, la producción total de frutos y producción comercial fueron incrementando hasta el tratamiento N3, y posteriormente disminuyó drásticamente con la aplicación de los tratamientos N4, N5 y N6 (reducción de hasta un 51% en relación a N3), indicando que éstos tratamientos fueron perjudiciales para el cultivo de judía. Con lo que se refiere a la producción no comercial, estos presentaron un comportamiento inverso a la producción comercial ya que fueron los tratamientos por debajo y por encima de N3 los que se presentaron los máximos valores. Nuestros resultados están en concordancia con los de otros autores (Davenport, 1996; López-Cantarero, 1997), los cuales también observaron que ante la aplicación de elevadas dosis de N, la producción total y producción comercial disminuye drásticamente favoreciéndose el incremento de la producción no comercial.

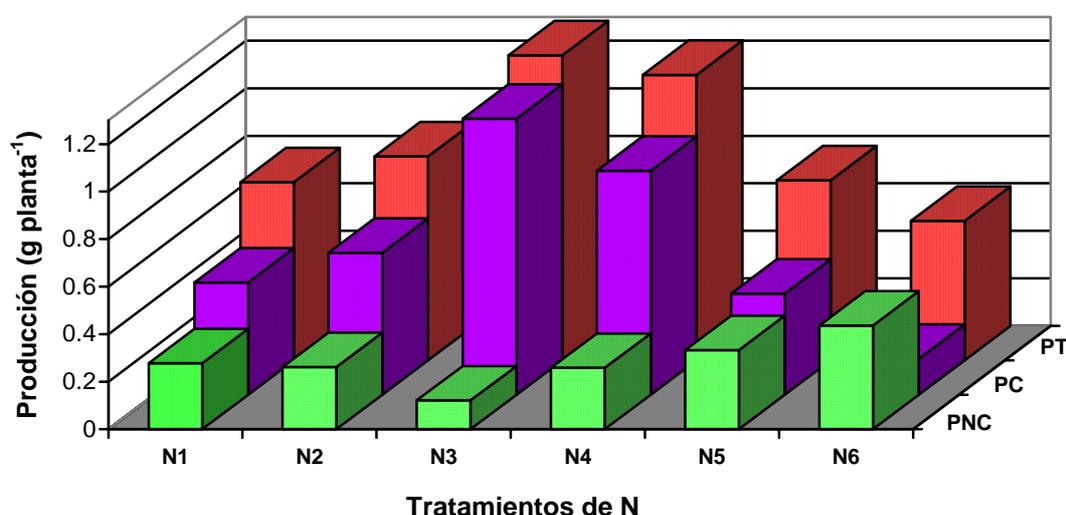


Figura 2. Influencia del N sobre la producción total de frutos (PT), producción comercial (PC) y no comercial (PNC) en plantas de judía (g p.s. planta⁻¹). Los datos son las medias \pm error estándar (n = 8).

Además, las plantas con dosis deficientes de N, que en nuestro experimento se consideran los tratamientos N1 y N2, se caracterizaron por presentar un crecimiento reducido, poco desarrollo de flores, y un pobre llenado de las vainas como ha sido mencionado por otros autores (Bennett, 1993; Mills y Benton Jones, 1996; Marschner et al., 1996). Estos mismos autores indican que la deficiencia nutricional de N puede afectar tanto a la provisión o síntesis de fotosintatos como a la distribución de estos entre la fuente (hojas) y los distintos sumideros fisiológicos de la planta, en particular los frutos. Por el contrario, en las plantas tratadas con dosis de N consideradas elevadas a tóxicas de N, se afectó principalmente el amarre de frutos, lo que se reflejó en la baja producción de frutos y la baja calidad de los mismos.

Teniendo en cuenta nuestros resultados podemos indicar que la aplicación de dosis de N por encima de N3, especialmente el tratamiento N6 (24 mM), produce una reducción más significativa de la producción comercial en plantas de judía que la aplicación de las dosis inferiores al óptimo (N1 y N2). Estos resultados junto con los de producción de biomasa en la planta confirman la hipótesis de que las plantas de judía son más sensibles a la toxicidad de N que a la deficiencia.

En resumen, comentar que la aplicación de 6 mM de N (N3) resultó ser el tratamiento óptimo para una eficaz producción total de frutos, producción comercial y producción no comercial, mientras que los tratamientos por debajo de N3, se caracterizaron por una menor producción total, producción comercial y un aumento en la producción no comercial. Finalmente, las dosis por encima del óptimo (N4, N5 y N6) dieron lugar a la disminución drástica de la producción total, producción comercial y un fuerte aumento en la producción no comercial, siendo estos parámetros buenos indicadores para definir un estrés nutricional respecto al N.

4.3. METABOLISMO NITROGENADO

4.3.1. Raíces y Hojas

La aplicación de diferentes dosis de N favoreció la concentración de NO_3^- a partir de los tratamientos N3 al N6 en raíces ($P < 0.05$; Figura 3) y hojas ($P < 0.05$; Figura 3), mientras que en los tratamientos N1 y N2 no se detectó este ión. Como podemos observar en la Figura 3 la máxima concentración de NO_3^- se presentó en las raíces y hojas de las plantas tratadas con N6. Esta acumulación excesiva de NO_3^- en N6 nos podría indicar “a priori” que la absorción y translocación de NO_3^- hacia la parte aérea excede la capacidad de asimilación en este tratamiento (Mackown et al., 1990).

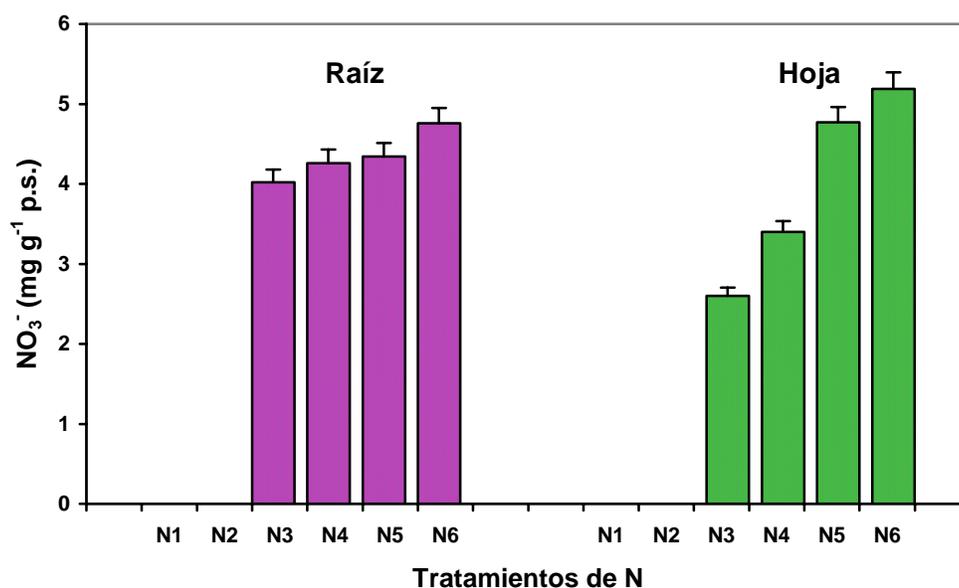


Figura 3. Acumulación de NO_3^- en raíces y hojas de plantas de judía en respuesta a los tratamientos de N.

En algunos trabajos se ha indicado que una acumulación excesiva de NO_3^- podría ser la causa de una disminución del crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ejemplo, Andreeva et al. (1998) encontró que aplicaciones elevadas de NO_3^- a la solución nutritiva (> 10 mM de N), dieron lugar a un efecto estresante para las plantas, disminuyéndose sustancialmente procesos clave para el desarrollo de las plantas tales como la fotosíntesis, la síntesis y acumulación de

almidón, y la asimilación de N, lo que condujo a una importante reducción de la productividad. En nuestra experiencia, la concentración foliar de NO_3^- observada en los tratamientos N4, N5, y especialmente en N6, podría interferir o alterar los procesos mencionados anteriormente y provocar así una reducción de la producción de biomasa foliar. Efectivamente la acumulación de NO_3^- coincide con la drástica disminución de la producción de biomasa total, biomasa aérea, foliar y radicular (ver Apartado 4.1.).

La otra forma nitrogenada inorgánica que puede ser asimilada por las plantas es el NH_4^+ . En nuestro experimento, podemos observar como a medida que aumento la aplicación de N al medio, incremento la concentración de NH_4^+ en los tejidos estudiados (Raíces: $P < 0.01$, Figura 4; Hojas: $P < 0.01$, Figura 4), presentando el tratamiento N6 la máxima concentración con incrementos del 65% y 71% respectivamente, en relación al tratamiento N1 en el que encontramos la mínima concentración de NH_4^+ en raíces y hojas.

Con respecto al ion NH_4^+ , se ha demostrado en diversos estudios que un elevado aporte de este catión al medio perjudica el crecimiento y producción de las plantas, en comparación con plantas que han sido fertilizadas con NO_3^- (Harada et al., 1968; Wilcox et al., 1985; Cramer y Lewis, 1993). La toxicidad de NH_4^+ puede ser producida por las siguientes causas: (1) inducción de deficiencias por acción antagónica con otros nutrientes, especialmente cationes; (2) inhibición del crecimiento secundario originado por la acidificación del medio radicular; (3) alteraciones en el pH intracelular y balance osmótico; (4) desacoplamiento del transporte de electrones en la fotofosforilación; y finalmente (5) alteración del metabolismo de las poliaminas y fitohormonas (Gerendás et al., 1997).

Al igual que ocurría para los NO_3^- , en nuestra experiencia se produjo una acumulación importante de NH_4^+ en las hojas de las plantas tratadas con las dosis N4, N5 y especialmente con N6, lo que podría explicar la reducción de biomasa observada en estas plantas (ver Apartado 4.1.). De hecho, la relación obtenida entre estos parámetros podría apoyar esta hipótesis, ya que el coeficiente de correlación fue negativo y muy significativo ($r = 0.94^{***}$).

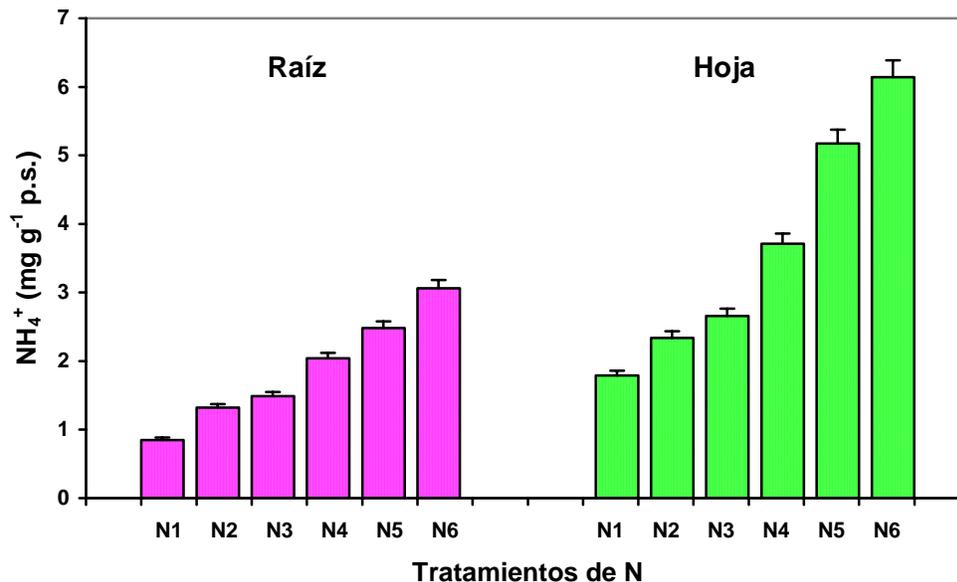


Figura 4. Acumulación de NH_4^+ en raíces y hojas de plantas de judía en respuesta a los tratamientos de N.

Finalmente, y en relación a las elevadas concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ encontrados en N6, Sánchez et al. (2000) han sugerido que la acumulación excesiva de estos iones en este tratamiento en plantas de judía podría ser la causa de la formación y acumulación de H_2O_2 , lo que contribuiría de forma decisiva en una reducción de la biomasa en este tratamiento por la aparición de un estrés oxidativo (Okuda et al., 1991; García et al., 2001).

El crecimiento de la planta es dependiente de un adecuado aporte de N para formar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. Después de muchos estudios se ha comprobado que la etapa limitante para la asimilación de N es la reducción de los NO_3^- a NO_2^- catalizado por la enzima NR (Huber et al., 1996; Sivasankar y Oaks, 1996). Posteriormente, la enzima NiR convierte el NO_2^- a NH_4^+ (Sivasankar y Oaks, 1996; Migge y Becker, 1996), siendo ambas enzimas, NR y NiR, inducidas por los mismos factores (Oaks, 1994). Uno de los principales factores que regulan tanto a la actividad NR como a la actividad NiR es la disponibilidad de NO_3^- (Campbell, 1996). En nuestro experimento, y al igual que ocurrió para los NO_3^- , las actividades NR y NiR (Tabla 2) se detectaron a partir del tratamiento N3, presentándose en éste tanto en raíces como en hojas las mínimas actividades y las

máximas en el tratamiento N6. Los datos de las actividades NR y NiR junto con las concentraciones de NO_3^- en raíces y hojas confirman el exceso de la absorción y translocación de NO_3^- encontrada en el tratamiento N6. Además, indicar como ha sido observado en muchos trabajos (Sivasankar y Oaks, 1996; Ruiz et al., 1998) que la máxima reducción de NO_3^- se produce en las hojas (Tabla 2) lo que nos sugiere que la mayor parte de los NO_3^- son absorbidos y posteriormente translocados hacia las hojas donde son principalmente reducidos.

Tanto el NH_4^+ originado en las plantas por la reducción de NO_3^- como el suministrado vía fertilización es incorporado a formas orgánicas principalmente a través del ciclo GS/GOGAT (Sivasankar y Oaks, 1996; Migge y Becker, 1996). La enzima GS en primer lugar cataliza la conversión del aminoácido, glutamato, hacia la amida, glutamina. Posteriormente, la enzima GOGAT cataliza la reducción del grupo amida de la glutamina para formar dos moléculas de glutamato. Una de las moléculas de glutamato puede ser incorporada de nuevo al ciclo GS/GOGAT, mientras que la otra es utilizada para formar otros aminoácidos o para incorporarse a proteínas (Sivasankar y Oaks, 1996). En nuestro experimento, las actividades GS y GOGAT incrementaron con el aumento de la fertilización nitrogenada, presentándose las máximas actividades en el tratamiento N6, tanto en raíces como en hojas, con incrementos superiores al 65% para la actividad GS y del 85% para la actividad GOGAT, en relación a la mínima actividad encontrada en N1 (Tabla 2). Uno de los factores que determinan la actividad de las enzimas GS y GOGAT es la presencia de NH_4^+ (Oaks, 1994). En nuestro experimento, se encontró una relación positiva y significativa entre el contenido de NH_4^+ y las actividades enzimáticas GS y GOGAT en ambos órganos (raíces: NH_4^+ -GS, $r = 0.75^{**}$; NH_4^+ -GOGAT, $r = 0.80^{**}$; hojas: NH_4^+ -GS, $r = 0.81^{**}$; NH_4^+ -GOGAT, $r = 0.92^{***}$). Además, resaltar que al igual que las actividades NR y NiR (Tabla 2) las máximas actividades encargadas de la asimilación del NH_4^+ (GS y GOGAT) se presentaron en las hojas, lo que indica que la mayor asimilación de NH_4^+ se llevó a cabo en este tejido.

Tabla 2. Efecto de los tratamientos de N sobre las actividades enzimáticas de NR, NiR, GS, GOGAT y PEPCasa en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPCasa
Raíces					
N1	ND	ND	0.10	0.15	1.64
N2	ND	ND	0.16	0.17	2.80
N3	0.035	0.82	0.22	0.26	3.94
N4	0.042	1.15	0.24	0.45	4.96
N5	0.051	1.18	0.26	1.03	10.72
N6	0.075	1.24	0.32	1.22	15.39
Significación	*	*	***	***	***
Hojas					
N1	ND	ND	0.28	0.08	2.21
N2	ND	ND	0.58	0.11	5.39
N3	0.071	1.54	0.76	0.56	7.87
N4	0.080	4.64	0.83	0.73	9.04
N5	0.140	5.78	0.97	1.01	11.42
N6	0.165	6.36	1.36	1.47	16.77
Significación	**	***	***	***	***

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

La actividad PEPCasa refleja la relación entre el metabolismo nitrogenado y el metabolismo carbonado (Champigny y Foyer, 1992). En nuestra experiencia, la aplicación de las diferentes dosis de N conlleva un aumento estadísticamente significativo de la actividad PEPCasa en raíces (Tabla 2) y hojas (Tabla 2), obteniéndose la máxima actividad en el tratamiento N6, con un aumento del 89% y 87% respectivamente (Tabla 2), en relación a N1 que dio lugar a la mínima actividad. La actividad PEPCasa siguió un comportamiento similar a la GS y GOGAT, lo que refleja la relación estrecha que existe entre el metabolismo nitrogenado y carbonado (Champigny y Foyer, 1992).

Esta relación entre ambos metabolismos en plantas superiores ha sido reconocido por diferentes investigadores (Naik y Nicholas, 1986; Champigny y Foyer, 1992). En nuestro experimento, también se encontró dicha relación, ya que a medida que se aumentan las dosis de N, se incrementa la actividad enzimática PEPCasa, lo que puede indicar que los esqueletos

carbonados proporcionados por esta actividad enzimática se destinan mayoritariamente a la formación de compuestos nitrogenados.

Los productos finales de la asimilación del N en las plantas son principalmente aminoácidos, proteínas y N orgánico (Barneix y Causin, 1996). Nuestros resultados muestran que estos compuestos nitrogenados incrementaron con las dosis de N, presentándose las máximas concentraciones en el tratamiento N6 en raíces (Tabla 3) y hojas (Tabla 3), y las mínimas en el tratamiento N1. En cuanto a la concentración del N total, éste presentó el mismo comportamiento que el que acabamos de describir para el N orgánico. Finalmente, resaltar que los máximos contenidos de estas formas nitrogenadas se presentaron en las hojas.

Tabla 3. Efecto de los tratamientos de N sobre la concentración de aminoácidos, proteínas, N orgánico y N total en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	Aminoácidos	Proteínas	N orgánico	N total
Raíces				
N1	0.25	1.32	26.68	27.53
N2	0.33	1.41	29.48	30.80
N3	0.62	1.74	34.20	39.82
N4	0.68	2.77	37.23	43.53
N5	1.48	3.48	39.35	46.17
N6	1.88	4.64	39.75	47.59
Significación	***	**	**	**
Hojas				
N1	0.95	5.66	28.12	29.91
N2	1.33	7.03	31.10	33.44
N3	1.92	7.20	40.51	45.83
N4	4.32	8.33	43.47	50.58
N5	5.83	12.21	63.47	73.41
N6	7.18	14.67	65.00	76.33
Significación	***	**	***	***

Aminoácidos y proteínas expresados en mg g⁻¹ p.f.; N orgánico y N total expresados en mg g⁻¹ p.s.

En resumen, indicar que bajo condiciones deficientes de N representadas en nuestra experiencia por los tratamientos N1 y N2 se produce, como ha sido descrito en numerosas investigaciones (López-Cantarero et al., 1997; Ruiz y Romero, 1999), una disminución muy significativa de la asimilación de N presentándose tanto en raíces como en hojas actividades de las enzimas GS, GOGAT y PEPCasa inferiores a las observadas bajo condiciones óptimas del

tratamiento N3. La inferior asimilación de N en los tratamientos N1 y N2 es la causa de que las plantas tratadas con estas dosis produzcan mínimas concentraciones de compuestos orgánicos nitrogenados (aminoácidos, proteínas y N orgánico), lo que explicaría su inferior producción de biomasa y de productividad respecto al obtenido en el tratamiento N3.

En cuanto a los tratamientos elevados de N observamos que las plantas de judía tratadas con N4, N5 y N6 muestran concentraciones elevadas tanto en raíces como en hojas de NO_3^- y NH_4^+ sin que ello repercuta de forma negativa en la asimilación de N. Distintos trabajos han descrito como respuesta característica de la toxicidad de NO_3^- una inhibición de la absorción y asimilación de NO_3^- debido a la acumulación foliar de este anión y a la sobreproducción de aminoácidos. Estas dos consecuencias producidas por la toxicidad de N actuarían como señales para evitar por un lado la acumulación tóxica de NO_3^- , y por otro lado, el gasto energético innecesario de la asimilación de este anión (Crawford y Glas, 1998). Sin embargo, estos resultados en nuestra experiencia no se producen ya que como hemos descrito anteriormente la asimilación de N aumenta a medida que se incrementa la aplicación externa de N, encontrándonos las máximas actividades enzimáticas y los máximos compuestos nitrogenados orgánicos en el tratamiento N6.

Considerando estos resultados, sugerimos que las plantas de judía carecen de mecanismos eficaces que evitan la reducción de la absorción y asimilación de N cuando la acumulación intracelular de fracciones nitrogenadas inorgánicas (NO_3^- y NH_4^+) sobrepasan el poder de asimilación de éstas. Por lo tanto, la acumulación de NO_3^- y NH_4^+ que se produce a partir del tratamiento N4, y en especial en el tratamiento N6, podría ser la causa de la toxicidad que presentan estas plantas, lo que se reflejaría en la reducción de biomasa y productividad ya descritos en el apartado 4.1.

En definitiva, podemos definir a las plantas de judía incapaces de impedir la acumulación de NO_3^- y NH_4^+ cuando estas formas se presentan a concentraciones elevadas en el medio. Esta característica, las hace buenas candidatas como extractoras de estos iones en especial del NO_3^- tan perjudicial para el medio ambiente.

4.3.2. Vaínas y Semillas

La aparición de NO_3^- tanto en vaínas ($P > 0.05$; Figura 5) como en semillas ($P > 0.05$; Figura 5) solo se presentó con la aplicación de las dosis más elevadas de N, es decir con los tratamientos N5 y N6. Como es de sobra conocido, el NO_3^- es un anión que escasamente es transportado a través del floema hacia el fruto (Marschner et al., 1996), lo que explicaría la no detección de este anión ni en vaínas ni en semillas en los tratamientos inferiores al N5.

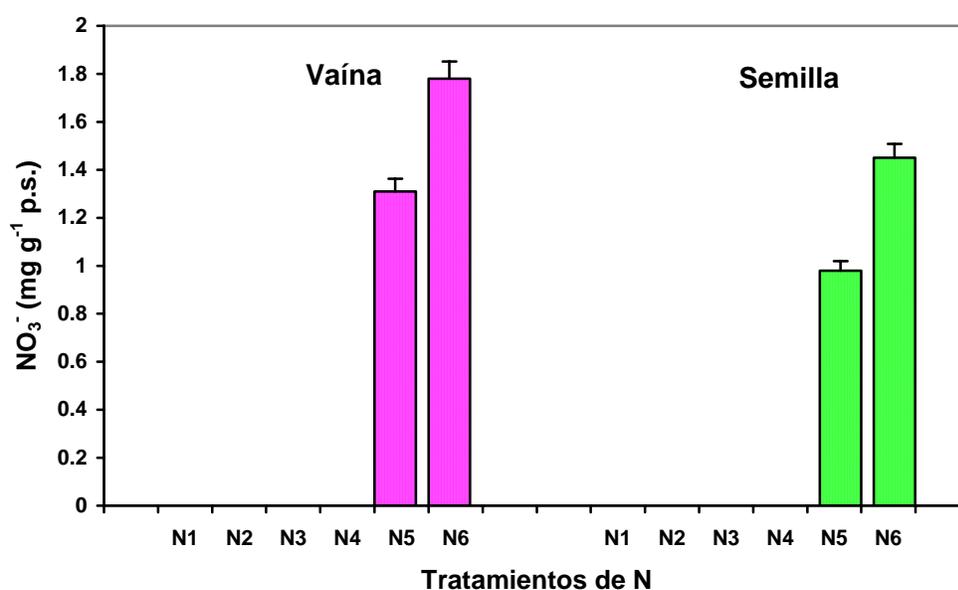


Figura 5. Acumulación de NO_3^- en vaínas y semillas de plantas de judía en respuesta a los tratamientos de N.

La aparición exclusivamente de NO_3^- en los frutos de las plantas tratadas con N5 y N6 se debe posiblemente a la existencia de toxicidad de NO_3^- en las hojas en estos tratamientos, es decir, en éstas la capacidad de asimilación de este anión posiblemente es inferior a su acumulación, lo que explicaría el transporte de NO_3^- hacia los frutos como mecanismo de reducción de la toxicidad en hojas. Por otro lado, resaltar que la mayor acumulación de NO_3^- en frutos se presentó en las semillas, debido a que éstas actúan como sumidero fisiológico mientras que las vaínas muestran por lo general una función de asimilación o de fuente dentro del fruto (Fader y Koller, 1985; Sánchez et al., 2002).

En cuanto al NH_4^+ su acumulación en el fruto se debe principalmente a una aplicación externa excesiva, y también aunque menos habitual, a la reducción de NO_3^- . En la Figura 6 podemos observar elevadas concentraciones de esta fracción nitrogenada principalmente en las plantas tratadas con N6, donde alcanza valores superiores a 4 mg g^{-1} p.s. tanto en vainas ($P < 0.01$, Figura 6) como en semillas ($P < 0.01$, Figura 6).

Por lo tanto, y teniendo en cuenta estos resultados, podría existir un efecto tóxico producido por la acumulación de NO_3^- y NH_4^+ en los tratamientos N5 y N6. La acumulación de estas fracciones nitrogenadas en frutos se ha relacionado con una disminución del crecimiento del fruto y con la aparición de deformaciones, lo que en definitiva afectaría como así ocurre a la productividad total y comercial (Mills y Benton Jones, 1996).

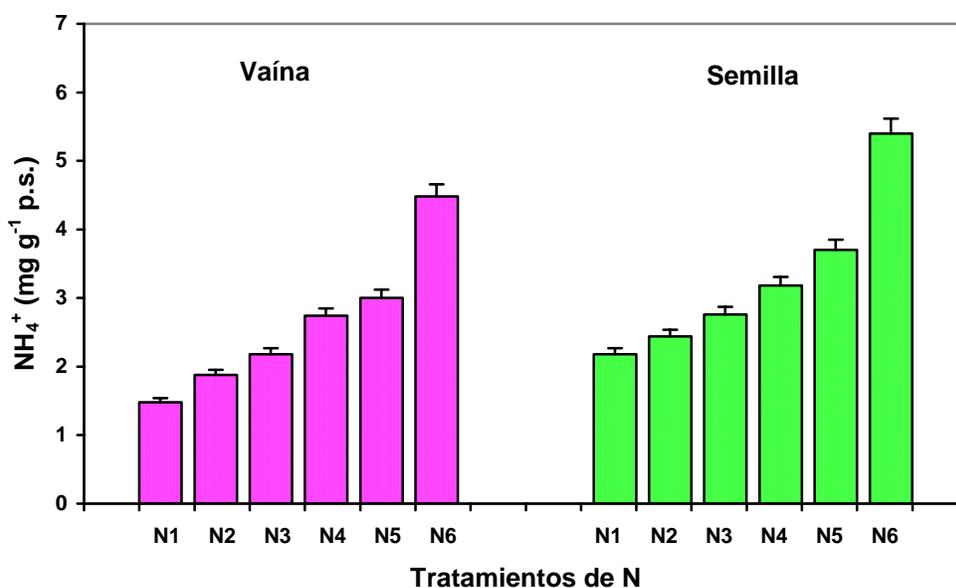


Figura 6. Acumulación de NH_4^+ en vainas y semillas de plantas de judía en respuesta a los tratamientos de N.

En cuanto a las enzimas NR y NiR, como indicamos anteriormente, son claves en la reducción de NO_3^- principalmente en hojas (Sivasankar y Oaks, 1996; Ruiz et al., 1998), mientras que en frutos generalmente no se realiza esta reducción de NO_3^- bajo condiciones normales, ya que el N incorporado a este órgano se realiza siempre en forma de

aminoácidos (Ho, 1996). No obstante, cuando existe un exceso de NO_3^- por la elevada aplicación del mismo al medio externo, éste puede ser transportado vía floema hacia los frutos (Ho, 1996). En nuestro experimento, como hemos indicado anteriormente, la presencia de NO_3^- se detectó solamente en los tratamientos N5 y N6, y fueron en éstos donde observamos actividades de las enzimas NR y NiR. Para ambas enzimas, las máximas actividades se obtuvieron en N6 tanto en vainas como en semillas (Tabla 3).

Tabla 4. Efecto de los tratamientos de N sobre las actividades enzimáticas de NR, NiR, GS, GOGAT y PEPCasa en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPCasa
Vainas					
N1	ND	ND	0.09	0.043	0.67
N2	ND	ND	0.13	0.052	1.89
N3	ND	ND	0.18	0.280	2.28
N4	ND	ND	0.21	0.337	4.23
N5	0.073	2.47	0.23	0.365	6.11
N6	0.098	2.68	0.25	0.507	8.84
Significación	***	**	*	***	***
Semillas					
N1	ND	ND	0.035	0.071	0.43
N2	ND	ND	0.040	0.082	0.57
N3	ND	ND	0.048	0.120	1.52
N4	ND	ND	0.059	0.226	1.77
N5	0.049	0.50	0.066	0.253	1.87
N6	0.098	0.54	0.106	0.518	2.07
Significación	***	*	**	***	**

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

Al igual que en raíces y hojas, la ruta principal de asimilación del NH_4^+ en frutos es el ciclo de la glutamina sintetasa (GS)/glutamato sintasa (GOGAT) (Sivasankar y Oaks, 1996; Migge y Becker, 1996). Estas actividades enzimáticas siguieron un patrón similar tanto en vainas como en semillas como podemos observar en la Tabla 3, presentando las máximas actividades en el tratamiento N6, con incrementos superiores al 60% en relación a las mínimas actividades encontradas en el tratamiento N1.

Como hemos mencionado ya en varias ocasiones una de las enzimas que participan en la asimilación del N es la GS, la cual ha sido detectada de forma importante en diferentes frutos (Gallardo et al., 1988; Loulakakis et al., 1994), por lo que se la considera una enzima esencial en la asimilación de NH_4^+ en estos órganos. Por el contrario, la enzima que cataliza la síntesis de glutamato (GOGAT) aunque ha sido detectada, sus actividades son inferiores a la GS en los frutos estudiados (Büker et al., 1998). En nuestro experimento, y al igual ocurría con la reducción de NO_3^- en los tratamientos N5 y N6, la mayor actividad de las enzimas encargadas de la asimilación del NH_4^+ (GS y GOGAT) se encontró principalmente en las vainas. También observamos que la presencia de NH_4^+ tanto en vainas como en semillas determina la actividad de estas dos enzimas (vainas: NH_4^+ -GS, $r = 0.96^{***}$; NH_4^+ -GOGAT, $r = 0.92^{***}$; semilla: NH_4^+ -GS, $r = 0.90^{***}$; NH_4^+ -GOGAT, $r = 0.86^{**}$), como ha sido reportado por Oaks (1994). Así mismo, comentar que en nuestro experimento, la enzima más importante en la asimilación de NH_4^+ fue la actividad GOGAT en comparación a GS.

La PEPCasa esta presente en semillas de diferentes especies y puede jugar en este órgano un papel esencial en la biosíntesis de aminoácidos. Se ha comprobado que existe una fuerte correlación entre la actividad PEPCasa y la concentración de proteína en semillas de diferentes cultivares de soja, indicando el papel limitante de la enzima PEPCasa en la acumulación de proteínas de almacenamiento en las semillas. Además, y usando técnicas de inmunolocalización, la PEPCasa fue detectada en los cuerpos de proteína de granos de trigo en desarrollo, posiblemente contribuyendo a la biosíntesis de proteína de almacenamiento (Saldras et al., 1993). En nuestro experimento, la aplicación de distintas dosis de N favorecieron que se encontraran diferencias significativas de la actividad PEPCasa en vainas (Tabla 3) y semillas (Tabla 3), presentando el tratamiento N6 las máximas actividades, con incrementos de 92% y 79%, respectivamente, en relación a N1. Además, y siguiendo el mismo comportamiento que el resto de las enzimas estudiadas, las vainas fueron los tejidos del fruto que presentaron la mayor actividad de esta enzima.

El desarrollo y crecimiento del fruto depende de la translocación de fotoasimilados desde las hojas hacia este sumidero fisiológico. Muchos estudios se han centrado durante estos años en la forma de estimular los sumideros fisiológicos durante las últimas fases de desarrollo

del fruto en relación al metabolismo y acumulación de la sacarosa (Mackown et al., 1990), mientras que el metabolismo de los aminoácidos durante la maduración de los frutos aún no es muy conocido. En general, se acepta que la glutamina y el glutamato son los principales aminoácidos translocados vía floema, siendo estos compuestos las formas nitrogenadas mayoritarias durante el desarrollo de los frutos (Marschner, 1995). En nuestro experimento, los compuestos nitrogenados de alto y bajo peso molecular (aminoácidos y proteínas), N orgánico y el N total en vainas y semillas aumentaron significativamente conforme se incrementaron las dosis de N, presentándose los máximos valores en el tratamiento N6 y los mínimos en N1 (Tabla 4). Además, resaltar que los contenidos de estos compuestos nitrogenados fueron más elevados en las semillas que en las vainas.

