

Tesis de Posgrado

Efecto de los iones amonio y nitrato sobre la absorción de fosfato por plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.)

Barneix, Atilio José

1981

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Barneix, Atilio José. (1981). Efecto de los iones amonio y nitrato sobre la absorción de fosfato por plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1668_Barneix.pdf

Cita tipo Chicago:

Barneix, Atilio José. "Efecto de los iones amonio y nitrato sobre la absorción de fosfato por plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1668_Barneix.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

EFECTOS DE LOS IONES AMONIO Y NITRATO SOBRE LA ABSORCION DE FOSFATO POR PLANTAS
DE TRIGO (Triticum aestivum L.)

Autor: Atilio J. Barneix
Director: Osvaldo H. Caso

Trabajo realizado en el Centro de Ecofisiología Vegetal (CONICET, FECIC, FUND.
M. LILLO)

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN LA ORIENTACION CIENCIAS BIOLÓGICAS

1668
Ej 2

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Osvaldo Caso, por haberme brindado siempre su apoyo y las facilidades para allanar los inconvenientes presentados en el desarrollo de este trabajo.

A la Ing. Agr. Patricia A. Arnozis, por haber brindado siempre su colaboración como compañera y amiga.

Al Centro de Ecofisiología Vegetal, por haberme posibilitado la realización de este trabajo, y a todos sus integrantes por su constante apoyo y estímulo.

A la Lic. Cristina Dizeo, por la realización de los cortes histológicos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haber financiado esta investigación.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para que esta investigación pudiera realizarse.

DEDICADA:

A mi padre, que siempre me ha alentado, y con su ejemplo me enseñó que no hay obstáculo insalvable.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	
1.1. Consideraciones generales	1
1.2. Generalidades sobre el metabolismo del nitrógeno	2
1.3. Absorción y metabolismo del fosfato	6
1.4. Relaciones entre el nitrógeno y la absorción de iones	8
1.4.1. Generalidades	8
1.4.2. Relaciones entre el nitrógeno y el fósforo	10
1.5. Objetivos de la presente investigación	13
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Materiales	14
2.1.1. Material vegetal	14
2.1.2. Condiciones ambientales	14
2.1.3. Drogas usadas	14
2.1.4. Soluciones nutritivas	15
2.2. Cultivo de plantas	16
2.2.1. Germinación	16
2.2.2. Técnicas de cultivo	16
2.2.2.a Cultivo en soluciones circulantes	16
2.2.2.b Cinética de absorción de P en plantas hambreadas	18
2.2.2.e Cinética de absorción de P en plantas no hambreadas	18
2.2.2.d Obtención de raíces escindidas	19
2.3. Marcación con ^{32}P	19
2.3.1. Experimentos de marcación durante tiempos cortos	19

2.3.2. Experimentos de marcación durante tiempos largos	20
2.3.3. Marcación en los experimentos de cinética	21
2.4. Medición de eflujo	22
2.5. Incorporación de ^{14}C a proteínas	23
2.6. Técnicas histológicas	26
2.7. Técnicas analíticas	26
2.7.1 Determinación de fósforo total	26
2.7.2 Determinación de ^{32}P	26
2.7.3 Partición de fosfato	27
2.7.4 Determinación de nitrógeno total	27
2.7.5 Determinación de proteínas	28
2.8. Tratamiento estadístico	28
3. CARACTERIZACION DE LA ABSORCION DE FOSFATO EN PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS CON AMONIO O NITRATO COMO FUENTE DE NITROGENO.	29
3.1. Algunas características de las plantas de trigo cultivadas durante dos semanas con amonio o nitrato, como única fuente de nitrógeno.	29
3.2. Contenido de fósforo y absorción de fósforo radiactivo	36
3.3. Absorción de P en plantas cultivadas en nitrato y posteriormente transferidas a amonio	38
3.4. Efecto del pH sobre la absorción de fósforo en plantas pretratadas con amonio o nitrato	42
3.5. Interacción fuente nitrogenada-concentración de nitrógeno	45
3.6. Efecto de la azida de Na sobre la absorción de fósforo en plantas pretratadas con amonio o nitrato.	46
3.7. Partición de fosfato en la raíz	50
3.8. Marcación con pulso de ^{32}P	54
3.9. Absorción de fósforo marcado durante tiempos prolongados	56

4. ESTUDIOS CINÉTICOS	60
4.1. Cinética de absorción de fosfato en plantas pretratadas con amonio o nitrato	60
4.2. Cinética de absorción de fosfato por plantas con niveles normales de fósforo	78
4.3. Cinética de eflujo de fósforo radiactivo	84
4.3.1 Bases teóricas	84
4.3.2 Procedimiento	88
4.3.3 Resultados	88
5. ABSORCIÓN DE FOSFATO Y METABOLISMO DEL NITRÓGENO	99
5.1. Contenido de nitrógeno	99
5.2. Absorción y transporte de iones y su relación con la síntesis de proteínas	101
5.3. Incorporación de ^{14}C a proteínas en raíces de plantas cultivadas en amonio o nitrato	105
6. CONCLUSIONES	
6.1. Mecanismos de absorción de fosfato en plantas de trigo cultivadas en amonio o nitrato	109
6.2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la regulación de la absorción y transporte de fosfato	109
7. BIBLIOGRAFÍA	114

1. INTRODUCCION

1.1. Consideraciones generales.

El crecimiento de los vegetales es el resultado de la acción de numerosos factores endógenos y exógenos. Estos factores no son independientes, sino que el efecto de cada uno de ellos depende de los restantes.

Entre los factores exógenos, los nutrientes minerales no escapan a tal regla, puesto que la absorción y utilización de cada uno de ellos está condicionada por la presencia y concentración de otros compuestos orgánicos e inorgánicos de la rizosfera. Las interacciones que se producen entre nutrientes provocan cambios al nivel subcelular que pueden afectar los procesos de fotosíntesis, respiración, síntesis de proteínas y utilización y transporte de carbohidratos y de ácidos orgánicos. Esos cambios se traducen, finalmente, en diferencias en el crecimiento. Entre esas interacciones posee importancia singular la que se establece entre el nitrógeno y el fósforo, por ser estos los dos macronutrientes que, con mayor frecuencia, son críticos para el crecimiento de los vegetales.

En este trabajo de tesis se estudiarán los efectos de algunas de las diferentes formas químicas del nitrógeno presentes en el medio, particularmente las iones nitrato y amonio, sobre la absorción de fosfato en plantas de trigo.

1.2. Generalidades sobre el metabolismo del nitrógeno.

El nitrógeno es el cuarto elemento, en orden de abundancia en los vegetales, después del carbono y de los elementos del agua. Constituye el 2 al 4% del peso seco de la planta (Mengel y Kirkby, 1978). Es un elemento esencial para los vegetales y forma parte de las proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, pigmentos, y de un gran número de sustancias del metabolismo secundario.

Su absorción y utilización por los vegetales ha sido intensamente estudiada. La voluminosa bibliografía existente sobre el tema ha sido revisada últimamente por diversos autores (Hewitt, 1975, 1979; Burris, 1959; Beevers y Hageman, 1969; Beevers, 1976; Mengel y Kirkby, 1978).

La mayoría de las plantas absorben el nitrógeno de la solución del suelo. Dados los numerosos procesos que afectan el ciclo del nitrógeno, la cantidad de este elemento en esta solución puede variar considerablemente en períodos de tiempos muy breves, particularmente en el caso del ion nitrato.

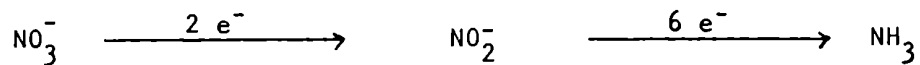
La mayor parte del nitrógeno del suelo se encuentra bajo la forma de nitrógeno orgánico. El nitrógeno inorgánico se encuentra como amonio fijado, amonio intercambiable, nitrato, o nitrito, aunque en la mayoría de los suelos la cantidad de nitrito es ínfima. El amonio fijado proviene del desplazamiento de los cationes Ca^{++} y Mg^{++} por el ion amonio en las partículas de arcilla, y por lo tanto no está disponible para los vegetales. En consecuencia, el amonio

intercambiable y el nitrato son las principales fuentes de nitrógeno para las plantas (Beever, 1976).

Tanto las formas amonio como nitrato pueden ser absorbidas. El nitrato es generalmente preferido al amonio, pero ello depende de la especie y de las condiciones del medio. La bibliografía sobre la absorción de nitrato y amonio ha sido revisada por Haynes y Goh (1978).

El amonio parece tener una cinética de absorción similar a la de los demás cationes monovalentes, especialmente el potasio; pero también se ha observado que el amoníaco es capaz de atravesar pasivamente las membranas biológicas. En cambio, es poco lo que se sabe sobre la absorción de nitrato. El sistema de absorción de nitrato es inducido por la presencia del sustrato, y esta inducción es inhibida por inhibidores de la síntesis de proteínas y de ARN. La absorción de nitrato es estimulada por la luz, probablemente por un incremento en el suministro de ATP.

Una vez absorbido, el nitrógeno debe ser incorporado a los compuestos nitrogenados del vegetal. Cuando la forma absorbida es el nitrato, este es reducido según la siguiente ecuación (Losada, 1975):

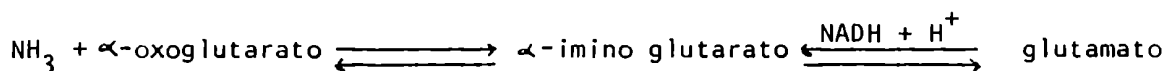


Las dos enzimas involucradas en esta reacción son la nitrato-reductasa y la nitrito reductasa. La nitrato reductasa es una enzima citoplasmática que es inducida por el sustrato, de peso molecular estimado entre 500.000 y 600.000

daltons y formada por dos subunidades: una de ellas contiene molibdeno como co-factor, y la otra contiene flavín-mononucleótido (FAD) (Beevers y Hageman, 1969) (Figura 1). El dador de electrones es el NADH.

La nitrito reductasa, por el otro lado, no ha sido caracterizada aún. Se supone que está ubicada en los cloroplastos. Se ha identificado a la ferredoxina como el dador de los 6 electrones requeridos para reducir una molécula de nitrito a amoníaco (Losada, 1975).

La posterior incorporación del NH_3 a esqueletos carbonados, ya sea que este haya sido absorbido como tal o que provenga de la reducción de NO_3^- , se lleva a cabo por medio de tres enzimas principales: la glutamato dehidrogenasa, la glutamina sintetasa, y la glutamato sintasa (Mengel y Kirkby, 1978). La glutamato dehidrogenasa cataliza la reacción entre el NH_3 y el α -oxo-glutarato. Se supone que en esta reacción los sustratos se combinan para dar un iminoácido que es posteriormente reducido a glutamato, según la siguiente reacción:



Una vía alternativa, y aparentemente más importante (Lea y Mifflin, 1974), involucra dos reacciones en serie catalizadas por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa. En esta reacción el glutamato actúa como aceptor de NH_3 para producir glutamina. En presencia de una fuente reductora, la glutamina transfiere su grupo amino al α -oxoglutarato, mediante la última de las enzimas nombradas.

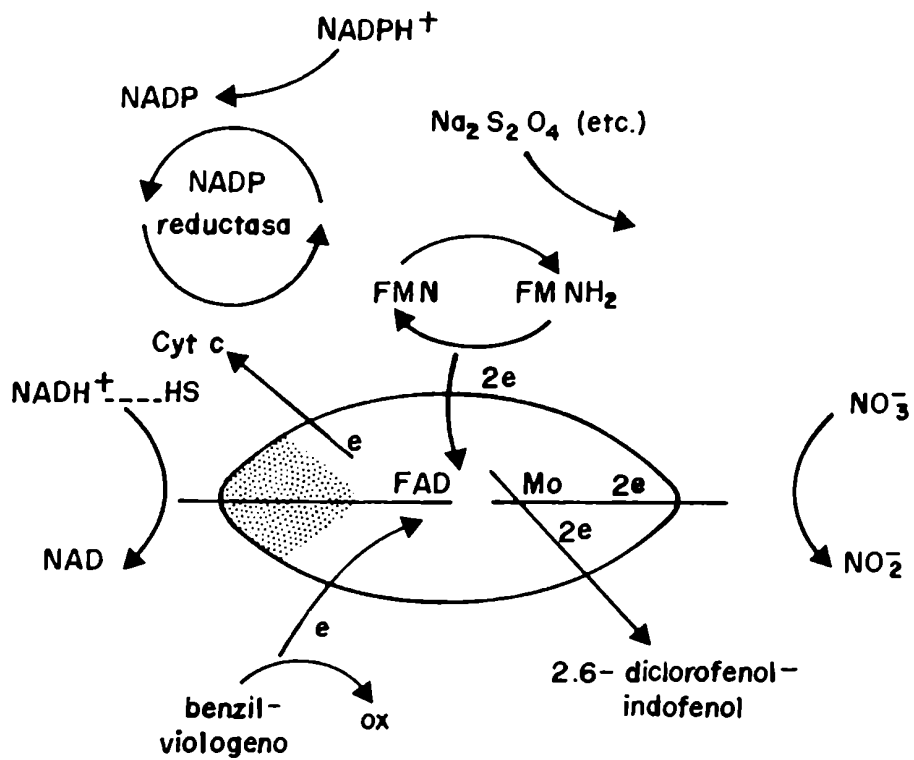
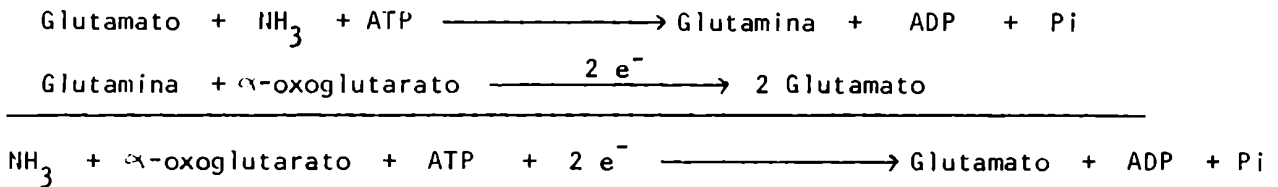


Figura 1: Representación de varios donores y aceptores de electrones de la nitrato reductasa. Se considera que "in vivo" el NADH^+ es el dador natural de electrones para la reducción del nitrato a nitrito. (De Beevers y Hagema, 1969).

La ferredoxina es la que provee el poder reductor necesario para esta reacción, y las dos reacciones pueden escribirse como sigue:



El grupo amino del glutamato puede luego ser transferido a otro cetoácido por el proceso de transaminación, que se lleva a cabo por medio de aminotransferasas.

Dado que el amonio es tóxico para los vegetales (Vines y Wedding, 1960), la rápida síntesis de aminoácidos permite la eliminación de esta sustancia. Se produce entonces una acumulación de asparagina y glutamina cuando las plantas crecen en una concentración elevada de nitrógeno inorgánico, y especialmente cuando se suministra nitrógeno como NH_4^+ (Wenzel y Michael, 1966; Goswami y Willcox, 1969).

1.3. Absorción y metabolismo del fosfato.

A diferencia del nitrógeno, el fósforo no debe ser reducido por el vegetal sino que se absorbe y se utiliza en su forma oxidada, como ortofosfato (Clarkson, 1980). El fósforo se encuentra en el suelo casi exclusivamente como ortofosfato, y constituye entre el 0,02 y el 0,15% de la materia seca del suelo. De este ortofosfato, entre el 20 y el 80% se encuentra formando parte de materia orgánica.

Desde el punto de vista del fisiólogo vegetal, el fósforo se encuentra en el suelo en tres fracciones principales: a) fosfato en la solución del suelo; b) fósforo lábil, que es el fósforo que se encuentra adsorbido sobre las partículas del suelo, y que puede ser rápidamente intercambiado con la solución del suelo; y c) fósforo insoluble, que no puede ser utilizado por las plantas.

El fósforo en la solución del suelo se encuentra en concentraciones extremadamente bajas, que varían entre 10^{-4} y 10^{-5} M en suelos fértiles (Mengel et al., 1969). Generalmente, la concentración de fósforo en las células de la raíz y en el jugo xilemático es de 100 a 1000 veces más elevada que aquella de la solución del suelo (Russell y Barber, 1960). Esto significa que el fósforo es absorbido por la planta contra un gradiente muy elevado. Esta absorción se produce con gasto de energía metabólica (Hai y Ludelot, 1966), por medio de transportadores que aún no han sido identificados, pero que estarían relacionados con proteínas específicas que poseen sitios de unión para el ortofosfato, ubicados en la plasmalemma (Jeanjean et al., 1979).

El ortofosfato se puede condensar para producir polifosfatos unidos por uniones éster y anhídrido. Estas uniones de alta energía son biológicamente importantes en los procesos de conservación y transformación de energía (Clarkson, 1980). Loughman y Russell (1957) y Jackson y Hagen (1960) observaron, en discos de papa, que luego de algunos minutos el 80% del fósforo absorbido se encontraba formando parte de compuestos orgánicos, especialmente nucleótidos y azúcares fosforilados. Posteriormente el fósforo absorbido se incorporó a fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas fosforiladas.

El fósforo es un elemento móvil dentro de la planta y puede ser transportado tanto basípeto como acrópetamente (Clarkson, 1980). Maizel et al. (1956) sugirieron que la fosforilcolina es el principal transportador de fósforo en el floema. Más recientemente Hall y Blake (1972) demostraron la existencia de fosfato inorgánico en el floema, lo que indica que la forma inorgánica también representaría un porcentaje importante del fósforo trasladado dentro de la planta.

1.4. Relaciones entre el nitrógeno y la absorción de iones.

1.4.1. Generalidades.

El nitrógeno suministrado a la planta afecta la absorción de otros iones tanto por su cantidad como por su forma química. Una mayor cantidad de nitrógeno induce una mayor absorción de los restantes nutrientes, asociada a un mayor crecimiento.

Las diferentes formas químicas del nitrógeno producen diferentes efectos fisiológicos (Haynes y Goh, 1978). Las plantas cultivadas en amonio contienen generalmente menores concentraciones de calcio, magnesio y potasio, y niveles más altos de fósforo y azufre, que aquellas que crecen en nitrato (Arnon, 1939, Harada et al., 1968; Cunningham y Nielsen, 1965; Kirkby y Mengel, 1966; De Cock y Kirkby, 1969; Kirkby, 1967, 1968; Borys et al., 1970; Blair et al., 1970; Cox y Reisenauer, 1973, 1977; Kirkby y Hughes, 1970; Polizotto et al., 1975).

Las causas de estas diferencias en la composición química no son bien conocidas aún. Jackson y Williams (1968) midieron un mayor contenido de cationes

en aquellas plantas de trigo cultivadas en presencia de nitrato con respecto a aquellas cultivadas en amonio. Postularon que al ser absorbido el NO_3^- produciría una alcalinización del medio en la rizosfera, lo que crearía condiciones favorables para la absorción de cationes. También un cambio de pH, pero esta vez una acidificación producida por la absorción de los iones NH_4^+ sería, según Riley y Barber (1971) y Soon y Miller (1977), la causa de los mayores contenidos de fósforo en las plantas fertilizadas con amonio.

Por el otro lado, Cox y Reisenauer (1973), trabajando con plantas de trigo en soluciones nutritivas, encontraron también una disminución en el contenido de cationes en plantas cultivadas en amonio con respecto a aquellas cultivadas en nitrato, y postularon que esta disminución sería debida a la competencia por el sitio de absorción, ya sea por los iones NH_4^+ per se., o por los iones H^+ liberados al medio al ser absorbido el NH_4^+ . Posteriormente, esos mismos autores (1977) postularon otra teoría para explicar el mismo fenómeno. Dado que las raíces de las plantas cultivadas en amonio, comparadas con aquellas cultivadas en nitrato, contienen niveles menores de aniones orgánicos (carboxilatos), se produciría una menor formación de quelatos con cationes divalentes, lo que disminuiría la actividad interna de estos iones y permitiría una mayor entrada desde el exterior a la planta. Por lo tanto, no se necesitaría un efecto específico en la permeabilidad de membrana, o en los mecanismos de transporte a través de ella para explicar este fenómeno.

1.4.2. Relaciones entre el nitrógeno y el fósforo.

La abundante bibliografía existente sobre las relaciones entre la fertilización nitrogenada y la absorción de fosfato (Chapman, 1936; Bennet et al., 1953; Grunes et al., 1955; Olson y Dreier, 1956; Rennie y Mitchell, 1954; Robertson et al., 1954; Grunes et al., 1958; Cole et al., 1963; Leonce y Miller, 1966; Bouldin y Sample, 1958, 1959; Starotska y Hill, 1955; Duncan y Ohlrogge, 1958, 1959; Miller et al., 1962, 1965; Miller, 1966; Blanchar y Caldwell, 1966; Rennie y Sopper, 1958; Thien y Mc Fee, 1970, 1972; Subramonia Iyer et al., 1973, 1974; Subramonia Iyer y Saxena, 1977; Roux y Lessaint, 1962; Barte, 1977; Hassan y Van Hai, 1978) coincide en que la presencia de nitrógeno incrementa la absorción de fósforo. Pero la causa de este incremento ha recibido interpretaciones diversas de diferentes autores. Puesto que los trabajos más antiguos fueron realizados en suelo, varios autores atribuyeron ese aumento de la absorción de fosfato a un incremento en la solubilidad del fertilizante fosforado (Bouldin y Sample, 1958, 1959; Caldwell, 1960; Starotska y Hill, 1955).

Otros autores justificaron este incremento de la absorción de fósforo por un mayor crecimiento de las raíces en la zona fertilizada, como consecuencia de una mayor exploración del suelo (Duncan y Ohlrogge, 1958, 1959; Miller y Ohlrogge, 1958; Miller y Vij, 1962; Grunes et al., 1958).

Recién en 1963, Cole et al., trabajando en maíz en soluciones nutritivas, establecieron una relación entre la absorción de fosfato y el metabolismo del nitrógeno. Determinaron que un breve período de pretratamiento con nitrógeno

incrementaba la absorción de fósforo, y este incremento era mayor que el producido por un aumento de diez veces de la concentración externa de fosfato. Además, el pretratamiento incrementó de 5 a 10 veces la velocidad de transporte de fosfato a la parte aérea. Estos autores no encontraron diferencias entre el amonio o el nitrato como fuentes de nitrógeno. En cambio, Leonce y Miller (1966) trabajando también en maíz, en experimentos realizados en suelo y en soluciones nutritivas, observaron que las plantas a las que se había agregado $SO_4(NH_4)_2$ o $ClNH_4$ y fertilizante fosforado incrementaban el contenido de P en la parte aérea con respecto a aquellas a las que se les había aplicado NO_3K . Pero estas últimas plantas produjeron una notable acumulación de fosfato en la raíz. Concluyeron que el ion amonio tenía un efecto específico sobre el transporte de fósforo hacia el xilema a través del simplasto de las células radicales.

Por el otro lado, Roux y Lesaint (1963) encontraron que en presencia de amonio la concentración de fósforo en tomate era el doble de aquella en presencia de nitrato. La fracción fosforada que se incrementó en mayor proporción en la planta fue el fósforo inorgánico, siendo los ácidos nucleicos la fracción menos afectada.

Contrariamente a esos autores, Thien y Mc Fee (1970, 1972), trabajando con soluciones nutritivas y con pretratamientos cortos de nitrógeno, observaron que si bien el pretratamiento producía un incremento en la velocidad de absorción de fosfato, el efecto era el mismo si se utilizaba nitrato o amonio. Observaron

que la absorción y el transporte a la parte aérea estarían afectados en diferente grado por el nitrógeno. Esta observación coincide con lo informado por Barta (1977) quien en un ensayo, empleando el sistema radical dividido de Lolium perenne, demostró que el nitrógeno aumentaba la absorción de Ca y P a través de un incremento en la actividad metabólica. El sugiere que la absorción de iones y su posterior transporte a la parte aérea están controladas por mecanismos diferentes.

Contrariamente a lo descrito en los trabajos anteriores, Pill y Lambeth (1977) determinaron en tomate un menor contenido de P en presencia de amonio con respecto a aquel en nitrato.

Subramonia Iyer et al. (1971, 1973, 1974, 1977) realizaron una serie de estudios de cinética de absorción de fosfato por plantas de maíz pretratadas con nitrato o amonio. Observaron que tanto una forma como la otra estimulaban la absorción de fosfato, mas el aumento de la velocidad de absorción debido al nitrato podría ser debido a un incremento de la concentración del carrier de fosfato en la membrana plasmática de las células radicales, en tanto que el amonio provocaría un incremento en la velocidad del complejo carrier-fosfato.

Hassan y Van Hai (1978), trabajando también en cinética de absorción de fosfato, en plantas de Citrus, encontraron que con concentraciones de fósforo menores de $1,6 \times 10^{-5}$ M, el nitrógeno, no tiene efecto sobre la absorción de este ion, en tanto que a concentraciones mayores, la absorción de fosfato es menor en presencia de concentraciones altas de sulfato de amonio.

De todo lo expuesto se desprende que, si bien la interacción entre el nitrógeno y el fósforo es un hecho verificado repetidamente y que, salvo excepciones, se acepta que el nitrógeno incrementa la absorción de fósforo, la información es

contradictoria con respecto a los efectos diferenciales del amonio o del nitrato sobre la absorción de fosfato; más aún, son desconocidas las causas que provocan esas diferencias.

Por otra parte, no existe ningún trabajo específico que describa en forma integral diferentes enfoques del problema, sino que toda la información publicada hasta ahora proviene de trabajos que sólo lo abordan parcialmente.

1.5. Objetivos de la presente investigación.

Los objetivos del presente trabajo de tesis son:

- Estudiar los efectos producidos por los iones NH_4^+ y NO_3^- sobre la absorción de fosfato en plantas de trigo.
- Determinar si la interacción observada se produce a nivel de absorción o de transporte a la parte aérea.
- Determinar mediante qué mecanismos se producen las diferencias de absorción.
- Determinar las posibles causas de las diferentes respuestas observadas en la absorción de fosfato, en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. Material vegetal:

Se trabajó con plantas de trigo (Triticum aestivum L.) cv. Buck cencerro. La semilla fue cedida directamente por José Buck S.A.

