

Tesis de Posgrado

Regulación de la exportación de aminoácidos al floema en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y su impacto en la concentración final de proteínas en el grano

Caputo Suarez, Carla Paula

2001

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:

Caputo Suarez, Carla Paula. (2001). Regulación de la exportación de aminoácidos al floema en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y su impacto en la concentración final de proteínas en el grano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3343_CaputoSuarez.pdf

Cita tipo Chicago:

Caputo Suarez, Carla Paula. "Regulación de la exportación de aminoácidos al floema en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y su impacto en la concentración final de proteínas en el grano". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3343_CaputoSuarez.pdf

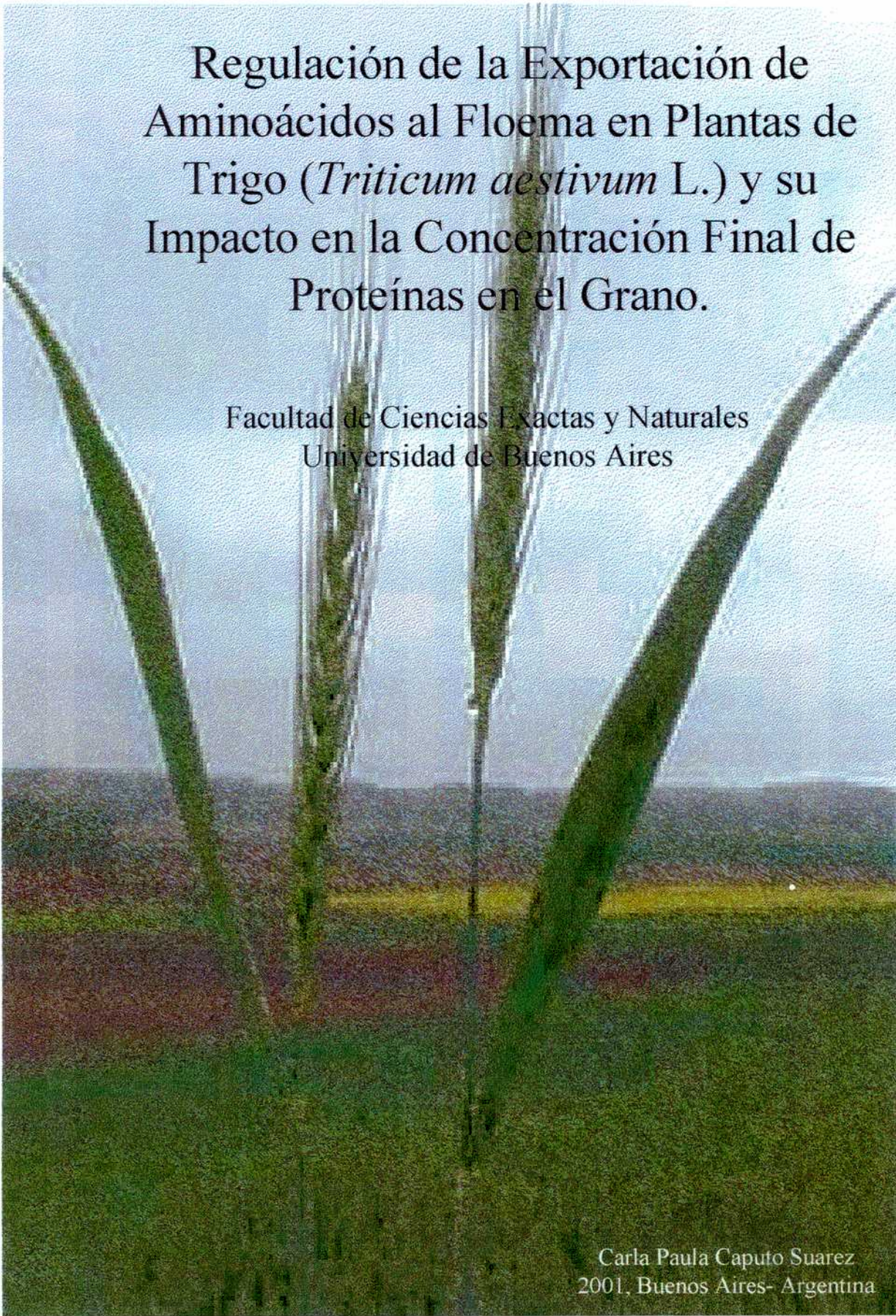
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Regulación de la Exportación de
Aminoácidos al Floema en Plantas de
Trigo (*Triticum aestivum* L.) y su
Impacto en la Concentración Final de
Proteínas en el Grano.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Carla Paula Caputo Suarez
2001, Buenos Aires- Argentina

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

№ 3343

Trabajo de Tesis

Regulación de la Exportación de Aminoácidos
al Floema en Plantas de Trigo (*Triticum
aestivum* L.) y su Impacto en la Concentración
Final de Proteínas en el Grano.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Carla Paula Caputo Suarez

Buenos Aires 2001

3 6 3

El presente trabajo para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires fue realizado bajo la dirección del Dr Atilio Barneix y la coordinación de la Dra. Renata Wulff. en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas y Fisiológicas dependiente del CONICET - Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

A todos los integrantes del laboratorio.

**A mi director Atilio Barneix, y a los directores del Instituto, por hacerme posible la
realización de este trabajo.**

**A Alejandra, Guadalupe, Irma, Laura, Marcela, Marcelo, Pedro, Rocío, Rosario y Olga
que han hecho tan agradable cada día y me han soportado tanto.**

A las Sras. Graciela y Teresa por su incansable preocupación por nuestro bienestar.

**A mis Padres, familiares y amigos por ser parte de mi vida y apoyarme en todo
momento.**

Y sobre todo a mi esposo, Diego.

Resumen

La concentración de proteínas en el grano de trigo es uno de los determinantes de la calidad panadera y por lo tanto del precio del grano. Como los aminoácidos que las conforman provienen de los órganos vegetativos desde donde son transportados por el floema, el estudio de los factores que regulan la exportación de aminoácidos al floema es relevante para la comprensión de la acumulación de proteínas en el grano.

En el presente trabajo se estudiaron las causas fisiológicas de la disminución en la concentración de proteínas en el grano debido a la ausencia del brazo corto del cromosoma 7B de trigo (*Triticum aestivum* L.) en la línea ditelosómica CSDT7BL de la variedad Chinese Spring. Se evaluó el transporte de aminoácidos desde los órganos fuente hacia el grano, que mostró estar disminuido a altas disponibilidades de N, con respecto a las plantas euploides. Por lo tanto se emprendió el estudio de la regulación de la exportación de aminoácidos al floema en plantas jóvenes de otras variedades cultivadas en condiciones controladas mediante la técnica de exudación facilitada con EDTA. Las plantas fueron sometidas a diferentes regímenes de nitrógeno, lumínicos, o al agregado exógeno de citocininas. Se concluyó que en condiciones estables de crecimiento los aminoácidos exportados al floema provendrían del nitrógeno recientemente reducido, mientras que en situaciones de estrés, serían los aminoácidos almacenados previamente en las hojas o los derivados de la proteólisis los que se exportan. Por otro lado, esta exportación resultó ser independiente de la exportación de azúcares al floema, tanto como de la disponibilidad de fotoasimilados en las hojas, en cambio las citocininas mostraron un efecto promotor dependiente de la disponibilidad de nitrógeno.

Luego, se emprendieron ensayos con las plantas CSDT7BL en cámara de cultivo exponiéndolas a las condiciones determinadas en la primera parte, capaces de generar cambios en la exportación de aminoácidos. El conjunto de los resultados obtenidos sugiere que esta línea posee una deficiencia para la exportación de aminoácidos al floema que se manifiesta en altas disponibilidades de nitrógeno, alcanzando una meseta a una concentración externa de nitrógeno menor que en las euploides, que no pareciera depender de la forma en que éste se suministre. Esta deficiencia podría ser la causante de la disminución en la concentración de proteínas en el grano maduro, ya que se encontró una correlación positiva entre estos parámetros en las plantas cultivadas en el campo.

Abstract

Regulation of amino acid export to the phloem in wheat plants (*Triticum aestivum* L.) and its relation on grain protein concentration

Grain protein concentration is one of the major determinants of wheat baking quality, and grain price. Nitrogen requirement of the developing grain is largely supplied by the amino acids transported via the phloem from vegetative organs. But, the regulation of amino acid export to the phloem is still far from clear.

Through the present work the physiological causes of the decrease in grain protein concentration observed in the ditelosomic line CSDT7BL of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chinese Spring (CS), in which the short arm of chromosome 7B is missing, as compared to the normal line, were studied. As a first approach, the amino acid transport via the phloem was analyzed using the exudation in EDTA technique in CS and CSDT7BL plants grown to maturity in the field under two fertilization regimens. During grain development, when high nitrogen was supplied the CSDT7BL plants showed a lower amino acid concentration in the phloem exudate of the flag leaf than CS ones. In order to understand the processes that regulate the amino acids export to the phloem, a series of experiments were performed during vegetative growth period of different wheat cultivars grown in controlled condition and exposed to different nitrogen availability, light irradiance or external cytokinin addition. It was concluded that the rate of amino acid export from the leaf to the phloem is dependent on the nitrogen available to the plant. In plants grown under an adequate nitrogen and light supplies the amino acid export-pool is mainly originated from recently absorbed nitrogen, while under stress conditions the main amino acid source for export are the leaf amino acid-reserve pool or the proteolysis products. Besides, the export of amino acids did not show dependence on the rate of sugar export to the phloem, while cytokinins externally-supplied promoted it at high nitrogen availability.

Finally, in a third set of experiments the ditelosomic line CSDT7BL of cv. Chinese Spring was cultured in controlled growth conditions and under different nitrogen and light supplies to alter the amino acid export to the phloem. The results suggests that this line has a deficiency for the amino acid export to the phloem, revealed when nitrogen supplied is high but independently of the nitrogen source. This deficiency may account for the decrease in grain protein concentration observed in this line.

INDICE

	pag.
Agradecimientos	III
Resumen	IV
Abstract	V
Indice	VI
Indice de tablas y Figuras	X
Abreviaturas	XII

INTRODUCCIÓN	1
Distribución Global del Nitrógeno en la Tierra	2
Utilización del Nitrógeno por las Plantas	4
Absorción y Asimilación de Nitrógeno	4
Transporte y Remobilización de Nitrógeno	8
Senescencia Foliar	10
Almacenamiento de Nitrógeno	11
Importancia del Nitrógeno en la Determinación de la Calidad Panadera	14
Transporte por Floema	17
Características del Floema	17
Cargado Floemático	18
Descarga en los Destinos	21
Sustancias Transportadas por Floema	21
Principales Aminoácidos Transportados y su Concentración	22
Objetivos e Hipótesis	24

MATERIALES Y MÉTODOS	26
Material vegetal	27
Condiciones de cultivo	27
En el Campo	27
En Cámara de Cultivo	27
Análisis del material	29
Extracción y Determinación de Aminoácidos	29
Extracción y Determinación de Hidratos de Carbono	29
Extracción y Determinación de Nitrógeno Total en los Tejidos	30
Determinación de Porcentaje de Proteínas en Grano	31
Extracción y Determinación de Nitrato Libre en los Tejidos	31
Extracción y Determinación de Proteínas Solubles	31
Determinación de la Actividad de la Enzima Nitrato Reductasa	31
Análisis Estadísticos	32
Compuestos Agregados Exógenamente	32
Procedimiento de Colección de Exudado Floemático	33
RESULTADOS	34
Ensayos Preliminares de Colección de Exudado Floemático	35
Determinación de los Compuestos Translocados vía Floema	35
Establecimiento del Buffer de Exudación	36
Establecimiento del Tiempo de Exudación	38
Análisis de la exudación en los distintos niveles foliares	40
Procedimiento de colección de exudado floemático adoptado	40
Relación entre la Exportación de Aminoácidos al Floema y la Concentración de Proteínas en el Grano en Plantas de la Línea Ditelosómica para el Brazo Corto del Cromosoma 7B del Cultivar Chinese Spring (CSDT7BL)	42

Efecto de la Disponibilidad de Nitrógeno sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema	46
Exportación de Aminoácidos al Floema en Plantas cultivadas con Distintas Disponibilidades de Nitrógeno	46
Composición de Aminoácidos en Hojas y Exudados Floemáticos de Plantas Cultivadas con Dos Concentraciones Diferentes de Nitrógeno	49
Efectos del Hambreado de Nitrógeno sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema	53
Relación entre la formación del Pool de Aminoácidos en las hojas y la exportación de Aminoácidos al Floema	54
Discusión	57
Relación entre la Exportación de Aminoácidos y de Azúcares al Floema	64
Efecto de la Intensidad Lumínica sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema	65
Relación entre un Estrés Inducido por Oscuridad Continua y la Exportación de Aminoácidos al Floema	68
Ritmo Diario de Exportación de Azúcares y Aminoácidos al Floema	70
Discusión	72
Efecto de las Citocininas sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema	76
Efecto de Distintas Concentraciones de Citocininas sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema	77
Relación entre el Efectos del Agregado de BAP y la Disponibilidad de Nitrógeno sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema	79
Respuesta al Agregado de Citocininas de la Exportación de Aminoácidos al Floema en Oscuridad Continua.	80
Discusión	81
Estudio de la Exportación de Aminoácidos al Floema en la Línea Ditelosómica para el Brazo Corto del Cromosoma 7B del Cultivar Chinese Spring (CSDT7BL)	83
Exportación de Aminoácidos al Floema en Plantas de las Líneas CSDT7BL y Euploide Cultivadas con Distintas Disponibilidades de Nitrógeno	83

Estudio de la Exportación de Aminoácidos al Floema en la Línea Ditelosómica para el Brazo Corto del Cromosoma 7B del Cultivar Chinese Spring (CSDT7BL)	83
Exportación de Aminoácidos al Floema en Plantas de las Líneas CSDT7BL y Euploide Cultivadas con Distintas Disponibilidades de Nitrógeno	83
Composición de Aminoácidos en Hojas y Exudados Floemáticos de Plantas de las Líneas CSDT7BL y Euploide	89
Efectos del Hambreado de Nitrógeno sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema de Plantas de las Líneas CSDT7BL y Euploide	89
Relación entre un Estrés Inducido por Oscuridad Continua y la Exportación de Aminoácidos al Floema de Plantas de las Líneas CSDT7BL y Euploide	93
Discusión	94
CONCLUSIONES Y PRESPECTIVAS	97
BIBLIOGRAFIA	100