En resumen, comentar que las vainas tuvieron una función asimiladora, ya que este tejido presentó las máximas actividades de todas las enzimas implicadas en el metabolismo del N, mientras que en las semillas aunque existió asimilación, realmente este tejido funcionó como un sumidero fisiológico, explicándose las mínimas actividades enzimáticas y la máxima acumulación de aminoácidos, proteínas y N orgánico que se producen en este órgano.

En relación a los tratamientos, indicar que las plantas tratadas con N3 fueron las más eficaces en la utilización del N lo que se reflejó en una productividad óptima (ver apartado 4.1.). Además, en los frutos de estas plantas no se detectaron niveles de NO_3^- lo que asegura que su consumo no signifique riesgo alguno para la salud humana.

Tabla 5. Efecto de los tratamientos de N sobre la concentración de aminoácidos, proteínas, N orgánico y N total en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	Aminoácidos	Proteínas	N orgánico	N total
Vainas				
N1	0.25	2.25	29.01	30.49
N2	0.37	3.76	34.05	35.93
N3	0.60	4.21	38.02	40.24
N4	0.92	4.96	42.83	45.57
N5	0.99	5.38	57.44	61.75
N6	1.07	6.72	58.30	64.56
Significación	**	**	**	**
Semillas				
N1	1.01	3.77	35.55	37.73
N2	1.29	5.04	40.90	43.34
N3	2.10	5.78	46.02	48.83
N4	3.39	5.98	51.43	54.61
N5	5.98	6.55	58.95	63.63
N6	6.52	7.31	61.91	68.76
Significación	**	**	**	**

Aminoácidos y proteínas expresados en mg g^{-1} p.f.; N orgánico y N total expresados en mg g^{-1} p.s.

En cuanto a los tratamientos deficientes, N1 y N2, el déficit en la asimilación de N produjo una mínima producción de compuestos orgánicos nitrogenados en toda la planta, lo que redujo la producción de frutos. Finalmente, la toxicidad de N representada en los tratamientos N4, N5 y especialmente en N6, dio lugar a una acumulación importante de NO_3^- y NH_4^+ tanto en vainas como en semillas. Posiblemente, y como hemos indicado anteriormente, esta sea la causa principal de la disminución de la productividad en estas plantas caracterizadas por ser muy sensibles a la aplicación de dosis nitrogenadas elevadas (Cramer y Lewis, 1993; Andreeva et al., 1998).

4.4. METABOLISMO DEL FÓSFORO

4.4.1. Raíces y Hojas

El fósforo (P), después del N, es el segundo elemento nutricional limitante para el crecimiento de las plantas, oscilando su concentración alrededor del 0.2% del peso seco de la planta (Jeschke et al., 1996; Raghothama, 1999). Este macronutriente es un componente clave para muchas moléculas que participan en procesos básicos para las plantas, tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP (Schachtman et al., 1998). En nuestro experimento, la aplicación de diferentes dosis de N favorecieron significativamente a los niveles de P total y sus distintas fracciones en raíces y hojas (Tabla 6), presentando los mayores niveles en el tratamiento N4, con incrementos superiores al 22% en raíces y 18% en hojas, en relación a los menores niveles encontrados en los tratamientos N1 y N6. López-Cantarero et al. (1998) encontró un efecto positivo de la fertilización nitrogenada sobre el estado nutricional de fósforo total en plantas de berenjena. Esto fue debido a que uno de los procesos que facilita la absorción de nutrientes de baja movilidad, como es el caso del fósforo, es la acidificación de la rizosfera, por la liberación neta de H^+ , la cual toma lugar principalmente cuando las plantas son suplementadas con NO_3^- (Hoffland et al., 1989b; le Bot et al., 1990). En nuestro experimento, el N fue aplicado en la forma de NH_4NO_3 ; de este modo, el incremento de la dosis de N aparentemente estimuló la toma de P por la acidificación de la rizosfera.

Por otro lado, el efecto estimulativo del N sobre la absorción de P puede ser atribuido a: (1) la gran expansión radicular en respuesta a la aplicación de N, dado que la toma de nutrientes de baja movilidad como es el caso del P es profundamente influido por la morfología y fisiología de la raíz; (2) la disponibilidad del P en el suelo, es alterado por los cambios químicos y de acidez en la rizosfera; y (3) cambios fisiológicos estimulados por el N, los cuales influyen el transporte de P dentro de la planta (Adalsteinsson et al., 1994).

Las plantas pueden responder a la deficiencia de P en tres formas diferentes: (1) cambios en el patrón de crecimiento; (2) cambios en la actividad fisiológica y metabólica; y (3) cambios en la actividad de los sistema de transporte de Pi. Los cambios en el patrón de crecimiento puede ser observado por el preferencial alargamiento del sistema radicular en comparación de la parte aérea, lo cual implica una modificación en el patrón de distribución de fotoasimilados (Foyer y Spencer, 1986). La adaptación de las plantas a la deficiencia de P es compleja e involucra respuestas de la planta a nivel celular, tejido y de la planta completa (Israel y Rufty, 1988). Los eventos que incluyen la adaptación de la planta a ambientes deficientes de P son: (1) reducción del crecimiento de la planta, especialmente las hojas; (2)

incremento de las raíces fibrosas para la captación de P; (3) incremento de la actividad de fosfatasas; (4) incremento de las capacidades enzimáticas para el almacenamiento de almidón y sacarosa (y otros compuestos de fosfato libre); y (5) manteniendo el nivel de Pi en un rango adecuado para que no se afecte el proceso de fotosíntesis. Estas respuestas implican que la deficiencia de P limite la utilización de carbohidratos más que la limitación de la fotosíntesis.

Tabla 6. Efecto de los tratamientos de N sobre las distintas fracciones de P en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	P-total	P-inorgánico	P-Orgánico	P-lipídico	P-ARN	P-ADN	P-Protéico
soluble							
Raíces							
N1	549.11	236.11	137.27	71.38	49.41	32.94	21.96
N2	621.38	285.83	142.91	80.77	49.71	37.28	24.85
N3	686.29	329.41	150.98	82.35	54.90	41.17	27.45
N4	709.12	340.37	156.00	85.09	56.72	42.54	28.36
N5	613.99	325.41	116.65	61.39	55.25	30.69	24.55
N6	507.65	289.36	76.14	50.76	45.68	25.38	20.30
Significación	**	**	**	*	*	*	*
Hojas							
N1	386.09	154.43	100.38	50.19	34.74	27.02	19.30
N2	408.09	163.23	102.02	53.05	36.72	32.64	20.40
N3	449.01	188.58	107.76	58.37	40.41	31.43	22.45
N4	475.30	199.62	114.07	61.78	42.77	33.27	23.76
N5	417.68	187.95	87.71	50.12	41.76	29.23	20.88
N6	366.60	179.63	65.98	40.32	36.66	25.66	18.33
Significación	**	**	**	*	*	*	*

El P total y sus distintas fracciones son expresados en mg/ 100 g⁻¹ p.s.

Por otro lado, y en relación a las distintas fracciones de P analizadas en nuestra experiencia, el P inorgánico (Pi) mostró un comportamiento similar al del P total ante la aplicación de N (Tabla 11), presentando las máximas concentraciones de Pi en el tratamiento N4, con incrementos de 31 % y 22 % respectivamente, en comparación a las mínimas concentraciones encontradas en N1. Así mismo, indicar que el Pi es la fracción más importante respecto al P total en raíces y hojas de las plantas de judía, representando el 48 % y 42 % respectivamente. Theodorou y Plaxton (1993) mencionan que el P en su forma inorgánica (Pi) esta involucrado en el control de muchas reacciones enzimáticas y en la regulación de distintos procesos metabólicos.

Así como el P total, el Pi aumentó a medida que se incrementaron la dosis de N (Tabla 6). Existen dos opiniones contradictorias concernientes al comportamiento del Pi en respuesta

a más o menos absorción de P. Algunos investigadores sugieren que la diferencia en el estado nutricional de P en la planta altera el nivel de Pi en la hoja (Crafts-Brander, 1992), mientras otros autores afirman que el Pi es completamente independiente del estado de P (Foyer y Spencer, 1986). En nuestro experimento, la relación entre P total y Pi fue positivo y significativo en raíces ($r = 0.78^{**}$) y hojas ($r = 0.86^{**}$), implicando una dependencia del Pi sobre el estado nutricional del P (P total).

El hecho de que el Pi sea la fracción más importante del P total en las plantas de judía (Tabla 6), se debe probablemente a que es un componente mayoritario de la fracción soluble, que actúa como P de reserva para ser utilizado por la planta en los momentos de mayor actividad vegetativa, como es el crecimiento o formación de nuevos órganos, e incluso en la síntesis de aquellos compuestos que le son necesarios (Bielecki y Ferguson, 1983).

Con respecto a la fracción de P orgánico soluble, en nuestro experimento, los máximos niveles se presentaron en el tratamiento N4 (Tabla 6), con incrementos de 51 % y 42 % respectivamente, en relación a los bajos niveles obtenidos en el tratamiento N6. Por otro lado, esta fracción de P representa el 22 % y 24 % respectivamente del P total, lo que indica que es la segunda fracción más importante de P en las plantas de judía.

En cuanto al P-lipídico, la cual es considerada una fracción formadora de compuestos estructurales, podemos indicar que a medida que incrementamos las dosis de N, las concentraciones de P-lipídico aumentaron (Tabla 6), presentando los máximos niveles en el tratamiento N4, con incrementos del 40 % y 34 % respectivamente, en relación a los mínimos niveles obtenidos en el tratamiento N6. Comparando la fracción de P-lipídico con respecto al P total, esta fracción representa el 12 % y 14 % del total, por lo que se considera la tercera fracción de P más importante en las plantas estudiadas.

Dentro de las fracciones de P, se encuentran el P-ARN y el P-ADN, estas fracciones presentaron el mismo comportamiento que la fracción de P-lipídico, siendo el tratamiento N4 el que mostró las mayores concentraciones de P-ARN y P-ADN (Tabla 6), con incrementos superiores de 14 % y 22 % respectivamente, en comparación a las mínimas concentraciones obtenidas en el tratamiento N6. Así mismo, indicar que estas fracciones en comparación al P total representan el 6 % al 8 %, por lo que se consideran al P-ARN y P-ADN como la cuarta y quinta fracción de P más importante para las plantas de judía.

Finalmente, con lo que respecta a la fracción de P-proteico, esta fue influenciada por los tratamientos de N aplicado, presentando nuevamente el tratamiento N4 las mayores concentraciones de P-proteico (Tabla 6), con incrementos de 28 % y 22 % respectivamente,

en relación a las menores concentraciones obtenidas en el tratamiento N6. Así mismo, indicar que esta fracción representa el 4 % y 5 % del P total, por lo que se considera la sexta fracción de P más importante en las plantas de judía.

De los hechos experimentales deducimos, que los niveles de P que se producen por efecto de los tratamientos de N, se deben fundamentalmente a la acumulación de P inorgánico, en menor medida la de P orgánico soluble, P lípidico y finalmente el material genético (P-ARN, P-ADN y P-protéico).

Por otro lado, observamos que bajo condiciones de deficiencia de N existe mayor acumulación de Pi seguida de P orgánico soluble, mientras que en condiciones de toxicidad de N el comportamiento de estas fracciones es similar, con la excepción de que los niveles de Pi se ve favorecido su incremento a expensas de la disminución de la fracción de P orgánico soluble. Esto nos hace pensar que bajo condiciones de estrés, ya sea deficiencia y toxicidad de N, se requiere la formación y acumulación de Pi para tolerar dichas condiciones de estrés y que la planta en general pueda seguir funcionando de la mejor manera (Marschner, 1995).

Teniendo en cuenta los resultados de las distintas fracciones, deducimos que el tratamiento N4 fue el más eficiente en la utilización de P en las plantas de judía, mientras que los tratamientos N1 y N6 dieron lugar a las menores concentraciones (Tabla 6), probablemente debido al efecto negativo que ejercieron tanto las dosis deficientes como tóxicas de N sobre la absorción y transporte de P. En el caso de la toxicidad de N, éste efecto negativo se vio más favorecido por la concurrente presencia de NO_3^- , el cual suprime la acumulación de P en las vacuolas (Rabe y Lovat, 1984).

Por otro lado, indicar que tanto el P total y sus fracciones presentaron los mayores niveles en las raíces en comparación que las hojas (Tabla 6), esto probablemente se debió al transporte de estos compuestos fosforados desde las hojas hacia los frutos, teniendo éste una función de sumidero fisiológico.

La principal enzima que se está utilizando como bioindicador del P es la Actividad Fosfatasa Ácida (AFA). Esta enzima cataliza la hidrólisis de los esteres fosfato y su actividad podría tener relación con algún estímulo en la removilización del P (Smith y Chevalier, 1984). En nuestro experimento, podemos indicar que la aplicación de las dosis de N afecto significativamente a la actividad de la fosfatasa ácida en raíces ($P > 0.01$; Figura 7) y hojas ($P > 0.01$; Figura 7), presentando el tratamiento N4 las mínimas actividades con decrementos del 34% y 51% en raíces y hojas respectivamente, en comparación a las máximas actividades presentadas en los tratamientos N1 y N6.

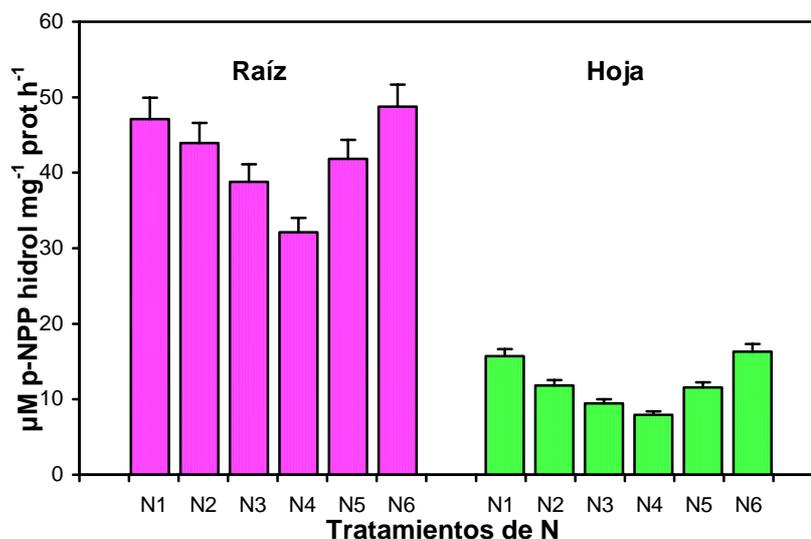


Figura 7. Influencia de los tratamientos de N sobre la actividad fosfatasa ácida en raíces y hojas de plantas de judía.

El aumento en los niveles de Pi en raíces y hojas por efecto de la aplicación de N (Tabla 6) es reflejada en la actividad fosfatasa ácida (Figura 7), dado que la actividad de esta enzima muestra una relación con el estado nutricional del P, y más específicamente con el Pi, muestra un aumento de la actividad fosfatasa ácida bajo condiciones de deficiencia y toxicidad de P (Barret-Lenard et al., 1993; Ruiz et al., 1996; López-Cantarero et al., 1998; Baghour et al., 2001). En nuestro experimento, la máxima actividad enzimática correspondió a los niveles más bajos de Pi, presentando una relación significativa entre estos dos parámetros en raíces ($r = -0.80^{**}$) y hojas ($r = -0.78^{**}$).

En resumen, indicar que las dosis deficientes y tóxicas de N se caracterizaron por presentar los niveles más bajos de las distintas fracciones de P, así como la mayor actividad fosfatasa ácida, esto debido a la influencia directa que se da entre los niveles de N y los de P. Por el contrario, el tratamiento N4 presentó los mayores niveles de las distintas fracciones de P y la menor actividad fosfatasa ácida. Finalmente, indicar que la mayor proporción de P en raíces y hojas está en la forma de Pi y P-orgánico soluble representando valores superiores al 65% en relación al P total.

4.4.2. Vaínas y Semillas

El N y P son elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Mattson et al., 1991; López-Cantarero et al., 1997), ya que el rendimiento está estrechamente

relacionado a la acumulación de N y P (Jeschke et al 1996). En nuestro experimento, el P total y sus fracciones se incrementaron a medida que se aplicaron las dosis crecientes de N, presentando los niveles más elevados en el tratamiento N4, con incrementos de 33% en vainas y 31% en semillas, en relación a los tratamientos N1 y N6 que dieron lugar en esta ocasión a los mínimos niveles de P total y sus fracciones (Tabla 7).

En relación a las distintas fracciones de P, indicar que el fitato (mio-inositol hexakisfosfato), es el mayor compuesto de P almacenado en las semillas, y es esencial para el crecimiento de las plántulas (Raboy et al., 2000). En nuestro experimento, el contenido de P-fitato fue influenciado significativamente por las dosis de N, presentando los mayores niveles en el tratamiento N4 (Tabla 7), con incrementos de 39% y 15% en semillas de judía, en relación a los menores niveles encontrados en los tratamientos N1 y N6. Por otro lado, indicar que los niveles de P-fitato representaron el 45% del P total, y que fue mucho mayor que el P inorgánico (24%). Estos últimos resultados coinciden con otros trabajos (Viveros et al., 2000) donde resaltan que la fracción de P más importante en las semillas es el P-fitato en comparación que P inorgánico. Godoy y Chicco (2005) mencionan que en las fuentes de origen vegetal el fósforo se encuentra principalmente en forma de fitatos y ácido fítico, que representa aproximadamente entre 50 y 80% del fósforo total del grano. El fósforo restante se encuentra formando parte de compuestos tales como fosfolípidos, fosfoproteínas y ácidos nucleicos, y una pequeña proporción (8-12%) como fosfatos inorgánicos. Sin embargo en la mayoría de las semillas de leguminosas el P-fitato constituye aproximadamente entre el 60 al 80% del fósforo total, y se localiza fundamentalmente en el cotiledón y ejes embrionarios. Estructuralmente su localización no es bien conocida. Según algunos autores está integrado con el cuerpo de proteínas formando complejos con proteínas y minerales (Yoon et al., 1996). Sin embargo, otros investigadores han indicado que en frijoles más del 70% del fitato se encuentra en formas solubles en agua, posiblemente combinadas con proteínas solubles, más que como fitina insoluble (Godoy y Chicco, 2005).

Por otro lado, indicar que la relación entre el P total y el P-fitato en semillas fue positivo y significativo ($r = 0.98^{***}$), implicando la dependencia del P-fitato sobre el estado nutricional de P en las semillas de judías.

Con respecto al P inorgánico (Pi), éste mostró un comportamiento similar al del P total ante la aplicación de N (Tabla 7), presentando las máximas concentraciones de Pi en el tratamiento N4, con incrementos de 44 % y 51 % respectivamente, en comparación a las mínimas concentraciones encontradas en N1. Por otro lado, indicar que el Pi es la segunda

fracción más importante después del P-fitato en vainas y semillas de las plantas de judía, representando el 40 % y 20 % respectivamente.

Tabla 7. Efecto de los tratamientos de N sobre las las distintas fracciones de P en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	P-total	Pi	P-Orgánico Soluble	P-lipídico	P-ARN	P-ADN	P-Protéico	P-fitato
Vainas								
N1	274.06	87.69	71.25	35.62	30.14	27.40	21.92	ND
N2	313.72	116.07	72.15	40.78	31.37	28.23	25.09	ND
N3	343.66	134.02	75.60	41.23	34.36	30.92	27.49	ND
N4	387.32	158.80	77.46	46.47	38.73	34.85	30.98	ND
N5	332.35	149.55	59.82	29.91	36.55	29.91	26.58	ND
N6	259.54	119.38	44.12	28.54	25.95	20.76	20.76	ND
Significación	**	**	**	*	*	*	*	--
Semillas								
N1	515.72	123.77	92.82	41.25	30.94	20.62	20.62	185.65
N2	607.23	127.51	97.15	42.50	36.43	30.36	24.28	248.96
N3	679.60	135.92	101.94	47.57	40.77	33.98	27.18	292.22
N4	707.25	141.45	106.08	49.50	42.43	35.36	28.29	304.11
N5	652.02	123.88	91.28	45.64	32.60	32.60	26.08	299.92
N6	486.91	68.16	58.42	34.08	24.34	24.35	19.47	258.06
Significación	**	**	**	*	*	*	*	*

El P total y sus distintas fracciones son expresados en mg/ 100 g⁻¹ p.s. ND = No detectado.

Por otro lado, la degradación del fitato por la enzima fitasa libera mio-inositol y Pi (Scott y Loewus, 1986). El inositol es utilizado *in situ* para la síntesis de la pared celular (Sasaki et al., 1989) y la síntesis de fosfatidilinositol (Helsper et al., 1984), mientras el Pi es translocado a los crecimientos de las partes apicales de las plántulas, cuando los constantes niveles de Pi por unidad de peso fresco son mantenidos (homeostasis de P) (Strother, 1990). El Pi liberado durante los procesos de utilización del fitato pudieran ser vinculado a los requerimientos de Pi durante el crecimiento posgerminativo (Sartirana y Bianchetti, 1967). La síntesis de *novo* de fitato puede compensarse incrementando los niveles de Pi endógeno o exógeno por la acumulación de fitato en cotiledones de judía, y estas respuestas fueron interpretadas en relación con la homeostasis de P (Organ et al., 1988).

Con respecto a la fracción de P orgánico soluble, en nuestro experimento, los máximos niveles se presentaron en el tratamiento N4 (Tabla 7), con incrementos de 43 % y 45 % respectivamente, en relación a los bajos niveles obtenidos en el tratamiento N6. Por otro lado,

esta fracción de P representa el 20 % y 15 % respectivamente del P total, lo que indica que es la tercera fracción más importante de P en las plantas de judía.

En cuanto al P-lipídico, la cual es considerada una fracción formadora de compuestos estructurales, podemos indicar que a medida que incrementamos las dosis de N, las concentraciones de P-lipídico aumentaron, presentando los máximos niveles en el tratamiento N4 (Tabla 7), con incrementos del 40 % y 34 % respectivamente, en relación a los mínimos niveles obtenidos en el tratamiento N6. Comparando la fracción de P-lipídico con respecto al P total, esta fracción representa el 12 % y 14 % del total, por lo que se considera la cuarta fracción de P más importante en las plantas de judía.

Una función del P es como un constituyente de estructuras macromoleculares, tales como el P-ARN y el P-ADN (Marschner, 1995), estas fracciones presentaron el mismo comportamiento que la fracción de P-lipídico, siendo el tratamiento N4 el que mostró las mayores concentraciones de P-ARN y P-ADN (Tabla 7), con incrementos superiores de 32 % y 40 % respectivamente, en comparación a las mínimas concentraciones obtenidas en el tratamiento N6. Así mismo, indicar que estas fracciones en comparación al P total representan el 9 % al 5 %, por lo que se consideran al P-ARN y P-ADN como la quinta y sexta fracción de P más importante para las plantas de judía.

Con lo que respecta a la fracción de P-proteico, esta fue influenciada por los tratamientos de N aplicado, presentando el tratamiento N4 las mayores concentraciones de P-proteico (Tabla 7), con incrementos de 33 % y 31 % respectivamente, en relación a las menores concentraciones obtenidas en el tratamiento N6. Así mismo, indicar que esta fracción representa el 8 % y 4 % del P total, por lo que se considera la séptima fracción de P más importante en las plantas de judía.

De acuerdo a los niveles de P total, P_i, P orgánico soluble, P-lipídico, P-ARN, P-ADN, P-proteico y P-fitato (únicamente en semillas), nosotros deducimos que el tratamiento N4 fue el más eficiente en la utilización de P en las plantas de judía, mientras que los tratamientos N1 y N6 dieron lugar a las menores concentraciones (Tabla 7), probablemente debido al efecto negativo que ejercieron tanto las dosis deficientes como tóxicas de N sobre la absorción y transporte de P hacia los frutos. En el caso de la toxicidad de N, éste efecto negativo se vio más favorecido por la concurrente presencia de NO₃⁻, el cual suprime la acumulación de P en las vacuolas (Lazame et al., 1984).

El crecimiento de la planta depende de un adecuado aporte de N para formar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. Se ha comprobado que

el crecimiento de la planta y el nivel de rendimiento son a menudo dependientes del aporte de dicho nutriente (Mattson et al., 1991; McDonald et al., 1996; López-Cantarero et al., 1997). Estos hechos indican la estrecha relación entre el rendimiento y el metabolismo del nitrógeno (Ruíz y Romero, 1998a), sin embargo el exceso de este a menudo da como resultado una pobre calidad de los frutos y una disminución del rendimiento comercial (Davenport, 1996; López-Cantarero et al., 1997). En nuestro estudio, encontramos que tanto la deficiencia y la toxicidad de N disminuyen el rendimiento comercial y la calidad del fruto, esto último reflejado en la disminución del contenido de P en forma de fitato en semillas, la cual juega un papel importante durante el proceso de germinación de la semilla. Así mismo, indicar que los fitatos en la forma de sales de K-Mg-Ca son también el principal sitio de almacenamiento del K y Mg, y en algunas casos también Ca y Zn (Scott y Loewus, 1986), se sabe hoy en día que una aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados, en especial a base de NH_4^+ producen problemas secundarios con frecuencia, tales como las deficiencias de K, Ca o Mg, lo cual pudiera verse reflejado en la menor concentración de fitato (Benton Jones, 1997).

Como ya indicamos anteriormente en la Introducción, que la actividad fosfatasa ácida (AFA) es uno de los bioindicadores más comúnmente usados para conocer el estado nutricional del P (Ruiz et al., 1996; López-Cantarero et al., 1998). En frutos, la AFA respondió significativamente a las diferentes dosis de N, presentando las máximas actividades en los tratamientos N1 y N6, con incrementos superiores al 47% en vainas y 21% en semillas, en comparación a las mínimas actividades encontradas en el tratamiento N4 ($P > 0.01$; Figura 8). Además, la correlación entre AFA y la fracción de Pi fue significativamente negativo (*Vainas*: AFA-P inorgánico, $r = -0.78^{**}$; *Semillas*: AFA-P inorgánico, $r = -0.76^{**}$).

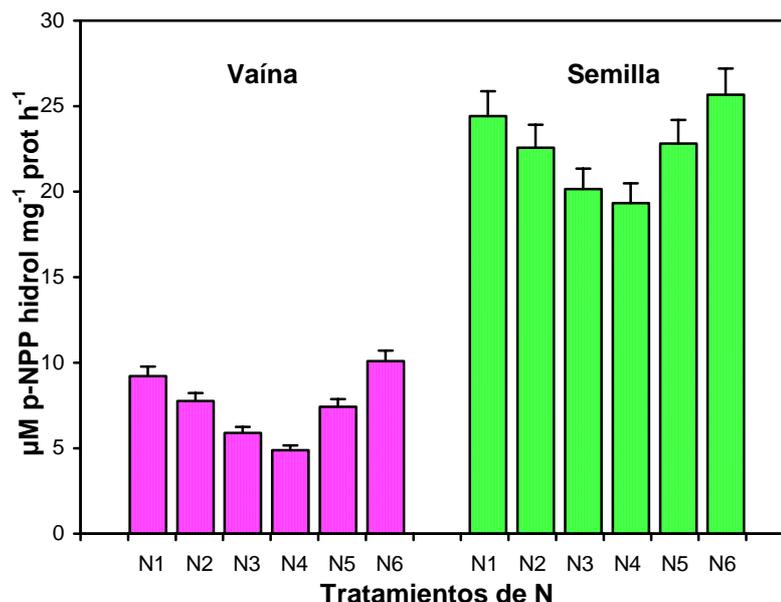


Figura 8. Influencia de los tratamientos de N sobre la actividad fosfatasa ácida en raíces y hojas de plantas de judía.

En cuanto a la actividad fitasa [mio-inositol-(1,2,3,4,5,6)-hexakisfosfato fosfohidrolasa] forma parte de una subfamilia de alto peso molecular de las histidinas fosfatasa ácidas que catalizan la hidrólisis del fitato a Pi y mio-inositol (Viveros et al., 2000). En nuestro experimento, la actividad fitasa se vio afectada significativamente por las dosis de N aplicadas, presentando los tratamientos N1 y N6 la máxima actividad, con incrementos superiores al 10% en semillas en comparación a la mínima actividad presentada en N4 ($P > 0.01$; Figura 9). Además, indicar que se encontró una relación negativa y significativa entre la fitasa y el contenido de P-fitato ($r = -0.94^{***}$); mientras que la relación fitasa y AFA fue positiva y significativa ($r = 0.90^{***}$), este último es debido a que ambas enzimas pertenecen a la misma subfamilia de las fosfatasa (Raboy et al., 2000).

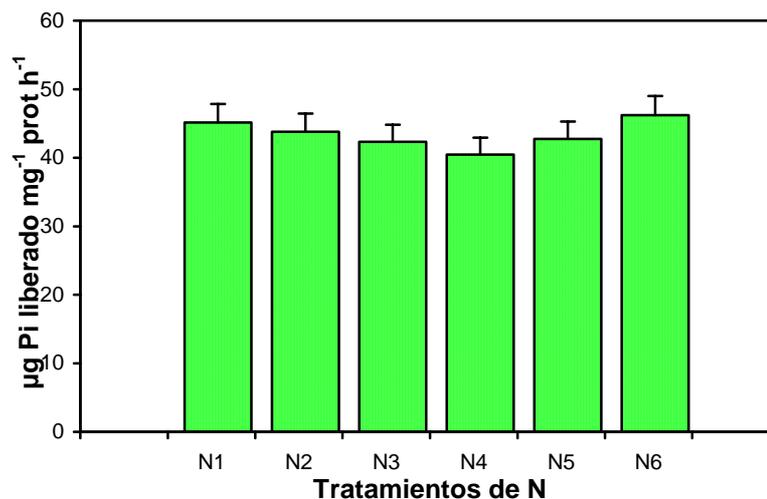


Figura 9. Influencia de los tratamientos de N sobre la actividad fitasa en semillas de plantas de judía.

En resumen, indicar que los tratamientos deficientes (N1) y tóxicos de N (N6) se caracterizaron por presentar los niveles más bajos de P total y sus fracciones, así como las máximas actividades de la fosfatasa ácida y fitasa (esta última únicamente detectada en semillas); mientras que los elevados niveles de P total y sus fracciones, junto con las mínimas actividades fosfatasa ácida y fitasa se obtuvieron en el tratamiento N4. Finalmente, resaltar que el P-fitato fue la fracción más importante del P total presente únicamente en las semillas de judía, la cual se puede considerar un bioindicador del estado nutricional de P.

4.5. METABOLISMO DE LOS CATIONES

4.5.1. Raíces y Hojas

Al igual que el N, el K⁺ es el nutriente esencial para las plantas (Daliparthy et al., 1994). Su comportamiento, a pesar de su naturaleza catiónica, es muy similar a la que presenta el P y el N, redistribuyéndose con suma facilidad de los órganos maduros a los juveniles dada su movilidad y baja afinidad por los ligandos orgánicos de los que fácilmente se intercambia (Jones y Mills, 1991). En nuestro experimento, la aplicación de diferentes dosis de N favorecieron significativamente la concentración del K en su forma total y soluble en raíces y hojas (Tabla 8), presentando los mayores niveles en el tratamiento N3, con incrementos del 40 % y 82 % en raíces, y 39 % y 64 % en hojas respectivamente, en relación a los menores niveles encontrados en el tratamiento N1.

Tabla 8. Efecto de los tratamientos de N sobre las concentraciones de los cationes K, Ca y Mg en sus formas totales y solubles en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	K total	K soluble	Ca total	Ca soluble	Mg total	Mg soluble
Raíces						
N1	18.58	2.03	15.05	5.12	5.56	1.15
N2	20.63	3.92	16.75	5.76	6.56	1.96
N3	31.19	11.13	20.44	9.25	8.72	2.13
N4	27.64	8.03	21.36	10.43	11.98	5.24
N5	25.80	6.68	19.58	8.50	12.74	6.31
N6	22.88	5.71	18.30	7.49	10.25	3.67
Significación	**	**	*	*	*	*
Hojas						
N1	20.41	5.43	18.46	11.46	6.72	2.70
N2	23.02	7.27	19.51	12.06	7.02	3.17
N3	33.67	15.09	21.29	14.98	9.29	4.71
N4	29.32	13.40	22.46	15.47	14.50	6.37
N5	27.50	11.40	20.74	13.62	16.04	8.10
N6	25.88	9.79	20.35	13.29	11.33	5.82
Significación	**	**	*	*	**	*

El K, Ca y Mg total y su forma soluble son expresados en mg g⁻¹ p.s.