2.1.2. Condiciones ambientales:

Todos los experimentos fueron realizados en una cámara de cultivo, iluminada artificialmente con 6 lámparas G.E. tipo HFL, de 400 W. La temperatura se mantuvo constante a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El fotoperíodo fue de 16 horas de luz. La radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) de la cámara fue $90\mu\text{E}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$.

2.1.3. Drogas usadas:

En todos los experimentos se utilizaron drogas pro-análisis para la preparación de las soluciones nutritivas y para las técnicas analíticas.

La ^{14}C sacarosa y el ^{32}P en solución clorhídrica fueron suministrados por la Comisión Nacional de Energía Atómica.

2.1.4. Soluciones nutritivas:

Las soluciones nutritivas empleadas son las utilizadas por Chouteau (1960), diluidas 5 veces para evitar efectos tóxicos producidos por el amonio. Cuando el texto menciona soluciones completas se estará refiriendo a estas soluciones.

Solución completa de amonio:

PO_4H_2K	0,4 mM
SO_4Mg	0,15 mM
$SO_4(NH_4)_2$	0,5 mM
SO_4Ca	0,5 mM
Fe-EDTA	0,004 mM

micronutrientes:

Cl	1,77 ppm
B	0,27 ppm
Mn	0,11 ppm
Zn	0,131 ppm
Cu	0,032 ppm
Mo	0,05 ppm

Solución completa de nitrato:

PO_4H_2K	0,4 mM
SO_4Mg	0,15 mM
$(NO_3)_2Ca$	0,5 mM
Fe-EDTA	0,004 mM

micronutrientes:

En igual concentración que en la solución completa de amonio.

El pH de las soluciones nutritivas se mantuvo a $5,5 \pm 0,05$ salvo en aquellos experimentos en que se especifique que se utilizaron otros pH. Las soluciones fueron llevadas a pH con OHNa o ClH .

Todas las soluciones fueron preparadas con agua desmineralizada con una conductividad menor de 3 μmhos .

2.2. CULTIVO DE PLANTAS.

2.2.1. Germinación.

Los cariopses de trigo fueron colocados sobre papel húmedo con agua destilada, en oscuridad, a 25°C , durante 48 horas. Posteriormente las plántulas fueron transferidas a las soluciones nutritivas.

2.2.2. Técnicas de cultivo.

2.2.2.a Cultivo en soluciones circulantes.

Las plántulas fueron colocadas en macetas plásticas de 100 ml sobre una malla plástica de modo que las raíces crecieran hacia la solución. Las macetas fueron cubiertas por polietileno negro, para evitar la entrada de luz. Este polietileno fue perforado de modo que permitiera el crecimiento de los coleoptiles. Se colocaron tres plántulas por maceta.

Las macetas fueron conectadas en series de seis mediante un tubo de plástico, en la forma que se muestra en la Figura 2.

La solución nutritiva se hizo circular a través de las macetas por

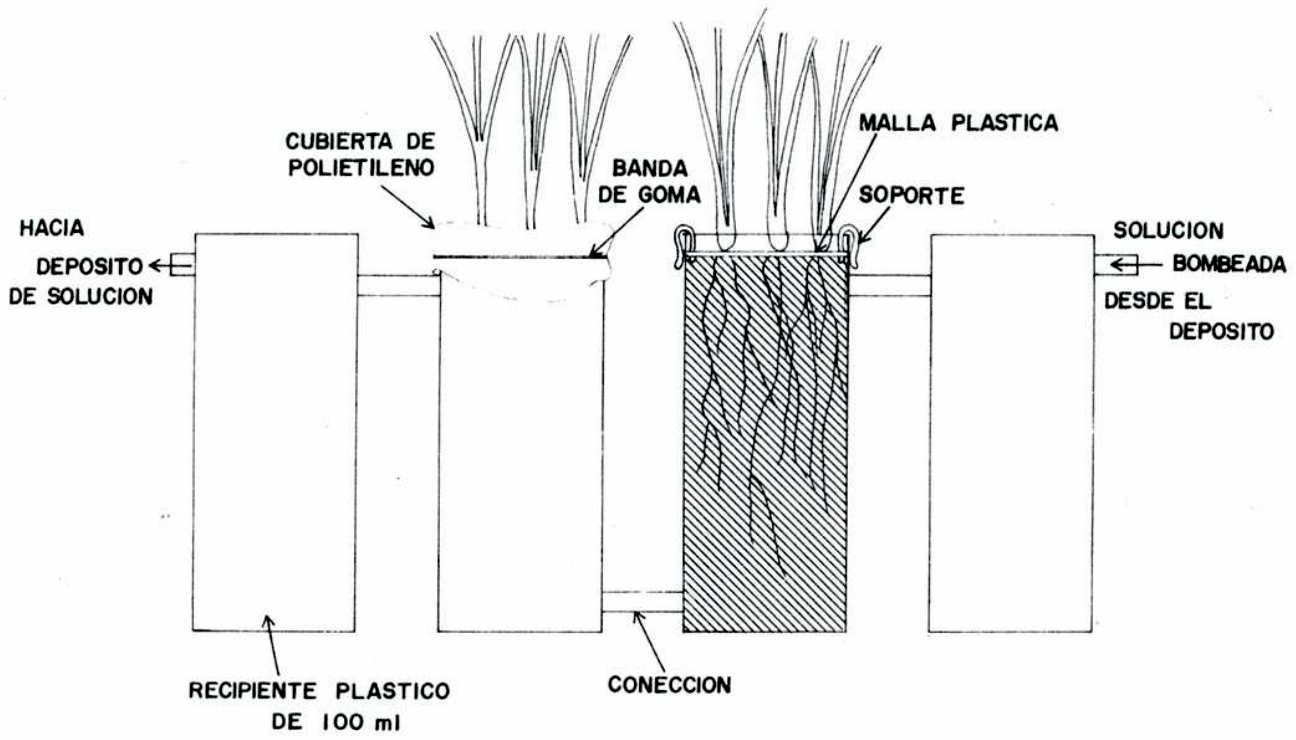


Figura 2: Plantas de trigo cultivadas en solución circulante.

medio de una bomba peristáltica, desde un recipiente de 30 litros, al que retornaba por gravedad. La solución en el recipiente fue constantemente aireada. La velocidad de flujo de solución a través de cada serie de macetas fue de 100 ml por hora, durante la primera semana de crecimiento de las plántulas. Durante la segunda semana el flujo fue aumentado a 200 ml/hora, debido al mayor tamaño de las plantas. El pH de las soluciones fue controlado diariamente, y la solución fue renovada semanalmente.

2.2.2.b Cinética de absorción de P en plantas hambreadas.

En esta serie de experimentos, dado que fue necesario utilizar un número muy grande de plantas se cambió el método de cultivo. Las plántulas, luego de 48 horas de germinadas, fueron colocadas en una malla plástica sobre un recipiente de plástico de 45 l de volumen que contenía agua destilada aireada constantemente. Luego de diez días las plantas fueron colocadas en discos de poliuretano expandido, a razón de nueve plantas por disco, y en macetas plásticas de 800 ml que contenían las soluciones de pretratamiento. Estas soluciones fueron:

Solución de nitrato: $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ 0,5 mM

Solución de amonio: $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,5 mM + SO_4Ca 0,5 mM

Las plantas control permanecieron en agua destilada.

2.2.2.c Cinética de la absorción de ^{32}P en plantas no hambreadas.

En este experimento las plantas fueron cultivadas en cubos flotantes de

poliuretano expandido, en recipientes que contenían 30 l de solución nutritiva constantemente aireada. La solución fue renovada diariamente. Los pretratamientos fueron realizados en los mismos recipientes, y en iguales condiciones que el cultivo.

2.2.2.d Obtención de raíces escindidas.

Para la obtención de raíces escindidas se cultivaron las plantas en soluciones nutritivas, en macetas de 3,5 l. Las plantas se colocaron en discos flotantes de poliuretano expandido, a razón de 30 plantas por maceta. Las soluciones nutritivas se renovaron diariamente; se burbujeó aire constantemente.

2.3. MARCACION CON ^{32}P

2.3.1. Experimentos de marcación durante tiempos cortos.

En experimentos de marcación durante tiempos menores de dos horas, la absorción de ^{32}P se llevó a cabo en recipientes plásticos de 100 ml. La marcación se inició transfiriendo las mallas plásticas donde crecían tres plantas directamente a la solución de marcación; en consecuencia, el daño ocasionado a las plantas por el manipuleo fue mínimo.

Las soluciones de marcación fueron de dos tipos: (i) soluciones completas de amonio o nitrato (como se describen en el punto 2.1.4) marcadas con $0,1 \mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}P ; o (ii) una solución de absorción compuesta por SO_4Ca $0,5 \text{ mM}$ y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ $0,4 \text{ mM}$, marcada con $0,1 \mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}P .

En cada experimento se indica el tipo de solución empleada, así como el tiempo de marcación.

En todos los experimentos de este tipo la marcación se realizó a la luz, y en las condiciones ambientales utilizadas para el cultivo de plantas.

Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento. La unidad experimental consistió de tres plantas

La absorción se detuvo transfiriendo las plantas a agua destilada helada. Luego de enjuagarse dos veces con agua destilada, las plantas fueron colocadas en una solución de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Ca}$ 0,4 mM y SO_4Ca 0,5 mM sin marcar, a 0°C durante 30 minutos para intercambiar el fósforo radiactivo presente en el espacio libre. Finalmente las plantas se lavaron tres veces con agua destilada. Se separó la raíz de la parte aérea y ambas se secaron a 60°C durante 48 horas en una estufa de aire forzado. Las plantas se pesaron, y se determinó el contenido de ^{32}P en la raíz y en la parte aérea.

2.3.2. Experimentos de marcación durante tiempos largos.

Cuando se requirió marcar las plantas durante tiempos prolongados (varios días), las plantas se colocaron en discos de poliestireno expandido (5 plantas por maceta), en recipientes de 800 ml que contenían las soluciones radiactivas. Se burbujeó aire constantemente durante el tiempo de marcación. Las soluciones radiactivas fueron renovadas diariamente.

En estos experimentos de tiempos prolongados de absorción siempre se utilizaron soluciones completas de amonio o nitrato marcadas con ^{32}P . En los experimentos de transporte la concentración de actividad empleada fue de 0,03 $\mu\text{Ci/ml}$, y en los experimentos de eflujo fue de 0,15 $\mu\text{Ci/ml}$.

La absorción fue detenida en la forma previamente descrita para los ensayos de absorción en tiempos breves.

En estos experimentos se utilizó el mismo fotoperíodo que durante el cultivo.

2.3.3. Marcación en los experimentos de cinética.

La marcación de las plantas en los experimentos de cinética se llevó a cabo en recipientes de plástico de 800 ml. Las soluciones de marcación fueron soluciones de SO_4Ca 0,5 mM, y un amplio rango de concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, según se indica en cada experimento. En los experimentos de cinética de absorción de P en plantas hambreadas se colocaron nueve plantas por maceta de las cuales se tomaron grupos de tres, que fueron considerados como la unidad experimental. Se hicieron tres repeticiones para cada concentración de fosfato. Las soluciones fueron aireadas vigorosamente durante el período de absorción, con el fin de conseguir una adecuada agitación de la solución. La misma fue detenida en la forma ya descrita en el inciso 2.3.1.

En los experimentos de cinética de absorción de fosfato por plantas no hambreadas, la marcación se realizó en recipientes y soluciones similares a las ya enunciadas, pero se realizaron cuatro repeticiones para cada concentración de fosfato. Nuevamente, la unidad experimental consistió en tres plantas. Dada la gran cantidad de concentraciones de fosfato empleadas en este experimento, la marcación se realizó en dos tandas de dos repeticiones cada una, marcándose

primero des repeticiones y posteriormente las otras dos. El tiempo transcurrido entre ambas marcaciones fue menor de una hora. No hubo diferencias en la cantidad de fósforo absorbido durante la primera y la segunda tanda, para cada concentración de fosfato en cada tratamiento.

2.4. MEDICION DE EFLUJO

Las plantas fueron cultivadas en soluciones completas de nitrato, en discos de poliestireno expandido, en macetas de 800 ml constantemente aireadas. Posteriormente fueron transferidas a soluciones completas de nitrato o amonio marcadas con ^{32}P donde permanecieron una semana, en la forma que se indica en 2.3.2. Para efectuar la medición del eflujo de fósforo radiactivo, cada plantas fue colocada en un recipiente de plástico que contenía 50 ml de soluciones completas de nitrato o amonio. La solución fue aireada vigorosamente, y totalmente renovada en cada tiempo de muestreo. Luego se tomó una alícuota de 10 ml para medir la cantidad de fósforo radiactivo en un contador de centelleo líquido. La medición de eflujo se realizó en cuatro plantas de cada tratamiento, y posteriormente los valores fueron promediados. Luego de 24 horas de iniciada la medición del eflujo, las plantas fueron cosechadas, se separaron la raíz y la parte aérea, y se secaron en estufa de aire forzado a 60°C durante 48 horas. Se determinó el contenido de ^{32}P remanente en la planta.

El contenido inicial de ^{32}P se determinó sumando el fósforo marcado remanente en la planta al fósforo recogido en las soluciones de intercambio a lo largo del experimento.

2.5. INCORPORACION DE ^{14}C A PROTEINAS

Ante la carencia de un método asequible para medir el "turn-over" de proteínas, se desarrolló el siguiente método:

Como donador de ^{14}C se prefirió la utilización de ^{14}C -sacarosa a la de aminoácidos marcados, dado que en la célula vegetal existen dos "pools" de aminoácidos: uno proveniente de la degradación de las proteínas, y otro proveniente de la síntesis "de novo" de aminoácidos, que serían incorporados a proteínas (Stewart y Bidwell, 1966). Estos "pools" están separados, y por lo tanto los aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas no pueden ser nuevamente incorporados a péptidos sin antes ser degradados a sus esqueletos carbonados. Los aminoácidos suministrados exógenamente son incorporados al "pool" de degradación, y por ello sufren una gran dilución antes de ser resintetizados e incorporados a proteínas. En cambio la sacarosa entra directamente como esqueleto carbonado al "pool" de síntesis "de novo" (Bevers, 1976).

Las plantas fueron cultivadas como se indica en 2.2.2.d. Inmediatamente antes de realizar la medición de la incorporación de ^{14}C a proteínas, se cortaron las raíces de las plantas de cada tratamiento y se conservaron en agua

destilada. Quinientos mg de raíces frescas se pesaron y colocaron en bolsitas de gasa de 10 x 10 cm, cuidando siempre que no se desecaran. Las bolsitas con las raíces fueron colocadas en erlenmeyers de 125 ml, conteniendo cada uno 30 ml de la siguiente solución:

ClK	5 mM
SO ₄ Ca	0,5 mM
Sacarosa	0,25 mg/ml
¹⁴ C-sacarosa	20 µCi

Los erlenmeyers fueron colocados en un agitador, a 25°C, en la oscuridad.

La absorción de ¹⁴C fue detenida transfiriendo las bolsitas a un recipiente con agua destilada helada. Las raíces fueron lavadas en agua helada, molidas en un mortero de porcelana, y suspendidas en OHNa 0,1 M. Este extracto crudo se centrifugó a baja velocidad. El precipitado se lavó otra vez con OHNa 0,1 M, y se centrifugó nuevamente. Los sobrenadantes se unieron, y se llevó a volumen con OHNa 0,1 M. De este extracto se tomó una alícuota de 1 ml para determinar proteínas totales. Al resto se le agregó TCA (Acido tricloroacético) hasta una concentración del 5%. Se centrifugó a baja velocidad. El sobrenadante se eliminó, y el precipitado se lavó con TCA 5% y se volvió a centrifugar.

El precipitado se hidrolizó durante una noche en amoníaco concentrado, a 37°C. Posteriormente el amoníaco se evaporó al vacío hasta sequedad, y el residuo se resuspendió en 10 ml de líquido de centelleo (4 g de PPO, 40 mg POPOP, 750 ml de tolueno y 250 ml de tritón X-100). Se determinó el contenido de ¹⁴C en un contador de centelleo líquido.

Con la técnica aquí desarrollada la incorporación de ¹⁴C a proteínas resultó ser lineal, por lo menos durante 5 horas (Figura 3).

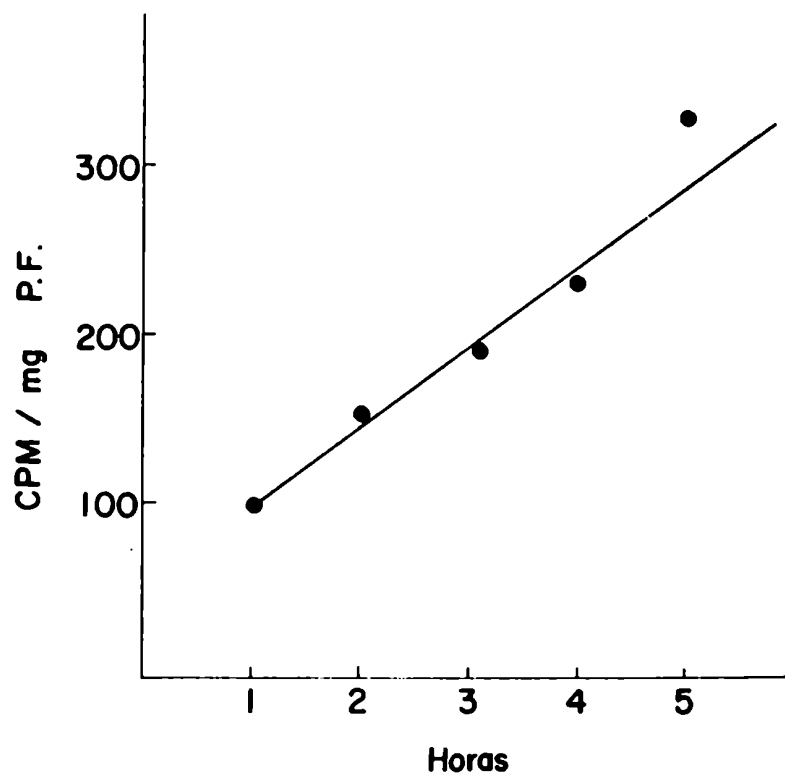


Figura 3: Incorporación de ^{14}C a proteínas solubles de raíces escindidas de trigo.

2.6. TECNICAS HISTOLOGICAS

Las raíces fueron fijadas con FAA (Formol-Acético-H₂O) inmediatamente después de ser cosechadas. Los cortes histológicos fueron hechos mediante la técnica de inclusión en parafina, y cortados posteriormente a micrótopo. Los cortes así obtenidos fueron teñidos con la tinción de safranina-fast green (Johansen, 1940), y montados en bálsamo de Canadá.

2.7. TECNICAS ANALITICAS

2.7.1. Determinación de fósforo total

El fósforo total fue determinado en muestras secas, digeridas en una mezcla de ácidos nítrico, perclórico y sulfúrico, (100: 40: 10), por medio del reactivo vanado-molíbico.

2.7.2. Determinación de ³²P

Para determinar el contenido de ³²P, las muestras secas fueron digeridas en una mezcla de ácidos nítrico, perclórico y sulfúrico (100: 40: 10). El residuo fue resuspendido en 10 ml de H₂O destilada, y se midió la actividad en un contador de centelleo líquido.

2.7.3. Partición de fosfato

Las plantas fueron marcadas en la forma indicada en 2.3.1. Luego de lavadas, y eliminado el fósforo radiactivo del espacio libre, las raíces se molieron en un mortero, a 0°C, en presencia de ácido perclórico 10%. El extracto se centrifugó a baja velocidad, el precipitado se lavó dos veces con ácido perclórico 5%, y se unieron los sobrenadantes. El precipitado, que contiene el fósforo ácido insoluble (ácido nucleicos y fosfolípidos) fue secado, pesado y digerido con la mezcla digestora descrita en 2.7.2., y el contenido de ^{32}P se determinó en la forma indicada.

Del sobrenadante se extrajo el fósforo inorgánico mediante una partición con una mezcla de isobutanol-benceno-agua, en presencia de molibdato, quedando en la fase acuosa solamente el fósforo orgánico ácido soluble (fósforo azúcares y nucleótidos) (Avron, 1960), y se determinó el contenido de ^{32}P en la fase acuosa, contando directamente en un contador de centelleo líquido. El contenido de fósforo inorgánico se determinó por diferencia entre el fósforo total soluble (1er sobrenadante) y el fósforo orgánico ácido soluble.

2.7.4. Determinación de nitrógeno total

El nitrógeno total se determinó por Kjeldahl en muestras secadas y molidas.

2.7.5. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas solubles en las raíces se realizó sobre el extracto indicado en 2.5., mediante el método de Lowry et al., (1951).

2.8. TRATAMIENTO ESTADISTICO

Para la comparación de pares de muestras se utilizó la prueba del t de Student. Para la comparación múltiple de medias se utilizó la prueba de Student-Newman-Keuls. En todos los casos en que se compararon distribuciones porcentuales los datos fueron transformados a arcoseno.

Las pendientes de las rectas fueron calculadas por el método de ajuste de los cuadrados mínimos lineales. La comparación de pendientes se realizó por el método de Tsutakawa y Hewett (1978).

3. CARACTERIZACION DE LA ABSORCION DE FOSFATO EN PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS CON AMONIO O NITRATO COMO FUENTE DE NITROGENO

3.1. Algunas características de las plantas de trigo cultivadas durante dos semanas con amonio o nitrato como única fuente de nitrógeno.

Las plantas de trigo cultivadas durante dos semanas en soluciones nutritivas con amonio o nitrato como única fuente nitrogenada, presentaron entre sí diferencias morfológicas y fisiológicas.

En la mayoría de los experimentos realizados durante este trabajo de tesis no hubo diferencias entre el peso seco de las plantas de ambos tratamientos ni en la relación tallo/raíz (Tabla 1).

En los casos en que se observaron diferencias, las plantas cultivadas en solución nutritiva con nitrato tuvieron mayor peso seco que aquellas cultivadas con amonio. Asimismo, en los casos en que hubo diferencias en la relación tallo/raíz, este cociente fue menor en las plantas cultivadas en nitrato. El menor crecimiento en presencia de amonio ha sido atribuido a los efectos tóxicos que produce este ion en la planta. Si bien aún no está totalmente aclarado de qué manera se produce la toxicidad de este ion en la planta entera, se sabe que a nivel celular desacopla la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación (Vines y Wedding, 1960). De cualquier manera, la toxicidad del amonio depende de su concentración en la solución de cultivo (Maynard y Barker, 1969), por ello

	NH_4^+	NO_3^-	
Peso seco (gr)	0,092	0,104	N.S.
Relación tallo/raíz	3,33	3,13	N.S.
Contenido de fósforo %			
Raíz	0,200	0,162	S (P 0,01)
P. aérea	0,419	0,290	S (P 0,01)

Tabla 1: Peso seco, relación tallo/raíz y contenido de fósforo en planta de trigo cultivadas durante dos semanas en soluciones nutritivas de amonio o nitrato.

	NH_4^+		NO_3^-	
pH	4,0	5,5	4,0	5,5
Peso seco (mg)	23,82 a	22,85 a	22,64 a	22,88 a

Tabla 2: Peso seco de raíces de plantas de trigo tratadas durante 48 hs. en soluciones de amonio o nitrato, a pH 4,0 ó 5,5. Promedios de cinco repeticiones. Números seguidos de iguales letras no difieren significativamente (P 0,05).

se ha elegido usar soluciones nutritivas con una concentración de nitrógeno relativamente baja (1 mM), evitándose de este modo, en la mayoría de los casos, la aparición de efectos tóxicos.

Si bien no se encontraron mayores diferencias en el peso seco entre los tratamientos, se observaron diferencias morfológicas. Aunque estas no fueron evidentes en la parte aérea, sí lo fueron en la raíz. Las plantas cultivadas durante dos semanas en soluciones nutritivas con amonio presentaron raíces más cortas, más gruesas, y con más ramificaciones laterales que aquellas de las plantas cultivadas en soluciones con nitrato (Figura 4). Sin embargo, las ramificaciones laterales de estas últimas fueron mucho más delgadas y más largas que las de las primeras.

Los cortes histológicos de las raíces principales de las plantas de ambos tratamientos, realizados a 5 cm del cuello (Figura 5), revelaron diferencias en la lignificación y suberificación. Las plantas cultivadas en amonio presentaron un metaxilema con tres vasos bien desarrollados, con abundante engrosamiento de las paredes celulares del parénquima xilemático, y la aparición de bandas en U en la endodermis (Figura 5) ; en tanto que aquellas provenientes de nitrato presentaban sólo dos vasos en el metaxilema, con poca lignificación, y no se observaron engrosamientos en U en la endodermis (Figura 5) . Similares diferencias fueron observadas en raíces de Paspalum dilatatum en presencia de amonio o nitrato (comunicación personal de la Ing. P. Arnozís).