Indice de Tablas y Figuras

	Pag.
Tabla 1: Contenido global de nitrógeno	2
Tabla 2: Solución nutritiva utilizada	28
Tabla 3: Determinación de la concentración y el pH óptimo del buffer	38
Tabla 4: Composición de aminoácidos en hojas	51
Tabla 5: Composición de aminoácidos en exudados floemáticos	52
Tabla 6: Composición de aminoácidos en hojas y exudados floemáticos de plantas CS y CSDT7BL	90
Figura 1: Ciclo de nitrógeno.	4
Figura 2: Esquema de la absorción, asimilación y removilización de N	7
Figura 3: Modelo para el control de la absorción de NO ₃ ⁻	10
Figura 4: Procedimiento de colección del exudado floemático	33
Figura 5: Obtención de exudados floemáticos en función del tiempo	39
Figura 6: Obtención de exudados floemáticos de los distintos niveles	41
Figura 7: Efecto de la disponibilidad de N en plantas CS y CSDT7BL cultivadas a campo.	44
Figura 8: Relación entre la concentración de aminoácidos en el exudado floemático de la hoja bandera y el porcentaje de proteínas en el grano,	45
Figura 9: Efecto de la disponibilidad de N en plantas jóvenes	48
Figura 10: Efecto de la disponibilidad de N en plantas jóvenes	49
Figura 11: Relación entre la concentración de cada aminoácido en el floema en función de su concentración en las hojas	53
Figura 12: Efecto del hambreado de N en plantas jóvenes	55
Figura 13: Efecto del hambreado de N en plantas jóvenes	56
Figura 14: Efecto del agregado de N en plantas jóvenes	58
Figura 15: Efecto del agregado de N en plantas jóvenes	59
Figura 16: Relación entre la concentración de aminoácidos en las hojas y en sus exudados floemáticos	61
Figura 17: Efecto de la intensidad lumínica en plantas jóvenes	66
Figura 18: Efecto de la intensidad lumínica en plantas jóvenes	67
Figura 19: Efecto del estrés inducido por oscuridad continua en plantas	69
Figura 20: Ritmo diario de exudación floemática en plantas jóvenes	71
Figura 21: Relación entre la concentración de aminoácidos en las hojas y en sus exudados floemáticos de las plantas sometidas a oscuridad	73
Figura 22: Relación entre la concentración de azúcares en las hojas y en sus exudados floemáticos.	75
Figura 23: Efecto del agregado exógeno de distintas concentraciones de BAP en plantas jóvenes	77

Figura 24:	Efecto del agregado exógeno de distintas concentraciones de Kinetina en plantas jóvenes.	78
Figura 25:	Efecto del agregado de BAP sobre plantas jóvenes cultivadas con dos niveles de N en plantas jóvenes	79
Figura 26:	Efecto de agregado de BAP sobre plantas jóvenes sometidas a oscuridad continua en plantas jóvenes	80
Figura 27:	Efecto de la disponibilidad de nitrato sobre plantas jóvenes CS y CSDT7BL	85
Figura 28:	Efecto de la disponibilidad de nitrato sobre plantas jóvenes CS y CSDT7BL	86
Figura 29:	Efecto de la disponibilidad de nitrato sobre plantas jóvenes CS y CSDT7BL	87
Figura 30:	Efecto de la disponibilidad de amonio sobre plantas jóvenes CS y CSDT7BL	88
Figura 31:	Efecto del hambreado de N sobre plantas jóvenes CS y CSDT7BL	91
Figura 32:	Efecto del hambreado de N sobre plantas jóvenes CS y CSDT7BL	92
Figura 33	Efecto del estrés inducido por oscuridad continua sobre plantas jóvenes CS y CSDT7BL	94

Abreviaturas

- AA:** Aminoácidos
BAP N6-bencil amino purina
C Carbono
CS: Chinese Spring
CSDT7BL: Línea ditelosómica para el brazo corto del
Cromosoma 7B del cultivar Chinese
Spring
EDTA: Acido etilen diamino tetra acético
N: Nitrógeno
NR: Nitrato reductasa
N/C: Relación Nitrógeno / Carbono
TC/CA: Complejo tubo criboso – célula acompañante

Código de tres letras de los aminoácidos

Asp: Aspártico	Leu: Leucina
Ala: Alanina	Lys: Lisina
Arg: Arginina	Met: Metionina
Asn: Asparagina	Phe: Fenilalanina
Cys-Cys: Cisteína	Pro: Prolina
Gln: Glutamina	Ser: Serina
Glu: Glutámico	Thr: Treonina
Gly: Glicina	Trp: Triptófano
His: Histidina	Tyr: Tirosina
Ile: Isoleucina	Val: Valina

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es un componente esencial de la mayoría de las moléculas biológicas y es el macronutriente que las plantas requieren en mayor cantidad. En las plantas monocárpicas como el trigo, el N absorbido del suelo es asimilado principalmente en las células del mesófilo de las hojas maduras, denominadas “fuente”. Los primeros productos estables de esta asimilación son los aminoácidos, los que pueden ser almacenados, utilizados para la síntesis proteica o removilizados hacia los tejidos llamados “destino” (hojas jóvenes, raíces y órganos reproductivos) transportados por el floema.

En suelos con bajo contenido de N, como es el caso de la Argentina, la mayor proporción de este nutriente disponible para su acumulación en los granos proviene de la removilización del N almacenado durante el período de crecimiento vegetativo, siendo de esta forma la eficiencia de la removilización el principal determinante de la concentración de proteínas que acumulará el grano al final del ciclo de cultivo. Tal concentración proteica es de gran interés agronómico, ya que debido a su influencia tanto en la calidad panadera como en el valor nutricional del pan, es uno de los determinantes del precio internacional de los granos.

Distribución Global de Nitrógeno en la Tierra

El N está ampliamente distribuido en la tierra bajo diversas formas (Tabla 1), y aunque aproximadamente el 78 % del volumen de la atmósfera terrestre esta formada por N, éste constituye menos del 2.0 % de la masa total del N terrestre (Paul & Clark, 1989), y solamente el 0.01 % se encuentra en la biosfera como componente de los organismos vivos.

Contenido de Nitrógeno en	(Tn x10 ¹¹)	(%)
Las rocas primarias	40-190 x10 ⁴	98
La atmósfera	3.9 x 10 ⁴	< 2
El suelo	1.05	< 0.2
Los organismos vivos	0.05	0.01

Tabla 1: Contenido Global de Nitrógeno

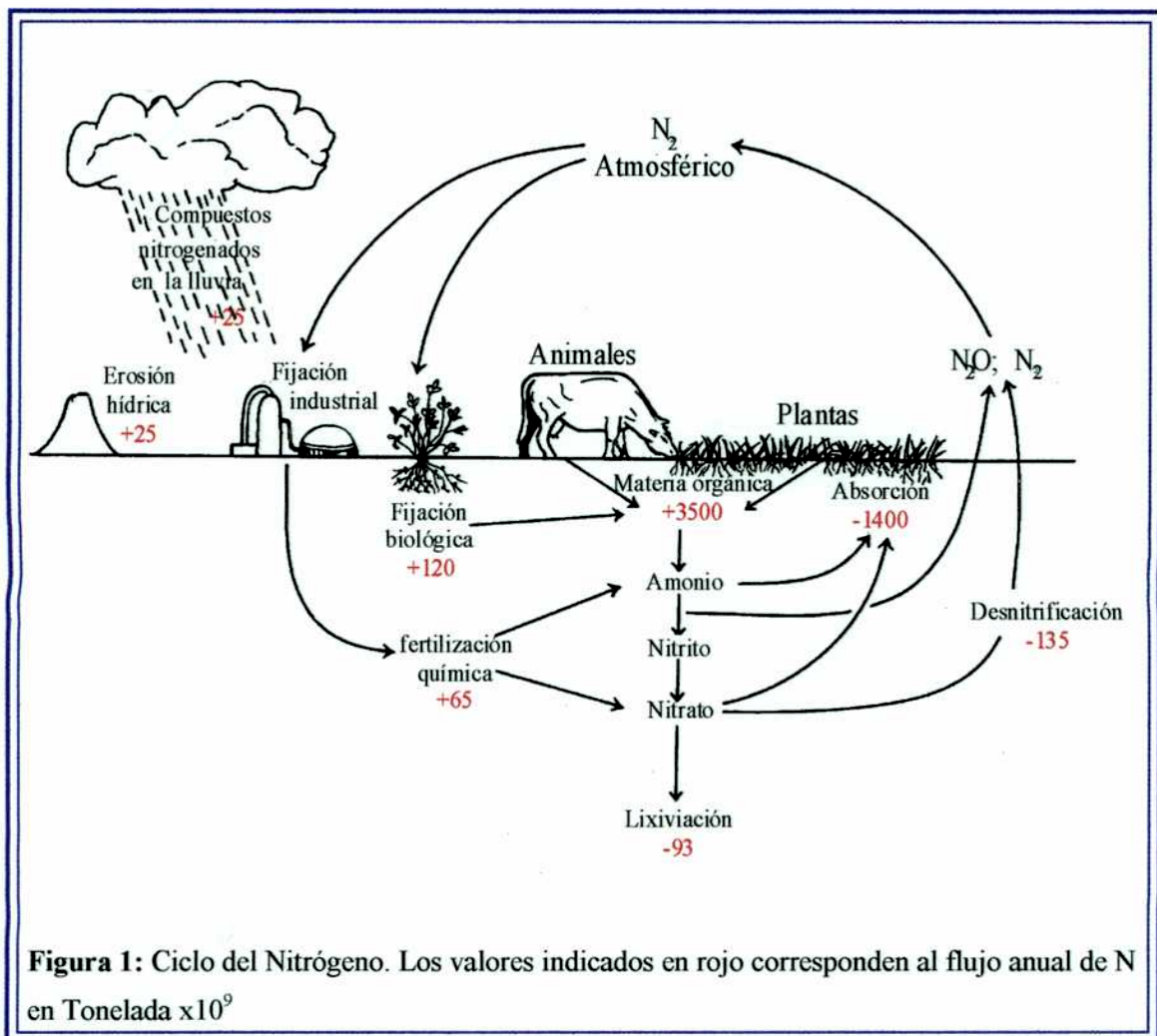
Todos los compuestos nitrogenados que se encuentran en la naturaleza son constantemente transformados en diferentes formas químicas, constituyendo el denominado Ciclo del Nitrógeno (**Figura 1**). Gran parte de este ciclo ocurre en las capas más superficiales del suelo, con flujos de entrada y salida que están acompañados de transformaciones principalmente bioquímicas. Las principales fuentes de N para el suelo son: los restos vegetales y animales, los fertilizantes industriales, las sales de amonio y los nitratos incorporados por las precipitaciones y la reducción del N atmosférico realizada por bacterias de vida libre o en simbiosis con ciertas plantas, como las leguminosas, en el denominado proceso de fijación biológica del nitrógeno (Haynes, 1986).

La fertilización química se produce con baja eficiencia debido a los procesos de pérdida a los que se halla sujeto el N, representando solamente un 2 % de la absorción global de N por parte de los vegetales. Por lo tanto el suministro adecuado del mismo en la agricultura constituye uno de los aspectos más importantes para aumentar la productividad agrícola.

La mayor proporción del N del suelo se encuentra en los horizontes superficiales principalmente bajo formas orgánicas (98 % del total). Los compuestos nitrogenados presentes en esta fracción permanecen estables por largos períodos, constituyendo los taninos, los fenoles y la lignina o asociados con arcillas, siendo tan resistentes al ataque microbiano que en cada estación de crecimiento solo una pequeña fracción de la reserva del N del suelo (~3 %) es mineralizada hasta compuestos inorgánicos como amonio, nitrato o nitrito. De ese N mineralizado, la mayor parte es soluble en agua (NO_3^-) y se desplaza por fenómenos de lixiviación a horizontes no alcanzados por las raíces, en tanto que el amonio puede quedar fuertemente retenido por adsorción en el complejo humus - arcilla o fijado entre las láminas de arcilla, siendo también inaccesible. Otro proceso de pérdida de N para el sistema productivo es la denitrificación que ocurre por vía biológica y consiste en la respiración anaerobia de sustratos orgánicos, usando nitrato como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria y liberando N_2 y N_2O a la atmósfera (**Figura 1**) (Powlson, 1993).

Por lo tanto en el suelo se encuentra una gran heterogeneidad en la distribución de los distintos compuestos nitrogenados variando su proporción en el espacio con los cambios estacionales asociados con la actividad microbiana y de las plantas (Paul & Clark, 1989). De esta forma las raíces están continuamente expuestas a diversas formas

de N en la solución del suelo, aunque la mayor proporción está constituida por el nitrato y el amonio (Haynes, 1986).



Utilización del Nitrógeno por las Plantas

Absorción y Asimilación de Nitrógeno

Como el N se encuentra en bajas concentraciones en el suelo y cambia substancialmente su disponibilidad en períodos relativamente cortos (Cameron & Haynes, 1986), las plantas han desarrollado sistemas de incorporación de compuestos nitrogenados de alta eficiencia en las células de la raíz, capaces de responder rápidamente a las fluctuaciones en la disponibilidad, de forma que la entrada neta de un nutriente dado dependa de las necesidades de la planta más que de su concentración en

el medio circundante de la raíz (Rodgers & Barneix, 1989; Glass *et al.*, 1999). Mas aún, cuando están asimilando simultáneamente diferentes formas de N, surge la necesidad de integrar las señales desde los distintos reservorios potenciales de N para regular su incorporación y coordinar la absorción por parte de las raíces hasta satisfacer la demanda del vástago y de toda la planta en su conjunto. Por ejemplo, el amonio es capaz de inhibir el influjo de nitrato, entonces cuando la absorción de N ocurre a partir de una mezcla de ambos, comúnmente se favorece la entrada de amonio (Lee & Drew, 1989; Bottacin *et al.*, 1999).

Experimentos fisiológicos han establecidos que las raíces de las plantas poseen múltiples sistemas de transporte para la absorción de compuestos nitrogenados. Estos incluyen al menos tres sistemas de transporte activo para la absorción de nitrato y dos, uno activo y otro pasivo, para la incorporación de amonio. Los sistemas de transporte pueden ser de baja y de alta afinidad, donde estos últimos generalmente operan a bajas concentraciones externas, están mediados por un transporte activo y sujetos a regulaciones basadas en función a una variedad de reservorios internos de N. En los últimos años se han clonado genes de distintas plantas que codifican proteínas encargadas de mediar el transporte de baja y alta afinidad de nitrato, los que fueron agrupados dentro de la Superfamilia de Grandes Facilitadores (Vidmar *et al.*, 1999), y también se aisló un transportador de alta afinidad de amonio de plantas de *Arabidopsis* (Ninnemann *et al.*, 1994) a partir del cual luego se aislaron análogos en otras especies. Se suman también transportadores de aminoácidos, aunque su importancia en la adquisición del N en suelos agrícolas es incierta (Glass *et al.*, 1999).

La reducción del nitrato se puede llevar a cabo tanto en las raíces como en los vástagos y la proporción con que ocurre en cada órgano es dependiente de la especie (Lexa & Chesman, 1999). Este proceso involucra dos reacciones catalizadas por enzimas diferentes. En primer lugar, la nitrato reductasa (NR; NADH, EC 1.6.6.1 y NADPH, EC 1.6.6.2) una enzima dimérica, que utiliza molibdeno (Mo_2^+) como cofactor y NAD(P)H como dador de electrones, cataliza la reducción de nitrato a nitrito en el citosol. La síntesis de esta enzima es inducida por sustrato y requiere luz para alcanzar su actividad máxima (Oaks, 1994). El nitrito, como es tóxico, es rápidamente transportado a los plástidos (cloroplastos en hojas) donde la enzima nitrito reductasa (NiR; EC, 1.7.7.1) lo reduce a amonio utilizando la ferredoxina como dador de electrones (**Figura 2**).

El amonio, además de poder ser absorbido directamente del suelo, está continuamente siendo generado de una variedad de procesos anabólicos y catabólicos en las hojas, como la fotorespiración, reducción de nitrato, degradación de proteínas y biosíntesis de lignina, pero como se trata de un compuesto capaz de causar toxicidad no se acumula en los tejidos y es rápidamente incorporado a compuestos orgánicos. El principal mecanismo de asimilación de amonio se da por medio de la enzima glutamina sintetasa (GS; EC, 6.3.1.2) que sintetiza glutamina a partir del ácido glutámico con gasto de ATP, la isoforma citosólica domina en las raíces, mientras que la cloroplástica es cuantitativamente más importante en los tejidos verdes (**Figura 2**).

