Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Regulación de la absorción de amonio en plantas de trigo

Causin, Humberto Fabio

1994

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:
Causin, Humberto Fabio. (1994). Regulación de la absorción de amonio en plantas de trigo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2630_Causin.pdf

Cita tipo Chicago:
Causin, Humberto Fabio. "Regulación de la absorción de amonio en plantas de trigo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2630_Causin.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

REGULACION DE LA ABSORCION DE AMONIO EN PLANTAS DE TRIGO

HUMBERTO FABIO CAUSIN

REGULACION DE LA ABSORCION DE AMONIO EN PLANTAS DE TRIGO

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

AUTOR: Humberto Fabio Causin

DIRECTOR: Dr. Atilio J. Barneix

CONSEJERO DE ESTUDIOS: Dr. Juan Accorinti

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1994

Tesis realizada en el Centro de Ecofisiología Vegetal (CEVEG), CONICET. El autor recibió, además, apoyo de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.B.A.).

Nº 0630

42

Los resultados del presente trabajo de tesis fueron parcialmente publicados en:

- Regulation of NH_4^+ uptake in wheat plants: Effect of root ammonium concentration and amino acids. Plant and Soil (1993) 151, 211-218.
- The effect of glutamine and asparagine on net NH_4^+ uptake in young wheat plants. Plant and Soil (1994), en prensa.

INDICE

AGRADECIMIENTOS I

ABREVIATURAS II

RESUMEN IV

1. INTRODUCCION

1.1. Consideraciones generales 1

1.2. Aspectos generales sobre la absorción y asimilación del nitrógeno 4

1.3. Efectos de las fuentes de nitrógeno durante su absorción y asimilación 12

1.3.1. Efectos sobre el pH externo 12

1.3.2. Efectos sobre la absorción de otras especies iónicas 13

1.3.3. Efectos sobre el pH y balance eléctrico endógenos 14

1.3.4. Efectos sobre el crecimiento y desarrollo 17

1.4. Aspectos generales sobre la regulación de la absorción de amonio. Objetivos del presente trabajo 19

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Material vegetal 24

2.2. Condiciones ambientales 24

2.3. Soluciones nutritivas 24

2.4. Cultivo de plantas 25

2.5. Medición de la absorción neta de amonio 26

2.6. Medición de la absorción neta de potasio 27

2.7. Técnicas analíticas

2.7.1. Determinación de N total en tejidos vegetales 28

2.7.2. Determinación de amonio en la solución de cultivo 28

2.7.3. Determinación de amonio en tejidos vegetales 29

2.7.4. Determinación de aminoácidos y amidas libres endógenas 30

2.7.5. Determinación de glutamina y asparagina endógenas 30

2.7.6. Medición de la actividad *in vitro* de la enzima GS 31

2.7.7. Medición de la actividad aminativa y desaminativa *in vitro* de la enzima GDH 31

2.7.8. Medición de la actividad *in vitro* de la enzima PEP-carboxilasa 32

2.7.9. Determinación de potasio en la solución de cultivo 32

2.7.10. Análisis estadístico 32

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de la absorción de amonio en plantas deficientes en N y en plantas pretratadas con nitrato o amonio.

3.1.1. Caracterización de la absorción neta de NH_4^+ en plantas de trigo cultivadas en ausencia de N 34

3.1.2. Estudio del efecto del pretratamiento con NO_3^- o NH_4^+ sobre la absorción neta de NH_4^+, medida en presencia o en ausencia de NO_3^- 38

3.1.3. Efectos de la variación de la concentración endógena de NH_4^+ y aminoácidos totales libres sobre la absorción de NH_4^+ 42

3.1.3.1. Estudios realizados con diferentes tiempos de incubación 43

3.1.3.2. Estudios realizados mediante la provisión de NH_4^+ exógeno en presencia o en ausencia de MSX 48

3.2. Efecto de la provisión exógena de distintos aminoácidos y amidas sobre la absorción neta y metabolismo del amonio 57

3.2.1. Caracterización de la absorción neta de NH_4^+ en plantas deficientes en N pretratadas con distintos aminoácidos y amidas 58

3.2.2. Estudio del efecto de la glutamina y la

asparagina sobre la absorción y metabolismo del NH_4^+ 60

3.2.2.1. Experimentos realizados con plantas deficientes en N 60

3.2.2.2. Experimentos realizados con plantas pretratadas con nitrato o amonio 75

3.3. Efecto de la provisión de distintas fuentes nitrogenadas sobre la actividad de enzimas vinculadas al metabolismo del amonio 83

3.3.1. Efecto de la provisión de NO_3^- y/o NH_4^+ sobre la actividad de la enzima PEP-carboxilasa 84

3.3.2. Efecto de la provisión de gln, asn y NH_4^+ sobre la actividad de las enzimas GS, PEP-carboxilasa y GDH en plantas deficientes en N 86

4. CONCLUSIONES GENERALES 91

5. BIBLIOGRAFIA CITADA 98

AGRADECIMIENTOS

Si bien resultaría demasiado extenso dar una nómina de todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a que este trabajo fuera posible, no quisiera dejar de mencionar mi especial agradecimiento a:

La Ing. Agr. Patricia Arnozis y el Dr. Atilio Barneix, por guiarme en diferentes etapas a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Osvaldo Caso, director del CEVEG, y a todos mis compañeros becarios, investigadores y personal técnico de dicho instituto, por su colaboración. En especial quisiera recordar a María Raquel Guitman ("Beba") por brindarme su tiempo, experiencia y amistad.

A los profesores de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la F.C.E.N., Dres. Juan Accorinti, Gloria Zulpa y Cristina Záccharo y a mi jefa de trabajos prácticos Dra. Mónica Storni, por todo su apoyo.

A mis padres, mi esposa y familiares, por su paciencia, comprensión y constante aliento.

Humberto Fabio Causin

ABREVIATURAS

aa: aminoácido/s

ac.: ácido

ADP: adenosín di fosfato

AOA: aminooxiacetato

ATP: adenosín tri fosfato

cv.: cultivar

DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucina

EDTA: ac. etilendiamino tetra acético

Exp.: Experimento

Fd: ferredoxina

GDH: glutámico deshidrogenasa

GOGAT: oxoglutarato-glutamina aminotransferasa

GS: glutamina sintetasa

MSX: L-metioninsulfoximina

NAD(P): nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducida

PA; pa: parte aérea

PEP: fosfoenol piruvato

PF: peso fresco

Pi: fósforo inorgánico

PVPP: polivinilpolipirrolidona

RZ; rz: raíz

s.b.: solución basal

TCA: ac. tricloroacético

RESUMEN

La regulación de la absorción de NH_4^+ es un proceso complejo en el que varios factores estarían involucrados. Dado que el "status" de N endógeno desempeña un rol fundamental en dicho proceso, se estudió el efecto de la provisión de diversas fuentes de N sobre la absorción neta de NH_4^+ y distintas variables vinculadas a su metabolismo.

Se utilizaron plantas de trigo (*Triticum aestivum* L., cv. Klein dorado) de 10 días, cultivadas en hidroponia ya sea en ausencia de N o con NO_3^- y/o NH_4^+ como fuentes del mismo. Se separaron lotes homogéneos de plantas por triplicado y se procedió a la aplicación de distintos tratamientos mediante el cultivo con NO_3^-, NH_4^+ y distintos aminoácidos durante períodos de tiempo y/o concentraciones variables, como así también con inhibidores enzimáticos específicos. En todos los casos la absorción neta de NH_4^+ se midió por desaparición del ión de la solución externa. Asimismo, parte del material vegetal fue cosechado, pesado y procesado para la determinación de la concentración de N total, NH_4^+ libre, aminoácidos totales libres, glutamina, asparagina y/o la actividad *in vitro* de distintas enzimas vinculadas al metabolismo del NH_4^+, dependiendo del diseño experimental.

Los principales resultados obtenidos indicarían que:

- La absorción neta de NH_4^+ en plantas cultivadas en ausencia

de N puede disminuir considerablemente como consecuencia directa de la exposición de las mismas a distintas fuentes de N.

- Los cambios en la concentración de NH_4^+ libre y aminoácidos totales libres endógenos no estarían directamente involucrados en la inhibición del sistema de transporte. No obstante, un elevado aumento en la concentración de NH_4^+ en raíz puede provocar un descenso en la tasa de absorción neta del ión probablemente a causa de un aumento de la tasa de eflujo.
- Cuando se proveyeron exógenamente distintos aminoácidos y amidas en forma individual, se observó que en determinadas condiciones la glutamina y la asparagina podían inhibir en más de un 90% la absorción neta de NH_4^+ con respecto a la de las plantas cultivadas sin fuentes de N u otros aminoácidos. Dicho efecto sería específico para el NH_4^+ y no se debería ni a una competencia directa por el sitio de transporte entre las especies moleculares consideradas ni sería la mera consecuencia de una depolarización transitoria del plasmalema.

Si bien con la metodología empleada no pudo desarrollarse un modelo que explique claramente el mecanismo de regulación de la absorción de NH_4^+ en trigo, el presente trabajo destaca la existencia de un posible rol por parte de metabolitos nitrogenados específicos en dicho proceso.

1. INTRODUCCION

1.1. CONSIDERACIONES GENERALES.

El nitrógeno es uno de los principales macronutrientes debido tanto a su abundancia en los tejidos vegetales (encontrándose en 4º lugar luego del C, H y O) como a su ubicuidad en los distintos componentes bioquímicos celulares. Si bien la atmósfera representa el principal reservorio de N molecular, solo algunos microorganismos poseen el sistema enzimático capaz de asimilarlo directamente (fijación biológica). La mayoría de los vegetales absorben el N previamente fijado o provisto a la solución del suelo, ya sea bajo la forma de iones inorgánicos (NO_3^-, NO_2^- o NH_4^+), o de pequeñas moléculas orgánicas.

Desde principios de siglo se conocía el hecho de que la fertilización nitrogenada incrementaba el crecimiento y rendimiento de diversos cultivos (Naftel, 1931). Sin embargo para ese entonces prevalecía la noción de que las plantas absorbían fundamentalmente NO_3^- y de que el N aplicado bajo la forma de sales de NH_4^+ o compuestos orgánicos solo podía ser incorporado si era previamente oxidado a dicho anión. Sin embargo a medida que avanzó el estudio de la nutrición nitrogenada se aceptó no solo el hecho de que el NH_4^+ podía ser absorbido directamente por las raíces sino que, en muchos casos, la provisión conjunta de NO_3^- y NH_4^+ podía determinar un mejor crecimiento vegetal (Naftel, 1931; Reisenauer, 1978;

Scherer y MacKown, 1987).

Son numerosas las revisiones bibliográficas referidas a la absorción y asimilación de las distintas fuentes de N y a sus efectos sobre el crecimiento y metabolismo en diferentes especies vegetales (Lycklama, 1963; Pate, 1972; Raven y Smith, 1975; Haynes y Goh, 1978; Huffaker y Rains, 1978; Clarkson y Hanson, 1980; Salsac y col., 1987). Desde el punto de vista teórico el NH_4^+ sería una fuente óptima de N ya que, por un lado las cargas negativas de las micelas arcillosas favorecen su retención en el suelo disminuyendo así su pérdida por lixiviación, y por otro (como se verá más adelante) tanto su absorción como asimilación son energéticamente menos costosas que las del NO_3^- (Salsac y col., 1987). No obstante, si bien existen diversas especies adaptadas a la nutrición con NH_4^+, se ha observado que la provisión de este como única fuente nitrgenada puede provocar serias disminuciones en el crecimiento junto con la aparición de síntomas de stress hídrico y toxicidad (Barker y col., 1967; Kirkby y Mengel, 1967; Kirkby, 1968; Wilcox y col., 1985; Allen y Smith, 1986; Causin y Arnozis, 1988; Mehrer y Mohr, 1989). En consecuencia debe realizarse un manejo muy cuidadoso de la fertilización con NH_4-N a fin de obtener una productividad óptima sin dañar al vegetal. Para ello sería conveniente considerar al menos 3 grandes aspectos: I- Cuál es la dinámica del N en un suelo dado a fin de poder estimar la cantidad de NH_4^+ disponible

para la planta; II- Cuál es el mecanismo de absorción del NH_4^+ y que factores la regulan; III- Cuáles son las causas de los síntomas de toxicidad y, consecuentemente, los mecanismos de detoxificación posibles.

En el presente trabajo de tesis la investigación se ha centralizado en el segundo de los aspectos mencionados haciendo especial incapié en el estudio del proceso de regulación de la absorción de NH_4^+.

1.2. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA ABSORCION Y ASIMILACION DEL NITROGENO.

La fijación biológica del N atmosférico es llevada a cabo por distintos microorganismos libres o simbiontes que poseen un complejo enzimático denominado nitrogenasa (Mengel y Kirkby, 1978; Marschner, 1986). Este complejo, formado por 2 subunidades (una Fe-proteína y una Mo-Fe-proteína) cataliza la reducción de N_2 a NH_3 utilizando ferredoxina y/o flavodoxina como fuentes de poder reductor. El proceso requiere de ATP y, genéricamente, puede representarse según la sig. ecuación:

$$N_2 + 15\text{-}30\ ATP + 6\ Fd_{red} + 6\ H^+ \xrightarrow{6\ e^-} 2\ NH_3 + 15\text{-}30\ (ADP + Pi) + 6\ Fd_{ox}$$

La otra fuente importante de N proviene de la degradación de la materia orgánica del suelo. Dicho proceso es llevado a cabo por microorganismos heterotróficos que se encargan de la proteolisis y posterior amonificación de los grupos amino liberados. Del amoníaco producido, parte se perderá en la atmósfera y parte se retendrá en el suelo como sales de NH_4^+ (Mengel y Kirkby, 1978). El mismo puede ser directamente absorbido por las plantas o bien puede ser oxidado ya sea por reacción directa con el O_2 (si las condiciones ambientales lo permiten) o en forma biológica. Este último proceso se conoce como nitrificación (Haynes y Goh, 1978; Mengel y Kirkby, 1978; Salsac y col., 1987) e involucra 2 pasos: oxidación del NH_4^+ a

NO_2^- (llevada a cabo por bacterias del gro. Nitrosomonas) y oxidación del NO_2^- a NO_3^- (llevada a cabo por bacterias del gro. Nitrobacter). El proceso en conjunto conduce a una acidificación del medio y puede representarse de la sig. manera:

$$2\ NH_4^+ + 3\ O_2 \longrightarrow 2\ HNO_2 + 2\ H_2O + 2\ H^+$$

$$2\ HNO_2 + O_2 \longrightarrow 2\ H^+ + 2\ NO_3^-$$

$$2\ NH_4^+ + 4\ O_2 \longrightarrow 2\ NO_3^- + 4\ H^+ + 2\ H_2O$$

Si bien las plantas pueden absorber cualquiera de las 3 formas inorgánicas del N como así también moléculas orgánicas sencillas que lo contengan, el NO_3^- y el NH_4^+ son las fuentes de N más utilizadas (Kirkby, 1968; Maynard y Barker, 1969; Yoneyama y col., 1977; Haynes y Goh, 1978; Salsac y col., 1987).

En solución acuosa el NH_4^+ suele estar disociado en NH_3 + H^+ (pK= 9.21). Si bien el NH_3 puede difundir libremente a través de las biomembranas, en el rango de pH fisiológicos el equilibrio está desplazado hacia la especie iónica (Muller y col., 1990). Las membranas biológicas representan una barrera efectiva al pasaje de iones, constituyéndose en los sitios claves de selección y transporte de solutos. Ya desde la primer mitad de nuestro siglo, experimentos con células gigantes de algas (gros. Nitella y Valonia) demostraban claramente que estas concentraban nutrientes contra gradiente

del medio externo (Barceló Coll y col., 1983). De esta manera fue cobrando forma la hipótesis que plantea la existencia de algún mecanismo de bombeo de solutos mediante transportadores situados en el plasmalema y/o tonoplasto. La observación de que la cinética de absorción de determinados iones provistos a distintas concentraciones presentaba curvas de saturación, condujo a Epstein y su grupo (Epstein y Hagen, 1952; Elzam y Epstein, 1965) a desarrollar una teoría en la que se postulaba que el transporte de iones a través de las biomembranas sería formalmente equivalente a la relación entre una enzima y su sustrato. De esta forma la tasa de absorción de un ión sería dependiente de 2 factores principales: v_{max} (tasa máxima de transporte, alcanzable al saturarse todos los sitios de transporte disponibles para el ión) y Km (equivalente a la constante de Michaelis-Menten y que denota el grado de afinidad del sistema de transporte a diferentes especies iónicas). La interpretación de gráficos de isotermas de absorción fue motivo de la aparición de diferentes posturas respecto de la naturaleza y ubicación de los transportadores en la célula (Epstein, 1966; Osmond y Laties, 1968; Welch y Epstein, 1969; Nissen, 1973 a-b, 1974; Joseph y col. 1975; Bortslap, 1981; Kochian y Lucas, 1982; Ower y Cresswell, 1986). De todos modos se ha reconocido que una aplicación formal del modelo introducido por Epstein resulta demasiado mecanicista pues no toma en cuenta aspectos importantes de

autorregulación: Por ej. Km y/o V_{max} pueden variar con la edad o el estado nutricional de la planta (Huffaker y Rains, 1978; Clarkson y Hanson, 1980; Lee, 1982).

Desde el punto de vista termodinámico, el hecho de que un ión necesite de un mecanismo de transporte para atravesar las biomembranas no implica que dicho transporte sea activo. Para ello es necesario conocer tanto las concentraciones del mismo en los compartimientos que separa la membrana (gradiente de potencial químico) como así también el gradiente de potencial eléctrico de transmembrana. Las células vegetales se caracterizan por presentar una diferencia de potencial negativa con el medio externo gracias a la presencia de bombas electrogénicas (Spanswich, 1981). Las mismas son principalmente ATPasas asociadas a membranas que a través de la translocación de H^+ proveen la energía necesaria para el transporte de iones y moléculas orgánicas sencillas (aminoácidos, azúcares, etc.) (Marschner, 1986). Debido a la existencia de este potencial de transmembrana negativo y al hecho de que, en condiciones normales, el NH_4^+ no se acumula como tal en los tejidos (Givan, 1979) la absorción del mismo ha sido definida tradicionalmente como un proceso pasivo. No obstante, en un estudio reciente de los flujos y compartimentalización de NO_3^- y NH_4^+ en segmentos de raíces de *Allium cepa* utilizando ^{15}N, Macklon y col. (1990) señalan la existencia de absorción activa de NH_4^+ en dicha especie, al

menos en las condiciones experimentales empleadas. Respecto del transporte de NO_3^-, este requiere de energía pues debe realizarse en contra del gradiente eléctrico. A dicho gasto debe sumarse el hecho de que el NO_3^- puede acumularse rápidamente en la vacuola por lo que el potencial químico del anión suele ser considerablemente más elevado en el interior de la célula (Salsac y col., 1987).

La asimilación del NO_3^- es también un proceso energéticamente más costoso que la del NH_4^+ pues aquel debe ser previamente reducido para poder ser incorporado a esqueletos carbonados. La reducción del NO_3^- es llevada a cabo por 2 sistemas enzimáticos (Barceló Coll y col., 1983; Salsac y col., 1987):

a- Nitrato reductasa, que cataliza la reducción de nitrato a nitrito:

$$NO_3^- + NAD(P)H + H^+ \xrightarrow{2\ e^-} NO_2^- + NAD(P)^+ + H_2O$$

b- Nitrito reductasa, que utilizando Ferredoxina como dador de electrones reduciría al nitrito según la ecuación:

$$NO_2^- + 6\ Fd_{red} + 8\ H^+ \xrightarrow{6\ e^-} NH_3 + 6\ Fd_{ox} + 2\ H_2O + OH^-$$

El proceso en conjunto conduce a la alcalinización del medio y la obtención de poder reductor implica un consumo de ± 15 ATP.

Tanto el NH_4^+ procedente de la reducción del NO_3^- como el absorbido directamente del medio externo es rápidamente incorporado a esqueletos carbonados. Durante mucho tiempo se

pensó que la glutamato deshidrogenasa era la enzima clave responsable de dicho proceso. Dicha enzima catalizaría la incorporación de NH_3 a α-cetoglutarato para dar glutamato, utilizando NADH como agente reductor (Mengel y Kirkby, 1978; Barceló Coll y col., 1983; Marschner, 1986). Esta reacción no requiere gasto de ATP y es reversible. Estudios cinéticos de la GDH-NADH, sin embargo, indicaban que esta enzima requeriría altos niveles de amonio para ser activada dado su elevado Km para dicho ión. Considerando que tales niveles serían tóxicos, Lea y Miflin (1974) propusieron una vía alternativa en la que el amonio es primeramente incorporado a glutamato a través de la enzima glutamina sintetasa, cuya afinidad por el ión es superior a la de la GDH. La reacción conduce a la síntesis de glutamina la que sería utilizada como sustrato por la oxoglutarato-glutamina aminotransferasa para dar 2 moléculas de glutamato:

$$\text{Glu} + NH_3 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GS}} \text{Gln} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

$$\text{Gln} + \alpha\text{-cetoglutarato} + 2\,e^- \xrightarrow{\text{GOGAT}} 2\,\text{Glu}$$

$$NH_3 + \alpha\text{-cetoglutarato} + 2\,e^- + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glu} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

Ambas enzimas se encuentran en hojas (principalmente en cloroplastos) y en raíces (tanto en citoplasma como en proplastos).

Si bien esta vía es la más ampliamente difundida, trabajos más recientes sugieren que el rol de la GDH-NADH

puede ser subestimado en determinadas condiciones con lo cual vuelve a plantearse la polémica sobre el aporte relativo de ambas vías a la asimilación del NH_4^+ (Loyola Vargas y col., 1988; Magalhaes, 1991).

Tanto la glutamina como el ácido glutámico provenientes de la asimilación del amonio pueden ser utilizados por una amplia variedad de sistemas enzimáticos que distribuyen el N a otros compuestos (fig. 1).

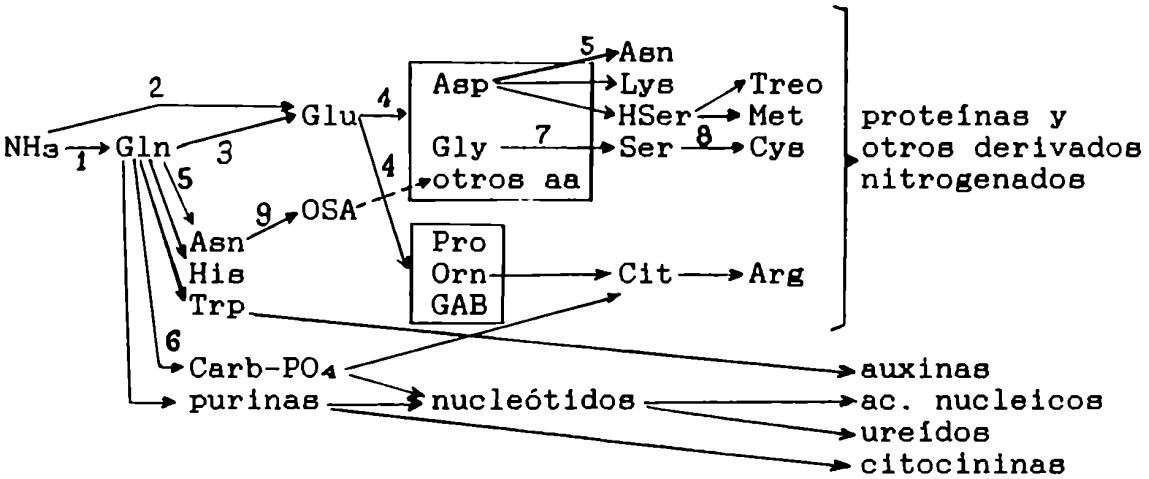

Fig. 1: Principales vías de asimilación de NH_3 y redistribución de N en plantas. 1, GS; 2, GDH; 3, GOGAT; 4, transaminasas; 5, Asn sintetasa; 6, carbamoil fosfato sintetasa; 7 y 8, metabolismo fotorrespiratorio; 9, asn-piruvato aminotransferasa. Carb-PO_4, carbamoil fosfato; GAB, ac. τ-aminobutírico; HSer, homoserina; OSA, ac. 2-oxosuccinámico. (Ta y col., 1984; Joy, 1988).

A pesar de la energía invertida en la asimilación del NH_4^+ y de la necesidad de mantener niveles endógenos bajos del ión, existen numerosas reacciones *in vivo* que liberan amonio a partir de distintos compuestos orgánicos. En particular el proceso de la fotorrespiración, la degradación de proteínas y aminoácidos y la utilización de diversos productos de transporte, suelen ir acompañados por liberación de NH_4^+ que deberá ser posteriormente reasimilado para evitar su acumulación. En la fig. 2 se representan las principales vías metabólicas que, sin estar directamente vinculadas al catabolismo de proteínas, pueden generar amonio libre.

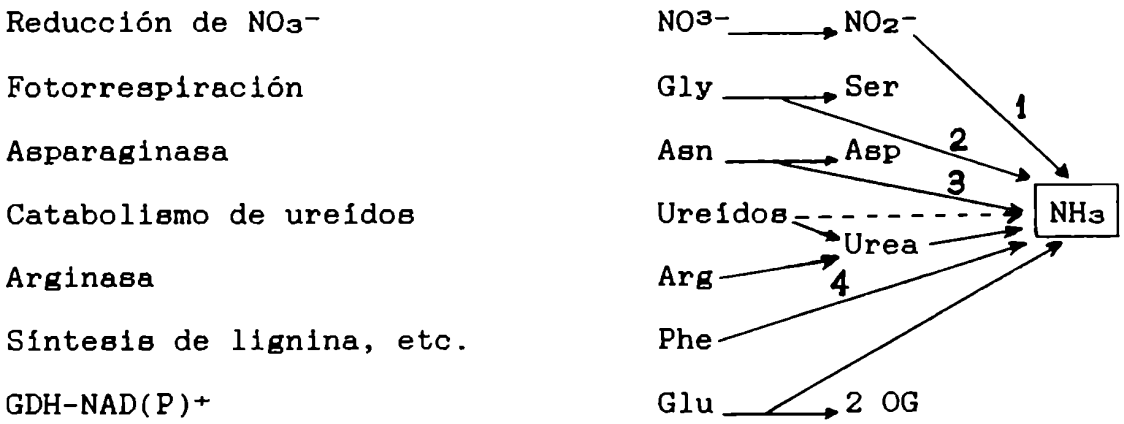

Fig. 2: Reacciones metabólicas que generan amonio libre en plantas. Algunas de estas reacciones dependen de la luz (1, reducción del nitrito; 2, metabolismo fotorrespiratorio) o están reguladas por ella (3, asparaginasa; 4, fenilalanina amonio liasa). OG, oxoglutarato; GDH-NAD(P)+, actividad desaminativa de la GDH. (Joy, 1988).

1.3. EFECTOS DE LAS FUENTES DE NITROGENO DURANTE SU ABSORCION Y ASIMILACION.

1.3.1. Efectos sobre el pH externo.

El pH de la solución nutritiva tiende a acidificarse cuando las plantas son cultivadas con NH_4^+ como única fuente de N, mientras que si se suministra NO_3^- el medio tiende a alcalinizarse (Barker y col., 1967; Kirkby y Mengel, 1967; Maynard y Barker, 1969; Raven y Smith, 1976; Mengel y col., 1983). Naftel (1931) observó que la absorción de NH_4^+ en plantas de algodón cultivadas hidropónicamente a distintos pH (rango 3.5-7.0) aumentaba a medida que el pH inicial era más alcalino, mientras que la absorción de NO_3^- era comparativamente muy poco afectada por los cambios de pH. Por otro lado, el mencionado autor y otros más recientes (Haynes y Goh, 1978; Peet y col., 1985) hacen referencia a que la máxima absorción de N total y los mayores rendimientos en peso ocurren cuando el pH de la solución de cultivo está comprendida en el rango de 5.5 y 6.0.

Los cambios de pH de la rizósfera pueden no solo afectar la selectividad de las membranas celulares sino provocar un deterioro e incluso la muerte de los tejidos cuando aquellos son extremos. Muchos de los síntomas de toxicidad observados en diferentes especies vegetales cultivadas con NH_4^+ se deben

precisamente a la acidificación del medio como consecuencia de su absorción (Maynard y Barker, 1969; Cox y Reisenauer, 1973; Raven y Smith, 1976; Peet ycol., 1985).

1.3.2. Efectos sobre la absorción de otras especies iónicas.

La absorción de NO_3^- sería considerablemente específica no siendo mayormente afectada por la presencia de otros aniones en el medio (Huffaker y Rains, 1978); por el contrario los cationes pueden modificarla significativamente: por ejemplo los mencionados autores observaron una aceleración de la absorción de NO_3^- en presencia de Ca^{++} sugiriéndose un efecto de enmascaramiento de las cargas negativas de la pared celular por dicho catión. La absorción de los cationes Ca^{++}, Mg^{++}, Na^+ y K^+ es mayor en plantas cultivadas con NO_3^- respecto de las tratadas con NH_4^+, mientras que las concentraciones de P y S son comparativamente menores (Barker y col., 1967; Harada y col., 1968; Kirkby, 1968; Maynard y Barker, 1969; Cox y Reisenauer, 1973; Breteler, 1973; Barneix, 1981; Wilcox y col., 1985).

Por su parte la presencia de NH_4^+ reduce la absorción de otros cationes (particularmente K^+) aunque, con el uso de concentraciones de amonio inferiores a 1 eq m^{-3}, un control estricto del pH externo parecería minimizar dicho efecto (Maynard y Barker, 1969; Peet y col., 1985). Asimismo varios

autores hacen referencia al efecto inhibidor del NH_4^+ sobre la absorción de NO_3^- aunque hay algunas divergencias sobre el mecanismo implicado (Haynes y Goh, 1978; Huffaker y Rains, 1978; Rufty y col., 1982; Macklon y col., 1990).

1.3.3. Efectos sobre el pH y balance eléctrico endógenos.

En la sección 1.2. se hizo mención a los cambios de pH que ocurren durante la asimilación de NO_3^- o NH_4^+. Sin embargo las consecuencias de este hecho no son idénticas en todas las plantas pues los sitios de asimilación varían según las especies consideradas.

Estudios en plantas cultivadas con distintas fuentes de N indicarían que el NH_4^+ provisto exógenamente es asimilado principalmente en las raíces (Raven y Smith, 1976; Haynes y Goh, 1978; Ikeda y Yamada, 1978; Arnozis y Barneix, 1986; Salsac y col., 1987), mientras que la asimilación del NO_3^- puede realizarse tanto en raíz como en hojas, dependiendo de la especie estudiada (Raven y Smith, 1976; Yoneyama y col., 1977; Haynes y Goh, 1978; Huffaker y Rains, 1978; Mengel y col., 1983, Salsac y col., 1987). No obstante debe tenerse en cuenta que tanto la fotorrespiración como otras vías metabólicas (fig. 2) generan amonio libre en parte aérea que debe ser asimilado *in situ*.

A fin de contrarrestar los cambios de pH endógeno y mantener el equilibrio eléctrico celular durante la absorción y asimilación de N, las plantas disponen de diferentes mecanismos biofísicos y bioquímicos. En los casos en que la asimilación de N ocurre principalmente en las raíces, el bombeo de H^+ o HCO_3^- al medio externo se constituye en una de las principales vías de restauración del equilibrio eléctrico celular (Naftel, 1931; Kirkby, 1967; Kirkby y Mengel, 1967; Harada y col., 1968; Breteler, 1973; Raven y Smith, 1976; Huffaker y Rains, 1978; Keltjens, 1981). En los casos en que el exceso de carga no pueda ser directamente eliminado a la solución externa, la célula puede acumular distintas especies iónicas en la vacuola (Raven y Smith, 1976). Sin embargo dicha acumulación de solutos, amén de ser limitada por el volúmen vacuolar, acarrearía serios problemas osmóticos por lo que la célula dispone además de distintos mecanismos bioquímicos tales como: Neutralización de cargas a través de la síntesis de sales poco solubles (ergo con poca incidencia sobre el equilibrio osmótico) o síntesis/degradación de ácidos orgánicos no volátiles (Breteler, 1973; Raven y Smith, 1976; Allen y Raven, 1987). Con respecto a este último mecanismo se ha propuesto una vía metabólica en la que 2 enzimas estarían principalmente involucradas: la PEP-carboxilasa y la enzima málica (Ben Zioni y col., 1970; Davies, 1973; Davies, 1979). La primera se activaría al aumentar el pH celular y

sintetizaría oxalacetato (un diácido) a partir de PEP y CO_2. La segunda enzima, por el contrario, tendría su máxima actividad a pH ácido y catalizaría la decarboxilación de malato (pudiendo este provenir de la reducción de oxalacetato) a piruvato.

En plantas cultivadas con NH_4^+ se observa un rápido descenso de la concentración de carboxilatos y una mayor acumulación de aminoácidos ácidos, aminas y amidas que en plantas cultivadas con NO_3^- (Kirkby, 1968; Harada y col., 1968; Van Egmond, 1971; Yoneyama y col., 1977; Ikeda y Yamada, 1978; Matsumoto y Tamura, 1981; Arnozis y Barneix, 1986; Causin y Arnozis, 1988; Ikeda y col., 1992). Esto sería consecuencia de la utilización de cetoácidos para la incorporación del amonio a formas orgánicas a fin de evitar su acumulación en los tejidos.