Para determinar si las diferencias morfológicas observadas pudieron ser

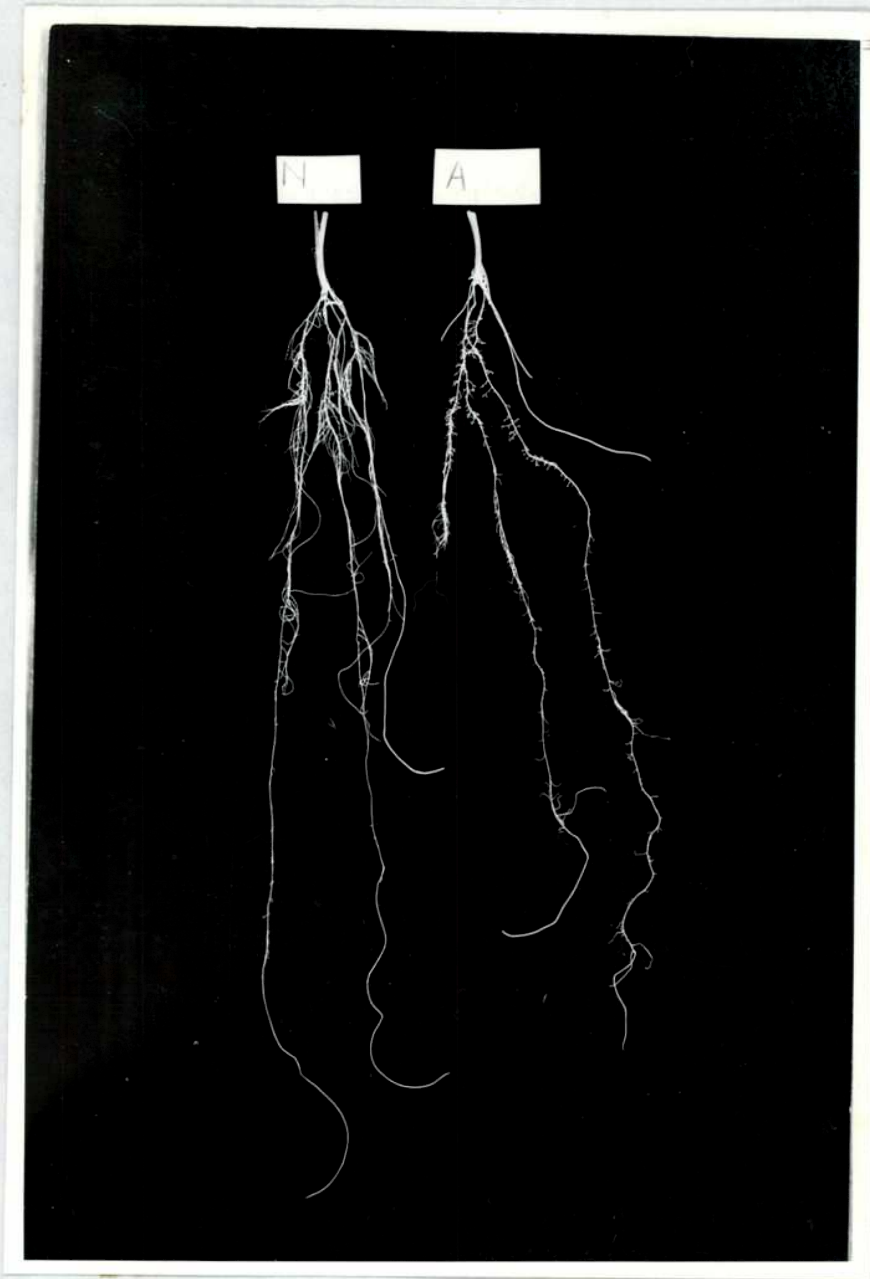


Figura 4: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la morfología de raíces de trigo (A = amonio, N = nitrato).

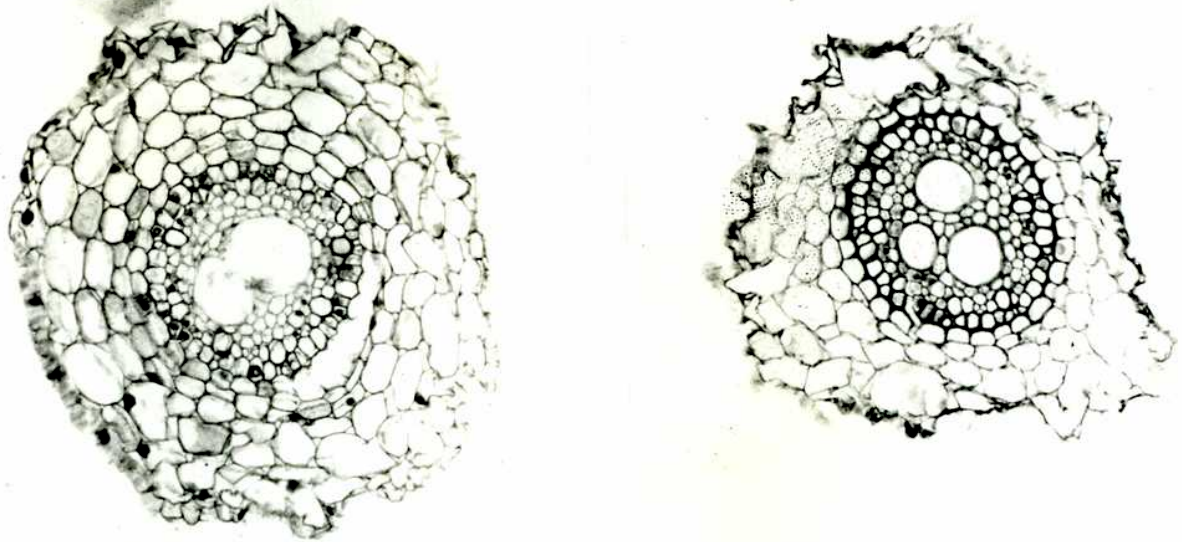


Figura 5: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la anatomía de la raíz de trigo. Cortes transversales realizados a 5 cm del cuello. (Izquierda: amonio, derecha: nitrato).

debidas a pequeños cambios de pH en la rizosfera, provocados por la absorción de los iones nitrato o amonio e imposibles de controlar en las presentes condiciones experimentales, se cultivaron plantas durante dos semanas en soluciones nutritivas con amonio o nitrato, pero en dos pH diferentes. Se eligieron el pH 5,5, por ser este el pH con que se trabajó en el resto de los experimentos, y el pH 4,0, que es más ácido que el que podría esperarse se produzca en la rizosfera por la absorción de NH_4^+ , en las actuales condiciones de trabajo, sin llegar a ser deletéreo para la planta. En la Figura 6 puede verse que, si bien las raíces de las plantas crecidas a pH 4,0 fueron más cortas que las de las plantas crecidas a pH 5,5, las diferencias morfológicas anteriormente mencionadas para cada tratamiento se conservaron independientemente del pH de la solución nutritiva. Estas diferencias tampoco pueden ser atribuidas a cambios en el tenor de oxígeno en la rizosfera. Si bien se sabe que en presencia de amonio hay un mayor consumo de oxígeno que en presencia de nitrato (Willis, 1955), las soluciones se airearon exhaustivamente. Por lo tanto, se puede aceptar que las diferencias morfológicas observadas se debieron a un efecto específico del tipo de ion nitrogenado suministrado a la planta. Diferencias en la morfología de la raíz debidas a la fuente de nitrógeno ya fueron descritas por Konings y Verschuren (1980) en maíz. Sin embargo, estos autores observaron la formación de cámaras aéreas en la corteza radical en presencia del ion nitrato, mientras que tales cámaras aéreas no se observaron en los experimentos presentes.



Figura 6: Efecto del pH y la fuente de nitrógeno sobre la morfología de raíces de trigo. (A = amonio, N = nitrato).

3.2. Contenido de fósforo y absorción de fósforo radiactivo

Cuando se cultivaron plantas de trigo durante dos semanas en soluciones nutritivas con amonio o nitrato como única fuente de nitrógeno, las plantas cultivadas con amonio presentaron concentraciones de fósforo en la raíz y la parte aérea más elevadas que aquellas cultivadas en nitrato (Tabla 2). Para estudiar la absorción de fósforo en las plantas provenientes de los dos tratamientos se utilizó el isótopo radiactivo ^{32}P .

Se cultivaron plantas de trigo en soluciones circulantes de nitrato y amonio durante dos semanas en la forma descrita en Materiales y Métodos (2.2.1). Posteriormente se midió la velocidad de absorción de fósforo radiactivo en soluciones completas de nitrato y amonio marcadas con ^{32}P . La velocidad de absorción del trazador radiactivo fue 100% mayor en las plantas cultivadas con amonio que en aquellas cultivadas con nitrato (Figura 7). El incremento de la concentración de fósforo radiactivo en la raíz fue lineal desde el primer momento, y hasta por lo menos dos horas después de iniciada la absorción (Figura 7a); sin embargo, en la parte aérea la radiactividad aumentó en forma exponencial (Figura 7b), y luego de dos horas todavía no había alcanzado el estado estacionario, que se caracteriza porque el transporte hacia la parte aérea se hace lineal.

Esta demora en alcanzar el estado estacionario se debió a que al comienzo de la absorción de fosfato marcado, la actividad específica del fosfato en la raíz fue aumentando en forma exponencial. Lo mismo ocurrió con el fosfato exportado a la parte aérea. El estado estacionario se alcanza cuando la actividad

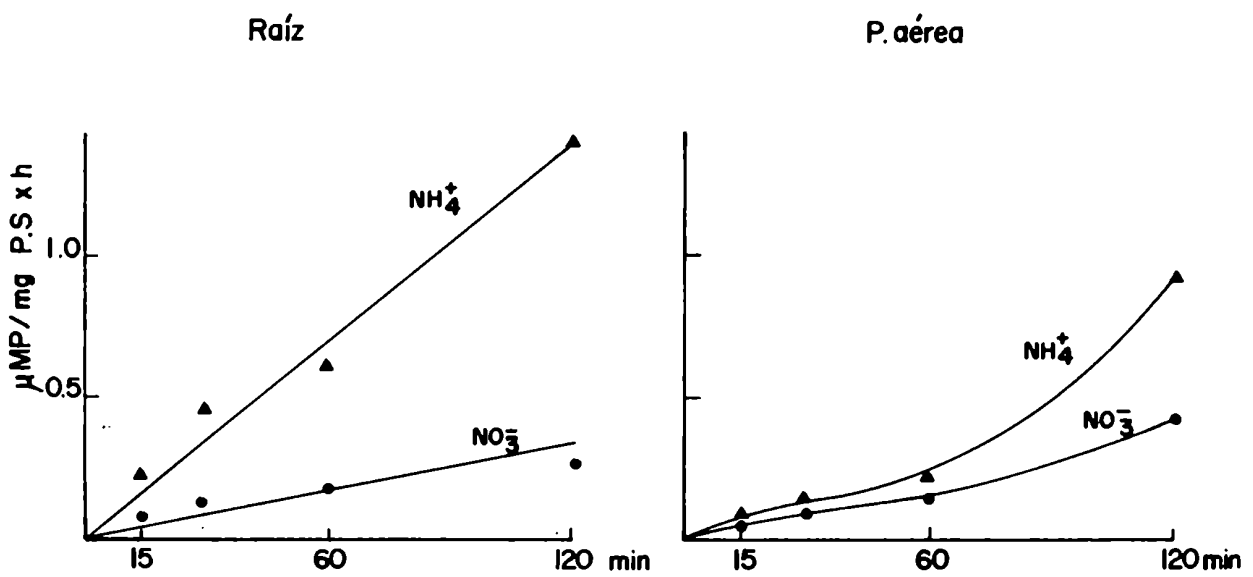


Figura 7: Efecto de la fuente nitrogenada sobre la absorción de ^{32}P por plantas de trigo. Cada punto es la media de 5 repeticiones.

específica dentro de la raíz es igual a la solución externa (Pitman y Cram, 1977).

Dado que las diferencias en la concentración y en la velocidad de absorción de fosfato radiactivo entre las plantas cultivadas con amonio o nitrato no pueden adjudicarse a diferencias en el peso seco, o en la tasa de crecimiento relativo, como sugieren Pitman y Cram (1977) para el ion potasio, puede suponerse que dichas diferencias se debieron a factores presentes en la solución de absorción, o a causas intrínsecas de la planta. Estas posibilidades se estudiaron en los experimentos que se describen a continuación.

3.3. Absorción de P por plantas cultivadas en nitrato y posteriormente transferidas en amonio.

La presencia de un ion en la solución de absorción puede disminuir, o acelerar, o no tener efecto alguno sobre la absorción de otro ion del mismo signo (Epstein, 1974). En el caso aquí estudiado, $-(\text{PO}_4\text{H}_2^- \text{ con } \text{NH}_4^+ \text{ o } \text{NO}_3^-)-$, podría ser factible que existiera competencia entre los iones PO_4H_2^- y NO_3^- , por ser ambos aniones monovalentes. De esta manera, el fosfato sería menos absorbido en presencia de nitrato que en presencia de amonio, que es un catión monovalente. Otra posibilidad es que las diferencias observadas se debieran a cambios de pH producidos en la rizosfera, como consecuencia de absorción de iones amonio o nitrato durante el período de absorción de ^{32}P . Estos cambios de pH tienen considerable importancia cuando las plantas son cultivadas en suelo ya que producen variaciones en la solubilidad de los fertilizantes fosfatados. En soluciones nutritivas el pH afecta la forma iónica del ion fosfatado (Hagen y Hopkin, 1955). Mientras que a pH ácido el fosfato se encuentra casi totalmente como ion diácido

PO_4H_2^- , a pH alcalino se encuentra como PO_4H^{2-} . De estas dos formas, las raíces absorben preferentemente la forma diácida. Sin embargo a pH muy ácido, el ion H^+ desplazaría al ion Ca^{++} de las membranas, produciendo una disminución en la absorción de iones (Riley y Barber, 1971). Según Hagen y Hopkin (1955) y Tseng y Lin (1974), el rango de pH más favorable para la absorción de fosfato en varias gramíneas sería de 5,0 a 6,0.

Para comprobar si algunos de estos factores pudo ser el causante de las diferencias observadas, se cultivaron plantas de trigo en soluciones completas de nitrato durante doce días, en la forma descrita en el capítulo Materiales y Métodos (2.2.1). Posteriormente, la mitad de las plantas se transfirió a soluciones que contenían amonio como fuente de nitrógeno, mientras que el resto permaneció en las soluciones de nitrato. Se midió la velocidad de absorción de fósforo radiactivo durante 30 minutos y a diferentes tiempos luego de la transferencia a soluciones de amonio (0, 2, 8, 14, 20 y 48 hs). La absorción de fósforo marcado se realizó en soluciones completas, con amonio o nitrato marcadas con ^{32}P (Figura 8)

En el tiempo 0 no se observaron diferencias en la velocidad de absorción del marcador entre las plantas tratadas con amonio y las que permanecieron en nitrato. Sin embargo, luego de tiempos más largos, aparecieron diferencias en la velocidad de absorción del radioisótopo, que llegaron a ser de 100% luego de 48 horas de tratamiento con amonio.

Estos resultados indican que las diferencias observadas en la velocidad de absorción de fosfato en plantas cultivadas en amonio o nitrato no se debieron a efectos antagónicos, o a variaciones de pH producidas por la presencia de estos iones en la solución de absorción, ya que a tiempo cero no hubo diferencias. Humble et al. (1969), en experimentos con soluciones nutritivas,

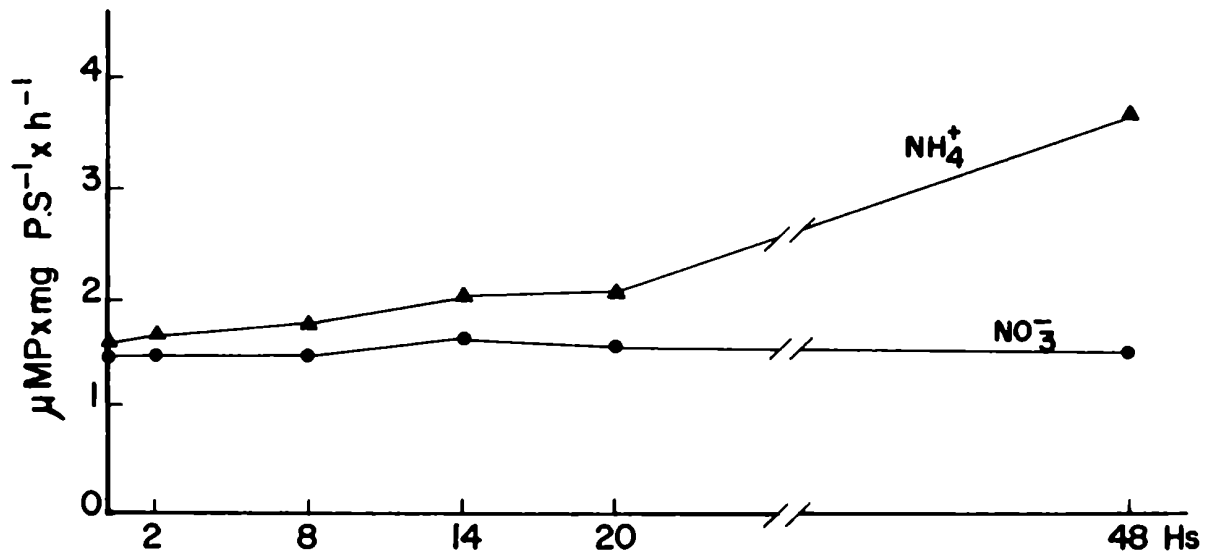


Figura 8: Variación de la velocidad de absorción de fosfato en plantas de trigo cultivadas durante doce días en nitrato, luego de ser transferidas a amonio. Cada punto es la media de tres repeticiones.

midieron los efectos del N sobre la absorción de P en raíces cortadas de Hordeum vulgare. Observaron que cuando medían la absorción de P durante 15 minutos, en presencia de amonio o nitrato, no había diferencias entre las dos fuentes. En cambio si la duración del tratamiento era de 24 horas, las plantas de amonio absorbían más que aquellas de nitrato. Estos resultados son similares a los aquí obtenidos. Las diferencias observadas deben atribuirse entonces a causas metabólicas, que requieren un cierto tiempo de pretratamiento con la fuente reducida de nitrógeno para manifestarse.

Estos resultados también descartan la posibilidad de que las diferencias observadas en la absorción de fosfato sean debidas a las diferencias morfológicas y anatómicas observadas en las raíces. Burley et al. (1970) hallaron que la absorción de fosfato por la raíz de maíz no se vio afectada por el grado de madurez de esta, aunque el transporte a la parte aérea había sido en la zona en que el metaxilema aún no se hallaba desarrollado. También Russell y Clarkson (1976) demostraron en Hordeum que el fosfato puede ser igualmente absorbido a lo largo de toda la raíz, inclusive en aquella zona en que las bandas de Caspari se encuentran suberificadas. Este comportamiento fue diferente al del Ca^{++} , que sólo se absorbió en la zona de la raíz que aún no estaba suberificada. En ese mismo trabajo, ellos observaron que la capacidad de la raíz para absorber fosfato estaba más directamente relacionada con el volumen radical que con su superficie total, o con su longitud total. En los experimentos realizados en el presente trabajo las raíces de amonio tuvieron siempre un peso menor o igual que aquellas crecidas en nitrato (Tabla 1). El volumen radical no fue medido,

pero se puede suponer que es directamente proporcional al peso seco. Por lo tanto, no es de esperar que las diferencias en la absorción de fosfato en las plantas cultivadas en ambas fuentes nitrogenadas se hayan debido a esas diferencias morfológicas. Además, este último experimento descarta esa posibilidad ya que, luego de 48 horas en amonio, las raíces no presentaron diferencias morfológicas o anatómicas detectables con respecto a aquellas que permanecieron en nitrato y, sin embargo, las diferencias en la velocidad de absorción de P se incrementaron, en las primeras, más del 100% con respecto a las segundas.

3.4. Efecto del pH sobre la absorción de fósforo en plantas pretratadas con amonio o nitrato.

Así como el pH de la solución nutritiva tiene efecto sobre el crecimiento de la raíz, es posible que los cambios en el pH de la rizosfera, debidos a la absorción de los iones NH_4^+ y NO_3^- , afecten de alguna manera a la raíz, induciendo de este modo los cambios en la velocidad de absorción de fosfato observados al tratar las plantas con las soluciones de amonio o nitrato. Para evaluar esta posibilidad, se cultivaron plantas de trigo durante 12 días en soluciones nutritivas con nitrato. Posteriormente estas plantas fueron separadas en cuatro lotes, cada uno de los cuales se mantuvo durante 48 hs. en una de las siguientes soluciones:

Sol. completa de nitrato, pH 5,7

Sol. completa de amonio, pH 5,7

Sol. completa de nitrato, pH 4,0

Sol. completa de amonio, pH 4,0

Posteriormente las plantas fueron transferidas a una solución de SO_4Ca 0,5 mM y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,4 mM, marcada con ^{32}P , pH 5,5, durante 30 min. Al ser estas soluciones de igual composición, se evitó que las diferencias observadas en la velocidad de absorción de fosfato puedan ser atribuidas a variaciones de pH producidas en el medio durante el período de absorción.

No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de fósforo absorbido por las plantas a las cuales se les suministró la misma fuente nitrogenada, con pH diferente (Figura 9). En cambio, las plantas tratadas durante 48 horas con amonio absorbieron más fósforo que aquellas tratadas con nitrato, a cualesquiera de los dos pH probados. Por lo tanto, se puede descartar que las diferencias en la velocidad de absorción de fosfato entre plantas cultivadas en amonio o nitrato puedan ser adjudicadas solamente a un efecto producido por la variación de pH en la solución de cultivo o en la solución de absorción. Cabe agregar que, al cabo de 48 hs. de tratamiento con las soluciones de cultivo arriba descritas, no se encontraron diferencias significativas entre los pesos secos de las raíces de las plantas de los cuatro tratamientos (Tabla 2).

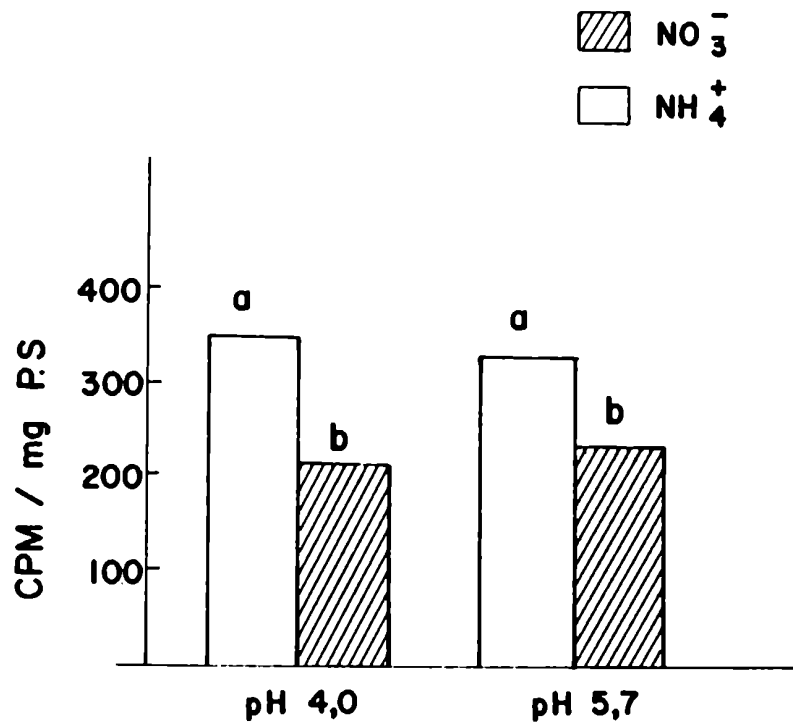


Figura 9: Efecto del pH durante el pretratamiento con diferentes fuentes nitrogenadas sobre la absorción de ³²P por plantas de trigo. Diferentes letras indican diferencias significativas (p 0,01).

3.5. Interacción fuente nitrogenada-concentración de nitrógeno.

Con el fin de dilucidar si el incremento en la velocidad de absorción de fosfato observado al tratar plantas de trigo con amonio, respecto de aquellas que permanecen en nitrato, es un efecto exclusivo del ion NH_4^+ , o si puede ser producido también por otra fuente reducida de nitrógeno, se utilizó urea (CON_2H_4), que se absorbe en forma molecular, no iónica y, por lo tanto, no induce el balanceo de cargas en la planta via la absorción o la eliminación de otro ion. La urea es transformada en NH_3 y CO_2 por medio de una ureasa, sin producir cambios en el pH de los tejidos radicales (Kirkby y Mengel, 1967).

Además se probó el efecto del amonio suministrado en diferentes concentraciones.

Para este experimento se cultivaron plantas de trigo en soluciones completas con nitrato durante doce días. Posteriormente se transfirieron a soluciones completas con las siguientes fuentes y concentraciones de nitrógeno:

Nitrato	1,0 mM
Amonio	10,0 mM
Amonio	1,0 mM
Amonio	0,1 mM
Amonio	0,05 mM
Urea	1,0 mM

Luego de 48 horas se midió la absorción de fosfato marcado durante 30 minutos, en soluciones que contenían sólo SO_4Ca 0,5 mM y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,4 mM marcado con ^{32}P .

Las plantas tratadas con las fuentes reducidas de nitrógeno absorbieron, en todos los casos, una mayor cantidad de fosfato marcado que aquellas tratadas con nitrato (Figura 10), exceptuando las que estuvieron en una concentración de amonio 10 mM, debido al efecto tóxico de la alta concentración de este ion (Maynard y Barker, 1969). Por otra parte, la absorción de P tampoco se vio significativamente incrementada en el tratamiento con 0,05 mM, respecto de las de nitrato.

La urea mostró un efecto similar al del amonio. Esto indicaría que las diferencias observadas sobre la absorción de fosfato no serían un efecto específico del ion amonio, como sugieren Leonce y Miller (1966), sino un efecto general de las fuentes reducidas de nitrógeno. Kirkby y Mengel (1967) encontraron que la concentración de fosfato en plantas de tomate cultivadas en urea fue similar a la de aquellas cultivadas en amonio, y superior a las cultivadas en nitrato.

3.6. Efecto de la azida de Na sobre la absorción de fósforo en plantas pretratadas con amonio o nitrato.

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que las diferencias en la absorción de fosfato entre plantas tratadas con diferentes fuentes de nitrógeno serían debidas a un efecto metabólico. Es interesante entonces ver qué ocurre con estas diferencias cuando la absorción se realiza en presencia de un inhibidor metabólico. Para ello se probó el efecto producido por la azida de Na, que es un inhibidor de la oxidasa terminal (Luttge y Laties, 1967).