Luego, la enzima glutamato sintasa (Fd-GOGAT o NAD(P)H-GOGAT; EC, 1.4.1.13) puede convertir la glutamina en glutamato. El proceso de incorporación de amonio se puede dar también en las mitocondrias de las raíces, por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH; EC, 1.4.1.2), dependiente de NADH, que incorpora una molécula de amonio al ácido α -cetoglutarato para formar ácido glutámico. Sin embargo se ha postulado que este proceso ocurre más bien como un mecanismo de desintoxicación de amonio y no como medio de asimilación del N (Oaks, 1994).

A partir de los aminoácidos inicialmente sintetizados se forman el resto de los aminoácidos por transaminación, los que junto con las aminas constituyen los primeros productos estables de la asimilación del N.

En las plantas la absorción del N varía según a: 1) respuestas temporales a modificaciones en factores ambientales, tales como la concentración de nitrógeno, la intensidad de luz, el pH, la composición iónica del medio, la temperatura de la raíz y condiciones de estrés y 2) factores internos que generan variaciones durante los distintos estadios de la vida de una planta, y aseguran que la absorción de nitrógeno responda a sus requerimientos. Cuando existe una discrepancia entre el suplemento interno de N y el ritmo de crecimiento relativo (RGR), la asimilación de nitrato varía para que la cantidad de N en los diferentes reservorios se mantenga relativamente constante. Además se observó que bajo un adecuado suplemento de nitrato, su absorción por las raíces está lejos de la capacidad máxima de transporte, indicando que en condiciones normales, al menos en lo que a cultivos se refiere, no sería el factor limitante de la nutrición nitrogenada (Touraine *et al.*, 1994)

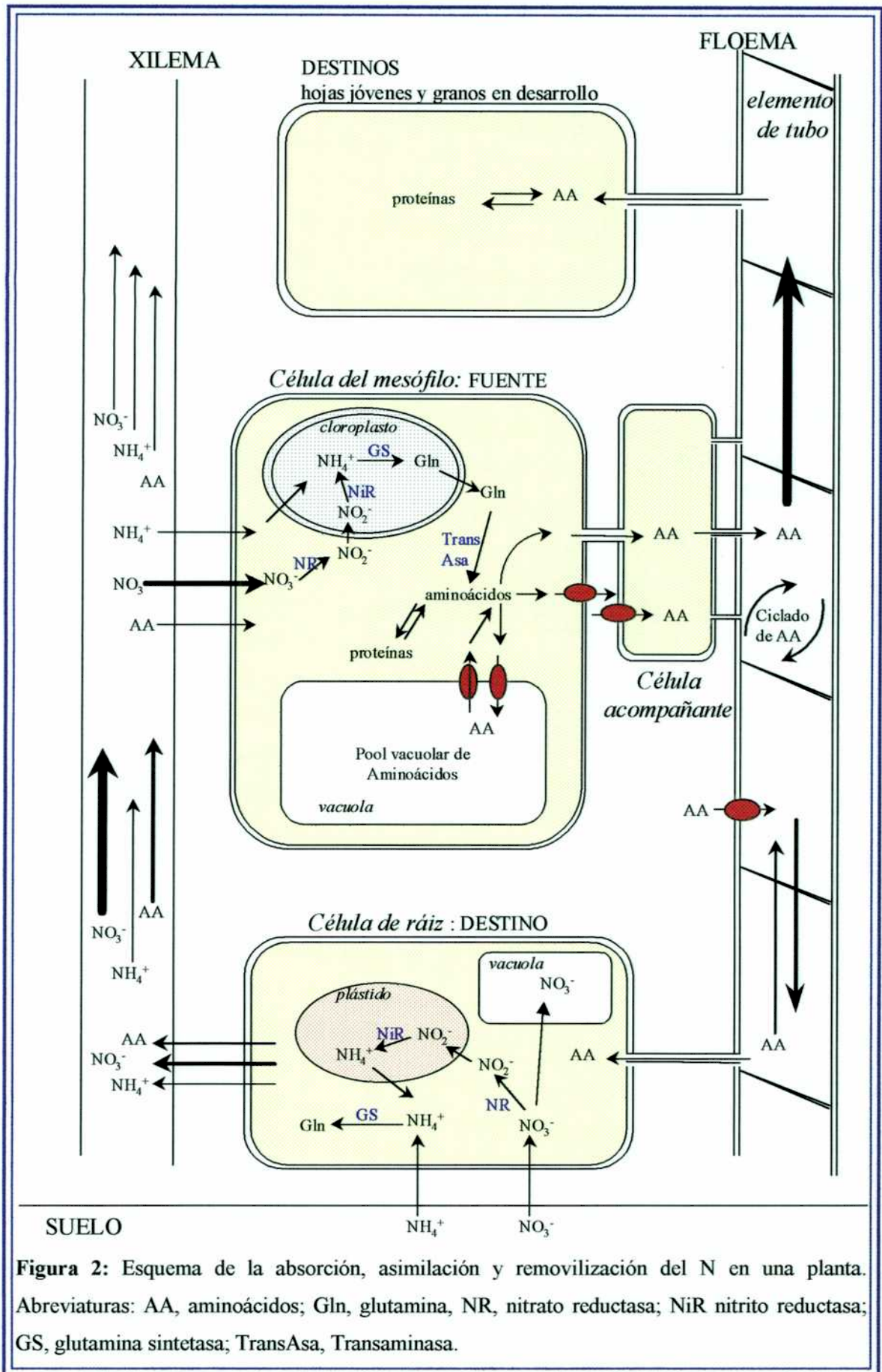


Figura 2: Esquema de la absorción, asimilación y removilización del N en una planta. Abreviaturas: AA, aminoácidos; Gln, glutamina, NR, nitrato reductasa; NiR nitrito reductasa; GS, glutamina sintetasa; TransAsa, Transaminasa.

En experimentos en donde la disponibilidad de nitrato y la tasa de crecimiento de la planta se controlan independientemente, se observa que la tasa de incorporación de nitrato esta principalmente determinada por los procesos regulatorios que coordinan su asimilación con la producción de biomasa. Por ejemplo, la tasa de asimilación específica de nitrato (determinada sobre una base del peso seco de la raíz) de seis cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) mostró una correlación positiva con el RGR del tallo (Rodgers & Barneix, 1988).

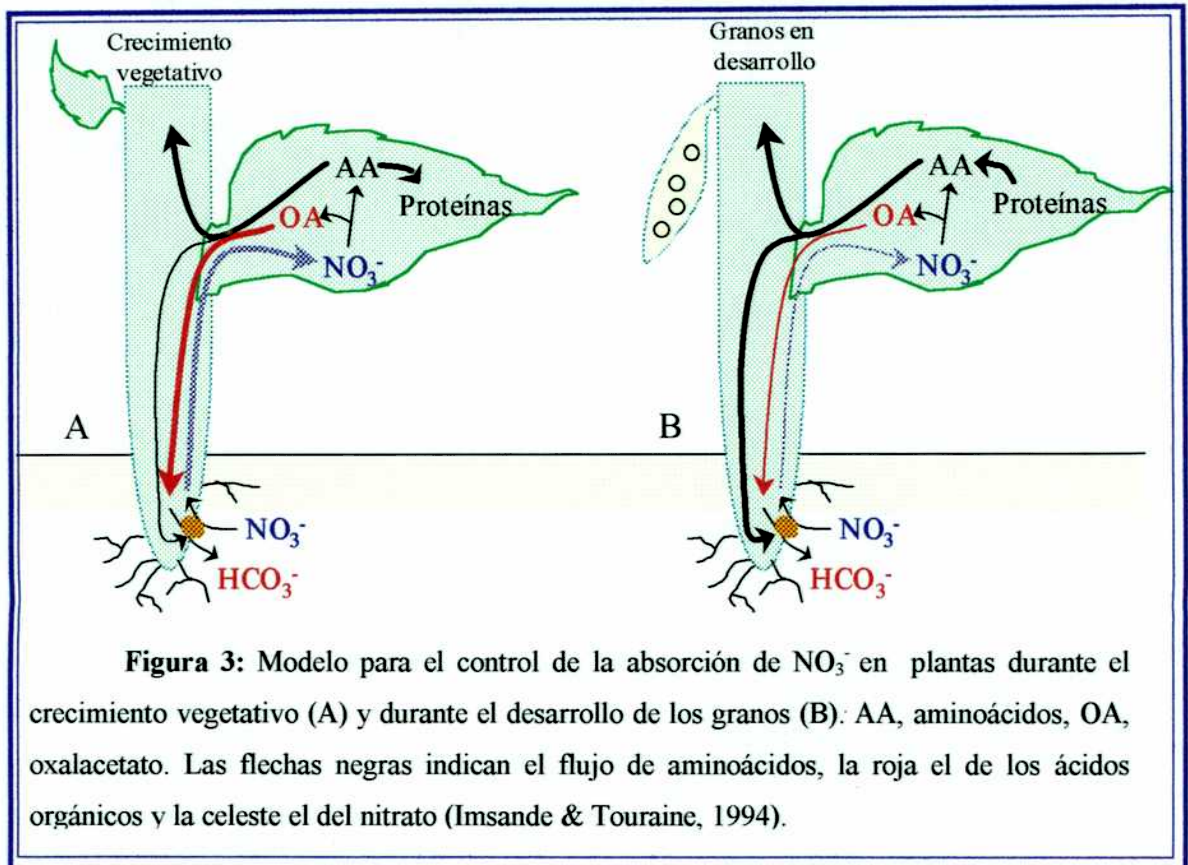
Transporte y Removilización de Nitrógeno

Los distintos órganos de la planta interaccionan entre sí en gran medida mediante los flujos de solutos a través de los sistemas de transporte de larga distancia, el xilema y el floema. El transporte por xilema se encuentra direccionado desde las raíces hacia las láminas de las hojas, mientras que en lo concerniente al floema, el flujo es bidireccional, las hojas completamente expandidas son las fuentes principales del floema, mientras que las hojas en desarrollo, los órganos reproductivos y las raíces resultan los principales destinos.

El N requerido para el crecimiento del vástago es transportado desde las raíces vía xilema como una mezcla de N inorgánico y orgánico, siendo el nitrato y los aminoácidos las formas predominantes, cuya proporción varía con las especies y las condiciones de cultivo (Simpson, 1986; Gojon *et al.*, 1994). Cuando la planta está creciendo con nitrato como principal fuente de N y la reducción ocurre principalmente en las hojas, se obtienen grandes cantidades de ácidos orgánicos fuertes (principalmente oxalacetato y bicarbonato) que para mantener el pH interno de la célula son expelidos y transportados principalmente como malato de potasio por el floema hasta las raíces donde es decarboxilado, el HCO_3^- es excretado y el K^+ acompaña al anión nitrato recientemente adquirido por xilema hacia el vástago (Touraine *et al.*, 1988). Como los niveles de N se estabilizan en las hojas completamente expandidas, gran parte del N entrante es re-exportado hacia los destinos principalmente por el floema (Urquhart & Joy, 1981) (Figura 2). A lo largo de este recorrido el N orgánico sufre un ciclado entre las hojas y las raíces por floema y xilema pudiendo ser transferido directamente de uno a otro en cualquier punto (Cooper *et al.*, 1986;). La tasa de ciclado del N tanto como la

fuerza de la raíz como destino puede ser afectada por la dosis externa de N (Agrell *et al.*, 1994).

Dado que la tasa de ciclado de aminoácidos entre la raíz y el vástago es alta, se ha postulado que los aminoácidos podrían tener algún efecto regulador de la absorción de nitrato (ver Imsande & Touraine, 1994), esta hipótesis se vio reforzada cuando se encontró que los niveles de algunos aminoácidos (Gln, Asn, Ala y Arg) inhibían altamente la absorción de nitrato (Muller & Touraine, 1992). Por otro lado, se observó que los ácidos orgánicos eran capaces de promover la absorción, tanto viajando por floema como administrándolos en la superficie de las raíces (Touraine *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta estos resultados Imsande y Touraine (1994) postularon un modelo en el que la absorción de nitrato se encuentra regulada por ambos metabolitos. Durante el crecimiento vegetativo, la tasa de reducción de nitrato, la síntesis de carboxilatos y de aminoácidos es alta. La mayoría de estos últimos serán usado localmente para la síntesis de proteínas, mientras que los carboxilatos se exportaran rápidamente hacia la raíz. En cambio durante la formación de los órganos reproductivos, la reducción de nitrato en las hojas y la disponibilidad de HCO_3^- en las raíces disminuye, a la vez que la exportación desde las hojas es incrementada por la removilización de N desde los órganos fuente. La mayoría del N translocado está destinado para el llenado de los granos, pero dada la alta tasa de ciclado de N (Cooper & Clarkson, 1989), el floema irrigante de la raíz estará probablemente muy enriquecido en aminoácidos, disminuyendo la absorción de nitrato, tanto por el aumento en la concentración de estos últimos como por la disminución en la concentración de ácidos orgánicos en el floema (**Figura 3**). Sin embargo, resultados posteriores en ensayos con la raíz de una misma planta dividida y sometida a diferentes disponibilidades de nitrato, indicaron que la absorción de este ion no estaría determinada específicamente por el nivel de aminoácidos en el floema irrigante de la raíz ya que al hambrear de N una mitad de la raíz se produjo un incremento en la entrada de nitrato en la otra mitad pero sin un cambio significativo en la concentración de aminoácidos del floema (Tillard *et al.* 1998).



Senescencia Foliar

Es la etapa final del desarrollo de una hoja que lleva a la muerte del órgano, es vista en la actualidad como un proceso de muerte celular programada que asegura una eficiente remoción de los componentes celulares con destino a otros órganos. Éste no constituye un simple proceso degenerativo pasivo sino que se halla controlado por señales internas y externas, y puede ser acelerado o retrasado por alteración de estas señales. Debe ser considerada entonces como un proceso importante en la adaptación de las plantas superiores a las condiciones ambientales de estrés externo o de desarrollo interno (Feller & Fischer, 1994). Los factores externos como la intensidad lumínica, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, las relaciones hídricas y las interacciones simbióticas o con patógenos y los factores internos como los balances hormonales y de C/N o las relaciones establecidas entre las fuentes y los destinos en cuanto a la distribución de los fotoasimilados y los nutrientes, pueden ser factores involucrados en la regulación de la senescencia de la hoja o que pueden influenciarla a nivel de la planta entera (Noodén, 1988).

La integridad de las membranas y la compartimentalización subcelular se mantienen hasta la última fase, permitiendo una buena cooperación entre las organelas involucradas en el catabolismo de los constituyentes de la hoja (Feller & Fischer, 1994). La regulación del contenido celular de proteínas se lleva a cabo por una expresión diferencial que involucra la activación o inhibición de genes específicos a medida que la senescencia progresa. Muchos de estos genes codifican proteasas, nucleasas, lipasas, enzimas del metabolismo del N y otras involucradas en la movilización de nutrientes. Dentro de las funciones activadas en la célula vegetal durante la senescencia, las relacionadas con la proteólisis resultan de particular interés en cuanto a la economía del N. Las proteasas celulares implicadas en esta función son un grupo numeroso de enzimas, algunas muy complejas, y hasta este momento se conoce muy poco sobre la regulación de su actividad, se han identificado y localizado intracelularmente varias endo- y exopeptidasas vegetales y se ha visto que su patrón de expresión varía considerablemente durante la senescencia (Huffaker, 1990; Buchanan-Wollaston, 1997).