Si bien de acuerdo al mecanismo antes propuesto cabría esperar que durante la asimilación del NH_4^+ la actividad de la PEP-carboxilasa disminuyese como consecuencia de la acidificación del medio, se ha observado en numerosas especies que tanto la fijación de CO_2 en oscuridad como la actividad misma de la enzima es estimulada por la nutrición con NH_4^+ (Givan, 1979; Arnozis y Barneix, 1986; Dahlbender y Strack, 1986; Muller y col., 1990; Vona y col., 1992). La provisión de esqueletos carbonados por esta vía alternativa constituye una adaptación a la nutrición con amonio, sin embargo el mecanismo

por el cual el mismo la estimula es aún motivo de controversias.

1.3.4. Efectos sobre el crecimiento y desarrollo.

Las distintas formas nitrogenadas afectan marcadamente el crecimiento vegetal. Diversos autores han reportado una disminución en el crecimiento en plantas tratadas con NH_4^+ como única fuente de N respecto de plantas cultivadas con NO_3^- (Naftel, 1931; Barker y col., 1967; Harada y col., 1968; Kirkby, 1968; Matsumoto y Tamura, 1981; Rufty y col., 1982; Allen y Smith, 1986; Arnozis y Barneix, 1986; Bowman y Paul, 1988, Causin y col., 1992). Análogamente el pasaje de un medio con NO_3^- a uno con NH_4^+ puede provocar en plazos relativamente cortos una disminución del peso seco total en ciertas especies vegetales (Harada y col., 1968; Kirkby, 1968; Haynes y Goh, 1978; Huffaker y Rains, 1978; Causin y Arnozis, 1988). Sin embargo en algunos casos este efecto deletéreo ha podido evitarse cultivando a las plantas en soluciones diluídas de NH_4^+ bajo estricto control del pH externo, existiendo además numerosas especies en las que el amonio es indispensable para obtener un óptimo de crecimiento (Maynard y Barker, 1969; Breteler, 1973; Haynes y Goh, 1978; Ta y col., 1981; Peet y col., 1985; Wilcox y col., 1985; Salsac y col., 1987). Asimismo la provisión simultánea de NH_4^+ y NO_3^- puede mejorar

el crecimiento en diversas especies tales como algodón (Naftel, 1931), trigo (Cox y Reisenauer, 1973; Reisenauer, 1978), crisantemo (Elliot y Nelson, 1983) y remolacha (Causin y Arnozis, 1988).

Además de los mencionados efectos sobre el crecimiento, algunos autores han reportado una aceleración en el ciclo normal de desarrollo de ciertas especies vegetales cultivadas con NH_4^+ respecto de controles con NO_3^- (Leyshon y col., 1980; Causin y col., 1994). El mecanismo por el cual se produce dicho efecto aún no ha sido convenientemente aclarado.

1.4. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA REGULACION DE LA ABSORCION DE AMONIO. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

En la sección 1.2. se ha mencionado que el transporte de iones a través de las biomembranas solo puede llevarse a cabo por medio de canales o transportadores específicos asociados a ellas. El análisis de la cinética de absorción de iones en solución acuosa, tanto en plantas intactas como escindidas, ha sido tradicionalmente el principal método utilizado para dilucidar las propiedades de tales sistemas. Si bien la reciente aparición de sofisticadas técnicas que permiten el aislamiento y estudio de canales iónicos específicos ha obligado a la reinterpretación de algunos conceptos tradicionales (Hedrich y Schroeder, 1989), dicho enfoque sigue siendo de inestimable ayuda para la comprensión de los mecanismos de autorregulación presentes en las plantas. En los estudios de cinética de absorción es frecuente el uso de plantas con distinto "status nutricional". La deficiencia de un nutriente mineral provoca cambios metabólicos cuya magnitud y gravedad dependen tanto del tipo de nutriente como del período de deficiencia. En general se ha observado que la supresión de un determinado nutriente por períodos de 1 o más días determina un incremento en la absorción del mismo con respecto a plantas crecidas con suministro contínuo (Clarkson y Hanson, 1980; Lee, 1982). Tal efecto también se pudo

observar con las distintas fuentes de N (Lee, 1982; Lee y Rudge, 1986; MacKown, 1987; Bowman y Paul, 1988; Clarkson y col., 1989; Rodgers y Barneix, 1989; Rufty y col., 1990).

Uno de los fenómenos que suele presentarse en los experimentos con plantas deficientes es la aparente inducción del transportador por la presencia del sustrato. Varios autores han mencionado este fenómeno para el ión nitrato (Jackson y col., 1972; Lee, 1982; Lee y Rudge, 1986) o nitrito (Goyal y Huffaker, 1986), pero con respecto al amonio existen controversias. Por un lado en trabajos tanto con organismos inferiores como con varias especies de plantas vasculares se observa que la absorción de NH_4^+ no es precedida por una fase lenta de inducción, sino que se caracterizaría por una corta fase inicial de rápida absorción seguida por una fase lineal más lenta (Minotti y col., 1969; Ulrich y col., 1984; Schlee y Komor, 1986). Por el contrario Goyal y Huffaker (1986) mencionan la aparición de una fase de inducción en plantas de trigo deficientes en N al cabo de aproximadamente 120 min. de exposición al amonio.

Si bien algunas de las propiedades de los transportadores de NO_3^- y NH_4^+ parecerían diferentes, el hecho de que la absorción de ambos se vea incrementada tras un período de cultivo sin N ha llevado a algunos autores a postular que la regulación de la absorción de ambos iones se daría básicamente por el mismo mecanismo (Lee y Rudge, 1986). No obstante la

forma en que tal regulación se ejerce no ha sido completamente esclarecida.

En distintos estudios utilizándose NO_3^- como fuente de N se ha observado que la absorción del mismo depende de diversos factores tales como: concentración interna del ión (Jackson y col., 1976; MacKown y col., 1981; Breteler y Nissen, 1982), el nivel de compuestos nitrogenados en los tejidos (Lee y Rudge, 1986) y el contenido endógeno de carbohidratos (Mengel y Viro, 1978; Arnozis y col., 1988). También se ha observado que la provisión de ciertos aminoácidos puede ejercer un efecto inhibidor sobre la absorción del ión (Doddema y Otten, 1979; Breteler y Arnozis, 1985; Muller y Touraine, 1992; Rodgers y Barneix, 1993), sugiriéndose que estas formas nitrogenadas podrían ejercer un rol importante en el proceso de regulación.

Uno de los efectos más comunmente observados en plantas cultivadas con amonio como única fuente de N es el descenso en el contenido de aniones totales, siendo los ácidos orgánicos (carboxilatos) los más afectados (ver sección 1.3.3.). Algunos autores proponen que esta disminución neta de cargas negativas podría ejercer un efecto regulador sobre la absorción del NH_4^+ y otros cationes en general. Si bien este fenómeno ha de ser tenido en cuenta, existe numerosa evidencia de que no es el único factor involucrado en el proceso de regulación. En efecto, al igual que para el ión NO_3^-, la absorción neta de NH_4^+ en plantas cultivadas en ausencia de N disminuye cuando

estas son previamente expuestas a un medio conteniendo N, independientemente de la forma en que este sea provisto (Minotti y col., 1969; Clarkson y Hanson, 1980; Goyal y Huffaker, 1986). Para explicar este hecho se han postulado diversas hipótesis: Por un lado algunos autores, trabajando con bacterias, han encontrado que el aumento de la concentración interna de amonio libre inhibe la absorción de metil amina, un análogo estructural del NH_4^+ (Kleiner y Fitzke, 1981; Alef y Kleiner, 1982). Sin embargo el uso de metil amina como sustrato en estudios de cinética de absorción ha sido cuestionado puesto que la absorción de aquella no siempre es equiparable a la del amonio y además puede ser utilizada como sustrato por la enzima GS. Esta última observación es importante pues plantea la cuestión de si es la disponibilidad de sitios de transporte del metil amonio a través del plasmalema o algún producto de su metabolismo el factor que regula su velocidad de absorción (Barnes y Zimniak, 1981; Barnes y col., 1983).

Por otro lado, trabajos realizados en plantas superiores parecen indicar que el nivel de amonio libre endógeno no sería el principal factor que controla la absorción del ión, sugiriéndose la intervención de algún metabolito nitrogenado derivado de su asimilación (Morgan y Jackson, 1988 a). Finalmente otros autores consideran que la absorción estaría regulada principalmente por el status de N total de la planta

y no por la acción de alguna fuente nitrogenada en particular (Presland y Mc Naughton, 1986; Lee y Rudge, 1986; Di Martino Rigano y col., 1987 a-b).

Debido a la diversidad de opiniones existentes, particularmente a lo referente al rol de los niveles de N endógeno como factor regulador, en el presente trabajo de tesis se han abordado los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto de la variación del tiempo de incubación y de la concentración externa de distintas fuentes de N sobre la absorción neta de NH_4^+ en trigo.
- Determinar si existen correlaciones entre la tasa de absorción neta y la concentración de N total, NH_4^+ libre y aminoácidos libres endógenos.
- Estudiar el efecto de la provisión exógena de distintos metabolitos derivados de la asimilación del NH_4^+ sobre la absorción neta y metabolismo del ión.
- En base a los resultados, elaborar un posible modelo que explique el mecanismo a través del cual el nivel endógeno de N puede ejercer un efecto regulador sobre la absorción neta de NH_4^+.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL.

Se trabajó con plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) cv. Klein dorado, cuyas semillas fueron facilitadas por el criadero Klein S.A.

2.2. CONDICIONES AMBIENTALES.

Tanto el cultivo de plantas como los distintos experimentos se realizaron en condiciones de hidroponia en una cámara iluminada artificialmente con 14 lámparas HPL de 400 w. La temperatura se mantuvo constante a 22 ± 2°C. El fotoperíodo fue de 16 hs. de luz y 8 de oscuridad, siendo la radiación fotosintéticamente activa de 160 µmol cm^{-2} seg^{-1}.

2.3. SOLUCIONES NUTRITIVAS.

A fin de obtener plantas deficientes en N las mismas se cultivaron en una solución de la siguiente composición:
Macronutrientes (eq m^{-3}): KCl, 1.00; $CaSO_4$, 0.50; KH_2PO_4, 0.50; $MgSO_4.7H_2O$, 0.25.
Micronutrientes (meq m^{-3}): H_3BO_3, 6.25; $MnSO_4.H_2O$, 0.50; Fe (como Fe-EDTA), 0.50; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.50; $CuSO_4.5H_2O$, 0.13; Na_2MoO_4, 0.13.

Esta solución, con el agregado de $CaCO_3$ (0.50 eq m^{-3}) y

$Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$ (0.50 eq m^{-3}) como tampones, se utilizó como solución basal (s.b.) durante la medición de la absorción neta de NH_4^+ o en aquellos tratamientos en los que se pudieran prever cambios significativos del pH externo.

El amonio fue provisto como $SO_4(NH_4)_2$, salvo en aquellos experimentos en los que se indique la fuente específicamente utilizada.

Las soluciones nutritivas fueron constantemente aireadas y el pH de las mismas se mantuvo entre 6.3 ± 0.2 mediante el agregado de H_2SO_4 o KOH cuando fuese necesario.

En la preparación de las soluciones se utilizó agua desmineralizada con una conductividad menor a 5.0 µmos.

2.4. CULTIVO DE PLANTAS.

Los cariopses de trigo fueron desinfectados durante 10 minutos en H_2O_2 10% (v/v), enjuagados y puestos a germinar sobre papel de filtro humedecido con agua destilada, en oscuridad, durante 48 hs. Una vez germinadas las plántulas se transfirieron a mallas de acero inoxidable dispuestas sobre tanques de 40 l. conteniendo una solución de 0.50 eq m^{-3} de $CaSO_4$ a fin de inducir un mayor alargamiento de las raíces. Al cabo de 48 hs. dicha solución fue remplazada por una solución nutritiva sin N. La misma fue renovada periódicamente o remplazada acorde a los distintos tratamientos. Para la

aplicación de los mismos se tomaron grupos homogéneos de 10 a 15 plantas los que posteriormente se insertaron en placas acrílicas perforadas, ubicadas sobre los recipientes con las soluciones nutritivas, utilizándose anillos de espuma de poliéster.

A lo largo del presente trabajo de tesis he utilizado frecuentemente los términos de plantas "deficientes en N" o "hambreadas" para designar a aquellas plantas que no recibieron aporte de N exógeno hasta al menos 24 hs. antes de iniciado el período de medición de la absorción de NH_4^+.

2.5. MEDICION DE LA ABSORCION NETA DE AMONIO.

La absorción neta de NH_4^+ se midió por desaparición del ión de la solución de cultivo. Se utilizaron macetas plásticas con tapas perforadas sobre las que se dispusieron los grupos de plantas a razón de 40 plantas/200 ml de solución. Previo a la transferencia a dichas macetas y con el fin de minimizar posibles modificaciones en la soluciones por efecto de los pretratamientos, las raíces fueron enjuagadas en agua desmineralizada y luego en s.b. sin N o conteniendo NH_4^+ en una concentración adecuada, dependiendo del diseño experimental.

Una vez transferidas a las macetas, las plantas se dejaron equilibrar durante 15 min. en las respectivas

soluciones antes de iniciar los muestreos. Los mismos se realizaron durante períodos de 2 a 4 hs., tomándose alícuotas de 1.0 ml a los intervalos indicados en las respectivas figuras. Previo al inicio y/o al final del período de absorción, parte del material vegetal fue cosechado, se enjuagaron las raíces en agua desmineralizada y luego de secarlas cuidadosamente se separaron de la parte aérea descartándose los restos de cariopse. Se determinó el peso fresco de cada fracción y luego se procesó según lo indicado en las diferentes técnicas analíticas.

La absorción neta de NH_4^+ se expresó por gramo de peso fresco de raíz y en los cálculos se tomó en cuenta la tasa de evapotranspiración. La misma se estimó mediante la diferencia en el peso de las macetas al inicio y al final de los muestreos, teniéndose en cuenta el volúmen perdido a causa de los mismos.

Cuando se menciona, la tasa o velocidad de absorción neta de NH_4^+ fue estimada con datos provenientes de los primeros 90-120 min. de muestreo a fin de evitar cambios debidos a un excesivo consumo del amonio en solución (Goyal y Huffaker, 1986).

2.6. MEDICION DE LA ABSORCION NETA DE POTASIO.

En algunos experimentos fue necesario estimar la

absorción neta de K^+, para lo cual se siguió básicamente la misma metodología descripta en el punto 2.5. La principal diferencia consistió en que el material de vidrio en el que se recolectaron las muestras fue previamente tratado con HCl 5% a fin de eliminar posibles trazas del ión.

2.7. TECNICAS ANALITICAS.

2.7.1. Determinación de N total en tejidos vegetales.

Para la determinación de la concentración de nitrógeno en los tejidos se utilizó la técnica de destilación por arrastre con vapor de N reducido (micro-Kjeldahl). Para ello, 0.1 g de material seco fueron previamente digeridos con 2.0 ml de H_2SO_4 concentrado a 400°C y posterior agregado de H_2O_2 hasta total clarificación. Luego de diluir las muestras con H_2O bidestilada, se tomaron alícuotas de 1.0 ml y se destilaron previo agregado de 0.5 ml de NaOH 50% (p/v). El destilado se recogió en 2.0 ml de ácido bórico 2% + indicador (azul de metileno, 50 mg/l metanol + rojo de metileno, 100 mg/l metanol; 15 ml/l ác. bórico) y se tituló con H_2SO_4 valorado.

2.7.2. Determinación de amonio en la solución de cultivo.

La concentración de amonio en solución fue determinada

colorimetricamente mediante la reacción con fenolato de Berthelot (Cataldo y col., 1974; Patton y Crouch, 1977).

2.7.3. Determinación de amonio en tejidos vegetales.

Para la extracción del amonio libre, 1.0 g de tejido (ya sea fresco o conservado a -18°C) se homogeinizó a 4°C en un mortero conteniendo 5.0 ml de H_2O destilada o bien etanol 70% (llevado a pH 3 con HCl), utilizándose arena de cuarzo como abrasivo. Este último solvente se usó especialmente en aquellos experimentos en los que las plantas fueron tratadas exógenamente con distintos aminoácidos y amidas a fin de reducir el riesgo de hidrólisis de los mismos durante el proceso de extracción (Morgan y Jackson, 1988 b).

El homogenato se filtró y la concentración de amonio en el extracto crudo se determinó según los siguientes métodos, dependiendo del diseño experimental:

I- <u>Método colorimétrico</u>

Se utilizó la reacción con fenolato según se indica en la sección 2.7.2.

II- <u>Método titrimétrico</u>

En este método el amonio libre es previamente oxidado a NH_3 y extraído mediante destilación. Para ello, a un volúmen dado del extracto se agregó igual volúmen de una solución buffer pH 11 (216 ml NaOH 1.0 N + 202 ml $Na_2B_4O_7.10\ H_2O$ 0.5 M)

colocándose inmediatamente a la muestra en un destilador para Kjeldhal. El destilado se recogió en ácido bórico 2% + indicador (2.7.1.) y se tituló con H_2SO_4 valorado.

2.7.4. Determinación de aminoácidos y amidas libres endógenas.

La concentración de aminoácidos y amidas libres totales en extractos acuosos o etanólicos (sección 2.7.3.) se determinó colorimétricamente utilizando un reactivo con ninhidrina (Yemm y Cocking, 1955). Previo al inicio de la reacción se precipitaron las proteínas mediante el agregado de 1.3 ml TCA 10% a 0.1 ml de extracto + 3.1 ml H_2O. Las muestras se dejaron en hielo durante 20 min., se centrifugaron 15 min. a 650 g y se utilizó el sobrenadante para la reacción colorimétrica.

2.7.5. Determinación de glutamina y asparagina endógenas.

La concentración de gln y asn en raíces se determinó utilizando la acción secuencial de enzimas específicas, según la metodología descripta en el catálogo Boehringer Mannheim (1983). La determinación se realizó en extractos etanólicos (sección 2.7.3.) a los que se precipitó previamente las proteínas según la siguiente metodología: 0.5 ml del extracto + 1.0 ml de ácido perclórico 1.0 M se enfriaron en hielo

durante 10 min., agregándose posteriormente 0.5 ml de KOH 2.0 M. Las muestras se dejaron nuevamente en hielo durante 10 min., se centrifugaron 10 min.a 650 g y se utilizó el sobrenadante para la determinación de las amidas.

2.7.6. Medición de la actividad *in vitro* de la enzima GS.

La actividad de enzima GS se determinó mediante la formación de glutamil-hidroxamato por reacción de la gln con hidroxilamina en presencia de la enzima y ATP (Rhodes y col., 1975). La enzima se extrajo moliendo 1.0 g de tejido fresco + 5.0 ml de buffer de extracción (Rhodes y col., 1975) en un mortero, sobre hielo. El homogenato se filtró, se centrifugó a 1000 g durante 5 min. y el sobrenadante fue utilizado como extracto crudo de la enzima en la mezcla de reacción.

2.7.7. Medición de la actividad aminativa y desaminativa *in vitro* de la enzima GDH.

Las actividades NADH y NAD^+-dependientes de la GDH se determinaron según Singh y Srivastava (1983). La enzima se extrajo moliendo 0.9 g de tejido fresco + 3.0 ml de buffer de extracción en un mortero, sobre hielo. El homogenato se filtró, se centrifugó en frío a 6000 g durante 45 min. y se utilizó el sobrenadante como extracto crudo de la enzima en la

mezcla de reacción.

2.7.8. Medición de la actividad *in vitro* de la enzima PEP-carboxilasa.

La actividad de la enzima PEP-carboxilasa se midió según la metodología de Ikeda y Yamada (1981). La extracción de la enzima se realizó moliendo 1.0 g de tejido fresco + 2.0 ml de buffer de extracción + 30 mg de PVPP en un mortero, sobre hielo. El homogenato se filtró, se centrifugó en frío a 25000 g durante 20 min. y se utilizó el sobrenadante como extracto crudo de la enzima en la mezcla de reacción.

2.7.9. Determinación de potasio en la solución de cultivo.

La concentración de K^+ en la solución nutritiva se midió en un espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 503.

2.7.10. Análisis estadístico.

Los datos presentados en las diferentes tablas y figuras corresponden a medias de al menos 3 repeticiones con sus respectivos errores estándar. Los datos fueron analizados mediante el test de Tukey de análisis de varianza. Las cifras indicadas en las tablas con distintas letras difieren

significativamente a $p < 0.05$.

3 - RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACION DE LA ABSORCION DE AMONIO EN PLANTAS DEFICIENTES EN N Y EN PLANTAS PRETRATADAS CON NITRATO O AMONIO.

3.1.1. Caracterización de la absorción neta de NH_4^+ en plantas de trigo cultivadas en ausencia de N.

Cuando una planta es privada de un determinado nutriente por un período de tiempo tal que su crecimiento no sea afectado significativamente, la absorción del mismo es mayor que en plantas a las que dicho nutriente fue provisto de manera contínua (Clarkson y Hanson, 1980; Lee, 1982; Goyal y Huffaker, 1986; Lee y Rudge, 1986; Clarkson y col., 1989; Lee y col., 1992). Sin embargo uno de los fenómenos que suele presentarse en experimentos con plantas deficientes en N es que cuando estas son transferidas a soluciones con determinadas fuentes del mismo, aparece una fase inicial de absorción lenta atribuída generalmente a la inducción del sistema de transporte por la presencia del sustrato. Este hecho ha sido observado en el caso de los iónes NO_3^- y NO_2^-, pero existen controversias sobre su existencia en el caso del NH_4^+ (1.4.).

Dado que es importante caracterizar dicha fase de inducción para poder realizar cualquier estudio cinético, el objetivo de este primer experimento fue determinar si en las

condiciones experimentales utilizadas existe tal fase en el material vegetal de estudio.

- Experimento I: Se utilizaron plantas de trigo de 10 días cultivadas sin N según lo descripto en la metodología general.

Las mismas fueron divididas en 4 grupos y transladadas a sendos recipientes conteniendo 790 ml de una solución nutritiva sin N, aireada. El sistema se dejó estabilizar durante 30 min. y se añadieron luego 10 ml de una solución estándar de $SO_4(NH_4)_2$ a fin de obtener una concentración final de 3.0 eq m^{-3} de NH_4^+. A los 5 min. se inició el muestreo periódico por un período total de 6 hs., tomándose por duplicado alícuotas de 0.5 ml de cada recipiente.

Finalizado el muestreo las plantas fueron procesadas según se describe en la metodología general.

En la fig. 3 se representaron la absorción neta acumulativa y las variaciones de la concentración externa y la tasa de absorción neta de NH_4^+ en función del tiempo. Tal como puede observarse, en los intervalos de tiempo considerados no existe una fase inicial de inducción sino que, por el contrario, la velocidad de absorción es máxima al comienzo del período de medición y va disminuyendo hasta hacerse constante al cabo de aproximadamente 120 min. La tasa de absorción neta

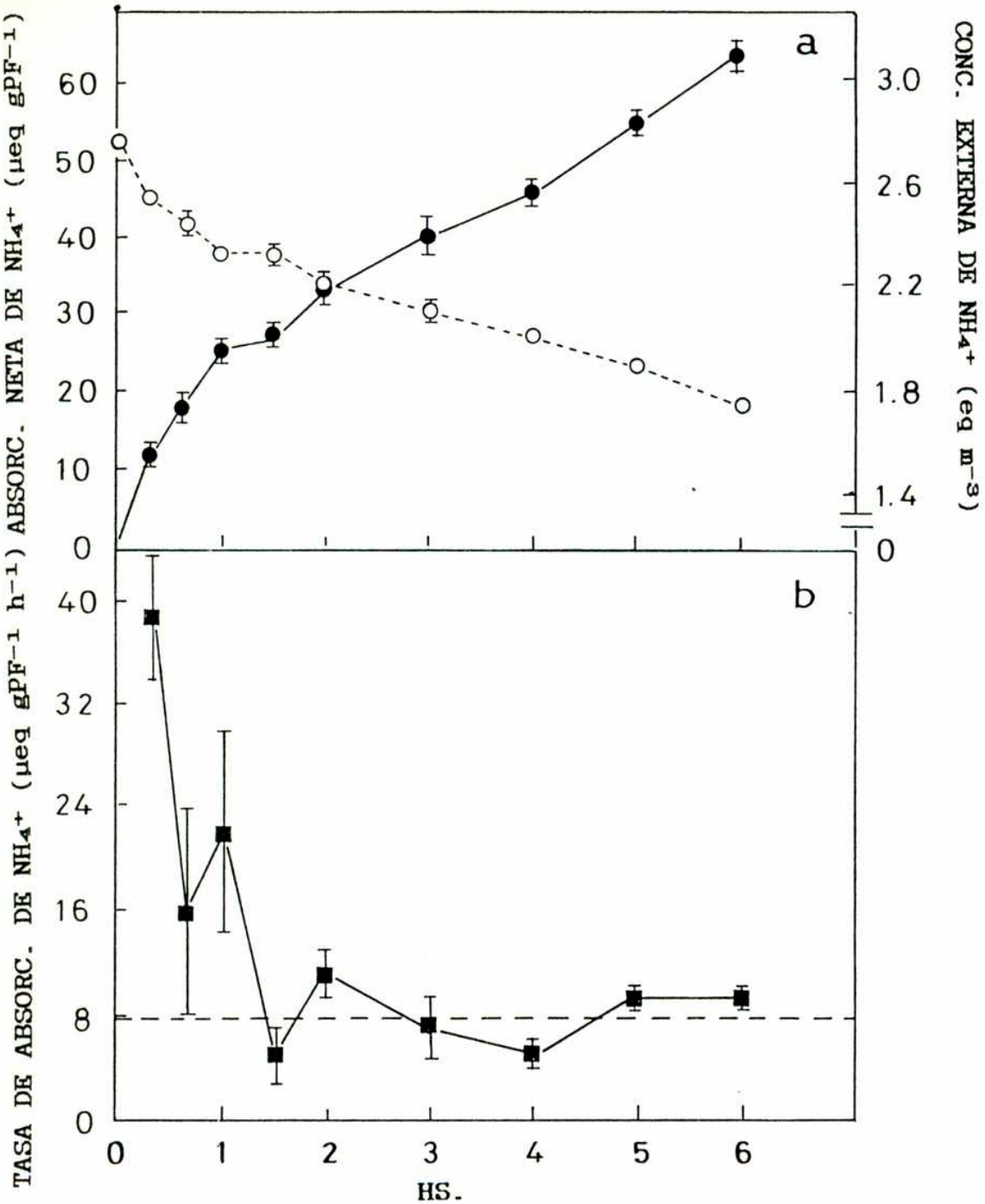

Fig. 3: a- Absorción neta (acumulativa) (●) y concentración externa de NH_4^+ (o) y b- Variación de la tasa de absorción neta de NH_4^+ (■) en plantas de trigo de 10 días cultivadas en ausencia de N (Exp. I). Las barras verticales representan ± error estándar.

en la fase lineal se estimó en 7.9 ± 1.1 μeq g^{-1} h^{-1}.

Como se verá a lo largo del presente trabajo, el tiempo transcurrido desde el inicio del período de medición hasta que el sistema se halle en equilibrio estacionario (velocidad de absorción neta constante) puede variar según las características del diseño experimental utilizado. En otros trabajos con plantas deficientes en N también se ha informado la aparición de una fase de descenso de la absorción de NH_4^+ durante los primeros 60-120 min. de exposición al ión, aunque no hay unanimidad en lo que respecta a la descripción de dicha fase (Lycklama, 1963; Minotti y col., 1969; Goyal y Huffaker, 1986). Uno de los principales inconvenientes reside en el hecho de que tal efecto sería en realidad la resultante de la interacción de varios factores tales como: llenado del espacio libre aparente (espacio libre externo + sitios de intercambio catiónico) (Minotti y col., 1969; Epstein, 1972), saturación de sitios de transporte existentes en forma constitutiva, inducción o inhibición de la síntesis y/o actividad de transportadores. La metodología empleada en el presente trabajo de tesis no permite abordar estudios cinéticos de compartimentalización; sin embargo en todos los experimentos el sistema se dejó equilibrar durante un tiempo superior al requerido para el llenado del espacio libre externo (Goyal y Huffaker, 1986) a fin de que pudiese despreciarse el efecto de dicha variable sobre la tasa de absorción neta de NH_4^+.

Con respecto a la influencia del llenado de los sitios de intercambio catiónico, no debe descartarse que dicha componente haya contribuído en parte al descenso inicial de la absorción neta de NH_4^+. Si bien no ha podido determinarse con exactitud la magnitud de este efecto, se ha informado que en plantas de trigo de 8 a 10 días tales sitios se saturarían durante los primeros 60 min. de exposición a 1.0 eq m-3 del ión (Goyal y Huffaker, 1986). En nuestro caso dicha saturación probablemente se haya producido en menor tiempo pues se utilizó una solución con el triple de la concentración de NH_4^+ de la arriba mencionada. En el mismo trabajo los autores mencionan un posterior aumento de la tasa de absorción neta de NH_4^+ hasta que la misma se estabiliza al cabo de aproximadamente 5 hs. de iniciado el período de medición.

Dicho efecto, atribuído a la inducción de la síntesis y/o actividad de los sistemas de transporte del NH_4^+, no fue observado en nuestras condiciones experimentales. No obstante creo conveniente mencionar que en estudios cinéticos recientes con el uso de ^{15}N, los resultados de algunos autores sugieren que el ión NH_4^+ podría ejercer un efecto inductivo sobre la tasa de influjo del mismo (Morgan y Jackson, 1988 b; Jackson y Volk, 1992).

En las secciones siguientes se procedió a estudiar con más detalle el posible rol del ión NH_4^+ y otros compuestos nitrogenados en la regulación de la absorción neta de NH_4^+ en

trigo.

3.1.2. Estudio del efecto del pretratamiento con NO_3^- o NH_4^+ sobre la absorción neta de NH_4^+, medida en presencia o en ausencia de NO_3^-.

Como se mencionara anteriormente, la absorción neta de los iones nitrogenados varía según las plantas hayan o no sido expuestas a alguna fuente de N. A continuación se describirán una serie de experimentos en los que se estudió el efecto de la provisión de NO_3^- y/o NH_4^+ como fuentes de N sobre la tasa de absorción neta de NH_4^+ y su posible correlación con la variación de distintos componentes nitrogenados endógenos.

- Experimento II: En este experimento se utilizaron plantas de 10 días cultivadas en ausencia de N o tratadas durante 40 hs. con $Ca(NO_3)_2$ o $SO_4(NH_4)_2$ (concentración de N= 1.3 eq m^{-3}). En cada caso las plantas se dividieron en 2 grupos y se transfirieron a recipientes de 200 ml en donde se midió la absorción neta de NH_4^+, provisto con SO_4^{2-} o NO_3^- como aniones acompañantes (concentración inicial de NH_4^+= 1.3 eq m^{-3}). Previo a la transferencia, parte del material vegetal fue cosechado, separado en raíz y parte aérea y procesado para la determinación de la concentración de N total, NH_4^+ libre y aminoácidos totales libres.

En las condiciones experimentales empleadas, la tasa de

absorción neta de NH_4^+ en las plantas deficientes en N se mantuvo aproximadamente constante durante todo el período de medición, independientemente del anión acompañante (fig. 4, tabla 1). La velocidad de absorción neta en ausencia de NO_3^- en las plantas cultivadas con NO_3^- o NH_4^+ resultó aproximadamente un 50% inferior a la del tratamiento control, no observándose diferencias significativas con relación a la fuente de N utilizada (fig. 4, tabla 1). Esta disminución de la tasa de absorción de amonio no es atribuíble a las variaciones en el crecimiento de las plantas pues:

-La biomasa radical del tratamiento control solo superó en un 7.4% a la de las plantas pretratadas con NO_3^- y en un 17.7% a la del tratamiento con NH_4^+ (tabla 1).

-La relación biomasa parte aérea/biomasa raíz fue aproximadamente un 20% inferior en las plantas hambreadas respecto de las plantas tratadas con alguna de las fuentes de N. Frente a biomasas radicales comparables, una reducción en la superficie de transpiración debería contribuir a una disminución en la tasa de absorción de iones, más que a un incremento de la misma.

La presencia exógena de NO_3^- no afectó a la absorción neta de NH_4^+, salvo en las plantas cultivadas con NO_3^- en las que se registró un descenso en la absorción de NH_4^+ a partir de los 150 min. de iniciado el período de medición (fig. 4).

La concentración de N total en raíz no difirió

significativamente entre las plantas pretratadas durante 40 hs. con NO_3^- o NH_4^+, aunque en promedio fue un 41% superior a la de las plantas deficientes en N (tabla 2). En parte aérea, solo las plantas cultivadas con NH_4^+ presentaron una mayor concentración de N que el control.

La concentración de aminoácidos totales libres en raíz fue significativamente mayor en las plantas cultivadas con NH_4^+ que en los tratamientos restantes, mientras que la concentración de NH_4^+ libre difirió en los 3 casos (NH_4^+ > NO_3^- > control) (tabla 2). En parte aérea solo la concentración de aminoácidos libres difirió significativamente entre tratamientos (NH_4^+ > NO_3^- > control).

Debido a que en las plantas cultivadas con NO_3^- la tasa de absorción de NH_4^+ disminuyó al cabo de 150 min. de iniciado el período de medición en presencia de NO_3^-, se realizó un nuevo experimento en donde se midió la absorción neta de NH_4^+ en ausencia y presencia de NO_3^- por un período de tiempo mayor, a fin de verificar si dicho efecto persistía.