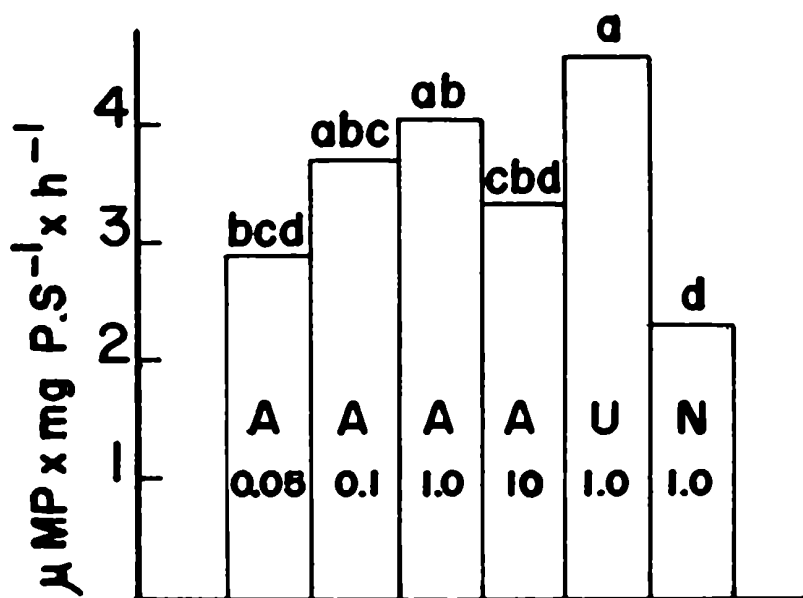


Figura 10: Efecto del pretratamiento con varias fuentes de nitrógeno, y varias concentraciones de amonio sobre la velocidad de absorción de fosfato por plantas de trigo. A = amonio, N = nitrato, U = urea. Las concentraciones se expresan en mM. Diferentes letras indican diferencias significativas (p 0,01).

Varios autores han demostrado que la azida de Na inhibe la entrada activa de iones (Jeanjean, 1976; Luttge y Laties, 1967). Spanswick (1973) y Slayman (1970) observaron que la azida de Na producía una depolarización de las células en Eloдея canadensis y en Neurospora crassa.

Se cultivaron plantas de trigo durante doce días en soluciones de nitrato y luego fueron divididas en cuatro lotes. Dos lotes se transfirieron a soluciones de amonio durante 48 hs., en tanto que los otros dos permanecieron en soluciones de nitrato. Posteriormente, un lote de cada tratamiento se transfirió a una solución de SO_4Ca 0,5 mM y PO_4H_2K 0,4 mM, y azida de Na 1 mM, donde permanecieron 15 minutos. Los otros dos lotes se pasaron a soluciones de igual composición, pero sin azida. Posteriormente los cuatro lotes se transfirieron a soluciones iguales a las anteriores, pero marcadas con ^{32}P , donde permanecieron durante 30 minutos.

La absorción de fosfato fue 90% mayor en las plantas pretratadas con amonio que en aquellas pretratadas con nitrato (Figura 11). En presencia del inhibidor, esta diferencia fue sólo del 35% a favor de las plantas provenientes de amonio. En estas últimas, la azida de Na redujo la absorción del fosfato en un 75%, en tanto que en las plantas pretratadas con nitrato esa reducción fue sólo del 65%.

El hecho de que las diferencias en la velocidad de absorción se vean reducidas de un 90% a sólo un 35%, en presencia de azida de Na, indicaría que el mecanismo causante de tales diferencias es sensible a este inhibidor y, por

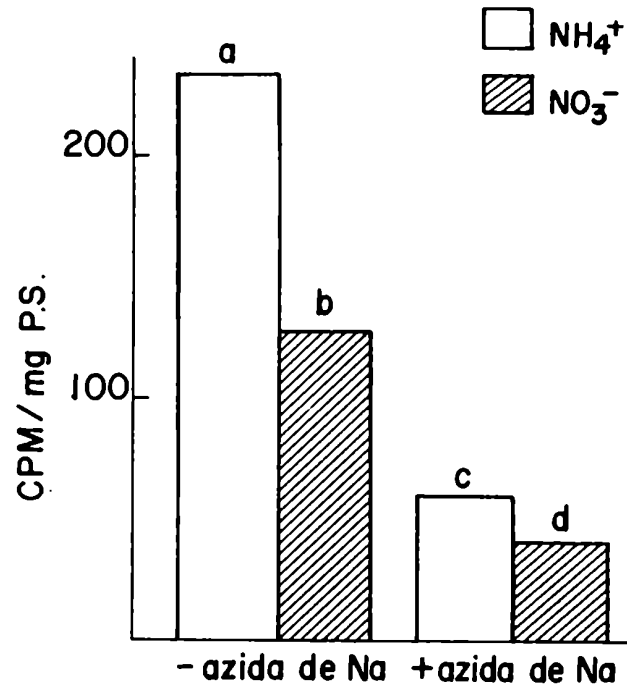


Figura 11: Efecto de la azida de Na sobre la absorción de ^{32}P por plantas de trigo pre-tratadas con amonio o nitrato. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

lo tanto, puede aceptarse que esas diferencias en la velocidad de absorción de fosfato entre las plantas provenientes de las diferentes fuentes nitrogenadas son debidas a un mecanismo principalmente activo, que recibe energía de la cadena respiratoria. Se sabe que en los vegetales superiores la absorción de iones no está directamente relacionada con el nivel de ATP (Lin y Hanson, 1974), sino más bien con el transporte de electrones.

En las plantas pretratadas con amonio, la absorción de fosfato en presencia de azida fue, de cualquier manera, algo mayor que en nitrato. Esta diferencia podría explicarse bien porque el tiempo empleado o la concentración de inhibidor usado no fueron suficientes para inhibir totalmente los componentes activos, o porque al componente activo se sumo un componente pasivo, que contribuyó a las diferencias observadas entre las dos fuentes nitrogenadas. Este componente podría estar representado por un mayor intercambio isotópico a través de la membrana plasmática entre el interior de la célula y la solución externa.

3.7. Partición de fosfato en la raíz.

Resulta de interés determinar qué ocurre dentro de la raíz con el exceso de fósforo absorbido por las plantas pretratadas con amonio. Para ello se cultivaron plantas en soluciones nutritivas de nitrato durante doce días, posteriormente fueron transferidas a soluciones de amonio, o nitrato, durante 48 hs. De este modo se obtuvo mayor uniformidad en el tamaño y forma de las raíces que

si se hubiesen utilizado plantas cultivadas durante dos semanas en las soluciones de nitrato, o amonio. Posteriormente, las plantas fueron marcadas en soluciones de SO_4Ca 0,5 mM y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,4 mM durante 30 minutos y se analizó la distribución de fósforo radiactivo en las diferentes fracciones fosforadas en la raíz (ver Materiales y Métodos 2.7.3). Las fracciones analizadas fueron: fosfato inorgánico, fósforo orgánico ácido soluble (nucleótidos y fósforo-azúcares), y fósforo orgánico ácido insoluble (ácidos nucleícos y fosfolípidos).

Las raíces de las plantas pretratadas con amonio absorbieron 100% más fósforo marcado que las de las plantas pretratadas con nitrato (Tabla 3a). La concentración del radioisótopo en las fracciones de fosfato inorgánico y fósforo orgánico ácido soluble, fue mayor en las raíces de las plantas de amonio que en las de nitrato, no siendo así en la fracción ácido insoluble, en la que no se observaron diferencias entre ambos tratamientos (Tabla 3a). Al analizar la distribución del fósforo marcado entre las diferentes fracciones, se encontró que la distribución entre las fracciones solubles fue similar en las raíces de ambos tratamientos (Tabla 3b), en tanto que en la fracción de fosfato orgánico soluble el contenido relativo de ^{32}P , con respecto al total absorbido por la raíz, fue menor en las plantas pretratadas con amonio que en las pretratadas con nitrato. Esto se explica porque la incorporación de fosfato marcado a las fracciones solubles es mucho mayor en las plantas de amonio que en las de nitrato. No así en la fracción insoluble, puesto que la incorporación es igual en ambos tratamientos. Por lo tanto, la concentración relativa de ^{32}P en esa fracción disminuye en amonio con respecto a nitrato.

Tabla 3: a) ^{32}P incorporado a las diferentes fracciones fosforadas de raíces de trigo pretratadas con amonio o nitrato, luego de 60' de absorción (CPM/mg). Promedios de cuatro repeticiones. Letras diferentes en cada columna significa diferencias significativas (P 0,0).

	P inorgánico	P orgánico soluble	P insoluble	P total
NH_4^+	0,71 a	1,13 a	0,19a	2,03 a
NO_3^-	0,38 b	0,57 b	0,16a	1,11 b
^{32}P absorbido en NH_4^+	1,87	1,98	1,18	1,82
^{32}P absorbido en NO_3^-				

b) distribución relativa del ^{32}P absorbido, en las diferentes fracciones fosforadas.

	P inorgánico	P orgánico soluble	P insoluble
NH_4^+	34% a	55,7% a	9,2% a
NO_3^-	34% a	51% a	14,2% b

Roux y Lesaint (1962) hallaron que plantas de tomate crecidas en amonio incorporaban más fósforo radiactivo en todas las fracciones con respecto a aquellas crecidas en nitrato. La fracción menos enriquecida fue la de los ácidos nucleicos, en tanto que la más enriquecida fue la de fosfato inorgánico. Lo primero está de acuerdo con lo observado en este experimento, en la fracción ácido insoluble. En la fracción soluble, a diferencia de lo encontrado por Roux y Lesaint, se enriquecieron en forma similar las fracciones inorgánica y orgánica soluble (Tabla 3a). Según Loughman et al. (1957) la distribución del fosfato en las fracciones inorgánica y orgánica depende de la concentración externa de fosfato, enriqueciéndose la primera cuando es alta la concentración externa de P; por lo tanto, es explicable la discrepancia entre estos resultados y los de Roux y Lesaint.

El hecho de que el exceso de fosfato absorbido no se incorpore a la fracción de ácidos nucleicos y fosfolípidos concuerda con el hecho de que no se observa mayor crecimiento en estas plantas. Si el fósforo absorbido en exceso permanece soluble, puede ser acumulado en la vacuola o transportado a la parte aérea. El destino de este fósforo será estudiado en los siguientes experimentos.

3.8. Marcación con pulso de ^{32}P .

Para aclarar qué ocurre con el fósforo marcado luego de su absorción, se realizó un experimento de marcación por pulso.

Se cultivaron plantas de trigo en soluciones de nitrato durante doce días; posteriormente se transfirieron por 48 horas a soluciones de amonio o nitrato. Luego las plantas absorbieron fósforo marcado durante 60 minutos, de una solución de SO_4Ca 0,5 mM y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,4 mM, con ^{32}P . Luego, las plantas se lavaron con agua destilada y se pasaron a soluciones de la misma composición, carentes del trazador radiactivo. Las plantas se cosecharon a diferentes tiempos, y se determinó el contenido de fósforo marcado en la raíz y en la parte aérea. Se consideró tiempo cero el momento en que las plantas se sacaron de la solución de marcación.

En la Figura 12 puede verse que, luego de una hora de marcación, las raíces de las plantas pretratadas con amonio tenían una concentración de fósforo marcado 40% mayor que las pretratadas con nitrato. El contenido del trazador radiactivo en las raíces disminuyó con el tiempo, pero esta disminución fue más rápida en las raíces de las plantas provenientes de amonio, que en las de nitrato. Al cabo de cuatro horas, las diferencias en el contenido de ^{32}P en plantas de ambos tratamientos desaparecieron. A su vez, el contenido de marcador en la parte aérea se incrementó con el tiempo (Figura 12b).

Este resultado indicaría que en las plantas pretratadas con amonio hubo

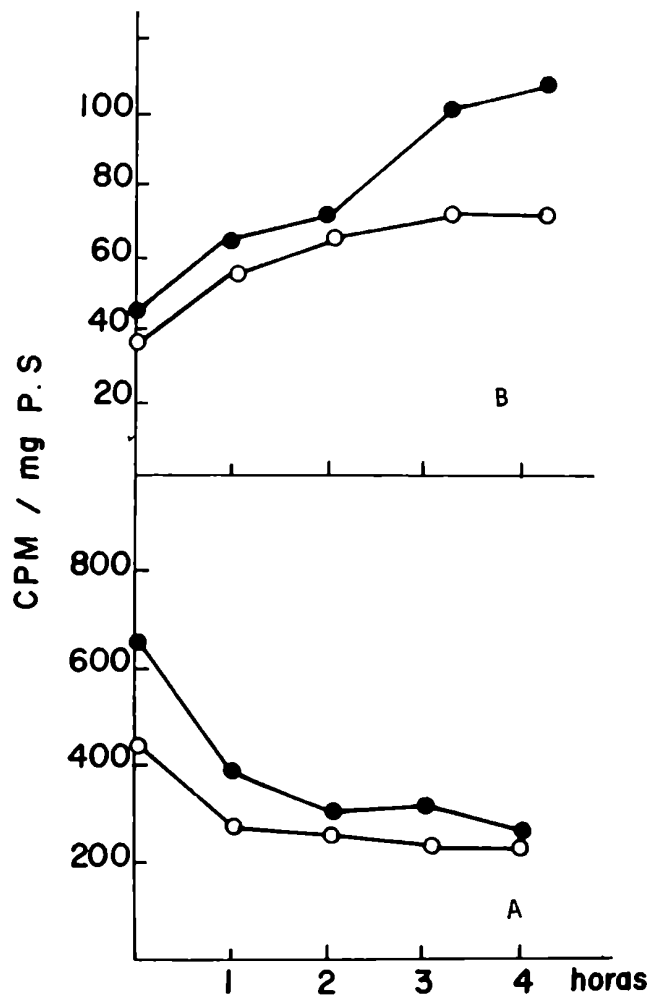


Figura 12: Transporte de ^{32}P a la parte aérea, en plantas de trigo cultivadas en amonio o nitrato, luego de ser marcadas durante 1 h con ^{32}P . A = raíz. B= parte aérea. Cada punto es la media de cinco repeticiones.
 . NH_4^+ ó NO_3^-

un mayor transporte de fósforo a la parte aérea. Para interpretar este resultado debe tenerse en cuenta que en este experimento el transporte de fósforo radiactivo no se encontraba en el estado estacionario, y además parte del fósforo marcado es transportado a la parte aérea, pero parte se intercambia con el fósforo que se encuentra en la vacuola; por lo tanto fue interesante ver qué ocurría cuando la marcación se producía durante tiempos significativamente prolongados para alcanzar el estado estacionario.

3.9. Absorción de fósforo marcado durante tiempos prolongados

Para confirmar el resultado del experimento anterior, se realizó un experimento en el que plantas de trigo cultivadas durante diez días en soluciones de nitrato fueron transferidas a soluciones completas de amonio o nitrato marcadas con ^{32}P , durante cinco días. Las soluciones se suministraron en la forma descrita en el capítulo de Materiales y Métodos (2.3.2).

Al cabo de cinco días de absorción, las plantas tratadas con amonio presentaron un contenido de fósforo marcado 73% mayor que las plantas tratadas con nitrato (Figura 13). Sin embargo, la concentración de fósforo marcado en las raíces fue solamente 12% mayor en las de amonio que en las de nitrato, en tanto que las diferencias en la parte aérea alcanzaron un 100%. Es decir que casi todo el fósforo absorbido en exceso por las plantas tratadas con amonio fue transportado a la parte aérea. En estas plantas, el 74% de todo el fósforo radiactivo absorbido se encontró en la parte aérea, en tanto que en las plantas de

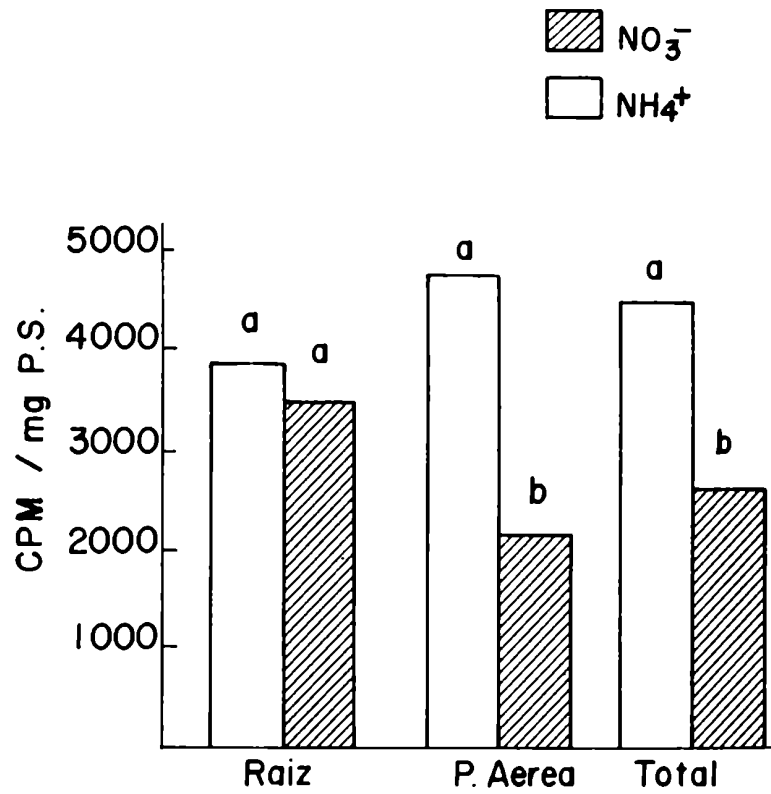


Figura 13: Distribución de fósforo marcado entre la raíz y la parte aérea en plantas de trigo pretratadas con amonio o nitrato, luego de cinco días de absorción. Pares de barras con diferentes letras indican diferencias significativas (p 0,01)

nitrate sólo fue transportado 54,4% del total absorbido durante los cinco días. Esto confirma que en presencia de amonio hay un mayor transporte de fósforo a la parte aérea. Estos resultados están de acuerdo con los de Leonce y Miller (1966), en maíz. Estos autores postularon que el amonio actuaría afectando específicamente el transporte de fósforo hacia el xilema. Considerando estos resultados y los del experimento de partición de fósforo podría suponerse que el exceso de fósforo al no ser incorporado a la fracción insoluble puede ser fácilmente transportado a la parte aérea. El fosfato es transportado, vía xilema, en un 90% como fosfato inorgánico (Loughman et al., 1957).

Con los resultados hasta ahora obtenidos se hace difícil interpretar las causas de las diferencias en el transporte de fósforo a la parte aérea encontradas en las plantas de los dos tratamientos. El transporte de iones a través de la corteza de la raíz hacia el xilema es un fenómeno que es aún poco conocido. Excepto el Ca^{++} , que sólo se transporta vía apoplasto (Clarkson y Russell, 1976), los demás iones pueden ser transportados vía simplasto o apoplasto, aunque no se sabe en qué proporción por cada vía. Tampoco se conoce el mecanismo por el que se realiza este transporte. Tyree (1970), en un estudio teórico del transporte de iones vía simplasto concluye que el flujo citoplasmático y la difusión podrían transportar una cantidad suficiente de iones para satisfacer los flujos medidos en el xilema. La mayoría de los estudios sobre el transporte de iones hacia el xilema han sido realizados con K^+ , Rb^+ , Na^+ o Cl^- (Pitman, 1970;

Bowling y Weatherby, 1964; Ginsburg y Ginsburg, 1970; Läuchli et al., 1971; Pitman, 1972; Schaefer et al., 1975) y es inexplicablemente muy poco lo que se ha hecho con PO_4H_2 (Clarkson, 1974).

Los iones serían transportados vía simplasto hasta las células del parénquima xilemático, donde serían excretados al xilema. Esta excreción es sensible a inhibidores metabólicos, inhibidores de la síntesis de proteínas y a ciertas hormonas, como el ácido abscísico (Pitman, 1975; Läuchli, 1976). De qué manera este transporte y posterior excreción al xilema pueden ser afectados por la fuente nitrogenada es algo que aún no está claro, y será discutido más profundamente en los capítulos 5 y 6.

4. ESTUDIOS CINÉTICOS

4.1. Cinética de absorción de fosfato en plantas pretratadas con amonio o nitrato.

Los resultados obtenidos hasta ahora sobre las diferencias en la absorción de fósforo en plantas cultivadas en diferentes fuentes nitrogenadas no son suficientes para aclarar los mecanismos que provocan esas diferencias. Con el objeto de comprender mejor estos mecanismos, se encaró un estudio de la cinética de absorción de fósforo en plantas de trigo, y los efectos que sobre ella tienen el amonio y el nitrato.

En este tipo de estudios, para obtener resultados reales y no artificios de técnica, es necesario que las plantas tengan inicialmente un bajo contenido interno de sales dado que, cuando se mide la absorción en concentraciones bajas, se produce un eflujo de iones desde el interior de la raíz que altera

los resultados (Higinbotham, 1973). Por ello, para este tipo de experimentos se cambió el sistema de cultivo de plantas. Estas fueron cultivadas en agua destilada durante doce días, y luego pretratadas, durante 48 hs., con soluciones que contenían solamente amonio o nitrato (ver capítulo de Materiales y Métodos, 2.2.2.b). De este modo se consiguió que las plantas tuvieran una concentración interna de fósforo muy baja. Posteriormente se midió la absorción de fósforo radiactivo en soluciones que contenían solamente SO_4Ca 0,5 mM y diferentes concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ marcado con ^{32}P (ver Materiales y Métodos, 2.3.3). Se probó la absorción de fosfato en estas condiciones, y durante el tiempo por utilizar en los experimentos (4 horas), y resultó ser lineal (Figura 14), por lo tanto fue posible aplicar posteriormente la cinética enzimática de Michaelis-Menten.

En una etapa preliminar, se determinó la cinética de absorción de fosfato en plantas de trigo cultivadas durante dos semanas en agua destilada, en un muy amplio rango de concentraciones de fosfato (entre 0,001 mM y 100 mM).

La velocidad de absorción de fosfato en función de su concentración mostró ser una curva trifásica, con dos fases hiperbólicas y una tercera lineal (Figura 15). La primera fase hiperbólica abarcó el rango de concentraciones

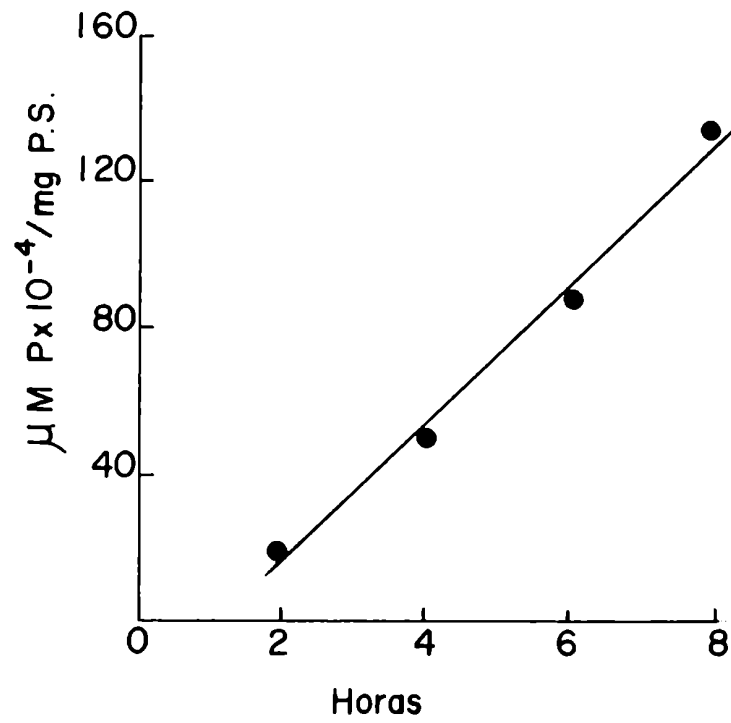


Figura 14: Absorción de ^{32}P a lo largo del tiempo por plantas de trigo cultivadas en agua destilada durante diez días. Cada punto es la media de tres repeticiones.

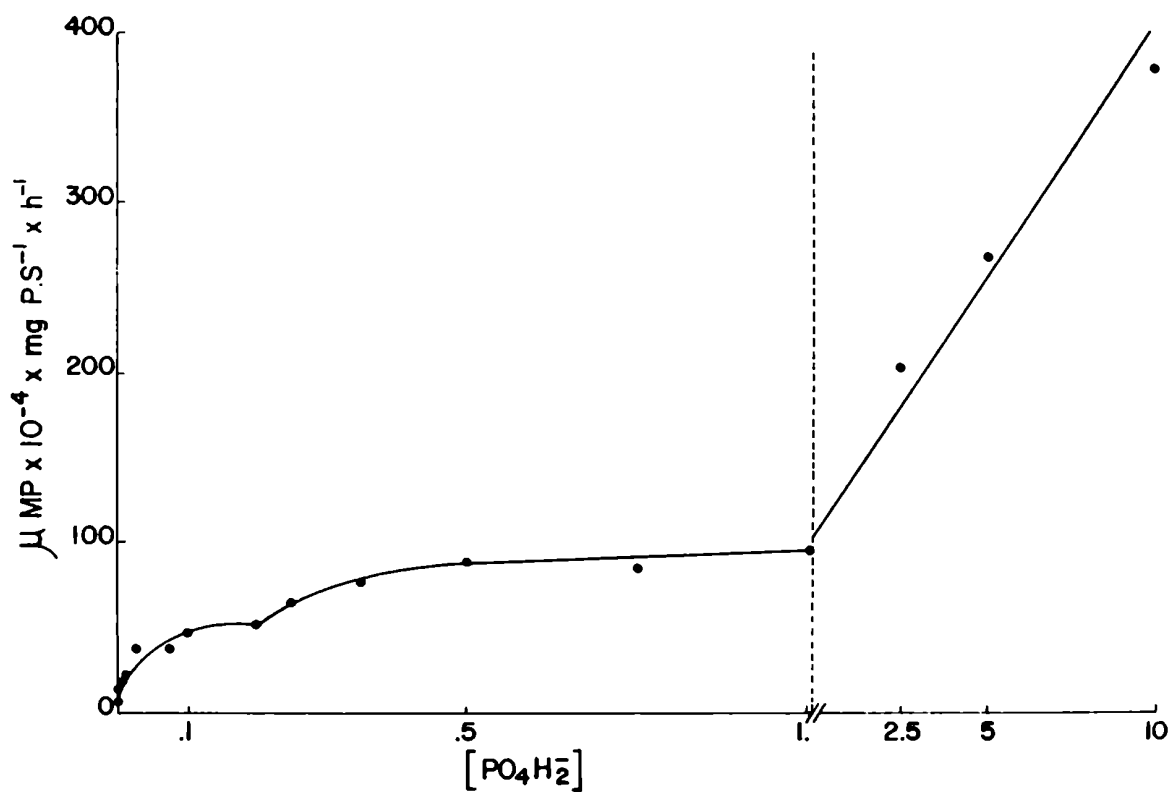


Figura 15: Velocidad de absorción de fosfato por plantas de trigo, a varias concentraciones de fosfato. Cada punto es el promedio de tres repeticiones.

de fosfato entre 0,001 mM y aproximadamente 0,2 mM. La segunda fase hiperbólica, el rango entre 0,2 mM y 1,0 mM. La tercera fase, lineal, se extendió desde 1,0 mM, y hasta por lo menos 100 mM, sin perder su linealidad. Esta curva trifásica fue similar a la ya descrita por Edwards (1970).