Almacenamiento de Nitrógeno

El término almacenamiento ha sido usado en forma diferente por bioquímicos, fisiólogos y ecólogos, y en muchas definiciones del mismo, no se tienen en cuenta algunas características de las plantas, como por ejemplo su capacidad de acumular nitrógeno aún en condiciones de deficiencia del mismo. Consecuentemente Millard (1988) diferenció entre acumulación, como el proceso que ocurre cuando los recursos exceden la demanda de crecimiento de la planta, y almacenamiento, cuando implica un uso potencial de los recursos movilizados desde un tejido para el crecimiento y mantenimiento de otros tejidos. Como la acumulación también puede sustentar un crecimiento posterior, Chapin y colaboradores (1990) definieron el almacenamiento como “los recursos que se construyen en la planta y pueden ser movilizados en un futuro para sustentar biosíntesis”, comprendiendo: 1) las reservas, como compartimentalización o síntesis metabólicamente regulada de compuestos de almacenamiento de los recursos que podrían de otra forma ser usados directamente para promover el crecimiento, 2) la acumulación en el sentido de Millard (1988), y 3) el reciclado, como la ruptura de componentes de crecimiento o defensa para sustentar un crecimiento posterior (ver Heilmeier & Monson, 1994).

Teniendo en cuenta estas definiciones, el N es almacenado primariamente en forma de proteínas (algunas especializadas para ese propósito), aminoácidos (especialmente arginina, glutamina y asparagina) o como nitrato, variando su concentración en las diversas fracciones con las estaciones.

El nitrato juega un rol transiente en el almacenamiento de N, respondiendo al suplemento y a la demanda del mismo (Heilmeier & Monson, 1994). En vástagos de plantas de trigo cultivadas con solución nutritiva conteniendo concentraciones de nitrato desde 0.05 a 4 mM se observó un aumento interno de la concentración de este anión solo cuando los requerimientos de N para el crecimiento fueron satisfechos (Zheng & Leigh, 1990) lo que se ajusta a la definición de la acumulación dada por Millard (1988).

Muchas plantas pueden tener grandes cantidades de aminoácidos y amidas libres en sus tejidos vegetativos (Millard 1988), variando mucho su concentración en los tejidos vegetales con diferentes fuentes y regímenes de nitrógeno. Un alto suministro de nitrógeno aumenta la concentración total de aminoácidos libres en las hojas de varias especies (Haynes & Goh, 1978; Darral & Wareing, 1981; Barneix *et al.*, 1984; Heilmeier & Monson, 1994), y existe una rápida respuesta a los cambios en el suministro de nitrógeno (Barneix *et al.*, 1984).

En una célula existen distintos *pooles* de aminoácidos libres ubicados en los distintos compartimentos subcelulares, como son los cloroplastos, citosol y vacuola y la interacción entre estos compartimentos requiere el transporte a través de membranas (Yoneyama & Takeba, 1984). La vacuola, el compartimento subcelular más conspicuo de los tejidos vegetales, cuyo volumen supera el 80 % del volumen celular total, puede acumular aminoácidos en grandes cantidades cuando la síntesis excede la demanda. Sin embargo, Riens y colaboradores (1991) reportaron que en los tejidos fotosintéticos de espinaca, solo el 20-25 % de los aminoácidos se encontraba en la vacuola, y el resto se encontraba distribuido uniformemente entre el citosol y los cloroplastos; siendo similares los patrones de aminoácidos libres en los tres compartimentos, donde el 80 % del total de los mismos estaba formado por solo tres de ellos: glutamina, glutamato y aspartato. En hojas de cebada iluminadas, en cambio, su concentración en la vacuola iba desde el 50 % según Dietz *et al.* (1990) al 5 % según Winter *et al.* (1992); mientras que en hojas mantenidas en oscuridad, las vacuolas eran el mayor sitio de acumulación de aminoácidos (Sakano & Tazawa, 1984, 1985; Riens *et al.*, 1991). Estos resultados indican que la cantidad de aminoácidos encontrados en la vacuola es variable y que

estaría regulada por una relación fuente/destino, donde el balance entre síntesis y utilización determina la magnitud del *pool* de aminoácidos vacuolar.

El almacenamiento de N en las hojas en la forma de proteínas ofrece ventajas comparadas con el de nitrato y aminoácidos (Millard, 1988). Una de estas es la maximización de la ganancia de carbono por las altas cantidades de rubisco. A esta proteína se le adjudicó un rol tanto metabólico como de almacenamiento, ya que constituye entre el 40 y el 80 % del total de las proteínas solubles de las hojas en las plantas C3, y durante la senescencia es una de las fuentes potenciales de removilización de N de mayor capacidad (Millard, 1988). Por otro lado, en algunas especies se encuentran proteínas cuya función es específicamente de reserva, las que se acumulan en tejidos especiales y varían su concentración a lo largo del año (Heilmeyer & Monson, 1994).

Finalmente, se encuentran las proteínas almacenadas en las semillas como reserva de carbono, nitrógeno y azufre para ser usados por el embrión durante la germinación. Estas proteínas se acumulan tardíamente en estructuras cristalinas densas llamadas cuerpos proteicos cuya estructura permite un plegado que favorece un máximo de aminoácidos en el menor volumen molecular. La expresión de los genes que las codifican se encuentra muy regulada por el desarrollo, es decir que dichos genes solo se expresan durante una limitada porción del ciclo de vida y en un solo tejido (cotiledones o endosperma dependiendo de la especie). La mayoría de las proteínas de reserva de las dicotiledoneas son las globulinas, que son insolubles en agua, pero solubles en soluciones salinas concentradas, en las gramíneas en cambio, generalmente son prolaminas, que también son insolubles en agua o soluciones salinas, pero solubles en alcohol o en soluciones con detergentes, aunque también se encuentran las glutelinas que son muy poco solubles. Las proteínas de reserva son ricas en arginina, glutamina, glutamato y asparagina, y son típicas de cada especie, por lo que la mayoría lleva un nombre trivial derivado de la especie en la que se la encuentra.

Importancia del Nitrógeno en la Determinación de la Calidad Panadera

La preparación de pan es una de las aplicaciones del trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L). La calidad panadera resulta del balance entre los diferentes componentes del grano como el almidón, proteínas de gluten, lípidos, agua y sus interacciones. De estos componentes, se ha visto que las proteínas son las que cumplen un rol fundamental en el proceso del levado del pan, influenciado tanto por la concentración de proteínas como por la composición de cada una de las gliadinas y de las diversas subunidades de la gluteninas que finalmente son acumuladas en la madurez. Las proteínas del gluten son sintetizadas en el endosperma almidonoso en desarrollo y alcanzan hasta la mitad del total de las proteínas en el grano maduro, donde son depositadas en los cuerpos proteicos discretos que pierden su integridad a medida que el grano madura formando una matriz proteica en el tejido seco maduro (Parker, 1980). Las proteínas del gluten están divididas en dos grupos. Las gliadinas (prolaminas): que son proteínas monoméricas que no poseen residuos de cisteína (ω -gliadinas) o que solo tiene puentes de sulfuro intra-tenarios (α - y γ - gliadinas), y las gluteninas (glutelinas): que son proteínas poliméricas que presentan puentes de sulfuro inter e intra cadena. El peso molecular preciso de los polímeros de gluteninas no ha sido determinado pero se considera que llegan hasta aproximadamente 10 millones de daltons, estos polímeros están formados por dos grupos de subunidades, las de bajo y las de alto peso molecular.

En nuestro país la concentración de proteínas en el grano de trigo ha ido decreciendo continuamente en los últimos años. Este hecho se puede atribuir a varias razones, entre ellas, a la caída en la fertilidad de los suelos por una continua explotación de los mismos sin uso de fertilizantes, incrementos en los rendimientos de las variedades actuales que inducen una mayor demanda de N y una política de mejoramiento que durante muchos años priorizó el rendimiento a la calidad.

Un inconveniente para los planes de mejoramiento de la calidad panadera es la falta de conocimientos sobre las bases fisiológicas, bioquímicas y genéticas de la determinación de la concentración de proteínas en el grano. Esto se debe en parte a la existencia de una importante interacción de este carácter con el ambiente que dificulta la

interpretación de las observaciones. Como consecuencia, a lo largo de los años, se ha sugerido que la mayoría de los cromosomas contendrían información genética involucrada en la determinación de la cantidad final de proteínas en el grano (Konzak, 1977). Beniani y Busch (1992) observaron una frecuencia de distribución bimodal o trimodal para el contenido de proteínas entre progenies, sugiriendo la existencia de más de un gen importante para la concentración de N en trigo. A pesar que no se han podido identificar los genes específicos para la determinación de la concentración de proteínas totales en el grano, existen líneas como las derivadas del cultivar Atlas 66 que, consistentemente para un mismo rendimiento, acumulan mayores niveles de proteínas que otros trigos (Khan *et al.*, 1989). Esto indica que con los conocimientos adecuados el mejoramiento genético de este carácter es posible.

Triticum aestivum es una especie alohexaploide cuyos 42 cromosomas se han dividido en tres grupos o genomas llamados A, B y D (Konzak 1977) atendiendo a su distinto donante. Hay similitudes morfológicas y/o funcionales entre los cromosomas de los distintos genomas, por lo que se los llama homeólogos. Por tanto las líneas ditelosómicas, donde todo un brazo cromosómico está ausente, son herramientas útiles para el estudio de la participación de cada uno de estos brazos en los diferentes caracteres de trigo. Las líneas ditelosómicas del cultivar Chinese Spring (CS) han sido extensivamente utilizadas para estudios genéticos de la concentración de proteínas en el grano (Konzak 1977), y ha sido reportado que muchas de estas líneas muestran un aumento en la concentración de proteínas en el grano. Sin embargo, este incremento generalmente se puede explicar a través de una correlación negativa con el rendimiento y no a un aumento real en el contenido proteico (Law & Brown, 1977). Dado que el rendimiento del cultivo está dado básicamente por el contenido de almidón en el grano, todo incremento en el rendimiento produce una caída en la concentración de proteínas si no es acompañada con un aumento en la acumulación de N. La acumulación de azúcares en el grano está limitada por el tamaño del mismo, mientras que los resultados de experimentos realizados con espigas cultivadas en medio líquido indican que no parece haber una limitante fundamental para la acumulación de nitrógeno en el grano, ya que ésta aumenta con la disponibilidad de nitrógeno del medio (Donovan & Lee, 1977; Barlow *et al.*, 1983; Corke & Atsman, 1988). Por lo tanto el contenido total de nitrógeno del grano sería en gran medida una consecuencia de la eficiencia de la planta para llevar a cabo dicho proceso.

Hay amplias evidencias de que el transporte de carbono (C) hacia el grano es independiente del transporte de nitrógeno (Johnson *et al.*, 1967), en tanto que hay indicios de que el transporte de nitrógeno se encuentra condicionado por la exportación de carbono (Barneix *et al.*, 1992; Winter *et al.*, 1992). Al variar el suplemento externo de N, no se altera la relación N/C en xilema y floema durante el desarrollo de las semillas de soja; tampoco se ven alterados, en maíz, el desarrollo temprano de la espiga ni su relación C/N (Layzell & LaRue, 1982; Lemcoff & Loomis, 1986). Por lo tanto la proporción exportada desde las hojas podría depender del nivel de fotosíntesis, y requerir el flujo de sacarosa al floema, quedando de esta forma regulada la relación N/C exportada, y limitada también la concentración de nitrógeno del grano.

Los recursos nitrogenados necesarios para el almacenamiento en los órganos reproductivos de los cereales derivan de la absorción y reducción directa durante el período post-antesis, y de la redistribución del nitrógeno absorbido y asimilado durante el período vegetativo (Cregan & van Berkum, 1984, Berecz & Ragasits, 1993). La proporción de nitrógeno que proviene de cada una de estas fuentes varía con la disponibilidad del mismo en el suelo y con el genotipo del cultivar (Berecz & Ragasits, 1993; Van Sanford & MacKown, 1987). Spiertz y Ellen (1978) encontraron que en condiciones de alta disponibilidad después de la floración, aproximadamente el 50 % del nitrógeno acumulado en el grano de trigo había sido absorbido directamente en ese momento, en consecuencia, una importante proporción del N presente en los órganos vegetativos no fue aprovechada y se perdió en los restos vegetales. Mientras que en aquellos ambientes donde el nitrógeno provisto por el suelo en el período post-antesis es pobre, como es el caso de Canadá, Australia, USA y Argentina, el porcentaje proveniente de la redistribución desde otros órganos sobrepasaba el 80 % del nitrógeno total. En estos casos la eficiencia de dicha etapa de removilización se convierte en el factor principal en la determinación de la concentración final de proteínas en el grano (Dalling, 1985; Barneix *et al.*, 1992; Wyss *et al.*, 1991).

El proceso de removilización del nitrógeno acumulado en los tejidos fuente se puede dividir en dos pasos generales:

- (1) La formación de un *pool* intracelular de aminoácidos libres, por asimilación directa del N o por la degradación de proteínas. Como ya se mencionó, este paso se encuentra condicionado por la disponibilidad de nitrógeno en el suelo y por la actividad de enzimas proteolíticas involucradas en la senescencia y
- (2) El transporte de esos aminoácidos hacia los destinos, que ocurre principalmente por el floema.

Transporte por Floema

Características del Floema

El floema es por su anatomía el único tejido adaptado para el transporte a larga distancia de moléculas señales y sustancias orgánicas desde los tejidos fuente hacia los tejidos destino.

En las angiospermas el floema esta formado por los elementos de tubos cribosos y sus células acompañantes asociadas. Durante la diferenciación cada elemento de tubo entra en un programa de desarrollo altamente especializado en donde la vacuola es eliminada, los plástidos se reducen en número y se transforman, los núcleos degeneran y los ribosomas se reducen o hasta pueden llegar a desaparecer, y si bien retienen el retículo endoplásmico, este se encuentra confinado a una posición parietal asociado a la membrana plasmática (Cronshaw, 1981). Como parte de la diferenciación los plasmodesmos que interconectan un elemento con otro se transforman en poros y forman las placas cribosas, que permiten el paso de moléculas de gran tamaño (Essau, 1969; Knoblauch & van Bel, 1998).

A pesar de las transformaciones sufridas, los elementos de tubo retienen su funcionalidad por mucho tiempo (semanas e incluso meses), y se han detectado más de cien proteínas en el exudado floemático de arroz y trigo, comprendidas la mayoría en un rango de tamaño entre 10-40 kDa (Fisher *et al.*, 1992; Hayashi *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1993), y en trigo también se observó un constante reciclado de las mismas (Fisher *et al.*, 1992).

En la actualidad se piensa que dichas proteínas provendrían de las células acompañantes, desde donde serían transportadas a través de los plasmodesmos

especializados que los interconectan. Dado que en estas células se han detectado mRNAs que codifican para algunas de esas proteínas (Dannenhoffer *et al.*, 1997; Ishiwari *et al.*, 1998) y en un estudio con plantas transgénicas de arroz se pudo modular su concentración en el floema, mediante la sobre - expresión o la represión de las mismas en las células acompañantes (Fukuda *et al.*, 1999).

Además, se realizaron ensayos de microinyección de proteínas en cultivo de células, y se observó que algunas de estas proteínas poseían la capacidad de ajustar el límite de exclusión de los plasmodesmos, para permitir su propio transporte, o el de otras macromoléculas a través de ellos (Lucas *et al.*, 1995; Balachandran *et al.*, 1997; Ishiwari *et al.*, 1998; Xoconostle *et al.*, 1999).