- Experimento III: Plantas de trigo de 8 días, cultivadas en ausencia de N, fueron separadas en 2 grupos y tratadas durante 30 hs. con 0.5 eq m^{-3} $SO_4(NH_4)_2$ o 1.0 eq m^{-3} NO_3NH_4. Posteriormente se transfirieron a recipientes de 200 ml en donde se midió la absorción neta de NH_4^+, provisto con SO_4^{2-} o NO_3^- como aniones acompañantes (concentración inicial de NH_4^+=

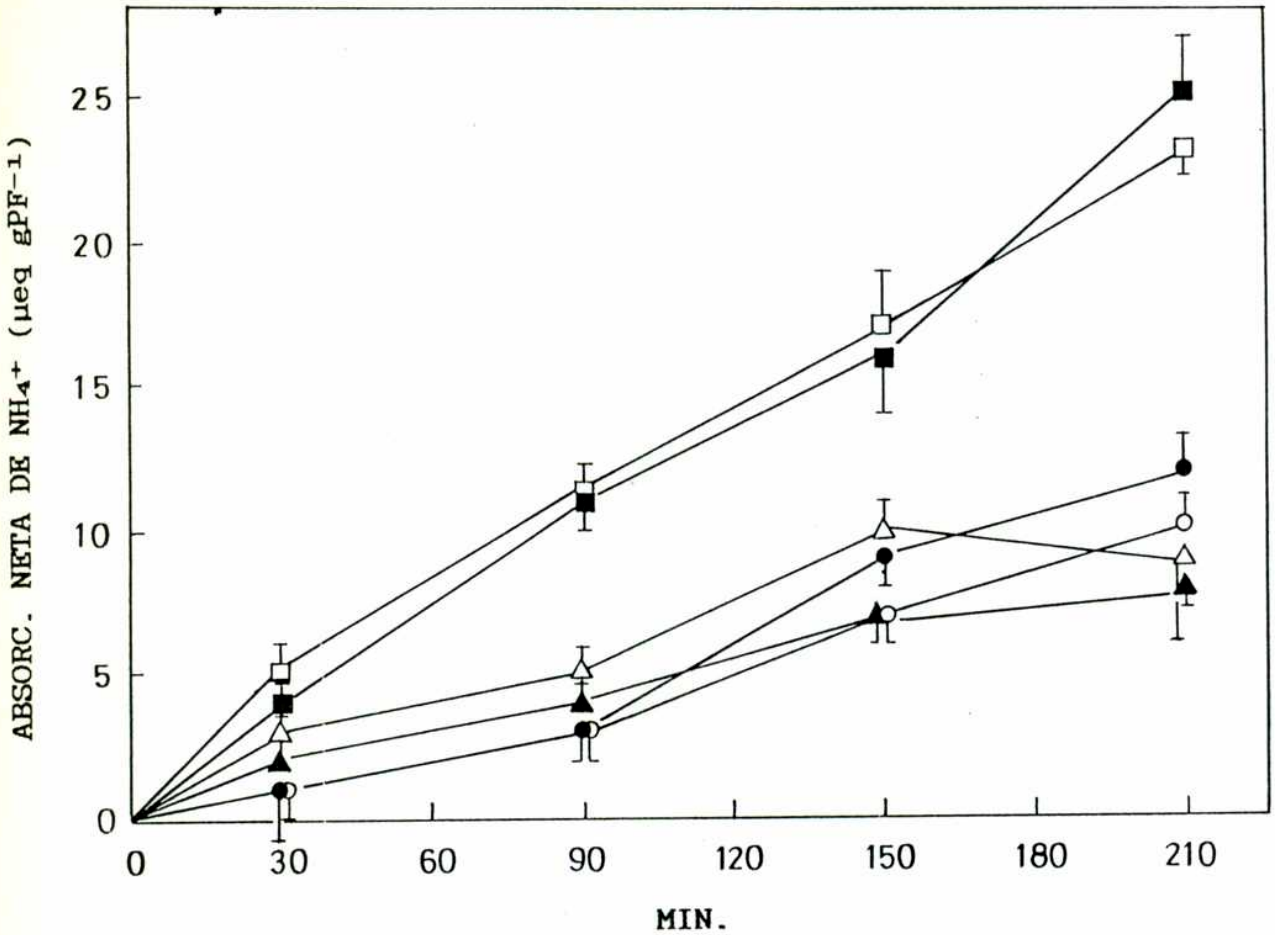

Fig. 4: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas deficientes en N (□■) o pretratadas durante 40 hs. con 0.65 eq m^{-3} de $Ca(NO_3)_2$ (△▲) o $SO_4(NH_4)_2$ (○●) como fuentes de N. La absorción de NH_4^+ se midió en ausencia (símbolos claros) o en presencia (símbolos oscuros) de NO_3^- (Exp. II). Las barras verticales representan ± error estándar.

Tabla 1. Peso fresco de raíz y parte aérea y velocidad de absorción neta de NH_4^+ ($\mu eq\ gPF^{-1}\ h^{-1}$) en plantas deficientes en N (control) o cultivadas durante 40 hs. con 1.3 eq m^{-3} de NO_3-N o NH_4-N. La absorción neta de NH_4^+ se midió en presencia o en ausencia de NO_3^- en los 3 grupos de plantas (Exp. II). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento	Tasa de absorción de NH_4^+ + NO_3^-	Tasa de absorción de NH_4^+ - NO_3^-	PFrz (g)	PFpa (g)
control	7.0[a] (0.6)	6.7[a] (0.3)	4.18[c] (0.06)	4.13[a] (0.08)
NH_4^+	3.0[b] (0.0)	3.3[b] (0.7)	3.43[a] (0.07)	4.15[a] (0.06)
NO_3^-	3.7[b] (0.3)	2.7[b] (0.7)	3.87[b] (0.05)	4.77[b] (0.07)

Tabla 2: Concentración de N (%N gPS^{-1}), NH_4^+ libre ($\mu eq\ gPF^{-1}$) y aminoácidos totales libres ($\mu mol\ gPF^{-1}$), en raíz y parte aérea, en plantas deficientes en N (control) o cultivadas durante 40 hs. con 1.3 eq m^{-3} de NO_3-N o NH_4-N. (Exp. II). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento	%N		NH_4^+ libre		aminoácidos libres	
	RZ	PA	RZ	PA	RZ	PA
control	1.67[a] (0.07)	3.44[a] (0.06)	0.63[a] (0.07)	0.21[a] (0.10)	1.10[a] (0.02)	1.38[a] (0.03).
NH_4^+	3.04[b] (0.10)	4.53[b] (0.11)	4.53[c] (0.10)	0.54[a] (0.06)	5.06[b] (0.36)	4.09[c] (0.14)
NO_3^-	2.58[b] (0.11)	3.79[ab] (0.07)	1.10[b] (0.05)	0.33[a] (0.11)	1.48[a] (0.04)	1.91[b] (0.09)

1.0 eq m^{-3}) durante un período de 6 hs.

Al igual que lo observado en el experimento II, la absorción neta de NH_4^+ en ausencia de NO_3^- exógeno fue similar en las plantas cultivadas ya sea con NO_3^- o con NH_4^+ (fig. 5). Sin embargo en este caso no se registraron efectos inhibitorios significativos por la presencia de NO_3^-, aún en aquellas plantas previamente expuestas durante 30 hs. a ambas fuentes de N simultáneamente (fig. 5).

Del conjunto de datos puede inferirse que el aumento de la concentración de N endógena ejerce un efecto represor sobre la absorción de NH_4^+, aunque la magnitud de dicho efecto no parecería estar directamente correlacionada con los niveles de amonio o aminoácidos totales libres endógenos. En principio estos resultados concordarían con datos presentados por Lee y Rudge (1986) en plantas de cebada. Estos autores sugieren que tanto la absorción de NO_3^- como de NH_4^+ dependería fundamentalmente del "status de N" endógeno, aclarando que quedan excluídos de dicho término tanto las especies iónicas de N como así también aquellos compuestos nitrogenados que, por estar involucrados en procesos metabólicos de vital importancia, no presentan variaciones significativas de su concentración en las condiciones experimentales utilizadas. Si bien otros autores apoyan esta hipótesis (Pressland y Mc Naughton, 1986; Di Martino Rigano y col., 1987 b), no hay una explicación clara del mecanismo a través del cual el sistema

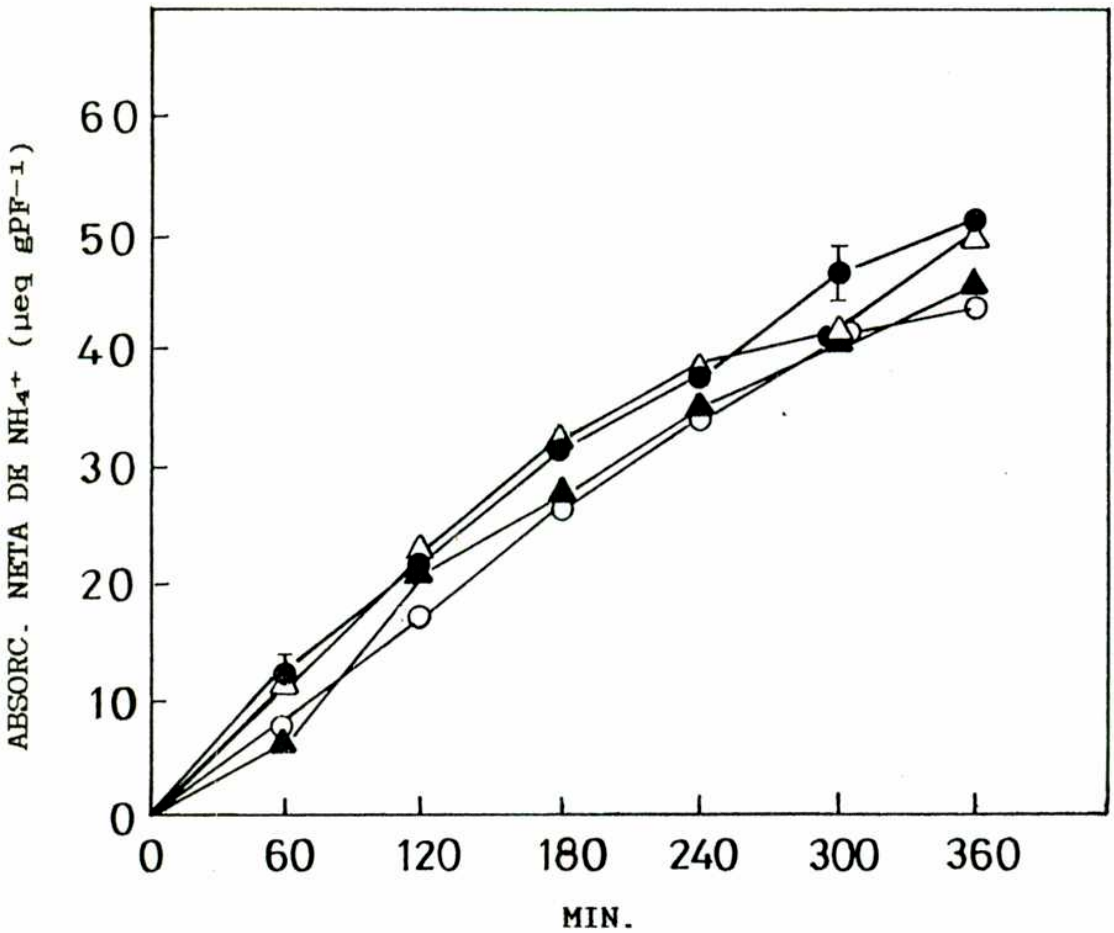

Fig. 5: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas pretratadas durante 30 hs. con 1.0 eq m^{-3} de NO_3NH_4 (Δ▲) o 0.5 eq m^{-3} $SO_4(NH_4)_2$ (O●) como fuentes de N. La absorción de NH_4^+ se midió en ausencia (símbolos claros) o en presencia (símbolos oscuros) de NO_3^- (Exp. III). Las barras verticales representan ± error estándar.

de transporte del NH_4^+ detecta cambios en el status de N endógeno.

Dado que existen informes de que en determinadas condiciones los aumentos de la concentración interna de NH_4^+ libre y/o algún metabolito derivado de su asimilación podrían provocar una disminución de la absorción neta del ión (Kleiner y Fitzke, 1981; Alef y Kleiner, 1982; Morgan y Jackson, 1988 a; Morgan y Jackson, 1989; Jackson y Volk, 1992), en la sección siguiente se explicarán diversos experimentos orientados a explorar más detalladamente si hay alguna correlación entre la concentración de NH_4^+ y/o aminoácidos totales libres endógenos y las variaciones en la tasa de absorción de NH_4^+.

3.1.3. Efectos de la variación de la concentración endógena de NH_4^+ y aminoácidos totales libres sobre la absorción de NH_4^+.

A fin de poder establecer si, bajo determinadas condiciones, cambios en los niveles de NH_4^+ y/o aminoácidos libres endógenos podrían actuar como factores reguladores de la absorción de NH_4^+, se realizaron una serie de experimentos en los que se procuró obtener concentraciones variables de NH_4^+ y aminoácidos libres en raíz a través de 3 métodos diferentes:

- Pretratando a las plantas durante distintos períodos de

tiempo con una concentración de NH_4^+ dada (Experimentos IV y V);

- Pretratando a las plantas con distintas concentraciones de NH_4^+ exógeno (Experimento VI);
- Inhibiendo la asimilación de NH_4^+ vía GS mediante el uso de MSX (Experimento VII).

A continuación se comentarán los resultados de cada grupo de experimentos.

3.1.3.1. Estudios realizados con diferentes tiempos de incubación.

-Experimento IV: Plantas de trigo de 10 días cultivadas en ausencia de N (control) o pretratadas durante 3 y 24 hs con 1.0 eq m^{-3} NH_4^+, fueron divididas en 3 subgrupos y transferidas a sendas macetas en donde se midió la absorción neta del ión a 3 concentraciones diferentes: 0.5, 1.0 y 2.5 eq m^{-3} NH_4^+. Parte del material vegetal fue cosechado al inicio y al final del período de absorción y procesado para la determinación de amonio libre endógeno según se indica en materiales y métodos.

a) Absorción en 0.5 eq m^{-3} NH_4^+ (fig. 6, a-b).
Las plantas cultivadas sin N agotaron el NH_4^+ de la solución al cabo de 180 min., aunque la concentración del mismo había

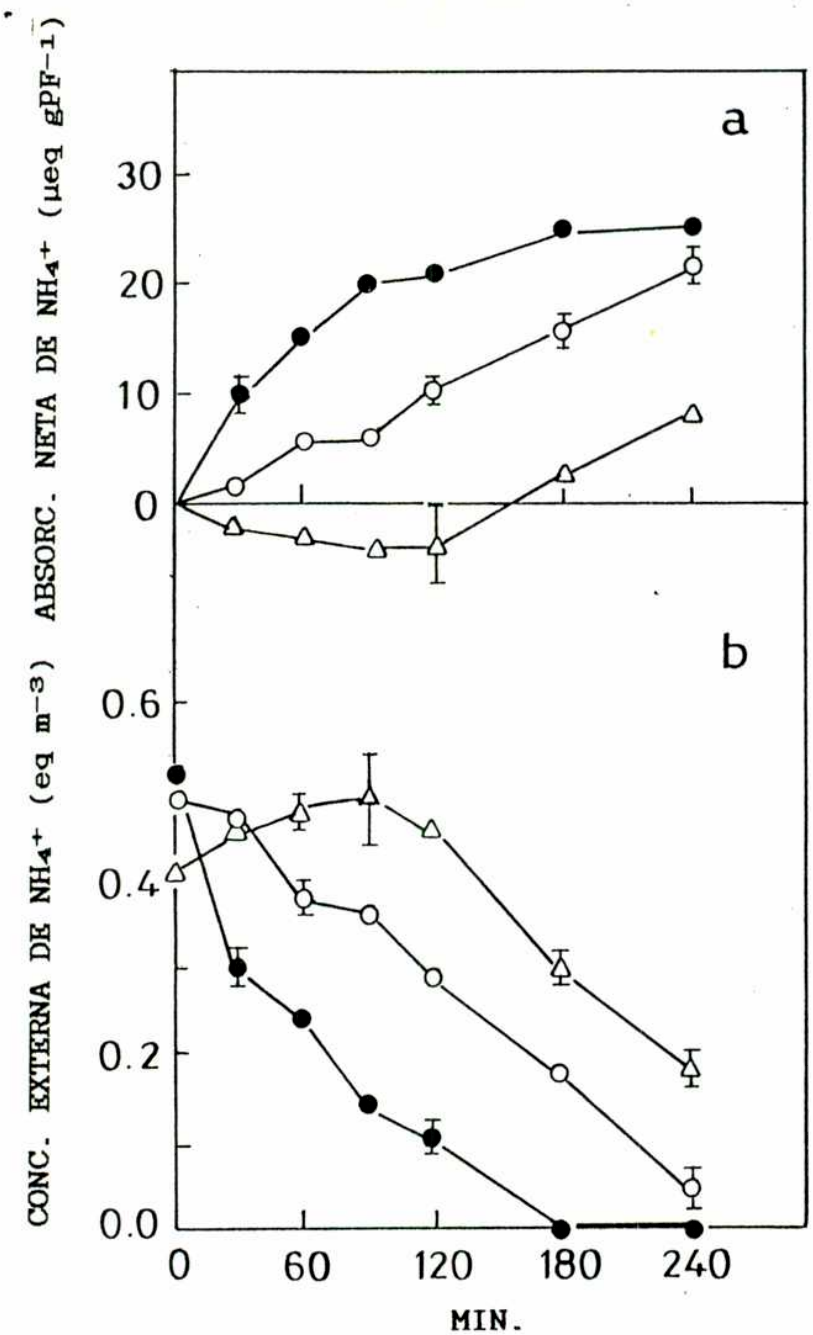

Fig. 6: a- Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) y b- concentración de NH_4^+ en la solución externa en plantas cultivadas sin N (●) o pretratadas con 1.0 eq m^{-3} NH_4^+ durante 3 hs. (o) o 24 hs. (Δ). La absorción de amonio se midió en una solución con una concentración inicial de 0.5 eq m^{-3} NH_4^+ (Exp. IV). Las barras verticales representan ± error estándar.

disminuído en ± 80% ya a las 2 hs. de iniciado el período de medición. Goyal y Huffaker (1986) reportaron que la absorción de NH_4^+ en plantas de trigo deficientes en N disminuía marcadamente a concentraciones externas del ión inferiores a los 0.3 eq m^{-3}. Esto podría explicar el marcado descenso de la absorción neta observado a partir de los 90 min. en este tratamiento.

Las plantas pretratadas con NH_4^+ durante 3 hs. absorbieron a una tasa constante de 7.0 μeq g^{-1} h^{-1} a lo largo de todo el período de medición.

En las plantas con 24 hs. de pretratamiento se observó un aumento de la concentración de NH_4^+ externa durante los primeros 120 min. de iniciada la absorción. Esto reflejaría la existencia de un eflujo neto de amonio. En estudios cinéticos sobre absorción de fósforo y zinc (Elliot y col., 1984; Cogliatti y Santa María, 1990; Santa María, 1992) se ha comprobado que la tasa de eflujo puede contribuir significativamente a la regulación de la absorción de los mismos. Dicha tasa depende tanto del tiempo de precargado como de la concentración utilizada en la solución de cultivo. Con respecto al ión amonio la información disponible es escasa. Morgan y Jackson (1988 b) han reportado que en plantas de avena y trigo de 20 días cultivadas durante 6 días en ausencia de N y pretratadas posteriormente a distintos tiempos con $^{15}NH_4^+$, la tasa de eflujo de NH_4^+ endógeno aumentó

considerablemente durante las primeras 5 hs. de cargado (llegando incluso a superar a la tasa de influjo), determinando un marcado descenso de la absorción neta del ión.

b) Absorción en 1.0 eq m^{-3} NH_4^+ (fig. 7, a-b).
La velocidad de absorción neta no difirió significativamente entre las plantas hambreadas y las pretratadas durante 3 hs. con NH_4^+ (± 11.5 µeq g^{-1} h^{-1}), sin embargo resultó menor en aquellas pretratadas durante 24 hs. En los 3 casos la tasa de absorción disminuyó ligeramente a partir de los 90-120 min. de iniciado el período de absorción.

c) Absorción en 2.5 eq m^{-3} NH_4^+ (fig. 8, a-b).
La velocidad de absorción de NH_4^+ en las plantas hambreadas fue de 17.0 µeq g^{-1} h^{-1} durante los primeros 120 min., disminuyendo luego en aproximadamente un 47%. En los 2 tratamientos restantes la velocidad de absorción neta entre los 30 y 120 min. fue similar a la de las plantas hambreadas; sin embargo la fase posterior de descenso fue más marcada, acentuándose particularmente en las plantas pretratadas durante 24 hs. con NH_4^+.

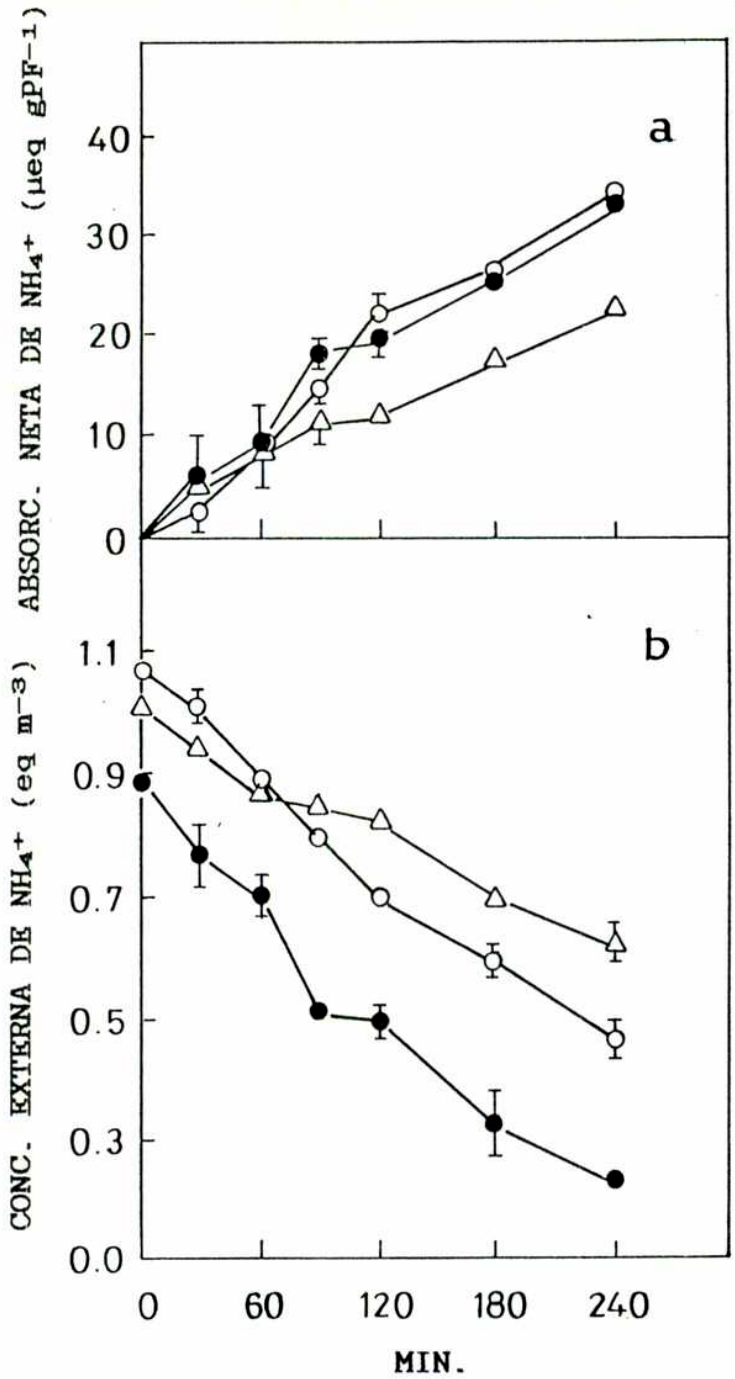

Fig. 7: a- Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) y b- concentración de NH_4^+ en la solución externa en plantas cultivadas sin N (●) o pretratadas con 1.0 eq m^{-3} NH_4^+ durante 3 hs. (o) o 24 hs. (Δ). La absorción de amonio se midió en una solución con una concentración inicial de 1.0 eq m^{-3} NH_4^+ (Exp. IV). Las barras verticales representan ± error estándar.

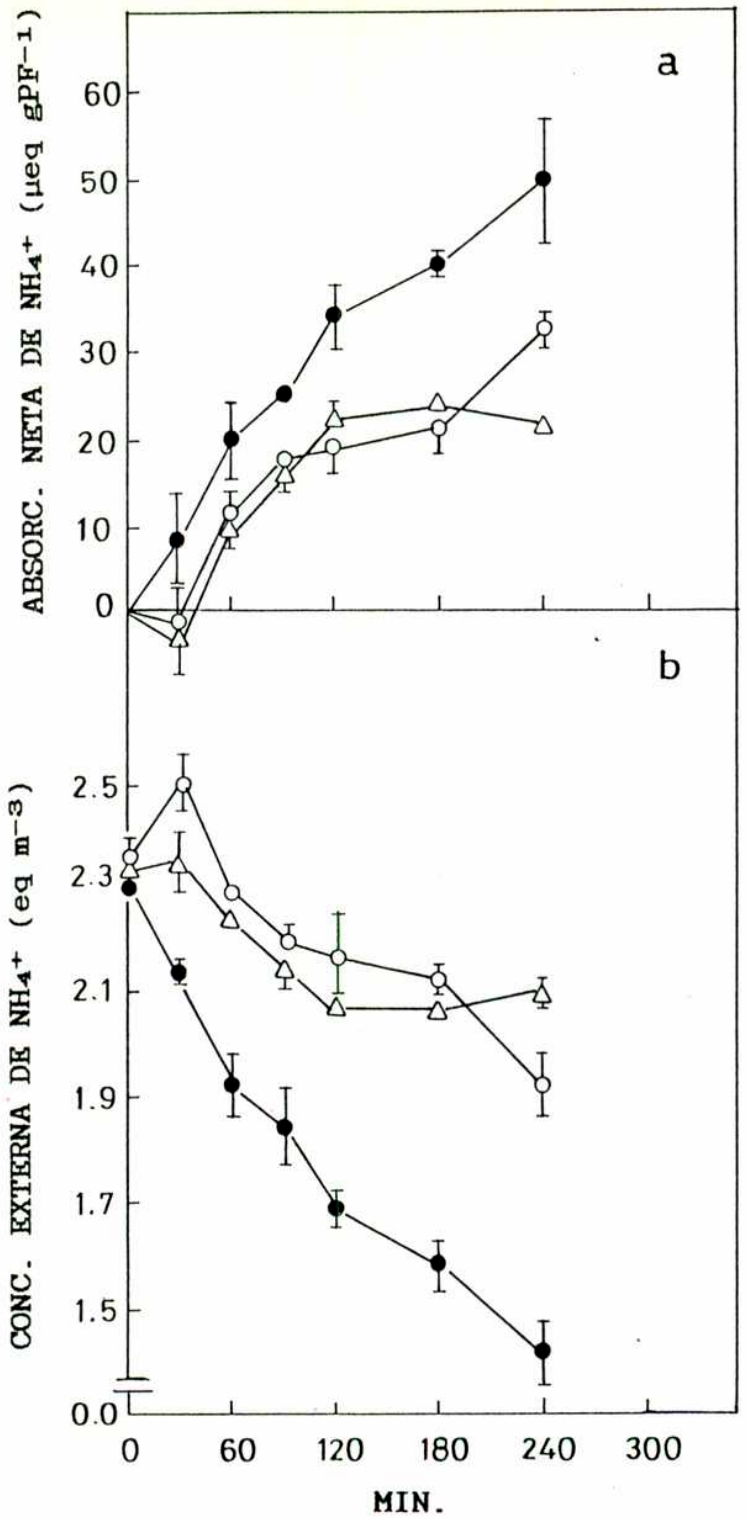

Fig. 8: a- Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) y b- concentración de NH_4^+ en la solución externa en plantas cultivadas sin N (●) o pretratadas con 1.0 eq m^{-3} NH_4^+ durante 3 hs. (o) o 24 hs. (Δ). La absorción de amonio se midió en una solución con una concentración inicial de 2.5 eq m^{-3} NH_4^+ (Exp. IV). Las barras verticales representan ± error estándar.

El análisis del contenido de NH_4^+ libre en raíz en los distintos tratamientos muestra que en las plantas deficientes en N existe un pequeño pool endógeno de dicho ión, cuya concentración es de 4 a 5 veces menor a la presente en las plantas pretratadas con NH_4^+ (tabla 3). Asimismo, solo en las plantas hambreadas hubo un aumento en la concentración relativa de NH_4^+ endógeno al final del período de absorción conjuntamente con la concentración de NH_4^+ utilizada en la solución externa (tabla 3). Esta capacidad de acumulación podría en principio deberse a una menor relación eflujo/influjo dada la baja concentración de NH_4^+ en raíz presente en dichas plantas. Sin embargo, cuando se toman en consideración los 3 tratamientos no se observa una clara correlación entre el contenido inicial de NH_4^+ en las raíces y la posterior evolución de la absorción neta del ión (comparar por ej. tabla 3 con figs. 6 a y 7 a).

Un hecho que llama la atención es el que las plantas pretratadas durante 24 hs. con NH_4^+ presentaron en general niveles más bajos de NH_4^+ endógeno que las plantas expuestas solo durante 3 hs. a dicho ión. Si bien dicho efecto podría en parte deberse a una menor tasa de absorción neta, es posible que al cabo de 24 hs. se hayan inducido cambios en el metabolismo del amonio que pudieran contribuir a incrementar su incorporación a esqueletos carbonados. En la sección 3.3. se discutirá más detalladamente el efecto de la provisión de

Tabla 3: Concentración de NH_4^+ libre (μeq gPF^{-1}) e incremento relativo de la concentración de NH_4^+ en raíz, en plantas cultivadas sin N (control) o pretratadas durante 3 o 24 hs. con 1.0 eq m^{-3} NH_4^+. La concentración de NH_4^+ libre se midió al principio (t_o) y al final (t_f) del período de absorción, la cual se realizó a 3 concentraciones exógenas de NH_4^+ diferentes: 0.5, 1.0 y 2.5 eq m^{-3} (Exp. IV). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento		NH_4^+ libre	Incremento relativo
control	t_o	1.84[a] (0.15)	----
	t_f-0.5	5.25[b] (0.05)	1.85
	t_f-1.0	12.34[c] (0.25)	5.70
	t_f-2.5	13.36[c] (0.45)	6.26
3 hs. NH_4^+	t_o	9.98[a] (1.21)	----
	t_f-0.5	18.12[c] (0.45)	0.82
	t_f-1.0	14.44[b] (0.45)	0.45
	t_f-2.5	15.78[bc] (0.58)	0.58
24 hs. NH_4^+	t_o	7.40[a] (0.05)	----
	t_f-0.5	8.40[a] (1.05)	0.14
	t_f-1.0	10.24[a] (0.78)	0.38
	t_f-2.5	9.72[a] (0.26)	0.31

distintas fuentes de N sobre la actividad de algunas de las principales enzimas vinculadas al metabolismo del amonio.

- Experimento V: El siguiente experimento fue diseñado para explorar con más detalle la evolución de la tasa de absorción neta de NH_4^+ en relación a los cambios temporales de los niveles de NH_4^+ libre y aminoácidos totales libres endógenos. Plantas de 10 días cultivadas sin N y pretratadas durante 0 (control), 3, 6, 9, 24 o 48 hs. con 1.5 eq m^{-3} NH_4^+ fueron transferidas a soluciones conteniendo 1.5 eq m^{-3} NH_4^+ en donde se midió la velocidad de absorción neta del ión durante 120 min. Previo al inicio del período de medición, parte del material fue cosechado y procesado para la determinación del contenido de NH_4^+ y aminoácidos totales libres en raíz.

La velocidad de absorción neta de NH_4^+ disminuyó aproximadamente un 60% al cabo de 6 hs. de pretratamiento, aumentando nuevamente en las plantas pretratadas durante 48 hs. (fig. 9). La concentración de NH_4^+ libre en raíz aumentó marcadamente durante las primeras 8 hs., permaneciendo constante hasta las 24 hs. Al cabo de 48 hs de exposición al NH_4^+ la concentración endógena del mismo disminuyó a aproximadamente un 50% del máximo valor alcanzado (fig. 9).