Al igual que el N, el K⁺ es el ion que se necesita en mayor cantidad en las plantas (Pettigrew y Meredith, 1997). Las plantas pueden tolerar un exceso de nitrato en mucho mayor grado que el exceso de amonio. Los niveles de amonio pueden ser tóxicos para las plantas si no son incorporados a compuestos de carbono-nitrógeno después de la absorción. El amonio puede restringir también la captación de K por competir por los

lugares de absorción en la raíz (Benton Jones, 1999). En nuestro estudio, se observó que a medida que incrementamos la dosis de N hasta el tratamiento N3, se aumentó la absorción, transporte y acumulación K total y soluble en raíces y hojas (Tabla 8), sin embargo, bajo elevadas dosis de N (N4, N5 y N6), la acumulación de K total y soluble en ambos órganos disminuyó, esto fue debido a que existen niveles elevados de NH_4^+ en la solución nutritiva aplicada de los tratamientos N4, N5 y N6, y este catión compite por los sitios de acción con el K a nivel de absorción, provocando una disminución de los niveles de K en ambos órganos. Nuestros resultados concuerdan con los encontrados por Benton Jones (1999) quien menciona que la aplicación elevada de NH_4^+ tiende a deprimir la concentración de K debido a dos razones: (1) que interfiere con la difusión del K desde las capas de arcillas del suelo, y (2) compite con la captación del K.

Por otro lado, comentar que los niveles de K total y soluble fueron mayores en las hojas que en las raíces, debido a que este catión presenta una elevada movilidad, lo que permite realizar un eficiente transporte del K desde las raíces hacia las hojas.

Con respecto al catión Calcio, en nuestro estudio la aplicación de las diferentes dosis de N favorecieron de manera positiva y significativa la concentración de Ca total y soluble (Tabla 8), presentando los máximos niveles en el tratamiento N4, con aumentos del 30 % y 50 % en raíces, y 18 % y 26 % en hojas respectivamente, en relación a los mínimos niveles obtenidos en el tratamiento N1.

La captación de Ca se ve afectada por la fuente nitrogenada utilizada, por ejemplo, la aplicación de N en forma de NO_3^- generalmente está asociada con un incremento en la absorción y transporte de algunos iones, especialmente de Ca y K; sin embargo, cuando la fuente nitrogenada es NH_4^+ , la captación de Ca se ve afectada (Mengel y Kirkby, 2001). En nuestro estudio, observamos que a medida que se incrementaba la dosis de N, los niveles de Ca total y soluble en raíces y hojas aumentaron hasta el tratamiento N4 (Tabla 8) y posteriormente disminuyeron drásticamente, esto probablemente se deba a que los niveles elevados de NH_4^+ tienen un efecto antagónico con el Ca a nivel de absorción y transporte.

Por otro lado, se observa en nuestro estudio, que los niveles de Ca total y soluble son muy similares en raíces y hojas, debido probablemente a que este catión presenta poca movilidad en la planta.

Con respecto al catión Magnesio, en nuestra experiencia, se observó que la aplicación de las distintas dosis de N tuvo un comportamiento similar al K (Tabla 8),

presentándose las mayores concentraciones en el tratamiento N5, con incrementos del 56% y 82% en raíces, y 58% y 66% en hojas respectivamente, en relación a las menores concentraciones encontradas en el tratamiento N1.

Al igual que el K y Ca, el Mg también es afectado por la fuente nitrogenada aplicada, especialmente por el NH_4^+ (Mengel y Kirkby, 2001). En nuestro estudio, observamos que la dosis elevadas de N (N5 y N6) disminuyó drásticamente la concentración de Mg total y soluble en raíces y hojas (Tabla 8), lo que indica que los niveles elevados de NH_4^+ en la solución nutritiva compiten por los sitios de acción con el Mg a nivel de absorción. Por otro lado, comentar que los niveles de Mg en las hojas fueron mayores que en la raíz, debido probablemente a la movilidad que tiene este catión, lo que facilita el transporte desde las raíces hacia las hojas (Benton Jones, 1999).

En general, los tratamientos deficientes de N (N1 y N2) se caracterizaron por presentar la menor acumulación de K, Ca y Mg en raíces y hojas, lo cual se reflejó en la menor producción de biomasa en las plantas de judía; mientras la dosis considerada óptima de N (N3) junto con el tratamiento N4, presentaron la mayor acumulación de estos cationes, así como la mejor producción de biomasa. Finalmente, las dosis elevadas de N (N5 y N6) se caracterizaron por presentar una drástica disminución en la acumulación de K, Ca y Mg, así como una menor producción de biomasa en las plantas de judía. Esto último se debió a que los tratamientos elevados de N (N5 y N6), presentaron altos niveles de NH_4^+ en la solución nutritiva aplicada a las plantas de judía, esta toxicidad de NH_4^+ puede afectar en orden decreciente la absorción y translocación de los cationes K, Ca y Mg, lo cual concuerda con Gerendás et al. (1997), quien menciona que la toxicidad de NH_4^+ puede producir deficiencias por acción antagónica con otros nutrientes, especialmente cationes como K, Ca y Mg.

Una de las enzimas utilizadas como bioindicadores del estado nutricional de los cationes (K, Ca y Mg) es la actividad Piruvato Kinasa (Bar-Akiva et al., 1976; Lavon et al., 1988; Pulgar et al., 1996; Ruiz et al., 1999). Ésta enzima cataliza la síntesis de piruvato y ATP a partir del PEP y del ADP (Podestá y Plaxton, 1991). El papel de esta enzima es esencial, puesto que es el primer lugar de control de la glicólisis, proceso determinante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Plaxton et al., 1993; Huppe y Turpin, 1994; Podestá y Plaxton, 1994a,b). Estudios sobre la cinética de esta enzima revelan que su activación depende de los niveles de PEP, ADP, y de la presencia de cationes como el K y el Mg (Podestá y Plaxton, 1991; Ruiz et al., 1999).

Como indicábamos, uno de los objetivos de esta tesis era determinar si en nuestra experiencia la actividad PK (PK) refleja el nivel de cationes en diferentes órganos analizados, y si está influenciada por los tratamientos de N. En nuestro experimento, las actividades de la Piruvato Kinasa basal (PK-basal) y las inducidas con K (PK-K), Ca (PK-Ca) y Mg (PK-Mg) incrementaron a medida que se fue aumentando la fertilización nitrogenada, presentándose las máximas actividades en el tratamiento N6, tanto en raíces como en hojas, con incrementos superiores al 16% para la actividad PK-basal, 29 % para PK-K, 30 % para PK-Ca y del 33 % para la actividad PK-Mg, en relación a las mínimas actividades encontradas en el tratamiento N1 ($P < 0.01$; Tabla 9). Por lo tanto, y teniendo en cuenta la dependencia que muestra la actividad PK a la presencia de cationes, esta enzima ha sido utilizada como un bioindicador de los niveles de éstos cationes (K, Mg y Ca) en diferentes órganos estudiados (Bar-Akiva et al., 1976; Lavon et al., 1988; Pulgar et al., 1996; Ruiz et al., 1999, 2002). En nuestro experimento, se encontró una relación positiva y significativa entre el contenido de K, Ca y Mg, y las actividades enzimáticas de la PK-basal en ambos órganos (*raíces*: K total-PK basal, $r = 0.90^{**}$; Ca total-PK basal, $r = 0.81^{**}$; Mg total- PK basal, $r = 0.80^{**}$; K soluble-PK basal, $r = 0.92^{**}$; Ca soluble- PK basal, $r = 0.85^{**}$; Mg soluble- PK basal, $r = 0.84^{**}$; *hojas*: K total-PK basal, $r = 0.92^{**}$; Ca total-PK basal, $r = 0.86^{**}$; Mg total- PK basal, $r = 0.84^{**}$; K soluble-PK basal, $r = 0.94^{***}$; Ca soluble- PK basal, $r = 0.90^{**}$; Mg soluble- PK basal, $r = 0.87^{**}$). Similares resultados han sido mencionados por otros autores que han trabajado con diferentes especies y órganos analizados (Lavon y Goldschmidt, 1999; Ruiz et al., 1999, 2000, 2002).

Varios estudios sugieren que la actividad PK pudiera ser un buen indicador fisiológico de los contenidos de K, Mg y Ca en tejido vegetal (Bar-Akiva et al., 1976; Pulgar et al., 1996; Lavon y Goldschmidt, 1999; Ruiz et al., 1999, 2000, 2002). En nuestro estudio, presentamos en la Tabla 9 las actividades PK estimuladas con K, Ca y Mg, así como los incrementos y decrementos en estas actividades con respecto a la actividad PK basal. La actividad PK fue estimulada con K con el tratamiento N6 en ambos órganos, alcanzando su máxima actividad, así como el mayor incremento (19 % en raíces y 22 % en hojas) con respecto a la actividad PK basal en el mismo tratamiento, posiblemente reflejando niveles de deficiencia de K en N6 debido a las elevadas concentraciones de NH_4^+ en la solución nutritiva aplicada y en la planta (Bar-Akiva et al., 1976; Lavon et al., 1988; Pulgar et al., 1996). La tendencia contraria ocurrió en el

tratamiento N1 tanto en raíces y hojas, debido posiblemente a los niveles elevados de K, una condición que pudiera inhibir la actividad PK debido a la acción directa del K sobre esta enzima o debido al antagonismo entre el NH_4^+ y el K. Finalmente, en el tratamiento N3 de ambos órganos, la actividad PK estimulada con K, mostró un mínimo cambio (alrededor del 1 % en raíces y hojas) con respecto a la actividad basal, indicando condiciones apropiadas de este catión (Bar-Akiva et al., 1976; Lavon et al., 1988; Pulgar et al., 1996).

El comportamiento de la PK estimulada por Ca (Tabla 9) fue similar a la actividad PK estimulada por K en ambos órganos (Tabla 9), siendo el tratamiento N6 el que alcanzó la máxima actividad, así como el mayor incremento (12 % en raíces y 15 % en hojas) con respecto a la actividad PK basal en el mismo tratamiento, lo cual pudiera reflejar niveles de deficiencia de Ca en N6 debido principalmente a: (1) los niveles elevados de NH_4^+ que provocaron una disminución en la absorción de Ca; (2) fuerte competición entre Ca y los cationes K y Mg, la presencia de cualquiera de ellos es esencial para la actividad PK; (3) un incremento en la formación de complejos entre Ca y los sustratos de PK (Ca-PEP y Ca-ADP), los cuales pudieran disminuir la afinidad de éste con la enzima y por lo tanto su actividad (Podestá y Plaxton, 1992); y (4) finalmente, una disminución del metabolismo nitrogenado en este tratamiento (Ruiz et al., 1999). Por el contrario, en el tratamiento N1, se tuvo un decremento de la actividad PK estimulada por Ca (-5 % en raíces y -4 % en hojas) con respecto a los valores de la PK basal, sugiriendo que la concentración foliar de Ca en ambos órganos fueron adecuados. Ruiz et al. (2000) trabajando con aplicaciones de Ca en plantas de tabaco, encontraron que el incremento en la aplicación de Ca disminuyó el contenido de K y Mg en hojas, y disminuyó la actividad de la PK, por lo que sugieren a la actividad de esta enzima como un bioindicador del contenido de Ca, Mg y K.

En cuanto a la actividad PK estimulada por Mg, en nuestro estudio, ésta presentó un comportamiento similar a la actividad PK estimulada por K y Ca (Tabla 9). La única característica notoria fue que los incrementos o decrementos de la actividad PK inducida por Mg en raíces y hojas fueron de menor intensidad que los registrados por K y Ca. Esto pudiera ser debido en primer lugar, a que los niveles elevados de NH_4^+ tienen un efecto más negativo sobre la concentración de K y Ca, y en menor grado sobre Mg; y en segundo lugar, a que la cinética de activación de la PK depende de la presencia de cationes, en especial de Mg (Podestá y Plaxton, 1991, 1992; Day y Copeland, 1993).

Tabla 9. Influencia de los tratamientos de N sobre la actividad Piruvato Kinasa (PK) en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	PK basal	PK-K	PK-Ca	PK-Mg
Raíces				
N1	19.51	18.04 (-7.53%)	18.50 (-5.17%)	19.08 (-2.20%)
N2	20.15	19.25 (-4.46%)	19.56 (-2.92%)	19.90 (-1.24%)
N3	21.50	21.75 (+1.16%)	22.16 (+3.06%)	22.45 (+4.41%)
N4	23.06	26.35 (+14.26%)	24.11 (+4.55%)	24.25 (+5.16%)
N5	24.91	28.68 (+15.13%)	26.35 (+5.78%)	26.44 (+6.14%)
N6	25.73	30.70 (+19.31%)	28.77 (+11.81%)	27.76 (+7.88%)
Significación	*	**	**	**
Hojas				
N1	16.16	15.25 (-5.63%)	15.54 (-3.83%)	15.77 (-2.41%)
N2	16.76	15.96 (-4.77%)	16.30 (-2.74%)	16.45 (-1.84%)
N3	17.82	18.04 (+1.23%)	18.35 (+2.97%)	18.62 (+4.48%)
N4	18.25	20.32 (+11.34%)	19.46 (+6.63%)	19.87 (+8.87%)
N5	18.86	21.96 (+16.43%)	20.36 (+7.95%)	20.88 (+10.71%)
N6	19.20	23.45 (+22.13%)	22.15 (+15.36%)	22.76 (+13.33%)
Significación	*	**	**	**

Las actividades PK basal e inducida con K (PK-K), Ca (PK-Ca) y Mg (PK-Mg) son expresadas nM pirúvico mg^{-1} proteína min^{-1} . Los valores en paréntesis representan los incrementos (+%) o decrementos (-%) de las actividades PK inducidas por K, Ca y Mg en comparación a la actividad PK basal.

En resumen, según los resultados de la actividad PK inducida con K, Ca y Mg, nos indica que existe una necesidad fisiológica de estos cationes, en especial bajo los tratamientos elevados de N (N4, N5 y N6), debido al efecto antagónico que ejerce los elevados niveles de NH_4^+ sobre la absorción de K, Ca y Mg.

Con lo que se refiere a la ATPasa plasmática de la raíz, juega un papel central en la fisiología de las plantas. La actividad ATPasa en la raíz, actúa principalmente en la membrana plasmática, favoreciendo el transporte de iones (Terry et al., 1989). Una relación directa ha sido encontrada entre la actividad ATPasa y la concentración de cationes como K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en la raíz. Además, la actividad ATPasa es estimulada por la presencia de cationes, siendo el K^+ el más efectivo (Sklenar et al., 1994). En nuestra experiencia, la aplicación de las diferentes dosis de N conllevo un aumento estadísticamente significativo de las actividades ATPasa basal (ATPasa-basal) y las inducidas con K (ATPasa-K), Ca (ATPasa-Ca) y Mg (ATPasa-Mg) en raíces ($P < 0.01$; Tabla 10), obteniéndose las máximas actividades en el tratamiento N6, con aumentos del 12 %, 27 %, 24 % y 21 % respectivamente, en relación a N1 que dio lugar a las mínimas actividades ($P < 0.01$; Tabla 10). La actividad ATPasa siguió un

comportamiento similar a la PK radicular, lo que refleja el nivel de cationes en raíces, por lo que se consideran buenos bioindicadores fisiológicos de estos cationes, esto concuerda con los estudios realizados por Lavon y Goldschmidt (1999), Ruiz et al. (1999, 2002).

Serrano (1989) y Dunlop y Gardiner (1993) sugieren que la actividad ATPasa plasmática pudiera ser un buen indicador fisiológico de los contenidos de K, Mg y Ca en tejido vegetal. En nuestro estudio, la aplicación de diferentes dosis de N favoreció la actividad ATPasa plasmática en presencia de K, presentando las mínimas actividades en el tratamiento N1 (Tabla 10), coincidiendo con las bajas concentraciones de K total y soluble en raíces (Tabla 8). Además, independientemente de los tratamientos de N aplicados, las actividades de la ATPasa en presencia de K fueron mayores que las actividades de la ATPasa basal (Tabla 10). La actividad ATPasa es estimulada principalmente por cationes monovalentes, siendo el K⁺ más efectivo (Terry et al., 1989), principalmente porque este catión incrementa la afinidad de la ATPasa por el ATP (González de la Vara et al., 1992). Sin embargo, Lindberg y Yahya (1994) y Ruiz et al. (2002) encontraron que el K⁺ estimula la actividad ATPasa bajo condiciones limitantes o inadecuadas de nutrientes, particularmente con respecto al K. Estas conclusiones podrían explicar la estimulación de la actividad ATPasa en presencia de K con respecto a la actividad basal, en todos los tratamientos de N, especialmente en las dosis elevadas de N (N4, N5 y N6). Finalmente, nuestros resultados podrían indicar un inadecuado estado nutricional del K en las raíces de plantas de judía crecidas bajo nuestras condiciones nutricionales.

En cuanto a la actividad de la ATPasa en presencia de Calcio, la máxima actividad ATPasa fue observada en las plantas donde se les aplicó los tratamientos elevados de N (N6), presentando incrementos de 24 % respecto a N1. Por otro lado, la ATPasa incremento significativamente su actividad en presencia de Ca en relación a la ATPasa basal (Tabla 10). Estos resultados concuerdan con Terry et al. (1989) y Ruiz et al. (2002), quienes registraron que la actividad ATPasa es estimulada en menor grado por Ca que por K, con algunos casos registrando una inhibición de la actividad enzimática. Sin embargo, nuestros resultados podrían ser explicados por el inadecuado estado nutricional de Ca en raíces de judía bajo nuestro experimento.

Tabla 10. Influencia de los tratamientos de N sobre la actividad ATPasa en raíces de plantas de judía.

Tratamiento	ATPasa basal	ATPasa-K	ATPasa-Ca	ATPasa-Mg
Raíces				
N1	32.68	31.04 (-5.01%)	31.55 (-3.45%)	31.87 (-2.47%)
N2	33.61	32.69 (-2.73%)	32.89 (-2.14%)	33.25 (-1.07%)
N3	34.83	35.25 (+1.20%)	35.77 (+2.69%)	36.11 (+3.67%)
N4	35.15	37.72 (+7.31%)	36.35 (+3.41%)	36.86 (+4.86%)
N5	36.45	39.80 (+9.19%)	38.45 (+5.48%)	38.78 (+6.39%)
N6	37.16	42.78 (+15.12%)	41.36 (+11.30%)	40.54 (+9.09%)
Significación	*	*	*	*

Las actividades ATPasa basal e inducida con K (ATPasa-K), Ca (ATPasa-Ca) y Mg (ATPasa-Mg) son expresadas $\mu\text{M Pi liberado mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$. Los valores en paréntesis representan los incrementos (+%) o decrementos (-%) de las actividades ATPasa inducidas por K, Ca y Mg en comparación a la actividad ATPasa basal.

En relación a la actividad ATPasa estimulada por Mg, ésta presentó un comportamiento parecido a la actividad ATPasa estimulada por K y Ca (Tabla 10). La única característica notoria fue que los incrementos o decrementos de la actividad ATPasa inducida por Mg en raíces fue de menor intensidad que los registrados por K y Ca. Esto pudiera ser debido en primer lugar, a que los niveles elevados de NH_4^+ tienen un efecto más negativo sobre la concentración de K y Ca, y en menor grado sobre Mg; y en segundo lugar, a que la cinética de activación de la ATPasa depende de la presencia de cationes, en especial de Mg (Podestá y Plaxton, 1991, 1992; Day y Copeland, 1993).

El contenido de cationes en la raíz está predeterminado por el transporte de los iones a través de la membrana plasmática y éste requiere la participación de la ATPasa (Serrano, 1989; Dunlop y Gardiner, 1993). Se ha demostrado que la ATPasa basal en las raíces refleja el transporte de iones, y en algunos casos muestra una relación directa entre la actividad de esta enzima y la concentración de cationes en las raíces (Sklenar et al., 1994). En nuestra experiencia, se encontró una correlación positiva y significativa entre la actividad ATPasa basal y los contenidos de K, Ca y Mg en raíces (K total- ATPasa basal, $r = 0.92^{**}$; Ca total- ATPasa basal, $r = 0.90^{**}$; Mg total- ATPasa basal, $r = 0.84^{**}$; K soluble- ATPasa basal, $r = 0.94^{**}$; Ca soluble- ATPasa basal, $r = 0.92^{**}$; Mg soluble- ATPasa basal, $r = 0.87^{**}$).

En resumen, indicar que bajo condiciones deficientes de N (N1 y N2) se caracterizaron por presentar la menor acumulación de K, Ca y Mg en su forma total y soluble, así como las mínimas actividades PK y ATPasa inducidas por K, Ca y Mg, con

respecto a la actividad PK y ATPasa basal; lo cual indica condiciones cercanas a las óptimas de estos cationes. En el caso de la dosis de N considerada óptima (N3) se caracterizó por presentar una concentración intermedia para K, Ca y Mg en sus formas totales y solubles, así como para sus bioindicadores fisiológicos, indicando niveles apropiados de K, Ca y Mg. Con lo que se refiere a los tratamientos elevados de N (N4, N5 y N6) se caracterizaron por presentar las plantas de judía concentraciones decrecientes de K, Ca y Mg total y soluble tanto en raíces como en hojas, sin embargo, las actividades PK y ATPasa inducidas con K, Ca y Mg se incrementaron alcanzando sus máximas actividades con respecto a la PK y ATPasa basal; lo que indica una necesidad fisiológica de estos cationes en los tratamientos elevados de N (N4, N5 y N6). Finalmente, la actividad ATPasa basal e inducida con K, Ca y Mg siguió un comportamiento similar a la actividad PK, lo que reflejan ambas el nivel de cationes en raíces y en hojas, por lo que se consideran buenos bioindicadores fisiológicos de estos cationes.

4.5.2. Vainas y Semillas

El potasio es uno de los macronutrientes esenciales para las plantas y el que más directamente influye sobre la calidad del fruto (Maschner, 1995). El K es frecuentemente descrito como el “elemento calidad” para la producción de cultivos, ya que con una deficiencia de K, la fotosíntesis, respiración y la translocación de compuestos orgánicos disminuyen (Benton Jones, 1999). Además, una deficiencia de K provoca una reducción del número de frutos y una reducción del tamaño de los mismos (Mengel y Kirkby, 2001). En nuestro experimento, al igual que lo observado en raíces y hojas de las plantas de judía, la aplicación de diferentes dosis de N favorecieron significativamente la concentración del K en su forma total y soluble en vainas y semillas (Tabla 11), presentando los mayores niveles en el tratamiento N3, con incrementos del 37 % y 54 % en vainas, y 35 % y 57 % en semillas respectivamente, en relación a los menores niveles encontrados en el tratamiento N1.

Al igual que el N, el K^+ es el ion que se necesita en mayor cantidad en las plantas. Además, la nutrición con K siempre ha sido ligada a los factores de calidad en muchos cultivos (Pettigrew y Meredith, 1997). Sin embargo, se ha visto que elevadas dosis de N pueden afectar la absorción de K, en especial si la fuente nitrogenada

aplicada es en forma de NH_4^+ (Benton Jones, 1999). En nuestro estudio, se observó que a medida que incrementamos la dosis de N hasta el tratamiento N3, se aumentaba el transporte y acumulación de K total y soluble en vainas y semillas (Tabla 11), no obstante, bajo elevadas dosis de N (N4, N5 y N6), la acumulación de este catión disminuía, esto probablemente se deba a que existen niveles elevados de NH_4^+ por efecto de las elevadas dosis de N (N4, N5 y N6) y este catión pudiera estar compitiendo por los sitios de acción del K a nivel de transporte, lo cual provoca una disminución de los niveles de K en vainas y semillas. Así mismo, Benton Jones (1999) menciona que una toxicidad de NH_4^+ se caracteriza por un mal funcionamiento del tejido vascular, lo cual se traduce en un ineficiente transporte de K hacia los sumideros fisiológicos, en particular hacia los frutos. Además, para el crecimiento del fruto, la movilidad de nutrientes inorgánicos y compuestos orgánicos a través del floema es fundamental (Foyer y Galtier, 1996; Ho, 1996). El catión predominante en los frutos es K, debido principalmente a su gran movilidad a través del floema (Marschner et al., 1996).

Tabla 11. Efecto de los tratamientos de N sobre las concentraciones de los cationes K, Ca y Mg en sus formas totales y solubles en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	K total	K soluble	Ca total	Ca soluble	Mg total	Mg soluble
Vainas						
N1	21.13	7.97	7.46	2.96	7.51	4.75
N2	24.45	9.28	8.67	3.16	8.76	5.31
N3	33.35	17.31	11.87	6.25	9.44	6.28
N4	30.81	14.50	12.47	6.96	10.65	7.45
N5	28.21	12.69	11.29	5.45	12.76	10.19
N6	26.98	10.79	9.98	4.19	11.88	8.43
Significación	**	**	*	*	*	*
Semillas						
N1	22.51	8.20	15.13	6.67	12.29	4.27
N2	24.48	10.61	17.96	7.16	13.55	5.31
N3	34.65	18.85	19.21	8.06	15.34	7.33
N4	31.12	15.73	24.54	11.13	16.81	8.36
N5	29.38	13.21	22.34	10.45	19.39	11.64
N6	27.91	11.74	21.88	9.96	17.21	9.63
Significación	**	**	*	*	*	*

El K, Ca y Mg total y su forma soluble son expresados en mg g^{-1} p.s.

El floema es el tejido conductor más importante que transporta agua y nutrientes para el desarrollo de la semilla, la movilidad de los nutrientes en el fluido del floema es

un factor importante en la nutrición del desarrollo del embrión dentro de la semilla (Marschner, et al., 1996). En nuestro experimento, los niveles de K total y soluble fueron mayores en las semillas que en las vainas debido a que este catión presenta una elevada movilidad, lo que permite realizar un eficiente transporte del K desde las vainas a la semilla. Además, que este catión en las semillas de judía juega un papel importante, ya que forma parte de las sales del ácido fítico, las cuales se conocen como fitato y sirven como fuentes de reserva de nutrientes, siendo esenciales para el crecimiento de las plántulas (Raboy et al., 2000).

Marschner (1995) menciona que las plantas deficientes en K^+ presentan frutos pequeños, la superficie es deslucida, y tienen un sabor insípido por la falta de acidez. Los cambios en las actividades enzimáticas y en los compuestos orgánicos, que se producen con la deficiencia de K^+ son, en parte, responsables de la elevada susceptibilidad de las plantas deficientes. Estos cambios también alteran a la calidad nutricional de los productos almacenados, siendo afectados principalmente los frutos y tubérculos los cuales tienen una mayor necesidad de K^+ . En calabacín, por ejemplo, la incidencia en los desórdenes en la maduración de los frutos aumentan con un aporte inadecuado de K^+ . En plantas de patatas, gran cantidad de los parámetros de calidad se ven afectados por el contenido en K^+ en los tejidos (Mengel y Kirkby, 2001).

En tomate, la corrección de la deficiencia de K^+ provoca un aumento de la producción comercial, mientras que con un nivel deficiente, la producción disminuye y se favorece la defoliación. En esta planta, el color rojo del fruto se ve afectado por la concentración de K^+ , en particular por un aumento en la concentración de licopeno. En general, una nutrición apropiada de K^+ provoca un aumento de los sólidos totales, azúcares, ácidos orgánicos, carotenos y licopenos, manteniendo una mayor calidad (Marschner, 1995).

Con respecto al Calcio y la calidad de los frutos, la fisiología y bioquímica de muchos frutos ha sido extensamente estudiada, así como éste elemento está involucrado en varios factores de calidad del fruto en cosecha y en la presencia de desórdenes fisiológicos como mancha amarga. El Ca afecta la senescencia y calidad del fruto debido a la alteración de los procesos intracelulares y extracelulares, y la tasa de ablandamiento del fruto depende del estado nutricional del Ca en el fruto (Wojcik, 2002). En las frutas se puede desarrollar desórdenes fisiológicos, tales como mancha amarga (bitter pit) o pudriciones de yemas apicales (Blossom-end-rot) (Benton Jones,

1999). En nuestro estudio, la aplicación de las diferentes dosis de N favorecieron de manera positiva y significativa la acumulación de Ca total y soluble en vainas y semillas (Tabla 11), presentando los máximos niveles en el tratamiento N4, con aumentos del 40 % y 38 % en vainas, y 57 % y 40 % en semillas respectivamente, en relación a los mínimos niveles obtenidos en el tratamiento N1. Deshpande et al. (1996) menciona que la judía representa una buena fuente de proteínas, vitaminas y minerales. Estudios previos han demostrado que las judías son una buena fuente de Ca en comparación a otros vegetales. Las judías secas (semillas) contienen alrededor de 1.6 mg g^{-1} de Ca, mientras que en judías frescas (vainas) su contenido fue de 5.6 mg g^{-1} de peso seco (Quintana et al., 1999).

La absorción y transporte de Ca es influida por la fuente nitrogenada utilizada, en donde la aplicación de NO_3^- favorece estos procesos en comparación a la utilización de NH_4^+ (Mengel y Kirkby, 1999). En nuestro estudio, observamos que a medida que se incrementaba la dosis de N, los niveles de Ca total y soluble en vainas y semillas aumentaron hasta el tratamiento N4 (Tabla 11) y posteriormente disminuyeron drásticamente, esto probablemente de debió a que: (1) los niveles elevados de NH_4^+ tienen un efecto negativo con el Ca a nivel de absorción y transporte; (2) la toma y subsecuente distribución de un dado catión puede inhibir o disminuir tanto la absorción y translocación de otros cationes hacia los sumideros fisiológicos, un ejemplo de ello es el antagonismo que existe entre el K y Ca, y Mg; y (3) a la baja movilidad que tiene el Ca por el floema (Kirkby y Pilbearn, 1984).

La literatura científica ofrece gran número de referencias acerca de la toma y distribución de calcio por las plantas. Se supone que la mayor parte del calcio se mueve pasivamente por el flujo de transpiración acompañando al agua desde el suelo a través de la planta y finalmente el aire (Kirkby y Pilbearn, 1984). Además, el calcio no tiene movilidad a través del floema que transporta los azúcares desde las hojas hacia los frutos en desarrollo. Por estas razones, el calcio es un nutriente poco móvil que tiende acumularse en los órganos más viejos, mientras que los de mayor actividad metabólica (hojas en crecimiento, flores, frutos y meristemas apicales) son los que necesitan un mayor aporte; por tanto, la deficiencia de este elemento afecta en primer lugar a las partes en formación y meristemas en crecimiento, donde queda fijado y prácticamente inmóvil en sus paredes celulares. Debido a esta inmovilidad, las hojas viejas pueden

tener concentraciones normales de calcio, mientras que las hojas jóvenes, frutos u otros órganos pueden presentar niveles por debajo de la normalidad (Stiles, 1987).

La deficiencia de calcio en fruto tiene importantes repercusiones en especies frutales y hortícolas. Así, en manzano, las alteraciones de la nutrición cálcica originan el bitter pit y plara, fisiopatías que junto con el escaldado merman considerablemente la producción y la calidad (Val et al., 2002).

El calcio es transportado vía xilema a las partes de la planta de mayor transpiración, de este modo, cuando la transpiración es intensa y la entrada de calcio insuficiente, los órganos de menor índice de transpiración, frutos y hojas jóvenes, presentan una carencia localizada de este elemento, ya que el calcio apenas se retransporta vía floema, dando lugar a la aparición de trastornos nutricionales tales como “vitescencia” en melón, “blossom end rot” en tomate, pimiento y sandía, “bitter pit” en manzana, “tipburn” en lechuga y “blackheart” en apio (Sanz et al., 2001).

En semillas de plantas dicotiledóneas, como es el caso de la judía, los elementos minerales son acumulados en cristales globoides incrustados en cuerpos de proteínas. Aquí, también, la mayoría de los minerales parecen estar depositados en las sales del ácido fítico (fitato); magnesio y potasio, los cationes predominantes en los cristales globoides, pero también ha sido encontrado calcio (Lott, 2000). Estos mismos autores proponen que estos cationes específicos son selectivamente depositados en el fitato de ciertos tipos de cuerpos de proteínas de embriones en desarrollo. En nuestro estudio, observamos que la mayor acumulación de Ca se presentó en las semillas más que en las vainas, y este catión pudiera estar formando parte del fitato como un compuesto orgánico de reserva de las semillas de judía. Estos datos concuerdan con los registrados por Raboy (2001) quienes mencionan que las judías son excelentes fuentes de Ca, y el almacenamiento de catión parece estar localizado en las regiones embrionales, las cuales podrían ayudar a tener un crecimiento rápido de la radícula y la plúmula al momento de la germinación. Además, el calcio resulta esencial para las funciones normales de la membrana en cualquier célula, seguramente a modo de enlazador de fosfolípidos, tanto entre sí como a proteínas de membrana (Azcón-Bieto y Talón, 2001).