Aún no está claro el significado de esta curva polifásica. Edwards postuló que las dos primeras fases hiperbólicas correspondían al rango de concentraciones donde la absorción es activa, en tanto que la fase lineal correspondía al rango de concentraciones donde la absorción es pasiva, por difusión simple. La curva bifásica para la cinética de absorción de iones ha sido descrita en numerosas oportunidades. Fue descrita por primera vez por Epstein et al. (1963) para la absorción de potasio en raíces escindidas de cebada. Postularon la existencia de dos mecanismos de absorción que actuarían en diferentes rangos de concentración del ión. Posteriormente este mecanismo dual fue descrito para el resto de los nutrientes minerales. Sin embargo, Nissen (1974, 1980) postula que, en realidad, las curvas de absorción de iones no serían bifásicas sino polifásicas, y distingue hasta 8 fases para la absorción de sulfato por plantas de tomate.

Si bien la mayoría de los nutricionistas actuales acepta la existencia de dos "mecanismos" de absorción, correspondiendo cada uno a una de las dos fases de las curvas de cinética, nada se sabe en realidad del significado físico de esos mecanismos. Están en este momento en pugna los partidarios de la teoría de los mecanismos "en paralelo" con los que sugieren que los mecanismos actuarían "en serie". Ambas teorías coinciden en ubicar al mecanismo de bajas

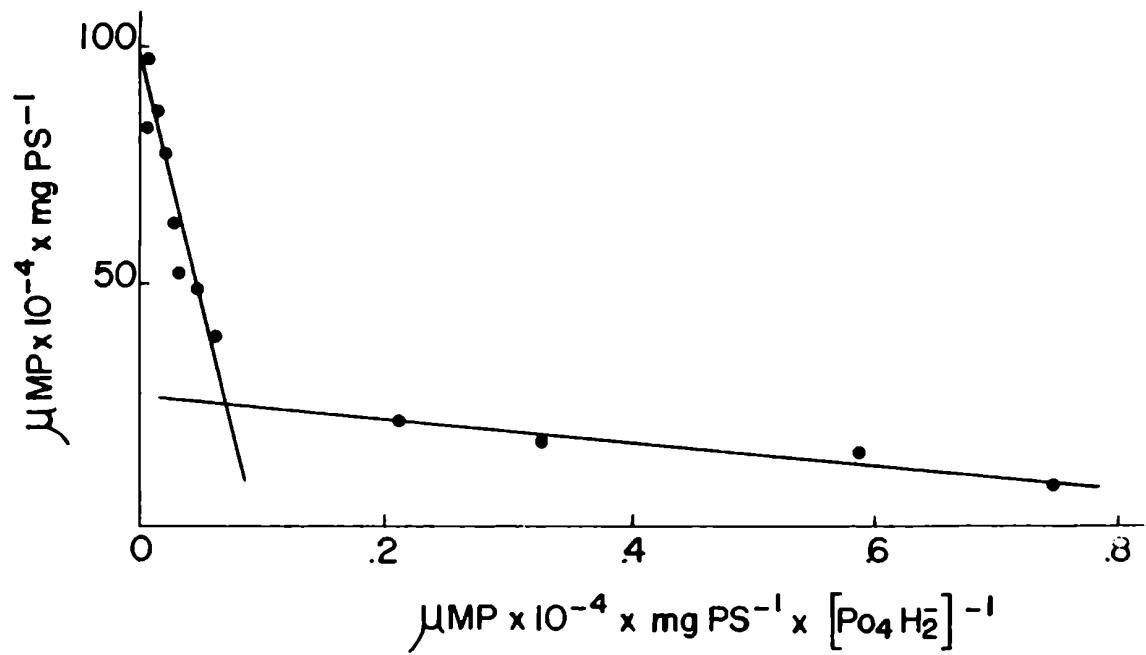


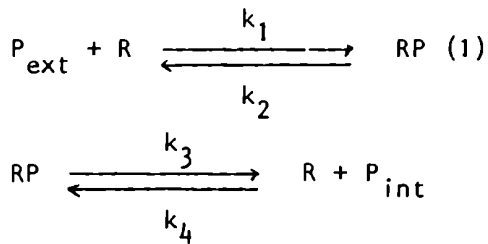
Figura 16: Representación de Hofstee de la velocidad de absorción de fosfato por plantas de trigo. Cada punto es la media de tres repeticiones.

concentraciones en la plasmalemma. Según Epstein (1972) el mecanismo 2 también se ubicaría en la plasmalemma, el cual sería poco efectivo en la absorción de iones cuando estos se encuentran en bajas concentraciones, pero empezaría a actuar al saturarse el mecanismo 1 y en condiciones de alta concentración, la absorción sería la suma del aporte de ambos mecanismos. Por otro lado, Laties (1969) postula que el mecanismo 2 se encontraría ubicado en el tonoplasto, y que en concentraciones bajas de sustrato actuaría el mecanismo 1, absorbiendo iones a través de la plasmalemma, pero en concentraciones más altas esta entrada sería pasiva y actuaría el mecanismo 2 para acumular iones en la vacuola.

En el presente experimento, cuando se representó la velocidad de absorción de fosfato en el rango de concentraciones entre 0,001 mM y 1,0 mM en función de v/P (esto es, velocidad sobre concentración de fosfato), se obtuvieron dos rectas, correspondiendo cada una de ellas a una de las dos fases hiperbólicas (Figura 16). En este tipo de representación, utilizada para calcular constantes cinéticas de reacciones enzimáticas, la pendiente de la recta representa $-K_m$, y su intersección con el eje de la ordenada, la velocidad máxima (Hofstee, 1953).

El K_m representa la concentración de sustrato en la cual la velocidad de la reacción alcanza 1/2 de su velocidad máxima y da una idea de la afinidad de la enzima por el sustrato.

Si se considera que la absorción de fosfato por la raíz es mediada por un transportador o "carrier", de modo que:



siendo P_{ext} el fósforo en la solución de absorción; R el intermediario o "carrier", que con el fósforo forma el complejo RP, cuya disociación es el paso limitante de la velocidad de reacción, siendo la reacción (2) esencialmente irreversible; P_{int} el fósforo en el interior de la célula radical, y k_1 , k_2 , k_3 y k_4 las velocidades de cada uno de los pasos de la reacción, podemos asemejar esta reacción a una reacción enzimática y estudiarla en la misma forma en que se estudian ese tipo de reacciones (Hagen y Hopkins, 1955).

Por lo tanto, mediante el cálculo de las pendientes de las dos rectas de la Figura 16 (ver Materiales y Métodos, 2.8), se determinó un K_m del orden de 10^{-6} M para el rango de baja concentración de fosfato, y un K_m del orden de 10^{-4} para la fase o "mecanismo" de alta concentración.

Para estudiar el efecto de las fuentes de nitrógeno sobre los parámetros K_m y V_{max} , se eligió utilizar solamente el rango de concentraciones dentro de los cuales la absorción es activa, esto es, hasta 1,0 mM. Plantas de trigo cultivadas durante doce días en agua destilada se pretrataron, durante 48 hs., en soluciones de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ 0,5 mM, ó SO_4Ca 0,5 mM y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,5 mM. Otro lote de igual número de plantas permaneció en agua destilada durante el pretratamiento,

como control. Posteriormente las plantas fueron transferidas a soluciones de absorción, con diferentes concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ marcadas por ^{32}P (ver Materiales y Métodos 2.3.3.), donde permanecieron 4 horas, y se determinó el fósforo marcado absorbido.

Se obtuvo una curva bifásica para cada uno de los tratamientos nitrogenados y para el control (Figura 17). Si la concentración de fosfato se representa en forma logarítmica, estas curvas se rectifican (Figura 18) y se puede determinar con exactitud el punto de inflexión entre las curvas (Tabla 4). De las representaciones de Hoffstee (Figura 19) se calcularon las constantes cinéticas para cada tratamiento (Tabla 4). Los K_m fueron similares en cada una de las dos fases para los tres tratamientos. Si bien presentan pequeñas diferencias entre sí, estas diferencias no son estadísticamente significativas. Estos K_m son ligeramente inferiores a los determinados por Edwards (1970) para trigo, quien ha determinado un K_m de $7,4 \times 10^{-6}$ M para la fase de baja concentración, y $2,0 \times 10^{-4}$ para la fase de alta concentración.

Si bien no se encontraron diferencias entre los K_m de las plantas de los distintos tratamientos, sí se encontraron diferencias en la velocidad máxima. Fueron mayores las velocidades máximas en las plantas pretratadas con nitrógeno que en aquellas que permanecieron en agua destilada (Tabla 4) y, entre las primeras, la velocidad máxima para amonio fue mayor que para nitrato, en las dos fases.

Aplicando la cinética de Michaelis-Menten a la absorción de fosfato,

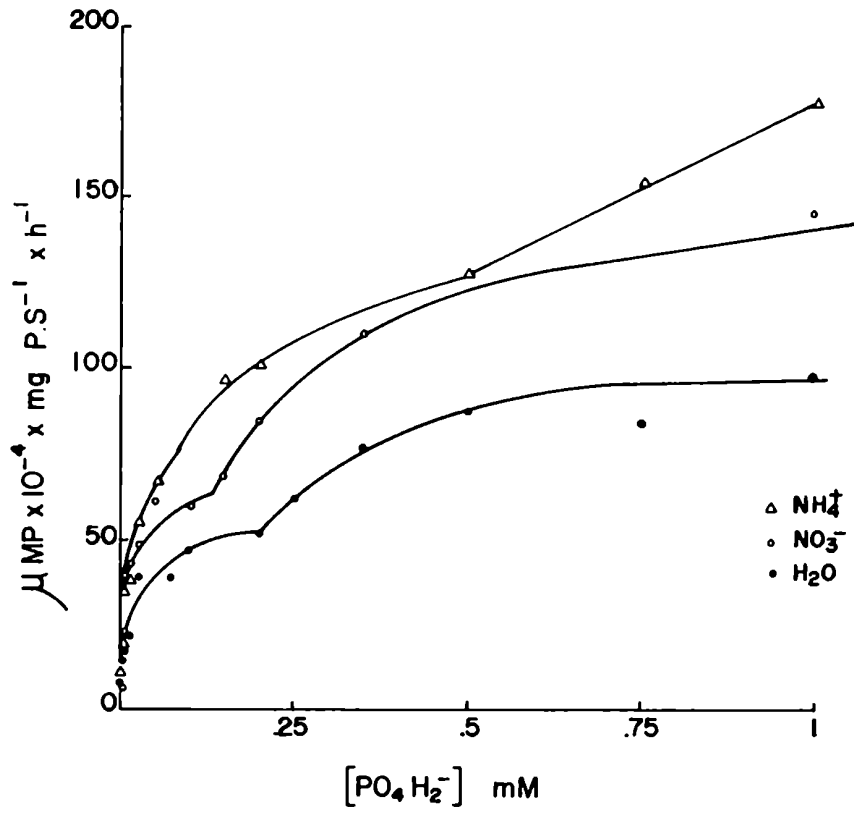


Figura 17: Velocidad de absorción de fosfato por plantas de trigo tratadas con amonio, nitrato o agua, a diferentes concentraciones de fosfato. Cada punto es la media de tres repeticiones.

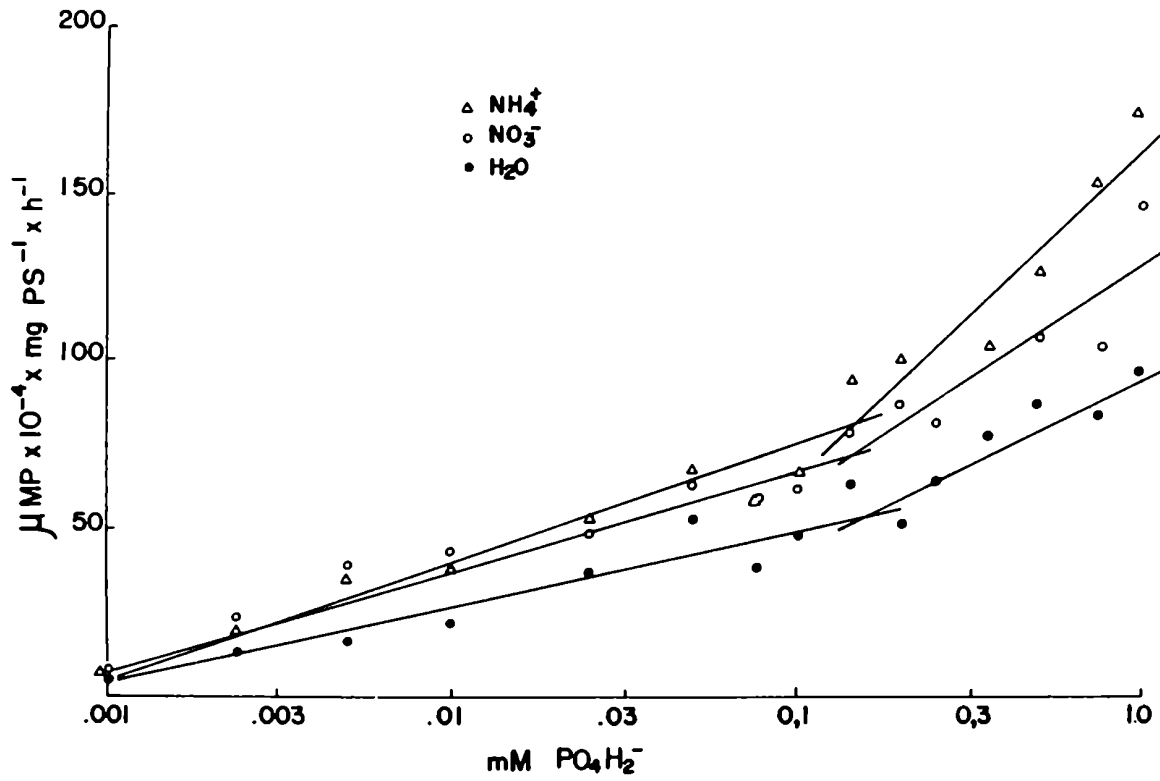


Figura 18: Velocidad de absorción de fosfato por plantas de trigo tratadas con amonio, nitrato o agua, a diferentes concentraciones de fosfato. Cada punto es la media de tres repeticiones.

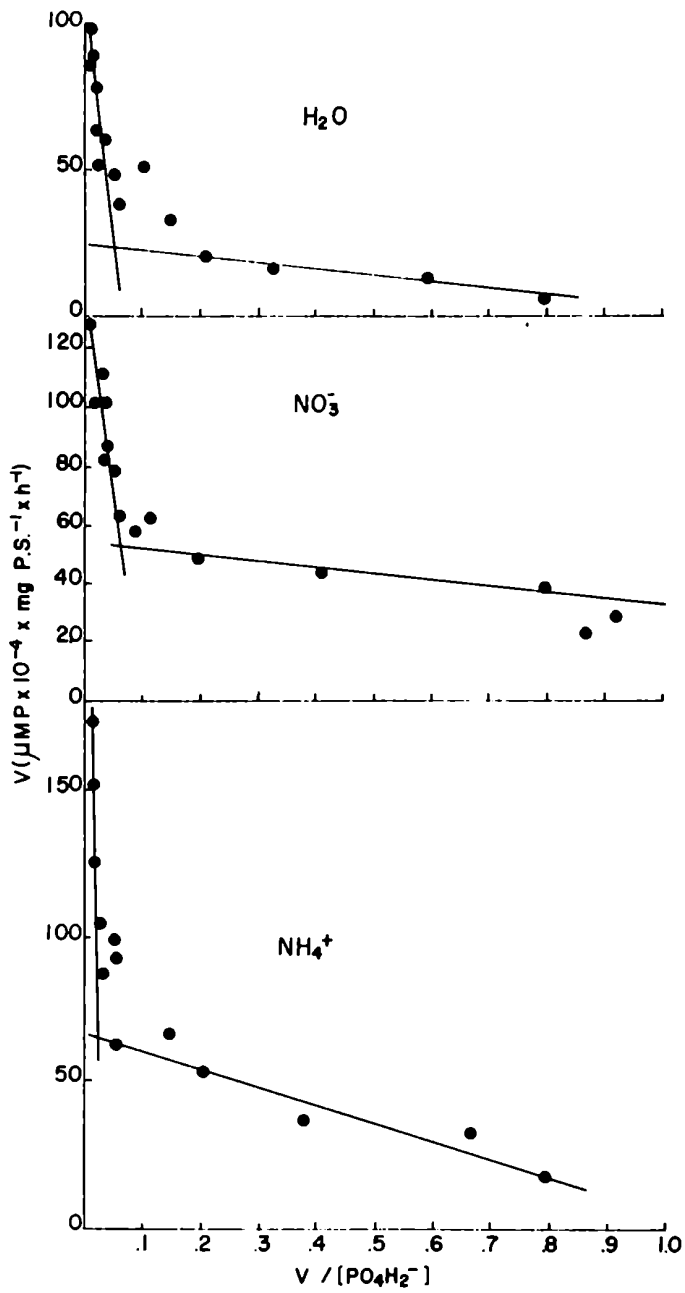


Figura 19: Representación de Hofstee de la velocidad de absorción de fosfato por plantas de trigo cultivadas en amonio, nitrato o agua. Cada punto es la media de tres repeticiones.

CINETICA DE ABSORCION DEL P CON H_2O , NO_3^- Y NH_4^+

	Km bajo	Vmax bajo [*]	cambio de fase	Km alto	Vmax alto [*]
H_2O	$5,7 \times 10^{-6} M$	$45,97 \times 10^{-4}$	0,138 mM	$1,15 \times 10^{-4} M$	$99,9 \times 10^{-4}$
NO_3^-	$4,5 \times 10^{-6} M$	$62,8 \times 10^{-4}$	0,093 mM	$1,22 \times 10^{-4} M$	$138,8 \times 10^{-4}$
NH_4^+	$6,1 \times 10^{-6}$	$70,9 \times 10^{-4}$	0,069 mM	$1,50 \times 10^{-4} M$	$172,0 \times 10^{-4}$

* $\mu MP \times mg P.S.^{-1} \times 4 h^{-1}$.

Tabla 4: Constantes cinéticas para la absorción de fosfato por plantas de trigo deficientes en fosfato pretratadas durante 48hs. con NO_3^- 1 mM, NH_4^+ 1 mM o H_2O . Promedios de tres repeticiones.

la velocidad de absorción será:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{P}} \quad (3)$$

siendo K_m la constante de disociación del complejo intermediario RP (ver ecuaciones 1 y 2), que puede ser escrita como

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_4} \quad (4)$$

Si suponemos que cuando la velocidad de absorción es máxima, todo el carrier se encuentra formando el complejo RP, entonces

$$V_{max} = k_3 \times R \quad (5)$$

donde R es la concentración total del "carrier".

De estas ecuaciones se deduce que, de haber un incremento en la V_{max} y el K_m permanece constante, entonces ese incremento sólo puede explicarse por un aumento de la concentración del carrier en la membrana plasmática. Si el K_m se viera modificado, entonces existiría algún otro factor que estaría alterando la cinética.

Los resultados obtenidos en este experimento sugieren que las diferencias observadas en la velocidad de absorción de fosfato, entre los tratamientos de nitrógeno, serían debidas a un incremento en la concentración del carrier en la membrana plasmática de las células radicales de las plantas pretratadas con amonio, con respecto a aquellas pretratadas con nitrato.

Suvramonia Iyer et al. (1974, 1977), trabajando en cinética de absorción de fosfato en plantas de maíz pretratadas con amonio o nitrato, encontraron que en concentraciones crecientes de nitrato el K_m no varía en el rango de baja concentración, y en el de alta concentración disminuye. Con concentraciones crecientes de amonio encontraron que el K_m aumenta en los dos mecanismos. Pero hay que tener en cuenta que estos investigadores trabajaron en un rango muy alto de concentraciones de P, entre 0,05 mM y 100 mM, tomando sólo ocho concentraciones de fosfato en todo el rango. Por eso, lo que ellos llaman "mecanismo 1" es la superposición de dos fases descritas en el experimento anterior, en tanto lo que ellos llaman "mecanismo 2", entre 1 y 100 mM de fosfato, es la fase lineal de absorción pasiva, que no puede ser estudiada con la cinética Michaeliana. Por lo tanto, esos resultados no pueden ser tenidos muy en cuenta.

Con el tiempo de absorción empleado en este experimento no se logró el estado estacionario en las concentraciones más bajas de fosfato; por lo cual no fue posible hacer estudios cinéticos. Sin embargo, y teniendo en cuenta la dificultad que existe para interpretar experimentos de transporte en tiempos cortos de absorción, puede verse en la Figura 20 que el transporte a la parte aérea siguió un patrón relativamente distinto al de la absorción. Si bien la dispersión de los datos es mayor que para la absorción, aquí no se distinguen varias fases, como ocurría en la cinética de absorción, sino que las curvas de transporte presentan una fase lineal que posteriormente alcanza un nivel de saturación en las plantas pretratadas con H_2O o con nitrato. En las plantas

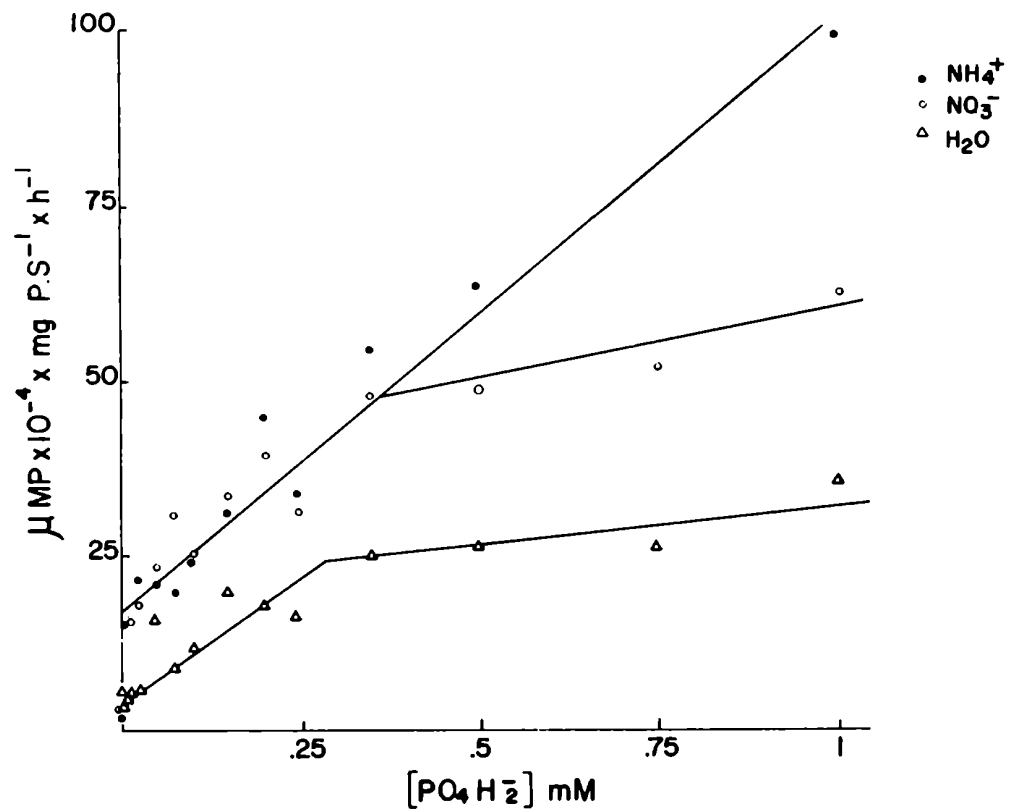


Figura 20: Velocidad de transporte de fosfato a la parte aérea en plantas de trigo pretratadas con amonio, nitrato o agua. Cada punto es la media de tres repeticiones.

pretratadas con amonio, por lo menos en las concentraciones aquí empleadas, no se alcanza dicho nivel de saturación. Esto puede interpretarse como una mayor capacidad para transportar fosfato a la parte aérea.

La curva de transporte a la parte aérea como una sola fase, a diferencia de la bifásica de absorción, también fue descrita para fosfato, en trigo, por Edwards (1970) quien, a concentraciones más altas de P, encontró que la absorción era lineal.

Lüttge y Laties (1966) también observaron que, si bien la absorción de Cl^- por plántulas de maíz seguía una isoterma bifásica, el transporte a la parte aérea era lineal.