La concentración de aminoácidos libres en raíz también

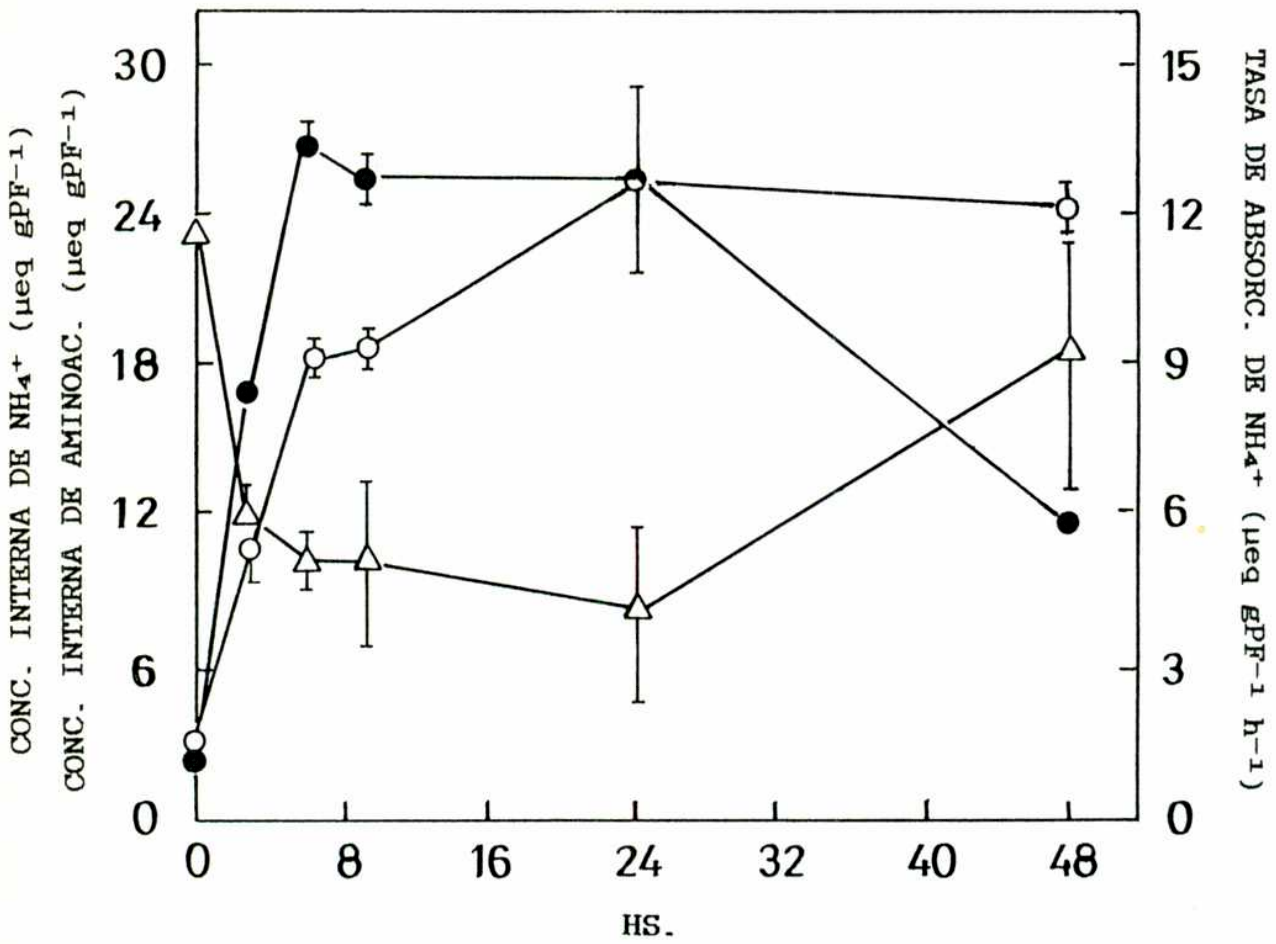

Fig. 9: Velocidad de absorción neta de NH_4^+ (△), concentración de NH_4^+ libre (●) y aminoácidos totales libres (o) en raíces de plantas de trigo cultivadas durante 0, 3, 6, 9, 24 o 48 hs. con 1.5 eq m^{-3} NH^{4+} (Exp. V). Las barras verticales representan ± error estándar.

aumentó durante las primeras 24 hs., permaneciendo luego constante.

A diferencia de lo hallado previamente, en el presente experimento se observa una relación inversa entre la evolución del contenido de NH_4^+ libre en raíz y la tasa de absorción neta del ión (fig. 9). El hecho de que a partir de las 24 hs. de pretratamiento la concentración de NH_4^+ libre endógeno disminuya a pesar de que, concomitantemente, la tasa de absorción neta del ión es incrementada, sugiere que a partir de dicho período habría un aumento en la actividad de enzimas vinculadas a los procesos de asimilación del mismo, tal como se mencionara en el experimento anterior.

3.1.3.2. Estudios realizados mediante la provisión de NH_4^+ exógeno en presencia o en ausencia de MSX.

En los experimentos que se describen a continuación se continuó investigando la existencia de una posible correlación entre el contenido de NH_4^+ libre en raíz y el grado de inhibición de la absorción neta del ión, mediante el uso de 2 metodologías diferentes orientadas a inducir la acumulación de NH_4^+ tisular: a- cultivo de plantas en soluciones con concentraciones crecientes del ión (experimento VI) y b- aplicación conjunta de NH_4^+ y un inhibidor de la enzima GS (el MSX) dado que esta cataliza la principal vía de incorporación

del NH_4^+ a esqueletos carbonados (experimento VII).

Un aspecto interesante de destacar es el hecho de que, si bien con ambos procedimientos se espera inducir la acumulación de NH_4^+ endógeno, en las plantas pretratadas con concentraciones crecientes del ión dicha acumulación iría asociada a un incremento en la concentración de productos derivados de su asimilación, mientras que en las plantas expuestas al MSX dicho incremento debería ser escaso o nulo.

- Experimento VI: Plantas de trigo de 8 días cultivadas en ausencia de N fueron tratadas durante 40 hs. con 0.0 (control), 0.5, 1.0, 10.0 y 20.0 eq m^{-3} NH_4^+. Al cabo de dicho período, parte del material vegetal se cosechó y el resto se transfirió a macetas conteniendo 1.0 eq m^{-3} NH_4^+ en donde se midió la absorción neta del ión durante 300 min.

- Experimento VII. Plantas de 10 días cultivadas sin N o pretratadas durante 40 hs. con 1.3 eq m^{-3} NH_4^+ fueron divididas en 3 grupos y transferidas a recipientes de 4 L. conteniendo una solución nutritiva con 1.3 eq m^{-3} NH_4^+ + 1.0 eq m^{-3} MSX durante 0, 3 o 6 hs. Al final de cada tratamiento, parte del material fue cosechado y el resto se transfirió a macetas conteniendo 1.3 eq m^{-3} NH_4^+ en donde se midió la absorción neta del ión durante 150 min.

Cuando las plantas tratadas durante 40 hs. con distintas concentraciones de NH_4^+ (Exp. VI) fueron transferidas a las macetas con 1.0 eq m^{-3} del ión, la absorción neta de NH_4^+ en aquellas cultivadas con 0.5 eq m^{-3} no difirió significativamente de la del control (fig. 10). Por el contrario, la tasa de absorción disminuyó en las plantas pretratadas con 1.0 eq m^{-3} NH_4^+ y un eflujo neto se registró en los restantes tratamientos, particularmente acentuado durante los primeros 90 min. La concentración de NH_4^+ y aminoácidos totales libres en raíz aumentó conjuntamente con la concentración externa de NH_4^+, siendo unas 10 o 5 veces mayor a la del control en las plantas pretratadas con 10.0 o 20.0 eq m^{-3} NH_4^+, respectivamente (tabla 4).

El tratamiento con NH_4^+ en presencia de MSX (Exp. VII) determinó un marcado descenso de la absorción neta del ión tanto en las plantas hambreadas como en las pretratadas con NH_4^+ (fig. 11). La concentración de NH_4^+ libre aumentó en ambos grupos ya al cabo de las primeras 3 hs. de tratamiento con el inhibidor (tabla 5). Por el contrario la concentración de aminoácidos libres no fue afectada por la presencia de MSX en las plantas pretratadas con NH_4^+, aunque aumentó unas 2.6 veces en las plantas deficientes en N durante las primeras 3 hs. de tratamiento, permaneciendo luego constante (tabla 5). Dado que en las plantas deficientes en N la concentración de aminoácidos libres tiende a aumentar durante aproximadamente

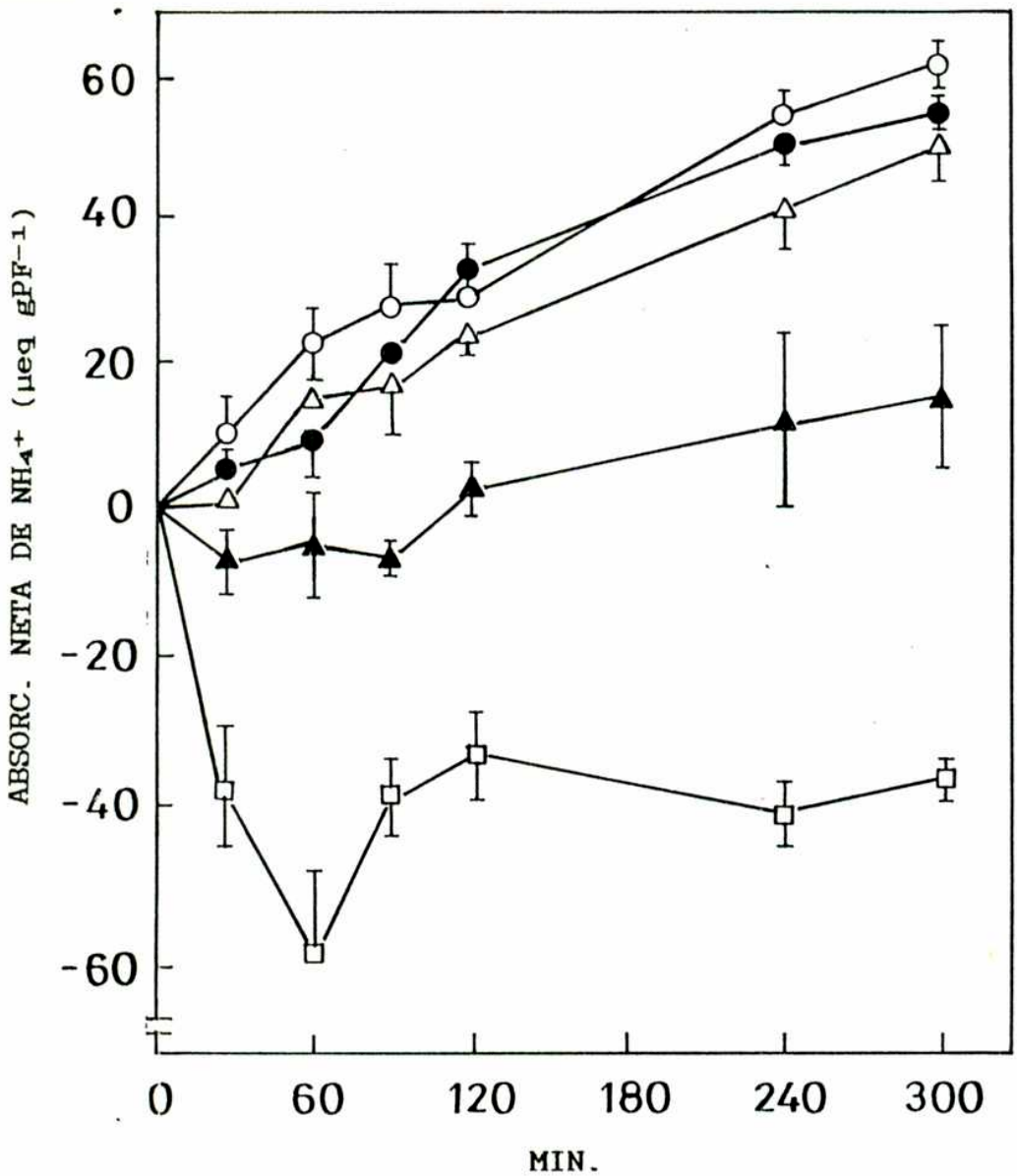

Fig. 10: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas cultivadas durante 40 hs. con 0.0 (o), 0.5 (●), 1.0 (△), 10.0 (▲) o 20.0 (□) eq m^3 NH_4^+ (Exp. VI). Las barras verticales representan ± error estándar.

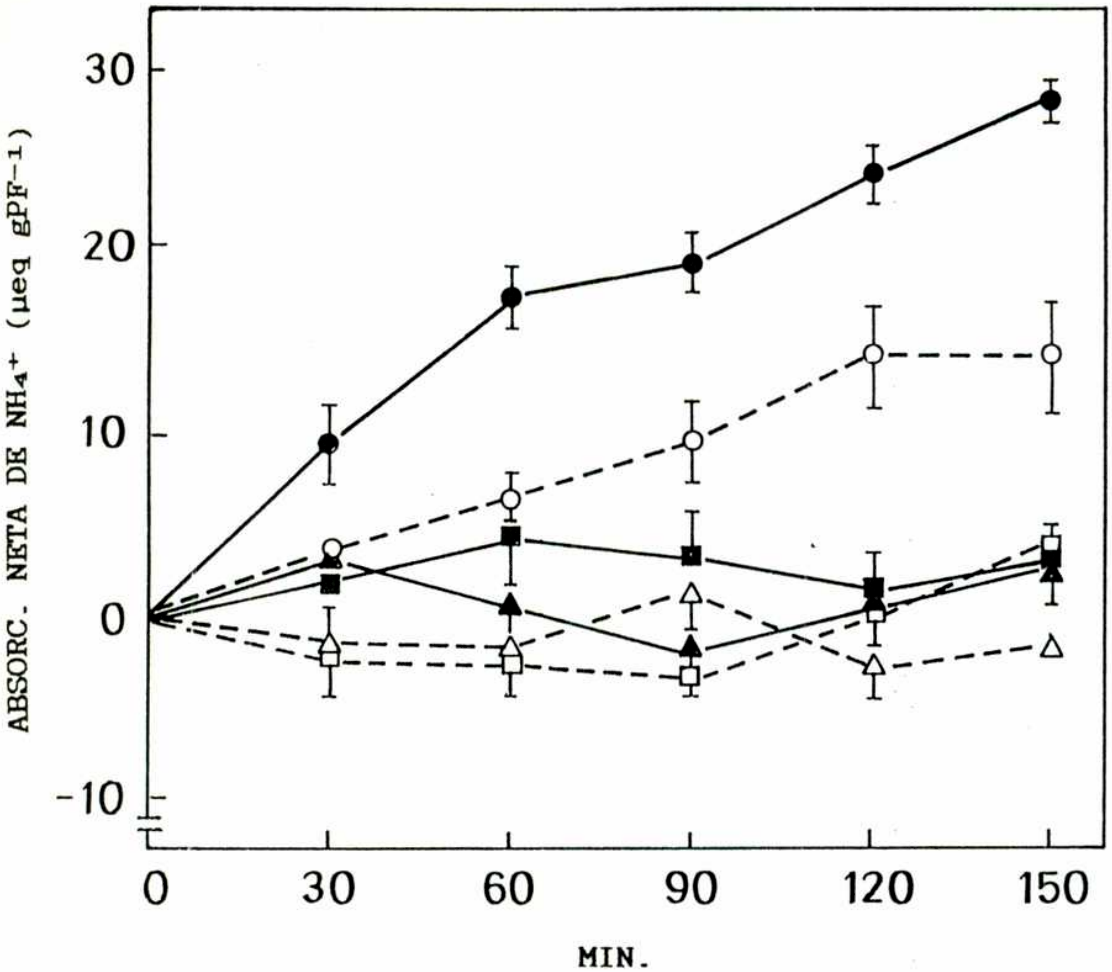

Fig. 11: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas deficientes en N (símbolos oscuros) o cultivadas durante 40 hs. con 1.3 eq m^{-3} NH_4^+ (símbolos claros) y pretratadas durante 0 hs. (○●), 3 hs. (△▲) o 6 hs. (□■) con 1.3 eq m^{-3} NH_4^+ + 1.0 eq m^{-3} MSX (Exp. VII). Las barras verticales representan ± error estándar.

Tabla 4: Concentración de NH_4^+ libre (µeq gPF^{-1}) y aminoácidos totales libres (µmol gPF^{-1}) en raíces de plantas cultivadas durante 40 hs. con 0.0, 0.5, 1.0, 10.0 o 20.0 eq m^{-3} de NH_4^+ (Exp. VI). Entre paréntesis: error estándar.

	Concentración externa de NH_4^+				
	0.0	0.5	1.0	10.0	20.0
NH_4^+ libre	2.32 (1.29)	11.84 (1.54)	13.13 (0.25)	18.28 (0.25)	25.48 (1.80)
aminoácidos libres	5.55 (1.89)	8.44 (1.87)	19.77 (2.14)	27.70 (4.80)	32.74 (6.80)

Tabla 5: Concentración de NH_4^+ libre (µeq gPF^{-1}) y aminoácidos totales libres (µmol gPF^{-1}) en raíces de plantas deficientes en N o cultivadas durante 40 hs. con 1.3 eq m^{-3} NH_4^+ e incubadas posteriormente en una solución con NH_4^+ + MSX durante 0, 3 o 6 hs. (Exp. VII). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento	Tiempo de incubación		
	0 hs. MSX	3 hs. MSX	6 hs. MSX
Plantas hambreadas			
NH_4+ libre	2.28[a] (0.29)	13.30[b] (0.55)	17.94[c] (0.57)
aminoácidos libres	2.73[a] (0.50)	7.02[b] (0.48)	7.89[b] (0.54)
Plantas con 40 hs. NH_4^+			
NH_4+ libre	7.71[a] (0.26)	14.62[b] (0.76)	17.59[b] (0.29)
aminoácidos libres	15.01[a] (1.50)	17.12[a] (1.39)	13.57[a] (0.78)

las primeras 24 hs. de exposición al NH_4^+ (ver fig. 9), este último resultado sugiere que la asimilación de NH_4^+ habría sido inhibida al cabo de las 3 hs. de tratamiento con MSX.

No obstante, a fin de determinar en que magnitud la provisión de MSX en nuestras condiciones experimentales lograba inhibir a la enzima GS, se procedió a medir la actividad *in vitro* de dicha enzima en raíces de plantas deficientes en N (control) y plantas pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} MSX.

La actividad de la enzima GS fue de 4.29 ± 0.04 nmol g^{-1} min^{-1} para el tratamiento control vs. 0.00 ± 0.00 nmol g^{-1} min^{-1} en las plantas tratadas con el inhibidor. Si bien en este caso la actividad enzimática en las plantas hambreadas fue baja (ver sección 3.3.), es claro que en nuestras condiciones experimentales el tratamiento con MSX puede ejercer un efecto inhibitorio significativo sobre la GS.

Dicho resultado concuerda con lo informado en otros trabajos (Arima y Kumazawa, 1977; Rhodes y col., 1980; Frantz y col., 1982; Fentem y col., 1983; Martin y col., 1983; Ikeda y col., 1984; Walker y col., 1984 b; Dahlbender y Strack, 1986; Johansson y Larsson, 1986). Sin embargo quisiera señalar que, si bien ha sido demostrado que el MSX inhibe en forma específica e irreversible a la GS (Ronzio y col., 1969), algunos autores han llamado la atención sobre su uso pues en determinadas condiciones han observado efectos secundarios

sobre el catabolismo de proteínas, la recirculación de ácidos orgánicos y la actividad de ciertas desaminasas (Walker y col., 1984 a; Sieciechowicz y col., 1989; Magalhaes, 1991; Magalhaes y Huber, 1991; Jackson y col., 1993).

Los experimentos desarrollados en la presente sección han permitido obtener un considerable rango de variabilidad en lo que respecta a la tasa de absorción de NH_4^+ y la concentración de NH_4^+ y aminoácidos libres endógenos, por vías muy diferentes.

En las figuras 12 y 13 se ha representado la velocidad de absorción neta de NH_4^+ en función de la concentración de NH_4^+ libre y aminoácidos totales libres endógenos, respectivamente, a partir de datos obtenidos de los experimentos V, VI y VII. En la figura 12 se observa que, mientras que en las plantas pretratadas durante distintos tiempos con 1.5 eq m^{-3} de NH_4^+ (Exp. V) la correlación entre el contenido de NH_4^+ libre en raíz y la tasa de absorción neta no llega a ser significativa, en los 2 experimentos restantes hubo una marcada disminución de dicha tasa conjuntamente con el aumento de los niveles de NH_4^+ libre endógeno. A su vez, en las plantas tratadas con MSX (Exp. VII) la velocidad de absorción neta fue más sensible a los cambios de NH_4^+ libre en el rango de las bajas concentraciones ($\leq$ 16-18 μeq gPF^{-1}) que en las plantas del experimento VI. El resultado obtenido con el uso de MSX es particularmente interesante pues, dado que la asimilación del

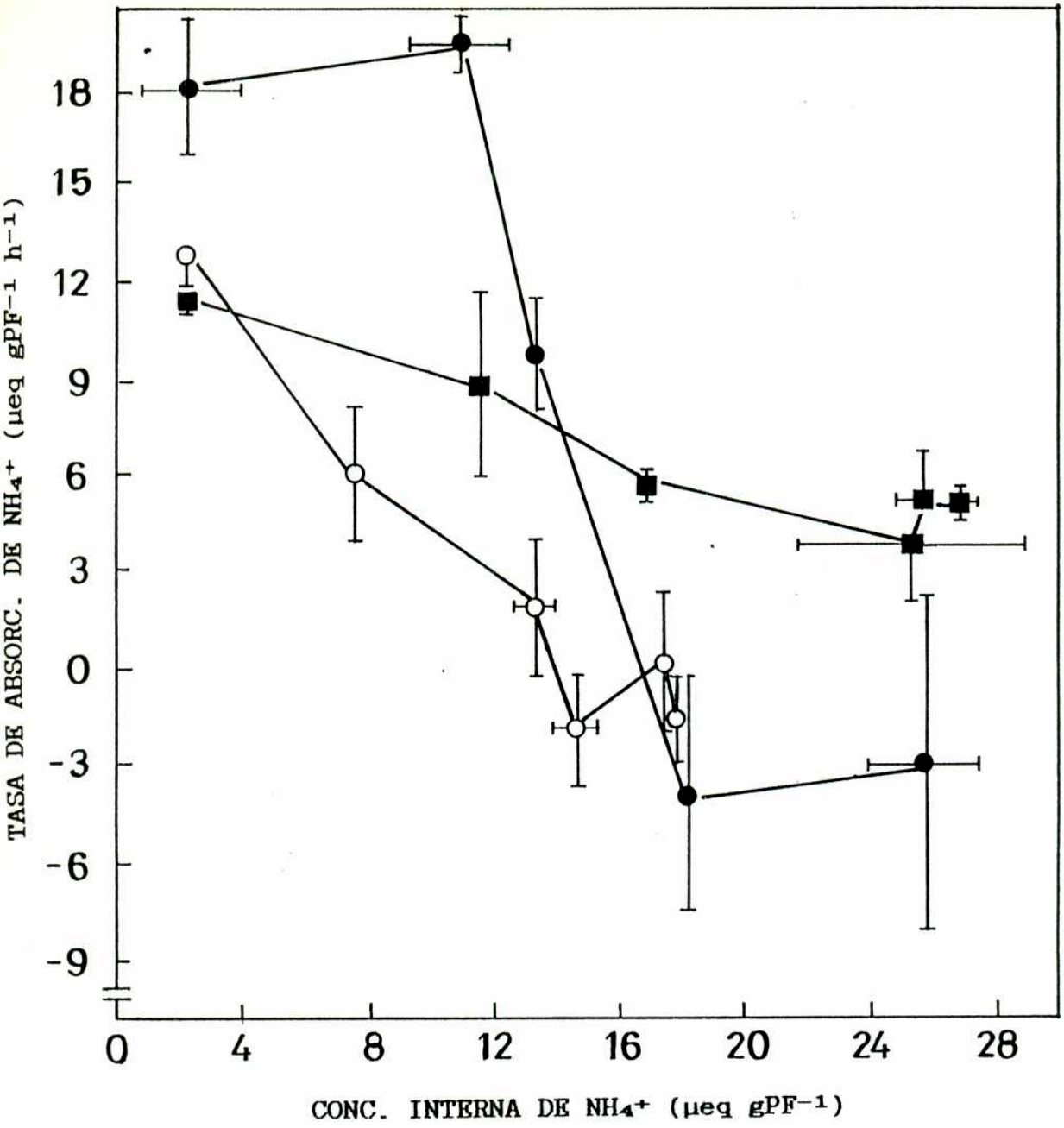

Fig. 12: Velocidad de absorción neta de NH_4^+ en función de la concentración de NH_4^+ libre en raíz en plantas cultivadas durante distintos períodos de tiempo con 1.5 eq m^{-3} NH_4^+ (Exp. V) (■), durante 40 hs. con distintas concentraciones de NH_4^+ (Exp. VI) (●) o pretratadas con 1.3 eq m^{-3} NH_4^+ + 1.0 eq m^{-3} MSX (Exp. VII) (o). Las barras verticales y horizontales representan ± error estándar.

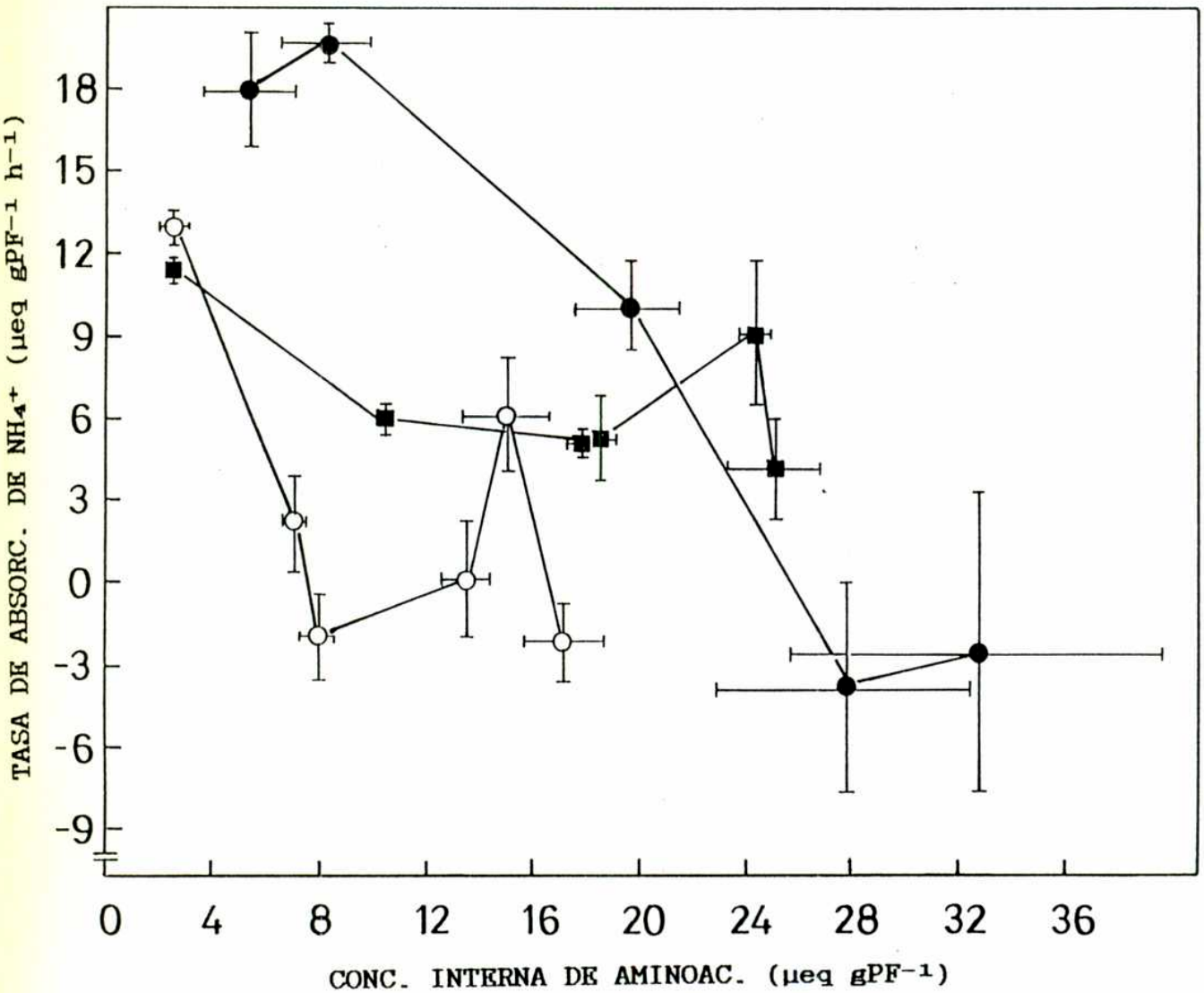

Fig. 13 : Velocidad de absorción neta de NH_4^+ en función de la concentración de aminoácidos totales libres en raíz en plantas cultivadas durante distintos períodos de tiempo con 1.5 eq m^{-3} NH_4^+ (Exp. V) (■), durante 40 hs. con distintas concentraciones de NH_4^+ (Exp. VI) (●) o pretratadas con 1.3 eq m^{-3} NH_4^+ + 1.0 eq m^{-3} MSX (Exp. VII) (o). Las barras verticales y horizontales representan ± error estándar.

NH_4^+ estaría inhibida y, consecuentemente, la acumulación de metabolitos derivados de dicho proceso, el aumento del pool de NH_4^+ libre endógeno podría considerarse como uno de los principales factores que habría contribuído a la disminución de la absorción neta.

Ahora bien, ¿es posible que la disminución de la absorción neta observada en ambos experimentos se deba a un efecto inhibitorio específico por parte del ión NH_4^+ sobre su sistema de transporte?. Si bien con la metodología empleada es imposible testear adecuadamente dicha hipótesis, creo oportuno discutir algunos aspectos relativos a la compartimentalización del NH_4^+ en raíz que pueden contribuir a explicar los principales resultados hasta ahora obtenidos.

En la figura 14 se han esquematizado los flujos de un ión a través de la raíz durante el proceso de absorción. La circulación desde el medio externo hasta la endodermis (última capa de la corteza) se realiza básicamente por 2 vías: apoplasto y simplasto. En el primer caso los iones disueltos circulan en forma de flujo masal con la corriente de agua a través de las paredes celulares y espacios intercelulares hasta llegar a la endodermis. La misma, en el caso de trigo, está constituída por una capa de células las cuales (a excepción de unas pocas células ubicadas generalmente frente a los polos protoxilemáticos) presentan bandas de suberina que impiden el pasaje de la solución acuosa (bandas de Caspari),

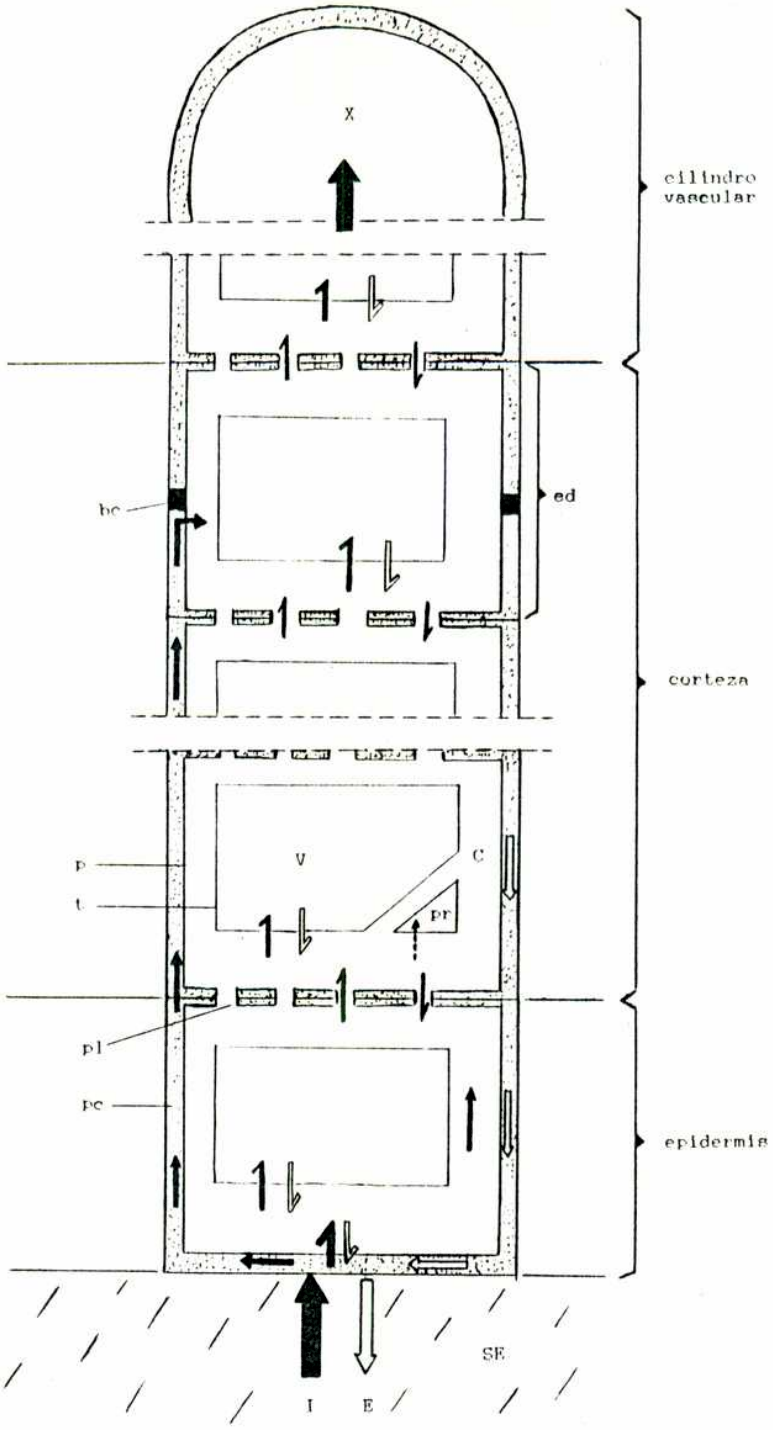

Fig. 14: Principales flujos de un ión a través de la raíz. bc, bandas de Cáspari; C, citoplasma; E, tasa de eflujo; ed, endodermis; I, tasa de influjo; p, plasmalema; pc, pared celular; pl, plasmodesmos; pr, proplasto; SE, solución externa; t, tonoplasto; V, vacuola; X, xilema.

obligando a los iones disueltos a atravesar el plasmalema. El volúmen de la masa radical por el cual los iones circulan vía apoplasto representa el espacio libre aparente (3.1.1.). El flujo vía simplasto corresponde a la circulación del ión a través de los protoplastos de distintas células interconectadas mediante delgadas bandas de citoplasma denominadas plasmodesmos.