Cargado Floemático

El cargado de sustancias en el floema crea una alta presión de turgencia en el complejo tubos cribosos - células acompañantes (TC-CA), lo que ha sido generalmente visto como un componente determinante del flujo de masa de Münch, dado por la diferencia de presión entre la fuente y los destinos (Orlich, 1998). En su camino hacia los destinos, los azúcares y aminoácidos escapando de los tubos cribosos, son acumulados por los tejidos circundantes en una proporción que depende de la fuerza relativa de cada destino. A partir de 1930 surgió el concepto de que los azúcares requerían un paso de cargado para ingresar al floema dado que su concentración en el floema es mayor que la de las células del mesófilo, dando origen al termino "cargado floemático" en 1955 por Loomis, quien describió al fenómeno como 'acción endotérmica de bombeado' (Turgeon, 1996).

La comunicación entre el complejo TC-CA y las células del mesófilo vecinas puede ocurrir en forma tanto simplástica, a través de la red interconectada de protoplastos, como apoplástica pasando por el conjunto de espacios intercelulares y las paredes celulares que forman el espacio circundante fuera de los protoplastos. (**Figura 2**)

El transporte simplástico depende de la abundancia de plasmodesmos entre el complejo TC-AC y el mesófilo en la zona de la venas menores. Dado que se ha podido observar una gran diversidad entre especies, en cuanto a la densidad de conectividades simplásticas, distinguiéndose varias gradaciones de frecuencias plasmodesmáticas, se

las ha clasificado llamándolas: tipo 1, 1-2a, 2a y 2b desde una profusa abundancia hasta casi una ausencia total de plasmodesmos, con una diferencia de 1000 veces entre los extremos (van Bel, 1992).

En el transporte apoplástico la comunicación se hace posible por las proteínas integrales de membrana denominadas permeasas o transportadores, las que se especializan en el transporte de determinadas moléculas a través de las membranas celulares.

Los mecanismos de transporte posibles son: difusión pasiva, difusión facilitada y transporte activo primario y secundario. En este último, se pueden utilizar varios modos de acoplamiento de energía. Las plantas poseen principalmente un transporte activo secundario, en el que utilizan la generación de un gradiente de protones por medio de una protón-ATPasa de membrana. (Frommer *et al.*, 1994).

La expresión heteróloga de genes en oocitos de *Xenopus* y en células de levaduras incapaces de incorporar metabolitos específicos resultó en la identificación y caracterización de genes que codifican para proteínas transportadoras de una variedad de organismos superiores. Estos ensayos revelaron que para varias plantas, el transporte de sacarosa está mediado por un transportador específico para dicho metabolito, que es inhibido por protonóforos y estimulado por un pH externo decreciente, generando la hipótesis que se trata de un mecanismo de transporte activo secundario que utiliza un simporte de protones (Giaquinta, 1983; Riesmeier *et al.*, 1992; 1993). Por otro lado, el uso de tres diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* portando mutaciones en un número de diferentes genes de permeasas de aminoácidos ha permitido el aislamiento de cuatro familias de genes que codifican proteínas integrales de membrana que son capaces de mediar el transporte de aminoácidos (Frommer *et al.* 1994; Fischer *et al.*, 1998). La familia denominada AAP (del inglés, amino acid permease) esta formada por al menos seis miembros y el transporte de aminoácidos mediado por estas proteínas también es sensible a protonóforos, aumenta con pH decrecientes y ocurre en contra de un gradiente de concentración, sugiriendo un transporte activo vía un mecanismo de simporte con protones (Frommer *et al.*, 1993, Kwart *et al.*, 1993). Basados en sus afinidades diferenciales se las puede agrupar en dos subfamilias: (i) transportadores con amplia especificidad que reconocen aminoácidos ácidos y neutros además de ureidas y (ii) transportadores generales que solo reconocen aminoácidos básicos. Las otras tres

familias están formadas por proteínas transportadoras específicas para algún/os aminoácido/s (Fischer *et al.*, 1998).

Todos los transportadores de aminoácidos identificados hasta ahora muestran diferentes patrones de expresión cubriendo todos los tejidos vegetales, algunos miembros son encontrados en las raíces o en los tejidos en crecimiento mientras que otros solo se expresan en las hojas maduras (Fischer *et al.*, 1995; 1998), y si bien es difícil determinar el tejido al que están circunscriptos, se piensa que muchos de ellos se encuentran restringidos al sistema vascular (Kwart *et al.*, 1993), donde también se encontró el transportador de sacarosa de *Solanum tuberosum*, mostrando también una expresión proporcionalmente mucho mayor en los tejidos fuente que en los destinos (Riesmeier *et al.*, 1993). Estos resultados sugieren que las proteínas transportadoras tanto de sacarosa como de aminoácidos juegan un rol en el cargado floemático (Rentsch & Frommer, 1996; Fischer *et al.*, 1998).

En la actualidad existe un gran consenso en que el camino de los asimilados desde las células del mesófilo hacia los tubos cribosos puede ocurrir en forma simplástica, apoplástica o por ambas, con una correlación entre la proporción de transferencia simplástica y el número de plasmodesmos, generándose así el concepto de un cargado floemático multiprogramado (Escherich & Fromm, 1994; Rentsch & Frommer, 1996; Gamalei, 1985; van Bel, 1992; van Bel *et al.*, 1994; Evert *et al.*, 1996; Botha & Cross, 1997). Mediante el uso del ácido sulfonil p-chloro mercuribenceno, que es un potente inhibidor del cotransporte metabolito - protón, se hace posible el transporte solo vía simplasto, lo que permite determinar según el grado de inhibición obtenido, la proporción en que contribuye cada mecanismo (van Bel *et al.*, 1994; Moing *et al.*, 1997; Turgeon & Medville, 1998).

Cuando hay una gran abundancia de plasmodesmos, como es el caso de cucúrbita se genera el problema de evitar la pérdida de solutos fuera del complejo TC-CA. Por esto se postuló un modelo llamado 'polímeros atrapados', consistente en la síntesis y transporte de polímeros como rafinosa y estaquiosa, que para ser descargados en los destinos serían nuevamente degradados a sacarosa (Turgeon, 1996). Sin embargo no en todas las especies con gran abundancia plasmodesmáticas se han detectado grandes cantidades de polímeros en el floema como para apoyar esta hipótesis.

Descarga en los Destinos

La descarga de los asimilados se produce en los tejidos vegetativos en desarrollo o de reserva, y en las semillas y frutos en crecimiento. En el caso de las semillas y los frutos la descarga debe ser apoplástica, por la ausencia total de plasmodesmos que comuniquen el embrión con los tejidos maternos, sin embargo la descarga a los tejidos maternos puede darse en forma simplástica (Thorne, 1985). Si bien el embrión mantiene un gradiente continuo de concentración de asimilados, convirtiéndolos en compuestos de mayor complejidad como almidón y proteínas, en la actualidad se piensa que los mecanismos de control no se encuentran en el grano en sí mismo (Wang & Fisher, 1994). Fisher y Macnicol (1986) encontraron que la composición de aminoácidos en el exudado floemático se asemejaba a la existente en el grano maduro de trigo, y que las proporciones de aminoácidos en la cavidad endospermática era generalmente similar a aquella de los tubos cribosos que alimentaban al grano.

La descarga dentro de las estructuras vegetativas en crecimiento puede variar con los órganos o especies. Para tallos de caña de azúcar existe evidencia directa de que el descargado es apoplástico y que se mantiene un gradiente de sacarosa desde los tubos cribosos por una invertasa apoplástica, mientras que en raíces seminales de plántulas de maíz la descarga de sacarosa a las células en crecimiento es simplástica (Hendrix, 1983).

Sustancias Transportadas por Floema

Los principales compuestos translocados vía floema son:

Carbohidratos: representan un 70-95 % del carbono translocado; en una concentración variable durante el crecimiento y con las especies siendo la sacarosa la sustancia principalmente translocada (Hendrix, 1983; Chino *et al.*, 1991; Girousse *et al.*, 1991).

Aminoácidos: son los compuestos más abundantes en el floema luego de la sacarosa; la proporción de cada aminoácido y sus concentraciones relativas y del total, varía con las especies (Pate, 1980; Winter *et al.*, 1992; Riens *et al.*, 1991; Chino *et al.*, 1991; Fischer & Macnicol, 1986; Girousse *et al.*, 1991; Hayashi & Chino, 1986). También se translocan ureidas, en algunas especies, aunque en menor proporción (Pate, 1980).

Aniones de ácidos orgánicos: su concentración es baja, pero al igual que como ocurre con los aminoácidos, forman sales con potasio que en solución generan el pH alcalino de los tubos cribosos ($\cong 8$) (Hendrix, 1983). Este alto pH, puede ser un componente crítico en la inhibición de enzimas que podrían de otra forma degradar los compuestos translocados.

Compuestos Inorgánicos: si bien el floema es considerado como la vía de transporte por excelencia de sustancias orgánicas, también transporta compuestos inorgánicos en una proporción de 1/100 con respecto a los carbohidratos. A estos se los denomina compuestos móviles. El K^+ representa un 85 % de la carga catiónica y le sigue el Mg^{2+} con casi la totalidad del 14 % restante (Hendrix, 1983), también se pueden encontrar aniones como Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- y SO_4^{2-} , variando su concentración en función de la disponibilidad de cada uno en el medio (Hayashi & Chino, 1985).

Otras sustancias: compuestos con capacidad de inhibir la actividad de proteasas, hormonas vegetales, como también otros compuestos involucrados en la señalización a nivel sistémico.

Principales Aminoácidos Transportados y su Concentración

La composición del exudado floemático es variable entre especies. En cebada (Winter *et al.*, 1992) y en espinaca (Riens *et al.*, 1991) el contenido de aminoácido del floema resultó ser de una concentración y composición similar a la concentración total de aminoácidos libres en las hojas. En cebada el ácido glutámico representó el 49.2 % del total de los aminoácidos, mientras que el 20.9 % correspondió al ácido aspártico. En espinaca, las proporciones fueron 39.1 y 14.7 % respectivamente, con un 10.1 % de glutamina. El ácido glutámico también fue el aminoácido dominante en el floema de remolacha (Lohaus *et al.*, 1994), y en los de cebada y avena (Weibull *et al.*, 1990). Mientras que en alfalfa (una legumbre), fue la asparagina el aminoácido más abundante (Girousse *et al.*, 1991).

El análisis de la composición del floema de plantas de trigo en estado vegetativo mostró una predominancia de ácido glutámico, seguido por aspártico y serina (Hayashi & Chino, 1986) que si bien durante las primera etapas del llenado del grano, se mantiene como el aminoácido más abundante en el floema, a medida que el grano madura, su concentración va disminuyendo, con un aumento concomitante de

glutamina, que finalmente es el aminoácido que se acumula en mayor medida en el grano (Peeters & van Laere, 1994; Fisher & Macnicol, 1986).



Como ya se mencionó, la concentración final de proteínas que se almacena en el grano se encuentra determinada por la cantidad de N disponible para ser exportada por los tejidos fuente, tanto provenga de la absorción directa como de la removilización de los compuestos almacenados durante el período vegetativo. Como se puede apreciar de lo expuesto en esta introducción, existe una gran complejidad de factores que afectan tanto la absorción como la removilización del N que dificultan enormemente los procesos de mejoramiento genético de este carácter en las diferentes variedades de trigo.

Este trabajo de tesis forma parte de un proyecto cuyo objetivo es determinar cuáles son las causas fisiológicas de la disminución en la concentración de proteínas en el grano debido a la ausencia del brazo corto del cromosoma 7B de trigo en la línea ditelosómica CS DT7BL de la variedad Chinese Spring. Con este fin la tesis se dividió en tres partes: En primer lugar se evaluó la posibilidad que la disminución en la concentración de proteínas en el grano de la línea CS DT7BL pueda estar relacionada con una disminución en el transporte de aminoácidos desde los órganos fuente hacia el grano. En una segunda parte, se estudio la regulación de la exportación de aminoácidos al floema, para en la tercer etapa encarar el estudio de este proceso en la línea CS DT7BL.

Objetivo General

Comprender los mecanismos que regulan la acumulación de proteínas en el grano de trigo.

Objetivos específicos

- Establecer las causas fisiológicas de la disminución en la concentración de proteínas en el grano de la línea ditelosómica CS DT7BL de la variedad Chinese Spring.
- Comprender los factores que regulan el transporte por floema de los aminoácidos desde los tejidos fuente hacia los destinos.

Hipótesis de Trabajo

- La línea CSDT7BL produce una concentración menor de proteínas en el grano debido a una disminución en el transporte de aminoácidos por el floema.

- La exportación de aminoácidos al floema está determinada por la magnitud del *pool* de aminoácidos libres acumulando en las hojas.

- La tasa de exportación de aminoácidos al floema se encuentra limitada por la exportación de azúcares estableciéndose una relación aminoácidos / azúcares relativamente estable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron cariopses de trigo (*Triticum aestivum* L.) de los cultivares: Klein Chamaco, provistas por el criadero Klein, La Dulce, provincia de Buenos Aires, Argentina; pro-INTA Isla Verde provista por el departamento de Recursos Biológicos de INTA-Castelar, provincia de Buenos Aires, Argentina y Chinese Spring de las líneas euploide y ditelosómica CSDT7BL, provistas por el Cereal Research Department, John Innes Center, United Kingdom.

Condiciones de cultivo

En el Campo

Los experimentos fueron llevados a cabo en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. El suelo utilizado consistió en un Argiudol Típico con un contenido de materia orgánica de 2.53 % y un contenido de N total de 0.14 %, que había sido cultivado previamente con maíz por varios años. Las parcelas fueron divididas con un diseño de bloques al azar, y las que fueron fertilizadas recibieron urea como fuente nitrogenada, al momento de la siembra, a emergencia y al comenzar la floración, en una concentración de 100 kg ha⁻¹. Las semillas fueron distribuidas por siembra directa en áreas de 1 m², con 5 surcos por área y una densidad de 10 plantas por metro lineal.

En Cámara de Cultivo

Las semillas se pre-germinaron en papel de filtro a 25 °C en oscuridad por 48 h, antes de transplantarlas a macetas de plástico de 300 cm³ conteniendo arena de cantera lavada y enjuagadas con tres a cuatro volúmenes de agua destilada. Cada maceta constituyó una unidad de muestreo, con excepción de los ensayos realizados para la determinación de la composición de aminoácidos presentes en hojas y exudados floemáticos, donde la unidad de muestreo estuvo conformada por dos macetas, con tres

repeticiones por tratamiento. El número de repeticiones del resto de los ensayos fue variable (no menor a cuatro) por lo que se encuentra indicado en cada figura.

Las plántulas fueron sembradas de a cinco por maceta en todos los ensayos, menos en los ensayos de los efectos del N con la variedad Klein Chamaco donde se sembraron ocho para el experimento donde las plantas fueron cultivadas en ausencia de N y cuatro plántulas en los experimentos restantes.

Las macetas se distribuyeron al azar en una cámara de cultivo con una temperatura constante de 25 ± 1.5 °C, sin control de humedad y con una densidad de flujo de fotones fotosintético promedio de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. provista por lámparas General Electric ® 400 W HPL, con un fotoperíodo de 16 h luz – 8 h oscuridad. Cada maceta fue fertilizada día por medio con 50 a 70 ml de solución nutritiva Hoagland & Arnon (1950) modificada (Tabla 2) durante todo el período de cultivo. Período que varió entre los 10 y 25 días dependiendo del ensayo, por lo que se aclara en cada caso. En los ensayos donde se cultivaron las plantas con distintas concentraciones de nitrógeno, se mantuvo constante la concentración de sales de todas las soluciones con el agregando de KCl en la cantidad necesaria para equiparar todas las plantas a la máxima concentración de KNO_3 .