Con respecto a la relación Magnesio y la calidad de los frutos, se conoce que éste macronutriente es importante para la obtención de buenos rendimientos y productos agrícolas de calidad debido a que: (1) participa en los procesos de crecimiento y desarrollo de las especies cultivadas. En caso de deficiencia, las síntesis de

carbohidratos, proteínas, grasas y vitaminas (principalmente, A y C) quedan paralizadas y las plantas retrasan su crecimiento y desarrollo, disminuyendo la producción y la calidad de la cosecha; (2) interviene en los fenómenos de fecundación, el desplazamiento de los azúcares dentro de la planta y en la formación de las semillas y otros órganos de reservas. Las hojas adultas son las primeras en manifestar situaciones de deficiencia, al emigrar el Mg^{2+} a las hojas más jóvenes, y, al final del ciclo biológico, se acumula en los granos y en otros órganos de reserva (tubérculos, cormos, bulbos, etc.); y (3) ejerce, en general, por su acción sobre diversos metabolismos, efectos beneficiosos sobre la calidad de los productos mercadeables. En nuestra experiencia, se observó que la aplicación de las distintas dosis de N tuvo un comportamiento similar al K y Ca (Tabla 11), presentándose las máximas concentraciones en el tratamiento N5, con incrementos del 41 % y 44 % en vainas, y 37 % y 63 % en semillas respectivamente, en relación a las mínimas concentraciones encontradas en el tratamiento N1.

Al igual que el K y Ca, el Mg también es afectado por la fuente nitrogenada aplicada, especialmente por el NH_4^+ (Mengel y Kirkby, 2001). En nuestro estudio, observamos que las dosis elevadas de N (N5 y N6) disminuyeron drásticamente la concentración de Mg total y soluble en vainas y semillas (Tabla 11), lo que indica que los niveles elevados de NH_4^+ en la solución nutritiva compiten por los sitios de acción con el Mg a nivel de absorción y posteriormente influye sobre su distribución en la planta. Además, la afectación de los procesos de absorción, transporte y distribución de Mg se ve acentuado por la competencia que existe entre este el Mg y los cationes K y Ca (Marschner et al., 1996).

En lo que concierne a los frutos, las deficiencias severas de Mg producen frutos pequeños, descoloridos, sin sabor y, nutricionalmente, desequilibrados. En el cultivo del tomate, por ejemplo, las deficiencias de los contenidos en Mg^{2+} reducen la actividad fotosintética de una parte del follaje, disminuyendo los contenidos de materia seca, de los azúcares reductores y de los sólidos solubles en los frutos. En el cultivo del melón, el magnesio ocasiona una acumulación de azúcares reductores, pero la firmeza de los frutos se ve favorecida por un cierto equilibrio de la relación K/Mg que varía entre la pulpa y la corteza; por debajo de valores 2/6 y por encima de 6/2, ambas firmezas se reducen (Marschner, 1995).

Por otro lado, comentar que las concentraciones de Mg en las semillas fueron mayores que en las vainas, debido a que el Mg junto con el K son los cationes dominantes encontrados en las semillas de las plantas de judía en forma de cristales globoides (Lott, 2000). Los minerales en cristales globoides parecen estar unidos al fitato, una mezcla de sales catiónicas del ácido fítico (mio-inositol ácido hexafosfórico). El fitato es la principal forma de almacenamiento de fósforo, K, Ca y Mg en semillas maduras y en granos (Raboy, 2001).

En general, los tratamientos deficientes de N (N1 y N2) se caracterizaron por presentar la menor acumulación de K, Ca y Mg en vainas y semillas, lo cual se reflejó en la menor calidad de los frutos de judía; mientras la dosis considerada óptima de N (N3) junto con el tratamiento N4, presentaron la mayor acumulación de estos cationes, así como la mejor calidad de los frutos de judía. Finalmente, las dosis elevadas de N (N5 y N6) se caracterizaron por presentar una drástica disminución en la acumulación de K, Ca y Mg, así como una menor calidad de frutos.

La enzima Piruvato Kinasa se considera un indicador fisiológico ampliamente usado de los niveles de cationes en diferentes tejidos. El uso de la actividad PK como un indicador del nivel de cationes esta basado sobre el hecho que la activación de la PK depende de la presencia de cationes, particularmente K, Mg y Ca (Podestá y Plaxton, 1991; Ruiz et al., 2000, 2002). En nuestro experimento, las actividades de la Piruvato Kinasa basal (PK-basal) y las inducidas con K (PK-K), Ca (PK-Ca) y Mg (PK-Mg) incrementaron a medida que se fue aumentando la fertilización nitrogenada, presentándose las máximas actividades en el tratamiento N6, tanto en vainas como en semillas, con incrementos superiores al 28 % para la actividad PK-basal, 41 % para PK-K, 37 % para PK-Ca y del 33 % para la actividad PK-Mg, en relación a las mínimas actividades encontradas en el tratamiento N1 (Tabla 12). Considerando la dependencia que muestra la actividad PK sobre la presencia de cationes, esta enzima ha sido utilizada como un bioindicador fisiológico de los niveles catiónicos (K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}) en diferentes vegetales (Bar-Akiva et al., 1976; Lavon et al., 1988; Pulgar et al., 1996; Ruiz et al., 1999, 2000, 2002), con el fin de prevenir y controlar los desequilibrios nutricionales entre estos elementos.

Tabla 12. Influencia de los tratamientos de N sobre la actividad Piruvato Kinasa (PK) en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	PK basal	PK-K	PK-Ca	PK-Mg
Vainas				
N1	12.30	11.60 (-5.64%)	11.82 (-3.87%)	12.09 (-1.65%)
N2	13.43	12.98 (-3.34%)	13.13 (-2.19%)	13.30 (-0.93%)
N3	14.25	15.48 (+0.87%)	14.57 (+2.29%)	14.72 (+3.30%)
N4	15.97	17.67 (+10.69%)	16.51 (+3.41%)	16.58 (+3.87%)
N5	16.45	18.31 (+11.34%)	17.16 (+4.33%)	17.20 (+4.60%)
N6	17.14	19.62 (+14.48%)	18.65 (+8.85%)	18.15 (+5.91%)
Significación	*	*	*	*
Semillas				
N1	2.86	2.69 (-5.63%)	2.75 (-3.83%)	2.80 (-1.80%)
N2	3.04	2.89 (-4.77%)	2.95 (-2.74%)	2.99 (-1.38%)
N3	3.53	3.57 (+1.23%)	3.63 (+2.97%)	3.64 (+3.36%)
N4	4.01	4.46 (+11.34%)	4.27 (+6.63%)	4.27 (+6.65%)
N5	4.98	5.79 (+16.43%)	5.37 (+7.95%)	5.37 (+8.03%)
N6	5.48	6.69 (+22.13%)	6.32 (+15.36%)	6.02 (+10.00%)
Significación	*	*	*	*

Las actividades PK basal e inducida con K (PK-K), Ca (PK-Ca) y Mg (PK-Mg) son expresadas nM pirúvico mg^{-1} proteína min^{-1} . Los valores en paréntesis representan los incrementos (+%) o decrementos (-%) de las actividades PK inducidas por K, Ca y Mg en comparación a la actividad PK basal.

Los trabajos de Ruiz et al. (1999, 2000, 2002) han examinado el efecto de la aplicación de K^+ y de Ca^{2+} sobre los niveles de los distintos cationes en hojas y frutos de plantas de pepino, y en hojas de tabaco, respectivamente. Además, en ambos trabajos se ha analizado a la actividad PK como posible indicador de las relaciones existentes entre los distintos cationes. En nuestra experiencia, se encontró una relación positiva y significativa entre el contenido de K, Ca y Mg, y las actividades enzimáticas de la PK-basal en ambos órganos (*vainas*: K total-PK basal, $r = 0.87^{**}$; Ca total-PK basal, $r = 0.78^{**}$; Mg total- PK basal, $r = 0.79^{**}$; K soluble-PK basal, $r = 0.90^{**}$; Ca soluble- PK basal, $r = 0.82^{**}$; Mg soluble- PK basal, $r = 0.82^{**}$; *semillas*: K total-PK basal, $r = 0.89^{**}$; Ca total-PK basal, $r = 0.84^{**}$; Mg total- PK basal, $r = 0.81^{**}$; K soluble-PK basal, $r = 0.92^{**}$; Ca soluble- PK basal, $r = 0.88^{**}$; Mg soluble- PK basal, $r = 0.85^{**}$).

Como hemos comentando anteriormente, la actividad PK se considera un buen indicador fisiológico de los contenidos de K, Mg y Ca en tejido vegetal (Bar-Akiva et al., 1976; Ruiz et al., 1999, 2000 y 2002). En nuestro estudio, las actividades PK estimuladas con K, Ca y Mg, así como los incrementos y decrementos en estas actividades con respecto a la actividad PK basal se presenta en la Tabla 12. La actividad

PK fue estimulada con K con el tratamiento N6 en ambos órganos, alcanzando su máxima actividad, así como el mayor incremento (14 % en vainas y 22 % en semillas) con respecto a la actividad PK basal en el mismo tratamiento, lo cual refleja niveles de deficiencia de K en este tratamiento, debido probablemente a las elevadas concentraciones de NH_4^+ en el medio de cultivo y en la planta (Pulgar et al., 1996) y por el antagonismo que ocurre con los cationes Mg y Ca (Marschner et al., 1996). El comportamiento contrario se presentó en el tratamiento N1 tanto en vainas y semillas, debido posiblemente a los niveles de K cercanos a los óptimos requeridos por las plantas de judía, una condición que puede inhibir la actividad PK debido a la acción directa del K sobre esta enzima. Finalmente, en el tratamiento N3 de ambos órganos, la actividad PK estimulada con K, mostró un mínimo cambio (entre 0.87 y 1.23 % en vainas y semillas) en relación a la actividad PK basal, indicando condiciones apropiadas de este catión (Lavon et al., 1988).

En cuanto a la actividad PK estimulada por Ca, en nuestro experimento, ésta enzima presentó un comportamiento similar a la actividad PK estimulada por K en vainas y semillas (Tabla 12), siendo el tratamiento N6 el que alcanzó tanto la máxima actividad y el mayor incremento (9 % en vainas y 15 % en semillas) con respecto a la actividad PK basal en el mismo tratamiento, lo cual refleja niveles de deficiencia de Ca en los frutos de judía en el tratamiento N6, debido a la baja movilidad del Ca a través del floema, así como al efecto antagónico que ocurre con NH_4^+ , K y Mg (Marschner et al., 1996). Por el contrario, en las dosis deficientes de N (N1), se tuvo una disminución de la actividad PK estimulada por Ca (alrededor del 4 % en vainas y semillas) en relación a los valores de la PK basal, lo cual indica que la concentración de Ca en ambos órganos fueron adecuados. Ruiz et al. (1999) estudiando el efecto de las aplicaciones de Ca sobre la actividad de la PK en frutos de pepino, sugieren a la actividad de esta enzima ser un buen indicador de los niveles de Ca en los frutos.

En relación a la actividad PK estimulada por Mg, en nuestro estudio, ésta enzima presentó una tendencia parecida a la actividad PK estimulada por K y Ca (Tabla 12), la única diferencia fue que los incrementos o decrementos de la actividad PK inducida por Mg en vainas y semillas fueron de menor intensidad que los registrados por K y Ca. Esto pudiera explicarse por el efecto antagónico que se presenta entre el Mg y los iones NH_4^+ , K, y Ca, y la influencia de ellos sobre la cinética de activación de la PK (Day y Copeland, 1993).

En general, los resultados de la actividad PK inducida con K, Ca y Mg en vainas y semillas, nos indica que existe una necesidad fisiológica de estos cationes, en especial bajo los tratamientos elevados de N (N4, N5 y N6), debido probablemente al efecto antagónico que ejerce los elevados niveles de NH_4^+ sobre la absorción y distribución de K, Ca y Mg, así como a la baja movilidad que tienen los cationes Ca y Mg en el floema.

En resumen, comentar que la deficiencia de N (N1 y N2) se caracterizó por presentar la menor acumulación en los niveles de K, Ca y Mg en su forma total y soluble en vainas y semillas, así como las mínimas actividades PK inducidas por K, Ca y Mg, con respecto a la actividad PK basal; lo cual indica condiciones nutricionales cercanas a las óptimas para estos cationes. En el caso de la dosis de N considerada óptima (N3) se caracterizó por presentar una concentración intermedia para K, Ca y Mg en sus formas totales y solubles, así como para sus bioindicadores fisiológicos, indicando niveles nutricionales adecuados de K, Ca y Mg. Con lo que se refiere a las dosis por encima del óptimo, es decir N4, N5 y N6 se caracterizaron por presentar las plantas de judía concentraciones decrecientes de K, Ca y Mg total y soluble tanto en vainas y semillas, sin embargo, las actividades PK inducidas con K, Ca y Mg se incrementaron alcanzando sus máximas actividades con respecto a la PK basal; lo que indica una necesidad fisiológica de estos cationes en los tratamientos elevados de N (N4, N5 y N6). Finalmente, la actividad PK basal e inducida con K, Ca y Mg reflejan el nivel de cationes en vainas y semillas, por lo que se consideran buenos bioindicadores fisiológicos de estos cationes.

4.6. INDICADORES FISIOLÓGICOS

4.6.1. Hidratos de carbono no estructurales y pigmentos fotosintéticos

4.6.1.1. Raíces y Hojas

Thornley (1972) fue el primer investigador que propuso un modelo para explicar los cambios en la distribución de la biomasa entre las raíces y la parte aérea. En este modelo, él propuso que el crecimiento es dependiente del suministro del carbono procedente de la parte aérea y del N procedente de la raíz. En este sentido comentar que en nuestro experimento, la aplicación de 6.0 mM de N (N3) resultó ser el tratamiento óptimo para una eficaz producción y distribución de la biomasa foliar y radicular en las plantas de judía (Tabla 1), mientras que los tratamientos por debajo de N3 (N1 y N2), se consideraron dosis deficientes de N, caracterizándose por un aumento del crecimiento radicular y una menor reducción del crecimiento foliar (Tabla 1). Por el contrario, las dosis por encima del óptimo, es decir, N4, N5 y N6, se consideran elevadas a tóxicas por la disminución del crecimiento de la parte radicular y foliar, siendo esta última la más afectada (Tabla 1). Finalmente, comparando los diferentes cocientes de la biomasa radicular-biomasa aérea obtenidos en los tratamientos deficientes de N (N1 y N2) con los obtenidos en los tratamientos elevados a tóxicos (N4, N5 y N6), observamos que los últimos fueron inferiores a los presentados con los tratamientos considerados deficientes de N (Figura 1).

El estado nutricional del N también determina la acumulación y distribución de sacarosa dentro de la planta. La deficiencia de N provoca una elevada acumulación foliar de hidratos de carbono no estructurales que es debido al escaso crecimiento de la parte aérea, en comparación a lo que ocurre en plantas suficientes de N (de Veau et al., 1990; Robinson, 1996, 1997a). Además, otros factores que contribuyen al incremento en los niveles foliares de los hidratos de carbono no estructurales en plantas limitantes de N es el incremento de las enzimas responsables de su biosíntesis y degradación de estos azúcares (Champigny y Foyer, 1992; Huber et al., 1994).

Con respecto a las enzimas claves de la biosíntesis de sacarosa se encuentran principalmente la Fructosa 1,6-bifosfatasa (F1,6BPasa) y la Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS) (Stitt, 1988). En nuestro experimento, la aplicación de N afectó significativamente la actividad de la F1,6BPasa ($P < 0.01$; Figura 10) y la SPS ($P < 0.01$; Figura 11) en la raíz como en las hojas, presentando las máximas actividades en el tratamiento N1, con

incrementos del 35% y 63% respectivamente, en relación a N6 que en esta ocasión dio lugar a las mínimas actividades.

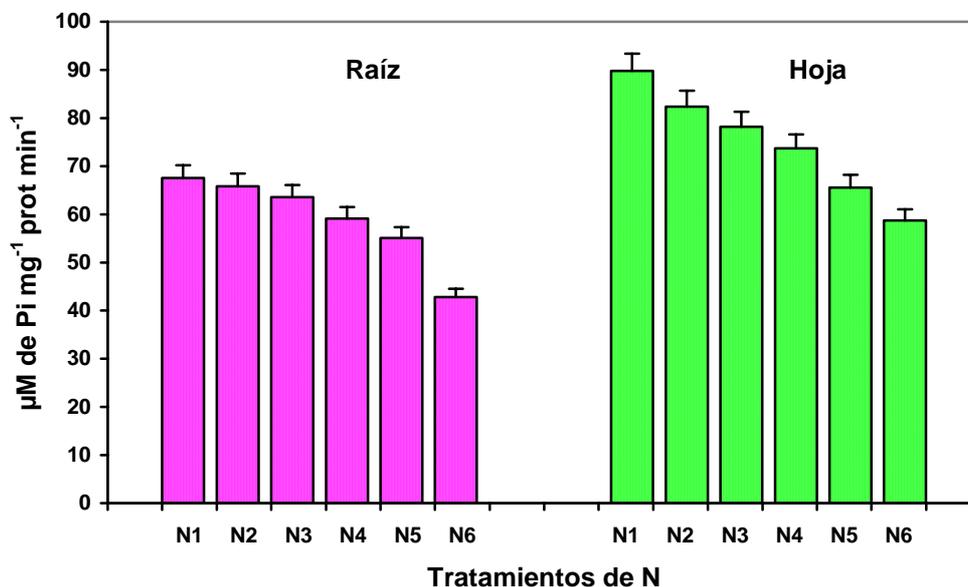


Figura 10. Influencia de los tratamientos de N sobre la enzima Fructosa 1,6-bifosfatasa (F1,6BPasa) en raíces y hojas de plantas de judía.

Como habíamos indicado en anteriormente, la sacarosa y el almidón son los principales productos de la fotosíntesis en las plantas superiores, siendo la sacarosa la forma mayoritaria de transporte de azúcares desde las hojas hacia el resto de la planta. La sacarosa además de aportar carbono y energía a las zonas en desarrollo, interviene de forma muy importante en las respuestas de protección o tolerancia ante diferentes estreses medioambientales (ap Rees, 1987). En nuestro experimento, observamos que la sacarosa presentó un comportamiento similar a las enzimas claves que intervienen en su biosíntesis, presentando el tratamiento N1 la máxima concentración, con incrementos del 93% y 68% respectivamente, en relación al tratamiento N6 que presentó el mínimo valor (Tabla 13).

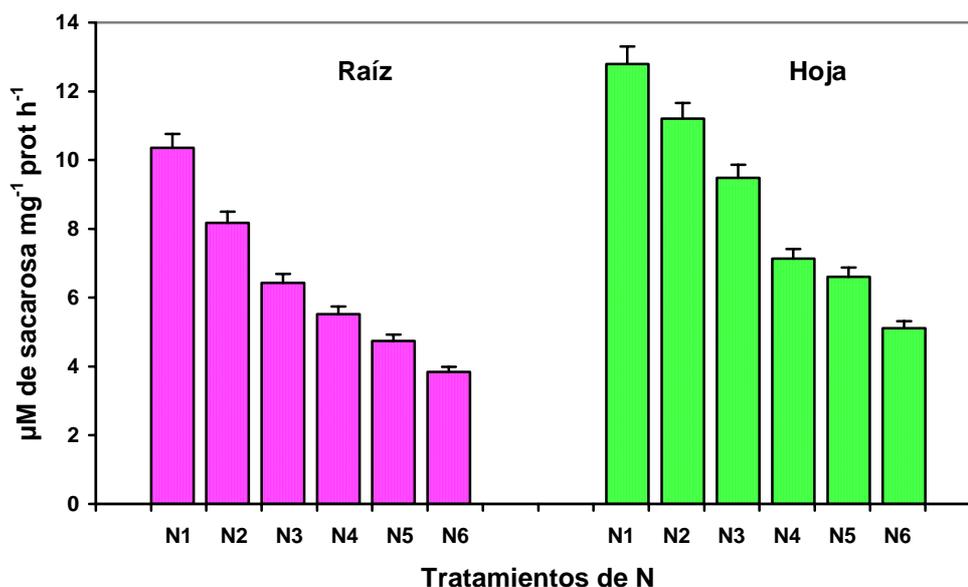


Figura 11. Influencia de los tratamientos de N sobre la enzima Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS) en raíces y hojas de plantas de judía.

Por otro lado, el exceso de triosa-fosfato que no se utilizan en la síntesis de sacarosa es utilizado para la síntesis de almidón, que actúa como una sustancia de reserva de carbono (Medrano y Flexas, 2001). En nuestro experimento, la concentración de almidón en raíces y hojas presentó un comportamiento similar a la sacarosa como respuesta a las distintas dosis de N aplicadas, observando en el tratamiento N1 el máximo valor, con incrementos del 72% y 40% respectivamente, en relación al tratamiento N6 que presentó el mínimo valor (Tabla 13). Asimismo, indicar que el mayor cociente obtenido de la relación sacarosa/almidón se presentó en el tratamiento N1, en comparación al menor cociente observado en el tratamiento N6 (Tabla 13). Además, resaltar que este cociente puede ser considerado un buen indicador de la deficiencia y/o toxicidad de N, debido a que en condiciones deficientes de N (N1) su cociente sacarosa/almidón fue el máximo en raíces y en hojas, y fue aumentando a medida que se fueron incrementando las dosis de N, presentando el mínimo cociente en la dosis considerada tóxica de N (N6). Estos resultados concuerdan con los reportados por Murchie et al. (1999) quienes mencionan que el cociente sacarosa/almidón es un buen indicador del estado nutricional del N en tejido vegetal.

Tabla 13. Efecto de los tratamientos de N sobre la acumulación de sacarosa y almidón, así como la razón sacarosa-almidón en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	Sacarosa	Almidón	Razón Sacarosa- Almidón
Raíces			
N1	3.57	14.64	0.243
N2	2.77	12.95	0.213
N3	1.38	10.62	0.129
N4	1.02	8.87	0.114
N5	0.66	6.09	0.108
N6	0.24	4.03	0.059
Significación	**	***	**
Hojas			
N1	8.39	22.54	0.37
N2	6.52	20.00	0.32
N3	5.68	18.48	0.30
N4	4.15	16.56	0.25
N5	3.28	15.45	0.21
N6	2.68	13.49	0.19
Significación	**	***	**

Las concentraciones de sacarosa y almidón fueron expresadas en mg g^{-1} de peso fresco.

La acumulación de sacarosa en las plantas superiores depende de su biosíntesis y degradación. Este último proceso es realizado por las enzimas sacarosa sintetasa (SS) y las invertasas (ácida y alcalina) (Huber y Akazawa, 1986) originando en ambos casos glucosa y fructosa (Schaffer, 1986). En nuestro experimento, las actividades SS y las invertasas (ácida y alcalina) en raíces y hojas presentaron un efecto directamente proporcional a la aplicación de las distintas dosis de N, observando las máximas actividades en el tratamiento N6, con incrementos superiores al 66% respectivamente, en relación a las mínimas actividades encontradas en el tratamiento N1 (Tabla 14). Además, indicar que dentro de las actividades invertasas en raíces y hojas, la invertasa alcalina presentó las mayores actividades que la invertasa ácida. Estos resultados concuerdan con los reportados por Schaffer (1986), quién menciona que en órganos completamente desarrollados es más importante la invertasa alcalina en el proceso de degradación de sacarosa; mientras que la invertasa ácida juega un papel relevante en órganos que no están completamente desarrollados.

Tabla 14. Influencia de los tratamientos de N sobre las enzimas claves de la degradación de sacarosa en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	SS	Invertasa Ácida	Invertasa Alcalina
Raíces			
N1	2.58	132.60	216.70
N2	3.19	194.60	278.50
N3	4.16	237.70	310.90
N4	5.96	272.50	352.70
N5	7.16	389.80	470.70
N6	9.64	407.60	637.10
Significación	**	***	***
Hojas			
N1	1.05	14.11	26.98
N2	2.12	26.00	31.00
N3	3.32	31.95	42.05
N4	4.06	35.99	59.17
N5	5.18	38.08	67.86
N6	7.37	43.72	86.71
Significación	**	***	***

La actividad la sacarosa sintetasa (SS) fueron expresadas en μM de sacarosa mg^{-1} proteína h^{-1} ; y las invertasas (ácida y alcalina) fueron expresadas en μM de glucosa mg^{-1} proteína h^{-1} .

Con respecto a los hidratos de carbono no estructurales, glucosa y fructosa, originados por las enzimas degradativas SS y las invertasas (ácida y alcalina) (Schaffer, 1986; Huber y Akazawa, 1986), sus concentraciones en raíces y hojas incrementaron significativamente conforme se aplicaron las distintas dosis de N (Tabla 15), presentándose los máximos valores en el tratamiento N6 con incrementos del 68% y 92% respectivamente, en relación a los mínimos valores del tratamiento N1. Además, resaltar que las concentraciones de glucosa y fructosa fueron más elevadas en las raíces que en las hojas, debido probablemente a que en las raíces el proceso de degradación de sacarosa fue mayor que su biosíntesis, caso contrario ocurrió en las hojas lo cual se vio reflejada en la mayor acumulación de sacarosa.

En relación a los pigmentos fotosintéticos, éstos han sido muy utilizados en distintas plantas, como indicadores de la producción de biomasa y del estado nutricional de N (López-Cantarero et al., 1994). En nuestra experiencia, las distintas tratamientos de N dieron lugar a un aumento significativo de la clorofila a, b y total, así como de carotenos, presentándose los máximos valores en el tratamiento N5, con incrementos en todos los casos superiores del 80% respecto a las mínimas concentraciones de pigmentos fotosintéticos del tratamiento N1 (Tabla 16). Existe una relación muy

estrecha entre el contenido de pigmentos y los azúcares, ya que estos últimos son producidos por los pigmentos a través del proceso de fotosíntesis (Stitt et al., 1987). Finalmente, indicar que los pigmentos y el contenido de azúcares están estrechamente relacionados con el estado nutricional del N (Lawlor, 2002).

Tabla 15. Efecto de los tratamientos de N sobre la acumulación de glucosa y fructosa en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	Glucosa	Fructosa
Raíces		
N1	3.57	14.64
N2	2.77	12.95
N3	1.38	10.62
N4	1.02	8.87
N5	0.66	6.09
N6	0.24	4.03
Significación	**	***
Hojas		
N1	8.39	22.54
N2	6.52	20.00
N3	5.68	18.48
N4	4.15	16.56
N5	3.28	15.45
N6	2.68	13.49
Significación	**	***

Las concentraciones de glucosa y fructosa fueron expresadas en mg g⁻¹ de peso fresco.

Con respecto a los pigmentos fotosintéticos, éstos han sido muy utilizados en distintas plantas, como indicadores de la producción de biomasa y del estado nutricional de N (López-Cantarero et al., 1994). En nuestra experiencia, las distintas tratamientos de N dieron lugar a un aumento significativo de la clorofila a, b y total, así como de carotenos, presentándose los máximos valores en el tratamiento N5, con incrementos en todos los casos superiores del 80% respecto a las mínimas concentraciones de pigmentos fotosintéticos del tratamiento N1 (Tabla 16). Existe una relación muy estrecha entre el contenido de pigmentos y los azúcares, ya que estos últimos son producidos por los pigmentos a través del proceso de fotosíntesis (Stitt et al., 1987). Finalmente, indicar que los pigmentos y el contenido de azúcares están estrechamente relacionados con el estado nutricional del N (Lawlor, 2002).

La clorofila y los pigmentos fotosintéticos son importantes para la captura de energía radiante durante el proceso de fotosíntesis. Diferencias en la actividad

clorofílica pudieran ser consideradas como un síntoma de una fertilización inapropiada de N ó de un desbalance nutricional, aunque otros factores ambientales, tales como temperatura, salinidad o sequía, pueden también disminuir la actividad clorofílica (Leidi et al., 1992).

La clorofila foliar, la cual ha sido directamente relacionada a la concentración de N foliar (Takabe et al., 1990), pudiera servir como un buen indicador de la concentración de N foliar; así como para predecir los requerimientos de fertilizantes nitrogenados en los cultivos (Takabe et al., 1989; López-Cantarero et al., 1994).

Tabla 16. Influencia de los tratamientos de N sobre los niveles de pigmentos foliares en plantas de judía.

Tratamiento	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Carotenos
Raíces				
N1	171.22	87.71	258.93	22.23
N2	287.74	126.88	414.62	29.95
N3	387.97	144.31	532.28	43.74
N4	741.02	360.34	1101.36	68.10
N5	937.86	554.70	1492.56	126.13
N6	740.19	415.03	1155.22	47.17
Significación	***	***	***	**

Los distintos pigmentos fotosintéticos son expresados en $\mu\text{g m}^{-2}$ p.f.

En resumen, la deficiencia de N (N1 y N2) se caracterizó por la estimulación de la síntesis de sacarosa encontrándose las máximas actividades fructosa-1,6-bifosfatasa y sacarosa fosfato sintasa. Bajo estas condiciones de estrés se produjo un aumento de la translocación de la sacarosa a las raíces explicándose de esta manera que el crecimiento radicular no se viera afectado. Además, comentar que bajo condiciones deficientes de N se observó una menor actividad clorofílica, lo cual se reflejó en las menores concentraciones de las clorofilas: a, b, total y de carotenos. Por el contrario, la toxicidad de N (N6) provocó además de una disminución general del crecimiento, disminución de la actividad clorofílica, una estimulación significativa de la degradación de sacarosa asociada con las máximas actividades enzimáticas sacarosa sintasa y las invertasas ácida y alcalina. Finalmente, indicar que el cociente obtenido de la relación sacarosa/almidón, así como, los niveles de pigmentos fotosintéticos pudieran ser considerados buenos indicadores de la deficiencia y/o toxicidad de N en las plantas de judía.

4.6.1.2. Vaínas y Semillas

La sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis en las plantas superiores y la mayor forma en la cual los hidratos de carbono son translocados desde de las hojas hacia el resto de la planta, con el fin de suplir carbono y energía para el crecimiento de la misma. Además, este azúcar es el principal hidrato de carbono de almacenamiento en las plantas, encontrándose en las hojas, tallos, tubérculos y frutos (ap Rees, 1987). El contenido de hidratos de carbono, en particular la sacarosa, constituye un importante parámetro de rendimiento y de calidad nutricional en muchos cultivos (Wiedefeld, 1995), así como un índice fisiológico para caracterizar el estado de maduración de los frutos. Muchos frutos acumulan y almacenan sacarosa y hexosas, en el caso de las peras, mango, ciertos melones y algunos cítricos almacenan relativamente elevados niveles de sacarosa. Sin embargo, frutos pequeños, tales como zarzamoras y frambuesa, a menudo almacenan principalmente glucosa y fructosa (Hubbard et al., 1989). Como indicábamos anteriormente, las enzimas F1,6BPasa y la SPS son las enzimas claves para la biosíntesis de sacarosa (Stitt, 1988). En nuestra experiencia, la aplicación de las diferentes dosis de N afectó significativamente la actividad de las enzimas F1,6BPasa ($P < 0.01$; Figura 12) y la SPS ($P < 0.05$; Figura 13) en las vaínas como en las semillas de las plantas de judía, presentándose las máximas actividades en el tratamiento N3, con incrementos del 33% y 22% respectivamente, en relación a N6 que en esta ocasión dio lugar a las mínimas actividades. Estos resultados son debidos a que bajo condiciones de toxicidad de N en forma de NH_4^+ , se puede producir un desacoplamiento del transporte de electrones en la fotofosforilación a nivel de fotosíntesis, traduciéndose en la menor síntesis de azúcares simples, como glucosa y fructosa, siendo estos últimos los sustratos necesarios para que las enzimas F1,6BPasa y la SPS los conviertan a sacarosa, por lo que la biosíntesis de este producto disminuye drásticamente por la aplicación de N (Gerendás et al. 1997). Además, se ha visto que la enzima SPS su actividad es favorecida por la glucosa-6-fosfato y es inhibida por elevados niveles de Pi (Hubbard y Huber, 1989); con lo que respecta a la enzima F1,6BPasa, esta es favorecida por los niveles de triosa-fosfato y es inhibida por elevadas concentraciones de fructosa-2,6-fosfato (Lunn y Furbank, 1999).

Figura 12. Influencia de los tratamientos de N sobre la enzima Fructosa 1,6-bifosfatasa (F1,6BPasa) en vainas y semillas de plantas de judía.