Cuando los iones NH_4^+ son introducidos a las células básicamente puede ocurrir que:

- Parte de los iones sean metabolizados ya sea en citoplasma o en plástidos por las respectivas isoenzimas de la vía GS-GOGAT (otras vías alternativas solo cobran importancia en determinadas condiciones).
- Parte sean acumulados en vacuola.
- Parte sean transportados vía simplasto a otras células.
- Parte sean eliminados nuevamente al medio externo.

La proporción de iones comprendidos en cada uno de estos flujos dependerá tanto de factores inherentes a la planta como de las condiciones en que el amonio fue provisto. En el caso de las plantas pretratadas con altas concentraciones de NH_4^+ externo (Exp. VI), las vías responsables de su asimilación se saturarían rápidamente con la consiguiente acumulación de NH_4^+ libre no solo en la vacuola sino particularmente en el citoplasma y el apoplasto (Lee y Ratcliffe, 1991). Al ser luego expuestas las raíces a un medio con una concentración de

NH_4^+ considerablemente inferior a la utilizada durante el período de precargado, el eflujo pasivo de NH_4^+ acumulado podría superar a la tasa de influjo causando un brusco descenso en la absorción neta (fig. 12).

En el experimento VII el pretratamiento conjunto de NH_4^+ y MSX determinaría que, en forma análoga al caso anterior, gran parte del NH_4^+ que ingresa al citoplasma se acumule como consecuencia del bloqueo (total o parcial) de su principal vía de asimilación. Si se toma en cuenta que los flujos de NH_4^+ a través del plasmalema son más rápidos que a través del tonoplasto (Pressland y Mc Naughton, 1986; Lee y Ratcliffe, 1991), el NH_4^+ así acumulado puede ser más facilmente intercambiable con el medio externo. Asimismo si se considera que la aplicación de inhibidores enzimáticos suele ejercer un efecto deletéreo sobre la absorción de NH_4^+ (Lee y col., 1992), es posible que la interacción de dichos fenómenos haya determinado el marcado descenso en la tasa de absorción neta de NH_4^+ aún en las plantas con concentraciones endógenas del mismo más bajas que en las del experimento anterior (fig. 12).

Por lo expuesto es muy probable que la relación inversa hallada en ciertos casos entre la tasa de absorción neta y los niveles de NH_4^+ libre en raíz se deba a un aumento de la relación eflujo/influjo más que a un fenómeno inhibitorio específico sobre el sistema de transporte. Esta hipótesis estaría también sustentada por otros trabajos realizados en

plantas superiores en los cuales se deduce que la presencia de NH_4^+ no solo no parece inhibir su absorción sino que, por el contrario, la estimularía (Goyal y Huffaker, 1986; Morgan y Jackson, 1988 b; Jackson y Volk, 1992).

Con respecto a la relación entre la tasa de absorción neta y el contenido de aminoácidos totales libres (fig. 13), también hubo diferencias entre experimentos. En los experimentos V y VII no se observó una clara relación entre ambas variables, mientras que en el experimento VI la velocidad de absorción de NH_4^+ disminuyó con el aumento de la concentración de aminoácidos libres endógenos. Al representar dicha concentración en función de la concentración de NH_4^+ libre, solo en el caso del experimento VI se observó una correlación positiva entre ambas variables (fig. 15). Este resultado sugiere que, tal como se observara en la fig. 12, la disminución de la velocidad de absorción neta de NH_4^+ en este experimento probablemente esté más relacionada al aumento de los niveles de NH_4^+ en raíz que al de aminoácidos totales libres.

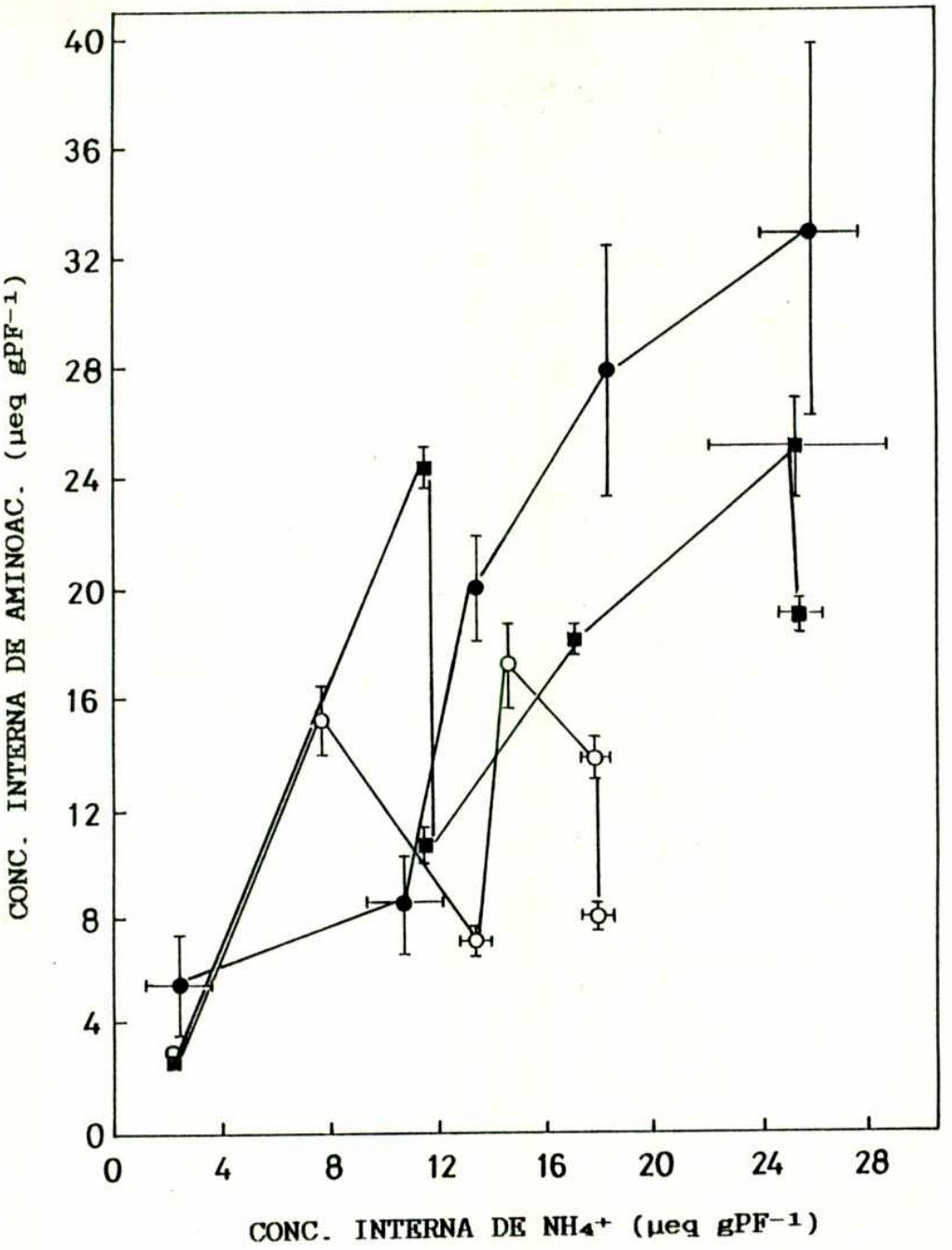

Fig. 15 : Concentración de aminoácidos totales libres en función de la concentración de NH_4^+ libre en raíz en plantas cultivadas durante distintos períodos de tiempo con 1.5 eq m^{-3} NH_4^+ (Exp. V) (■), durante 40 hs. con distintas concentraciones de NH_4^+ (Exp. VI) (●) o pretratadas con 1.3 eq m^{-3} NH_4^+ + 1.0 eq m^{-3} MSX (Exp. VII) (o). Las barras verticales y horizontales representan ± error estándar.

3.2. EFECTO DE LA PROVISION EXOGENA DE DISTINTOS AMINOACIDOS Y AMIDAS SOBRE LA ABSORCION NETA Y METABOLISMO DEL AMONIO.

La nutrición con NH_4-N determina un marcado aumento en el contenido endógeno de aminoácidos libres debido a la rápida incorporación del ión a esqueletos carbonados (Izawa, 1972; Oji e Izawa, 1972; Arima y Kumazawa, 1977; Huffaker y Rains, 1978; Givan, 1979). Se ha observado que la absorción de NO_3^- puede ser inhibida por la presencia de distintos aminoácidos en la solución nutritiva (Breteler y Arnozis, 1985; Muller y Touraine, 1992; Rodgers y Barneix, 1993) y algunos autores han sugerido que la absorción de N podría estar regulada por un determinado pool de aminoácidos de rápida circulación entre raíz y vástago (Cooper y Clarkson, 1989; Muller y Touraine, 1992). Dado que los resultados que he presentado hasta ahora muestran que no habría una relación directa entre la velocidad de absorción neta de NH_4^+ y la concentración de aminoácidos libres en raíz y considerando que la concentración tisular de cada aminoácido varía a una tasa diferente cuando se modifica la provisión de N (Arima, 1979; Arnozis y Findenegg, 1986; Joy, 1988), es posible asumir que solo aquellos aminoácidos o amidas cuyos niveles en raíz varíen rápidamente estarían preferentemente involucrados en la regulación de la absorción de N.

La información sobre el efecto de la provisión exógena de

aminoácidos sobre la absorción de NH_4^+ es escasa. Estudios en plantas de cebada (Clarkson y col., 1989) y otras especies vegetales (Etherton y Rubinstein, 1977) sugieren que la metionina (y probablemente otros aminoácidos) podrían inhibir la absorción de NH_4^+ y K^+ a través de un efecto de depolarización del plasmalema. Por otro lado se ha informado que la provisión de asparagina y glutamina inhibe marcadamente la absorción de NH_4^+ en células de levadura (Slaughter y col., 1990) y en plantas de maíz (Lee y col., 1992), aunque se desconoce exactamente mediante que mecanismo.

En las secciones siguientes se describirán una serie de experimentos en los que se estudió el efecto de la provisión exógena de diversos aminoácidos y amidas sobre la absorción de amonio.

3.2.1. Caracterización de la absorción neta de NH_4^+ en plantas deficientes en N pretratadas con distintos aminoácidos y amidas.

En este experimento se procuró determinar si la provisión exógena de aminoácidos pertenecientes a distintas familias en cuanto a las características de sus grupos "R" (Lehninger, 1972) podía afectar la tasa de absorción neta de NH_4^+ en plantas de trigo cultivadas en ausencia de otras fuentes de N.

-Experimento VIII: Plantas de trigo de 10 días, cultivadas en ausencia de N, fueron tratadas durante 4 hs. con una solución nutritiva sin N (control) o provista con 1.0 eq m^{-3} de los siguientes aminoácidos o amidas: serina (ser), fenilalanina (fen-ala), metionina (met), ácido aspártico (asp), ácido glutámico (glu), asparagina (asn) o glutamina (gln). Al final de cada pretratamiento se transfirieron a macetas de 180 ml. en donde se midió la absorción de NH_4^+ (1.5 eq m^{-3}) en presencia de 1.0 eq m^{-3} del aminoácido o amida utilizado en el tratamiento previo.

La absorción neta de NH_4^+ disminuyó más de un 90% respecto del control en las plantas tratadas con gln o asn, mientras que el efecto inhibitorio de los restantes aminoácidos no superó el 22% (fig. 16).

La gln es el primer producto que resulta de la incorporación del NH_4^+ a los esqueletos carbonados y ha sido demostrado que la misma se acumula más rápido que otros compuestos aminados cuando se provee nitrógeno a plantas deficientes en N (Arima y Kumazawa, 1977; Arima, 1979; Van Beusichem y col., 1988). Por otro lado la asn desempeña un rol muy importante como vía de transporte del N asimilado en numerosas especies, pudiendo ser sintetizada a partir de gln y asp, en presencia de ATP, a través de la asparagina sintetasa (Joy, 1988). Dado que la provisión exógena de ambas amidas

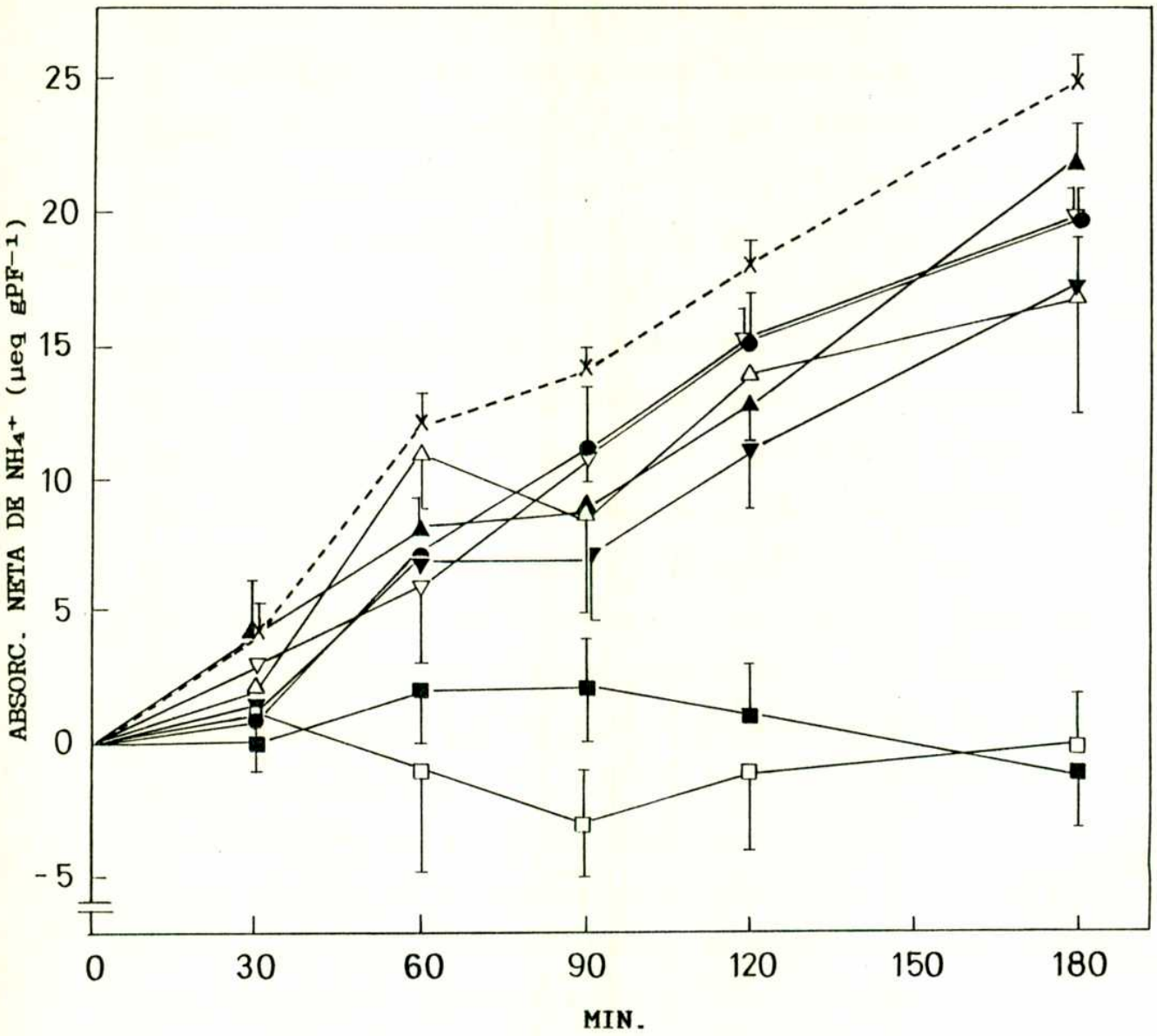

Fig. 16: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas cultivadas sin N (control) (x) o pretratadas durante 4 hs. con 1.0 mol m^{-3} de los siguientes aminoácidos y amidas: serina (▼), metionina (△), fenilalanina (▽), ácido aspártico (●), ácido glutámico (▲), glutamina (□) o asparagina (■) (Exp. VIII). Las barras verticales representan ± error estándar.

determinó una marcada inhibición de la absorción neta de amonio, es posible asumir que la gln y/o algún producto derivado de su transaminación esté/n involucrado/s en la regulación de la absorción del ión.

3.2.2. Estudio del efecto de la glutamina y la asparagina sobre la absorción y metabolismo del NH_4^+.

En esta sección se describirán varios experimentos desarrollados a fin de establecer el posible mecanismo a través del cual la asn y la gln inhiben/suprimen la absorción neta de NH_4^+. Los estudios se realizaron tanto en plantas previamente cultivadas en ausencia de N (3.2.2.1.) o con NO_3^- o NH_4^+ como fuentes del mismo (3.2.2.2.). En la mayoría de los experimentos se utilizó a la met como aminoácido control ya sea porque causó una parcial supresión de la absorción neta de NH_4^+ en las condiciones del experimento anterior (fig. 16), como por ser uno de los aminoácidos frecuentemente citados en estudios de depolarización de plasmalema (Kropf y col., 1984).

3.2.2.1. Experimentos realizados con plantas deficientes en N.

La metodología empleada en esta serie de experimentos fue básicamente la siguiente: Plantas de 10 días (cultivadas sin N) fueron pretratadas durante 4 hs. en una solución nutritiva

sin N o provista con NH_4^+, gln, asn , met o distintos inhibidores enzimáticos. Finalizado cada pretratamiento se procedió a medir la absorción neta de 1.5 eq m^{-3} NH_4^+, ya sea en presencia o en ausencia de los aminoácidos o inhibidores enzimáticos utilizados previamente. Cuando se indique, parte del material vegetal fue cosechado al comienzo y/o al final del período de medición a fin de determinar la concentración endógena de NH_4^+ libre, gln y asn en los distintos tratamientos.

-Experimento IX: En este experimento se procedió a estudiar el efecto de la provisión de gln, asn o met sobre la absorción de NH_4^+ de acuerdo al siguiente esquema:

Pretratamiento (4 hs.)	Medición de la absorción de NH_4^+ en presencia de:
a) s.b.	NH_4^+ solo (control)
b) s.b. + 1.0 eq m^{-3} gln	NH_4^+ solo
c) s.b. + 1.0 eq m^{-3} gln	1.0 eq m^{-3} gln
d) s.b. + 1.0 eq m^{-3} asn	NH_4^+ solo
e) s.b. + 1.0 eq m^{-3} asn	1.0 eq m^{-3} asn
f) s.b. + 1.0 eq m^{-3} met	NH_4^+ solo
g) s.b. + 1.0 eq m^{-3} met	1.0 eq m^{-3} met

Cuando las plantas fueron pretratadas durante 4 hs. con

gln, asn o met se observó una marcada inhibición de la absorción neta de NH_4^+ por efecto de ambas amidas en aquellos tratamientos en que la absorción del ión se midió en presencia de las mismas (fig. 17). Es más, la exposición ininterrumpida a un medio con asn determinó un eflujo neto de NH_4^+ tal como había sido observado en experimentos anteriores (ver fig. 16). La absorción neta de NH_4^+ en las plantas pretratadas con met disminuyó un 35% con respecto al control cuando se midió en presencia del aminoácido. Por el contrario, cuando la absorción de amonio se midió en ausencia de otras fuentes de N no se observaron diferencias significativas con respecto al control en las plantas pretratadas con gln o met, mientras que en las pretratadas con asn la tasa de absorción neta fue ± 50% menor durante los primeros 120 min. (fig. 17).

La concentración de NH_4^+ libre en raíz aumentó significativamente en las plantas pretratadas durante 4 hs. con gln o asn en ausencia de NH_4^+ externo (tabla 6). Análogamente, cuando dicha concentración se determinó al final del período de absorción, las plantas expuestas continuamente a cualquiera de las dos amidas presentaron los niveles más altos de NH_4^+ libre endógeno (tabla 6).

La concentración de gln en raíz aumentó en todos los tratamientos luego de que las plantas recibieran NH_4^+ exógeno (tabla 7), aunque no se hallaron diferencias significativas entre las plantas deficientes en N y las pretratadas con gln o

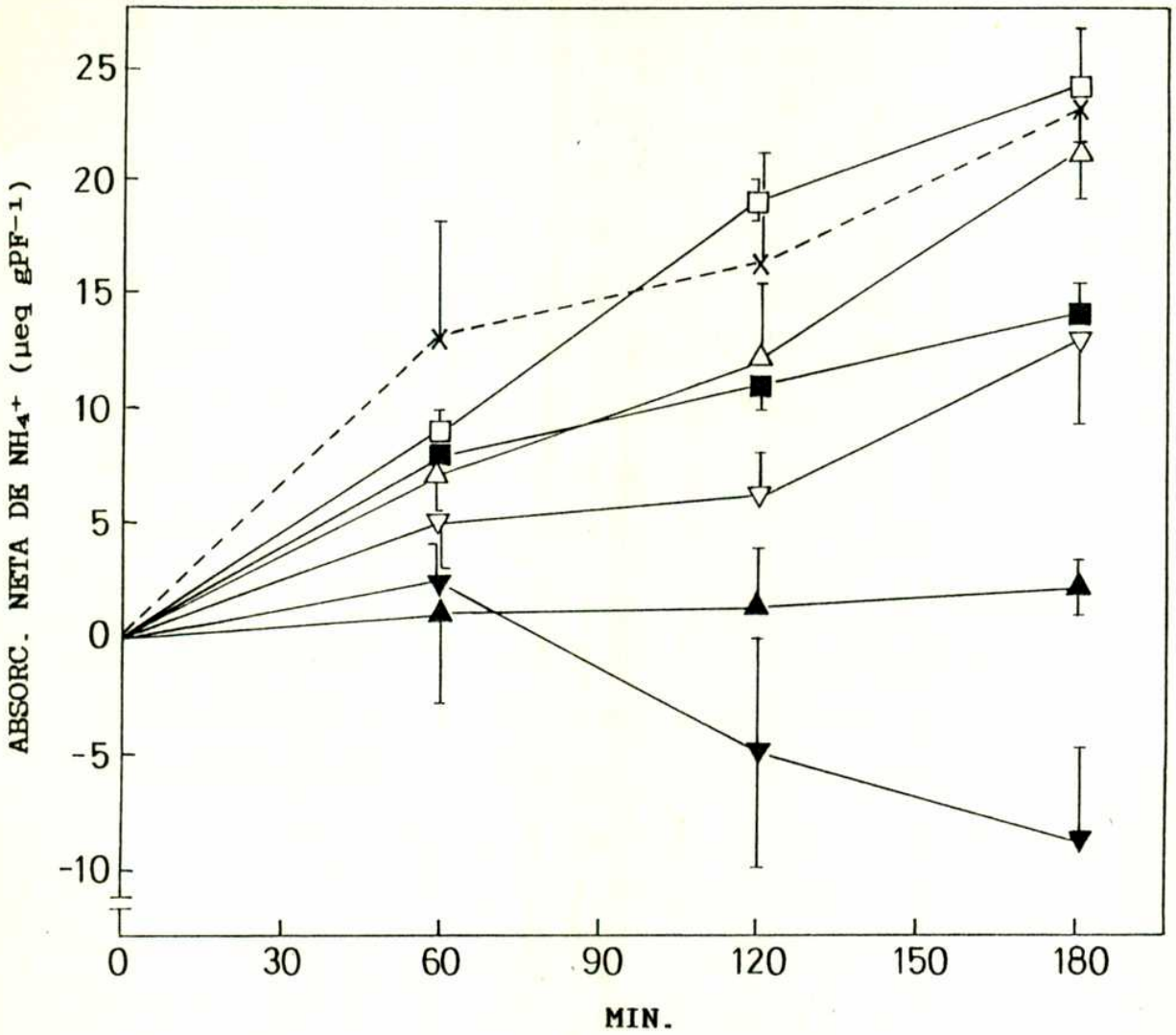

Fig. 17: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas cultivadas sin N (control) (×) o pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} de gln (tratam. b,c) (△▲), asn (tratam. d,e) (▽▼) o met (tratam. f,g) (□■). La absorción de NH_4^+ se midió en presencia (símbolos oscuros) o en ausencia (símbolos claros) de los respectivos aminoácidos (Exp. IX). Las barras verticales representan ± error estándar.

Tabla 6: Concentración de NH_4^+ libre en raíces (μeq gPF^{-1}) de plantas deficientes en N (a) y plantas pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} de gln (b, c), asn (d, e) o met (f, g), al comienzo (t_o) y al final (t_f) del período de medición de la absorción de NH_4^+ (Exp. IX). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento	$NH_4^+{}_{to}$	$NH_4^+{}_{tf}$
a) control	1.25^{b} (0.08)	14.60^{bc} (0.24)
b)	3.24^{d} (0.13)	13.25^{ab} (0.35)
c)	3.24^{d} (0.13)	16.62^{cd} (0.55)
d)	1.81^{c} (0.06)	13.77^{ab} (0.85)
e)	1.81^{c} (0.06)	17.60^{d} (0.40)
f)	0.76^{a} (0.03)	13.87^{ab} (0.32)
g)	0.76^{a} (0.03)	11.35^{a} (0.73)

Tabla 7: Concentración de glutamina y asparagina en las raíces (mg gPF^{-1}) de plantas deficientes en N (a) y plantas pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} de gln (b, c), asn (d, e) o met (f, g), al comienzo (t_o) y al final (t_f) del período de medición de la absorción de NH_4^+ (Exp. IX). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento	gln_{to}	gln_{tf}	asn_{to}	asn_{tf}
a) control	0.23^{b} (0.04)	0.41^{bc} (0.02)	1.25^{a} (0.06)	0.88^{a} (0.07)
b)	0.26^{b} (0.02)	0.37^{bc} (0.01)	1.51^{b} (0.01)	1.05^{ab} (0.06)
c)	0.26^{b} (0.02)	0.43^{c} (0.02)	1.51^{b} (0.01)	0.83^{a} (0.04)
d)	0.26^{b} (0.03)	0.36^{bc} (0.01)	1.47^{b} (0.05)	1.59^{d} (0.12)
e)	0.26^{b} (0.03)	0.36^{b} (0.01)	1.47^{b} (0.05)	1.44^{cd} (0.08)
f)	0.04^{a} (0.02)	0.29^{a} (0.00)	1.26^{a} (0.01)	1.24^{bc} (0.03)
g)	0.04^{a} (0.02)	0.28^{a} (0.01)	1.26^{a} (0.01)	1.28^{bcd} (0.08)

asn. Solo en el tratamiento con met la concentración de gln en raíz fue menor a la hallada en los restantes tratamientos (tabla 7). La concentración endógena de asn aumentó en las plantas pretratadas tanto con gln como con asn en ausencia de NH_4^+ externo (tabla 7). Sin embargo, cuando la misma se determinó al final del período de absorción de NH_4^+, no se registraron variaciones significativas en los tratamientos con asn o met, mientras que en el tratamiento control y en las plantas pretratadas con gln la concentración de asn en raíz disminuyó un 30% (tratamientos a y b) y un 45% (tratamiento c) con respecto al valor inicial (tabla 7).

A partir de un primer análisis del conjunto de datos presentados surgen una serie de aspectos que quisiera destacar. Si bien ya en el experimento VIII se notaba una marcada diferencia en el efecto ejercido por la provisión de gln o asn respecto de otros aminoácidos sobre la absorción neta de NH_4^+, los presentes datos señalan que:

- Solo se produjo una marcada inhibición en aquellos tratamientos en los cuáles las amidas fueron incluídas en la solución externa durante el período de absorción.
- Solo en las plantas pretratadas durante 4 hs. con asn la absorción neta de NH_4^+ resultó parcialmente suprimida en ausencia de la amida.
- La provisión de gln o asn exógenas determinó un aumento en la concentración de NH_4^+ libre en raíz tanto en ausencia de

NH_4^+ externo como en los casos en que la tasa de absorción neta del mismo es nula o negativa (eflujo neto). Esto sugiere un efecto por parte de las amidas sobre el metabolismo del amonio ya sea estimulando las vías de producción y/o inhibiendo las vías de asimilación del mismo.

- La provisión tanto de gln como de asn a plantas cultivadas en ausencia de N exógeno, determina un aumento de la concentración endógena de asn pero no de gln.

En base a estos hechos surgen, entre otras, las siguientes preguntas: ¿la presencia de gln o asn exógenas puede inhibir la absorción de NH_4^+ independientemente del tratamiento previo con las mismas?; ¿cuáles son los posibles mecanismos que podrían explicar el efecto supresor observado cuando las amidas se proveen conjuntamente con el NH_4^+?; ¿podría ser dicho efecto una consecuencia indirecta del aumento en los niveles de NH_4^+ libre endógeno?.

A fin de responder en forma precisa tales preguntas sería necesario poder estimar de que manera los tratamientos aplicados insiden sobre los distintos componentes del flujo neto de NH_4^+ y como se relacionan dichos efectos con las variaciones de compuestos nitrogenados específicos en aquellos compartimentos directamente vinculados al sistema de transporte de NH_4^+.

Estudios detallados de cinética de absorción y compartimentalización de NH_4^+ y distintos metabolitos

nitrogenados han sido abordados mediante diferentes metodologías tales como: utilización de análogos estructurales (Kleiner y Fitzke, 1981; Alef y Kleiner, 1982); utilización de N marcado (Arima y Kumazawa, 1977; Lewis y col., 1983; Pressland y Mc. Naughton, 1986; Morgan y Jackson, 1988 a-b, 1989; Macklon y col., 1990; Macduff y Jackson, 1992; Jackson y col., 1993) y análisis de espectros de RMN (Lee y col., 1992; Lee y Ayling, 1993). Los datos mencionados por distintos autores no siempre coinciden y algunos opinan que aún no existe una técnica adecuada para medir, en una escala de tiempo realista, la concentración de compuestos nitrogenados con algún posible efecto regulador en ninguno de sus probables compartimentos de la raíz (Lee y col., 1992).

Si a esta dificultad se suma el hecho de que en el presente trabajo de tesis no fue posible emplear ninguna de las metodologías previamente mencionadas, resulta evidente la imposibilidad de dar una respuesta exacta a todas las preguntas que he formulado. No obstante a continuación describiré una serie de experimentos que, si bien dejarán varios aspectos sin clarificar, ayudarán a tener una visión más precisa del posible mecanismo a través del cuál se produciría la regulación de la absorción de amonio en trigo.

En primer término comentaré 3 experimentos tendientes a explorar con más detalle el efecto del pretratamiento y/o la presencia de gln o asn sobre la absorción de NH_4^+ y algunos de

los posibles mecanismos propuestos para explicar tales efectos.