Macronutrientes	Concentración (mM)	Micronutrientes	Concentración (mg l^{-1})
MgSO_4	1.5	Fe-EDTA	6.922
KPO_4H_2	1	KCl	3.728
CaCl_2	1	H_2BO_2	1.546
KNO_3	0 – 20	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.338
KCl	0 – 19	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.575
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.125
		H_2MoO_4	0.081

Tabla 2: Solución nutritiva utilizada. La concentración de KNO_3 se especifica en cada ensayo en los resultados. El KCl fue adicionado como macronutriente solo en los ensayos con variaciones en la disponibilidad de N, y la concentración utilizada fue la necesaria para alcanzar una misma concentración de sales en todos los tratamientos. El KNO_3 fue reemplazado por $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ en un único ensayo que se especifica en los resultados.

Una vez por semana se efectuaron riegos con agua destilada para evitar una acumulación excesiva de sales.

Tanto las condiciones de luz - oscuridad, como de intensidad y la concentración de nitrógeno de la solución nutritiva fueron modificadas según el experimento, y el detalle para cada caso se encuentra en los resultados.

Análisis del material

Extracción y Determinación de Aminoácidos

Los aminoácidos libres de las hojas fueron extraídos dependiendo de la cantidad de material disponible de 50 o 100 mg de tejido liofilizado, con una solución (5 o 10 ml respectivamente) de Etanol - Cloroformo - Agua en una proporción 12:5:3 v/v/v. La suspensión resultante se incubó durante la noche a -18 °C, se filtró y se procedió a la completa separación de las fases con el agregado de cloroformo y agua (en proporciones 5:1 y 8:3 respectivamente), con la fase acuosa conteniendo los aminoácidos libres (Barneix *et al.*, 1984).

La determinación de la concentración de aminoácidos, tanto de las hojas como de los exudado floemáticos se realizó por el método de la ninhidrina (Yemm & Cocking, 1955), que consiste en incubar a 100 °C por 15 minutos una mezcla de 0.5 ml de muestra, 0.25 ml de buffer citrato de sodio 0.2 M a pH 5, 0.1 ml ninhidrina - metilcellosolve 5 % (p/v) y 0.5 ml de KCN 10 mM en metilcellosolve en una proporción 1:49 v/v, para luego dejar enfriar y leer la Absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro. Para estas determinaciones se utilizó glicina como patrón.

Para la determinación de la composición de aminoácidos de las muestras, estas fueron enviadas a analizar al laboratorio AB-DLO, Wageningen, en Holanda donde se utilizó un "Waters" ® -HPLC con una columna "Waters-PICOTAG" luego de una ultrafiltración y derivatización como se describe en el método "Waters"-PICOTAG ® .

Extracción y Determinación de Azúcares solubles

Para la extracción de los azúcares solubles de las hojas se preparó un extracto acuoso de 5 ml, a partir de 50 mg de tejido liofilizado que se incubó a 100 °C por 10

minutos. A continuación la extracción se llevó a cabo con $K_4Fe(CN)_6$ 0.25M y Acetato de Zinc 1 M en ácido acético 3 %.

La determinación de los azúcares solubles de las hojas y de los exudados floemáticos se realizó con el reactivo de anthrona (Yemm & Cocking, 1954), incubando a 100 °C por no más de 10 minutos 0.3 ml de muestra con 1.5 ml de una solución 0.2 % de anthrona en SO_4H_2 75 %. Luego de enfriar se lee la Absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro. Para estas determinaciones se utilizó sacarosa como patrón.

Extracción y Determinación de Nitrógeno Total en los Tejidos

La extracción del nitrógeno total de los tejidos vegetales se realizó con una digestión completa de 100 mg de material seco (en estufa a 60 °C por 48 h), con 2 ml de H_2SO_4 concentrado a 400 °C y posterior agregado de H_2O_2 100 vol. hasta total clarificación. Luego se diluyó la muestra con agua destilada llevándola a 15 ml.

La determinación de la concentración de nitrógeno se realizó por la técnica de micro Kjeldahl que consiste en la destilación por arrastre con vapor del nitrógeno reducido a amonio (Barneix *et al.*, 1992). Se tomó 1 ml de la muestra digerida y se le agregó 0,5 ml de NaOH al 50 % y se destiló, recogiendo en 2 ml de ácido Bórico 2 % con indicador (50mg/l azul de metileno en metanol y 100 mg/l rojo de metileno en metanol). Posteriormente se tituló con SO_4H_2 0,025 N (valorado).

Finalmente el porcentaje de nitrógeno presente en la muestra se obtuvo con el cálculo que sigue:

$$N \% = \frac{\text{ml } H^+ \times 14 \times \text{molaridad del ácido} \times 15 \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

Donde: 'ml H^+ ' corresponde al volumen de ácido utilizado para equilibrar la muestra.

Mientras que el valor de nitrógeno total se obtuvo de la multiplicación del N % por el peso de la planta o el órgano a determinar, dividido 100.

Determinación de Porcentaje de Proteínas en Grano

Se determinó la concentración del nitrógeno total de los granos maduros, por la técnica de micro Kjeldahl modificada (Barneix *et al.*, 1992), luego de una digestión completa con H₂SO₄ concentrado. Para luego obtener el porcentaje de proteínas por la multiplicación de los valores de N % obtenidos por un factor de 5.73.

Extracción y Determinación de Nitrato Libre en los Tejidos

El nitrato libre en los vástagos se extrajo de 25 mg de tejido vegetal secado en estufa a 60 °C por 48 h. La suspensión acuosa (10 ml) fue incubada a 30 °C por 90 minutos con agitación periódica.

La determinación de la concentración de nitratos se realizó a partir de 0.2 ml del extracto acuoso filtrado que se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos con 0.8 ml de ácido salicílico 5 % en H₂SO₄ concentrado, y que posteriormente se neutralizó con 19 ml de NaOH 2 N y se leyó espectrofotométricamente la Absorbancia a 410 nm. (Cataldo *et al.*, 1975).

Extracción y Determinación de Proteínas Solubles

Las proteínas solubles de las hojas se extrajeron a partir de 300 mg de tejido fresco o previamente almacenado a -18 °C. El tejido fue mortereado con arena de mar lavada y calcinada (Merck®) y con 3 ml de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7, el homogenato fue centrifugado a 10.000 xg durante 10 minutos. La concentración de proteínas se determinó en el sobrenadante por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Determinación de la Actividad de la Enzima Nitrato Reductasa

La determinación de la actividad de la enzima nitrato reductasa (EC 1.6.6.1) se efectuó de acuerdo a Jawosky *et al.* (1971). El principio del método se basa en la medición de la producción de nitrito por la reducción del nitrato, sustrato de la enzima, agregado al tejido exógenamente. La reacción se sigue clorimétricamente midiendo la aparición de nitrito por el aumento de la Absorbancia a 540 nm, tomando como blanco de sustrato la misma reacción sin el agregado de nitrato, mientras que para el blanco de

enzima se reemplazó la muestra por el buffer de reacción. La reacción se llevó a cabo 'in vivo' a partir de 0.2 g de tejido fresco de hojas expandidas cortadas en secciones de 5 mm² que se suspendieron en 10 ml de buffer fosfato de potasio 80 mM a pH 7,5 con isopropanol al 4 % y una concentración final de 20 mM de KNO₃. Se infiltraron en vacío por 5 min y luego se incubaron a 30 °C por 20 min. Se tomaron muestras de 1 ml a tiempo inicial y final a las que se les agregó 1 ml de 1 % sulfonil-amida en 3 M HCl y 1 ml de 0.01 % N-1-naphtylethylene-diamino di HCl (NED); se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 20 min y finalmente se determinó la Absorbancia a 540 nm .

Análisis Estadísticos

Los resultados fueron analizados por la técnica de análisis de varianza (ANOVA). Las comparaciones entre medias se realizaron por el método de scheffé. Los datos fueron analizados con el software Statgraphics (R)

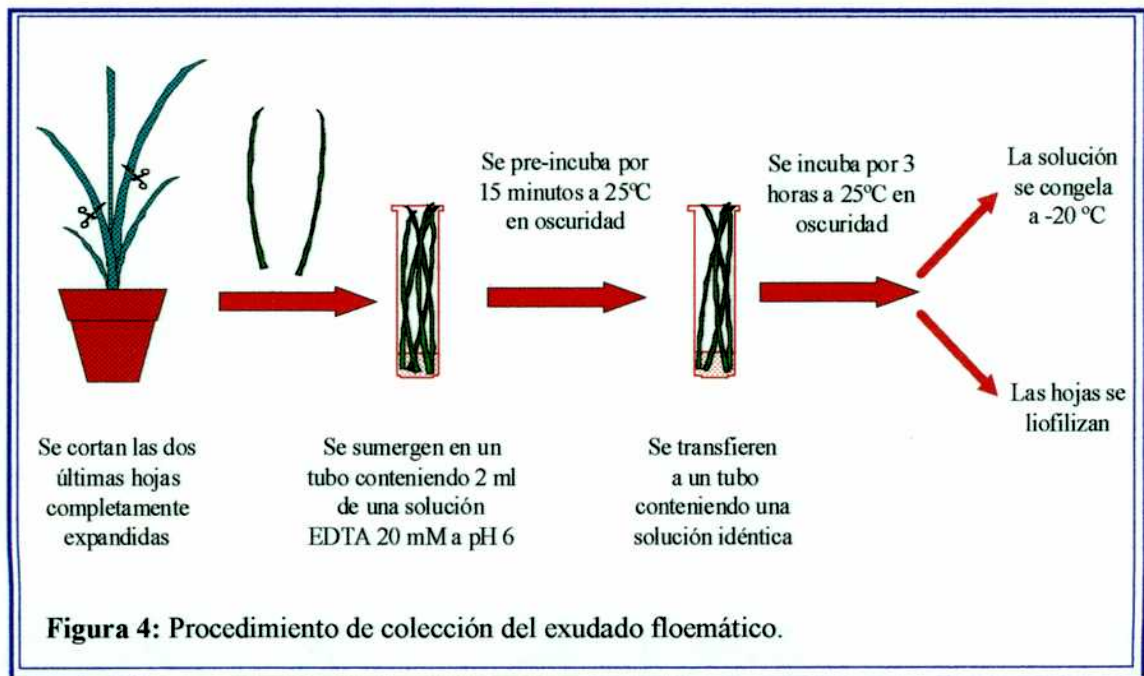
Compuestos Agregados Exógenamente

Las citocininas utilizadas fueron N6-bencil amino purina (BAP) y kinetina, provistas por SIGMA®, testeadas para cultivo de tejidos vegetales. Estas fueron resuspendidas según las especificaciones del proveedor y disueltas en agua.

Una dosis de hormona se definió como 5 ml de una solución de concentración micromolar especificada en cada caso, disuelta en 0.08 % de Tween 80 como tensoactivo, que se roció sobre el vástago de cada maceta (unidad de muestreo).

Procedimiento de Colección de Exudado Floemático

La colección del exudado floemático se llevó a cabo por la técnica de exudación facilitada (King & Zeevaart, 1974). Las dos hojas más jóvenes totalmente expandidas de cada planta fueron escindidas. Se introdujeron las hojas (el número fue variable por lo que se indica en cada ensayo en los resultados) por sus extremos cortados en 2 ml de una solución de EDTA (20 mM, pH 6) en tubos de 40 ml. Fueron preincubadas por 15 minutos en oscuridad, para eliminar los restos celulares remanentes del corte efectuado como así también para evitar contaminación con el exudado xilemático. Luego las hojas fueron transferidas a una solución igual con el mismo volumen donde fueron incubadas por 3 h en oscuridad, esto último, para evitar que las mismas transpiren y absorban la solución por xilema. Al final del período de exudación las hojas se almacenaron a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ o se liofilizaron, según el análisis a realizar posteriormente y la solución de exudación fue guardada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los vástagos remanentes y las raíces se secaron a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h en estufa (**Figura 6**).



RESULTADOS

Ensayos Preliminares para la Colección del Exudado Floemático

Determinación de los Compuestos Transportados por el Floema

La colección del exudado floemático de las plantas y el estudio de su composición química en condiciones variables de crecimiento es esencial para la investigación del transporte por floema.

La determinación de los asimilados translocados por el floema se basa en la medición de las cantidades relativas de carbono y nitrógeno en el exudado floemático, que si bien fluye fácilmente de tubos cribosos cortados de ciertas especies, en otras esto no ocurre y la obtención del exudado se hace más dificultosa (Simpson, 1986).

Hasta la actualidad se ha obtenido exudados floemáticos de muchas especies tanto por incisión y corte en el caso de las plantas que exudan naturalmente (Simpson, 1986), mediante la técnica de exudación facilitada (King & Zeevaart, 1974) o mediante la que utiliza el estilete de insectos para obtener muestras de floema (Fischer & Frame, 1984).

El método que permite la obtención de los exudados floemáticos más puros, es el que utiliza estiletes cortados de áfidos que se alimentan del fluido floemático (Hayashi & Chino, 1986; Girousse *et al.*, 1991; Lohaus, *et al.*, 1994), pero posee varias desventajas que hacen dificultosa su implementación: 1) Como primera medida se necesita encontrar un insecto adecuado para la especie vegetal a estudiar, 2) Es necesario y dificultoso cortar el estilete del insecto, y se requiere un instrumento costoso para este fin. Este paso tiene una baja probabilidad de éxito, que no solo esta dada por el éxito en la obtención del estilete sino también por que éste contenga exudado, y por último 3) Se obtiene un volumen muy pequeño por estilete (0.1 a 1 μ l) siendo necesario juntar muestras de varios estiletes para obtener un volumen suficiente para realizar los análisis. Finalmente, los datos obtenidos dependen de la especie, del insecto utilizado y de las condiciones fisiológicas de la planta, ya que no siempre se puede descartar que el áfido libere sustancias en el exudado que causen cambios en la muestra (Fischer & Frame, 1984; Febvay *et al.*, 1988).

La técnica de exudación facilitada, consiste en el uso de soluciones acuosas de agentes quelantes de cationes divalentes que permiten la exudación de sustancias móviles del floema desde superficies cortadas de partes aisladas de las plantas (principalmente hojas y peciolo) reduciendo el bloqueo del floema por reducción de la formación del tapón de calosa (King & Zeevaart, 1974). El quelante más utilizado es el EDTA (5-20 mM; pH 6-7) aunque también el EGTA y el ácido cítrico son capaces de promover la exudación (King & Zeevaart, 1974; Urquhart & Joy, 1981; Simpson, *et al.*, 1983). El agregado de Ca^{++} a la solución quelante inhibe totalmente la exudación (King & Zeevaart, 1974).