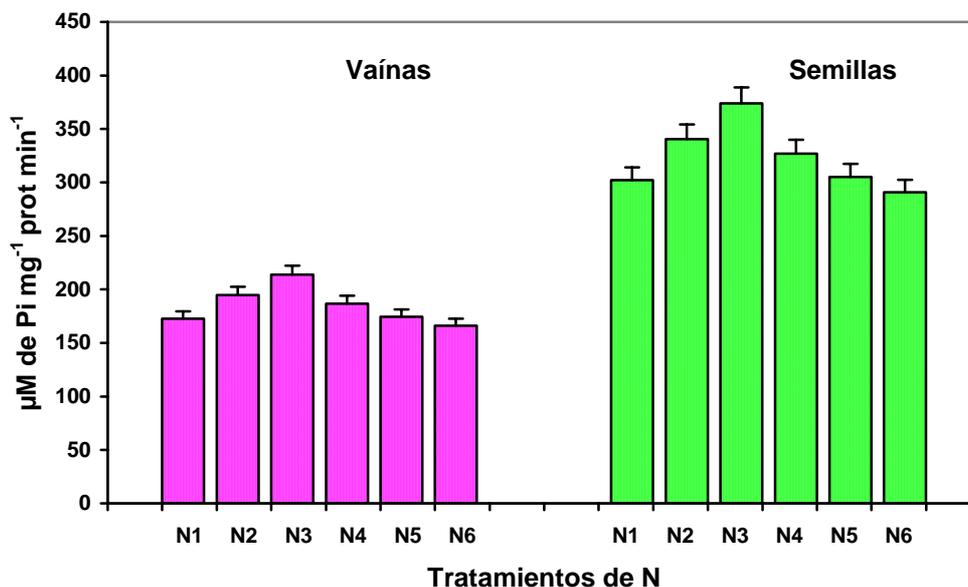
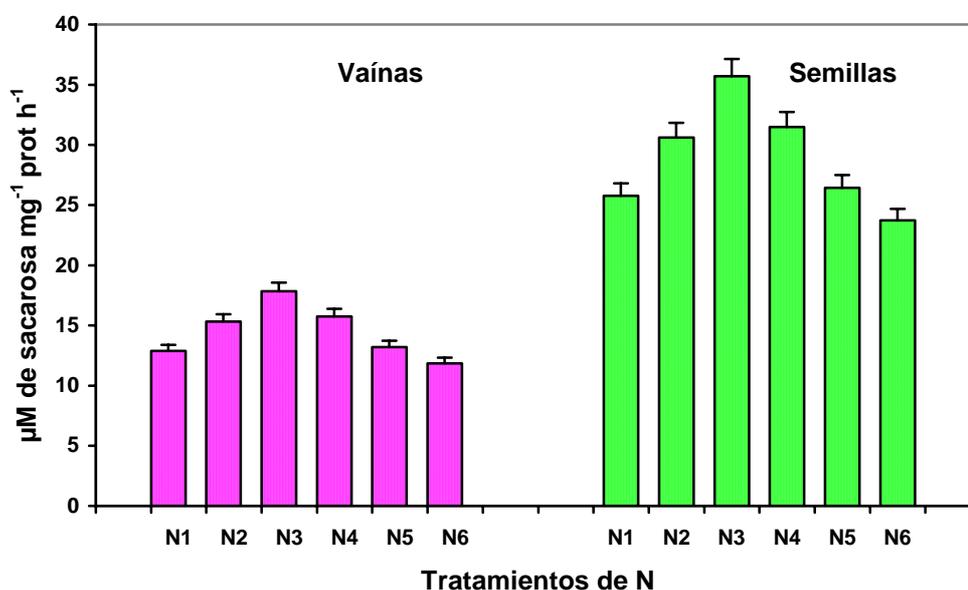


Figura 13. Influencia de los tratamientos de N sobre la enzima Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS) en vainas y semillas de plantas de judía.



Con respecto a la sacarosa y almidón, estos son los principales carbohidratos producidos durante la fotosíntesis en las plantas superiores, siendo la sacarosa la forma mayoritaria de transporte de azúcares desde las hojas hacia los sumideros fisiológicos de la planta, en particular hacia los frutos (ap Rees, 1987). En nuestro experimento, observamos que la sacarosa presentó un comportamiento similar a las enzimas claves

que intervienen en su biosíntesis, presentando el tratamiento N3 la máxima concentración, con incrementos del 56% y 48% respectivamente, en relación al tratamiento N6 que presentó el mínimo valor (Tabla 17).

Existen diferentes factores que regulan la biosíntesis de sacarosa tales como: la luz y obscuridad (Lunn y Furbank, 1999; Robinson, 2000); el nivel de CO₂ (Murchie et al., 1999; Demmers-Derks et al., 1998; Roumet et al., 2000; Zerihun y BassiriRad, 2000; Cabrerizo et al., 2001); disponibilidad de agua (Lunn y Furbank, 1999); temperatura (Demmers-Derks et al., 1998; Jones et al., 1998); reguladores del crecimiento como las giberelinas y el ácido abscísico (Cheikh y Brenner, 1992; Goupil et al., 1998; Coruzzi y Zhou, 2001) y el estado nutricional del N en la planta (Chaillou et al., 1994; Ciompi et al., 1996; Demmers-Derks, 1998; Banks et al., 1999; Robinson, 2000; Zerihun y BassiriRad, 2000; Coruzzi y Zhou, 2001). Con respecto a este último factor, mencionar que la aplicación de elevadas dosis de N tienen un efecto negativo sobre la biosíntesis de sacarosa (Chaillou et al., 1994); estos resultados concuerdan con los encontrados en nuestro experimento. Ciompi et al. (1996) estudiaron el efecto de la aplicación de N sobre el rendimiento y calidad del cultivo de caña de azúcar, encontraron que la aplicación de N tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento de la caña de azúcar, sin embargo, presentó un efecto negativo sobre el rendimiento de azúcares en la caña, cuando se aplicaron elevadas dosis de N. Así mismo, debe existir un balance en la relación C/N, bajo condiciones de elevadas dosis de N, se pierde ese balance y se afecta la biosíntesis de sacarosa (Lawlor, 2002).

En relación a los niveles de almidón, en nuestro experimento, observamos que la concentración de almidón en vainas y semillas presentó un comportamiento similar al de la sacarosa como respuesta a las distintas dosis de N aplicadas, observando en el tratamiento N3 el máximo valor, con incrementos del 38% y 34% respectivamente, en relación al tratamiento N6 que presentó el mínimo valor (Tabla 17). Así mismo, indicar que el mayor cociente obtenido de la relación sacarosa/almidón se presentó en el tratamiento N3, en comparación al menor cociente observado en el tratamiento N6. Además, resaltar que este cociente puede ser considerado un buen indicador de la deficiencia y/o toxicidad de N, debido a que bajo condiciones deficientes de N (N1 y N2), así como tóxicas de N (N4, N5 y N6) los cocientes sacarosa/almidón fueron bajos en vainas y semillas, mientras que su cociente máximo se logró con el tratamiento

óptimo (N3) y a partir de ahí fue disminuyendo drásticamente en el tratamiento considerado tóxico de N (N6), quien dio el mínimo cociente sacarosa/almidón.

Tabla 17. Efecto de los tratamientos de N sobre la acumulación de sacarosa y almidón, así como la razón sacarosa-almidón en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	Sacarosa	Almidón	Razón Sacarosa- Amidón
Vainas			
N1	15.70	24.90	0.630
N2	20.91	28.62	0.730
N3	27.00	36.38	0.742
N4	23.31	32.20	0.723
N5	18.55	27.20	0.681
N6	12.01	22.43	0.535
Significación	**	**	**
Semillas			
N1	65.94	94.62	0.696
N2	87.82	108.75	0.807
N3	113.40	130.24	0.870
N4	97.90	122.36	0.800
N5	77.91	103.36	0.753
N6	50.44	85.23	0.591
Significación	**	**	**

Las concentraciones de sacarosa y almidón fueron expresadas en mg g⁻¹ de peso fresco.

La acumulación de sacarosa en las plantas superiores depende de su biosíntesis y degradación. Este último proceso es realizado por las enzimas sacarosa sintetasa (SS) y las invertasas (ácida y alcalina) (Huber y Akazawa, 1986). En nuestro experimento, las actividades SS y las invertasas (ácida y alcalina) en vainas y semillas presentaron un comportamiento inversamente proporcional a las actividades SPS y F1,6BPasa quienes fueron afectadas por las distintas dosis de N, observando las mínimas actividades en el tratamiento N3, con incrementos superiores al 40% respectivamente, en relación a las máximas actividades encontradas en el tratamiento N1 (Tabla 18).

Tabla 18. Influencia de los tratamientos de N sobre las enzimas claves de la degradación de sacarosa en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	SS	Invertasa Ácida	Invertasa Alcalina
Vainas			
N1	10.73	284.30	310.45
N2	8.30	250.20	271.50
N3	6.42	153.90	190.32
N4	7.31	169.80	210.51
N5	8.74	190.75	246.32
N6	9.15	221.41	272.10
Significación	*	**	**
Semillas			
N1	22.53	426.45	589.85
N2	17.43	375.30	515.85
N3	13.48	230.85	361.60
N4	15.35	254.70	399.96
N5	18.35	286.12	468.00
N6	19.21	332.11	516.99
Significación	*	**	**

La actividad la sacarosa sintetasa (SS) fueron expresadas en μM de sacarosa mg^{-1} proteína h^{-1} ; y las invertasas (ácida y alcalina) fueron expresadas en μM de glucosa mg^{-1} proteína h^{-1} .

Además, indicar que las actividades de las enzimas SS y las invertasas, responsables de la degradación de sacarosa, fueron mayores en las semillas que en las vainas. Sung y Lo (1990) estudiaron el efecto de las enzimas sacarosa sintasa y las invertasas (ácida y alcalina) sobre el desarrollo de los frutos de *Phaseolus vulgaris*. Estos autores encontraron que la actividad de estas enzimas difieren entre vainas y semillas. Las vainas son consideradas ontogénicamente hojas dada su naturaleza, ya que rápidamente importan asimilados para su propio desarrollo y al último exportan para el desarrollo de las semillas (Fader y Koller, 1985). Los patrones de las actividades sacarosa sintasa y las invertasas fueron correlacionados con varias funciones de sumideros fisiológicos, incluyendo importación, almacenamiento de reservas, crecimiento y varias actividades biosintéticas que ocurren en el desarrollo de vainas y semillas (Sung y Lo, 1990).

Con respecto a la glucosa y fructosa, que se producen por el efecto de las enzimas degradativas SS y las invertasas (ácida y alcalina) (Schaffer, 1986; Huber y Akazawa, 1986), sus concentraciones en vainas y semillas tuvieron un comportamiento muy similar a estas actividades enzimáticas, presentándose los máximos valores en el tratamiento N1 con incrementos del 38% y 41% respectivamente, en relación a los

mínimos valores del tratamiento N3 (Tabla 19). Además, resaltar que las concentraciones de glucosa y fructosa fueron más elevadas en las semillas que en las vainas, debido probablemente a que las semillas tienen una función de sumidero fisiológico, mientras que las vainas participan como tejidos abastecedores de carbohidratos.

Tabla 19. Efecto de los tratamientos de N sobre la acumulación de glucosa y fructosa en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	Glucosa	Fructosa
Vainas		
N1	14.37	13.98
N2	12.14	10.62
N3	8.87	8.20
N4	9.72	9.39
N5	11.52	10.06
N6	13.29	12.72
Significación	**	***
Semillas		
N1	57.48	48.93
N2	48.56	37.17
N3	35.48	28.70
N4	38.88	32.86
N5	46.08	35.21
N6	53.16	44.52
Significación	**	***

Las concentraciones de glucosa y fructosa fueron expresadas en mg g^{-1} de peso fresco.

El N altera la composición de las plantas mucho más que cualquier otro nutriente mineral. Así, mientras la producción de materia seca y el contenido total de N aumenta con su aporte, la concentración de carbohidratos principales, que se almacenan en las plantas como son polifruetosanos y almidón, decrece drásticamente, sobretudo en herbáceas (Marschner, 1995).

En definitiva, existen pocos estudios realizados a nivel fisiológico sobre el efecto negativo de la toxicidad de N, no obstante, se ha visto que bajo estas condiciones se disminuye sustancialmente los procesos claves para su desarrollo como son la síntesis y acumulación de almidón, asimilación de N y la fotosíntesis, lo que condujo una reducción importante de la producción y calidad de los frutos de judía (Andeeva et al., 1998).

Por otro lado, se han encontrado diferentes resultados entre la aplicación de N y la calidad de fruto en diversos cultivos (Miners y Sims, 1983.), no obstante, el exceso de N a menudo resulta en pobre calidad del fruto y disminución del rendimiento comercial (Davenport, 1996; López-Cantarero et al., 1997; Ruiz y Romero, 1998). Con lo que se refiere al cultivo de la judía, ha recibido poca atención sobre este tema.

Con lo que respecta a los frutos de tomate, pimiento, sandía y melón verán reducidos tamaño, el número y su color en plantas deficientes de N si las comparamos con plantas en las que se ha aplicado el N de forma óptima (Huet y Dettmann, 1991). Por ejemplo, en tomates, el elevado contenido en sólidos solubles y materia seca se produce con la aplicación de elevados niveles de N, obteniéndose un aumento de la producción total, si los niveles de N aplicados son moderados (Papadopoulos y Khosla, 1993).

Por su parte, en patatas, el N aplicado afecta la producción y la calidad. Así, éste afecta al tamaño, producción, gravedad específica y color en fresco del tubérculo, disminuyéndolo su contenido de azúcares y almidón, cuando las dosis de N son elevadas (Maier et al., 1994).

En resumen, nuestros resultados indican que la dosis considerada óptima de N (N3) se caracterizó por la estimulación de la síntesis de sacarosa, encontrándose las máximas actividades fructosa-1,6-bisfosfatasa y sacarosa fosfato sintasa en vainas y semillas, estos resultados concuerdan con la mayor productividad y calidad nutricional obtenida en este tratamiento. Con respecto a los tratamientos deficientes (N1 y N2) y tóxicos de N (N4, N5 y N6), estos se caracterizaron por una estimulación significativa de la degradación de sacarosa con las máximas actividades enzimáticas sacarosa sintasa y las invertasas ácida y alcalina en vainas y semillas, y presentando la menor productividad y calidad nutricional, siendo más acentuada en los tratamientos tóxicos. Finalmente, indicar que el cociente obtenido de la relación sacarosa/almidón, pudiera ser considerado buen indicador de la deficiencia y/o toxicidad de N en las plantas de judía.

4.7. METABOLISMOS RELACIONADOS CON ESTRÉS

4.7.1. METABOLISMO DE LA PROLINA

4.7.1.1. Raíces y Hojas

Es conocido que la prolina se acumula en plantas durante la adaptación a diferentes tipos de estrés ambientales tales como sequía, salinidad, elevadas y bajas temperaturas, deficiencias de nutrientes, exposición a metales pesados y pH elevados (Delauney y Verma, 1993; Hare et al., 1999; Zaifnejad et al., 1997). Diferentes papeles han sido propuestos para la acumulación de prolina como una respuesta adaptativa, además participa en la regulación de los potenciales redox celulares (Saradhi y Saradhi, 1991; Wyn Jones et al., 1997).

Dos rutas metabólicas, el metabolismo del glutamato y ornitina, son muy importantes en la síntesis de prolina (Kavi Kishor et al., 1995). Con respecto a la ruta metabólica del glutamato para la biosíntesis de prolina, en nuestro experimento, las dosis de N afectaron significativamente la actividad Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) en raíces y hojas ($P < 0.01$; Tabla 20), con las mínimas actividades evidentes en el tratamiento N6, registrando niveles más bajos de 42 % y 38 % respectivamente, que las máximas actividades presentadas en N1.

Con respecto a la ruta metabólica de la ornitina, los tratamientos de N también influenciaron significativamente la actividad de la Ornitina- δ -aminotransferasa (OAT). En nuestro experimento, la aplicación de las dosis elevadas de N estimularon las actividades de AOT en raíces y hojas ($P < 0.01$; Tabla 20), presentando las máximas actividades en el tratamiento N4, con incrementos de 78 % y 72 % respectivamente, en comparación a las mínimas actividades encontradas en N1.

Los niveles de prolina en raíces y hojas ($P < 0.01$; Tabla 20) presentaron las más elevadas concentraciones en ambos órganos en el tratamiento N6. Nuestros resultados revelan una correlación inversa entre la actividad enzimática de la P5CS y la concentración de prolina tanto en raíces como en hojas (P5CS-prolina, $r = -0.85^{**}$), mientras que en ambos órganos mostraron una correlación positiva entre la actividad OAT y la concentración de prolina (raíz, $r = 0.80^{***}$, hojas, $r = 0.75^{**}$).

Tabla 20. Efecto de los tratamientos de N sobre el metabolismo de la prolina en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	P5CS	OAT	Prolina	PDH
Raíces				
N1	1.12	1054	35.9	0.217
N2	0.93	1581	42.8	0.122
N3	0.82	1951	53.2	0.081
N4	0.77	2210	63.2	0.066
N5	0.66	2550	71.2	0.059
N6	0.65	4830	84.4	0.058
Significación	**	**	**	**
Hojas				
N1	0.26	526	173.2	0.035
N2	0.24	838	234.5	0.030
N3	0.19	1032	246.7	0.028
N4	0.17	1430	360.2	0.027
N5	0.16	1630	365.5	0.024
N6	0.14	1910	588.0	0.021
Significación	**	**	**	*

Δ^1 -Pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) expresada en μM de Pi mg^{-1} proteínas min^{-1} ; Ornitina- δ -aminotransferasa (OAT) expresada en nmol de NADH oxidado mg^{-1} proteínas min^{-1} ; Prolina expresada en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco; Prolina dehidrogenasa (PDH) expresada en nmol de NAD reducido mg^{-1} proteínas min^{-1} .

En resumen, nosotros sugerimos que la biosíntesis y acumulación de prolina en raíces y hojas observada en nuestro experimento, debido quizás a las dosis elevadas de N, es mediado principalmente por la ruta de la ornitina. Nuestros resultados están de acuerdo con los propuestos por Rhodes et al. (1986) y Delauney y Verna (1993), quienes mencionan que la ruta glutamato para la biosíntesis de prolina es predominante bajo condiciones de estrés, tal como la elevada salinidad y condiciones de deficiencias de N. Por el contrario, en plantas que han sido tratadas con un exceso de N, como ocurrió en nuestro experimento, las actividades P5CS en raíces y hojas disminuyeron drásticamente (Tabla 20), mientras las actividades OAT en raíces y hojas aumentaron significativamente (Tabla 20), lo cual es consistente con la interpretación que la ruta de la ornitina es favorecida bajo estas condiciones.

El otro factor importante que regula los niveles de prolina en las plantas es la degradación. Esto es, la L-prolina es oxidada a pirrolina-5-carboxilato (P5C) en la mitocondria vegetal por la prolina dehidrogenasa (PDH) (Rayapati y Stewart, 1991). En nuestro

experimento, las actividades PDH en raíces ($P < 0.01$; Tabla 20) y hojas ($P < 0.05$; Tabla 20) disminuyeron a medida que las dosis de N fueron aumentando, presentando las mínimas actividades en el tratamiento N6, con una disminución de 73 % y 40 % con respecto a las máximas actividades encontradas en N1. Como indicados anteriormente, las concentraciones de prolina en raíces y hojas (Tabla 20) registraron sus máximas concentraciones en N6. Estos resultados pueden ser probablemente explicados por la inversa correlación entre la concentración de prolina y la actividad PDH observada en raíces y hojas ($r = -0.75^*$ y $r = -0.88^{***}$, respectivamente).

Uno de los factores que pueden ser determinantes en la regulación de los procesos de síntesis de prolina es la disponibilidad y la concentración de las formas de nitrógeno inorgánico (NO_3^- y NH_4^+) en las plantas (Delauney et al., 1993). En plantas superiores, el papel fisiológico de la acumulación de prolina aún no ha sido completamente determinado. Aparte de actuar como un “osmoregulador”, la acumulación de prolina tiene otras funciones celulares importantes. La prolina puede actuar como una fuente de N en la célula bajo condiciones de estrés, donde la acumulación de este compuesto nitrogenado pudiera ser utilizado como una forma de N almacenado (Dandekar y Uratsu, 1988). En nuestro experimento, la aplicación de elevadas dosis de N aumentaron las concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ en las raíces y hojas (Figura 3 y 4), presentando las máximas concentraciones de estos iones en el tratamiento N6. De este modo, nuestros resultados indican una correlación positiva y significativa entre los NO_3^- y NH_4^+ y los contenidos de prolina (raíces: NO_3^- -prolina, $r = 0.80^{**}$; NH_4^+ -prolina, $r = 0.73^{**}$; hojas: NO_3^- -prolina, $r = 0.74^{**}$; NH_4^+ -prolina, $r = 0.85^{***}$).

La ruta del glutamato para la síntesis de prolina es predominante bajo condiciones de estrés, tal como la elevada salinidad y bajo condiciones de deficiencia de N. Por el contrario, las plantas tratadas con exceso de N, la P5CS permanece en niveles bajos, mientras los niveles de la OAT incrementan significativamente, indicando que la ruta de la ornitina asume más importancia bajo estas condiciones (Rhodes et al., 1986). En nuestro experimento, la deficiencia de N fue caracterizada por la disminución de la acumulación de prolina en raíces y hojas, fundamentalmente porque la degradación de la prolina fue favorecida por la estimulación de la PDH. Estos resultados son consistentes con otros trabajos, los cuales reportan que bajo condiciones de deficiencia de N, la degradación de la prolina produce

glutamato, la cual es utilizada como una fuente nitrogenada para la síntesis de otros aminoácidos (Dandekar y Uratsu, 1988). Por otro lado, bajo deficiencia de N (N1), la prolina fue sintetizada por las rutas del glutamato y la ornitina, aunque la actividad enzimática P5CS involucrada en la biosíntesis de este aminoácido, fue predominante sobre la OAT (Tabla 20).

En resumen, la deficiencia de N (N1 y N2) es caracterizada por una disminución en la acumulación de prolina en raíces y hojas, fundamentalmente porque la degradación de la prolina es aumentada por la estimulación de la enzima prolina dehidrogenasa. Por el contrario, bajo condiciones adecuadas de N (6.0 mM de N) en plantas de judía, la síntesis de prolina excede a la degradación. Estos resultados implican que bajo condiciones óptimas de N, la planta pudiera no necesitar degradar prolina para la síntesis de otros compuestos nitrogenados. En el tratamiento N3 la actividad OAT fue superior que la P5CS, sugiriendo que bajo condiciones adecuadas de N, la prolina es sintetizada principalmente por la ruta de la ornitina. Por otro lado, la aplicación de elevadas dosis de N en *Phaseolus* es caracterizada por la acumulación de NO_3^- , NH_4^+ y prolina en raíces y hojas. Sin embargo, aunque las enzimas encargadas de la biosíntesis de prolina, tales como la Ornitina- δ -aminotransferasa y Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa, varían en su comportamiento dependiendo del estado nutricional del N, en nuestro experimento, este aminoácido parece ser sintetizado principalmente por la enzima Ornitina- δ -aminotransferasa, sugiriendo la predominancia de la ruta de la ornitina sobre la ruta de la glutamina. Finalmente, bajo nuestras condiciones experimentales, la prolina puede ser definido como un buen indicador del estado nutricional de N en plantas de judía.

4.7.1.2. Vaínas y Semillas

Elevados niveles de prolina han sido encontrados en flores y semillas de *Arabidopsis* (Chiang y Dandekar, 1995), en inflorescencias y silicuas de *Brassica napus* (Flasinski y Rogozionka, 1985), en óvulos de *Vicia faba* (Venekamp y Koot, 1984), en granos de polen de *Petunia sp.* y *Lycopersicon esculentum* (Fujita et al., 1998), y en frutos maduros de diferentes especies (Stines et al., 1999).

El metabolismo de la prolina es un mecanismo típico de la adaptación bioquímica en organismos vivos sujetos a condiciones de estrés (Delauney y Verma, 1993). Dos rutas de biosíntesis de prolina son conocidas en plantas superiores: la ruta del glutamato y la de la ornitina. En el caso de la primera, la prolina es sintetizada desde el glutamato vía Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) por dos sucesivas reducciones, las cuales son catalizadas por la P5C sintetasa (P5CS) y la P5C reductasa (P5CR); la enzima P5CS constituye el paso limitante bajo esta ruta de síntesis de prolina en las plantas (Kavi Kishor et al., 1995). Con respecto a la ruta metabólica del glutamato para la biosíntesis de prolina, en nuestro experimento, la aplicación de elevadas dosis de N afectaron significativamente la actividad P5CS en vainas y semillas ($P < 0.01$; Tabla 21), presentando las mínimas actividades en el tratamiento N6, con decrementos de 19 % y 18% respectivamente, en relación a las máximas actividades encontradas en N1.

Tabla 21. Efecto de los tratamientos de N sobre el metabolismo de la prolina en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	P5CS	OAT	Prolina	PDH
Raíces				
N1	0.255	2465	85	300
N2	0.245	2520	90	272
N3	0.220	2611	102	136
N4	0.204	2821	108	124
N5	0.184	3628	192	117
N6	0.178	2825	290	106
Significación	**	**	***	**
Hojas				
N1	0.242	1076	140	124
N2	0.232	1253	175	104
N3	0.216	1430	239	94
N4	0.203	2158	329	73
N5	0.191	2944	423	69
N6	0.178	3040	486	69
Significación	**	**	***	**

Δ^1 -Pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) expresada en μM de Pi mg^{-1} proteínas min^{-1} ; Ornitina- δ -aminotransferasa (OAT) expresada en nmol de NADH oxidado mg^{-1} proteínas min^{-1} ; Prolina expresada en μg g^{-1} de peso fresco; Prolina dehidrogenasa (PDH) expresada en nmol de NAD reducido mg^{-1} proteínas min^{-1} .

Con referencia a la ruta metabólica de la ornitina, la actividad Ornitina- δ -aminotransferasa (OAT), la cual transforma la ornitina y α -ketoglutarato a GSA y glutamato, siendo la última transformación hacia prolina, también fue influenciada significativamente por los tratamientos de N. En nuestro experimento, la aplicación de elevada dosis de N estimulo las actividades de OAT en vainas y semillas ($P < 0.01$; Tabla 21), presentando las máximas actividades en N6, siendo estas más elevadas en un 36 % y 65 % respectivamente, en comparación que las bajas actividades encontradas en N1.

Con respecto a los niveles de prolina en vainas y semillas ($P < 0.001$; Tabla 21), las máximas concentraciones en ambos órganos aparecieron bajo los tratamientos N6. Nuestros resultados revelan una inversa relación entre la actividad enzimática P5CS y la concentración de prolina en vainas ($r = 0.80^{**}$) y semillas ($r = -0.75^{**}$), mientras que ambos órganos muestran una relación positiva y significativa entre la actividad OAT y la concentración de prolina (vainas, $r = 0.81^{**}$; semillas, $r = 0.97^{***}$).

Nosotros sugerimos que la biosíntesis y acumulación de prolina en vainas y semillas, en nuestro experimento, debido quizás a las elevadas dosis de N, favoreció la ruta de la ornitina. Nuestros resultados no están de acuerdo con los de Rhodes et al., (1986) y Delauney y Verma (1993), quienes mencionan que la ruta del glutamato para la biosíntesis de prolina es la predominante bajo condiciones de estrés tales como la elevada salinidad y condiciones de deficiencia de N. Contrariamente, plantas en donde se les ha aportado elevados niveles de N como es el caso de nuestro experimento, las actividades P5CS en vainas y semillas (Tabla 21) disminuyeron drásticamente, mientras las actividades OAT en vainas y semillas (Tabla 21) aumentaron significativamente (Tabla 21), indicando que la ruta de la ornitina asume más importancia bajo estas condiciones.

El otro importante factor que controla los niveles de prolina en la planta es la degradación. La L-prolina es oxidada a P5C en la mitocondria vegetal por la prolina dehidrogenasa (PDH) (Rayapati y Stewart, 1991). La degradación de prolina produce glutamato, la cual es utilizada como una fuente de N para la síntesis de otros aminoácidos. En nuestro experimento, las actividades PDH en vainas y semillas disminuyeron a medida que las dosis de N fue aumentando, presentando las mínimas actividades en N6, con una disminución del 65 % y 44 % con respecto a la máxima actividad encontrada en N1. Como

indicamos anteriormente, las concentraciones de prolina en vainas y semillas (Tabla 21) registraron sus máximos niveles en el tratamiento N6; esto puede explicarse por la inversa relación entre prolina y la actividad PDH en vainas ($r = -0.75^{**}$) y en semillas ($r = -0.81^{**}$).

Nuestros resultados del metabolismo de la prolina en vainas y semillas de *Phaseolus vulgaris* tratadas con las elevadas dosis de N pudieran ser explicados por los efectos negativos causados por la toxicidad de este nutriente. Como se ha indicado en diversos estudios, una de las características por la cual la toxicidad de N es definida, es la restricción del crecimiento radicular, la desorganización del tejido vascular, lo que finalmente se traduce en una restricción en la toma de agua (Benton Jones, 1997), este último síntoma es similar a los causados por la sequía y salinidad (Delauney y Verma, 1993). Normalmente, las plantas responden a un estrés hídrico activando la biosíntesis de prolina, estos resultados son similares a los encontrados en nuestro experimento.

La respuesta metabólica de prolina bajo condiciones de toxicidad de N es reflejado principalmente en las semillas, en las cuales la acumulación de prolina es más elevada que la encontrada en las vainas, por que en las semillas la actividad PDH parece estar fuertemente inhibida por la toxicidad de N. Estos resultados definen a la acumulación de prolina como un bioindicador de la toxicidad de N en las semillas de las plantas de judía.

Finalmente, otros factores que pueden determinar los procesos de regulación de la síntesis de prolina es la disponibilidad y la concentración de formas nitrogenadas inorgánicas (NO_3^- y NH_4^+) en las plantas (Delauney et al., 1993). En las plantas superiores, el propósito de la acumulación de prolina en la actualidad no esta completamente elucidado. A parte de actuar como un osmolito, la acumulación de prolina tiene otras importantes funciones celulares. La prolina puede actuar como una fuente de N en la célula bajo condiciones de estrés, donde la acumulación de éste compuesto nitrogenado pudiera ser utilizado como una forma de almacenar N (Dandekar y Uratsu, 1988). En nuestro experimento, la aplicación de elevadas dosis de N incrementaron drásticamente la concentración de NO_3^- y NH_4^+ en vainas y semillas (Figuras 3 y 4). Nuestros resultados indican una relación positiva y significativa en las vainas y semillas entre los niveles de NO_3^- y NH_4^+ y los contenidos de prolina (vainas, NO_3^- -prolina, $r = 0.83^{**}$ y NH_4^+ -prolina, $r = 0.70^{**}$; semillas: NO_3^- -prolina, $r = 0.94^{***}$ y NH_4^+ -prolina, $r = 0.90^{***}$, respectivamente).

En nuestro experimento, la deficiencia de N fue caracterizada por una disminución en la acumulación de prolina en vainas y semillas, principalmente por que la degradación de prolina fue favorecida por la estimulación de la enzima PDH. Estos resultados son consistentes con otros resultados, los cuales indican que bajo condiciones de deficiencia de N, la degradación de prolina produce glutamato, el cual es utilizado como una fuente de nitrógeno para la síntesis de otros aminoácidos (Dandekar y Uratsu, 1988). Contrariamente, bajo condiciones adecuadas de N, como es el caso de nuestro experimento, en la dosis de 6.0 mM de N, la síntesis de aminoácidos excedió a la degradación, de este modo se explicaría la acumulación de prolina en las vainas y semillas en el tratamiento N3 (6.0 mM de N) y las mínimas actividades enzimáticas de la PDH en este tratamiento. Estos datos encontrados son lógicos, dado que bajo condiciones óptimas de N la planta pudiera no necesitar degradar prolina para la síntesis de otros compuestos nitrogenados.

Por otro lado, aunque bajo condiciones de deficiencia la P5CS fue activada (Tabla 21) y la actividad OAT fue disminuida (Tabla 21), parece ser que bajo deficiencia de N (N1), así como niveles óptimos de N (N3) la prolina es sintetizada principalmente por OAT, puesto que la actividad de esta enzima excedió a la P5CS (la oxidación de una molécula de NADH por OAT es equivalente a la producción de una molécula de Pi por la acción de la P5CS) (Verma y Zhang, 1999), sugiriendo por lo tanto la predominancia de la ruta de la ornitina sobre la ruta de la glutamina.

En resumen, bajo nuestras condiciones experimentales, el contenido de prolina pudiera ser definido como un bioindicador de la deficiencia de N, particularmente en semillas, puesto que las diferencias en concentraciones de este aminoácido en semillas tratadas fueron más elevadas que las encontradas en las vainas. Por otro lado, la acumulación de NO_3^- y NH_4^+ en vainas y semillas de judía causado posiblemente por la aplicación de dosis tóxicas de N, favoreció la estimulación de la síntesis y acumulación de prolina en ambos órganos, a través de la ruta biosintética de la ornitina, reflejado en la máxima actividad OAT y las mínimas actividades P5CS y PDH en el tratamiento N6. Las elevadas concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ en semillas que en vainas, pudieran explicar la gran acumulación de prolina encontrada en nuestras semillas estudiadas. Finalmente, la acumulación de prolina en ambos órganos es considerado un bioindicador de la toxicidad de N en frutos de plantas de judía.

4.7.2. COMPUESTOS DE AMONIOS CUATERNARIOS

4.7.2.1. Raíces y Hojas

Distintos estreses abióticos como los provocados por la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas, el encharcamiento, así como la toxicidad iónica provocan la reducción del potencial hídrico de los tejidos. Las plantas responden a este cambio sintetizando una amplia gama de compuestos denominados “osmoprotectores”, que actúan bien como osmolitos facilitando la retención de agua por el citoplasma y reajustando así el potencial hídrico intracelular, o bien como verdaderos compuestos protectores que estabilizan la estructura de las membranas y de las macromoléculas (Rhodes y Hanson, 1993). Los osmoprotectores son, pues, solutos compatibles con el funcionamiento celular en condiciones de estrés osmótico. Los compuestos nitrogenados orgánicos de bajo peso molecular son por lo tanto importantes para la adaptación de las plantas a los substratos salinos. Entre los osmoprotectores encontramos compuestos nitrogenados siendo los más estudiados por su importancia la prolina y los compuestos amonios cuaternarios (Azcon-Bieto y Talón, 2002).