-Experimento X: En este experimento se procedió a estudiar el efecto de la provisión de asn sobre la absorción de NH_4^+ de acuerdo al siguiente esquema:

Pretratamiento	Medición de la absorción de NH_4^+ en presencia de:
a) s.b.	NH_4^+ solo (control)
b) s.b. + 1 h. 1.0 eq m^{-3} asn	NH_4^+ solo
c) s.b. + 2 hs. 1.0 eq m^{-3} asn	NH_4^+ solo
d) s.b. + 5 hs. 1.0 eq m^{-3} asn	NH_4^+ solo
e) s.b.	1.0 eq m^{-3} asn

El pretratamiento durante 1 o 2 hs. con 1.0 eq m^{-3} asn no inhibió significativamente a la absorción neta de NH_4^+, medida en ausencia de la amida (fig. 18, tratam. b y c). Solo en el caso de las plantas pretratadas durante 5 hs. se observó una ligera disminución en la tasa de absorción neta con respecto al control. Por el contrario, en las plantas deficientes en N la presencia de asn exógena determinó un descenso significativo de dicha tasa a partir de ± 90 min. de iniciado el período de medición (fig. 18, tratam. e). Debido a que, a diferencia de la asn, el pretratamiento con gln no inhibió la

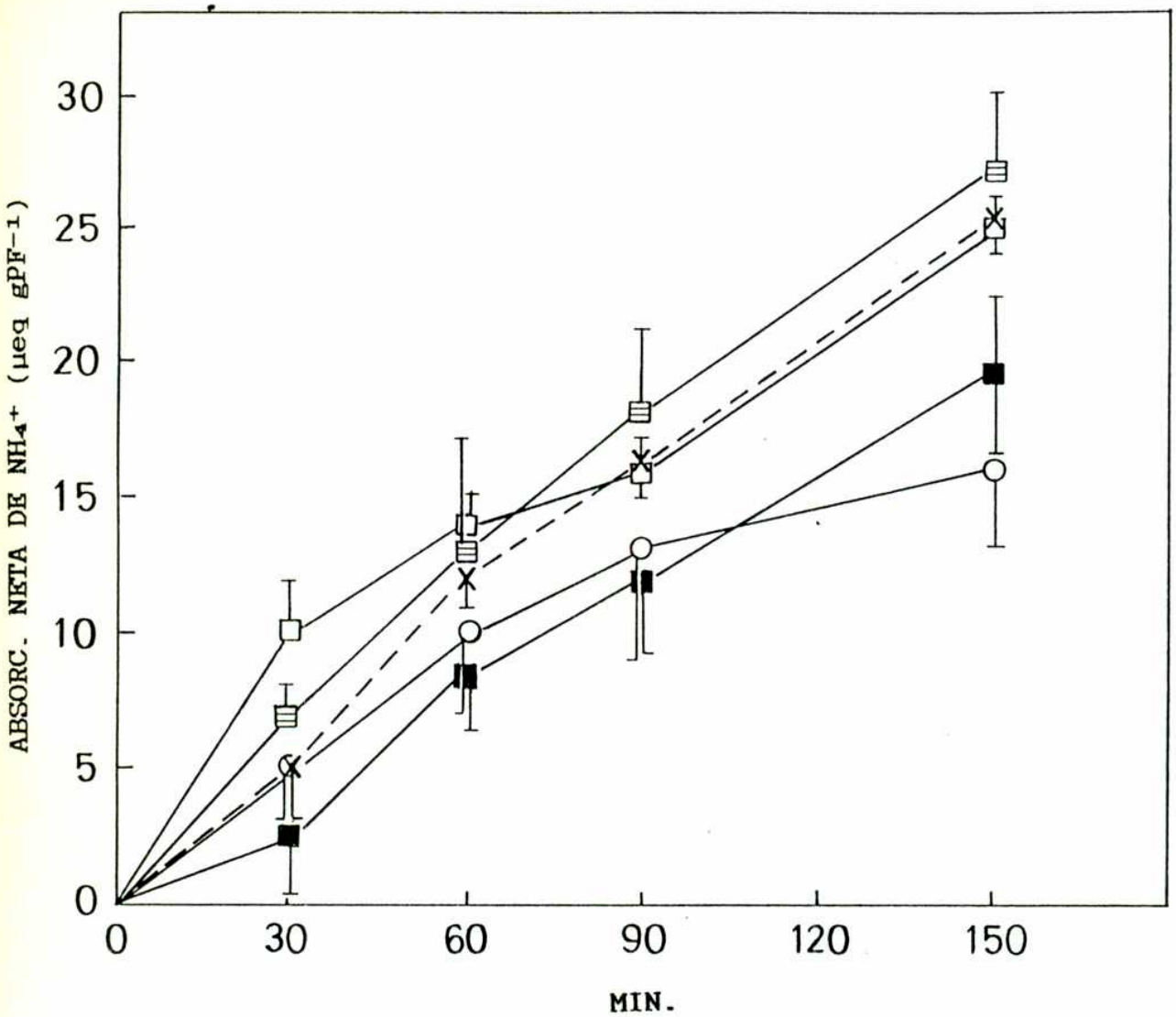

Fig. 18: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas cultivadas sin N, medida en ausencia (control) (X) o en presencia (tratam. e) (o) de 1.0 eq m^{-3} de asn, y en plantas pretratadas durante 1 h. (tratam. b) (□), 2 hs. (tratam. c) (▤) o 5 hs. (tratam. d) (■) con 1.0 eq m^{-3} de asn, medida en ausencia de la misma (Exp. X). Las barras verticales representan ± error estándar.

absorción de NH_4^+ cuando esta se midió en ausencia de la amida, se diseñó un experimento a fin de estudiar el efecto del uso de mayores concentraciones de gln provistas ya sea en forma previa o durante la absorción de NH_4^+. Se utilizó nuevamente met como aminoácido control.

-Experimento XI: Plantas de trigo de 10 días fueron tratadas con gln o met según el siguiente esquema:

Pretratamiento (4 hs.)	Medición de la absorción de NH_4^+ en presencia de:
a) s.b.	NH_4^+ solo (control)
b) s.b.	1.0 eq m^{-3} gln
c) s.b.	3.0 eq m^{-3} gln
d) s.b.	1.0 eq m^{-3} met
e) s.b. + 5.0 eq m^{-3} gln	NH_4^+ solo
f) s.b. + 5.0 eq m^{-3} met	NH_4^+ solo

Cuando las plantas fueron pretratadas con 5.0 eq m^{-3} gln o met y la absorción de NH_4^+ se midió en ausencia de las mismas (tratam. e y f), no se observó inhibición de la tasa de absorción de NH_4^+ durante los primeros 180 min., aunque posteriormente la misma disminuyó en ambos casos con respecto al control (fig. 19).

Sin embargo, cuando la absorción neta de NH_4^+ en plantas deficientes en N se midió en presencia de 1.0 o 3.0 eq m^{-3} gln

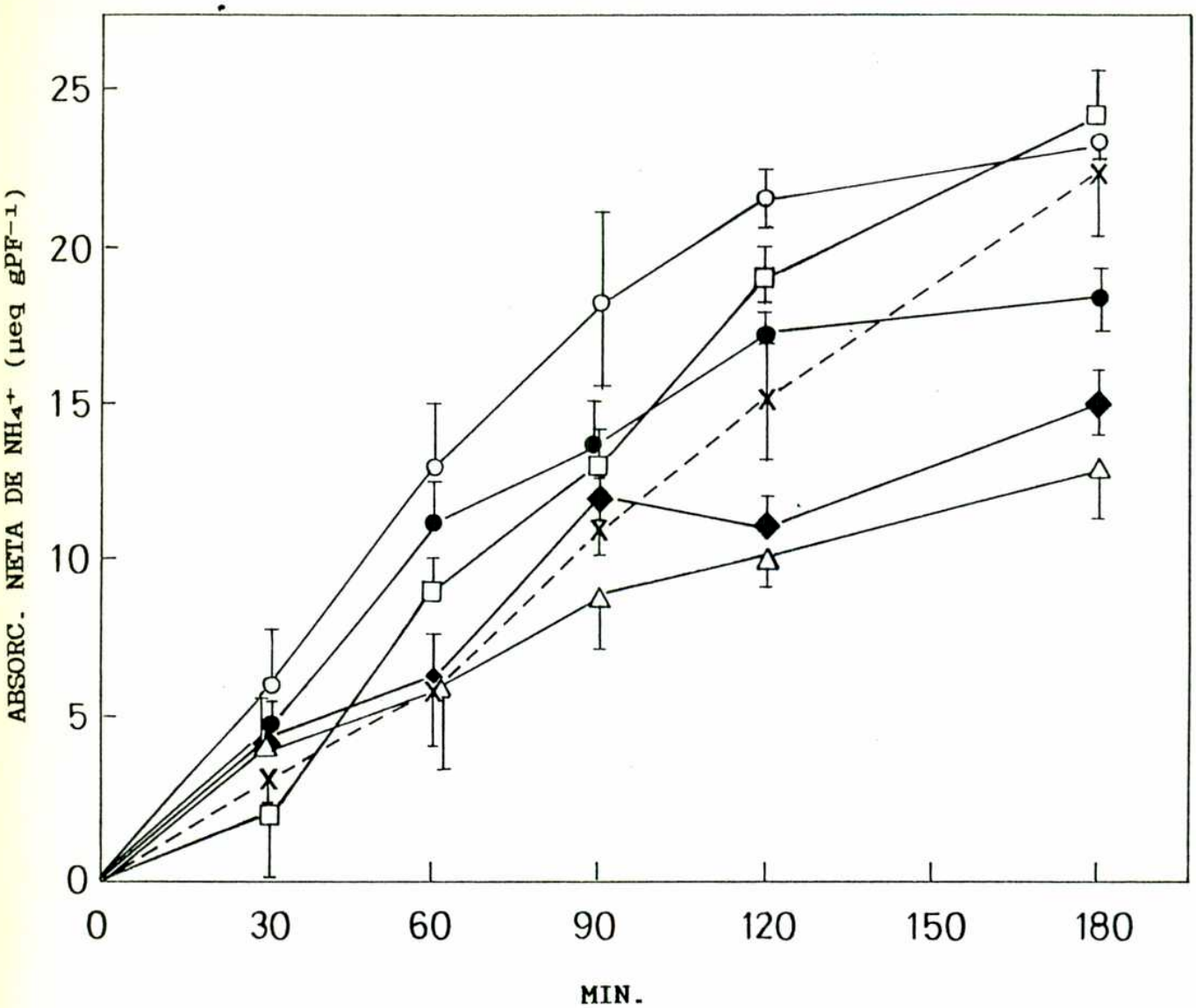

Fig. 19: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas cultivadas sin N, medida en presencia de 0.0 eq m^{-3} (control) (×), 1.0 eq m^{-3} (tratam. b) (Δ) o 3.0 eq m^{-3} (tratam. c) (◆) de gln, y en plantas pretratadas durante 4 hs. con 5.0 eq m^{-3} de gln (tratam. e) (●) o met (tratam. f) (o), medida en ausencia de las mismas (Exp. XI). Las barras verticales representan ± error estándar.

(tratamientos b y c), la tasa neta de absorción disminuyó en ambos casos al cabo de ± 90 min. de iniciados los muestreos (fig. 19), al igual que lo observado previamente al utilizarse asn. Dicho efecto no se observó cuando se utilizó 1.0 eq m^{-3} met en lugar de la amidas (fig. 19, tratamiento d).

El pretratamiento con 5.0 eq m^{-3} gln en ausencia de NH_4^+ externo determinó un aumento significativo de la concentración de NH_4^+ libre en raíz (tabla 8), tal como había sido observado en el experimento IX. Dicho efecto no se observó en parte aérea, en donde la concentración de NH_4^+ libre fue menor a 1.0 µeq gPF^{-1} en todos los pretratamientos (tabla 8).

Los resultados presentados hasta el momento confirmarían el hecho de que en las plantas pretratadas con gln o asn la absorción de NH_4^+ se inhibe marcadamente solo durante una contínua exposición a las mismas. Esto sugeriría que ambas amidas podrían afectar el flujo de NH_4^+ directamente a nivel de su sistema de transporte. La posibilidad de una competencia por el sitio de transporte entre las amidas y el ión parecería poco probable dada la diferencia estructural entre las especies moleculares consideradas. Por otro lado, los datos de los experimentos X y XI muestran que la absorción de NH_4^+ en plantas deficientes en N solo disminuye al cabo de 90 min. de exposición contínua a las amidas, siendo el porcentaje de inhibición (en el caso de la gln) independiente de la concentración externa utilizada. Asimismo las características

Tabla 8: Concentración de NH_4^+ libre (µeq gPF^{-1}) en raíz y parte aérea en plantas deficientes en N (tratamientos a-d) o pretratdas durante 4 hs. con 5.0 eq m^{-3} gln (tratamiento e) o met (tratamiento f) (Exp. XI). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento	NH_4^+ RZ	NH_4^+ PA
sin N (a-d)	0.88[b] (0.13)	0.81[a] (0.20)
gln (e)	3.88[a] (0.20)	1.03[a] (0.08)
met (f)	0.73[b] (0.08)	0.58[a] (0.20)

del efecto supresor observado cuando la absorción de NH_4^+ se mide en presencia de gln o asn difiere notablemente entre plantas tratadas y no tratadas previamente con las amidas.

Varios autores han informado que la absorción de distintos aminoácidos tales como metionina o ácido α-aminoisobutírico puede provocar una depolarización transitoria del plasmalema, causando una disminución en la tasa de absorción de K^+ o NH_4^+ (Etherton y Rubinstein, 1977; Kropf y col., 1984; Clarkson y col., 1989). En nuestras condiciones experimentales la velocidad de absorción neta de NH_4^+ en presencia de met no difirió significativamente de la del control en las plantas deficientes en N (fig. 19) y solo disminuyó un 35% en las pretratadas durante 4 hs. con met (fig. 17). No obstante, a fin de comprobar si la provisión de gln o asn afectaba la absorción neta de otros cationes, a continuación se describirá un experimento en donde se estudió la absorción neta de K^+ siguiendo un diseño similar al del experimento IX:

-Experimento XII: Plantas de trigo de 2 días fueron cultivadas en una solución nutritiva sin N durante 6 días, la cual fue posteriormente reemplazada por una solución sin K^+ durante 60 hs. previo al inicio de los pretratamientos. Durante dicho período la provisión de fosfato se efectuó mediante el agregado de 0.5 eq m^{-3} $PO_4H_2NH_4$. Los

pretratamientos con gln, asn y met se realizaron en similares condiciones a las descriptas para el experimento IX excepto que, en este caso, se utilizaron soluciones nutritivas desprovistas tanto de K^+ como de NH_4^+:

Pretratamiento (4 hs.)	Medición de la absorción de K^+ en presencia de:
a) solución sin aa	K^+ solo (control)
b) 1.0 eq m^{-3} gln	K^+ solo
c) 1.0 eq m^{-3} gln	1.0 eq m^{-3} gln
d) 1.0 eq m^{-3} asn	K^+ solo
e) 1.0 eq m^{-3} asn	1.0 eq m^{-3} asn
f) 1.0 eq m^{-3} met	K^+ solo
g) 1.0 eq m^{-3} met	1.0 eq m^{-3} met

La absorción neta de K^+ se midió en ausencia de NH_4^+ externo, partiendo de una solución basal con 1.5 eq m^{-3} K^+.

A diferencia de lo observado para el ión amonio, la presencia de gln o asn en la solución externa no solo no inhibió a la absorción neta de K^+ sino que, con respecto al tratamiento control, la habría parcialmente estimulado (fig. 20). Si bien este resultado debería ser sujeto a futuras investigaciones, es claro que el conjunto de datos sugiere que tanto la gln como la asn ejercerían un efecto inhibitorio específico sobre la absorción de NH_4^+, no atribuible a una

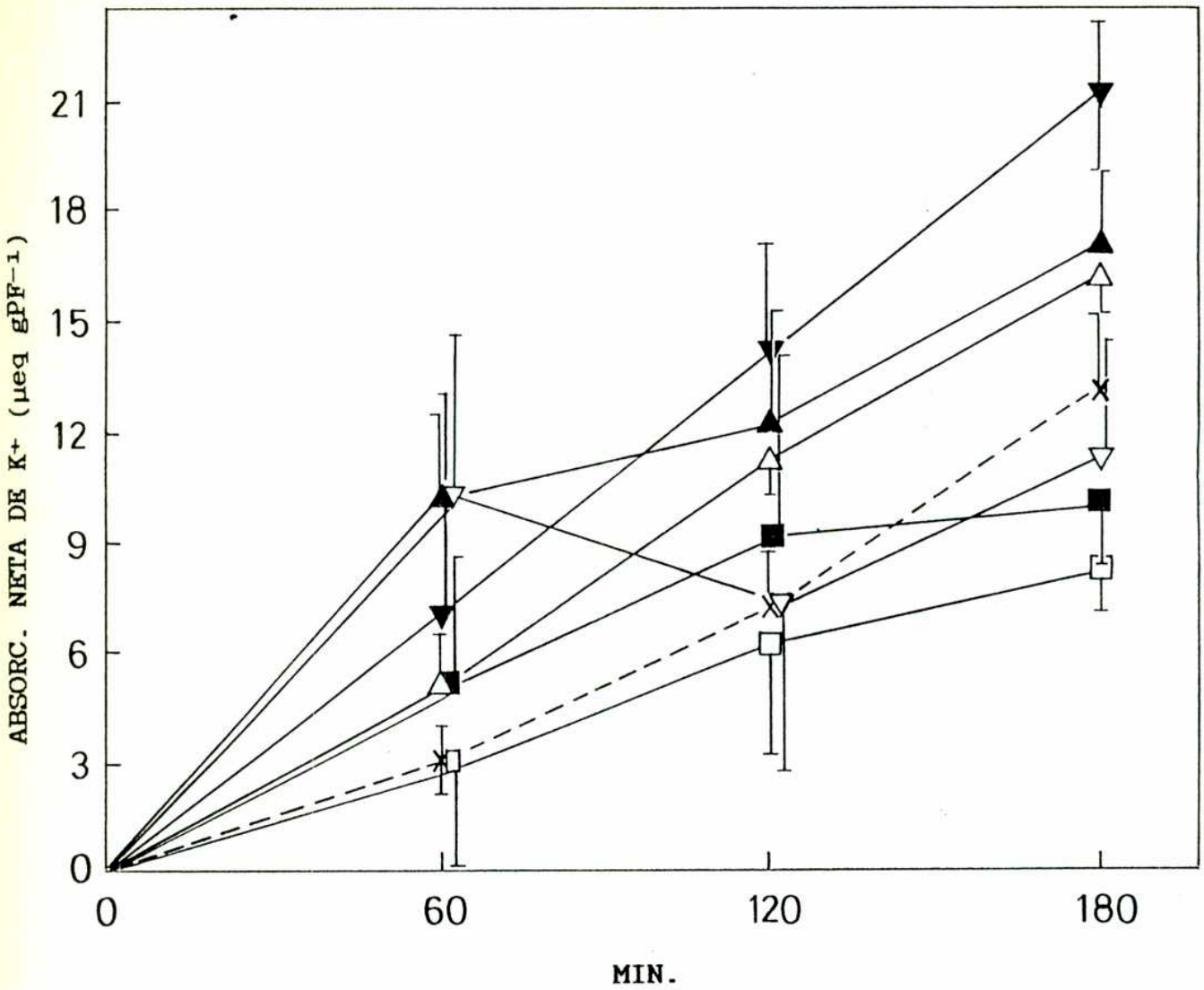

Fig. 20: Absorción neta de K^+ (acumulativa) en plantas pretratadas durante 0 hs. (control) (X) o 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} de gln (tratam. b,c) (Δ▲), asn (tratam. d,e) (▽▼), o met (tratam. f,g) (□■). La absorción de K^+ se midió en presencia (símbolos oscuros) o en ausencia (símbolos claros) de los respectivos aminoácidos (Exp. XII). Las barras verticales representan ± error estándar.

mera depolarización del plasmalema.

Cuando las plantas fueron pretratadas con gln o asn en ausencia de NH_4^+ externo se observó un aumento significativo de la concentración de NH_4^+ libre en raíz (tablas 6 y 8). Es más, cuando en las plantas pretratadas con asn se midió la absorción de NH_4^+ en presencia de la amida (Exp. IX), la concentración endógena del ión siguió aumentando a pesar de que en dicho tratamiento se registró un eflujo neto de NH_4^+ durante la mayor parte del período de medición (tabla 6; fig. 17). Ambos resultados indicarían que la provisión de gln o asn estimularía de alguna manera la acumulación de NH_4^+ libre en los tejidos. En la sección 3.3. se discutirán más detalladamente los posibles efectos sobre el metabolismo del NH_4^+ derivados de la provisión de distintas fuentes de N.

Ahora bien, ¿es posible que la disminución de la absorción neta sea consecuencia de un aumento del eflujo de NH_4^+ endógeno acumulado transitoriamente?. En la sección 3.1. se describieron varios experimentos en los que se demostró que en general no se observaba una clara relación entre ambas variables en el rango de concentraciones de NH_4^+ endógeno inferior a los 16-18 $\mu eq\ gPF^{-1}$. Por otro lado los resultados obtenidos en los experimentos IX y XI muestran que, a pesar de que el pretratamiento con las amidas determina un aumento significativo de la concentración de NH_4^+ en raíz, el porcentaje de inhibición de la absorción neta varía

considerablemente según esta se mida en presencia o en ausencia de las mismas (comparar fig. 17 vs. tabla 6 y fig. 19 vs. tabla 8). No obstante, dado que las alteraciones en el metabolismo del amonio podrían de alguna manera afectar la tasa de absorción del ión, se describirán a continuación 2 experimentos en los cuales se exploró si la provisión de inhibidores enzimáticos de la vía GS-GOGAT modificaba el efecto supresor de las amidas sobre la absorción de NH_4^+.

Diseño experimental:

Número de experimento	Pretratamiento (4 hs.)	Medición de la absorción de NH_4^+ en presencia de:
Exp. XIII	a) s.b. + 1.0 eq m^{-3} NH_4^+	-----NH_4^+ solo (control)
	b) s.b. + 1.0 eq m^{-3} gln	------1.0 eq m^{-3} gln
	c) s.b. + 1.0 eq m^{-3} gln	------1.0 eq m^{-3} MSX
	d) s.b. + 1.0 eq m^{-3} MSX	------1.0 eq m^{-3} MSX
	e) s.b. + 1.0 eq m^{-3} MSX	------1.0 eq m^{-3} gln
Exp. XIV	a) s.b.	----------NH_4^+ solo (control)
	b) s.b. + 1.0 eq m^{-3} asn	------1.0 eq m^{-3} asn
	c) s.b. + 1.0 eq m^{-3} asn + 1.0 eq m^{-3} MSX	----------1.0 eq m^{-3} asn + 1.0 eq m^{-3} MSX
	d) s.b. + 1.0 eq m^{-3} asn + 0.17 eq m^{-3} DON	----------1.0 eq m^{-3} asn + 0.17 eq m^{-3} DON

Cuando las plantas fueron pretratadas durante 4 hs. con

MSX (Exp. XIII), la absorción neta de NH_4^+ en presencia del inhibidor fue parcialmente suprimida durante los primeros 90 min. (fig. 21). Este efecto, sin embargo, fue más acentuado y se extendió a lo largo de todo el período de absorción cuando el MSX fue remplazado por gln durante dicho período. En las plantas pretratadas con gln se observó una marcada inhibición de la absorción de NH_4^+ (con eflujo neto del ión) en presencia de la amida, aunque no hubo diferencias significativas con respecto al control cuando se remplazó a la gln por el inhibidor (fig. 21). La concentración de NH_4^+ libre en raíz difirió significativamente por efecto del pretratamiento, siendo en las plantas pretratadas con NH_4^+ (control) > pretratadas con MSX > pretratadas con gln (tabla 9).

La provisión conjunta de asn con MSX o DON (un inhibidor de la GOGAT) determinó una parcial disminución del efecto inhibitorio ejercido por la amida sobre la absorción neta de NH_4^+ (Exp. XIV, fig. 22).

El análisis de los datos del experimento XIII muestra que, en concordancia con lo sugerido previamente, el efecto inhibitorio de la gln y la asn no estaría directamente correlacionado con el aumento del nivel de NH_4^+ libre en raíz (comparar fig. 21 y tabla 9). Ahora bien, cuando las plantas fueron pretratadas con gln o asn en ausencia de NH_4^+ externo no se observaron variaciones significativas con respecto al control en el contenido de gln en raíz, aunque sí hubo un

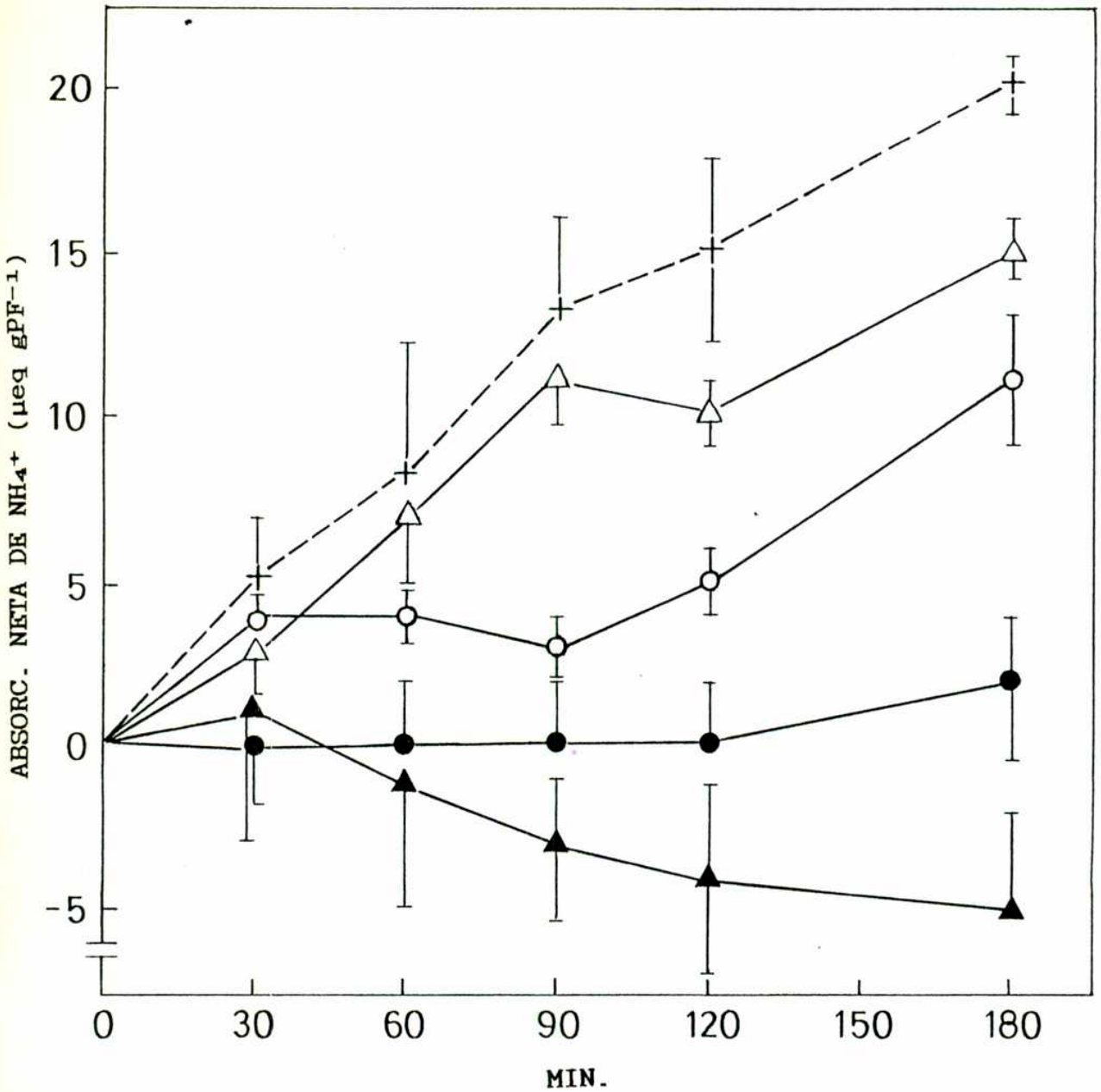

Fig. 21: Absorción neta de NH_4^+ (acumultiva) en plantas de trigo pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} de NH_4^+ (control) (+), gln (tratam. b,c) (△▲) o MSX (tratam. d,e) (○●). En los 2 últimos pretratamientos la absorción de NH_4^+ se midió alternativamente en presencia de gln (símbolos oscuros) o MSX (símbolos claros) (Exp. XIII). Las barras verticales representan ± error estándar.

Tabla 9: Concentración de NH_4^+ libre en raíces (μeq gPF^{-1}) de plantas pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} de NH_4^+ (control), gln o MSX (Exp. XII). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento	NH_4^+ libre
NH_4^+	13.09[a] (0.41)
MSX	4.59[b] (0.07)
gln	1.95[c] (0.12)

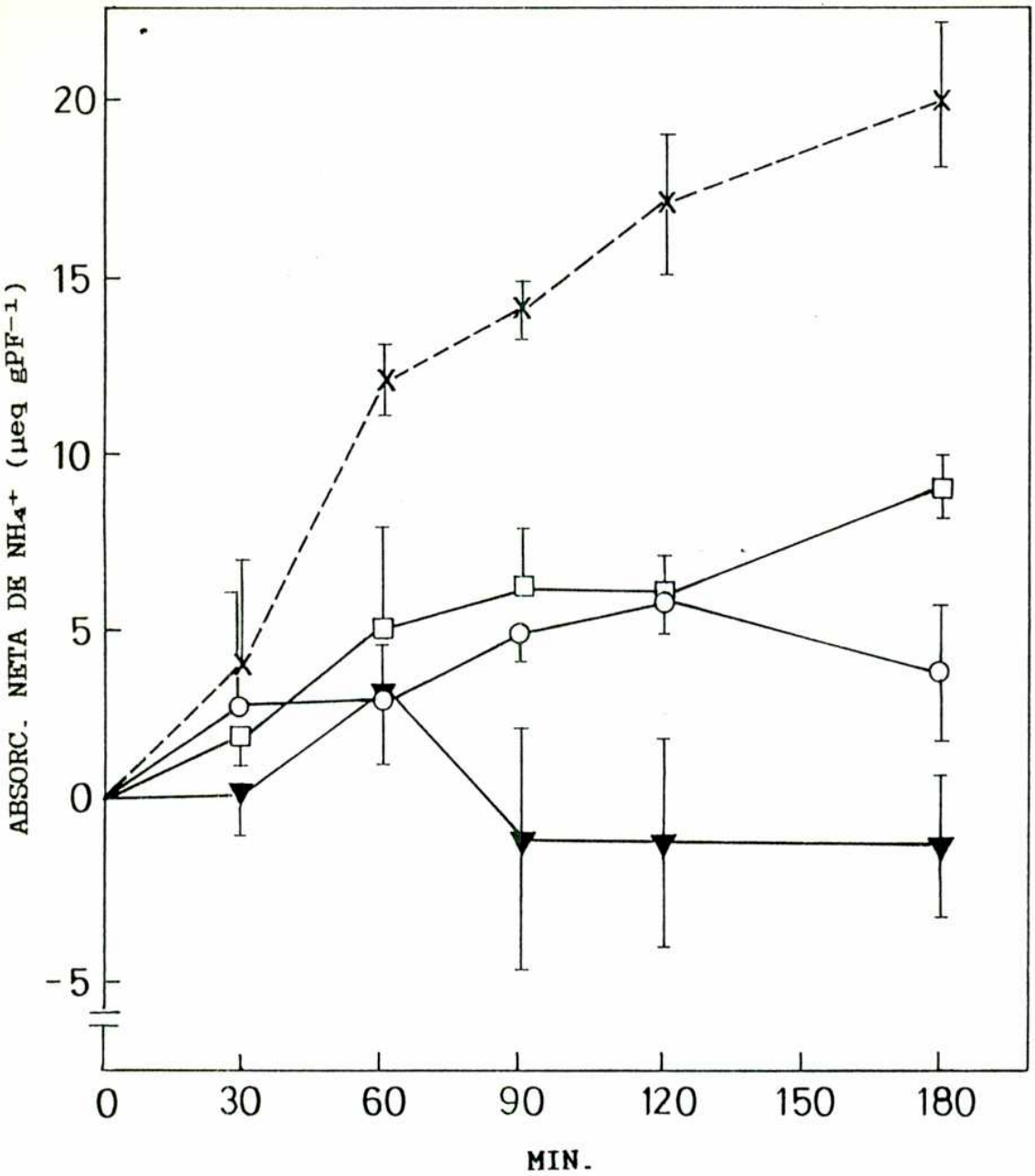

Fig. 22: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas cultivadas sin N (control) (×) o pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} de asn (tratam. b) (▼), 1.0 eq m^{-3} asn + 1.0 eq m^{-3} MSX (tratam. c) (o) o 1.0 eq m^{-3} asn + 0.17 eq m^{-3} DON (tratam. d) (□). La absorción de NH_4^+ se midió en presencia de asn sola o con el agregado del inhibidor enzimático según el respectivo pretratamiento (Exp. XIV). Las barras verticales representan ± error estándar.

aumento de la concentración endógena de asn en ambos casos (Exp. IX, tabla 7). Un resultado similar fue reportado por Slaughter y col. (1990) quienes observaron que la provisión exógena de gln o asn a un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* determinaba un aumento en el pool endógeno de asn, mientras que el de gln se mantenía aproximadamente constante. Dado que el incremento de la concentración de asn se correlacionó positivamente con una rápida disminución de la absorción de NH_4^+ en las células, los mencionados autores concluyeron que la asn endógena ejercería un efecto inhibidor sobre el sistema de transporte del ión.

Como se mencionara oportunamente, la asn desempeña un importante rol como intermediario en el transporte de N en plantas superiores, por lo tanto existe la posibilidad de que el aumento del contenido endógeno de esta amida contribuya a la regulación de la absorción de NH_4^+ en trigo. Bajo esta hipótesis, la disminución del efecto supresor ejercido por la asn que se observó cuando la misma se proveyó conjuntamente con inhibidores de las enzimas GS y GOGAT (Exp. XIV, fig. 22) podría deberse a una mayor utilización del pool endógeno de la asn como fuente de N asimilado. De manera similar, el efecto inhibitorio de la gln podría ser consecuencia de un aumento del pool de asn en raíz a través de la actividad de la asparagina sintetasa. Dado que la compartimentalización de la amida probablemente desempeñe un rol importante en su

actividad regulatoria, la necesidad de que las mismas estén presentes exógenamente para lograr una supresión prolongada de la absorción de NH_4^+ podría estar relacionada a una rápida disminución del pool endógeno de asn que afectaría directamente al sistema de transporte.

No obstante debe tenerse en cuenta que cuando las plantas pretratadas con gln fueron transferidas a la solución en donde se midió la absorción de NH_4^+ en presencia de gln (Exp. IX, tratamiento c), la concentración de asn en raíz al final del período de medición había decrecido significativamente a pesar de que la absorción neta de NH_4^+ permaneció inhibida (tabla 7, fig. 17). Dicho resultado sugeriría que la acción regulatoria de la gln (y asn?) en trigo involucraría un mecanismo más complejo del previamente expuesto.