Una explicación para esta diferencia entre las curvas de absorción y de transporte residiría para esos autores, en que los mecanismos de absorción 1 y 2 se encontrarían en serie; el primero en la plasmalemma, y el segundo en el tonoplasto. De este modo, el fósforo transportado hacia el xilema a través de la corteza de la raíz sólo debería atravesar la plasmalemma y no el tonoplasto; por lo tanto la curva de transporte sería monofásica. Este punto de vista se refuerza por el hecho de que células no vacuoladas presentan también sólo una fase de absorción de iones correspondiente al mecanismo 1 (Torii y Laties, 1966). Estas teorías, sin embargo, presuponen que la única barrera para el transporte hacia la parte aérea sería la plasmalemma, y que luego el transporte hacia el xilema y su posterior excreción serían procesos pasivos, de acuerdo con lo formulado por Crafts y Broyer (1938). Sin embargo, en este momento son muchas las

evidencias de que el transporte de iones vía simplasto, y su posterior excreción al xilema, sería un proceso que requiere gasto de energía. Lauchli y Epstein (1971 a y 1971 b) concluyeron que el transporte de cloro a través de la raíz de maíz vía simplasto dependería del ATP como fuente de energía, y que existiría una bomba en el plasmalemma que excretaría activamente los iones al xilema. Ginsburg y Ginsburg (1970) sugirieron que sólo los aniones serían transportados activamente, y que este transporte estaría acoplado más bien a los sistemas de transportes de electrones que al consumo de ATP. Además, el transporte de iones vía simplasto es inhibido por una serie de inhibidores metabólicos y de la síntesis de proteínas (Pitman, 1975).

Por todo esto es lícito pensar que, en realidad, existe una regulación metabólica del transporte de iones hacia el xilema y, por los resultados aquí obtenidos, esta regulación sería independiente de la regulación de la absorción.

4.2. Cinética de absorción de fosfato en plantas con niveles normales de fósforo.

En el experimento anterior se utilizaron plantas cultivadas en ausencia de fosfato. Si bien este procedimiento es el correcto para hacer una cinética de absorción de iones con el fin de estudiar comparativamente la absorción de fosfato por plantas cultivadas en amonio o nitrato -lo que se está llevando a cabo-, presenta el inconveniente de que esas plantas son fisiológicamente diferentes de aquellas utilizadas en experimentos anteriores. La eliminación de iones esenciales del medio de cultivo, como el sulfato o el fosfato, produce un incremento en la velocidad de absorción de estos iones en bacterias, levaduras y plantas superiores (Jeanjean, 1973).

Hay numerosas evidencias de que la tasa de absorción de fósforo depende de la demanda de ese elemento creada por el crecimiento. En plantas deficientes, antes del punto en que la salud de la planta decline irreversiblemente, la demanda de fosfato es muy alta, y diferentes experimentos han mostrado que la capacidad de absorción de fosfato en las raíces se ha incrementado grandemente (Bowen, 1970; Cartwright, 1972). Es delicado entonces extrapolar los resultados del experimento anterior respecto de las diferencias en la velocidad de absorción de fosfato observadas en los experimentos anteriores, donde se trabajó con plantas nutridas en fósforo.

Por ello se realizó un experimento de cinética de absorción de fosfato en plantas de trigo pretratadas con amonio o nitrato, pero cultivadas en soluciones completas para que estuvieran bien nutridas. Las plantas fueron cultivadas durante doce días en soluciones de nitrato, en la forma descrita en Materiales

y Métodos (2.2.2.c). Luego se les suministró soluciones de amonio o nitrato, durante 72 horas, y posteriormente se midió la velocidad de absorción de fosfato a partir de soluciones de SO_4Ca 0,5 mM, con diferentes concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, marcadas con ^{32}P , como se describe en Materiales y Métodos (2.3.3). El tiempo de absorción fue 1 hora.

La absorción de fósforo en estas condiciones presentó una isoterma similar a las obtenidas en los experimentos con plantas deficientes: dos fases hiperbólicas y una fase lineal (Figura 21), Sin embargo, hubo diferencias en los rangos de concentración en que actuaron cada una de las fases.

El punto de inflexión entre las dos fases hiperbólicas se encontró en una concentración próxima a 0,1 mM; pero la fase rectilínea -de absorción pasiva- que en los experimentos con plantas deficientes aparecía próxima a 1,0 mM de PO_4H_2^- , en este experimento se halló en concentraciones próximas a 0,3 mM. Los K_m calculados para las dos fases hiperbólicas (Figura 22 y Tabla 5) fueron nuevamente similares para los dos tratamientos en cada una de las fases, y presentaron pocas diferencias con los K_m determinados en el experimento anterior. En el experimento presente, las velocidades máximas también fueron mayores en las plantas pretratadas con amonio que en aquellas pretratadas con nitrato, en tanto que, en el experimento con plantas deficientes, estas diferencias apenas alcanzaban al 30% (Tabla 4). Esta mayor diferencia en las velocidades máximas está más de acuerdo con las diferencias halladas en experimentos anteriores realizados con plantas bien nutridas que con la leve diferencia observada cuando

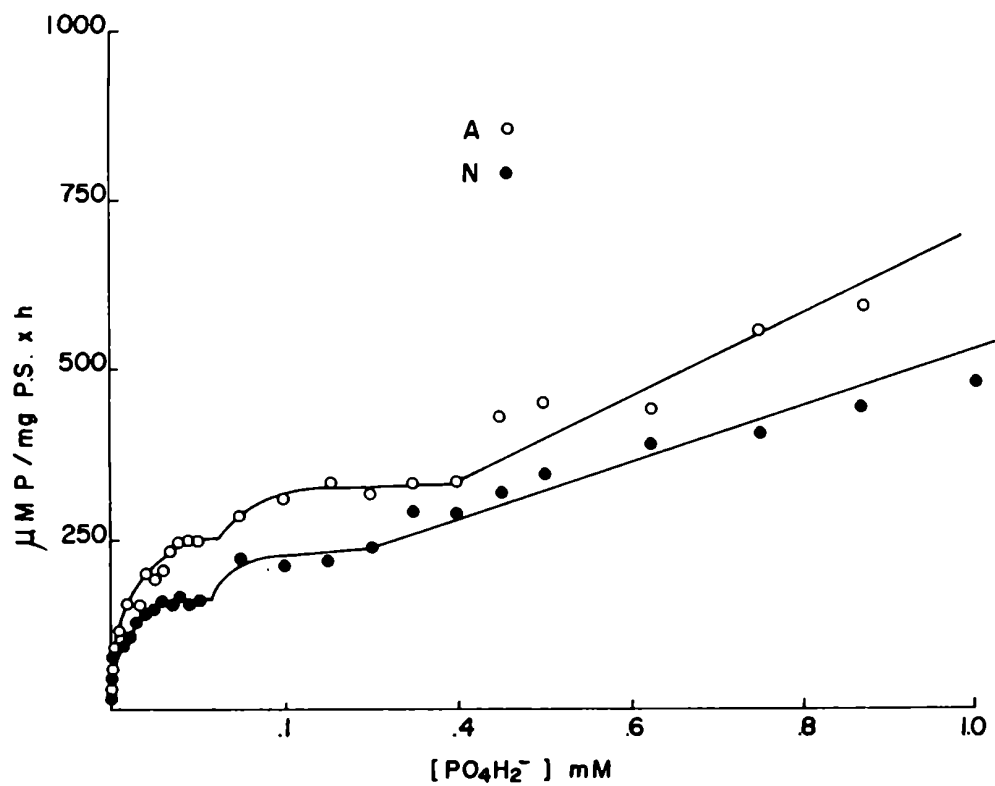


Figura 21: Velocidad de absorción de fosfato por plantas de trigo cultivadas en nitrato o amonio, a varias concentraciones de P. Cada punto es la media de cuatro repeticiones.

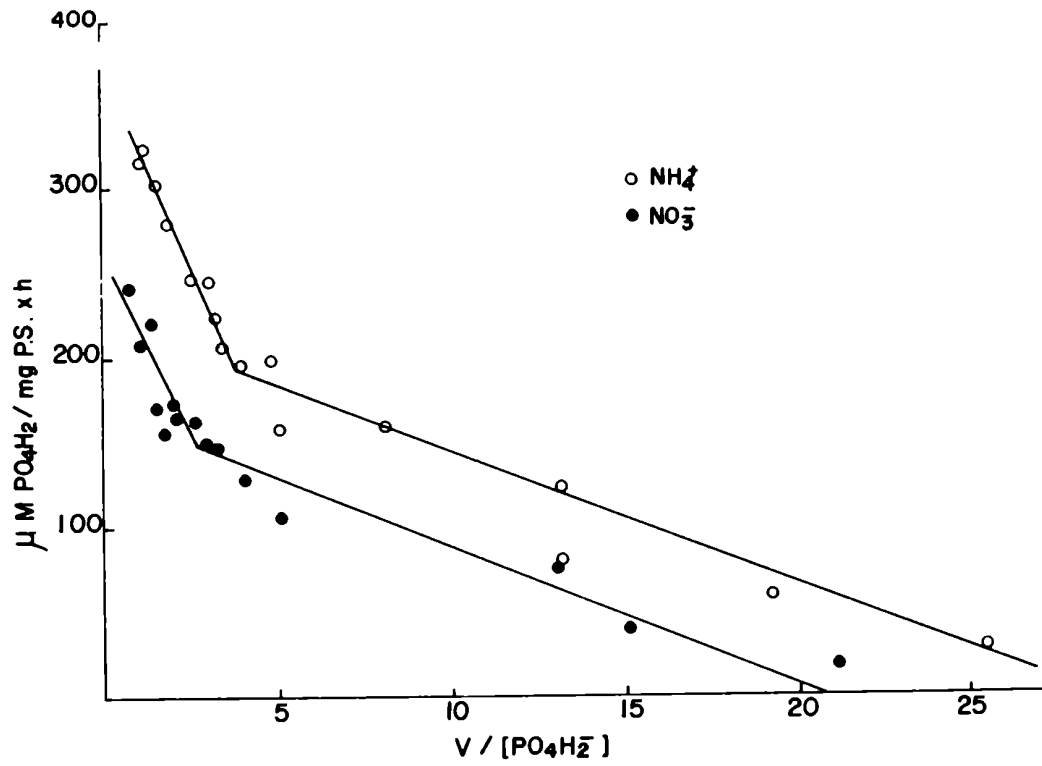


Figura 22: Representación de Hofstee de la velocidad de absorción de fosfato por plantas de trigo cultivadas en nitrato o amonio, a diferentes concentraciones de P. Cada punto es la media de cuatro repeticiones.

	Km bajo	Vmax bajo*	Km alto	Vmax alto*
NH_4^+	$8,12 \times 10^{-6} \text{M}$	223,43	$5,7 \times 10^{-4}$	407,0
NO_3^-	$5,90 \times 10^{-6} \text{M}$	144,47	$3,18 \times 10^{-4}$	242,0

* μM de $\text{PO}_4\text{H}_2^- \times 10^{-4}$ x $\text{mg P.S.}^{-1} \times \text{h}^{-1}$

Tabla 5: Constantes cinéticas para la absorción de fosfato por plantas de trigo no deficientes en fósforo, luego de 72 hs. de pretratamiento con NO_3^- o NH_4^+ . Promedios de cuatro repeticiones.

se emplearon plantas deficientes.

El escaso incremento de la velocidad de absorción de fosfato provocado por el amonio, con respecto al nitrato, en las plantas deficientes en fósforo, puede atribuirse al estado fisiológico de las plantas deficientes, ya que en esas plantas el incremento en la absorción de fósforo producido por la deficiencia de este elemento podría haber estado enmascarando las diferencias inducidas por las distintas fuentes nitrogenadas.

Estos resultados confirman, entonces, el hecho observado en el experimento anterior que el incremento en la velocidad de absorción de fosfato producido por el amonio respecto al nitrato sería producido por un incremento en la concentración del carrier de fosfato en las células radicales.

4.3. CINÉTICA DE EFLUJO DE FOSFORO RADIATIVO

4.3.1. Bases teóricas

Para poder comprender más claramente los resultados previamente obtenidos sobre los efectos que producen las diferentes fuentes de nitrógeno sobre la absorción y transporte de fósforo, y para poder conciliar los resultados de los experimentos de tiempos de absorción cortos con los de tiempos largos, se hace necesario hacer un estudio de la distribución de fósforo en los diferentes compartimentos de las células de la raíz.

Dado que no es posible medir directamente el contenido de un ion en cada uno de estos compartimentos (espacio libre, citoplasma y vacuola), esta medición debe ser realizada en forma indirecta. El método más usado para hacer un análisis compartimental es medir la velocidad de eflujo de iones de cada uno de los compartimentos celulares a la solución exterior.

Este método, claramente descrito por Clarkson (1974), se basa en la premisa de que las células maduras -que no tienen crecimiento neto- alcanzan un estado de equilibrio de flujo al ser colocadas en una solución de composición constante. En estas condiciones el flujo neto de un ion dado es cero, dado que los flujos parciales ϕ_j^o (el flujo hacia el exterior de la célula) y ϕ_j^i (el flujo hacia la solución exterior) son iguales y opuestos.

El eflujo puede ser medido cargando las raíces con un marcador radiactivo

durante un tiempo suficientemente largo y colocando, posteriormente, aquellas en una solución de composición y concentración similar carente del radioisótopo. De este modo, al producirse los flujos en ambas direcciones a través de la membrana, en las nuevas condiciones se producirá una salida del ion radiactivo hacia la solución externa, y una entrada del ion no radiactivo al compartimento celular. Si la solución externa es renovada constantemente, de modo que no se produzca un incremento en la concentración del marcador radiactivo, irá produciéndose una disminución en la concentración del radioisótopo en el interior de la célula sin modificación de la concentración total del ion.

La pérdida de concentración en el compartimento no tiene una velocidad constante puesto que la variación de su velocidad es exponencial y depende del logaritmo natural de la concentración del ion radiactivo en el interior de la célula.

Si el logaritmo de la velocidad de salida del marcador a través de la membrana se representa en función del tiempo, se obtiene una línea recta.

El proceso descrito ocurre cuando el flujo iónico se produce a través de una sola membrana. En la célula vegetal este proceso se complica. Primero, debido a la existencia de la pared celular, que por sus cargas eléctricas actúa como un intercambiador de iones. Segundo, debido a la presencia de la vacuola y del tonoplasto. Este representa otra barrera para el pasaje de iones, cuyos flujos hacia el interior y el exterior de la vacuola se superponen con los flujos a través de la membrana plasmática. Por lo tanto, la velocidad de salida

de un marcador de una célula vegetal es la sumatoria de las velocidades de salida de cada uno de los tres compartimentos mencionados.

Si se representa, entonces, el logaritmo de la cantidad de marcador remanente en el interior de la célula en función del tiempo, se obtiene una curva que está compuesta por la superposición de tres rectas, correspondiente cada una de ellas al marcador remanente en cada uno de dichos compartimentos (Figura 23). Prolongando la porción recta de la curva hasta el eje de ordenadas se obtiene la cantidad inicial de marcador en la vacuola. Restando esta cantidad a cada uno de los puntos de la curva se obtiene una nueva curva, que corresponde al marcador remanente en el espacio libre y el citoplasma. Prolongando nuevamente la porción recta hasta el eje de ordenada se obtiene la cantidad inicial de marcador en el citoplasma. Finalmente, restando esta cantidad a cada punto se obtiene una recta que representa al marcador radiactivo en el espacio libre. Conociendo estas cantidades pueden calcularse las velocidades de salida del marcador de cada compartimento.

Este método se utilizó, entonces, para conocer la distribución del fósforo en los diferentes compartimentos celulares de raíces de plantas cultivadas con amonio o nitrato.

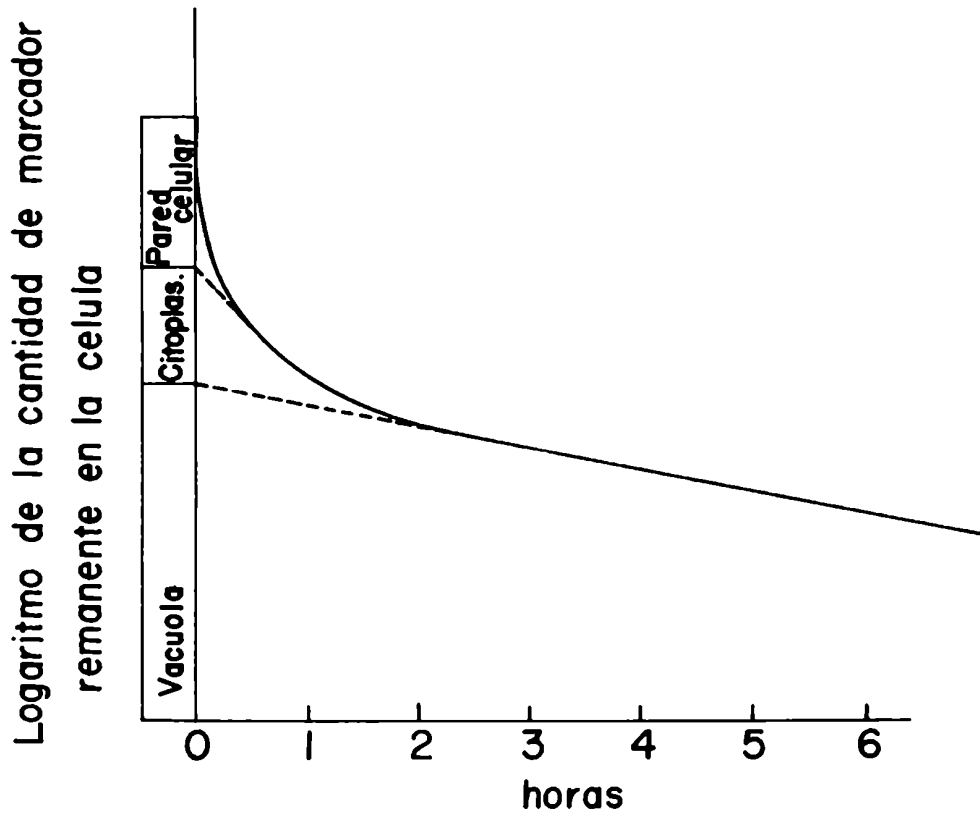


Figura 23: Representación teórica del eflujo de iones de una célula vegetal (De Clarkson, 1974).

4.3.2. Procedimiento

Se cultivaron plantas de trigo durante diez días en soluciones de nitrato. Posteriormente estas plantas fueron transferidas a soluciones completas de amonio y nitrato marcadas con ^{32}P . En estas soluciones las plantas permanecieron cinco días, para que se marcaran exhaustivamente y la actividad específica fuera homogénea en toda la planta e igual a la de las soluciones de absorción (ver capítulo de Materiales y Métodos).

Posteriormente, las plantas se transfirieron a soluciones de amonio y nitrato no marcadas. Las soluciones fueron renovadas periódicamente como se describe en Materiales y Métodos, y se midió el ^{32}P presente en la solución. La medición de eflujo se prolongó por 24 horas. Al final de este período se midió el contenido de fósforo remanente en la raíz y en la parte aérea.

4.3.3. Resultados

Al comenzar la medición del eflujo, las plantas cultivadas en amonio presentaron un contenido mayor de fósforo marcado que las de nitrato, tanto en la raíz como en la parte aérea (Tabla 6). A lo largo del tiempo el contenido de fósforo marcado remanente en la raíz mostró la ya mencionada curva compuesta en cada uno de los dos tratamientos (Figura 24). En la forma ya indicada se calculó el contenido inicial de marcador en la vacuola para cada uno de los

tratamientos (Tabla 7), y posteriormente se obtuvo una nueva curva, perteneciente al trazador radiactivo remanente en el citoplasma y el espacio libre, y se determinó el contenido inicial en el citoplasma (Figura 25). La cantidad de ^{32}P en el espacio libre no fue determinada dada la rapidez con que se produce el eflujo en este compartimento.

La concentración inicial de marcador radiactivo en el citoplasma fue 140% mayor en las plantas cultivadas en amonio que en las de nitrato. En la vacuola, en cambio, el contenido inicial de fósforo marcado fue solamente 14% mayor en las plantas pretratadas con amonio.

Esto indicaría que las diferencias observadas en el contenido de fósforo en las raíces de los diferentes tratamientos se deberían prácticamente al contenido del citoplasma, puesto que el de la vacuola fue muy semejante en las plantas de ambos tratamientos. Además, en las plantas provenientes de nitrato el 13% de todo el fósforo marcado se encontraba en el citoplasma y el resto en la vacuola, en tanto que en las plantas provenientes de amonio el 33% de todo el fósforo marcado se encontraba inicialmente en el citoplasma y en el resto en la vacuola.

El fósforo acumulado en la vacuola es claramente un "pool" de reserva (Bieleski, 1973). Smith (1966), en células de Nitella, mostró que el 90% de los ésteres fosfóricos se encontraban en el citoplasma, en tanto que en la vacuola casi todo el fósforo se encontraba como fósforo inorgánico. No hay dato sobre el contenido de ésteres fosfóricos en células de plantas superiores, pero todos

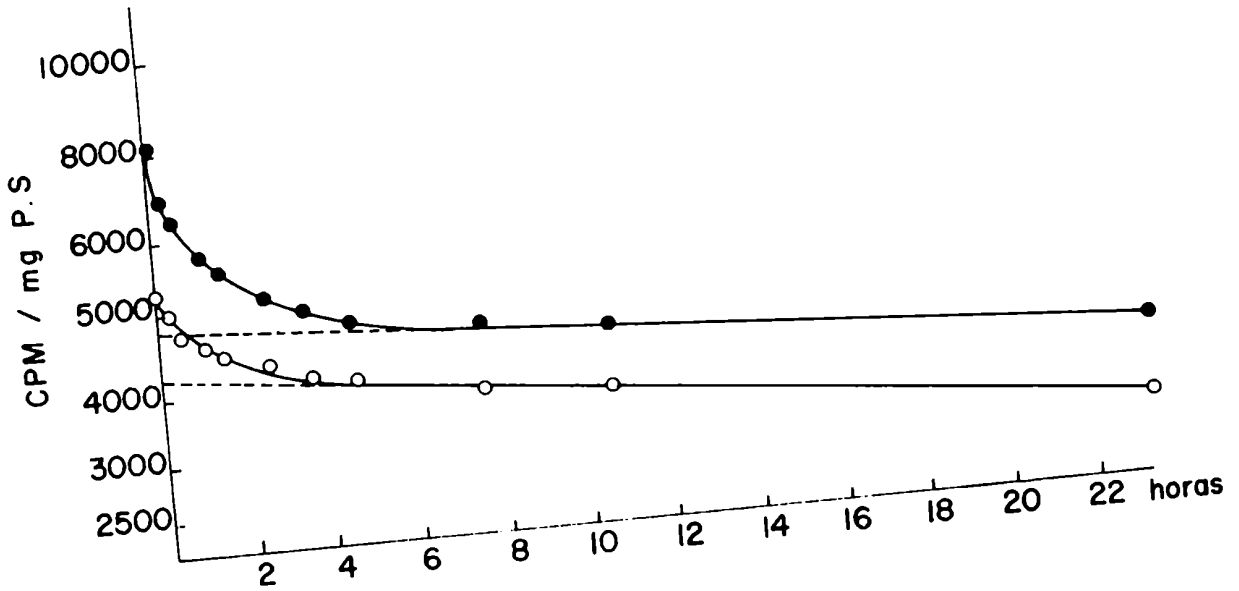


Figura 24: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la disminución de la concentración interna de ^{32}P a lo largo del tiempo en raíces de trigo. Cada punto es la media de cuatro repeticiones. ● NH_4^+ o NO_3^- .

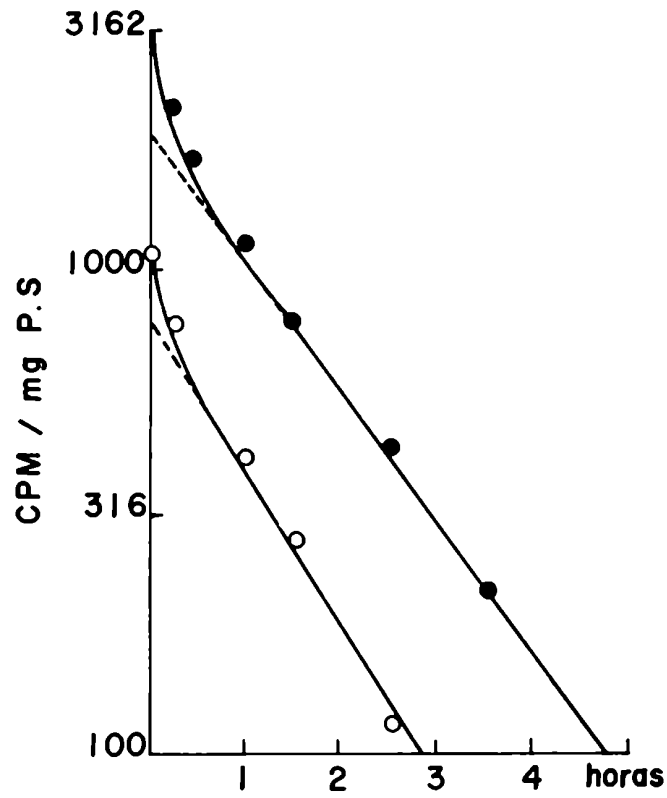


Figura 25: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la disminución de la concentración de ^{32}P a lo largo del tiempo en el citoplasma y espacio libre de raíces de plantas de trigo. Cada punto es la media de cuatro repeticiones.
 ● NH_4^+ ○ NO_3^- .

	Raíz	P. aérea
NH_4^+	5.004,8 a	7.256,0 a
NO_3^-	3.865,0 b	5.163,5 b

Tabla 6: Contenido inicial de ^{32}P en plantas pretratadas con nitrato o amonio (CPM/mg P.S.). Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (P 0,01).

	NH_4^+	NO_3^-
vacuola	4.677,3	4.073,80
citoplasma	2.089,3	870,9

Tabla 7: Contenido inicial de ^{32}P en la vacuola y citoplasma de raíces de plantas crecidas en nitrato o amonio (CPM/mg P.S.). (Promedio de cuatro repeticiones).

los datos obtenidos hasta ahora sugieren que el "pool" de fósforo de la vacuola es un "pool" no metabólico, escasamente intercambiable (Bielecki, 1973).