En la agricultura actual, el principal tipo de estrés es el relacionado con el estado nutricional de las plantas debido al uso excesivo de fertilizantes inorgánicos, siendo el más empleado el N (Ruiz y Romero, 1998, 1999). Sin embargo, y a pesar de esta situación, existe muy poca bibliografía disponible sobre el estrés iónico y la producción y distribución de los compuestos de amonios cuaternarios en plantas. En nuestro estudio, la aplicación de N supuso un incremento significativo de la concentración de colina y amonio cuaternario total tanto en raíces como en hojas ($P < 0.01$; Tabla 22), presentándose las máximas concentraciones en N6, mostrando un incremento de un 40 % y 42 % respectivamente, en comparación con las mínimas concentraciones encontradas en las dosis bajas de N.

La acumulación de estos compuestos se ha observado principalmente cuando existen condiciones de estrés. En nuestro experimento, observamos que solamente se acumulan bajo condiciones de toxicidad de N (N6), sin embargo en condiciones de estrés provocadas por la deficiencia de N no se produce la acumulación de estos compuestos por lo que se podrían definir como bioindicadores solamente del estrés por toxicidad de N.

Tabla 22. Efecto de los tratamientos de N sobre la concentración de colina y amonio cuaternarios totales en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	Colina	Amonio cuaternario total
Raíces		
N1	2.71	9.57
N2	3.30	11.81
N3	3.52	12.55
N4	3.97	13.25
N5	4.30	14.83
N6	4.68	16.14
Significación	**	**
Hojas		
N1	3.93	13.88
N2	4.69	16.75
N3	5.42	18.40
N4	5.75	19.19
N5	6.46	22.29
N6	7.20	24.86
Significación	**	**

Amonio cuaternario total y Colina expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.

Nuestros resultados son lógicos ya que bajo deficiencia de N las plantas como mecanismo de supervivencia remobilizan todos los compuestos nitrogenados con el fin de transportar los aminoácidos a las zonas de crecimiento. En condiciones de toxicidad, la acumulación de compuestos osmoprotectores se debe a su función de protección y por otro lado a que estos compuestos actúan como una fuente de almacenamiento de N.

4.7.2.2. Vañas y Semillas

Como podemos comprobar, y al igual que ocurría en raíces y hojas, colina y amonio cuaternario total (Tabla 23), fueron influenciadas por las dosis crecientes de N, presentando el tratamiento N6 las máximas concentraciones, en relación a las mínimas observadas en N1, mostrando una disminución de 37 % y 45 % respectivamente. Por otro lado, resaltar que la mayor acumulación de estos compuestos nitrogenados se presentó en la semillas y en menor

proporción en las vainas (Tabla 23). La acumulación de estos compuestos en frutos se podría explicar también como un mecanismo de detoxificación de los NO_3^- y NH_4^+ en el tratamiento N6. La asimilación y acumulación fundamentalmente de colina y amonio cuaternario total en las semillas podría actuar como un proceso de utilización de NO_3^- y NH_4^+ con el fin de evitar una mayor acumulación de estas formas inorgánicas de N en la planta.

En resumen, bajo nuestras condiciones experimentales, el contenido de colina y amonio cuaternario total en ambos órganos pudiera ser definido como un bioindicador de la toxicidad de N en frutos de plantas de judía, particularmente en semillas, puesto que las diferencias en concentraciones de estos compuestos nitrogenados en semillas tratadas fueron más elevadas que las encontradas en las vainas. Las elevadas concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ en semillas que en vainas, pudieran explicar la gran acumulación de colina y amonio cuaternario total encontrada en nuestras semillas estudiadas. Finalmente, la acumulación de colina y amonio cuaternario total puede actuar como una fuente de N en la célula bajo condiciones de estrés, donde la acumulación de estos compuestos nitrogenados pudieran ser utilizados como una forma de almacenar N.

Tabla 23. Efecto de los tratamientos de N sobre la concentración de colina y amonios cuaternarios totales en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	Colina	Amonio cuaternario total
Vainas		
N1	2.93	11.75
N2	3.09	12.37
N3	3.50	14.01
N4	3.90	15.62
N5	4.00	16.03
N6	4.68	18.75
Significación	*	*
Semillas		
N1	3.21	12.84
N2	3.54	14.16
N3	4.20	16.82
N4	4.86	19.45
N5	5.44	21.76
N6	5.83	23.34
Significación	**	**

Amonio cuaternario total y Colina expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.

4.7.3. METABOLISMO DE LOS FENOLES

4.7.3.1. Raíces y Hojas

Los compuestos fenólicos son los productos secundarios más ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Muchos de estos compuestos son fisiológicamente y ecológicamente importantes, estando involucrados en diversos procesos tal como rhizogénesis (Curir et al., 1990), vitrificación (Kevers et al., 1984), resistencia a diferentes tipos de estrés (Delalonde et al., 1996) y en reacciones redox (Takahama y Oniki, 1992). Sin embargo, los procesos que han sido más ampliamente estudiados y que están más directamente involucrados con los compuestos fenólicos son los relacionados con la resistencia a plagas y enfermedades (Dübeler et al., 1997).

El metabolismo de los compuestos fenólicos en las plantas involucra tanto la síntesis y la oxidación de estos compuestos. La fenilalanina amonio-liasa (PAL) es la enzima clave de la ruta biosintética de la mayoría de los compuestos fenólicos (Hao et al., 1996). En nuestro experimento, la aplicación de elevadas dosis de N estimularon la actividad PAL ($P < 0.01$; Tabla 24), siendo un 70 % y 61 % más elevado que los valores mínimos registrados con las dosis bajas de N (N1). Las concentraciones de ortodifenoles y fenoles totales en raíces y hojas ($P < 0.01$; Tabla 24) mostraron una tendencia similar; siendo las plantas tratadas con 24 mM de N las que mostraron la mayor acumulación ortodifenoles y fenoles totales en ambos órganos, presentando un incremento de 51 % y 64 % comparado a las dosis más bajas de N ($P < 0.01$; Tabla 24).

La relación entre la actividad PAL y la concentración de fenoles totales fue positiva y significativa en ambos órganos (raíz: PAL-fenoles totales, $r = 0.80^{**}$; hoja: PAL-fenoles totales, $r = 0.83^{**}$). Sin embargo, Nemat Allah y Younis (1995), indican que la reducción de la producción de biomasa coincide con los cambios en los parámetros del metabolismo secundario, sugiriendo un papel regulatorio en el metabolismo de los fenoles en las plantas. En nuestro experimento, la relación entre la producción de biomasa foliar y la concentración de fenoles totales fue positivo y significativo (fenoles totales-biomasa foliar, $r = 0.99^{***}$), confirmando que la acumulación de estos compuestos secundarios contribuyeron para el

incremento en la producción de biomasa en este órgano, como es mencionado por Nemat Allah y Younis (1995) y como es encontrado en nuestro experimento.

Tabla 24. Efecto de los tratamientos de N sobre el metabolismo fenólico en raíces y hojas de plantas de judía.

Tratamiento	PAL	Fenoles totales	Ortodifenoles	PPO	POD
Raíces					
N1	0.56	7.52	2.48	2.86	3.67
N2	0.82	8.44	2.95	2.18	2.34
N3	1.24	10.03	3.71	1.66	1.99
N4	1.38	11.12	4.33	1.51	1.72
N5	1.52	12.19	5.00	1.35	1.35
N6	1.88	15.41	6.93	1.20	1.22
Significación	**	**	**	**	**
Hojas					
N1	1.60	25.07	10.27	6.37	7.34
N2	2.02	26.38	11.87	5.61	5.22
N3	2.96	29.50	12.98	4.51	4.63
N4	3.22	30.90	13.90	4.32	4.21
N5	3.46	32.10	14.76	4.12	3.48
N6	4.18	33.50	16.08	3.88	3.32
Significación	**	**	**	**	**

Fenilalanina amonio-liasa (PAL) expresada en μM de ácido cinámico producido mg^{-1} proteínas min^{-1} ; Fenoles totales y Ortodifenoles expresados en μmol de ácido caféico g^{-1} p.f.; Polifenol oxidasa (PPO) expresada en μmol de ácido caféico oxidado mg^{-1} proteínas min^{-1} ; Peroxidasa (POD) expresada en μmol de guaicol oxidado mg^{-1} proteínas min^{-1} .

Las enzimas PPO y POD catalizan la oxidación de fenoles a quinonas (Thiapyapong et al., 1995). En este estudio, las dosis de N también influenciaron significativamente las actividades de la PPO y POD en raíces y hojas ($P < 0.01$; Tabla 24), ambas enzimas presentaron las máximas actividades en el tratamiento N1 y las mínimas actividades en las dosis elevadas de N, mostrando una disminución de 39 % y 58 % respectivamente. De este modo, las mínimas actividades para estas dos enzimas, junto con las máximas actividades PAL presentadas en el tratamiento de 24 mM de N parece ser la causa de la acumulación foliar de compuestos fenólicos en este tratamiento. Nosotros proponemos que la aplicación de elevadas dosis de N en general favorecen la síntesis y acumulación de fenoles, y también inhibe los procesos de oxidación de estos compuestos.

La oxidación de compuestos fenólicos generalmente conduce a la producción de quinonas (Thipyapong et al., 1995), las cuales son compuestos altamente tóxicos que generan especies de oxígeno reactivo (ROS). En nuestro experimento, la oxidación de fenoles fue importante en el tratamiento deficiente de N (N1), ya que este tratamiento mostró las máximas actividades PPO (Tabla 24) y las más bajas concentraciones de fenoles totales (Tabla 24). Por lo tanto, este tratamiento pudiera haber originado elevadas concentraciones de H₂O₂.

Los mecanismos que gobiernan la acumulación radicular y foliar de fenoles y H₂O₂ en el tratamiento de 24 mM de N (N6) parecen ser los siguientes: Primero, la acumulación tóxica y perjudicial de NH₄⁺, resultado del suplemento elevado de NH₄NO₃ (24 mM de N) y de la fuerte actividad PAL encontrada en este tratamiento, pudiera explicar la acumulación de fenoles y H₂O₂, dado que estos compuestos normalmente se acumulan como una respuesta de protección contra diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Dixon y Paiva, 1995; Willekens et al., 1997).

Además, la toxicidad de N incrementa la susceptibilidad de las plantas a patógenos (Benton Jones, 1997; Barker, 1999). Este hecho, pudiera explicar la acumulación de compuestos fenólicos y H₂O₂, ya que ambos compuestos forman parte preventiva del sistema de defensa de las plantas contra la infección de patógenos (Smith-Becker et al., 1998).

Finalmente, la acumulación foliar de H₂O₂ en las dosis elevadas de N pudieran explicar la tendencia de la producción de biomasa radicular y foliar en nuestro experimento, ya que la producción de biomasa disminuye con el incremento de la dosis de N. Esta reducción pudiera ser debido a los efectos tóxicos de la acumulación de H₂O₂ en las plantas tratadas con 24 mM de N (Okuda et al., 1991).

En resumen, nuestros resultados indican que la aplicación de dosis de 1.5 y 3.0 mM de N pueden ser definidas como subóptimas o deficientes de N, ya que disminuyen drásticamente la biomasa radicular y foliar en plantas de judía. Así mismo, la aplicación de 24 mM de N puede ser definido como tóxico, debido a que este tratamiento disminuye drásticamente el crecimiento de las plantas de judía en nuestro experimento. Además, el estrés abiótico causado por la aplicación de 24 mM de N, inhiben las enzimas PPO y POD, estimulan la acumulación la actividad PAL. El resultado fue la acumulación de compuestos fenólicos y H₂O₂ a nivel

radicular y foliar, esta acumulación de compuestos aparentemente causaron la reducción en la producción de biomasa.

4.7.3.2. Vañas y Semillas

El metabolismo de los compuestos fenólicos es regulado por la actividad de diversas enzimas. La fenilalanina amonio-*liasa* (PAL) es la enzima clave de la ruta biosintética de muchos compuestos fenólicos. La PAL cataliza la eliminación de NH_4^+ de la L-fenilalanina, dando origen al ácido transcinámico, siendo el primer paso en la biosíntesis de fenilpropanoides en las plantas, tales como lignina, suberina, flavonoides, cumarinas y amidas (Solecka y Kacperska, 1995; Rösler et al., 1997). La actividad PAL es afectada por numerosos factores, como la luz, la temperatura, los reguladores de crecimiento, inhibidores de RNA, síntesis de proteínas, heridas, ataque de patógenos, aplicación de funguicidas y herbicidas y el estado nutricional de ciertos nutrientes, tales como N y P (Jones, 1984; Nemat Allah y Jounis, 1995; Ruiz et al., 1998, 1999). En nuestro experimento, la aplicación de elevadas dosis de N estimularon la actividad PAL en vañas y semillas ($P < 0.01$; Tabla 25), siendo un 70 % y 68 % más elevado que los valores mínimos registrados con las dosis bajas de N (N1). Los contenidos de ortodifenoles y fenoles totales en vañas y semillas (Tabla 25) mostraron un comportamiento similar; siendo las plantas tratadas con 24 mM de N las que mostraron la mayor acumulación de ortodifenoles y fenoles totales en ambos órganos, presentando un incremento de 48 % y 36 % comparado a las dosis más bajas de N ($P < 0.01$; Tabla 25).

La relación entre la actividad PAL y la concentración de fenoles totales fue positivo y significativo en ambos órganos (vañas: PAL-fenoles totales, $r = 0.78^{**}$; semillas, PAL-fenoles totales, $r = 0.82^{**}$). Sin embargo, Nemat Allah y Jounis (1995), indican que la reducción de la producción de frutos coincide con los cambios en los parámetros del metabolismo secundario, sugiriendo un papel regulatorio en el metabolismo de los fenoles en las plantas. En nuestro experimento, la relación entre la producción de frutos y la concentración de fenoles totales fue positivo y significativo (fenoles totales-producción, $r = 0.90^{***}$), confirmando que la acumulación de estos compuestos secundarios contribuyeron en el incremento en la

producción de frutos (vaínas y semillas), como es mencionado por Nemat Allah y Jounis (1995) y como es encontrado en nuestro experimento.

Tabla 25. Efecto de los tratamientos de N sobre el metabolismo fenólico en vainas y semillas de plantas de judía.

Tratamiento	PAL	Fenoles totales	Ortodifenoles	PPO	POD
Vaínas					
N1	0.32	5.33	1.12	1.33	1.54
N2	0.42	5.80	1.27	1.17	1.09
N3	0.68	6.78	1.56	0.94	0.97
N4	0.77	7.41	1.77	0.90	0.88
N5	0.86	7.70	1.92	0.86	0.73
N6	1.08	8.37	2.17	0.81	0.69
Significación	**	**	**	*	**
Semillas					
N1	0.38	6.53	1.35	2.54	2.74
N2	0.50	7.00	1.54	2.38	2.29
N3	0.81	7.98	1.88	2.15	2.17
N4	0.92	8.61	2.15	2.11	2.08
N5	1.03	8.90	2.33	2.07	1.93
N6	1.20	9.57	2.43	2.02	1.89
Significación	**	**	**	*	**

Fenilalanina amonio-liasa (PAL) expresada en μM de ácido cinámico producido mg^{-1} proteínas min^{-1} ; Fenoles totales y Ortodifenoles expresados en μmol de ácido caféico g^{-1} p.f.; Polifenol oxidasa (PPO) expresada en μmol de ácido caféico oxidado mg^{-1} proteínas min^{-1} ; Peroxidasa (POD) expresada en μmol de guaicol oxidado mg^{-1} proteínas min^{-1} .

Las enzimas PPO y POD catalizan la oxidación de fenoles a quinonas (Thiapyanpong et al., 1995). En este estudio, la dosis de N también influenciaron significativamente las actividades de la PPO y POD en vainas y semillas ($P < 0.01$; Tabla 25), ambas enzimas presentaron las máximas actividades en el tratamiento N1 y las mínimas actividades en las dosis elevadas de N, mostrando una disminución de 39 % y 55 % respectivamente. De este modo, las mínimas actividades para estas dos enzimas, junto con las máximas actividades PAL presentadas en el tratamiento de 24 mM de N parece ser la causa de la acumulación en frutos de compuestos fenólicos en este tratamiento. Nosotros proponemos que la aplicación de

elevadas dosis de N en general favorecen la síntesis y acumulación de fenoles, y también inhibe los procesos de oxidación de estos compuestos.

La oxidación de compuestos fenólicos generalmente conduce a la producción de quinonas (Thiapyapong et al., 1995). En nuestro experimento, la oxidación de fenoles fue sustancial en el tratamiento deficiente de N (N1), ya que este tratamiento mostró las máximas actividades PPO (Tabla 25) y las más bajas concentraciones de fenoles totales (Tabla 25). Por lo tanto, este tratamiento pudiera haber originado elevadas concentraciones de H₂O₂.

Los mecanismos que gobiernan la acumulación de fenoles en frutos en el tratamiento de 24 mM de N (N6) parecen ser los siguientes: Primero, la acumulación tóxica y perjudicial de NH₄⁺, resultado del suplemento elevado de NH₄NO₃ (24 mM de N) y de la fuerte actividad PAL encontrada en este tratamiento, pudiera explicar la acumulación de fenoles, dado que estos compuestos normalmente se acumulan como una respuesta de protección contra diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Dixon y Paiva, 1995; Willekens et al., 1997).

Además, la toxicidad de N incrementa la susceptibilidad de las plantas a patógenos (Benton Jones, 1997; Barker, 1999). Este hecho pudiera también explicar la acumulación de compuestos fenólicos y H₂O₂, ya que ambos compuestos forman parte preventiva del sistema de defensa de las plantas contra la infección de patógenos (Smith-Becker et al., 1998).

Finalmente, la probable acumulación de H₂O₂ en frutos provocado por la aplicación de dosis elevadas de N pudieran explicar el comportamiento del rendimiento en nuestro experimento, ya que la producción de frutos disminuye con el incremento de la dosis de N. Esta reducción pudiera ser debido a los efectos tóxicos por la acumulación de H₂O₂ en las plantas tratadas con 24 mM de N (Okuda et al., 1991).

En resumen, nuestros resultados indican que la aplicación de 24 mM de N puede ser definido como tóxico, debido a que este tratamiento disminuye drásticamente el crecimiento de las plantas de judía, así como su producción en nuestro experimento. Además, el estrés abiótico causado por la aplicación de esta dosis de N inhiben las enzimas PPO y POD, estimulando la actividad PAL. El resultado fue la acumulación de compuestos fenólicos y probablemente H₂O₂ en frutos, lo que aparentemente causó la reducción en la producción comercial de frutos.

5. CONCLUSIONES

- 1.- La aplicación de 6 mM de N (N3) resultó ser el tratamiento óptimo para una eficaz producción de biomasa y productividad en las plantas de judía, mientras que los tratamientos por debajo de N3 (N1 y N2), se caracterizaron por una menor producción de biomasa y productividad. Por el contrario, las dosis por encima del óptimo (N4, N5 y N6) dieron lugar a la disminución drástica de la producción de biomasa y productividad (producción total y comercial), siendo estos parámetros buenos indicadores para definir un estrés nutricional respecto al N.

- 2.- Las plantas de judía carecen de mecanismos eficaces que evitan la reducción de la absorción y asimilación de N cuando la acumulación intracelular de fracciones nitrogenadas inorgánicas (NO_3^- y NH_4^+) sobrepasan el poder de asimilación de éstas. Por lo tanto, la acumulación de NO_3^- y NH_4^+ que se produce a partir del tratamiento N4, y en especial en el tratamiento N6, podría ser la causa de la toxicidad que presentan estas plantas, lo que se reflejaría en la reducción de biomasa y productividad.

- 3.- En definitiva, podemos definir a las plantas de judía incapaces de impedir la acumulación de NO_3^- y NH_4^+ cuando estas formas se presentan a concentraciones elevadas en el medio. Esta característica, las hace buenas candidatas como extractoras de estos iones en especial del NO_3^- tan perjudicial para el medio ambiente.

- 4.- Las dosis deficientes y tóxicas de N se caracterizaron por presentar los niveles más bajos de las distintas fracciones de P, así como la mayor actividad fosfatasa ácida, esto debido a la influencia directa que se da entre los niveles de N y los de P. Por el contrario, el tratamiento N4 presentó los mayores niveles de las distintas fracciones de P y la menor actividad fosfatasa ácida. Por otro lado, indicar que la mayor proporción de P en raíces y hojas está en la forma de Pi y P-orgánico soluble representando valores superiores al 65% en relación al P total.
- 5.- El P-fitato fue la fracción más importante del P total presente únicamente en las semillas de judía, la cual se puede considerar un bioindicador del estado nutricional de P.
- 6.- Bajo condiciones deficientes (N1 y N2) y óptimas de N (N3) se caracterizaron por presentar la menor acumulación en los niveles de K, Ca y Mg en su forma total y soluble, así como las mínimas actividades PK y ATPasa inducidas por K, Ca y Mg, con respecto a la actividad PK y ATPasa basal; lo cual indica condiciones cercanas a las óptimas de estos cationes. Con lo que se refiere a los tratamientos elevados de N (N4, N5 y N6) se caracterizaron por presentar las plantas de judía concentraciones decrecientes de K, Ca y Mg total y soluble en los diferentes órganos analizados, sin embargo, las actividades PK y ATPasa inducidas con K, Ca y Mg se incrementaron alcanzando sus máximas actividades con respecto a la PK y ATPasa basal; lo que indica una necesidad fisiológica de estos cationes en los tratamientos elevados de N (N4, N5 y N6).

- 7.- La actividad ATPasa basal e inducida con K, Ca y Mg siguió un comportamiento similar a la actividad PK, lo que reflejan ambas el nivel de cationes en los distintos órganos analizados, por lo que se consideran buenos bioindicadores fisiológicos de estos cationes.
- 8.- La dosis considerada óptima de N (N3) se caracterizó por la estimulación de la síntesis de sacarosa, encontrándose las máximas actividades fructosa-1,6-bifosfatasa y sacarosa fosfato sintasa, estos resultados concuerdan con la mayor eficiencia cloroflica, producción de biomasa, productividad y calidad nutricional obtenida en este tratamiento. Con respecto a los tratamientos deficientes (N1 y N2) y tóxicos de N (N4, N5 y N6), estos se caracterizaron por una estimulación significativa de la degradación de sacarosa con las máximas actividades enzimáticas sacarosa sintasa y las invertasas ácida y alcalina, y presentando la menor eficiencia cloroflica, producción de biomasa, productividad y calidad nutricional, siendo más acentuada en los tratamientos tóxicos.
- 9.- Finalmente, indicar que el cociente obtenido de la relación sacarosa/almidón, pudiera ser considerado buen indicador de la deficiencia y/o toxicidad de N en las plantas de judía.

6. REFERENCIAS

- Ågren GI. 1985.** Theory for growth of plants derived from the nitrogen productivity concept. *Physiol. Plant.* 64: 17-28.
- Adalsteinsson S, Schjorring JK, Jensén P. 1994.** Regulation of phosphate influx in winter wheat: root-shoot phosphorus interactions. *J. Plant Physiol.* 143: 681-686.
- Ahmad I, Hellebust JA. 1988.** The relationship between inorganic nitrogen metabolism and proline accumulation in osmoregulatory responses of two euryhaline microalgae. *Plant Physiol.* 88: 348-354.
- Alt D, Stuwe S. 1982.** Decline of the nitrate content in lettuce (*Lactuca sativa* var. Capitata L.) by means of monitoring the nitrogen content of the nutrient solution in hydroponic systems. In: Proceeding of the Ninth International Plant Nutrition Colloquium, Warwick, England. Scaife A (ed.). pp. 17-21.
- Andersen PC, Brent VB, Ruseel FM III. 1995.** Water stress-and nutrient solution-mediated changes in water relations and amino acids, organic acids, and sugars in xylem fluid of *Prunus salicina* and *Lagerstroemia indica*. *J. Ame. Soc. Hort. Sci.* 120: 6-42.
- Andreeva TF, Maevskaya NS, Voevudska SY. 1998.** The relationship between photosynthesis and nitrogen assimilation in *Mustard* plants exposed to elevated nitrate rates in nutrient solutions. *Russian J. Plant Physiol.* 45: 702-705.
- ap Rees T. 1987.** Compartmentation of plant metabolism. In: The biochemistry of plants, Davies DD (ed.) Vol. 12 (Physiology of metabolism). San Diego, CA, USA: Academic Press, pp 87-115.
- Azcón-Bieto J, Talón M. 2001.** Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, pp 145-162.
- Badiani M, De Biasi MG, Felici M. 1990.** Soluble peroxidase from winter wheat seedlings with phenoloxidase-like activity. *Plant Physiol.* 93: 489-494.
- Baethgen WE, Alley MM. 1989.** A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 20: 961-969.
- Baghour M, Sánchez E, Ruiz JM, Romero L. 2001.** Metabolism and efficiency of phosphorus utilization during senescence in pepper plants: Response to nitrogenous and potassium fertilization. *J. Plant Nutr.* 24: 1731-1743.

- Banks FM, Driscoll SP, Parry MAJ, Lawlor DW, Knight JS, Gray JC, Paul MJ. 1999.** Decrease in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco. Relationship between photosynthesis, growth, and allocation at different nitrogen levels. *Plant Physiol.* 119: 1125-1136.
- Bar-Akiva A, Sagiv J, Hasday D. 1976.** Effect of mineral deficiencies on pyruvate kinase activity of citrus leaves. *Proc. 4th Int. Colloq. Plant Nutr.* 1: 109-118.
- Barber MS, Mitchell HS. 1997.** Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. *Int. Rev. Cytol.* 172: 243-293.
- Barker AV. 1999.** Ammonium accumulation and ethylene evolution by tomato infected with root-knot nematode and grown under different regimes of plant nutrition. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 30: 175-182.
- Barneix AJ, Causin HF. 1996.** The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *J. Plant Physiol.* 149: 358-362.
- Barret-Lennard EG, Dracup M, Greenway H. 1993.** Role of extracellular phosphatases in the phosphorus-nutrition of clover. *J. Exp. Bot.* 44: 1595-1600.
- Barthes L, Deléens E, Bousser A, Hoarau J, Prioul JL. 1996.** Xylem exudation is related to nitrate assimilation pathway in detopped maize seedlings: use of nitrate reductase and glutamine synthetase inhibitors as tools. *J. Exp. Bot.* 47: 485-495.
- Becker TW, Caroché M, Carrayol E, Hirel B. 1992.** Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase and light inducibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. *Plant Mol. Biol.* 19: 367-379.
- Belakbir A, Ruiz JM, Romero L. 2000.** Yield and fruit quality of pepper (*Capsicum annuum* L.) in response to bioregulators. *HortSci.* 33: 85-87.
- Bennet WF. 1993.** Nutrient deficiencies & toxicities in crop plants. APS Press, The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. pp. 202.
- Benton Jones J Jr. 1997.** The essential elements. In: *Hydroponics: A practical guide for the soilless grower.* Benton Jones JJr (ed.) St. Lucie Press, Boca Raton, Florida, pp 30-32.

- Benton Jones JJr. 1997.** 'Hydroponics: a practical guide for the soilless grower.' (St. Lucie Press, Boca Raton, FL).
- Benton Jones JJr. 1999.** Plant Nutrition Manual. CRC Press Boca Raton, Washington. pp. 33-54.
- Besford RT. 1979.** Phosphorus nutrition and acid phosphatase activity in leaves of seven plant species. J. Sci. Fd. Agric. 30: 282-285.
- Beyer WF, Fridovich I. 1987.** Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. Anal. Biochem. 161: 559-566.
- Biddinger EC, Liu C, Joly RJ, Raghothama KG. 1998.** Physiological and molecular responses of aeroponically grown tomato plants to phosphorus deficiency. J. Am. Soc. Hortic. 123: 330-333.
- Bielecki RL, Ferguson IB. 1993.** Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: Encyclopedia of plant physiology. Vol. 15a. Lauchli A, Bielecki RL. (eds.), Springer-Verlag, Berlin.
- Blevins DC, Hiatt AJ, Lowe RH, Leggett JE. 1978.** Influence of K on the uptake, translocation, and reduction of nitrate by barley seedlings. Agron. J. 70: 393-396.
- Blevins DC. 1985.** Role of potassium in protein metabolism in plants. In: Potassium in agricultura. Madison MB (ed.), WI. American Society of Agronomy. pp. 413-424.
- Blevins DG. 1989.** An overview of nitrogen metabolism in higher plants. In: Plant Nitrogen Metabolism. Poulton JE (ed.), Plenum, New York. pp 1-41.
- Blum A, Ebercon A. 1976.** Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. Crop Sci. 16: 61-67.
- Boggio SB, Palatnik JF, Heldt HW, Valle EM. 2000.** Changes in amino acid composition and nitrogen metabolizing enzymes in ripening fruits of *Lycopersicon esculentum* Mill. Plant Sci. 159: 125-133.
- Bolwell GP, Wojtaszek P. 1997.** Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense - a broad perspective. Physiol. Mol. Plant Pathol. 51: 347-366.

- Bowler CM, Van M, Inzé D. 1992.** Superoxide dismutase and stress tolerance Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 83-166.
- Bowsler CG, Hucklesby DP, Emes MJ. 1993.** Induction of ferredoxin-NADP oxidoreductase and ferredoxin synthesis in pea root plastids during nitrate assimilation. Plant J. 3: 463-467.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brennan T, Frenkel C. 1977.** Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. Plant Physiol. 59: 411-416.
- Büker M, Schünemann D, Borchert S. 1998.** Enzymic properties and capacities of developing tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit plastids. J. Exp. Bot. 49:681-691.
- Burns IG. 1992.** Influence of plant nutrient concentration on growth rate: use of a nutrient interruption technique to determine critical concentrations of N, P and K in young plants. Plant Soil. 142: 221-233.
- Burns IG. 1996.** Nitrogen supply, growth and development. Acta Horticulturae 482: 21-30.
- Caboche M, Rouzé P. 1990.** Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. Trends Genet. 6: 187-192.
- Cabrerizo PM, González EM, Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C. 2001.** Continuous CO₂ enrichment leads to increased nodule biomass, carbon availability to nodules and activity of carbon-metabolising enzymes but does not enhance specific nitrogen fixation in pea. Physiol. Plant. 113: 33-40.
- Cakmak I, Hengeler C, Marschner H. 1994a.** Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. J. Exp. Bot. 45: 1245-1250.
- Cakmak I, Hengeler C, Marschner H. 1994b.** Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. J. Exp. Bot. 45: 1251-1257.

- Cakmak I. 1994.** Activity of ascorbate-dependent H₂O₂-scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium and potassium-deficient leaves, but not in phosphorus-deficient leaves. *J. Exp. Bot.* 45: 1259-1266.
- Cakmak, I, Römheld V. 1997.** Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil.* 193, 71-83.
- Campa A. 1991.** Biological roles of plant peroxidases: known and essential function. In: *Peroxidases in Chemistry and Biology, Vol II.* Everse J, Everse K, Grisham MB (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL. pp 25-50.
- Campbell WH. 1996.** Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiol.* 111: 355-361.
- Cao W, Tibbitts TW. 1999.** Response of potatoes to nitrogen concentrations differ with nitrogen concentrations differ with nitrogen forms. *J. Plant Nutr.* 21: 615-623.
- Cao W, Tibbitts TW. 1998.** Response of potatoes to nitrogen concentrations differ with nitrogen concentrations differ with nitrogen forms. *J. Plant Nutr.* 21: 615-623.
- Carbonell-Barrachina AC, Burló-Carbonell F, Mataix-Beneyto J. 1998.** Response of bean micronutrient nutrition to arsenic and salinity. *J. Plant Nutr.* 21: 1287-1299.
- Carbonell-Barrachina AC, Burló-Carbonell F, Mataix-Beneyto J. 1997.** Effect of sodium arsenite and sodium chloride on bean plant nutrition (macronutrients). *J. Plant Nutr.* 20: 1617-1633.
- Carpaena O, Hellin E, Llorente S, Raga A. 1973.** Fracciones de P en material vegetal. *Actas de la XVI Reunión Bienal de la R.S.E. de Física y Química, Oviedo, España.* 1973.
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Young VL. 1975.** Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comm. Soil Sci. Plant. Anal.* 6: 71-80.
- Chaillou S, Rideout JW, Raper DJr, Morot-Gaudry JF. 1994.** Responses of soybean to ammonium and nitrate supplied in combination to the whole root system or separately in a split-root system. *Physiol. Plant.* 90: 259-268.