3.2.2.2. Experimentos realizados con plantas pretratadas con nitrato o amonio.

En la presente sección se describirán 2 experimentos en los que se investigó si el efecto inhibitorio ejercido por la provisión de gln o asn sobre la absorción neta de NH_4^+ presentaba características similares en el caso de utilizarse plantas cultivadas previamente con NO_3^- o NH_4^+. A continuación se describe la metodología seguida en ambos experimentos:

Plantas de trigo de 7 días, cultivadas en ausencia de N,

fueron separadas en 2 grupos y transferidas durante 60 hs. a sendos tanques conteniendo una solución nutritiva con 1.5 eq m^{-3} de NO_3^- o NH_4^+ como fuentes de N. Posteriormente las plantas de cada grupo se transladaron a recipientes de 2 L. conteniendo una solución de igual composición a la del tratamiento precedente (control) o con el agregado de 1.0 eq m^{-3} de gln (Experimento XV) o asn (Experimento XVI). Al cabo de 4 hs. de pretratamiento, parte del material vegetal fue cosechado y el resto se transfirió a macetas plásticas con 180 ml de solución basal + 1.5 eq m^{-3} NH_4^+ en donde se midió la absorción neta del ión en presencia o ausencia de las amidas.

El material vegetal cosechado fue separado en raíz y parte aérea, se pesó y luego se procesó para la determinación de NH_4^+ libre, gln y asn endógenos.

En el siguiente esquema se resúmen los distintos tratamientos aplicados en ambos experimentos:

Fuente de N	Pretratamiento (4 hs.)	Medición de la absorción de NH_4^+ en presencia de:
	a) NH_4^+	NH_4^+ solo (control)
NH_4-N	b) NH_4^+ + aa*	NH_4^+ solo
	c) NH_4^+ + aa	NH_4^+ + aa
	d) NO_3^-	NH_4^+ solo (control)
NO_3-N	e) NO_3^- + aa	NH_4^+ solo
	f) NO_3^- + aa	NH_4^+ + aa

(*) 1.0 eq m^{-3} gln (Exp. XV) o 1.0 eq m^{-3} asn (Exp. XVI)

Tal como se había hallado previamente (sección 3.1.), la absorción neta de NH_4^+ en los tratamientos control no difirió significativamente entre las plantas cultivadas con NO_3^- o NH_4^+ como fuentes de N (figs. 23 y 24, tratamientos a y d).

a- Efecto del tratamiento con glutamina (Exp. XV). Cuando la absorción de NH_4^+ se midió en ausencia de gln exógena (tratamientos b y e), el pretratamiento con la amida no afectó a la tasa de absorción neta del ión en las plantas cultivadas con NO_3^-, pero causó una disminución de la misma de ± 30% durante los primeros 90 min. en las plantas que recibieron NH_4-N (fig. 23). Por el contrario, cuando la absorción de NH_4^+ se midió en presencia de gln (tratamientos c y f), la tasa de absorción fue suprimida totalmente al cabo de 2 hs. en el tratamiento con NO_3^- mientras que un eflujo neto de NH_4^+ se observó a lo largo de todo el período de medición en las plantas cultivadas con NH_4^+ (fig. 23).

La concentración de NH_4^+ libre tanto en raíz como en parte aérea fue mayor en las plantas que recibieron NH_4^+ como fuente de N (tabla 10). Por otro lado el tratamiento con gln determinó un aumento de la concentración de NH_4^+ libre en raíz, tanto en las plantas cultivadas con NO_3^- como con NH_4^+ (tabla 10).

La concentración de gln y asn en raíz fue 4 y 20 veces más alta, respectivamente, en las plantas que recibieron NH_4-N

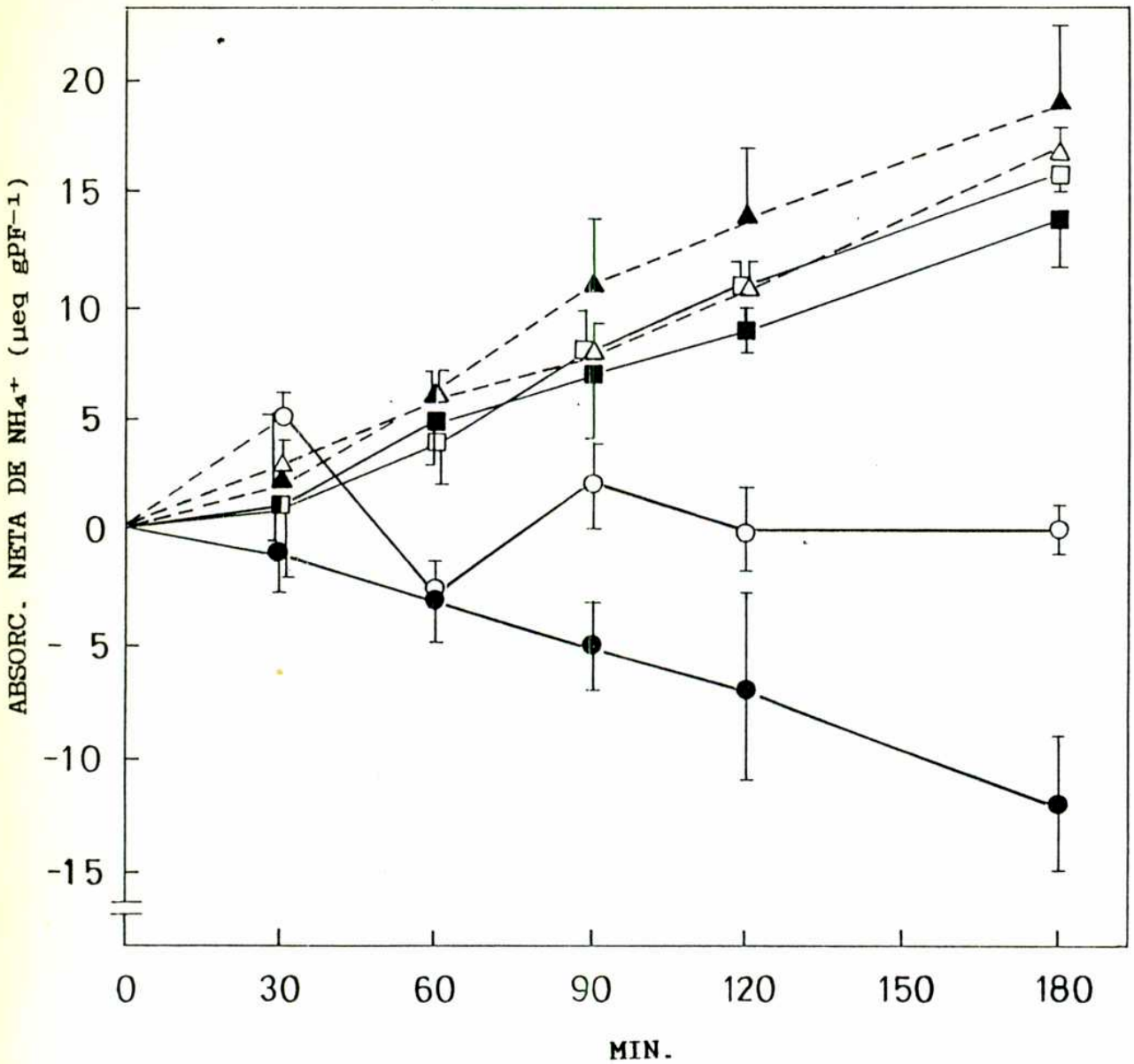

Fig. 23: Absorción neta de NH_4^+ (acumulativa) en plantas cultivadas durante 60 hs. con 1.5 eq m^{-3} de NO_3^- (símbolos claros) o NH_4^+ (símbolos oscuros) y pretratadas durante 0 hs. (controles) (△▲) o 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} gln. En este último caso la absorción se midió en ausencia (tratam. b,e) (□■) o en presencia (tratam. c,f) (○●) de 1.0 eq m^{-3} gln (Exp. XV). Las barras verticales representan ± error estándar.

Tabla 10: Concentración de NH_4^+ libre (μeq gPF^{-1}) en raíz y parte aérea en plantas cultivadas durante 60 hs. con NO_3^- o NH_4^+ como fuentes de N (tratamientos a y d) y pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} gln (tratamientos b, c, d y f) (Exp. XV). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento		NH_4^+ libre RZ	NH_4^+ libre PA
NH_4-N	a (control)	6.30[c] (0.35)	1.53[b] (0.12)
	b-c (gln)	8.74[d] (0.35)	1.41[b] (0.00)
NO_3-N	d (control)	0.66[a] (0.12)	0.54[a] (0.10)
	e-f (gln)	1.99[b] (0.12)	0.54[a] (0.10)

Tabla 11: Concentración de asn y gln en raíces (mg gPF^{-1}) de plantas cultivadas durante 60 hs. con NO_3^- o NH_4^+ como fuentes de N (tratamientos a y d) y pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} gln (tratamientos b, c, d y f) (Exp. XV). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento		asparagina	glutamina
NH_4-N	a (control)	3.21[b] (0.09)	1.52[b] (0.12)
	b-c (gln)	2.90[b] (0.16)	1.45[b] (0.08)
NO_3-N	d (control)	0.16[a] (0.02)	0.38[a] (0.03)
	e-f (gln)	0.15[a] (0.02)	0.26[a] (0.02)

en vez de NO_3^- (tabla 11). En ambos grupos, sin embargo, el tratamiento durante 4 hs. con gln no determinó cambios significativos en los niveles endógenos iniciales de ninguna de las 2 amidas (tabla 11).

b- Efecto del tratamiento con asparagina (Exp. XVI). Cuando la absorción de NH_4^+ se midió en ausencia de asn exógena (tratamientos b y e), la absorción neta no difirió con respecto de la del control en las plantas cultivadas con NH_4^+. Por el contrario, en el tratamiento con NO_3^- disminuyó marcadamente (con eflujo neto de NH_4^+) durante los primeros 60 min., aumentando posteriormente en forma paralela a la del control (fig. 24). Cuando la absorción de NH_4^+ se midió en presencia de asn, la tasa de absorción neta en las plantas cultivadas con NO_3^- (tratamiento f) solo se recuperó parcialmente entre los 60 y 120 min., quedando totalmente suprimida a los 180 min. de iniciado el período de medición (fig. 24). En las plantas cultivadas con NH_4^+ la presencia de asn exógena determinó un eflujo constante del ión a lo largo de todo el período de medición (tratamiento c).

La concentración de NH_4^+ libre en raíz y parte aérea nuevamente resultó mayor en las plantas cultivadas con NH_4-N (tabla 12). Asimismo el tratamiento durante 4 hs. con asn determinó un aumento significativo de la concentración de NH_4^+ libre en raíz independientemente de la fuente de N que

Tabla 12: Concentración de NH_4^+ libre ($\mu eq\ gPF^{-1}$) en raíz y parte aérea en plantas cultivadas durante 60 hs. con NO_3^- o NH_4^+ como fuentes de N (tratamientos a y d) y pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} asn (tratamientos b, c, d y f) (Exp. XVI). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento		NH_4^+ libre RZ	NH_4^+ libre PA
NH_4-N	a (control)	4.97[c] (0.06)	1.53[b] (0.12)
	b-c (asn)	9.27[d] (0.35)	1.22[ab] (0.00)
NO_3-N	d (control)	0.66[a] (0.12)	0.72[a] (0.20)
	e-f (asn)	2.05[b] (0.16)	0.37[a] (0.00)

Tabla 13: Concentración de asn y gln en raíces ($mg\ gPF^{-1}$) de plantas cultivadas durante 60 hs. con NO_3^- o NH_4^+ como fuentes de N (tratamientos a y d) y pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} asn (tratamientos b, c, d y f) (Exp. XVI). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento		asparagina	glutamina
NH_4-N	a (control)	2.10[b] (0.13)	1.69[b] (0.03)
	b-c (asn)	3.12[c] (0.08)	1.57[b] (0.08)
NO_3-N	d (control)	0.22[a] (0.05)	0.37[a] (0.01)
	e-f (asn)	0.25[a] (0.02)	0.36[a] (0.05)

recibieran las plantas.

La concentración de gln en raíz fue de ± 4.5 veces mayor en las plantas cultivadas con NH_4^+ respecto de las de NO_3^-, no registrándose aumentos significativos en ninguno de ambos grupos luego de 4 hs. de pretratamiento con asn (tabla 13). La concentración de asn en raíz también fue mayor en las plantas cultivadas con NH_4^+ y solo en este caso el pretratamiento con asn exógena determinó un aumento del 33% en la concentración endógena de la amida (tabla 13).

Un hecho que llama la atención es que en el caso de las plantas pretratadas con NO_3^- la concentración de gln en raíz fue similar y la de asn considerablemente menor a la hallada en plantas cultivadas en ausencia de N externo (comparar tablas 7 y 13). Si bien se trata de lotes de plantas diferentes, es poco probable que tal efecto pueda meramente atibuírse a la variabilidad natural que suelen presentar los niveles endógenos de aminoácidos libres. De hecho nótese que en las plantas en las que se utilizó NH_4^+ en vez de NO_3^- como fuente de N, la concentración de ambas amidas es superior a la de las plantas deficientes en N (tablas 7 y 13). Si se considera además que, si bien el % de N tanto en raíz como en parte aérea es mayor en plantas cultivadas con NO_3^- respecto de las deficientes en N, la concentración de aminoácidos totales libres es más elevada solo en parte aérea (tabla 2), entonces es posible asumir que el patrón de distribución (¿y

metabolismo?) de la gln y/o la asn en plantas deficientes en N es afectado diferencialmente según se expongan a un medio con NO_3^- o NH_4^+ como fuentes de N. Probablemente esto se deba en gran parte a las diferencias existentes en varios de los aspectos vinculados a la asimilación de cada especie iónica (ver secciones 1.2. y 1.3.).

El conjunto de resultados presentados muestra que la provisión exógena tanto de gln como de asn inhibe la absorción neta de NH_4^+ también en plantas previamente cultivadas con distintas fuentes de N. Al igual que en el caso de las plantas hambreadas, dicho efecto se manifiesta principalmente si la absorción se mide en presencia de las amidas, acentuándose particularmente en las plantas cultivadas con NH_4^+. En este caso la presencia de gln o asn en la solución externa determinó un eflujo neto de NH_4^+ de aproximadamente 4.1 y 5.0 $\mu eq\ gPF^{-1}\ h^{-1}$ respectivamente (figs. 23 y 24). Este fenómeno apoya la hipótesis de la existencia de una estimulación de las vías metabólicas involucradas en la generación de NH_4^+ libre. En efecto, si se considera que las concentraciones de NH_4^+ en raíz en las plantas pretratadas con NH_4^+ + gln o asn fueron de 8.74 y 9.27 $\mu eq\ gPF^{-1}$ respectivamente (tablas 10 y 12), de no haber una producción contínua de NH_4^+ endógeno hubiera sido imposible mantener constantes las mencionadas tasas de eflujo neto durante todo el período de medición pues el NH_4^+ inicialmente presente habría sido eliminado en ambos casos al

cabo de ± 2 hs.

En la fig. 25 se representó la tasa de absorción neta en función de la concentración de NH_4^+ libre en raíz para el total de los tratamientos correspondientes a los experimentos XV y XVI. Nuevamente puede observarse que, si bien el pretratamiento con las amidas determina un aumento de la concentración de NH_4^+ libre endógeno (tablas 10 y 12), no hay una correlación significativa entre ambas variables. Esto confirmaría el hecho de que el efecto inhibitorio ejercido por la presencia exógena de las amidas sobre la absorción neta de NH_4^+ no sería una consecuencia indirecta de tal fenómeno.

En un trabajo reciente, Lee y col. (1992) informaron que en plantas de maíz cultivadas con NO_3^- o NH_4^+, pretratamientos de 10 o 16 hs. con 1.0 eq m^{-3} de gln o asn podían inhibir considerablemente la absorción neta de ambas especies iónicas. Mediante la aplicación de diversos tratamientos en donde combinaron la provisión de las amidas con el uso de distintos inhibidores enzimáticos y la preincubación sin fuentes de N por períodos de tiempo variables, los autores concluyeron que habría una correlación significativa entre los niveles endógenos de asn (y eventualmente gln) y el % de inhibición de la absorción de NH_4^+. En nuestras condiciones experimentales tal correlación no pudo ser observada. Esta discrepancia quizás se deba, más que a cuestiones meramente metodológicas, al hecho de que el maíz es una especie con metabolismo C_4 que

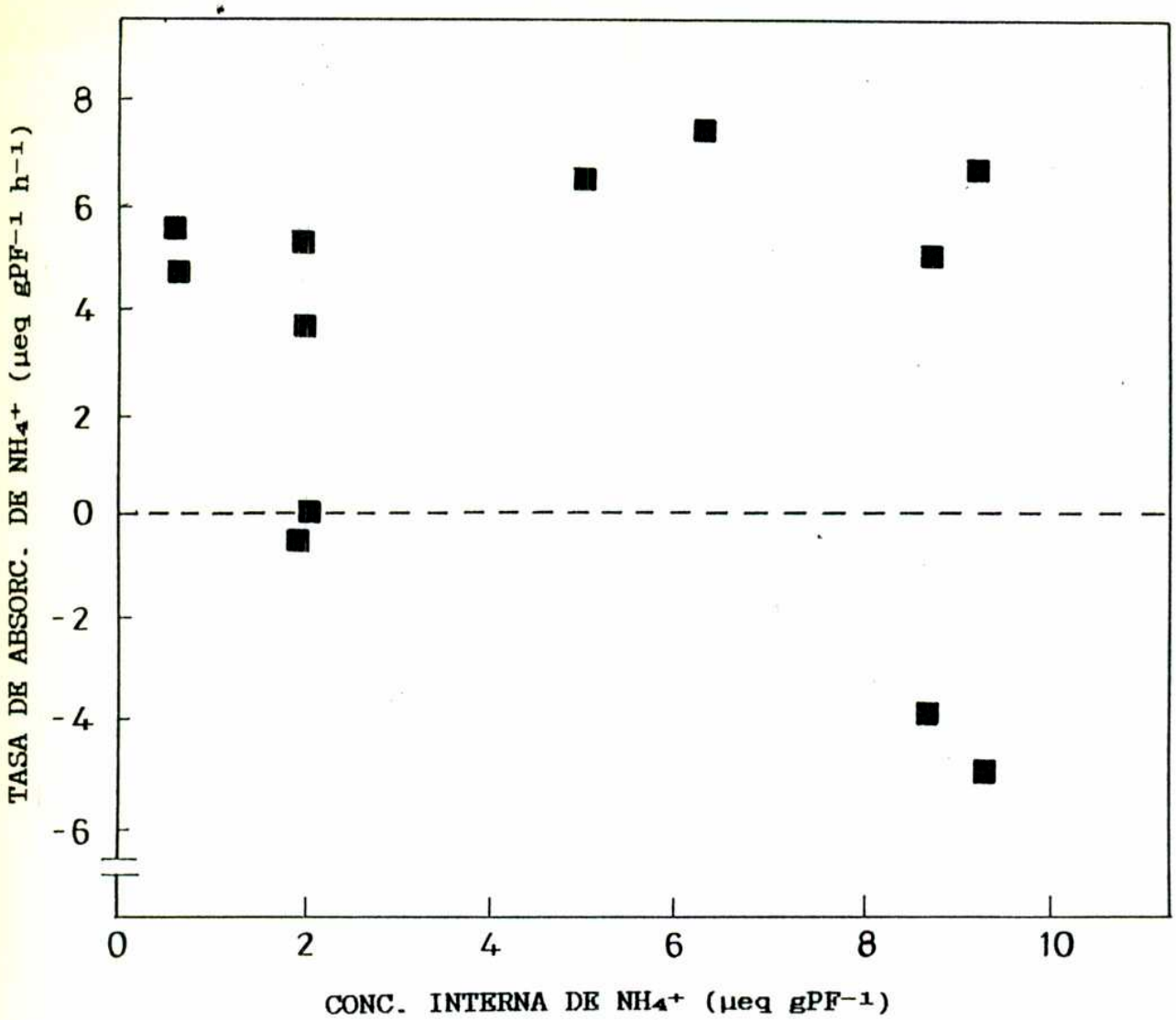

Fig. 25: Velocidad de absorción neta de NH_4^+ en función de la concentración de NH_4^+ libre en raíz según datos obtenidos de los experimentos XV y XVI.

presenta una gran tolerancia al NH_4^+ como fuente de N (Findenegg, 1987; Jackson y col., 1993). Tales características probablemente se traduzcan en las aparentes diferencias en los mecanismos de regulación de la absorción y metabolismo del NH_4^+ entre ambas especies.

3.3. EFECTO DE LA PROVISION DE DISTINTAS FUENTES NITROGENADAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS VINCULADAS AL METABOLISMO DEL AMONIO.

A lo largo de las secciones anteriores se ha mencionado en varias oportunidades la aparición de modificaciones en los niveles de NH_4^+ libre endógeno no atribuíbles a las variaciones en la tasa de absorción del ión. Dichos cambios sugerían que la provisión de distintas fuentes nitrogenadas podían afectar algunas de las vías metabólicas vinculadas a la asimilación y/o generación de NH_4^+ libre. En las figuras 1 y 2 (Introducción) se han esquematizado las principales vías del metabolismo del NH_4^+ endógeno. Existe numerosa evidencia de que el ciclo de las enzimas GS-GOGAT sería la vía más importante de asimilación del NH_4^+ endógeno (Rhodes y col., 1976; Arima y Kumazawa, 1977; Arima, 1979; Rhodes y col., 1980; Fentem y col., 1983; Lewis y col., 1983; Singh y Srivastava, 1986; Salsac y col., 1987; Loyola Vargas y col., 1988; Schmidt y Mohr, 1989; Robinson y col., 1991). Por otro lado, si bien en determinadas condiciones la actividad aminativa de la enzima GDH puede contribuir a la asimilación de NH_4^+ (Loyola Vargas y col., 1988; Magalhaes, 1991; Loulakakis y col., 1992), la evidencia existente sugiere que en las plantas superiores esta enzima contribuiría principalmente a la desaminación de glutamato (Robinson y

col., 1991). Asimismo cabe destacar que en muchas especies adaptadas a la nutrición con NH_4^+, la enzima PEP-carboxilasa desempeña un rol fundamental en la provisión anaplerótica de esqueletos carbonados para la asimilación del ión (Givan, 1979; Arnozis y Barneix, 1986; Dahlbender y Strack, 1986; Salsac y col., 1987; Magalhaes y col., 1992; Sandoval Villa y col., 1992).

A continuación se describirán 2 experimentos en los que se estudió el efecto de la provisión de distintas fuentes nitrogenadas sobre la actividad de las enzimas previamente mencionadas dada su importancia en el metabolismo del NH_4^+.

3.3.1. Efecto de la provisión de NO_3^- y/o NH_4^+ sobre la actividad de la enzima PEP-carboxilasa.

El mantenimiento de una alta actividad de la enzima PEP-carboxilasa constituye una de las principales adaptaciones metabólicas que presentan diversas especies tolerantes al NH_4^+ como fuente de N (Givan, 1979; Salsac y col., 1987). En efecto, durante la asimilación del NH_4^+ ocurre una acidificación del medio circundante que en teoría debería conducir a una disminución de la actividad de dicha enzima (Raven y Smith, 1976). No obstante, en las especies adaptadas a la nutrición con NH_4^+ la presencia del mismo no solo no inhibe a la enzima sino que puede estimular su actividad. De

esta forma se mantendría la provisión anaplerótica de esqueletos carbonados utilizables para la asimilación del NH_4^+ absorbido. Debido a que existen informes de que en plantas de trigo cultivadas con NO_3^- o NO_3^- + NH_4^+ como fuentes de N, el pasaje a un medio conteniendo solo NH_4^+ puede estimular en ambos casos la actividad de la PEP-carboxilasa (Arnozis y Barneix, 1989; Sandoval Villa y col., 1992), se realizó un experimento a fin de determinar si el mismo fenómeno se manifestaba en plantas deficientes en N pretratadas durante 24 hs. con dichas fuentes de N.

-Experimento XVII: Plantas de trigo de 9 días, cultivadas sin N, fueron tratadas durante 24 hs. con 1.0 eq m^{-3} de N provisto como $SO_4(NH_4)_2$, NO_3NH_4 o KNO_3. Posteriormente las plantas de cada grupo fueron transferidas a una solución nutritiva conteniendo 0.5 eq m^{-3} $SO_4(NH_4)_2$ y se procedió a medir la actividad de la enzima PEP-carboxilasa en raíz a las 0, 4 y 7.5 hs. de transplantadas.

La actividad de la enzima en los distintos tiempos de medición fue significativamente menor en las plantas pretratadas con NO_3^- como única fuente de N (tabla 14). No obstante, en todos los tratamientos la actividad de la PEP-carboxilasa fue estimulada por la posterior exposición al NH_4^+: En las plantas cultivadas con KNO_3 o NO_3NH_4 la actividad

Tabla 14: Actividad *in vitro* de la enzima PEP-carboxilasa (μmol NAD^+ g^{-1} min^{-1}) en raíces de plantas cultivadas durante 24 hs. con 1.0 eq m^{-3} de N provisto como NO_3^-, NH_4^+ o NO_3^- + NH_4^+ e incubadas posteriormente en una solución con 1.0 eq m^{-3} NH_4^+ durante 0, 4 o 7.5 hs (Exp. XVII). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento	0 hs.	4 hs.	7.5 hs.
NO_3^-	0.211[a] (0.063)	0.231[a] (0.045)	0.324[b] (0.011)
NH_4^+	0.374[bc] (0.117)	0.396[cd] (0.068)	0.446[e] (0.057)
NO_3^- + NH_4^+	0.351[bc] (0.038)	0.439[de] (0.057)	0.470[e] (0.039)

de la enzima aumentó significativamente a las 7.5 hs. de transferidas a la solución con NH_4^+, mientras que en las plantas cultivadas con $SO_4(NH_4)_2$ aumentó ya en las primeras 4 hs.

El conjunto de datos muestra que habría una correlación positiva entre la actividad de la PEP-carboxilasa y el tiempo de exposición del material vegetal a un medio con NH_4^+. En las plantas pretratadas con NO_3^- como única fuente de N dicho efecto se manifestó ya al cabo de 7.5 hs. de exposición al NH_4^+. Este hecho muestra que la enzima puede ser estimulada en períodos de tiempo considerablemente más cortos que los reportados por otros autores (Arnozis y Barneix, 1989). Lamentablemente aún no hay información precisa sobre el mecanismo a través del cual el NH_4^+ produce dicho efecto.

3.3.2. Efecto de la provisión de gln, asn y NH_4^+ sobre la actividad de las enzimas GS, PEP-carboxilasa y GDH en plantas deficientes en N.

La información referente al efecto regulador que el NH_4^+ y distintos aminoácidos pudieran ejercer sobre la actividad de las principales enzimas involucradas en el metabolismo del NH_4^+ es relativamente escasa. En la sección anterior se ha mencionado el efecto estimulador que ejerce el NH_4^+ en ciertas especies vegetales sobre la actividad de la PEP-carboxilasa.

Por otro lado Taylor y Stewart (1980) han mencionado que en gametofitos de helecho cultivados con NO_3^- o NO_3^- + NH_4^+ como fuentes de N, la actividad *in vitro* de la GS en los últimos fue menor que en los cultivados únicamente con NO_3^-. Aparentemente el efecto inhibidor del NH_4^+ sería provocado indirectamente a través de variaciones en el contenido de ATP, Mg, glutamato y/o tioles como consecuencia de los procesos de absorción y asimilación del NH_4^+.

Con respecto al efecto ejercido por la provisión de distintos aminoácidos, se ha informado que la gln puede controlar negativamente a la enzima GS en *Lemna minor* (Rhodes y col., 1976) y *Candida utilis* (Ferguson y Sims, 1974), y estimular la actividad desaminativa de la GDH en *Lemna minor* (Rhodes y col., 1976). Asimismo, en raíces y hojas de plántulas de maíz la provisión exógena de diversos aminoácidos inhibió la actividad específica de la NADH-GDH (actividad aminativa) y estimuló la actividad de la NAD^+-GDH (actividad desaminativa) (Singh y Srivastava, 1983).

- Experimento XVIII: A fin de comprobar si en nuestras condiciones experimentales el tratamiento con gln o asn exógenas afectaba la actividad de las enzimas GS, PEP-carboxilasa y GDH (actividad aminativa, NADH-dependiente y desaminativa, NAD^+-dependiente),se procedió a medir la actividad *in vitro* de dichas enzimas en raíces de plantas

deficientes en N o pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} de gln, asn o 1.5 eq m^{-3} de NH_4^+.

En nuestras condiciones experimentales la actividad *in vitro* de las mencionadas enzimas no difirió significativamente entre las plantas deficientes en N y aquellas pretratadas durante 4 hs. con gln o asn (tabla 15). Solo en las plantas que recibieron NH_4^+ hubo un aumento en las actividades de las enzimas PEP-carboxilasa y NADH-GDH con respecto al tratamiento control.

El rápido efecto estimulador del NH_4^+ sobre la PEP-carboxilasa corrobora nuevamente los resultados presentados previamente (sección 3.3.1.). Asimismo, en un reciente trabajo Loulakakis y col. (1992) han demostrado que en callos obtenidos a partir de ramas de *Vitis vinifera*, el cultivo de los mismos en un medio con NH_4^+ generaba un aumento en la actividad de la NADH-GDH. Mediante técnicas inmunoquímicas los autores determinaron que la enzima GDH presenta una estructura hexamérica constituída por 2 subunidades (α y β) con similares propiedades antigénicas pero diferente carga y peso molecular. Se han identificado 7 isoenzimas de la GDH cuyos hexámeros estarían constituídos ya sea exclusivamente por subunidades α o β o bien por proporciones definidas de ambas. Las subunidades α son las responsables de la actividad aminativa mientras que las β lo son de la desaminativa. El aumento de la

Tabla 15: Actividad *in vitro* de las enzimas GS (nmol glutamyl hydroxamato gPF^{-1} min^{-1}), PEP-carboxilasa (nmol NADH gPF^{-1} min^{-1}) y GDH: aminativa (NADH-dependiente) o desaminativa (NAD^+-dependiente) (nmol NADH gPF^{-1} min^{-1}), en raíces de plantas deficientes en N (control) o pretratadas durante 4 hs. con 1.0 eq m^{-3} gln, asn o 1.5 eq m^{-3} NH_4^+ (Exp. XVIII). Entre paréntesis: error estándar.

Tratamiento	GS	PEP-carboxilasa	NADH-GDH	NAD^+-GDH
control	27.4[a] (1.9)	454.7[a] (18.1)	90.6[a] (12.2)	43.9[a] (4.1)
gln	28.6[a] (1.7)	505.2[ab] (34.0)	108.2[ab] (5.3)	50.2[a] (0.6)
asn	31.7[a] (0.7)	522.0[ab] (2.0)	99.4[ab] (3.5)	51.8[a] (3.4)
NH_4^+	26.5[a] (2.0)	552.7[b] (13.6)	128.5[b] (7.8)	46.3[a] (5.7)

actividad de la NADH-GDH en presencia de NH_4^+ se debería a un efecto estimulatorio por parte del ión sobre la síntesis de novo de subunidades α.

En lo que respecta al efecto de la gln y/o asn sobre las vías metabólicas del NH_4^+, es probable que la actividad de otras enzimas no testeadas en el presente trabajo pueda verse afectada por la provisión exógena de las amidas. En leguminosas se ha demostrado que la asn es activamente metabolizada por la acción de 2 enzimas cuya actividad relativa varía con la madurez de la planta: la asparaginasa y la asparagina-piruvato aminotransferasa (Ireland y Joy, 1981; Ireland y Joy, 1983; Ta y col., 1984; Sieciechowicz y col., 1985; Ta y Joy, 1985; Joy, 1988), (figs. 1 y 2). Ireland y Joy (1981) observaron que la concentración de NH_4^+ libre en hojas de plántulas de arveja aumentó cuando las mismas fueron cultivadas en un medio con asn o asn + MSX. Por el contrario dicho efecto no se observó cuando la asn fue provista conjuntamente con AOA, un inhibidor de transaminasas. En base a estos resultados sumados a mediciones de las actividades de la asparaginasa y la asparagina-piruvato aminotransferasa en distintos estadíos del desarrollo del vegetal, los mencionados autores concluyeron que, si bien la primer enzima es la principal responsable de la desamidación de asn en semillas y primordios foliares, como su actividad decrece abruptamente en la fase de crecimiento activo, la asparagina-piruvato

aminotransferasa se constituye en una importante vía alternativa de producción de NH_4^+ libre endógeno en plántulas de arveja. Cabe destacar que en esta especie la actividad de ambas enzimas es muy baja en raíces, aunque prácticamente no hay estudios realizados en otras especies vegetales.

No obstante, si bien los experimentos desarrollados en la sección 3.2. sugieren la existencia de un efecto estimulador sobre la producción de NH_4^+ libre endógeno por parte de la gln y la asn, en nuestras condiciones experimentales no se halló correlación alguna entre tal efecto y la inhibición de la absorción neta de NH_4^+ observada en distintos tratamientos con las amidas. Si bien este hecho apoya la hipótesis de que el efecto supresor ejercido por las amidas no es una consecuencia indirecta de la acumulación transitoria de NH_4^+ endógeno, sería conveniente establecer el mecanismo a través del cual se induce dicha acumulación a fin de poder evaluar con mayor precisión si estos cambios metabólicos no afectan de alguna manera la tasa de absorción del ión.