Esta técnica fue extensivamente utilizada con un amplio rango de especies (Pate *et al.*, 1980; Chino *et al.*, 1991; Girousse *et al.*, 1991; Febvay *et al.*, 1988; Layzell & La Rue, 1982; Weibull *et al.*, 1990; Simpson & Dalling, 1981; Hanson & Cohen, 1985). Es fácil de usar, permite la colección de volúmenes adecuados para análisis bioquímicos y es factible para la colección de floema de distintas partes de una planta. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes: 1) La muestra obtenida se encuentra diluida por un factor desconocido, 2) Existe la posibilidad que el exudado se contamine con restos celulares de la superficie cortada o con exudado xilemático, y 3) Se puede dar toxicidad por el agente quelante, o se puede ver alterada la permeabilidad de las membranas. En cuanto al primer problema, si bien no se pueden determinar concentraciones absolutas es muy útil para estudiar respuestas frente a diversos tratamientos, basándose en las concentraciones relativas obtenidas, ya que se han llevado a cabo diversos estudios comparativos con la técnica que emplea al áfido (Weibull *et al.*, 1990; Girousse *et al.*, 1991), donde aunque se obtuvieron contenidos globales de azúcares y aminoácidos distintos con los dos métodos, la composición de ambas muestras en lo que respecta a la proporción de cada metabolito en particular estuvo altamente correlacionada, indicando la factibilidad en la utilización de la técnica de exudación facilitada como alternativa a la que emplea al áfido, que es tan laboriosa. Para evitar el segundo inconveniente se realiza una preincubación en el mismo buffer donde se liberan los restos celulares y se permite que lleguen a un equilibrio el extremo cortado y la solución, evitando que durante la incubación se contamine la muestra con exudado xilemático (Simpson & Dalling, 1981), mientras que para evitar cualquier efecto de toxicidad es aconsejable no superar una concentración de 20 mM del agente quelante.

En este trabajo se utilizó la técnica de exudación facilitada para la obtención de exudado floemático de hojas maduras de trigo. Para determinar las mejores condiciones para llevar a cabo los experimentos se realizaron estudios preliminares.

Establecimiento del Buffer de Exudación

De la bibliografía obtuvimos distintas soluciones de exudación empleadas con distintas especies. Las variaciones entre las soluciones radicaban en el pH y la concentración de las mismas, por lo que realizamos un ensayo probando estas variaciones en el buffer para la obtención de exudados floemáticos de hojas maduras de plantas jóvenes de trigo de la variedad Klein chamaco.

Las plantas se cultivaron por 15 días en cámara de cultivo con solución nutritiva conteniendo 10 mM NO₃K. Se coleccionaron de a 8 hojas por muestra, los exudados floemáticos de las dos últimas hojas totalmente expandidas de cada planta en diferentes soluciones de EDTA (5 y 20 mM a pH 6 o 7), por 3 horas en oscuridad.

Se determinó la concentración de aminoácidos, de azúcares y la relación aminoácido/azúcares de los exudados floemáticos luego del período de exudación.

Se obtuvieron concentraciones significativamente más elevadas de aminoácidos y azúcares en la solución de exudación en buffer EDTA 20 mM con respecto a las obtenidas con una concentración de 5 mM, siendo no significativas las diferencias obtenidas en función del pH de las dos concentraciones probadas. La relación aminoácidos/azúcares en la solución de exudación no fue afectada por la concentración ni el pH del buffer, ni por combinaciones de los mismos (**Tabla 3**).

Como la relación aminoácidos/azúcares se mantuvo constante en todos los tratamientos, se puede descartar la posibilidad de una exudación preferencial de alguno de los metabolitos medidos en función del buffer de exudación, y dado que los errores obtenidos con cada combinación fueron comparables entre sí, nos fue posible elegir la concentración de buffer en la que se lograba una concentración mayor tanto de aminoácidos como de azúcares, que fue la de 20 mM EDTA a pH 6.

Buffer EDTA		Aminoácidos (nmol ml ⁻¹)	Azúcares (nmol ml ⁻¹)	Relación Aminoácidos /Azúcares
MM	pH			
5	6	115.26 ± 21.50	228.95 ± 40.00	0.503 ± 0.041
5	7	111.87 ± 26.08	242.13 ± 51.38	0.462 ± 0.035
20	6	212.25 ± 28.51	470.85 ± 35.00	0.450 ± 0.033
20	7	258.12 ± 52.50	422.60 ± 120.38	0.611 ± 0.045

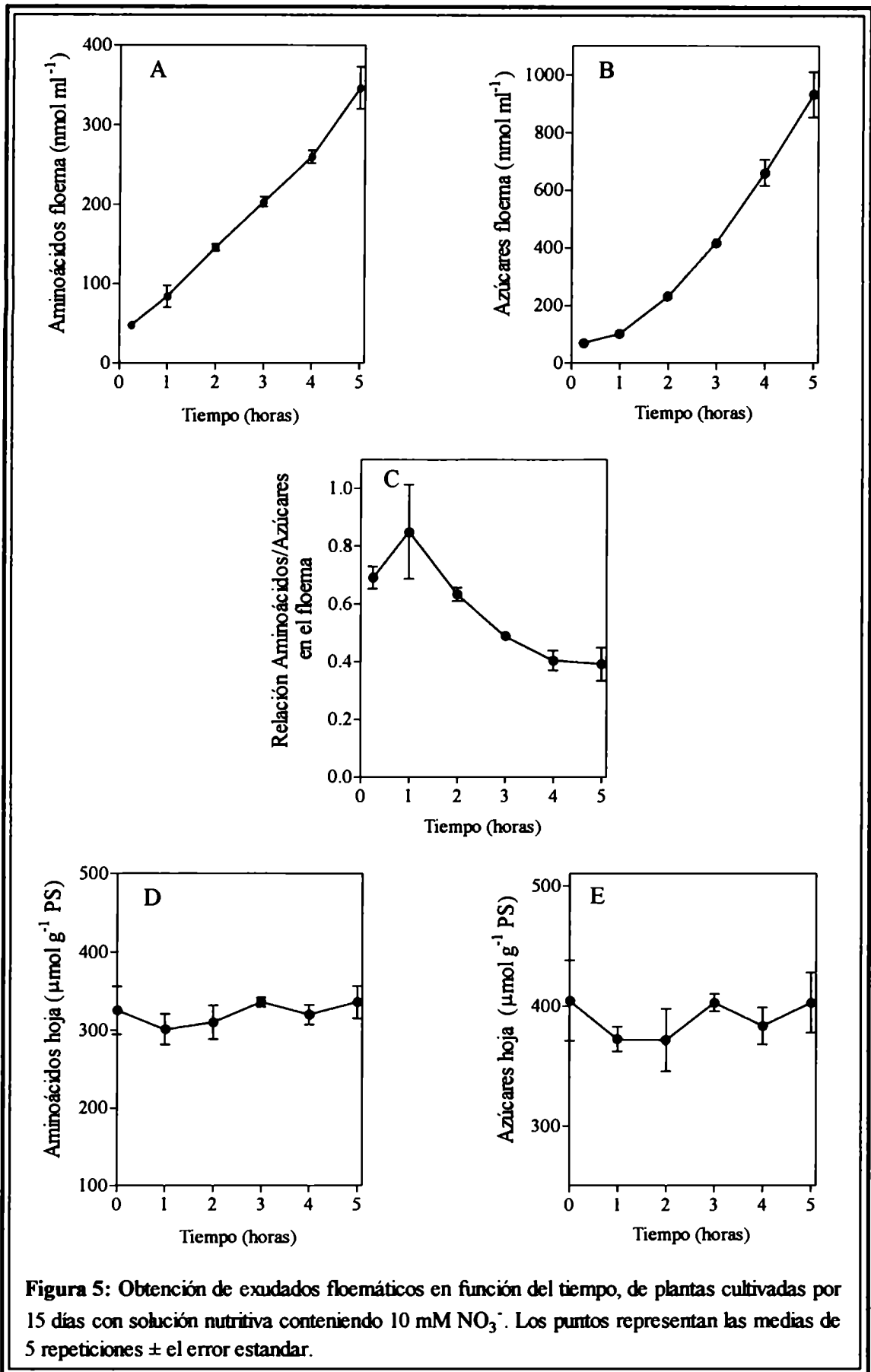
Tabla 3: Determinación de la concentración y el pH óptimo de buffer EDTA de exudación. Se utilizaron los exudados floemáticos de 8 hojas completamente expandidas de plantas cultivadas con 10 mM NO₃K por 15 días. Los valores representan las medias de 4 repeticiones ± el error estandar.

Establecimiento del Tiempo de Exudación

Para determinar la cinética de exudación de los dos metabolitos a la solución de exudación y para determinar la ocurrencia o no, de cambios en la concentración de los mismos en las hojas luego del período de exudación, realizamos un ensayo donde se tomaron los exudados floemáticos a distintos tiempos.

Se coleccionaron los exudados floemáticos de plantas cultivadas en las mismas condiciones que en el ensayo anterior. Se utilizó el buffer elegido (20 mM EDTA, pH 6) y la incubación se realizó por cinco horas en oscuridad, tomándose muestras de las soluciones de preincubación (de 15 minutos de exudación) y luego a cada hora de incubación. Se determinó la concentración de aminoácidos, de azúcares y la relación aminoácidos/azúcares de los exudados floemáticos luego de cada período de exudación y del tiempo de lavado, y se determinó la concentración de azúcares y aminoácidos de las hojas luego de los distintos tiempos de exudación incluyendo un control sin exudar (0 h).

La concentración de azúcares y de aminoácidos en los exudados floemáticos aumentaron con el tiempo de exudación, siendo en todos los casos las concentraciones de las soluciones de lavado similares entre sí, e inferiores al valor obtenido con una hora de exudación (**Figura 4 A, B**).



La relación aminoácidos/azúcares disminuyó con el tiempo de exudación hasta las 3 h permaneciendo luego constante, y siendo la relación obtenida luego del período de lavado similar a la de 2 h de exudación (**Figura 4 C**).

Por otro lado las concentraciones de aminoácidos libres y azúcares solubles de las hojas no fueron afectadas por el tiempo de exudación en que estuvieron en oscuridad (**Figura 4 D, E**).

Como la concentración de azúcares tanto como de aminoácidos en los exudados aumentó proporcionalmente con el tiempo y la relación aminoácido/azúcares permaneció constante a partir de las tres horas, se decidió continuar incubando las hojas durante 3 h para obtener los exudados floemáticos.

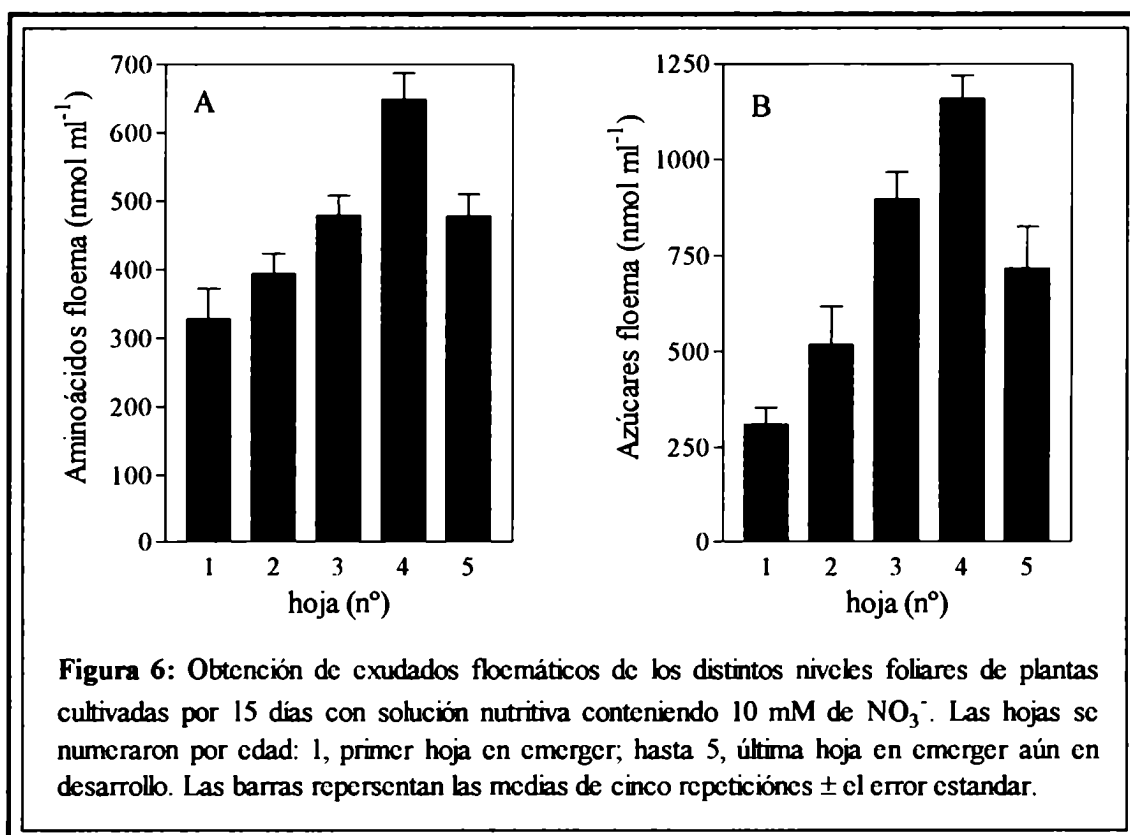
Por otro lado como no se obtuvieron diferencias en la concentración de aminoácidos y azúcares libres en las hojas luego de los distintos períodos de incubación, se decidió realizar estos análisis en las hojas utilizadas para coleccionar los exudados luego del período de exudación, asumiendo que la concentración obtenida es equivalente a la existente en la planta intacta en el momento de comenzado el tratamiento.

Análisis de la exudación en los distintos niveles foliares

Con este método de obtención de exudado floemático se está determinando la concentración neta (la resultante de lo exportado y lo importado) de los distintos metabolitos analizados. Como nuestro objetivo es estudiar la exportación de los asimilados desde los tejidos fuente hacia los destinos, en los ensayos anteriores coleccionamos el exudado de las dos últimas hojas expandidas de cada planta, que durante el ciclo vegetativo actúan como los tejidos fuente y por lo tanto el balance resultante de lo exportado e importado se encuentra desplazado hacia la exportación, sin embargo es posible obtener exudados floemáticos de las hojas en cualquier estadio de crecimiento.

En el ensayo que sigue se analizó el contenido de aminoácidos y azúcares en el exudado floemático de los distintos niveles foliares de plantas de 18 días de edad, cultivadas nuevamente con solución nutritiva con 10 mM NO₃K, para determinar la dinámica de exudación neta de las hojas en función de su estadio de crecimiento.

Las hojas más jóvenes (denominadas 5) aún en desarrollo, donde casi la totalidad del exudado obtenido corresponde a lo importado desde las hojas más viejas, mostraron una exudación de aminoácidos menor a la de las hojas con una expansión foliar total o mayor al 80 % (número 4) que fueron las que presentaron la máxima exudación, luego la exudación de las distintas hojas fue disminuyendo con la edad, hasta las hojas número uno, ya senescentes, cuyo nivel de exudación apenas superó el 50 % de exudación de las hojas número cuatro (**Figura 5 A**). La exudación de azúcares siguió un patrón similar, pero en las hojas uno y dos la exudación fue solo un tercio de las máximas exudaciones obtenidas en las hojas tres y cuatro, que no difirieron entre ellas (**Figura 5 B**). Las diferencias de exudación obtenidas entre las hojas uno a cuatro, todas hojas maduras, puede deberse al tamaño de las hojas, ya que el área foliar va en aumento en función del número de hoja .



**Relación entre la Exportación de Aminoácidos al Floema y la
Concentración de Proteínas en el Grano en Plantas de la Línea
Ditelosómica para el Brazo Corto del Cromosoma 7B del Cultivar
Chinese Spring (CSDT7BL)**

Las plantas que portan mutaciones para funciones determinadas fueron, y aún hoy son, de gran ayuda en el estudio de los caminos metabólicos de muchas especies, sin embargo, en el trigo panadero, la detección de una línea con una única mutación es muy improbable, ya que esta puede verse fácilmente enmascarada por la expresión de los genes homeólogos presentes, debido a la alta similitud entre los tres genomas que conforman el trigo hexaploide.