Los resultados de este experimento demuestran que el tiempo medio de intercambio para el fosfato de la vacuola es de varios días, en tanto que para el citoplasma es de sólo unas horas (Se considera tiempo medio de eflujo el tiempo necesario para que la mitad del fósforo radiactivo contenido inicialmente en el compartimento sea intercambiado por fósforo frío) (Tabla 8).

Por lo tanto, debemos tener en cuenta que los resultados de la partición de fosfato, descritos en el inciso 3.1.7., sólo corresponderían al "pool" de fosfato en el citoplasma, ya que con el tiempo de marcación empleado en ese experimento (1 hora) sólo se alcanzó marcar el "pool" citoplasmático.

Está claro ahora que el "pool" no metabólico de la vacuola - que se caracteriza por contener casi todo el fósforo presente en la célula, por ser un "pool" estacionario y por contribuir poco al transporte de fósforo a la parte aérea (Pitman, 1972)-, tiene un tamaño similar en las raíces provenientes de nitrato y de amonio, y que casi toda la diferencia en el contenido de fósforo entre los dos tratamientos se encuentra en el citoplasma. -que es el "pool" metabólico y aporta casi todo el fósforo que va a ser transportado. Por lo tanto, este mayor contenido en el citoplasma está de acuerdo con el mayor transporte a la parte aérea encontrado en experimentos anteriores, en las plantas tratadas con amonio.

Estos resultados aclaran las discrepancias en los contenidos de fósforo en la raíz observadas en los experimentos de absorción en tiempos cortos y en tiempos largos. En experimentos de absorción de fósforo marcado durante tiempos cortos (menores de dos horas), las diferencias en los contenidos de ^{32}P por unidad de peso seco eran muy grandes en la raíz. Si también se tienen en cuenta los tiempos medios de intercambio (Tabla 8), se observará que en esos experimentos sólo se marcaba el "pool" citoplasmático. En cambio, en los experimentos de marcación durante tiempos largos (varios días), las diferencias en el contenido de fósforo marcado en la raíz se hacían mínimas, en tanto que eran grandes en la parte aérea. En estos últimos experimentos, siempre considerando los tiempos medios de intercambio, se marcaba también el "pool" de la vacuola -que era similar en ambos tratamientos y sustancialmente mayor que el "pool" citoplasmático-, enmascarando las diferencias en este "pool" en las raíces de ambos tratamientos.

En las Figuras 26 y 27 se representan las velocidades de eflujo de fosfato en función del tiempo para el citoplasma y la vacuola, respectivamente. En la Tabla 9 se muestran las velocidades iniciales de eflujo de fósforo marcado de cada compartimento, en cada tratamiento. La velocidad inicial de eflujo de fósforo marcado del citoplasma de las plantas de amonio fue 671% mayor que la de las plantas de nitrato, en tanto que la velocidad de eflujo de fósforo marcado de la vacuola de las plantas de nitrato fue 120% mayor que en las de amonio. Con los datos obtenidos hasta el presente se hace difícil interpretar estas diferencias en la velocidad de eflujo. Ya se dijo que la velocidad de eflujo

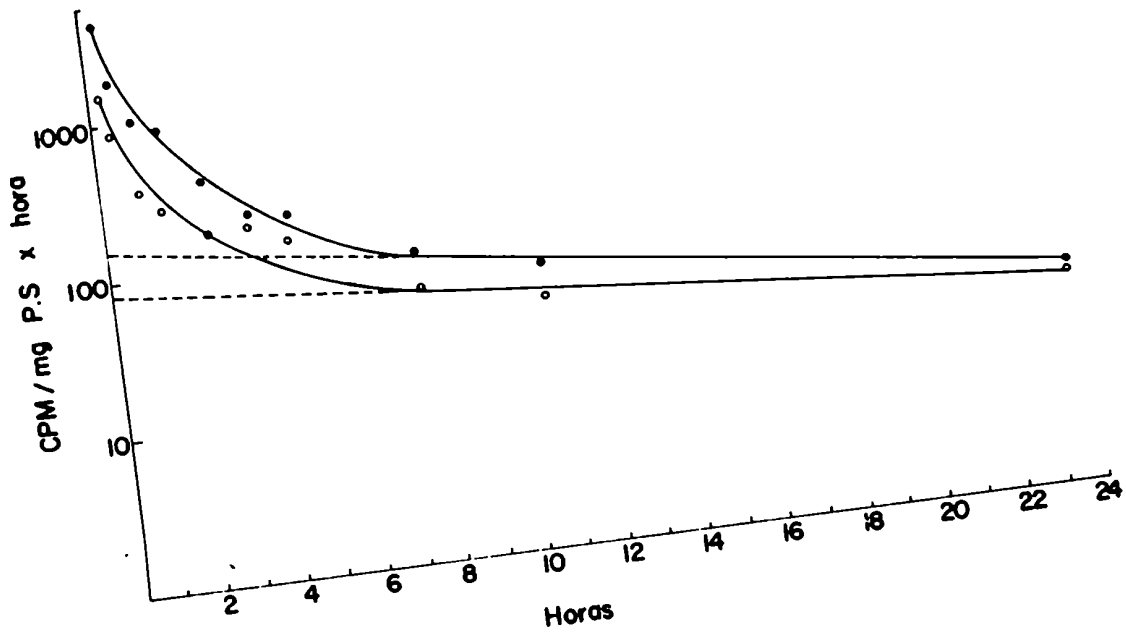


Figura 26: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la velocidad de eflujo de ^{32}P en raíces de plantas de trigo. Cada punto es la media de cuatro repeticiones.
 ● NH_4^+ ○ NO_3^- .

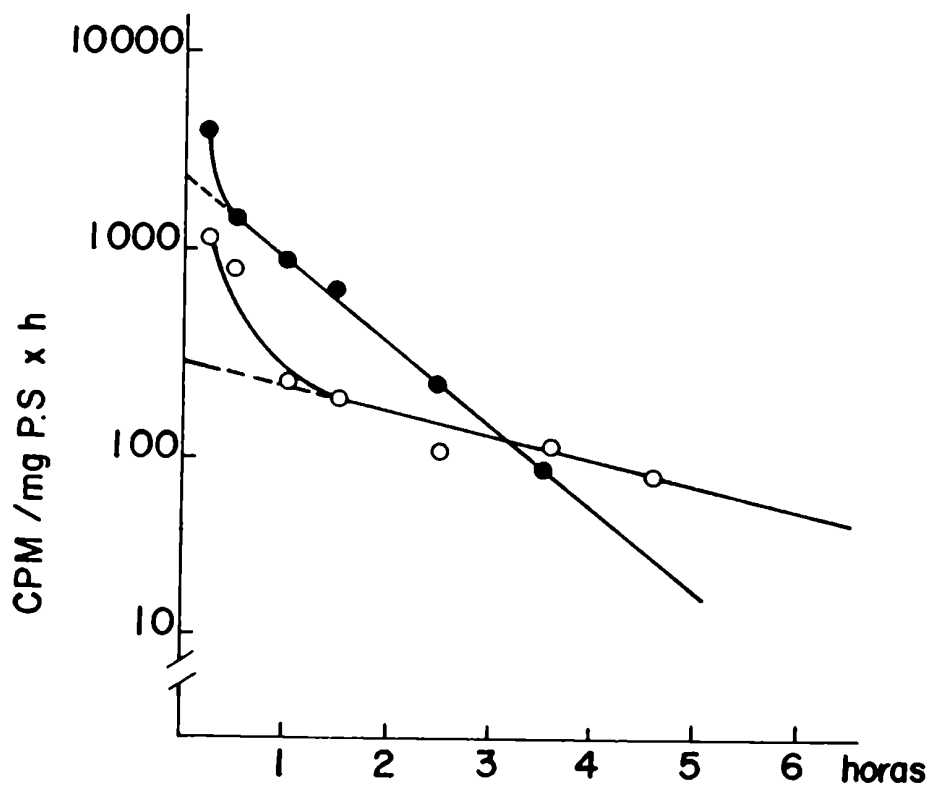


Figura 27: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la velocidad de eflujo de ^{32}P del citoplasma y espacio libre de raíces de plantas de trigo. Cada punto es la media de cuatro repeticiones. ● NH_4^+ o NO_3^- .

	NH_4^+	NO_3^-
vacuola	40,17	45,21
citoplasma	1,05	1,11

Tabla 8: Tiempos medios de eflujo de fósforo marcado de cada compartimento de raíces de plantas crecidas en nitrato o amonio (horas).

	NO_3^-	NH_4^+
vacuola	125.9	57,54
citoplasma	354,81	2.371,3

Tabla 9: Velocidad inicial de eflujo de ^{32}P de raíces de plantas crecidas en amonio o nitrato (CPM/mg P.S. por hora).

es una función de la concentración del ion, ya que esta es una consecuencia de la difusión pasiva de iones a través de la membrana. La difusión de un ion a través de una membrana depende de su concentración (más estrictamente, de su actividad), del potencial eléctrico a ambos lados de la membrana, y del coeficiente de permeabilidad de la membrana. En las presentes condiciones experimentales no fue posible obtener datos sobre la concentración del ion fosfato en el jugo vacuolar ni en el jugo citoplasmático y, por lo tanto, las concentraciones se han expresado en función del peso seco. Si bien estos datos son útiles para conocer los contenidos relativos de iones, nada expresan acerca de su actividad en la célula. Además, no puede descartarse que existan diferencias de potencial electroquímico a ambos lados de la membrana en las raíces de ambos tratamientos, o diferencias en el coeficiente de permeabilidad de las membranas; factores todos que estarían alterando la velocidad de eflujo.

Haría falta, entonces, más información para dar una explicación a estas diferencias en la velocidad de eflujo.

5. ABSORCIÓN DE FOSFATO Y EL METABOLISMO DEL NITRÓGENO

5.1 Contenido de nitrógeno

Hasta ahora se han estudiado los mecanismos mediante los cuales se producen las diferencias en la velocidad de absorción de fosfato en plantas de trigo cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno. De los experimentos anteriores se desprende que esas diferencias responden a mecanismos intrínsecos de la planta, de origen metabólico. Queda por ver ahora cuáles serían las causas fisiológicas que desencadenan dichos mecanismos, dando origen a diferencias. Puesto que la única diferencia en la forma de cultivo de las plantas que presentaron diferente velocidad de absorción de fosfato fue la forma química de nitrógeno, es entonces razonable buscar en el metabolismo del nitrógeno las causas de dicho fenómeno.

Muchos autores observaron que las raíces de las plantas cultivadas en amonio tienen una concentración interna de nitrógeno más alta que las de las plantas cultivadas en nitrato (Kirkby y Mengel, 1967; Blair et al., 1970; Cox y Reisenauer, 1973; Harada et al., 1968). Cole et al. (1963) encontraron una alta correlación entre el contenido de nitrógeno y la absorción de fósforo en raíces de maíz. Al determinarse el contenido de nitrógeno en plantas de trigo cultivadas durante dos semanas en soluciones circulantes de amonio o de nitrato, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de este elemento en la parte aérea (Tabla 10), en tanto que las raíces de las plantas cultivadas en amonio presentaron una concentración de nitrógeno mayor que la de las plantas cultivadas

en nitrato (Tabla 10). Esta diferencia, aunque pequeña (12%), fue significativa, en concordancia con lo observado por los autores antes citados.

Para poder establecer una relación entre la concentración de nitrógeno en la raíz y los mecanismos de absorción de fosfato, es necesario establecer en qué forma se encuentra ese nitrógeno en la raíz.

En el presente trabajo, por razones de técnica, no pudo hacerse un análisis de diferentes fracciones nitrogenadas de la raíz. En general, los autores que han estudiado dichas fracciones en varias plantas cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno, coinciden en que las plantas cultivadas con amonio presentan en sus raíces un mayor contenido de compuestos nitrogenados -especialmente aminoácidos libre- que las plantas cultivadas en nitrato (Harada et al., 1968; Kirkby y Mengel, 1967; Wenzel y Michael, 1966). También se han hallado mayor cantidad de amidas en el exudado xilemático de plantas de tomate (Wilcox et al., 1977) y de poroto (Thomas et al., 1979) cultivadas en amonio que en las cultivadas en nitrato. Esta mayor concentración de aminoácidos libre se interpreta como una rápida incorporación a esqueletos carbonados del amonio absorbido, a diferencia del nitrato que debe ser reducido principalmente en la parte aérea. Queda por ver si esta mayor cantidad de amidas libres está relacionada con la absorción de fósforo.

5.2. Absorción y transporte de iones y su relación con la síntesis de proteínas

La absorción y el transporte de iones han sido relacionados desde hace tiempo con la síntesis de proteínas (Sutcliffe, 1960). Se conocen varias sustancias, entre ellas varios inhibidores de la síntesis de proteínas, que afectan estos procesos (Pitman, 1975). Estos inhibidores afectan en forma diferente la absorción y el transporte de iones. Schaefer et al. (1975) encontraron que en plántulas de cebada y en experimentos de corta duración, la p-Fluoro-fenil alanina -un aminoácido análogo- reducía el transporte de iones, sin afectar su absorción. Lüttge et al. (1974) demostraron que, en raíces de cebada, la cicloheximida -que inhibe la síntesis de proteínas a nivel de formación del complejo de iniciación- producía similares resultados. Schaefer et al. concluyeron que para que se produzca la absorción y el transporte de iones serían necesarias ciertas proteínas de rápido "turn-over", siendo el "turn-over" de las proteínas requeridas para la absorción más lento que el de aquellas requeridas para el transporte. Por esta razón, la absorción y el transporte de iones serían afectados en forma diferente por los inhibidores.

En los experimentos anteriores se ha demostrado que la fuente de nitrógeno suministrada a la planta puede afectar la absorción como el transporte de fosfato. Por lo tanto, se consideró de interés estudiar qué efecto tienen estos inhibidores sobre la absorción de fosfato en plantas cultivadas con amonio o nitrato.

Se cultivaron plantas de trigo durante diez días en soluciones completas de nitrato. Posteriormente se transfirieron durante 48 horas a soluciones de

	Raíz	P. aérea
NH_4^+	3,89 a	4,86 a
NO_3^-	3,46 b	4,63 a

Tabla 10: Contenido de N en la parte aérea y la raíz de plantas de trigo cultivadas durante dos semanas en nitrato o amonio (%). Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (P 0,01).

	Total	Raíz	P. aérea	% transportado
NH_4^+	14,88 a	55,07 a	5,30 a	25,75 a
NO_3^-	10,74 b	30,48 b	5,12 a	38,26 b
NH_4^+ + P-F-fen	11,91 b	45,63 ab	3,47	23,36 a
NO_3^- + P-F-fen	10,75 b	39,63 b	2,90 c	21,6 a

Tabla 11: Efecto de la P-F-fenilalanina sobre la absorción y transporte de ^{32}P por plantas de trigo cultivadas en amonio o nitrato (CPM/mg P.S.). Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (P 0,01).

amonio o nitrato. Luego las plantas se separaron en dos lotes. Un lote de cada tratamiento se colocó, durante dos horas, en soluciones completas de nitrato o amonio y con el inhibidor por probar, en tanto que los otros lotes permanecieron en soluciones de nitrato o amonio (como testigos). Los inhibidores probados fueron la p-F-fenilalanina, la cicloheximida y la oligomicina. Luego se midió la absorción de fosfato durante 30 minutos, en soluciones de SO_4Ca 0,5 mM, y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,4 mM marcado con ^{32}P . El empleo de estos inhibidores "in vivo" presenta la dificultad de que no es posible saber si una vez absorbidos por la raíz son metabolizados por la planta antes de actuar, o si finalmente actúan "in situ" como tales. Aparentemente, se producen ambos fenómenos dado que los resultados no fueron muy claros y variaron de un experimento al otro. De los tres inhibidores probados sólo se obtuvieron resultados claros con la p-F-fenilalanina 2 mM.

Las plantas pretratadas con amonio, en ausencia del inhibidor, absorbieron 47% más fósforo que aquellas pretratadas con nitrato (Tabla 11). En cambio en presencia del inhibidor no hubo diferencias entre ambos tratamientos. Esta desaparición de las diferencias se debió exclusivamente a una disminución del 25% en la absorción de las plantas de amonio. Por el otro lado, el transporte no se vio afectado en estas plantas ya que el porcentaje de fósforo transportado sobre el total absorbido no varió, en tanto que en las plantas provenientes de nitrato ese porcentaje se redujo del 38,6% a sólo el 21,63%. Debe tenerse en cuenta que con el tiempo de absorción aquí utilizado, el transporte de ^{32}P no llegó al

estado estacionario. Estos resultados deben interpretarse teniendo en cuenta este factor, ya que no es factible trabajar con estos inhibidores durante tiempos prolongados porque se producirían daños irreversibles en la planta.

El diferente efecto producido por la p-F fen en las plantas de los dos tratamientos, si bien es difícil de interpretar por ahora, indicaría que las diferencias en la velocidad de absorción de fosfato entre los tratamientos estarían, de alguna manera, relacionadas con el "turn-over" de ciertas proteínas. No es posible postular dos mecanismos diferentes de absorción de fosfato, -uno estimulado por amonio y otro por nitrato, que serían afectados en forma diferentes por el inhibidor-, dado que tampoco es posible, por ahora, conocer los "pools" internos de aminoácidos en las raíces de cada uno de los tratamientos ni la compartimentalización de dichos "pools". Se sabe que existen dentro de la planta por lo menos dos "pools" de aminoácidos; uno proveniente de la degradación de proteínas, y otro de la síntesis "de novo" de aminoácidos que serán incorporados a proteínas (Bidwell et al., 1964; Steward y Bidwell, 1966). Estos dos "pools" están aislados, y los aminoácidos de uno de ellos no pueden pasar al otro sin previa degradación. De ser estos "pools" diferentes en las raíces de las plantas de ambos tratamientos, el aminoácido análogo aquí utilizado sufriría una dilución diferente en las raíces de cada tratamiento, lo que podría causar los efectos observados. También podría esperarse que fuera diferente la distribución de las proteínas de "turn-over" rápido propuestas por Schaefer et al. De cualquier manera, resulta interesante determinar qué ocurre con la síntesis de proteínas y

con el contenido de proteínas en las raíces de ambos tratamientos.

5.3. Incorporación de ^{14}C a proteínas en raíces de plantas cultivadas en amonio o nitrato.

Se ha demostrado en varios vegetales que el "turn-over" de proteínas es muy dependiente de la composición del medio de cultivo (Trewavas, 1972a, 1972b). Por todo lo expresado en el punto anterior, se procedió a medir la incorporación de ^{14}C a proteínas solubles en raíces de plantas tratadas con amonio o nitrato. La incorporación se llevó a cabo en raíces escindidas, -como se describe en Materiales y Métodos (2.5)-, a partir de ^{14}C sacarosa. Posteriormente se aislaron las proteínas solubles y se determinó el isótopo radiactivo en la forma descrita.

En la Figura 28 se representa la incorporación de ^{14}C a proteínas en las raíces de las plantas de ambos tratamientos, al cabo de 5 horas. Esta incorporación resultó aproximadamente 30% mayor en raíces de las plantas tratadas con amonio. Cuando se determinó el contenido total de proteínas solubles, se observó que aquellas que provenían de amonio contenían 30% más proteínas por unidad de peso fresco que aquellas provenientes de nitrato (Tabla 12).

Dado que el contenido de proteínas fue mayor, no necesariamente debe interpretarse la mayor incorporación de ^{14}C en las raíces de amonio como un mayor "turn-over", sino que al haber un "pool" más grande de proteínas son más las proteínas que se están sintetizando simultáneamente, con la consecuente incorporación de ^{14}C .

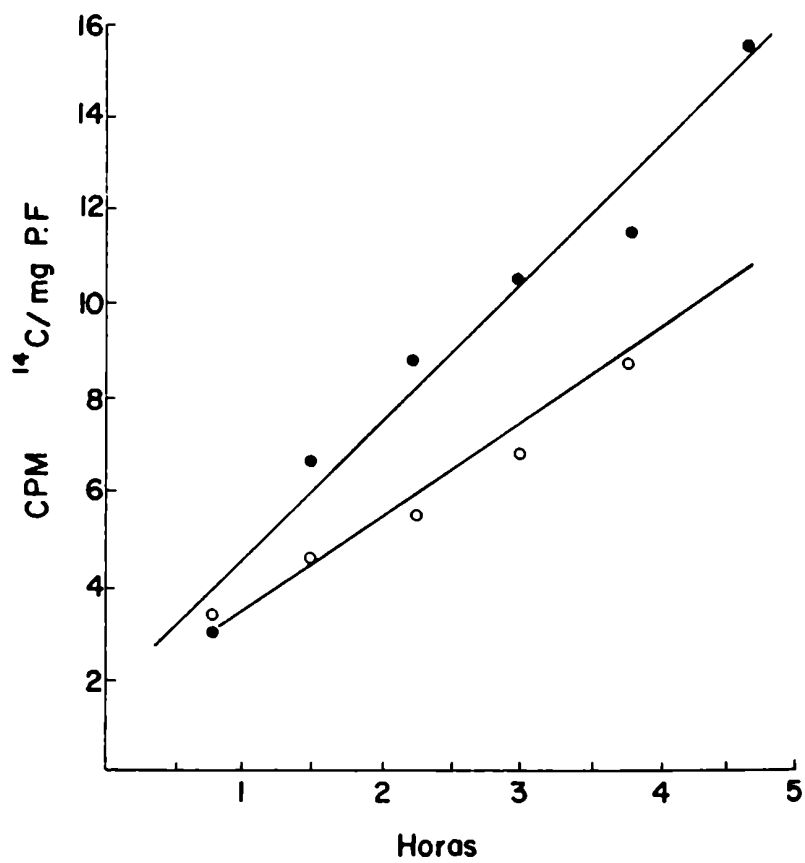


Figura 28: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la incorporación de ^{14}C a proteínas solubles de raíces escindidas de trigo.
 ● NH_4^+ o NO_3^- .

NH_4^+	NO_3^-
2,93 a	2,08 b

Tabla 12: Contenido de proteínas solubles en raíces de plantas de trigo cultivadas en amonio o nitrato (μg Prot/mg P.F.). Diferentes letras indican diferencias significativas (P 0,01).

Estos resultados no aclaran de qué manera este mayor contenido de proteínas podría estar relacionado con la mayor absorción de fósforo pero sin embargo, son bastantes las evidencias observadas por otros autores y las halladas en este trabajo que señalan la estrecha relación entre la absorción de iones y el metabolismo de las proteínas. Probablemente en ese nivel se encuentren las causas de las diferencias en la velocidad de absorción observadas a lo largo de esta serie de experimentos en las plantas pretratadas con las diferentes fuentes nitrogenadas. Otra evidencia de la intervención de las proteínas en la absorción de fosfato ha sido hallado por Jeanjean (1979) y Haas et al., (1979), quienes han extraído de Candida tropicalis y de raíces de centeno, respectivamente, proteínas solubles que tienen afinidad por el fosfato, y la unión de estas proteínas con este ion tiene un Km semejante al que presentan estos organismos para la absorción de fosfato en el rango de baja concentración.

Hace falta, entonces, un mejor conocimiento de los mecanismos de absorción de fosfato del metabolismo de nitrógeno en la raíz, y de sus relaciones con la absorción de iones para poder comprender cuáles son las causas de las diferencias en la absorción de fosfato observadas entre plantas cultivadas con fuentes de nitrógeno oxidadas o reducidas.

6. CONCLUSIONES

6.1. Mecanismo de absorción de fosfato en plantas de trigo cultivadas en amonio o nitrato.

La absorción de iones en las plantas superiores puede ilustrarse según un modelo general, en el que se representan los principales flujos de iones (Fig. 29). Sobre la base de este modelo y de acuerdo con los resultados hasta ahora obtenidos, se puede interpretar cómo se producen las diferencias en la velocidad de absorción de fosfato en plantas de trigo cultivadas en presencia de amonio o nitrato.

El influjo de fosfato hacia el citoplasma, a través de la plasmalemma (\emptyset_c^e) es activo y está mediado por transportadores de naturaleza desconocida. Existe además un eflujo pasivo de iones a través de la membrana plasmática (\emptyset_c^c). En las plantas cultivadas en amonio el influjo de fosfato es mayor que en aquellas cultivadas en nitrato. Este mayor influjo en las raíces provenientes de amonio sería consecuencia de una mayor concentración de transportadores en la membrana plasmática, según se desprende de los resultados de los experimentos de cinética de absorción de fosfato (4.1 y 4.2).

El influjo (\emptyset_v^c) a través del tonoplasto, hacia el interior de la vacuola, es activo; mientras que el eflujo (\emptyset_c^v), por el contrario, es pasivo. Estos flujos también se ven afectados por la fuente de nitrógeno aunque los contenidos de fosfato en la vacuola no sean muy diferentes en ambos tratamientos, de acuerdo con lo encontrado en los experimentos de cinética de eflujo (4.3). El flujo (\emptyset_c^v)

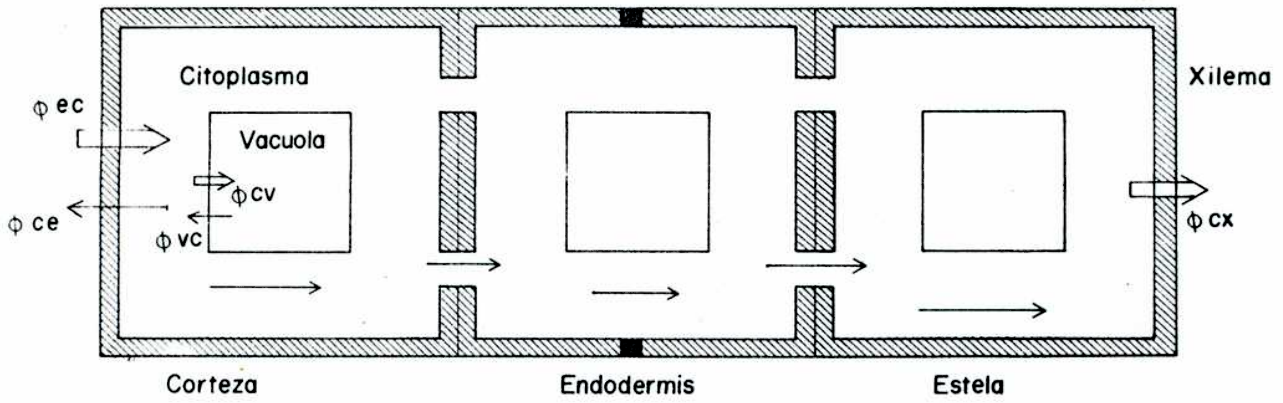


Figura 29: Esquema del corte de una raíz, donde están representados los principales flujos de iones.

es mayor en las plantas provenientes de nitrato que en aquellas provenientes de amonio.