4. CONCLUSIONES GENERALES

Los experimentos desarrollados a lo largo del presente trabajo muestran claramente que **la velocidad de absorción de NH_4^+ en plantas deficientes en N puede disminuir como consecuencia directa de la exposición de las mismas a distintas fuentes del mismo**. Si se considera que la circulación del NH_4^+ vía simplasto involucra necesariamente el pasaje del ión a través de biomembranas, la regulación como consecuencia de los cambios en el "status" de N endógeno debe producirse mediante "señales" que actúen a nivel de la síntesis y/o actividad de su sistema de transporte. ¿Cuál es la naturaleza de tales señales?.

Tanto la absorción como la asimilación del NH_4^+ generan cambios a nivel metabólico que sugieren la intervención de más de un factor en la regulación del proceso de absorción (1.2.; 1.3.). No obstante existe considerable evidencia de que los cambios en los niveles de determinados compuestos nitrogenados tendrían un rol importante dentro del mecanismo de regulación (1.4.).

El contenido de NH_4^+ libre endógeno no parecería estar directamente relacionado con los cambios en la tasa de absorción neta del ión, salvo en algunos casos en los que se indujo la acumulación de altos niveles de NH_4^+ libre tisular mediante la provisión de concentraciones elevadas de NH_4^+ externo o el cultivo simultáneo de NH_4^+ y MSX (3.1.2.2.). Aún así es probable que en estos casos el efecto supresor sobre la

absorción neta sea el resultado de un aumento de la relación eflujo/influjo como consecuencia del rápido incremento en el pool de NH_4^+ libre citoplasmático. En general, tanto los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo como los informados por otros autores sugieren que **el ión NH_4^+ no ejercería *per se* un efecto inhibitorio específico sobre su sistema de transporte** (3.2.).

Considerando dicho resultado, se procedió a investigar el posible rol de algunos metabolitos derivados de la asimilación del NH_4^+ en el proceso de regulación de la absorción neta del ión. **El análisis del contenido de aminoácidos totales libres en raíz en distintas condiciones experimentales no mostró correlación alguna con las variaciones en la tasa de absorción de NH_4^+** (3.1.2.).

Sin embargo cuando se procedió a la provisión exógena de distintos aminoácidos y amidas en forma individual, se observó que **la gln y la asn pueden ejercer un marcado efecto inhibitorio, cuyas características son claramente diferentes al efecto ejercido por los otros aminoácidos probados**. Ahora bien, si una o ambas amidas se hallasen directamente involucradas en la regulación de la absorción neta de NH_4^+, ello implicaría que las mismas deberían modificar de alguna manera las tasas relativas de influjo y/o eflujo del ión a través del plasmalema. Bajo esta hipótesis el efecto regulador se debería manifestar fundamentalmente en aquellas condiciones

en las que se indujesen cambios significativos en las concentraciones de gln y/o asn en los compartimentos lindantes al plasmalema: espacio libre aparente y citoplasma.

Los distintos experimentos desarrollados a lo largo de la sección 3.2.1.1. permiten concluir que **la provisión tanto de gln como de asn causa un efecto inhibitorio específico sobre la absorción neta de NH_4^+. Dicho efecto no sería una mera consecuencia de una depolarización transitoria del plasmalema o de una competencia directa por el sitio de transporte entre la especies moleculares consideradas**. No obstante, y esto es particularmente evidente en el caso de la gln, el hecho de que el pretratamiento con la amida solo logre suprimir significativamente la absorción neta de NH_4^+ cuando aquella es incluída simultáneamente en la solución externa, sugiere la existencia de algún tipo de efecto represor a nivel exógeno. Si bien la metodología empleada en el presente trabajo de tesis no permite caracterizar con mayor precisión el mecanismo involucrado, quisiera destacar 2 resultados en favor de esta hipótesis:

1- En el experimento XIII se observa que el pretratamiento durante 4 hs. con gln no disminuye significativamente la absorción neta de NH_4^+ con respecto al control cuando la misma se mide en un medio en donde la gln es remplazada por un análogo estructural: el MSX. Por el contrario cuando la gln es incluída en la solución externa, se observa un marcado efecto

inhibitorio tanto en las plantas pretratadas con la amida como con MSX.

2- Cuando las plantas deficientes en N son transferidas a un medio con NH_4^+ en presencia de gln o asn sin recibir tratamiento previo con las amidas, la tasa de absorción neta del ión disminuye significativamente ya al cabo de ± 90 min. de exposición contínua a las mismas.

Es claro que la sola existencia de un efecto a nivel exógeno sobre el sistema de transporte del NH_4^+ no es suficiente motivo para que la gln y/o la asn sean consideradas como uno de los factores indicadores del status de N endógeno responsables de la regulación de la absorción neta del ión. De ser esto posible, debería detectarse una correlación entre la variación de los niveles endógenos de tales amidas (particularmente a nivel del citoplasma) y el porcentaje de inhibición de la tasa de absorción neta de NH_4^+. La aplicación de pretratamientos con soluciones conteniendo gln o asn se realizó con la idea de inducir un aumento en los niveles endógenos de las mismas, a fin de corroborar si tal correlación podía ser evidenciada.

En el caso de las plantas deficientes en N, la provisión exógena tanto de gln como de asn determinó un aumento significativo de la concentración de asn en raíz (Experimento IX: tabla 7). Dicho aumento parecía poder explicar el efecto inhibitorio ejercido por ambas amidas, tal como fue informado

por Slaughter y col. (1990) en un trabajo realizado con levaduras. No obstante, si se toma en cuenta que en nuestras condiciones experimentales el incremento en la concentración endógena de asn fue de igual magnitud en las plantas pretratadas con una u otra amida, no se explica porqué al medirse la absorción de NH_4^+ en ausencia de las mismas, mientras que en las plantas pretratadas con asn la tasa de absorción neta permaneció parcialmente inhibida durante los primeros 90 min. de iniciado el período de medición, en las pretratadas con gln la absorción de NH_4^+ no difirió significativamente de la del control.

En el caso de las plantas cultivadas durante 60 hs. con NO_3^- o NH_4^+ también surgen situaciones paradógicas similares a las planteadas con las plantas deficientes en N. Por un lado resulta interesante que el efecto inhibitorio sobre la absorción neta de NH_4^+ provocado tanto por la gln como la asn sea mayor en las plantas cultivadas con NH_4^+ respecto de las que recibieron NO_3^-, si se considera que, comparativamente, las primeras tienen niveles iniciales más altos de asn y gln en raíz (comparar figs. 23 y 24 con tablas 10 y 12, respectivamente).

Sin embargo, tal como se discutiera en la sección 3.2.2.2., cuando se analiza a cada grupo de plantas por separado no se observa una clara relación entre el porcentaje de inhibición de la absorción neta de NH_4^+ en presencia o

ausencia de las amidas y la concentración endógena de las mismas previo al inicio del período de medición. Esto es particularmente evidente en las plantas cultivadas con NO_3^- en las cuales al medirse la absorción neta de NH_4^+ en presencia de gln o asn, esta fue totalmente inhibida a pesar de no haberse registrado aumentos en la concentración de ninguna de ambas amidas al cabo de 4 hs. de pretratamiento con las mismas.

El conjunto de resultados nuevamente sugiere que **la presencia exógena de gln o asn ejerce *per se* un efecto supresor sobre la absorción neta de NH_4^+, el cual, no obstante, se acentuaría conforme las plantas posean inicialmente una mayor concentración endógena de las amidas (en particular asn).**

Tal situación indicaría la existencia de la superposición de al menos 2 fenómenos cuyo/s mecanismo/s específico/s no ha/n podido precisarse con la metodología adoptada en el presente trabajo de tesis.

Si bien con el cojunto de resultados obtenidos no es posible formular un modelo que explique claramente el mecanismo de regulación de la absorción de NH_4^+ en trigo, el presente trabajo destaca tanto la existencia de un posible rol por parte de metabolitos nitrogenados específicos en el proceso de regulación, como la necesidad de desarrollar técnicas adecuadas para medir con exactitud y en un tiempo

realista las variaciones en los niveles endógenos (particularmente subcelulares) de los mismos, a fin de verificar si efectivamente tales variaciones actúan sobre el sistema de transporte de NH_4^+ como señales indicadoras del status de N del vegetal.

H. FABIO CAUSIN

Atilio J. Barneix

5. BIBLIOGRAFIA CITADA

Alef K. and Kleiner D. (1982): Evidence for an ammonium transport system in the N_2 fixing phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Microbiol. 132, 79-81.

Allen S. and Raven J. (1987): Intracellular pH regulation in *Ricinus communis* grown with ammonium or nitrate as N source: the role of long distance transport. J. Exp. Bot. 38, 580-596.

Allen S. and Smith J. (1986): Ammonium nutrition in *Ricinus communis*: Its effect on plant growth and the chemical composition of the whole plant, xylem and phloem saps. J. Exp. Bot. 37, 1599-1610.

Arima Y. (1979): ^{15}N assimilation in association with glutamine synthesis in rice seedling roots. Soil Sci. Pl. Nutr. 25, 311-322.

Arima Y. and Kumazawa K. (1977): Evidence of ammonium assimilation via the glutamine synthetase-glutamate synthase system in rice seedling roots. Plant Cell Physiol. 18, 1121-1129.

Arnozis P. A. and Barneix A. J. (1986): Asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno en plantas jóvenes de trigo. Actas del Primer Congreso Nacional de Trigo (III), 234-241.

Arnozis P. A. and Barneix A. J. (1989): PEP-carboxylase activity during ammonium assimilation in wheat plants. J. Plant Nutr. 12, 85-94.

Arnozis P. A. and Findenegg G. R. (1986): Electrical charge balance in the xylem sap of beet and sorghum plants grown with either NO_3^- or NH_4^+ nitrogen. J. Plant Physiol. 125, 441-449.

Arnozis P. A., Nelemans J. A. and Findenegg G. R. (1988): Phosphoenol pyruvate carboxylase activity in plants grown with either NO_3^- or NH_4^+ as inorganic nitrogen sources. J. Plant Physiol. 132, 23-27.

Barceló Coll J., Rodrigo G., García B. y Tamés R. (1983): Fisiología Vegetal. Ediciones Pirámide. Madrid, 360-378.

Barker A., Maynard D. and Lachman W. (1967): Induction of tomato stem and leaf lessions and potassium defficiency by excesive ammonium nutrition. Soil Sci. 103, 319-327.

Barneix A. J. (1981): Efectos de los iones amonio y nitrato sobre la absorción de fosfato por plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, U.B.A.

Barnes E. M. Jr. and Zimniak P. (1981): Transport of ammonium and methylammonium ions by *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 146, 512-516.

Barnes E., Zimniak K. P. and Jayakumar A. (1983): Role of glutamine synthetase in the uptake and metabolism of methylammonium by *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 156, 752-757.

Ben Zioni A., Vaadia Y. and Lips S. H. (1970): Correlation

between nitrate reduction, protein synthesis and malate accumulation. Physiol. Plant. 23, 1039.

Boheringer Mannheim (1983): Methoden der enzymatischen Lebensmittel analytik mit Einzelreagentien. Boheringer Mannheim GMBH. Biochemica. Mannheim.

Bortslap A. (1981): Invalidity of the multiphasic concept of ion absorption in plants. Pl. Cell. Environ. 4, 189-195.

Bowman D. C. and Paul J. (1988): Uptake and assimilation of NO_3^- and NH_4^+ by nitrogen-defficient perennial ryegrass turf. Plant Physiol. 88, 1303-1309.

Breteler H. (1973): A comparison between ammonium and nitrate nutrition of young sugar beet plants grown in nutrient solution at constant acidity. 1- Production of dry matter, ionic balance and chemical composition. N^{e}th J. Agric. Sci. 21, 227-244.

Breteler H. and Arnozis P. A. (1985): Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf bean. Phytochem. 24, 653-657.

Breteler H. and Nissen P. (1982): Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. Plant Physiol. 70, 754-759.

Cataldo D., Schrader L. and Youngs V. (1974): Analysis by digestion and colorimetric assay of total nitrogen in plant tissues high in nitrate. Crop Sci. 14, 854-856.

Causin H. F. y Arnozis P.A. (1988): Efectos de las fuentes de

nitrógeno sobre el crecimiento de la remolacha. Ciencia del Suelo 6, 129-135.

Causin H. F., Barneix A. J. and Guitman M. R. (1994): Effect of long term NH_4^+ nutrition on growth and yield of wheat plants. Turrialba 42 (4), en prensa.

Clarkson D. T. and Hanson J. B. (1980): The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Pl. Physiol. 31, 239-298.

Clarkson D. T., Saker L. R. and Purves J. V. (1989): Depression of nitrate and ammonium transport in barley plants with diminished sulphate status: Evidence of co-regulation of sulphate and nitrate intake. J. Exp. Bot. 218, 953-963.

Cogliatti D. H. and Santa María G. E. (1990): Influx and efflux of phosphorus in roots of wheat plants in non-growth-limiting concentrations of phosphorus. J. Exp. Bot. 41, 601-607.

Cooper H. D. and Clarkson D. T. (1989): Cycling of amino nitrogen and other nutrients between shoot and root in cereals: A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. J. Exp. Bot. 216, 1-10.

Cox W. and Reisenauer H. (1973): Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, ammonium or both. Plant Soil 38, 363-380.

Dahlbender B. and Strack D. (1986): The role of malate in

ammonium assimilation in cotyledons of radish. Planta 169, 382-392.

Davies D. D. (1973): Control of and by pH. Symp. Soc. Exp. Biol. 27, 513.

Davies D. D. (1979): The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. Ann. Rev. Pl. Physiol. 30, 131-158.

Di Martino Rigano V., Vona V., Di Martino C. and Rigano C. (1987) (a): Regulatory aspects of NH_4^+ utilization in the acidophilic thermophilic red alga *Cyanidium caldarium*. New Phytol. 105, 247-254.

Di Martino Rigano V., Vona V., Manzo L. and Rigano C. (1987) (b): NH_4^+ uptake by the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. New Phytol. 107, 507-512.

Doddema H. and Otten H. (1979): Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. III. Regulation. Physiol. Plant. 45, 339-346.

Elliot G. C., Lynch J. and Läuchli A. (1984): Influx and efflux of P in roots of intact maize plants. Plant Physiol. 76, 336-341.

Elliot G. C. and Nelson P. (1983): Relationship among nitrogen accumulation, nitrogen assimilation and plant growth in Chrisanthemum. Physiol. Plant. 57, 250-259.

Elzam O. E. and Epstein E. (1965): Absorption of chloride by barley roots: Kinetics and selectivity. Plant Physiol. 40, 620-624.

Epstein E. (1966): Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. Nature 212, 1324-1327.

Epstein E. (1972): Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. John Willey and Sons Inc. New York, 85-102.

Epstein E. and Hagen C. E. (1952): A Kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. Plant Physiol. 27, 457-474.

Etherthon B. and Rubinstein B. (1977): Evidence for amino acid-H^+ cotransport in oat coleoptiles. Plant Physiol. 59, 117 (Abs.).

Fentem P. A., Lea P. J. and Stewart G. R. (1983): Ammonia assimilation in the roots of nitrate- and ammonium-grown *Hordeum vulgare* L. (cv. Golden Promise). Plant Physiol. 71, 496-501.

Ferguson A. R. and Sims A. P. (1974): The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: The inactivation of glutamine synthetase. J. Gen. Microbiol. 80, 173-185.

Findenegg G. R. (1987): A comparative study of ammonium toxicity at different constant pH of the nutrient solution. Pl. Soil 103, 239-243.

Frantz T. A. , Peterson D. M. and Dubin R. D. (1982): Sources of ammonium in oat leaves treated with tabtoxine or methionine sulphoximine. Plant Physiol. 69, 345-348.

Givan C. V. (1979): Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. Phytochem. 18, 375-382.

Goyal S. and Huffaker R. C. (1986): The uptake of NO_3^-, NO_2^- and NH_4^+ by intact wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. Plant Physiol. 82, 1051-1056.

Harada T., Takaki H. and Yamada Y. (1968): Effects of nitrogen sources on the chemical components in young plants. Soil Sci. Pl. Nutr. 14, 47-55.

Haynes R. J. and Goh K. M. (1978): Ammonium and nitrate nutrition of plants. Biol. Rev. 53, 465-510.

Hedrich R. and Schroeder J. I. (1989): The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 40, 539-569.

Huffaker R. and Rains (1978): Factors influencing nitrate acquisition by plants; assimilation and fate of reduced nitrogen. En Nitrogen in the Environment (2). Nielsen & Mac Donald. Academic Press, N. Y., 1-43.

Ikeda M., Mizoguchi K. and Yamakawa T. (1992): Stimulation of dark carbon fixation in rice and tomato roots by application of ammonium nitorgen. Soil Sci. Pl. Nutr. 38, 315-322.

Ikeda M., Ogren W. M. and Hageman R. H. (1984): Effect of methionine sulphoximine on photosynthetic carbon metabolism in wheat leaves. Plant Cell Physiol. 25, 447-452.

Ikeda M. and Yamada Y. (1978): Incorporation of inorganic nitrogen into protein fraction in tomato plants with

ammonium and nitrate as nitrogen sources. J. Fac. Agr. Kyushu Univ. 52, 161-168.

Ikeda M. and Yamada Y. (1981): Dark CO_2 fixation in leaves of tomato plants grown with NH_4^+ and NO_3^- as nitrogen sources. Pl. Soil 60, 312-322.

Ireland R. J. and Joy K. W. (1981): Two routes for asparagine metabolism in *Pisum sativum* L. Planta 151, 289-292.

Ireland R. J. and Joy K. W. (1983): Subcellular localization of asparaginase and asparagine aminotransferase in *Pisum sativum* leaves. Plant Physiol. 72, 1127-1129.

Jackson W. A., Chaillou S., Morot-Gaudry J. F. and Volk R. J. (1993): Endogenous ammonium generation in maize roots and its relationship to other ammonium fluxes. J. Exp. Bot. 44, 731-739.

Jackson W. A., Kwik K. D. and Volk R. J. (1976): Nitrogen uptake during recovery from nitrogen defficiency. Physiol. Plant. 36, 174-181.

Jackson W. A. and Volk R. J. (1992): Nitrate and ammonium uptake by maize: adaptation during relief from nitrogen suppression. New Phytol. 122, 439-446.

Johansson L. and Larsson C. M. (1986): Relation between inhibition of CO_2 fixation and glutamine synthetase inactivation in *Lemna gibba* L. treated with L-methionine-D,L-sulphoximine (MSO). J. Exp. Bot. 37, 221-229.

Joseph A. R., Tang V. H. and Lambert J. (1975): Multiphasic

uptake of ammonium by soybean roots. Physiol. Plant. 34, 321-325.

Joy K. W. (1988): Ammonia, glutamine and asparagine: A carbon-nitrogen interface. Can. J. Bot. 66, 2103-2109.

Keltjens W. (1981): Absorption and transport of cations and anions in maize roots. Plant Soil 63, 39-46.

Kirkby E. A. (1967): Ionic balance in different tissues of tomato plants in relation to nitrate, urea and ammonium. Plant Physiol. 42, 66-67.

Kirkby E. A. (1968): Influence of ammonium and nitrate nutrition on the cation-anion balance and carbohydrate metabolism of white mustard plants grown in diluted nutrient solutions. Soil Sci. 105, 133-141.

Kirkby E. A. and Mengel K. (1967): Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nutrition. Plant Physiol. 42, 6-14.

Kleiner D. and Fitzke E. (1981): Some properties of a new electrogenic transport system: The ammonium (methylammonium) carrier from *Clostridium pasteurianum*. Bioch. Biophys. Acta 641, 138-147.

Kochian L. V. and Lucas W. (1982): Potassium transport in corn roots. I. Resolution of kinetics into a saturable and linear component. Plant Physiol. 70, 1723-1731.

Kropf D. L., Caldwell J. H., Gow N. A. R. and Harold F. M. (1984): Transcellular ion currents in the water mold

Achlya: Amino acid proton symport as a mechanism of current entry. J. Cell Biol. 99, 486-496.

Lea P. and Miflin J. (1974): Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature 251, 614-616.

Lee R. B. (1982): Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nitrogen defficiency. Ann. Bot. 50, 429-449.

Lee R. B. and Ayling S. M. (1993): The effect of methionine sulphoximine on the absorption of ammonium by maize and barley roots over short periods. J. Exp. Bot. 44, 53-63.

Lee R. B., Purves J. V., Ratcliffe R. G. and Saker L. R. (1992): Nitrogen assimilation and the control of nitrate and ammonium absorption by maize roots. J. Exp. Bot. 43, 1385-1396.

Lee R. B. and Ratcliffe R. G. (1991): Observations on the subcellular distribution of the ammonium ion in maize root tissue using *in vivo* ^{14}N nuclear magnetic resonance spectroscopy. Planta 183, 359-367.

Lee R. B. and Rudge K. A. (1986): Effects of nitrogen defficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants. Ann. Bot. 57, 471-486.

Lehninger A. L. (1972): Bioquímica. Ediciones Omega S.A., Barcelona, 71-93.

Lewis O. A. M., Chadwick S. and Withers J. (1983): The assimilation of ammonium by barley roots. Planta 159,

483-486.

Leyshon A. J., Campbell C. A. and Warder G. F. (1980): Comparison of the effect of NO_3-N and NH_4-N on growth, yield and yield components of manitou spring wheat and conquest barley. Can. J. Plant Sci. 60, 1063-1070.

Loulakakis K. A. and Roubelakis-Angelakis K. A. (1992): Ammonium induced increase in NADH-glutamate dehydrogenase activity is caused by de-novo synthesis of the α-subunit. Planta 187, 322-327.

Loyola Vargas V. M., Yáñez A., Caldera J., Oropeza C., Robert M. L., Quiroz J. and Scorer K. N. (1988): Nitrogen metabolism in *Canavalia ensiformis* (L.) D C. II. Changing activities of nitrogen assimilating enzymes during growth. J. Plant Physiol. 132, 289-293.

Lycklama J. C. (1963): The absorption of ammonium and nitrate by perennial ryegrass. Acta Bot. Neerl. 12, 361-423.

Macduff J. H. and Jackson S. B. (1992): Influx and efflux of nitrate and ammonium in italian ryegrass and white clover roots: comparisons between effects of darkness and defoliation. J. Exp. Bot. 43, 525-535.

Macklon A. E. S., Ron M. M. and Sims A. (1990): Cortical cell fluxes of ammonium and nitrate in exciced root segments of *Allium cepa* L.; studies using ^{15}N. J. Exp. Bot. 41, 359-370.

Mac Kown C. T. (1987): Nitrate uptake following nitrate

deprivation. J. Exp. Bot. 38, 1079-1090.

Mac Kown C. T., Volk R. J. and Jackson W. A. (1981): Nitrate accumulation, assimilation and transport by decapitated corn roots: Effects of prior nitrate nutrition. Plant Physiol. 68, 135-138.

Magalhaes J. R. (1991): Kinetics of $^{15}NH_4^+$ assimilation in tomato plants: evidence for $^{15}NH_4^+$ assimilation via GDH in tomato roots. J. Pl. Nutr. 14, 1341-1353.

Magalhaes J. R. and Huber D. M. (1991): Free ammonia, free amino acids and enzyme activity in maize tissue treated with methionine sulfoximine. J. Pl. Nutr. 14, 883-895.

Magalhaes J. R., Huber D. M. and Tsai C. Y. (1992): Evidence of increased ^{15}N-ammonium assimilation in tomato plants with exogenous α-ketoglutarate. Plant Sci. 85, 135-141.

Marschner H. (1986): Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press Limited. London, 173-267.

Martin F., Winspear M. J., Mac Farlane J. D. and Oaks A. (1983): Effect of methionine sulfoximine on the accumulation of ammonia in C_3 and C_4 leaves. Plant Physiol. 71, 177-181.

Matsumoto H. and Tamura K. (1981): Respiratory stress in cucumber roots treated with ammonium or nitrate nutrition. Pl. Soil 60, 195-204.

Maynard D. and Barker A. (1969): Studies on the tolerance of plants to ammonium nutrition. J. Amer. Soc. Hort. Sci.

94, 235-239.

Mehrer J. and Mohr H. (1989): Ammonium toxicity: description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its caution. Physiol. Plant. 77, 545-554.

Mengel K. H. and Kirkby E. A. (1978): Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute. Bern.

Mengel K., Robin P. and Salsac L. (1983): NRA in shoots and roots in maize seedlings as affected by the form of N nutrition and the pH of nutrient solution. Plant Physiol. 71, 618-622.

Mengel K. and Viro M. (1978): The significance of plant energy status for the uptake and incorporation of NH_4-nitrogen by young rice plants. Soil Sci. Pl. Nutr. 24, 407-416.

Minotti P., Williams D. and Jackson W. (1969): Nitrate uptake by wheat as influenced by ammonium and other cations. Crop Sci. 9, 9-14.

Morgan M. A. and Jackson W. A. (1988): a- Suppression of ammonium uptake by nitrogen supply and its relief during nitrogen limitation. Physiol. Plant. 73, 38-45.

b- Inward and outward movement of ammonium in root systems: transient responses during recovery from nitrogen deprivation in presence of ammonium. J. Exp. Bot. 199, 179-191.

Morgan M. A. and Jackson W. A. (1989): Reciprocal ammonium transport into and out of plant roots: modifications by

plant nitrogen status and elevated ammonium concentration. J. Exp. Bot. 211, 207-214.

Müller R., Steiger W., Gimmler H. and Kaiser W. M. (1990): Effect of ammonium on dark-CO_2 fixation and on cytosolic and vacuolar pH values in *Eremosphaera viridis* de Bary (Chlorococcales). J. Exp. Bot. 41, 441-448.

Muller B. and Touraine B. (1992): Inhibition of NO_3 uptake by various phloem translocated amino acids in soybean seedlings. J. Exp. Bot. 43, 617-623.

Naftel J. A. (1931): The absorption of ammonium and nitrate nitrogen by various plants at different stages of growth. J. Amer. Soc. Agron. 23, 142-158.

Nissen P. (1973): a- Kinetics of ion uptake in higher plants. Physiol. Plant. 28, 113-120.

b- Multiphasic uptake in plants. I. Phosphate and sulphate. Physiol. Plant. 28, 304-316.

Nissen P. (1974): Uptake mechanisms: Inorganic and organic. Ann. Rev. Pl. Physiol. 25, 53-79.

Oji Y. and Izawa G. (1972): Quantitative changes of free amino acids and amides in barley plants during ammonia and nitrate assimilation. Plant & Cell Physiol. 13, 249-259.

Osmond C. B. and Laties G. G. (1968): Interpretation of the dual isotherm for ion absorption in beet tissue. Plant Physiol. 43, 747-755.

Ower J. and Cresswell C. F. (1986): The influence of the form

and concentration of inorganic nitrogen supplied on N uptake by *Ankistrodesmus falcatus*. En Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands.

Pate J. S. (1973): Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. Soil Biol. Biochem. 5, 109-119.

Patton Ch. and Crouch S. R. (1977): Spectrophotometric and kinetics investigations of the Berteloth reaction for the determination of ammonia. Analytical Chem. 49, 464-469.

Peet M. M., Raper C. D. Jr., Tolley L. C. and Robarge W. P. (1985): Tomato responses to ammonium and nitrate nutrition under controlled root-zone pH. J. Plant Nutr. 8, 787-798.

Pressland M R. and Mc Naughton G. S. (1986): Whole plant studies using radioactive 13-Nitrogen. J. Exp. Bot. 37, 1619-1632.

Raven J. A. and Smith F. A. (1976): Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. New Phytol. 76, 415-431.

Reisenauer H. M. (1978): Nitrogen in the environment (2). Nielsen & Mac Donald. Academic Press, N. Y., 157-170.

Rhodes D., Rendon G. A. and Stewart G. R. (1975): The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. Planta

(Berl.) 125, 201-211.

Rhodes D., Rendon G. A. and Stewart G. R. (1976): The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor*. Planta (Berl.) 129, 203-210.

Rhodes D., Sims A. P. and Folkes B. F. (1980): Pathway of ammonia assimilation in illuminated *Lemna minor*. Phytochem. 19, 357-365.

Robinson S. A., Slade A. P., Fox G. G., Phillips R., Ratcliffe R. G. and Stewart G. R. (1991): The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. Plant Physiol. 95, 509-516.

Rodgers C. O. and Barneix A. J. (1989): The effect of N-deprivation on nitrate uptake and growth rate of two wheat cultivars selected for different fertility levels. Plant Physiol. Biochem. 27, 387-392.

Rodgers C. O. and Barneix A. J. (1993): The effect of amino acids on the regulation of nitrate uptake by wheat seedlings. J. Pl. Nutr. 16, 337-348.

Ronzio R. A. , Rowe W. B. and Meister A. (1969): Studies on the mechanisms of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulphoximine (MSO). Biochem. 8, 1066-1075.

Rufty T. W., Jackson W. and Raper D. (1982): Inhibition of nitrate assimilation in roots in the presence of ammonium: the moderate influence of K^+. J. Exp. Bot. 33, 1122-1137.

Rufty T. W., MacKown C. T. and Volk R. J. (1990): Alterations in nitrogen partioning in nitrogen stressed plants. Physiol. Plant. 79, 85-95.

Salsac L., Chaillou S., Morot-Gaudry J. F., Lesaint C. and Jolivet E. (1987): Nitrate and ammonium nutrition in plants. Plant Physiol. Biochem. 25, 805-812.

Sandoval Villa M., Alcántar Gonzales G., Tirado Torres J. L. and Aguilar Santelises A. (1992): Effect of the NH_4/NO_3 ratio on GS and PEPCase activities and on dry matter production in wheat. J. Plant Nutr. 15, 2545-2557.

Santa María G. E. (1992): Regulación de la absorción de Zn en plantas de trigo. Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas. F.C.E.N., U.B.A.

Scherer H. W. and MacKown C. T. (1987): Dry matter accumulation, N uptake and chemical composition of tobacco grown with different N sources at two levels of K. J. Pl. Nutr. 10, 1-14.

Schlee J. and Komor E. (1986): Ammonium uptake by chlorella. Planta 168, 232-238.

Schmidt S. and Mohr H. (1989): Regulation of the appearence of glutamine synthetase in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons by light, nitrate and ammonium. Planta 177, 526-534.

Sieciechowicz K. A., Joy K. W. and Irealnd R. J. (1989): Effect of methionine sulphoximine on asparaginase

activity and ammonium levels in pea leaves. Plant Physiol. 89, 192-196.

Singh R. P. and Srivastava H. S. (1986): Increase in glutamate synthetase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. Physiol. Plant. 66, 413-416.

Slaughter J. C., Mc Kernan G. and Masaru S. (1990): Intracellular asparagine pool as a factor in control of ammonium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. Mycol. Res. 94, 1009-1012.

Spanswich R. M. (1991): Electrogenic ion pumps. Annu. Rev. Plant Physiol. 32, 267-289.

Ta T. and Joy K. W. (1985): Transamination, deamidation, and the utilization of asparagine amino nitrogen in pea leaves. Can. J. Bot. 63, 881-884.

Ta T., Joy K. W. and Ireland R. J. (1984): Utilization of the amide groups of asparagine and 2-hydroxysuccinamic acid by young pea leaves. Plant Physiol. 75, 527-530.

Ta T., Tsutsumi M. and Kurihara K. (1981): Comparative study on the response of Indica and Japonica rice plants to ammonium and nitrate nitrogen. Soil Sci. Pl. Nutr. 27, 83-92.

Taylor A. A. and Stewart G. R. (1980): The effect of ammonia and light/dark transitions on the level of glutamine synthetase activity in *Osmunda regalis*. Pl. Sci. Letters

20, 125-131.

Ulrich N. R., Larsson M., Larsson C. M., Lesch S. and Novacky A. (1984): Ammonium uptake in *Lemna gibba* G L, related membrane potential changes and inhibition of anion uptake. Physiol. Plant. 61, 369-376.

Van Egmond F. Jr. (1971): Inorganic cations and carbohydrates in young sugar beet plants. Proceedings of the 8th Colloquium of the International Potash Institute, Sweden.

Van Beusichem M. L., Kirkby E. A. and Baas R. (1988): Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. Plant Physiol. 86, 914-921.

Vona V., Di Martino Rigano V., Esposito S., Di Martino C. and Rigano C. (1992): Growth, photosynthesis, respiration, and intracellular amino acids profiles in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. Effect of nutrient limitation and ressuply. Physiol. Plant. 85, 652-658.

Walker K. A., Givan C. V. and Keys A. J. (1984) (a): Glutamic acid metabolism and the photorespiratory nitrogen cycle in wheat leaves. Plant Physiol. 75, 60-66.

Walker K. A., Keys A. J. and Givan C. V. (1984) (b): Effect of L-methionine sulphoximine on the products of photosynthesis in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. J. Exp. Bot. 35, 1800-1810.

Welch R. M. and Epstein E. (1969): The plasmalemma: Seat of

the type 2 mechanisms of ion absorption. Plant Physiol. 44, 301-304.

Wilcox B., Magalhaes J. and Silva F. (1985): Ammonium and nitrate concentrations as factors in tomato growth and nutrient uptake. J. Plant Nutr. 8, 989-998.

Yemm E. W. and Cocking E. C. (1955): The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst 80, 209-213.

Yoneyama T., Akiyama Y. and Kumazawa K. (1977): Nitrogen uptake and assimilation by corn roots. Soil Sci. Pl. Nutr. 23, 85-91.