- Champigny ML, Foyer C. 1992.** Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis: basis for a new concept. *Plant Physiol.* 100:7-12.
- Charest C, Chon TP. 1990.** Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): Properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiol. Plant.* 80: 159-168.
- Cheikh N, Brenner ML. 1992.** Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves. *Plant Physiol.* 100: 1230-1237.
- Cheng GW, Crisoto CH. 1995.** Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 835-838.
- Chiallou S, Morot-Gaudry JF, Salsac L, Lesaint C, Jolivet E. 1986.** Compared effects of NO_3^- and NH_4^+ on growth and metabolism on French bean. *Physiol. Vég.* 24: 679-687.
- Chiang HH, Dandekar AM. 1995.** Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant Cell Environ.* 18: 1280-1290.
- Ciampi S, Gentili E, Guidi L, Soldatini GF. 1996.** The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. *Plant Sci.* 118: 177-184.
- Claasen ME, Wilcox GE. 1974.** Comparative reduction of calcium and magnesium composition of corn tissue by NH_4^+ -N and K fertilization. *Agron. J.* 66: 521-522.
- Claussen W, Lenz F. 1995.** Effect of ammonium and nitrate on net photosynthesis, flower formation, growth and yield of eggplants (*Solanum melongena* L.). *Plant Soil.* 171: 267-274.
- Clements RL, Leland HV. 1962.** An ion-exchange study of the free amino acids in the juices of six varieties of citrus. *J. Food Sci.* 27: 20-25.
- Cooper HD, Clarkson DT. 1989.** Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals- a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *J. Exp. Bot.* 40: 753-762.
- Coruzzi GM, Zhou L. 2001.** Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 247-253.

- Crafts-Brandner SJ. 1992.** Phosphorus nutrition influence on leaf senescence in soybean. *Plant Physiol.* 98: 1128-1132.
- Cramer GR, Epstein E, Laüchli A. 1991.** Effects of sodium, potassium and calcium on salt-stressed barley. II. Element Analysis. *Physiol. Plant.* 81: 197-202.
- Cramer MD, Lewis OAM. 1993.** The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. *Ann. Bot.* 72: 359-365.
- Crawford NM, Glass ADM. 1998.** Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plant. *Trend Plant Sci.* 3: 389-395.
- Crawford NM. 1995.** Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell.* 7:859-868.
- Curir P, Van Sumere CF, Termini A, Barthe P, Marchesini A, Dolci M. 1990.** Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiol.* 92: 1148-1153.
- Daliparthi J, Barker AV, Mondal SS. 1994. Potassium fractions with other nutrients in crops: a review focusing on the tropics. *J. Plant Nutr.* 17: 1859-1886.
- Dandekar AM, Uratsu SL. 1988.** A simple base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. *J. Bacteriol.* 170: 5943-5945.
- Davenport JR. 1996.** The effect of nitrogen fertilizer rates and timing on cranberry yield and fruit quality. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121: 1089-1094.
- Day DA, Copeland L. 1993.** Respiration. In: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*; Azcon-Bieto J, Talon M. (eds.), McGraw-Hill Interamericana. Madrid. pp. 173-193.
- de Veau EJ, Robinson JM, Warmbrodt RD, van Berkum P. 1990.** Photosynthesis and photosynthate partitioning in N₂-fixing soybeans. *Plant Physiol.* 94: 259-267.
- Delalonde M, Barret Y, Coumans MP. 1996.** Development of phenolic compounds in maize anthers (*Zea mays*) during cold pretreatment prior to androgenesis. *J. Plant Physiol.* 149: 612-616.

- Delauney AJ, Hu CAA, Kavi Kishor PB, Verma DPS. 1993.** Cloning of ornithine- δ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268: 18673-18678.
- Delauney AJ, Verma DPS. 1993.** Proline biosynthesis and osmo-regulation in plants. *Plant J.* 4: 215-223.
- Demmers-Derks H, Mitchell RAC, Mitchell VJ, Lawlor DW. 1998.** Response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) yield and biochemical composition to elevated CO₂ and temperature at two nitrogen applications. *Plant, Cell Environ.* 21: 829-836.
- Deshpande S, Styhe SK, Salunkhe DK. 1984.** Interrelationships between certain physical and chemical properties of dry bean. *Qual. Plant Foods Hum. Nutr.* 34: 53-65.
- Dixon RA, Paiva NL. 1995.** Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dübeler A, Voltmer G, Gora V, Lundeerstadt J, Zeeck A. 1997.** Phenols from *Fagus sylvatica* and their role in defense against *Cryptococcus fagisuga*. *Phytochem.* 45: 51-57.
- Duncanson E, Gilkes AF, Kirk DW, Sherman A, Wray JL. 1993.** nirl, a conditional-lethal mutation in barley causing a defect in nitrite reduction. *Mol. Gen. Genet.* 236: 275-282.
- Dunlop J, Gardiner S. 1993.** Phosphate uptake, proton extrusion and membrane electropotentials of phosphorus-deficient *Trifolium repens* L. *J. Exp. Bot.* 44: 1801-1808.
- Edwards JW, Coruzzi GM. 1989.** Photorespiration and light act in concert to regulate expression of the nuclear gene for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Plant Cell.* 1: 241-248.
- Elmlinger MW, Bolle C, Batschauer A, Oelmüller R, Mohr H. 1994.** Coaction of blue light and light absorbed by phytochrome on control of glutamine synthetase gene expression in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Planta* 192: 189-194.
- Elmlinger MW, Mohr H. 1991.** Coaction of blue/ultraviolet-A light and light absorbed by phytochrome in controlling appearance of ferredoxin-dependent glutamate synthase in the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Planta* 183: 374-380.

- Engels C, Marschner H. 1995.** Plant uptake and utilization of nitrogen. In: Nitrogen fertilization in the environment. Bacon PE. (ed), Marcel Dekker Inc., New York.
- Ensminger E, Ensminger ME, Kolande JE, Robson JRK. 1994.** Foods and nutrition encyclopedia. 2nd ed. vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Ettel W. 1981.** Eine neue enzymatische Stärkebestimmung für Lebensmittel. *Alimenta* 20: 7-11.
- Evans DE, Brians SA, Willians LE. 1991.** Active calcium transport by plant cell membranes. *J. Exp. Bot.* 42: 285-303.
- Evans HJ, Sorger, GJ. 1966.** Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17: 47-77.
- Fader GM, Koller HR. 1985.** Seed growth rate and carbohydrate pool sizes of the soybean fruit. *Plant Physiol.* 79: 663-666.
- Farnden KJF, Robertston JG. 1980.** Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation.* Bergersen FJ (ed). Jonh Wile & Sons, New York. pp: 265-314.
- Faure S. 2000.** Etude de l'absorption du nitrate chez *Brassica napus* L: evolution de l'activité des transporteurs et de la transcription des gènes NRT1 et NRT2 en réponse à une privation en nitrate, évaluation de leur rôle sur le cycle de culture. Thèse de Doctorat, Université de Caen, Caen.
- Fedovora E, Greenwood JS, Oaks A. 1994.** In situ localization of nitrate reductase in maize roots. *Planta.* 194: 279-286.
- Fenn LB, Taylor RM, Burks CM. 1994.** Calcium stimulation of ammonium absorption and growth by beet. *Agron. J.* 86: 916-920.
- Findenegg GR. 1987.** A comparative study of ammonium toxicity at different constant pH of the nutrient solution. *Plant Soil.* 103: 239-243.
- Flasinski S, Rogozinska J. 1985.** Effect of water deficit on proline accumulation, protein and chlorophyll content during flowering and seed formation in winter rape. *Acta Agrobot.* 38: 11-21.

- Föster JC, Jeschke WD. 1993.** Effects of potassium on nitrate transport and on the contribution of the root to nitrate reduction in the whole plant. *J. Plant Physiol.* 141: 322-328.
- Foyer C, Spencer C. 1986.** The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves. Effects on intracellular orthophosphate distribution, photosynthesis, and assimilate partitioning. *Planta.* 167: 369-375.
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ. 1994.** Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell Environ.* 17: 507-523.
- Foyer CH, Galtier N. 1996.** Source-sink interaction and communication in leaves. In *Photoassimilate Distribution in Plants and crops.* Zamski E, Schaffer AA, (eds.), Dekker. New York, pp. 311-341.
- Fujita T, Maggio A, Garcia-Rios M, Bressan RA, Csonka LN. 1998.** Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase. *Plant Physiol.* 118 661-674.
- Gallardo F, Gálvez S, Quesada MA, Cánovas FM, Nuñez de Castro I. 1988.** Glutamine synthetase activity during the ripening of tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 26:747-752.
- Galván A, Fernández E. 2001. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 225-233.
- Galván A, Rexach J, Mariscal V, Fernández E. 2002.** Nitrite transport to the chloroplast in *Chlamydomonas reinhardtii*: molecular evidence for a regulated process. *J. Exp. Bot.* 53: 845-853.
- García PC, Ruiz JM, Rivero RM, López-Lefebvre LR, Sánchez E, Romero L. 2001.** Direct action of biocide carbendazim on phenolic metabolism in tobacco plants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 131-137.

- Gaspar TH, Penel C, Hagega D, Greppin H. 1991.** Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes. In: Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Lobarzewski J, Greppin H, Penel C, Gaspar TH (eds.), University de Geneve, Geneve. pp. 249-280.
- Gastal F, Lemaire G. 2002.** N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *J. Exp. Bot.* 53: 789-799.
- Geladopoulos TP, Sotiroudis TG, Evangelopoulos AE. 1991.** A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal. Biochem.* 192: 112-116.
- Geladopoulos TP, Sotiroudis TG, Evangelopoulos AE. 1991.** A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal. Biochem.* 192: 112-116.
- Gerendás J, Zhu Z, Bendixen R, Ratcliffe G, Sattelmacher B. 1997.** Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 160: 239-251.
- Gerendás J. 1992.** Einfluß von form und konzentration des Stickstoffangebotes auf washstum und physiologie junger maispflanzen (*Zea mays* L.). Schriftenreihe des Instituts für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Universität Kiel, ISSN 0933-680X, Vol 20.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977.** Superoxide dismutase occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59: 309-314.
- Glass AD M, Siddiqi MY. 1995.** Nitrogen absorption by plant roots. In: Nitrogen Nutrition in Higher Plants. Srivastava HS, Singh RP (eds.), Associated Publishing Co. of New Delhi, India. pp.155-163.
- Glass ADM, Brito DT, Kaiser BN, Kinghorn JR, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat S, Siddiqi MY, Unkles SE, Vidmar JJ. 2002.** The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 855-864.

- Glass ADM, Brito DT, Kaiser BN, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat SR, Siddiqi MY, Silim SM, Vidmar JJ, Zhuo D. 2001.** Nitrogen transport in plants, with an emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164: 199-207.
- Godoy S, Chicco CF. 2005.** Utilización del fósforo fítico en la nutrición de los rumiantes. *Revista Digital del Centro de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela.* Septiembre-Diciembre 9: 1-12.
- Gojon A, Dapongny L, Lejay I, Tillard P, Ruffty TW. 1998.** Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant, Cell Environ.* 21: 43-53.
- González de la Vara LE, Baizabal-Aguirre VM, Guadalupe M. 1992.** Kinetics of the purified plasma membrane H^+ -ATPase from red beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.* 86: 407-413.
- Goupil P, Loncle D, Druart N, Bellettre A, Rambour S. 1998.** Influence of ABA on nitrate reductase activity and carbohydrate metabolism in chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1855-1862.
- Grat E, Dintzis FR. 1982.** Determination of phytic acid foods by high-performance liquid chromatography. *J. Food Chem.* 30: 1094-1097.
- Grive CM, Gratton R. 1983.** Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil.* 70: 303-307.
- Groat RG, Vance CP. 1981.** Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant. Physiol.* 67: 1198-1203.
- Guerrero MG, Vega JM, Losada M. 1981.** The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 169-204.
- Guo FQ, Wang R, Crawford NM. 2002.** The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. *J. Exp. Bot.* 53: 835-844.
- Gutteridge S, Bray RC, Notton BA, Fido RJ, Hewitt EJ. 1983.** Studies by electron paramagnetic resonance spectroscopy of the molybdenum center of spinach nitrate reductase. *Biochem. J.* 213: 137-142.

- Hageman RH, Hucklesby DP. 1971.** Nitrate reductase. *Methods Enzymol.* 23:497-503.
- Hamono T, Oji Y, Okamoto S, Mitsuhashi Y, Matsuki Y. 1985.** In verse correlation of thiol proteinase with nitrate reductase activities in barley leaves. *Plant Physiol.* 76: 353-358.
- Hao Z, Charles DJ, Yu L, Simon JE. 1996.** Purification and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*. *Phytochem.* 43: 735-739.
- Harada T, Takaki H, Yamada Y. 1968.** Effect of nitrogen sources on the chemical components of young plants. *Soil Sci. Plant Anal.* 14:47-55.
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J. 1999.** Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J. Exp. Bot.* 50: 413-434.
- Hasegawa E, Yoneyama T, Kitamura H. 1995.** Effect of decrease in supply of potassium on the growth and concentrations of major cations in the tissues of four rice (*Oryza sativa* L.) genotypes at the vegetative stage. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41: 345-355.
- Haug W, Lantzsh HJ. 1983.** Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* 34: 1423-1426.
- Hayakawa T, Nakamura T, Hattori F, Mae T, Ojima K, Yamaya T. 1994.** Cellular localization of NADH-dependent glutamate synthase protein in vascular bundles of unexpanded leaf blades and young grains of rice plants. *Planta* 193: 455-460.
- Helsper JPF, Linskens HF, Jackson JF. 1984.** Phytate metabolism in *Petunia* pollen. *Phytochem.* 23: 1841-1845.
- Ho LC. 1996.** The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *J. Exp. Bot.* 47:1239-1243.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950.** The water culture method for growing plants without soil. Circular 347. California Agricultural Experiment Station, University of California, Berkeley, CA.
- Hocking PJ, Pate JS. 1977.** Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. *Ann. Bot.* 41: 1259-1278.

- Hodges M. 2002.** Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *J. Exp. Bot.* 53: 905-916.
- Hoffland E, Findenegg GR, Nelemans JA. 1989a.** Solubilization of rock phosphate by rape. II. Local root exudation of organic acids as a response to P-starvation. *Plant Soil.* 113: 161-165.
- Hoffland E, Findenegg GR, Nelemans JA. 1989b.** Solubilization of rock phosphate by rape. I. Evaluation of the role of the nutrient uptake pattern. *Plant Soil.* 113: 155-160.
- Hogue E, Wilcow GE, Cantliffe DJ. 1970.** Effect of soil P on phosphate fraction in tomato leaves. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 95: 174-176.
- House CM, Anderson JW. 1980.** Light-dependent reduction of nitrate by pea chloroplasts in the presence of nitrate reductase and C₄ dicarboxylic acids. *Phytochem.* 19: 1925-1930.
- Huang JW, Grunes DL, Welch RM. 1990.** Magnesium, nitrogen form, and root temperature effects on grass tetany potential of wheat forage. *Agron. J.* 82: 581-587.
- Hubbard NL, Huber SC, Pharr DM. 1989.** Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Physiol.* 91: 1527-1534.
- Huber JL, Redinbaugh MG, Huber SC, Campbell WH. 1994.** Regulation of maize leaf nitrate reductase activity involves both gene expression and protein phosphorylation. *Plant Physiol.* 106: 1667-1674.
- Huber SC, Akazawa T. 1986.** A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 91: 1527-1534.
- Huber SC, Bachmann M, Huber JL. 1996.** Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca²⁺ and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci.* 1: 432-438.
- Huber SC. 1985.** Role of potassium in photosynthesis and respiration. In: R.D. Munson (ed.) *Potassium in Agriculture.* American Society of Agronomy, Madison, W. pp. 369-391.

- Huett DO, Dettmann EB. 1991.** Nitrogen response surface models of *zucchini squash*, lettuce and potato. I. Effect of N on growth, dry matter partitioning and fresh yield and quality. *Plant Soil*. 134: 243-254.
- Humble GD, Raschke K. 1971.** Stomatal opening quantitatively related to potassium transport. *Plant Physiol*. 48: 447-453.
- Huppe HC, Turpin DH. 1994.** Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 577-607.
- Imsade J, Touraine B. 1994.** N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol*. 105: 3-7.
- Inzé D, Van Montagu M. 1995.** Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 153-158.
- Ireland RJ, Lea PJ. 1999.** The Enzymes of Glutamine, Glutamate, Asparagina and Aspartate Metabolism. In: *Plant Amino Acids. Biochemistry and Biotechnology*. Singh BK (ed.), Marcell Dekker, Inc. New York. pp. 49-109.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M. 1992.** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant*. 84: 55-60.
- Israel DW, Rufty JR. 1988.** Influence of phosphorus nutrition on phosphorus and nitrogen utilization efficiencies and associated physiological responses in soybean. *Crop Sci*. 28: 954-960.
- Jeschke WD, Kirkby EA, Peuke AD, Pate JS, Hartung WC. 1997.** Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). *J. Exp. Bot.* 48:75-91.
- Jeschke WD, Pate JS. 1991.** Cation and chloride partitioning through xylem and phloem within the whole plant on *Ricinus communis* L. under conditions of salt stress. *J. Exp. Bot.* 42: 1105-1116.
- Jeschke WD, Peuke A, Kirkby EA, Pate JS, Hartung W. 1996.** Effects of P deficiency on the uptake, flows and utilization of C, N and H₂O within intact plants of *Ricinus communis* L. *J. Exp. Bot.* 47:1737-1754.
- Jeuffroy MH, Ney B, Ourry A. 2002.** Integrated physiological and agronomic modeling of N capture and use within the plant. *J. Exp. Bot.* 53: 809-823.

- Jolivet Y, Larher F, Hamelin J. 1982.** Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effect of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci. Lett.* 25: 193-201.
- Jones BJr, Wolf B, Mills HA. 1991.** Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide. Micro-Macro Publishing Inc., Athens, Georgia.
- Jones BJr. 1997.** The essential elements. In: *Hydroponics: A Practical Guide for the Soilles Grower*. Benton Jones JJr (ed.), St. Lucie Press, Boca Raton, Florida, pp. 30-32.
- Jones DH. 1984.** Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochem.* 23: 1349-1359.
- Jones TL, Tucker DE, Ort DR. 1998.** Chillings delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reductase activity in tomato. *Plant Physiol.* 118: 149-158.
- Kaiser JJ, Lewis OAH. 1984.** Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil.* 70: 127-130.
- Kaiser W M. 1982.** Correlation between changes in photosynthetic activity and changes in total protoplast volume in leaf tissue from hygro-, meso-, and xerophytes under osmotic stress. *Planta.* 154: 538-545.
- Kaiser WM, Huber SC. 1994.** Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol.* 106:817-821.
- Kaiser WM, Weiner H, Kandlbinder A, Tsai CB, Rockel P, Sonoda M, Planchet E. 2002.** Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *J. Exp. Bot.* 53: 875-882.
- Kalir A, Omri G, Poljakoff-Mayber A. 1984.** Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity. *Physiol. Plant.* 62: 238-244.
- Kavi Kishor PB, Hong Z, Milao GH, Hu CAA, Verma DPS. 1995.** Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108: 1387-1394.

- Kawai T, Hikawa M, Ono Y. 1995.** Effects of calcium sulfate and sublimed sulfur on incidence of internal browning in roots of *Japanese radish*. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 64: 79-84.
- Keller M, Hrazdina G. 1998.** Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development, during grape ripening. Amer. J. Enol. 49: 341-349.
- Kerr PS, Huber SC, Israel DW. 1984.** Effect of N₂-source on soybean leaf sucrose-phosphate synthase, starch formation, and whole plant growth. Plant Physiol. 75: 483-488.
- Kevers C, Coumans M, Coumans-Gillés M, Gaspar T. 1984.** Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. Physiol. Plant. 61: 69-74.
- Kim TW, Heinrich G. 1997.** Effect of strontium on chlorophyll content, peroxidase activity, and iron distribution in cell walls. J. Plant Nutr. 20: 255-269.
- King BJ, Siddiqi MY, Glass ADM. 1992.** Studies of the uptake of nitrate in barley. V. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity. Implications for nitrate influx. Plant Physiol. 99: 1582-1589.
- Kirkby EA, Pilbeam DJ. 1984.** Calcium as a plant nutrient. Plant Cell Environ. 7: 397-405.
- Krom MD. 1980.** Spectrophotometric determination of ammonia: study of a modified berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. Analyst. 105: 305-316.
- Kronemberger J, Lepingle A, Caboche M, Vaucheret H. 1993.** Cloning and expression of distinct nitrite reductases in tobacco leaves and roots. Mol. Gen. Genetics 236: 203-208.
- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM. 1995.** Analysis of NH₄⁺ efflux in Spruce roots. A test case for phase identification in compartmental analysis. Plant Physiol. 109: 481-490.
- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM. 1997.** Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology forest succession. Nature. 385: 59-61.

- Kruger NJ. 1999.** Carbohydrate synthesis and degradation. In: Plant Metabolism. Denis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (eds.), 2nd Edition, Longman, England. pp. 83-104.
- Kwak SS, Kim SK, Park IH, Liu JR. 1996.** Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochem.* 43: 565-568.
- Lachica M, Aguilar A, Yañez J. 1973.** Análisi foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín. *Ann. Edaf. Agrobiol.* 32: 1033-1047.
- Lalk I, Dörffling K. 1985.** Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. *Physiol. Plant.* 63, 287-292.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. 1996.** The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-593.
- Lamaze T, Sentenae H, Grignon C. 1984.** Effects of nitrate on phosphate accumulation and transport by corn roots. *Physiol. Veg.* 22: 155-161.
- Lauer MJ, Blevins DG, Sierzputowska-Gracz H. 1989.** ³¹P-nuclear magnetic resonance determination of phosphate compartmentation in leaves of reproductive soybeans (*Glycine max* L.) as affected by phosphate nutrition. *Plant Physiol.* 89: 1331-1336.
- Lavon R, Goldschmidt EE. 1999.** Enzymatic methods for detection of mineral element deficiencies in citrus leaves. A mini-review. *J. Plant Nutr.* 22: 139-150.
- Lavon R, Salomon R, Goldschmidt E. 1988.** Piruvate kinase activity of citrus leaves as affected by K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ deficiencies. *Contr. Agric. Res. Org.* 2270-E.
- Lawlor DW, Lemaire G, Gastal F. 2001.** Nitrogen, plant growth and crop yield. In: *Plant Nitrogen.* Lea PJ, Morot-gaudry JF (eds.), Berlin: Springer-Verlag, pp. 343-367.
- Lawlor DW. 2002.** Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *J. Exp. Bot.* 53: 773-787.
- le Bot J, Alloush GA, Kirkby EA, Sanders FE. 1990.** Mineral nutrition of chickpea plants supplied with NO₃⁻ or NH₄⁺-N. II. Ionic balance in relation to phosphorus stress. *J. Plant Nutr.* 13: 1591-1605.

- Lea PJ, Ireland RJ. 1999.** Nitrogen Metabolism in Higher Plants. In: Plant Amino Acids. Biochemistry and Biotechnology. Singh BK (ed.), Marcell Dekker, Inc. New York. pp.1-47.
- Lea PJ, Robinson SA, Stewart GR. 1990.** The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: The biochemistry of plants. Mifling BJ, Lea H (eds.). Vol. 16.
- Lee RB. 1982.** Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. *Ann. Bot.* 50: 429-449.
- Leidi EO, Silberbush M, Soares MIM, Lips SH. 1992.** Salinity and nitrogen nutrition studies on peanut and cotton plants. *J. Plant Nutr.* 15: 591-604.
- Li XZ, Larson DE, Glibetic M, Oaks A. 1995.** Effect of glutamine on the induction on nitrate reductase. *Physiol. Plant.* 93: 740-744.
- Li XZ, Oaks A. 1994.** Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*: influence of light. *Plant Physiol.* 106: 1145-1149.
- Lillo C. 1984.** Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiol. Plant.* 61: 214-218.
- Lillo C. 1994.** Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.* 90: 616-620.
- Lin M, Turpin DH, Plaxton WC. 1989.** Pyruvate kinase isoenzymes from the green alga *Selenastrum minutum*. II. Kinetic and regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 269: 228-238.
- Lindberg S, Yahya A. 1994.** Effects of pH and mineral nutrition supply on K^+ ($^{86}Rb^+$) influx and plasma membrane ATPase activity in roots of sugar beets. *J. Plant Physiol.* 144: 150-155.
- Lister CE, Lancaster JE, Walker JRL. 1996.** Phenylalanine ammonia-lyase activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand-grown apple cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 281-285.
- López-Cantarero I, Lorente FA, Romero L. 1994.** Are chlorophylls good indicators of nitrogen and phosphorus levels?. *J. Plant Nutr.* 17: 979-990.

- López-Cantarero I, Ruíz JM, Hernández J, Romero L. 1997.** Nitrogen Metabolism and Yield Response to Increases in Nitrogen-Phosphorus Fertilization: Improvement in Greenhouse cultivation of Eggplant in Greenhouse Cultivation of Eggplant (*Solanum melongena* Cv. Bonica). J. Agric. Food Chem. 46: 4227-4231.
- López-Cantarero I, Ruíz JM, Hernández J, Romero L. 1998.** Phosphorus Metabolism and Yield Response to Increases in Nitrogen-Phosphorus Fertilization: Improvement in Greenhouse Cultivation of Eggplant (*Solanum melongena* Cv. Bonica). J. Agric. Food Chem. 46: 1603-1608.
- López-Lefebvre LR, Rivero RM, García PC, Sánchez E, Ruiz JM, Romero L. 2000.** Role of CaCl₂ on ammonium assimilation in roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). J. Plant Physiol. 156: 672-677.
- Lott JNA. 2000.** Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. Seed Sci. Res. 10: 11-13.
- Loulakakis KA, Roubelakakis-Angelakis KA. 1990.** Intracellular localization and properties of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L.: Purification and characterization of the major leaf isoenzyme. J. Exp. Bot. 41: 1223-1230.
- Loulakakis KA, Roubelakakis-Angelakis AK and Kanellis AK. 1994.** Regulation of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in avocado fruit during development and ripening. Plant Physiol. 106:217-222.
- Lovatt CJ. 1990.** Stress alters ammonia and arginine metabolism. In: Polyamines and ethylene: Biochemistry, physiology and interactions. Flores HE (ed.), American Society of Plant Physiology, Rockville, M.D. pp. 166-179.
- Lunn JE, ap Rees T. 1990.** Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. Biochem. J. 267: 739-743.
- Lunn JE, Furbank RT. 1999.** Sucrose biosynthesis in C₄ plants. New Phytol. 143: 221-237.
- Lutts S, Majerus V, Kinet JM. 1999.** NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. Physiol. Plant. 105: 450-458.

- Lynch J, Läuchli A, Epstein E. 1991.** Vegetative growth of the common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Sci.* 31:380-387.
- Machackova I, Hansisova A, Krekule J. 1989.** Levels of ethylene, ACC, MACC, ABA and proline as indicators of cold hardening and frost resistance in winter wheat. *Physiol. Plant.* 76: 603-607.
- Mack G. 1995.** Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of NH_4^+ . *Planta.* 196: 231-238.
- Mackown CT, Sutton TG, Bush LP. 1990.** Nitrogen compositional changes in xylem exudates and leaves of burley tobacco. *Crop Sci.* 30: 133-138.
- Mackown CT, Sutton TG. 1997.** Recovery of fertilizer N applied to burley tobacco. *Agron. J.* 89: 183-189.
- Mackown CT, Sutton TG. 1998.** Using early-season leaf traits to predict nitrogen sufficiency of burley tobacco. *Agron. J.* 90: 21-27.
- MacNevin WM, Uron PF. 1953.** Separation of hydrogen peroxide from organic hydroperoxides. *Anal. Chem.* 25: 1760-1761.
- Magalhaes JS, Wilcox GE. 1983.** Tomato growth and nutrient uptake patterns as influenced by nitrogen form and light intensity. *J. Plant Nutr.* 6: 941-956.
- Maier NA, Dahlenburg AP, Williams CMJ. 1994.** Effect of nitrogen, phosphorus, and potassium on yield, specific gravity, crisp colour, and tuber chemical composition of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Kennebec. *Aust. J. Exp. Agric.* 34: 813-824.
- Marschner H, Kirkby EA, Cakmak I. 1996.** Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J. Exp. Bot.* 47: 1255-1263.
- Marschner H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press Inc., San Diego CA. pp. 245-281.
- Matsumoto H. 1988.** Repression of proton extrusion from intact cucumber roots and the proton transport rate of microsomal membrane vesicles of the roots due to Ca^{2+} starvation. *Plant Cell Physiol.* 29: 78-84.

- Mattson M, Lundborg T, Larsson M, Larsson CM. 1991.** Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth. I. Growth and nitrate uptake kinetics in vegetative cultures grown at different relative addition rates of nitrate-N. *J. Exp. Bot.* 43: 15-23.
- Mazelis M, Fowden L. 1969.** Conversion of ornithine into proline by enzymes from germinating peanut cotyledons. *Phytochem.* 8: 801-809.
- McCallum JA, Walker JRL, 1990.** Phenolic biosynthesis during grain development in wheat: change in phenylalanine ammonia-lyase activity and soluble phenolic content. *J. Cereal Sci.* 11: 35-49.
- McConchie R, Lang NS, Lax AR, Lang GA. 1994.** Reexamining polyphenoloxidase, peroxidase and leaf-blackening activity in *Protea*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119: 1248-1254.
- McDaniel CN. 1996.** Development physiology of floral initiation in *Nicotiana tabacum* L. *J. Exp. Bot.* 47: 465-475.
- McDonald AJ, Ericsson T, Larsson C. 1996.** Plant nutrition, dry matter gain and partitioning at the whole-plant level. *J. Exp. Bot.* 47: 1245-1253.
- Medrano H, Flexas J. 2001.** Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. In: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcón-Bieto J, Talón M (eds.), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, pp. 173-185.
- Meharg AA, Blatt MR. 1995.** Nitrate transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *J. Membr. Biol.* 145: 49-66.
- Mehdy MC. 1994.** Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472.
- Melo-Oliveira R, Oliveira IC, Coruzzi GM. 1996.** *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 4718-4723.
- Mengel K, Kirkby EA. 2001.** Principles of plant nutrition. 5th Edition. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 849.

- Miflin B, Habash DZ. 2002.** The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* 53: 979-987.
- Migge A, Becker TW. 1996.** In tobacco leaves, the genes encoding the nitrate-reducing or the ammonium-assimilating enzymes are regulated differently by external nitrogen-sources. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 665-671.
- Migge A, Meya G, Carrayol E, Hirel B, Becker TW. 1996.** Regulation of the subunit composition of tomato plastidic glutamine synthetase by light and the nitrogen source. *Planta.* 200: 213-220.
- Miller AJ, Smith SJ. 1996.** Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *J. Exp. Bot.* 47: 843-854.
- Miller GL. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.* 31: 426-428.
- Miller PM, Stewart CR. 1976.** Pyrroline-5-carboxylic acid reductase from soybean leaves. *Phytochem.* 15: 1855-1857.
- Mills HA, Benton Jones JJr. 1996.** Plant analysis handbook II. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. MicroMacro Publishing, Inc. pp. 422.
- Miners GS, Sims JL. 1983.** Changing fertilization practices and utilization of added plant nutrients for efficient production of burley and flue-cured tobacco. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 9: 4-76.
- Miyasaka SC, Grunes DL. 1990.** Root temperature and calcium level effects on winter wheat forage. II. Nutrient composition and tetany potential. *Agron. J.* 82: 243-249.
- Molina A, Hunt MD, Ryals JA. 1998.** Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. *Plant Cell.* 10: 1903-1914.
- Muller B, Touraine B. 1992.** Inhibition of NO_3^- uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* 41: 221-241.
- Murchie EH, Sarrobert C, Contard P, Betsche T, Foyer CH, Galtier N. 1999.** Overexpression of sucrose-phosphate synthase in tomato plants grown with CO_2 enrichment leads to decreased foliar carbohydrate accumulation relative to untransformed controls. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 251-260.

- Nagarathna KC, Shetty SA, Shetty HS. 1993.** Phenylalanine ammonia-lyase activity in pearl millet seedlings and its relation to downy mildew disease resistance. *J. Exp. Bot.* 44: 1291-1296.
- Naik MS, Nicholas DJD. 1986.** Origin of NADH for nitrate reduction in wheat roots. *Plant Sci. Lett.* 35: 91-96.
- Nemat Allah MM, Younis ME. 1995.** Herbicide effects on phenolic metabolism in maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*): Persistence and biochemical signs of stress during its detoxification. *J. Agric. Food Chem.* 40: 884-889.
- Nicoli MC, Elizalde BE, Pitotti A, Lericri CR. 1991.** Effect of sugars and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *J. Food Biochem.* 15: 169-184.
- Oaks A, Poulle M, Goodfellow VJ, Glass LA, Deising H. 1988.** The role of nitrate and ammonium ions and Light on the induction of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol.* 88: 1067-1072.
- Oaks A. 1994.** Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72: 739-750.
- Ocaña A, Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C. 1996.** Phosphoenolpyruvate carboxylase in root nodules of *Vicia faba*: Partial purification and properties. *Physiol. Plant.* 97: 724-730.
- Ohno T, Grunes DL. 1985.** Potassium-magnesium interactions affecting nutrient uptake by wheat forage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49: 685-690.
- Okuda T, Matsuda Y, Yamanaka A, Sagisaka S. 1991.** Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97: 1265-1267.
- Omata T. 1995.** Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC7942. *Plant Cell Physiol.* 36: 207-213.
- Organ MG, Greenwood JS, Bewley JD. 1988.** Phytin is synthesized in the cotyledons of germinated castor-bean seeds in response to exogenously supplied phosphate. *Planta.* 174: 513-517.
- Orsel M, Filleur S, Fraisier V, Daniel-Vedele F. 2002.** Nitrate transport in plants: which gene and which control?. *J. Exp. Bot.* 53: 825-833.