El fosfato que no entra en la vacuola es transportado vía simplasto hacia el xilema. Si bien no hay evidencias suficientes sobre la necesidad energética del pasaje del fosfato hacia el xilema, actualmente se acepta que sería producido por una excreción, mediante gasto de energía, desde las células del parénquima xilemático (Läuchli, 1976; Pitman, 1977). Este flujo ($\emptyset \frac{c}{x}$) es mayor en las plantas cultivadas con amonio que en aquellas cultivadas con nitrato, lo que se manifiesta en un mayor transporte a la parte aérea en las primeras.

Por otra parte, los flujos $\emptyset \frac{c}{x}$ y $\emptyset \frac{e}{c}$ serían afectados en forma independiente por la fuente de nitrógeno, según lo observado en los experimentos de cinética de transporte a la parte aérea (4.1) y del efecto de la p-F-fenilalanina sobre la absorción de fosfato por plantas tratadas con amonio o nitrato (5.2), cuyos resultados concordarían con lo ya postulado por Leonce y Miller (1966), Thien y Mc Fee (1970, 1972) y Barta (1977).

6.2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la regulación de la absorción y transporte de fosfato.

Los mecanismos de regulación de las funciones fisiológicas son muy complejos en los seres vivos y particularmente poco comprendidos en los vegetales superiores. Por lo tanto, es difícil determinar de qué manera el nitrógeno, o más aún, la forma química en que este es suministrado a la planta, puede actuar sobre los mecanismos de regulación de la absorción y transporte de fosfato.

Dado que no se observaron mayores diferencias en el crecimiento de las plantas cultivadas con las distintas fuentes de nitrógeno, se puede descartar que fueran inducidas por diferencias en la demanda, producto de variaciones en el crecimiento.

Cole et al. (1963) y Thien y Mc Fee (1970, 1972) atribuyeron el estímulo producido por el nitrógeno sobre la absorción de fosfato a una mayor síntesis de intermediarios nitrogenados que estarían involucrados en la absorción de dicho ion. El hecho de que las raíces de plantas de trigo cultivadas en amonio contengan una mayor concentración de nitrógeno total y una mayor cantidad de proteínas solubles (5.3), como se describió en el capítulo 5, apoyaría la propuesta de estos autores. Este "intermediario" nitrogenado no necesariamente debería ser una sustancia específica, sino que podría tratarse de un grupo de "sustancias", o tan sólo una activación del metabolismo del nitrógeno en la raíz. Estas diferencias pueden atribuirse a la diferente disponibilidad de nitrógeno cuando este se suministra en forma reducida u oxidada. Mientras que el amonio puede ser directamente incorporado a esqueletos carbonados en la raíz (Martin, 1970), el nitrato es transportado en su mayor parte reducido en la parte aérea (Mengel y Kirkby, 1978). Mengel y Viro (1978) observaron que, en plantas de arroz, el $^{15}\text{N-NH}_4^+$ era inmediatamente incorporado a esqueletos carbonados, en tanto que el $^{15}\text{N-NO}_3^-$ era transportado a la parte aérea. Además, varios autores han encontrado una mayor cantidad de aminoácidos y amidas libres en las raíces de plantas cultivadas con amonio que en aquellas que crecen en nitrato (Wenzel y Michael, 1966; Harada et al., 1968; Takaki et al., 1968; Yoneyama y Kumazawa, 1974, 1975).

Si se acepta esta mayor "disponibilidad" de nitrógeno en las raíces de las plantas que crecen en amonio, estas se comportarían entonces como si crecieran en una concentración de nitrógeno mayor que aquellas que crecen en nitrato. Como existe abundante información de que la absorción de fósforo se ve incrementada por un mayor suministro de nitrógeno, se puede postular que el cultivo en amonio, comparado con el cultivo en nitrato, produciría ese mismo efecto. Se puede proponer entonces que, en el sistema de regulación de la absorción de fosfato, una de las "señales" que determina el aumento de tamaño del sistema de absorción de fosfato podría estar dada por la concentración de nitrógeno y/o aminoácidos y/o amidas libres en la raíz. Sin embargo, no puede descartarse que en la regulación de este sistema contribuyan también "señales" provenientes de la parte aérea.

7. BIBLIOGRAFIA

- Arnon, D.I., "Effect of ammonium and nitrate nitrogen on the mineral composition and sap characteristics of barley". *Soil Sci.*, 48: 295-307, 1939.
- Avron, M., "Photophosphorylation by swiss-chard chloroplasts". *Biochim. Biophys. Acta*, 40: 257-272, 1960.
- Barta, A.L., "Uptake and transporte of Calcium and Phosphorus in Lolium perenne in response to N supplied to halves of divided root system". *Physiol. Plant.*, 39: 211-214, 1977.
- Beevers, L., "Mineral metabolism in Plants" Edward Arnold, Ltd., London, 1976.
- Beevers, L. and R.H. Hageman, "Nitrate reduction in higher plants", *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20: 495-522, 1969.
- Bennet, W.F.; G. Standford and L. Dumenil, "Nitrogen, phosphorus and potassium content of the corn leaf and grain as related to nitrogen fertilization and yield". *Proc. Soil. Sci. Soc. Am.*, 17: 252-258, 1953.
- Bidwell, R.G.S., "Protein synthesis and turn-over in cultured plant tissue: source of carbon for synthesis and the fate of the protein brakedown products" *Nature*, 4943: 367-373, 1964.
- Bieleski, R.L. "Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability" *Ann. Rev. Plant, Physiol.*, 24: 265-262, 1963.
- Blair, G.J.; Miller, M.H. and W.A. Mitchell, "Nitrate and ammonium as sources of nitrogen for corn and their influence on the uptake of other ions". *Agron. J.* 162: 530-532, 1970.
- Blanchar, R.W. and A.C. Caldwell, "Phosphorus-ammonium-moisture relationship in soils II: Ion concentration in leached fertilized zones and effects on plants". *Soil. Soc. Amer. Proc.*, 30: 43-47, 1966.
- Borys, M.W.; M. Knaflewski and J. Wojciechowsski, "Yield and mineral element content of some tomato tissues as influenced by $N-NO_3^-$, $N-NH_3$ ratio and N level". *Agrochimica*, 14: 312-320, 1970.
- Bouldin, D.R. and E.C. Sample. "The effect of associated salts on the availability of concentrated superphosphate". *Soil.Sci. Soc. Amer. Proc.* 22: 124-129, 1958.

- Bouldin, D.R. and E.C. Sample, "Laboratory and greenhouse studies with monocalcium, monoammonium and diammonium phosphates". Soil. Soc. Am. Proc. 23: 338-342, 1959.
- Bowen, G.D., "Effects of soil temperature on root growth and on phosphate uptake along Pinus radiata roots". Aust. J. Soil Res. 8: 31-42, 1970.
- Bowling, D.J.F. and P.E. Weatherley, "Potassium uptake and transport in roots of Ricinus communis". J. Exp. Bot. 15: 413-421, 1964.
- Burley, J.W., F.I.O.Nwoke, G. Leister and R. Popham, "The relationship of xylem maturation to the absorption and translocation of ^{32}P ". Amer. J. Bot., 57: 504-511, 1970.
- Burris, R.H., "Nitrogen Nutrition". Ann. Rev. Plant Physiol., 10: 301-328, 1959.
- Caldwell, A.C., "The influence of various nitrogen carriers on the availability of fertilizer phosphorus to plants". Trans. Int. Cong. Soil. Sci., 3: 517-525, 1960.
- Cartwright, B., "The effect of phosphate deficiency on the kinetics of phosphate absorption by sterile excised barley roots and some factors affecting the ion uptake efficiency of roots". Soil Sci. Plant Anal. 3: 313-322, 1972.
- Chapman, H.D., "Effect of nitrogenous fertilizers, sulfur and colloidal silica on the availability of phosphorus in calcareous soils". J. Amer. Soc. Agron. 28: 135-145, 1936.
- Choteau, J. "Balance acides-bases de la composition de plants de tabac alimentées en azote nitrique ou en azote ammoniacal". Ann. Physiol. Vég. 4: 237-247, 1960.
- Clarkson, D.T., "Ion transport and cell structure in plants", Mc Graw-Hill Ltd. London, 1974.
- Clarkson, D.T. and J.B. Hanson, "The mineral nutrition of higher plants", Ann., Rev. Plant Physiol., 31: 239-312, 1980.
- Crafts, A.S. and T.C. Broyer, "Migration of salt and water into the xylem of the roots of higher plants". Am. J. Bot., 25: 529-535, 1938.
- Cole, C.W.; D.L. Grunes, L.K. Ponter and S.R. Olsen, "The effect of nitrogen on short term phosphorus absorption and translocation in corn (*Zea mays*)". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 27: 671-674, 1963.
- Cox, W.J. and H.M. Reisnauer, "Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate or ammonium, or both". Plant Soil, 38: 363-380, 1973.

- Cox, W.J. and H.M. Reisenauer, "Ammonium effects on cation absorption by wheat", *Agronomy J.*, 69: 868-871, 1977.
- Cunningham, R.K. and K.F. Nielsen, "Cation-anion relationship in crop nutrition. V. The effect of soil temperature, light intensity and soil-water tension". *J. Agri. Sci.*, 64: 379-386, 1965.
- De Kock, P.C. and E.A. Kirkby, "Uptake by plants of various forms of nitrogen and effects on plant composition". *Tech. Bull. Minist. Agric. Fish. Fd. N°15*, 7-14, 1969.
- Duncan, W.G. and A.J. Ohlrogge, "Principles of nutrient uptake from fertilizer bands. II: Root development in the band". *Agron. J.* 50: 605-608, 1958.
- Duncan, W.G. and A.J. Ohlrogge, "Principles of nutrient uptake from fertilizer bands III: Band volume, concentration and nutrient composition". *Agron. J.*, 51: 103-106, 1959.
- Edwards, D.G., "Phosphate absorption and long distance transport in wheat seedlings". *Aust. J. Biol. Sci.* 23: 265-264, 1970.
- Epstein, E.O., "Mineral Nutrition of plants: principles and perspectives". John Wiley & Son, Inc. New York, 1972.
- Epstein, E.O.; D.W. Rains and O.E. Elzam, "Resolution of dual mechanism of potassium absorption by barley roots". *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)* 49: 684-492, 1963.
- Ginsburg, H. and B.Z. Ginsburg, "Radial water and solute flows in roots of *Zea mays*. II. Ion fluxes across the root cortex". *J. Exp. Bot.*, 21 (68): 593-604, 1970.
- Goswami, A.K. and J.S. Willcox, "Effect of applying increasing levels of nitrogen to ryegrass. I. Composition of various nitrogen fractions and free aminoacids". *J. Sci. Fd. Agric.* 20: 592-595, 1969.
- Grunes, D.L. F.G. Viets and H.S. Smith. "Proportionate uptake of soil and fertilizer phosphorus by plants as affected by nitrogen fertilization. I. Growth chamber experiments". *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 22: 43-48, 1958.
- Grunes, D.L; H.J. Haas and S.H. Shih, "Effect of longtime dryland cropping on available phosphorus of Cheyenne sandy loam". *Soil. Sci.*, 80: 127-138, 1955.
- Hagen, C.E. and H.T. Hopkins, "Ionic species in orthophosphate absorption by barley roots". *Plant Physiol.*, 30: 193-199, 1955.
- Hai, T.V. and H. Laudelout, "Phosphate uptake by intact rice plants by the continuous flow method at low phosphate concentrations". *Soil Sci.* 101: 408-417, 1966.

- Hall, S.M. and A. Baker, "The chemical composition of Ricinus phloem exudate".
Planta, 106: 131-140, 1972.
- Harada, T.; H. Takaki and Y. Yamada, "Effect of nitrogen sources on the chemical
components in young plants". Soil Sci. Plant Nutr. 14: 47-55, 1968.
- Hassan, M.M. and T.V. Hai, "Kinetic of phosphate uptake by intact seedlings",
Proc. 4th Int. Coooqu. on Control of Plant Nut., Gent. Vol II, 211-216, 1976.
- Haynes, R.J. and K.M. Goh, "Ammonium and nitrate nutrition of plants". Biol. Rev.,
53: 465-510, 1978.
- Hewitt, H.J., "Assimilatory nitrate nitrite reduction". Ann. Rev. Plant Physiol,
26: 73-100, 1975.
- Higinbotham, N., "The mineral absorption process in plants". The Botanical Review,
39: 15-69, 1973.
- Hofstee, B.H.J., "On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions"
Science, 116: 329-331, 1952.
- Humble, G.D., A. El Leboudi and V.V. Rendig, "Effect of nitrogen on phosphorus
absorption by exised Barley roots". Plant and Soil, 31: 353-365
- Jackson, P.C. and C.E. Hagen, "Products of orthophosphate absorption by barley
roots". Plant Physiol. 35: 326-332, 1960.
- Jackson, W.A. and D.C. Williams, "Nitrate stimulated uptake and transport of
stronium and other cations". Soil Sci. Am. Proc. 32: 698-704, 1968.
- Jeanjean, R., "The relationship between the rate of phosphate absorption and protein
synthesis during phosphate starvation in Chlorella pyrenoidosa" Physiol.
Plant. 37: 107-110, 1976.
- Jeanjean, R., "The effect of metabolic poisons on ATP level and on active phosphate
uptake in Chlorella pyrenoidosa" FEBS Lett, 32: 149-151, 1973.
- Jeanjean, R. and N. Fournier, "Characterization and partial purification of phosphate
binding proteins in Candida tropicalis". FEBS Lett. 105: 163-166, 1979.
- Johansen, C., "Plant Histotechnology". Mc Graw-Hill Book Co., 1940.
- Kirkby, E.A., "Ionic balance in different tissues of tomato plants in relation
to nitrate, urea and ammonium". Plant Physiol., 42: 66-67, 1967.
- Kirkby, E.A. and A.D. Hughes, "Some aspects of ammonium and nitrate nutrition
in plant metabolism". In E.A. Kirkby (ed.) "Nitrogen nutrition of the
plant". Univ. of Leeds, Leeds, 1970.

- Kirkby, E.A. and K. Mengel., "Ionic balance in different tissues of tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nitrogen". *Plant Physiol.*, 42: 6-14, 1967.
- Konings, H. and G. Verschuren, "Formation of aerenchyma in roots of Zea mays in aerated solutions, and its relation to nutrient supply". *Physiol. Plant.* 49: (3): 265-270, 1980.
- Laties, G.G., "Dual mechanisms of salt uptake in relation to compartmentation and long distance transport", *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20: 89-116, 1969.
- Lauchli, A. "Symplasmic transport and ion release into the xylem", in *Transport and Transfer Processes in Plants*, I.F. Wardlaw and J.B. Passioura, ed., Academic Press, 1976.
- Lauchli, A. and E. Epstein, "Lateral transport of ions into the xylem of corn roots I. Kinetics and energetics". *Plant Physiol.*, 48: 111-117, 1971(a).
- Lauchli, A. and A.R. Spurhard; E. Epstein, "Lateral transport of ions into the xylem of corn roots II. Evaluation of a stellar pump". *Plant Physiol.*, 48: 118-124, 1971 (b).
- Lea, P.J. and J. Mifflin. "Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants". *Nature*, 251: 614-616, 1974.
- Leonce, F.S. and M.H. Miller, "A physiological effect of nitrogen on phosphorus absorption by corn". *Agron. J.*, 58: 245-249, 1966.
- Lin, W. and J.B. Hanson, "Phosphate absorption rates and adenosine 5-triphosphate concentration in corn root tissue". *Plant Physiol.*, 54: 250-256, 1974.
- Losada, M., 1975. "La reducción fotosintética del nitrato y su regulación". Publicado en homenaje al Prof. D. Manuel Lora-Tamayo, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid, 1975.
- Loughman, B.C. and Russell, R.S., "The absorption and utilization of phosphate by young barley plants", *J. Exp. Bot.*, 8: 280-293, 1957.
- Lowry, O.H.; N.J. Rosenbrough, A.L. Forr and Randall, R.J., "Protein measurements with the Folin-phenol reagent". *J. Biol. Chem.*, 193: 265-273, 1951.
- Luttge, U. and G.G. Laties, "Dual mechanisms of ion absorption in relation to long distance transport in plants", *Plant Physiol.*, 41: 1531-1539, 1966.
- Luttge, U. and G.G. Laties, "Selective inhibition of absorption and long distance transport in relation to the dual mechanism of ion absorption in maize seedlings". *Plant Physiol.*, 42: 181-185, 1967.

- Lüttge, U. A. Läuchli, E. Ball and M.G. Pitman, "Cicloheximide a specific inhibitor of protein synthesis and intercellular ion transport in plant roots". *Experientia*, 30: 470-471, 1974.
- Maizel, J.V.; A.A. Benson and N.E. Tollbert, "Identification of Phosphorylcoline as an important constituent of plant sap". *Plant Physiol.*, 31: 407-408, 1956.
- Maynard, D.N. and A.U. Barker, "Studies on the tolerance of plants for ammonium nutrition". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 94 (3): 235-239, 1969.
- Mengel, K. and E.A. Kirkby, "Principles of plant nutrition". International Potash Institute, Bern, 1978.
- Mengel, K. H. Grimmer and K. Nemeth, "Potential and actual availability of plant nutrient in soils". *Landw. Forsch.* 23/1. Sonderh. 79-91, 1969.
- Miller, M.H., "Influence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on root growth and P absorption by corn on fertilizer band". *Agron. J.* 57: 393-396, 1965.
- Maas, E.V., G. Ogata and M.H. Finkel, "Salt induced inhibition of phosphate transport and release of membrane proteins from barley roots". *Plant Physiol.*, 64: 139-143, 1979.
- Miller, M.H. and A.J. Ohlrogge, "Principles of nutrient uptake from fertilizer bands I. Effect of placement of nitrogen fertilizer on the uptake band-placed phosphorus at different soil phosphorus levels". *Agron. J.* 50: 95-97, 1958.
- Miller, M.H.; J. Ohlrogge and N.V. Vij, "Some chemical and morphological effect of ammonium sulphate in fertilizer phosphorus band for sugar beets". *Can. J. Soil. Sci.* 4: 87-95, 1962.
- Olson, R.A. and A.F. Dréier, "Nitrogen, a key factor in fertilizer phosphorus efficiency". *Soil Sci. Am. Proc.*, 20: 509-514, 1956.
- Pitman, M.G. , "Uptake and transport of ions in barley seedlings III. Correlation between transport to the shoot and relative growth rate". *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 905-919, 1972 (a)
- Pitman, M.G., "Uptake and transport of ions in barley seedlings. II. Evidence for two active stages in transport to the shoot". *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 243-257, 1972 (b).
- Pitman, M.G., "Ion transport in the xylem". *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 28: 71-88, 1977.
- Pitman, M.G. and W.J. Cram., "Regulation of ion content in the whole plant". In *Integration of activity in the higher plants. Symposia of the S.E.B. N°XXXI.* Cambridge Univ. Press, 1977.

- Polizotto, K.R., G.E. Wilcox and C.M. Jones, "Response of growth and mineral composition of potato to nitrate and ammonium nutrition". J. Am. Soc. Hort. Sci. 100: 165-168, 1975.
- Rennie, D.A. and T. Mitchell, "The effect of nitrogen additions of fertilizer phosphate availability". Can. J. Agric. Sci., 34: 353-356, 1954.
- Rennie, D.A. and R.J. Sopper, "The effect of nitrogen additions on fertilizer phosphorus availability", J. Soil Sci., 9: 155-167, 1958.
- Riley, D. and Barber, S.A., "Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root-induced pH changes in root-soil interphase". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35: 301-306, 1971.
- Robertson, W.K.; P.M. Smith, A.J. Ohlrogge and D.M. Kinch, "Phosphorus utilization by corn as affected by placement and nitrogen and potassium fertilization". Soil. Sci., 77: 219-226, 1954.
- Roux, L. et Ch. Lesaint, "Comparaison de l'influence de la nutrition nitrique et ammoniacale sur la répartition du phosphore chez la tomate". Ann. Physiol. Veg., 4: 235-239, 1962.
- Russell, R.S. and D.A. Barber, "The relationship between salt uptake and the absorption of water by intact plants". Ann. Rev. Plant Physiol., 11: 127-140, 1960.
- Russell, R.S. and Clarkson, D.T., "Ion transport in root systems". In Perspectives in Experimental Biology, Vol. 2. Botany. ed. Sunderland, N., Pergamon, Oxford, 401-411, 1976.
- Schaefer, N.; R.A. Wildes and M.G. Pitman, "Inhibition by p-fluorophenylalanine of protein synthesis and of ion transport across the root in barley seedling". Aust. J. Plant Physiol., 2: 61-74, 1975.
- Smith, F.A., "Active phosphate uptake by Nitella translucens". Biochem. Biophys. Acta, 126: 94-99, 1966.
- Soon, Y.K. and M.H. Miller, "Changes in the rhizosphere due to ammonium and nitrate fertilization and phosphorus uptake by corn seedlings". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 41: 77-80, 1977.
- Spanswick, R.M., "Electrogenesis in photosynthetic tissues". in: Ion transport in plants, ed. Anderson, W.P., Academic Press, London, 1973.
- Starotska, R.V. and H.L. Hill, "Influence of soluble salts on the solubility of and plant response to calcium phosphate". Soil Sci. Amer. Proc., 19: 193-198, 1955.

- Steward, F.C. and R.C.S. Bidwell, "Storage pools and turn over systems in growing cells: experiments with ^{14}C -sucrose, ^{14}C -glutamine and ^{14}C asparagine" J. Expet. Bot., 17 (53): 726-741, 1966.
- Subramonia Iyer, P.R.V. and M.C. Saxena, "Kinetic studies on the inducement in uptake and transport of P by Maize (Zea mays) as a result of pre-uptake $\text{NO}_3\text{-N}$ Supply", Plant and Soil, 46: (1): 55-67, 1977.
- Subramonia Iyer, P.R.V.; M.C. Saxena and D. Sharma, "Kinetic studies on nitrogen induced uptake of ^{32}P by exised root systems of maize", ISNA Newsletter, 2: 39-41, 1973.
- Subramonia Iyer, P.R.V.; M.C. Saxena and D. Sharma. "Kinetic studies in $\text{NH}_4\text{-N}$ induced uptake of P by maize". Proc. Symp. on Use of Radioisotopes in Plant productivity, Patnagar, India, 311-322, 1974.
- Thien, S.J. and W.W. Mc Fee, "Influence of nitrogen on phosphorus absorption and translocation in Zea mays". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 34: 87-90, 1970.
- Thien, S. J. and W.W. Mc Fee, "Effect of nitrogen on phosphorus transport systems in Zea mays". Soil Sci. Soc. Am. Proc. 36: 617-620, 1973.
- Thomas, R.J. and U. Feller, "The effect of different inorganic nitrogen sources and plant age on the composition of sleding sap of Phaseolus vulgaris". The new Phytol., 82(3): 657-671, 1979.
- Trewavas, A., "Determination of the rates of protein synthesis and degradation in Lemna minor". Plant Physiol., 49: 40-46, 1972 (a).
- Trewavas, A. "Control of the protein turn-over rates in Lemna minor". Plant Physiol. 49: 47-51, 1972 (b).
- Tseng, S.Y. and H.Ch. Lin. "Influence of hidrogen ion activity on the uptake of phosphate by rice seedlings". J. Chim. Agr. Chem. Soc., 12: 14-18, 1974.
- Takaki, H.; M. Ikeda, Y. Yamada and T. Harada, "Occurrence of glucosamine in higher plants". Soil Sci. Plant, Nut., Japan, 14: 56-61, 1968.
- Tsutakawa, R.K. and J.E. Hewett, "Comparison of two regression lines over a finite interval". Biometrics, 34: 391-398, 1978.
- Tyree, M. "The symplasmic concept, general theory of symplast transport according to the thermodynamics of irreversible processes". J. Theor. Biol., 26: 181-214, 1970.
- Vines, H.M. and R.T. Wedding, "Some effects of ammonia on plant metabolism and a possible mechanism for ammonia toxicity". Plant Physiol., 35: 820-825, 1960.

- Wenzel, A.J. and G. Michael, "Effect of a varied N application on the aminacid content in spinach leaves". Z. Pflanzenerarh. Dung. Bodenk., 1966.
- Willis, A.J. and E.M. Yemm, "Respiration of barley plants. VII. Nitrogen assimilation and respiration of the root system".
- Wilcox, G.E.; C.A. Mitchell and J.E. Hoff, "Influence of nitrogen form on exudation rate, and ammonium, amide and cation composition of xylem in exudate in tomato". J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102 (2): 192-196, 1977.
- Yoneyama, T., and K. Kumazawa, "A kinetic study of the assimilation of ^{15}N -labelled ammonium in rice seedling roots". Plant and Cell Physiol., 15: 655-661, 1974.
- Yoneyama, T. and K. Kumazawa, "A kinetic study of the assimilation of ^{15}N -labelled nitrate in rice seedlings". Plant and Cell Physiol, 16: 21-26, 1975.