- Ozbun JL, Volk RJ, Jackson WA. 1965a.** Effects of potassium deficiency on photosynthesis, respiration and the utilization of photosynthetic reductant by immature bean leaves. *Crop Sci.* 5: 69-75.
- Ozbun JL, Volk RJ, Jackson WA. 1965b.** Effects of potassium deficiency on photosynthesis, respiration and the utilization of photosynthetic reductant by mature bean leaves. *Crop Sci.* 5: 497-500.
- Padgett PE, Leonard RT. 1996.** Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 47: 871-883.
- Paleg LG, Douglas TJ, Van Daal A, Keech DB. 1981.** Proline, betaine and other organic solutes protect heat inactivation. *Aust. J. Plant Physiol.* 8: 107-114.
- Paleg LG, Stewart CR, Bredbeer JW. 1984.** Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* 75: 974-978.
- Papadopoulus AP, Khosla S. 1993.** Limitations of the K:N ratio in the nutrient feed of drip-irrigated greenhouse tomatoes as a crop-management tool. *Can. J. Plant Sci.* 73: 289-296.
- Paquin R, Lechasseur P. 1979.** Observations sur une méthode de dosage de la proline libre dans les extraits de plantes. *Can. J. Bot.* 57: 1851-1854.
- Paquin R. 1985.** Survie á l'hiver des plantes fourragères et des céréales sous les climats nordiques, en particulier au Québec: progrès et prospectives. *Phytoprot.* 66, 105-139.
- Paranhos A, Fernández-Tárrago J, Corchete P. 1999.** Relationship between active oxygen species and cardenolide production in cell cultures of *Digitalis thapsi*: effect of calcium restriction. *New Phytol.* 141: 51-60.
- Peeters KMW, Vanlaere AJ. 1992.** Ammonium and aminoacids metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiol. Plant.* 84: 243-249.
- Pettigrew WT, Meredith WR Jr. 1997.** Dry matter production, nutrient uptake, and growth of cotton as affected by potassium fertilization. *J. Plant Nutr.* 20: 531-548.

- Peuke AD, Hartung W, Jeschke WD. 1994.** The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. I. Grown with ammonium or nitrate as nitrogen source. *J. Exp. Bot.* 44: 1167-1176.
- Peuke AD, Hartung W, Jeschke WD. 1994.** The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. II. Grown with low and high nitrate supply. *J. Exp. Bot.* 45: 733-740.
- Peuke AD, Jeschke WD. 1993.** The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. I. Grown with ammonium or nitrate as nitrogen source. *J. Exp. Bot.* 44: 1167-1176.
- Pilbeam DJ, Cakmak I, Marschner H, Kirkby EA. 1993.** Effect of withdrawal of phosphorus on nitrate assimilation and PEP carboxylase activity in tomato. *Plan Soil.* 154:111-117.
- Pilbeam DJ, Kirkby EA. 1983.** The physiological role of boron in plants. *J. Plant Nutr.* 6: 563-582.
- Pillinger JM, Coope JA, Ridge I. 1994.** Role of phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw. *J. Chem. Ecol.* 20: 1557-1569.
- Plaxton WC, Sangwan RS, Singh N, Gauthier DA, Turpin DH. 1993.** Phosphoenolpyruvate metabolism of developing oil seeds. In: *Seed Oils for the Future.* Champaign IL (ed.), AOCS Press; pp. 35-43.
- Podestá FE, Plaxton W.C. 1994b.** Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. I. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta.* 194: 381-387.
- Podestá FE, Plaxton WC. 1991.** Kinetic and regulatory properties of cytosolic pyruvate kinase from germinating castor beans. *Biochem J.* 279: 495-501.
- Podestá FE, Plaxton WC. 1992.** Plant cytosolic pyruvate kinase: A kinetic study. *Biochem. Biophys. Acta.* 1160: 213-220.

- Podestá FE, Plaxton WC. 1994a.** Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. I. Developmental profiles for the activity, concentration, and molecular structure of the pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinases, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta*. 194: 374-380.
- Pulgar G, Belakbir A, Vllora G, Moreno D, Romero L. 1996.** Pyruvate kinase activity as biondicator of cations in grafted watermelon plants. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27: 1027-1046.
- Puritch GS, Barker AV. 1967.** Structure and function of tomato leaf chloroplasts during ammonium toxicity. *Plant Physiol.* 42: 1229-1238.
- Quillere I, Dufossé C, Roux Y, Foyer CH, Caboche M, Morot-Gaudry JF. 1994.** The effects of deregulation of NR genes expression on growth and nitrogen metabolism of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *J. Exp. Bot.* 45, 1205-1211.
- Quintana JM, Harrison HC, Nienhuis J, Palta JP, Kmiecik K. 1999.** Comparison of pod calcium concentration between two snap bean populations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 273-276.
- Rabe E, Lovatt CJ. 1984.** De novo arginine biosynthesis in leaves of phosphorus-deficient *Citrus* and *Poncirus* species. *Plant Physiol.* 76:747-752.
- Rabe E. 1990.** Stress physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. *J. Hort. Sci.* 65: 231-243.
- Raboy V, Gerbasi PF, Young KA, Stoneberg SD, Pickett SG, Bauman AT, Murthy PPN, Sheridan WF, Ertl DS. 2000.** Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.* 124: 355-368.
- Raboy V. 2001.** Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends Plant Sci.* 6: 458-462.
- Raghothama KG. 1999.** Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:665-693.
- Rajasekar VK, Gowri G, Campbell WH. 1988.** Phytochrome-mediated light regulation of nitrate reductase expression in squash cotyledons. *Plant Physiol.* 88: 242-244.

- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB. 1997.** Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes: salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiol.* 115: 137-149.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. 1996.** Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.
- Rastogi R, Back E, Schneiderbauer A, Bowsher CG, Moffatt B, Rothstein SJ. 1993.** A 330 bp region of the spinach nitrite reductase gene promoter directs nitrate-inducible tissue-specific expression in transgenic tobacco. *Plant J.* 4: 317-326.
- Rayapati PJ, Stewart CR. 1991.** Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiol.* 95: 787-791.
- Redinbaugh MG, Campbell WH. 1993.** Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiol.* 101: 1249-1255.
- Reinbott TM, Blevins DG. 1994.** Phosphorus and temperature effects on magnesium, calcium and potassium in wheat and tall fescue leaves. *Agron. J.* 86: 523-529.
- Ress TAV, Larson TR, Heldens JWG, Huning FGJ. 1995.** In situ glutamine synthetase activity in a marine unicellular alga. Development of a sensitive colorimetric assay and the effects of nitrogen status on enzymes activity. *Plant Physiol.* 109: 1405-1410.
- Rhodes D, Handa S, Bressan RA. 1986.** Metabolic changes associated with adaptation of plant cells. In: *Biochemical and Physiological Mechanisms Associated with Environmental Stress tolerance*. Cherry JH (ed.), Berlin: Springer-Verlag, pp. 41-62.
- Rhodes D, Hanson AD. 1993.** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384.
- Rideout JW, Gooden DT, Martin SB. 1995.** Corrective measures for growing tobacco seedlings using the float system with water high in bicarbonate. *Tobacco Sci.* 39: 130-136.

- Robinson JM. 1996.** Leaflet photosynthesis rate and carbon metabolite accumulation patterns in nitrogen-limited, vegetative soybean plants. *Photosynth. Res.* 50: 133-148.
- Robinson JM. 1997a.** Influence of daily photosynthetic photon flux density on foliar carbon metabolite levels in nitrogen-limited soybean plants. *Int. J. Plant Sci.* 158: 32-43.
- Robinson JM. 2000.** Dark and daylight activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the leaves of nitrogen-limited spinach and soybean plants. *Int. J. Plant Sci.* 161: 651-657.
- Robinson SA, Stewart GR, Phillips R. 1992.** Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 98: 1190-1195.
- Rösler J, Krekel F, Amrhein N, Schmid J. 1997.** Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* 113: 175-179.
- Roumet C, Garnier E, Suzor H, Salager JL, Roy J. 2000.** Short and long-term responses of whole-plant gas exchange to elevated CO₂ in four herbaceous species. *Environ. Exp. Bot.* 43: 155-169.
- Ruan E, Nerson H, Edelstein M. 1998.** Eggplant dry matter composition fruit yield and quality as affected by phosphate and total salinity caused by potassium fertilizers in the irrigation solution. *J. Plant Nutr.* 23:431-442.
- Rufty TWJr, Israel DW, Volk JR, Qui J, Tongmin SA. 1993.** Phosphate regulation of nitrate assimilation in soybean. *J. Exp. Bot.* 44: 879-891.
- Rufty TWJr, Jackson WA, Raper CDRJ. 1981.** Nitrate reduction in roots as affected by the presence of potassium and by flux of nitrate through the roots. *Plant Physiol.* 68: 605-609.
- Rufty TWJr, Mackown CT, Israel DW. 1990.** Phosphorus stress effects on assimilation of nitrate. *Plant Physiol.* 94: 328-333.
- Rufty TWJr, Siddiqi MY, Glass AD, Ruth TJ. 1991.** Altered ¹⁵NO₃⁻ influx in phosphorus limited plants. *Plant Sci.* 76:43-48.

- Ruiz JM, Baghour M, Bretones G, Belakir A, Romero L. 1998.** Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): Role of Boron as a possible regulatory factor. *Int. J. Plant Sci.* 159:121-126.
- Ruiz JM, Belakbir A, Romero L. 1996.** Foliar level of phosphorus and its bioindicators in *Cucumis melo* grafted plants. A possible effect of rootstock. *J. Plant Physiol.* 149: 400-404.
- Ruiz JM, Bretones G, Baghour M, Belakbir A, Romero L. 1998.** Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochem.* 48: 269-272.
- Ruiz JM, Castilla N, Romero L. 2000.** Nitrogen metabolism in pepper plants applied with different bioregulators. *J. Agric. Food Chem.* 48:2925-2929.
- Ruiz JM, Garcia PC, Rivero RM, Romero L. 1999.** Response of phenolic metabolism to the application of carbendazim plus boron in tobacco. *Physiol. Plant.* 106: 151-157.
- Ruiz JM, Hernández J, Castilla N, Romero L. 2002.** Effect of soil temperatura on K and Ca concentrations on ATPase and Pyruvate Kinase activity in potato roots. *HortSci.* 37: 325-328.
- Ruiz JM, López-Cantarero I, Romero L. 2000.** Relationship between calcium and piruvate kinase. *Biol. Plant.* 43: 359-362.
- Ruiz JM, Moreno DA, Romero L. 1999.** Pyruvate kinase activity as an indicator of the level of K, Mg y Ca in leaves and fruits of the cucumber: The role of potassium fertilization. *J. Agric. Food Chem.* 47: 845-849.
- Ruiz JM, Rivero RM, García PC, Baghour M, Romero L. 1999.** Role of CaCl₂ in nitrate assimilation in leaves and root of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Sci.* 141: 107-115.
- Ruiz JM, Romero L. 1998a.** Calcium impact on phosphorus and its main bioindicators: response in the roots and leaves of tobacco. *J. Plant Nutr.* 21: 2273-2285.
- Ruiz JM, Romero L. 1998b.** Tomato genotype in relation to nitrogen utilization and yield. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4420-4422.
- Ruiz JM, Romero L. 1998c.** Commercial yield and quality of fruits of cucumber plants cultivated under greenhouse conditions. Response to increases in nitrogen fertilization. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4171-4173.

- Ruiz JM, Romero L. 1999a.** Cucumber yield and nitrogen metabolism in response to nitrogen supply. *Sci. Hort.* 82: 309-316.
- Ruiz JM, Romero L. 1999b.** Nitrogen efficiency and metabolism in grafted melon plants. A possible effect of rootstock. *Sci. Hort.* 81: 113-123.
- Ruiz JM, Romero L. 2000a.** Nitrogen metabolism and yield response of cucumber (*Cucumis sativus* L. Cv. Brunex) plants to phosphorus fertilisation. *J. Sci. Food Agric.* 80: 2069-2073.
- Ruiz JM, Romero L. 2000b.** Nitrogen metabolism in pepper plants applied with different bioregulators. *J. Plant Physiol.* 156: 125-132.
- Ruiz JM, Romero L. 2002.** Relationship between potassium fertilization and nitrate assimilation in leaves and fruits of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Assoc. Appl. Biol.* 140:241-249.
- Ruiz JM. 1999.** Respuesta de algunos procesos metabólicos en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. Tennessee 86) ante la aplicación conjunta de B y Ca. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- Sahulka J, Lisa L. 1980.** Effect of some disaccharides, hexoses and pentoses on nitrate reductase, glutamine synthetase, and glutamate dehydrogenase in excised pea roots. *Physiol. Plant.* 50: 32-36.
- Sakakibara H, Shimizu H, Hase T, Yamazaki Y, Takao T, Shimonishi Y, Sugiyama T. 1996.** Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. *J. Biol. Chem.* 271: 29561-29568.
- Saldras VO, Hall AJ, Connor DJ. 1993.** Light-associated nitrogen distribution profile in flowering canopies of sunflower (*Helianthus annuus* L.) altered during grain growth. *Oecologia.* 95: 488-494.
- Sánchez E, Ruiz JM, Romero L. 2002.** Proline metabolism in response to nitrogen toxicity in fruit of French Bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Strike). *Sci. Hort.* 93: 225-233.
- Sánchez E, Soto JM, García PC, López-Lefebvre LR, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L. 2000.** Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. *Aust. J. Plant Physiol.* 27:272-277.

- Sánchez E, Soto JM, Núñez A, Ruiz JM, Romero L. 2005.** Biosynthesis of non-structural carbohydrates and their distribution in greenbean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Strike): deficiency vs toxicity of nitrogen. *Rev. Fitotec. Mex.* 28:55-61.
- Sánchez-Guerrero I, Caba JM, Lluch C, Ligeró F. 1998.** Nitrate uptake by *Vicia faba*. A physiological approach. *J. Plant Nutr.* 21: 2589-2599.
- Sanz MA, Blanco A, Monge E, Val J. 2001.** Caracterización de la deficiencia de calcio en plantas de tomate utilizando parámetros fisiológicos. *ITEA. Vol. 97:* 26-38.
- Saradhi A, Saradhi PP. 1991.** Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiol.* 138: 554-558.
- SAS. 1987.** SAS/STAT Guide for Personal Computers. Version 6; Statistical Analysis System Institute, Inc.: Cary, NC. p. 1028-1056.
- Sasaki K, Nagahashi G, Gretz MR, Taylor IEP. 1989.** Use of per-C-deuterated myo-inositol for study of cell wall synthesis in germinating beans. *Plant Physiol.* 90: 686-689.
- Sasaki Y, Arima Y, Kumazawa K. 1984.** Radial transport of phosphate in corn roots: Mechanism of transport of phosphate estimated by the turnover rates of intermediate compounds. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30: 137-144.
- Satirana ML, Bianchetti R. 1967.** The effect of phosphate on the development of phytase in the wheat embryo. *Physiol. Plant.* 20: 1066-1075.
- Savouré A, Jaoua S, Hua XJ, Ardiles W, Van Montagu M, Verbruggen N. 1995.** Isolation, characterisation, and chromosomal location of a gene encoding the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 372: 13-19.
- Scarponi L, Nemat Allah M, Martinetti L. 1992.** Metolachlor in corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*): Persistence and biochemical signs of stress during its detoxification. *J. Agric. Food Chem.* 40: 884-889.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998.** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.
- Schaffer AA. 1986.** Invertases in young and mature leaves of *Citrus sinensis*. *Phytochem.* 25: 2275-2277.

- Schjoerring JK, Husted S, Mack G, Mattsson M. 2002.** The regulation of ammonium translocation in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 883-890.
- Schmerder B, Borriss H. 1986.** Induction of nitrate reductase by cytokinin and ethylene in *Agrostemma githago* L. embryos. *Planta.* 169: 539-593.
- Schobert B, Tschesche H. 1978.** Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 541, 270-277.
- Schrader LE, Domska D, Jung PE, Peterson LA. 1972.** Uptake and assimilation of ammonium-N and nitrate-N and the influence on the growth of corn (*Zea mays* L.). *Agronomy J.* 64: 690-695.
- Schuller KA, Plaxton WC, Turpin DH. 1990.** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green alga *Selenastrum minutum*; properties associated with the replenishment of tricarboxylic acid cycle intermediates during ammonium assimilation. *Plant Physiol.* 93: 1303-1311.
- Schuster C, Schmidt S, Mohr H. 1989.** Effect of nitrate, ammonium, light and plastidic factor on the appearance of multiple forms of nitrate reductase in mustard cotyledons. *Planta.* 177: 74-83.
- Scott JJ, Loewus FA. 1986.** Phytate metabolism in plants. In: Phytic acid. Chemistry and applications. Graf E (ed.), Pilatus Press, Minneapolis. pp. 23-42.
- Sechley KA, Yamaya T, Oaks A. 1992.** Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 134: 85-163.
- Serrano R. 1989.** Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.
- Setzer SJ, Locascio M, Hochmuth GJ. 1998.** Nitrogen and potassium application scheduling effects on drip-irrigated tomato yield and leaf tissue analysis. *J. Plant Nutr.* 23: 91-101.
- Shear CB, Faust M. 1975.** Postharvest biology and handling of fruits and vegetables. *HortSci.* 10: 361-365.
- Shevyakova NI. 1984.** Metabolism and the physiological role of proline in plants under conditions of water and salt stress. *Sov. Plant Physiol.* 31: 597-608.
- Shuman LM. 1994.** Mineral Nutrition. In: Plant-Environment interactions. Wilkinson RE (ed.), Marcel Dekker, Inc. N.Y. pp. 149-182.

- Siebrecht S, Tischner R. 1999.** Changes in the xylem exudate composition of poplar (*Populus treniula* x *P. alba*) dependent on the nitrogen and potassium supply. *J. Exp. Bot.* 50:1797-1806.
- Siegel LM, Wilkerson JQ. 1989.** Structure and function of spinach ferredoxin-nitrite reductase. In: Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. Wray JL, Kinghorn JR (eds.), Oxford Science Publications, Oxford.
- Silberbush M, Lops SH. 1991.** Potassium, nitrogen, ammonium/nitrate ratio, and sodium chloride effects on wheat growth. I. Shoot and root growth and mineral composition. *J. Plant Nutr.* 14: 751-764.
- Sing RP, Srivastava HS. 1986.** Increase in glutamate synthase activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.* 66: 413-416.
- Singh SP. 1999.** Production and utilization. In: Common Bean Improvement in the Twenty-First Century. Developments in Plant Breeding. Vol. 7. Kluwer Acad., Dordrecht. The Netherlands. pp: 1-24.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965.** Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticulture.* 16: 144-158.
- Singleton VL, Salgues M, Zaya J, Trousdale E. 1985.** Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine. *Amer. J. Enol. Viticulture.* 36: 50-56.
- Sisson VA, Rufty TM, Williamson RE. 1991.** Nitrogen-use efficiency among fluecured tobacco genotypes. *Crop Sci.* 31: 1615-1620.
- Sivasankar S, Oaks A. 1996.** Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 609-620.
- Sklenar J, Fox GG, Loughman BC, Pannifer ADB, Ratcliffe RG. 1994.** Effects of vanadate on the ATP content, ATPase activity and phosphate absorption capacity of maize roots. *Plant Soil.* 167: 57-62.
- Slawyk G, Rodier M. 1988.** Biosynthetically active glutamine synthetase in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*: optimization of the forward-reaction assay. *Mar. Biol.* 97: 269-274.

- Smirnoff N, Cumbes QJ. 1989.** Hydroxyl radicals scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem.* 28: 1057-1060.
- Smith DA, Chevalier P. 1984.** Increases in phosphatase and β -glucosidase activities in wheat seedling in response to P-deficient growth. *J. Plant Nutr.* 7: 1221-1231.
- Smith-Becker J, Marois E, Huguet EJ, Midland SL, Sims JJ, Keen NT. 1998.** Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiol.* 116: 231-238.
- Söderhäll I. 1995.** Properties of carrot polyphenoloxidases. *Phytochem.* 39, 33-38.
- Solecka D, Kacperska A. 1995.** Phenylalanine ammonia-lyase activity in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 585-591.
- Solomonson LP, Barber MJ. 1990.** Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 225-253.
- Song JQ, Fujiyama H. 1996.** Difference in response of rice and tomato subjected to sodium salinization to the addition of calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 42: 503-510.
- Sonneveld C, Mook E. 1983.** Lettuce tipburn as related to the cation contents of different plant parts. *Plant Soil.* 75: 29-40.
- Spencer DF, Ksander GG. 1994.** Phenolic acid content of vegetative propagules of *Potamogeton spp* and *Hydrilla verticillata*. *J. Aquatic Plant Management.* 32: 71-73.
- Stiles WC. 1987.** Tree nutrition: a key to good fruit quality in: Compact fruit tree. Departement of Pomology, Cornell University. 20: 107-111.
- Stines AP, Naylor DJ, Hoj PB, Van Heeswijck R. 1999.** Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiol.* 120: 923-931.
- Stitt M, Huber SC, Kerr P. 1987.** Regulation of photosynthesis sucrose synthesis. In: *The Biochemistry of Plants.* Hatch MD, Boardman NK (eds.), Vol. 13, Academic Press, New York, pp. 327-409.

- Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A. 2002.** Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 53: 959-970.
- Stitt M, Wilke I, Feil R, Held HW. 1988.** Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose. *Planta.* 174: 217-230.
- Stitt M. 1999.** Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 178-186.
- Stout MJ, Brovont RA, Duffey SS. 1998.** Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Chemical Ecol.* 24: 945-963.
- Streeter JG, Barta AL. 1984.** Nitrogen and minerals. In: *Physiological basis of crop growth and development.* Madison MB (ed.), American Society of Agronomy. pp. 175-200.
- Strother S. 1980.** Homeostasis in germinating seeds. *Ann. Bot.* 45: 217-218.
- Suárez MF, Avila C, Gallardo F, Cantón FR, García-Gutiérrez A, Claros MG, Cánovas FM. 2002.** Molecular and enzymatic análisis of ammonium assimilation in woody plants. *J. Exp. Bot.* 53: 891-904.
- Sueyoshi K, Kleinhofs A, Warner RL. 1995.** Expression of NADH-specific and NAD(P)H-bispecific nitrate reductase genes in response to nitrate in barley. *Plant Physiol.* 107: 1303-1311.
- Sung FJM, Lo WS. 1990.** Growth responses of rice in ammonium-based nutrient solution with variable calcium supply. *Plant Soil.* 125: 239-244.
- Takabe M, Yoneyama T, 1989.** Measurement of leaf color scores and its implication for nitrogen nutrition of rice plants. *Japan Agric. Res. Quarterly.* 23: 86-93.
- Takabe M, Yoneyama T, Inada K, Murakami T. 1990.** Spectral reflectance ratio of rice canopy for estimating crop nitrogen status. *Plant Soil.* 123: 295-297.
- Takahama U, Oniki T. 1992.** Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenols in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 33: 379-387.

- Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H. 2002.** Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J. Exp. Bot.* 53: 971-977.
- Teller S, Schmidt KH, Appenroth KJ. 1996.** Ferredoxin-dependent but not NADH-dependent glutamate synthase is regulated by phytochrome and a blue/UV-A light receptor in turions of *Spirodela ptyrhiza*. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 713-719.
- Temple SJ, Vance CP, Gantt JS. 1998.** Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci.* 3: 51-56.
- Terry MJ, Hall JL, Thomas B. 1989.** Purification of plasma membrane from wheat leaves and characterization of the associated vanadate-sensitive Mg^{2+} -ATPase activity. *J. Plant Physiol.* 134: 756-761.
- Theodorou ME, Plaxton WC. 1993.** Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 101:339-344.
- Thipyapong P, Hunt MD, Steffens JC. 1995.** Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochem.* 40: 673-676.
- Thipyapong P, Stellens JC. 1997.** Tomato polyphenol oxidase: Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiol.* 45: 409-418.
- Thornley JHM. 1972.** A balanced quantitative model for root:shoot ratios in vegetative plants. *Ann. Bot.* 36: 431-441.
- Tomasbarberan FA, Gil MI, Castaner M, Artes F, Salveit ME. 1997.** Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 45: 583-589.
- Turano FJ, Dashner R, Upadhyaya A, Caldwell CR. 1996.** Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. *Plant Physiol.* 112: 1357-1364.
- Ullrich WR. 1992.** Transport of nitrate and ammonium through plant membranes. In: Nitrogen metabolism of plants. Mengel K, Pilbeam D (eds.), Clarendon Press.
- Ulrich A, Fong KH. 1973.** Nitrogen nutrition of white rose potato in relation to vegetative growth and mineral content of leaves and roots. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 4: 413-426.

- Ulrich R, Thaler O. 1955.** On the presence and changes in several constituents of pears during the course of their development (xylose, quinic acid and proline). *CR Acad Sci.* 240: 1625-1628.
- Val J, Aznar Y, Cortés E, Medjoub R, Mata AP, Gracia MA, Monge E, Blanco A. 2002.** Metabolismo del calcio en frutales. Investigación realizada en la Estación Experimental de Aula Dei. Comunicaciones IX Simposio Ibérico sobre nutrición mineral de las plantas. Zaragoza, España. Pp. 61-64.
- van Beursichem ML, Kirkby EA, Raas R. 1988.** Influence of nitrate and ammonium nutrition and the uptake, assimilation, and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* 86: 914-921.
- Van Handel E. 1968.** Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22: 280-283.
- Vance CP, Stade S. 1984.** Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 75: 261-264.
- Vance CP. 1997.** The molecular biology of nitrogen metabolism. In: *Plant Metabolism*. Dennis DT (eds.). Longman.
- Vanlerberghe GC, Schuller KA, Smith RG, Feil R, Plaxton WC, Turpin DH. 1990.** Relationship between NH assimilation rate and in vivo phosphoenolpyruvate carboxylase activity: regulation of anaprotic carbon flow in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* 94: 284-290.
- Vaughn KC, Duke SO. 1981.** Tentoxin-induced loss of plastidic polyphenol oxidase. *Physiol. Plant.* 53: 421-428.
- Venekamp JH, Koot JTM. 1984.** The distribution of free amino acids, especially of proline, in the organs of field bean plants, *Vicia faba* L., during development in the field. *J. Plant Physiol.* 116: 343-349.
- Venekamp JH, Lampe JEM, Koot JTM. 1989.** Organic acids as sources of drought-induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba* L. *J. Plant Physiol.* 133: 654-659.

- Verma DPS, Zhang CS. 1999.** Regulation of proline and arginine biosynthesis in plants. In: Plant amino acids biochemistry and biotechnology. Sing BK (ed.), New York, pp. 249-265.
- Vicentz M, Moureaux T, Leydecker MT, Vaucheret H, Caboche M. 1993.** Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* 3: 315-324.
- Víllora G, Moreno DA, Romero L. 2004.** Crop quality under adverse conditions: importance of determining the nutritional status. In: Crop management and postharvest handling of horticultural crops. Vol. III. Crop fertilization, nutrition and growth. Dris R, Niskanen R, Jain SM (eds.). Science Publishers, Inc. pp. 55-76.
- Viveros A, Centeno C, Brenes A, Canales R, Lozano A. 2000.** Phytase and acid phosphate activities in plant feedstuffs. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 4009-4013.
- von Wirén N, Gazzarrini S, Frommer WB. 1997.** Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant Soil.* 196: 191-199.
- Wakhloo JL, Staudt A. 1988.** Development of nitrate reductase activity in expanding leaves of *Nicotiana tabacum* in relation to the concentration of nitrate and potassium. *Plant Physiol.* 87: 258-263.
- Wang MY, Siddiqui MY, Ruth TJ, Glaas ADM. 1993.** Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma. *Plant physiol.* 103: 1259-1267.
- Warner RL, Narayanan KR, Kleishofs A. 1987.** Imheritance and expression of NAD(P)H nitrate reductase in barley. *Theor. Appl. Genet.* 74: 714-717.
- Watanabe K, Sakai T, Goto S, Yaginuma T, Hayakawa T, Yamaya T. 1996.** Expression of NADH-dependent glutamate synthase in response to the supply of nitrogen in rice cells in suspension-culture. *Plant Cell Physiol.* 37: 1034-1037.
- Weber A, Flugge UI. 2002.** Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 865-874.
- Weidner D, Johnson C, Decoteau DR. 1996.** Nitrogen and potassium fertility affects jalapeño pepper plant growth, pod yield, and pungency. *HortSci.* 31:1119-1123.

- Weigert P, Gilbert J, Patey AL, Key PE, Wood R, Barylko-Pikielna N. 1997.** Analytical quality assurance for the WHO GEMS/Food-EURO programme- results of 1993/94 laboratory proficiency testing. *Food. Addit. Contam.* 14:399-410.
- Weinhold BJ, Todd PT, Reichman GA. 1995.** Yield and nitrogen efficiency of irrigated corn in northern great plants. *Agron. J.* 87: 842-846.
- Wellburn AR. 1994.** The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometer of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.
- Wilcox GE, Magalhaes JR, Silva FLIM. 1985.** Ammonium and nitrate concentration as factors in tomato growth and nutrient uptake. *J. Plant Nutr.* 8: 989-998.
- Willekens H, Chamonongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W. 1997.** Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816.
- Williams LE, Miller AJ. 2001.** Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 659-688.
- Wojcik P. 2002.** Yield and 'Jonagold' apple fruit quality as influenced by spring sprays with commercial rosatop material containing calcium and boron. *J. Plant Nutr.* 25(5): 999-1010.
- Wojtaszek P. 1997a.** Mechanisms for generation of reactive oxygen species in plant defense response. *Acta Physiol. Plant.* 19: 581-589.
- Wojtaszek P. 1997b.** Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692.
- Wolf B. 1982.** A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 13: 1035-1059.
- Woodall J, Boxall JB, Forde BG, Pearson J. 1996.** Changing perspectives in plant nitrogen metabolism the central role of glutamine synthetase. *Sci. Prog.* 79: 1-26.
- Woodall J, Forde BG. 1996.** Glutamine synthetase polypeptides in the root of 55 legume species in relation to their climatic origin and the partitioning of nitrate assimilation. *Plant Cell Environ.* 19: 848-858.

- Wray JL. 1993.** Molecular biology, genetics, and regulation of nitrite reduction in higher plants. *Physiol. Plant.* 89: 607-612.
- Wyn Jones R G, Storey R, Leigh R A, Ahmad N, Pollard A. 1997.** A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In: *Regulation of Cell Membrane Activities in Plants*. Marrá E, Ciferri O (eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 121-136.
- Yamaya T, Oaks A, Matsumoto H. 1984.** Characteristic glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. *Plant Physiol.* 76: 1009-1013.
- Yamaya T, Obara M, Nakajima H, Sasaki S, Hayakawa T, Sato T. 2002.** Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *J. Exp. Bot.* 53: 917-925.
- Yamaya T, Tanno H, Hirose N, Watanabe S, Hayakawa T. 1995.** A supply of nitrogen causes increase in the level of NADH-dependent glutamate synthase protein and in the activity of the enzyme in roots of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 36: 1197-1204.
- Yemm EW, Cocking EC. 1955.** The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst.* 80: 209-213.
- Yoon S, Choi Y, Min H, Cho K, Kim J, Lee S, Jung Y. 1996.** Isolation and identification of phytase-producing bacterium. *Enterobacter sp.4.* and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microbial Technol.* 18: 449-454.
- Yu Q, Osborne L, Rengel Z. 1998.** Micronutrient deficiency changes activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco plants. *J. Plant Nutr.* 21: 1427-1437.
- Zaifnejad M, Clark RB, Sullivan CY. 1997.** Aluminum and water stress effects on growth and proline of sorghum. *J. Plant Physiol.* 150: 338-344.
- Zeiler KG, Solmonson LP. 1989.** Regulation of Chlorella nitrate reductase: control of enzyme activity and immunoreactive protein levels by ammonia. *Arch. Biochem. Biophys.* 269: 46-54.
- Zerihum A, BassiriRad H. 2000.** Photosynthesis of *Helianthus annuus* does not acclimate to elevated CO₂ regardless of N supply. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 897-903.

- Zhang CS, Lu Q, Verma DPS. 1995.** Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalysing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 270: 20491-20496.
- Zheng X, Vanhuystee RB. 1992.** Anionic peroxidase catalyzed ascorbic acid and IAA oxidation in the presence of hydrogen peroxide: A defense system against peroxidative stress in peanut plant. *Phytochem.* 31: 1895-1898.
- Zucker M. 1965.** Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 40: 779-784.