En las líneas ditelosómicas, con la ausencia de un brazo cromosómico, se pueden ver eliminadas secuencias tanto codificantes como regulatorias, que se encuentren ausentes en los otros pares de cromosomas homeólogos, por eso son herramientas tan útiles para el estudio de los efectos de los diferentes brazos cromosómicos en los diferentes caracteres de trigo. Como ya se dijo, las líneas ditelosómicas del cultivar Chinese Spring (CS) han sido extensivamente utilizadas para estudios genéticos de la concentración de proteínas en el grano (Konzak 1977), y ha sido reportado que muchas de estas líneas muestran un aumento en la concentración de proteínas. Sin embargo, este incremento generalmente se puede explicar a través de una correlación negativa con el rendimiento, y no a un aumento real en el contenido proteico (Law & Brown, 1977). Por el contrario en nuestro laboratorio, en colaboración con el Dpto. de Recursos Biológicos de INTA-Castelar se ha identificado una línea ditelosómica de la cv. Chinese Spring, a la cual le falta el brazo corto del cromosoma 7B (CSDT7BL) que presenta, con respecto a la línea euploide (CS), una disminución en el contenido de proteínas en el grano (15-20 %), a pesar de producir un rendimiento en grano similar, o hasta incluso menor, con el mismo contenido total de N y aminoácidos libres en la hoja bandera durante el llenado de grano. A su vez se observó también una mayor cantidad de N remanente en la paja luego de la cosecha (Barneix *et al.*, 1998), que sugiere una deficiencia para la removilización de los compuestos nitrogenados desde los órganos fuente. Este efecto resultó ser exclusivo para la línea CSDT7BL, de

entre las 36 líneas ditelosómicas testeadas del cultivar CS (Barneix *et al.*, 1998), además existe evidencia de que se trate de un efecto aditivo, ya que la línea tetraploide para el cromosoma 7B del cultivar CS muestra una concentración de proteínas mayor al de la línea euploide (Barneix & Suarez, sin publicar).

Para avanzar en la comprensión de las causas de la disminución en el porcentaje de proteínas obtenido en el grano, y su relación con una deficiencia en la removilización de los compuestos nitrogenados, se emprendió un ensayo a campo, en el que se sometieron las plantas de las dos líneas a dos niveles de fertilización nitrogenada durante el crecimiento, un grupo no recibió N mientras que el otro fue fertilizado con tres dosis de 100 Kg ha⁻¹ a lo largo del ciclo del cultivo. Siete días después de antesis se realizó un muestreo en el que se midió el contenido de aminoácidos y azúcares en el floema (de 4 hojas bandera por muestra), como así también la concentración de ambos metabolitos en sus tejidos. Los datos presentados en este trabajo fueron obtenidos de plantas que formaban parte de un ensayo donde se evaluó la utilización del N por parte de plantas CS y CSDT7BL que se realizó en colaboración con la Ingeniera Nora Fatta y que fue publicado en la revista Agronomie. Por lo tanto, los parámetros estimadores del crecimiento y acumulación de N, como así también, las determinaciones de parámetros agronómicos se encontraran en el trabajo Fatta *et al.*, 2000; de donde se extrajo los datos de porcentaje de proteínas de los granos maduros y el contenido de N total de la paja remanente.

El análisis de los datos reveló una menor concentración de proteínas en el grano de las plantas CSDT7BL solo en el tratamiento con alta fertilización donde también se recuperó un alto contenido de nitrógeno en la paja (**Figura 7 A, B**). Asimismo, se observó que la concentración de aminoácidos en la hoja bandera era mayor en las plantas euploide fertilizadas, mientras que en las de la línea CSDT7BL no se observó aumento alguno en respuesta a la fertilización (**Figura 7 C**). Y la a cantidad de aminoácidos exportados por la hoja bandera de las plantas CSDT7BL fertilizadas fue significativamente menor que en las plantas CS, aunque en este parámetro se midió un pequeño aumento en respuesta a la fertilización (**Figura 7 D**). Estos resultados evidencian un uso ineficiente del nitrógeno al encontrarse en alta disponibilidad, debido probablemente a una deficiencia en la removilización del nitrógeno incorporado en el periodo pre-antesis, ya que no se encontraron diferencias entre las líneas en la concentración de azúcares en las hojas banderas ni en la cantidad exportada a partir de

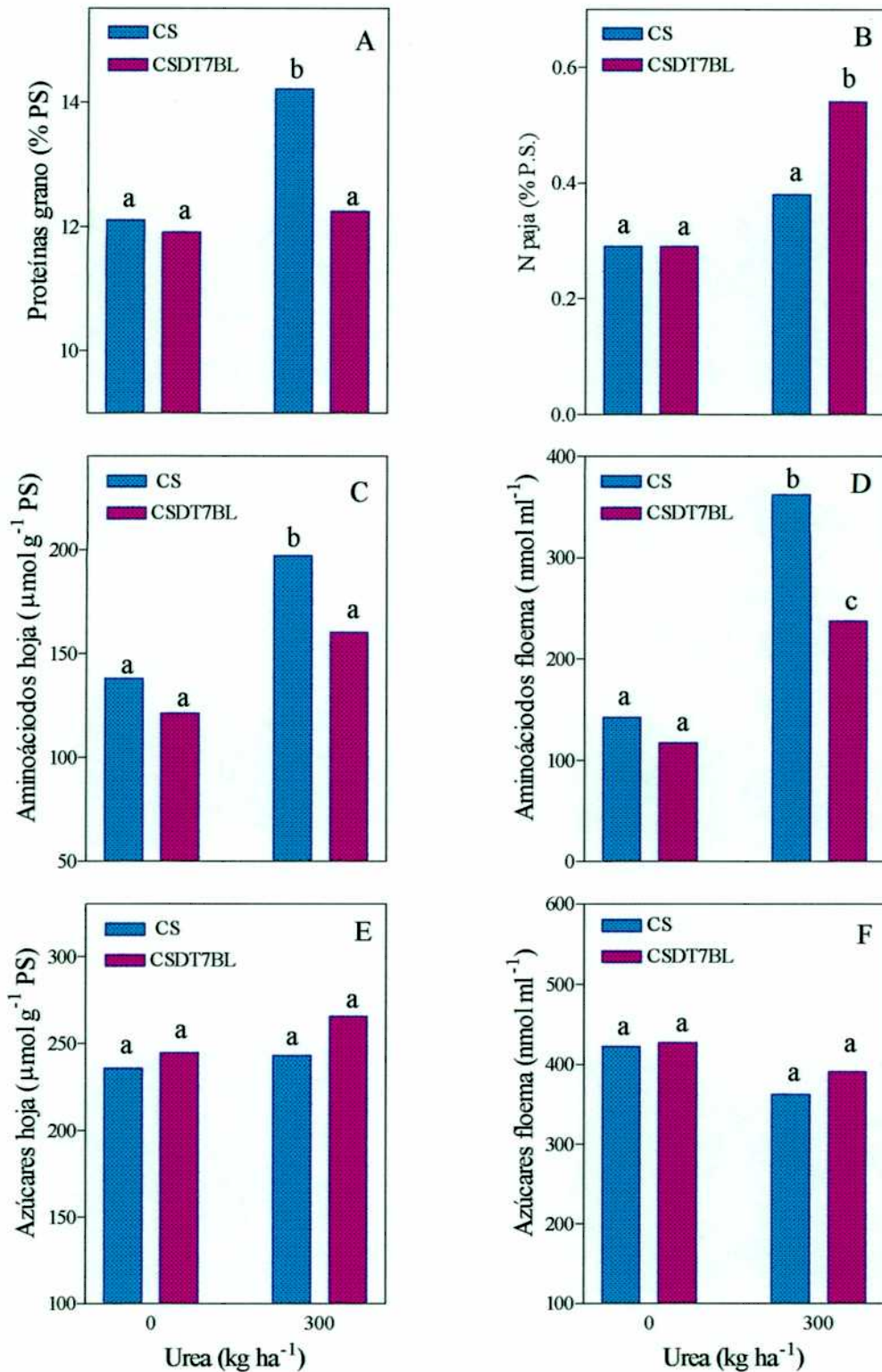
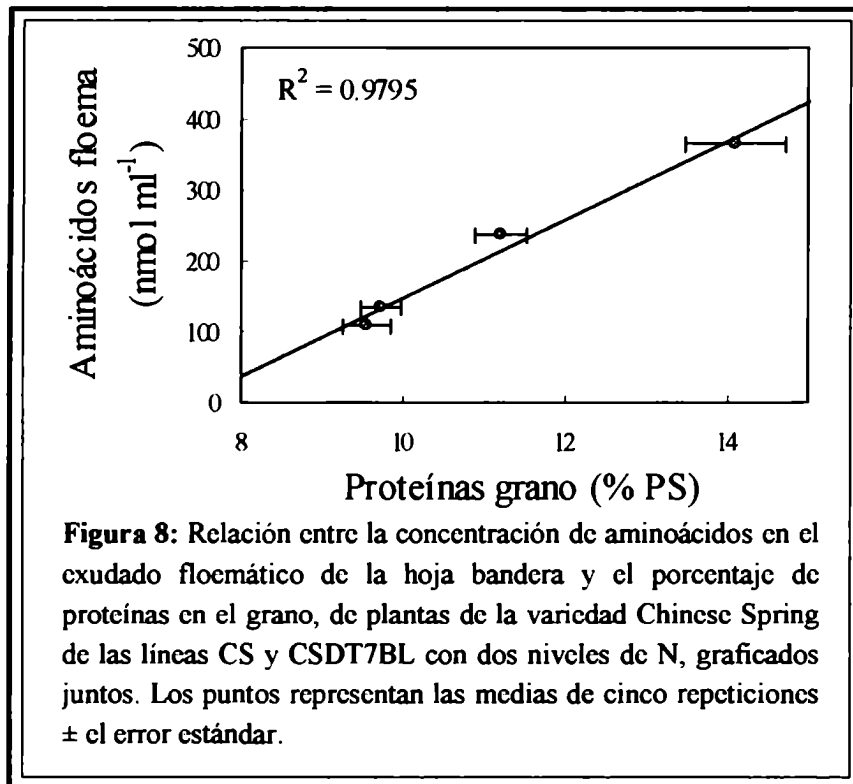


Figura 7: Efecto de la disponibilidad de N en plantas de la variedad Chinese Spring (CS) y su línea ditelosómica CSDT7BL, cultivadas a campo con 300 kg ha⁻¹ de urea o sin fertilización. Las barras representan las medias de cinco repeticiones y las letras indican diferencias significativas al 95%.

estas (**Figura 7 F**), permitiéndonos descartar la posibilidad que las diferencias encontradas entre las líneas provengan de una menor disponibilidad de carbono o de una disminución en el flujo del floema.

Por otro lado, se observó una correlación positiva ($R^2=0.98$) entre la concentración de aminoácidos en el exudado floemático de la hoja bandera y el contenido proteico del grano, al graficar las medias obtenidas de ambas líneas para cada tratamiento (**Figura 8**), que sugiere que la menor concentración de proteínas acumuladas en el grano maduro de la línea CSDT7BL podría ser explicada por una deficiencia en el transporte de aminoácidos por el floema, que permite suponer algún tipo de dependencia de la acumulación de N en el grano con la cantidad de aminoácidos que son exportados desde la hoja bandera.



A partir de estos resultados se decidió comenzar el estudio de la regulación de la exportación de aminoácidos al floema como una forma de comprender mejor la acumulación de N en el grano. En los capítulos siguientes se exponen una serie de ensayos que se llevaron a cabo en condiciones controladas en cámara de cultivo con plantas creciendo en estado vegetativo. Con este fin se utilizaron variedades comerciales de trigo, ya que la variedad Chinese Spring, por ser una variedad no comercial presenta algunos problemas de practicidad en el manejo.

Efecto de la Disponibilidad de Nitrógeno sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema

Como ya se expuso en la introducción, tanto en cebada (Winter *et al.*, 1992) como en espinaca (Riens *et al.*, 1991), se encontró una concentración y composición de aminoácidos en el floema similar a la de la concentración de aminoácidos libres en las hojas. Ésta última, muestran una gran respuesta a los cambios en la disponibilidad de N (Barneix *et al.*, 1984), variando ampliamente con diferentes regímenes y fuentes de este nutriente (Haynes & Goh, 1978; Darral & Waregin, 1981; Barneix *et al.*, 1984). Por lo tanto la concentración de aminoácidos y amidas en el floema también ha sido relacionada con la regulación de varios procesos del metabolismo del N y de la absorción y asimilación del nitrato (Touraine *et al.*, 1994; Barneix & Causin, 1996). Sin embargo la forma en que está regulada la exportación de aminoácidos al floema, tanto como su relación con la concentración de aminoácidos en las hojas no está aún dilucidada completamente.

Con el fin de evaluar la variación en la concentración de los principales metabolitos transportados por floema ante variaciones en la disponibilidad de N y su relación con la concentración y composición de aminoácidos en las hojas, se estudió el crecimiento vegetativo de plantas de trigo de la variedad Klein Chamaco, cultivadas en cámara de cultivo con distintas disponibilidades de N, cubriendo un amplio rango de concentraciones, desde un suplemento altamente insuficiente hasta una cantidad supraóptima. Como así también se evaluó la respuesta obtenida al suspender o al adicionar la fuente nitrogenada en plantas bien suplementadas en el primer caso y deficientes en el segundo.

Exportación de Aminoácidos al Floema en Plantas cultivadas con Distintas Disponibilidades de Nitrógeno

En este ensayo, con el objeto de comprender la influencia de la disponibilidad de N sobre la exportación de aminoácidos al floema, se cultivaron las plantas suplementadas con una solución nutritiva conteniendo distintas concentraciones de N (1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0 o 20.0 mM KNO₃).

A los 15 días de iniciado el tratamiento se coleccionaron los exudados floemáticos de 8 hojas por muestra, las hojas utilizadas para la obtención de los exudados y los vástagos de cada maceta, que fueron almacenados para la determinación de la concentración de aminoácidos y azúcares de los exudados y de los hojas, como así también para la determinación del contenido de nitrógeno y de nitratos de los vástagos.

Las plantas cultivadas con concentraciones menores a 5 mM de KNO_3 mostraron una limitación al crecimiento del vástago y a la acumulación de nitrógeno total, mientras que a todas las concentraciones superiores de N en el medio, estos parámetros no mostraron diferencias significativas entre sí (**Figura 9 A, B**). La concentración de nitrógeno se vio altamente reducida con el menor suministro, confirmando que se trataba de plantas con deficiencia de dicho nutriente (**Figura 9 C**), en cambio, la concentración de nitrato en los tejidos no aumentó hasta que la concentración en la solución nutritiva no superó los 5 mM, indicando un ritmo alto de reducción del nitrato que solo permite que se acumule en los tejidos cuando la demanda de N de la planta se ve satisfecha (**Figura 9 D**).

La concentración de aminoácidos en los tejidos de las hojas también se encontró limitada cuando el suministro de nitrógeno fue menor a 5 mM, mientras que por encima de esta concentración se alcanzó una meseta (**Figura 10 A**). En cambio, la cantidad de aminoácidos exudados desde el floema aumentó linealmente hasta una concentración de 10 mM, sin incremento posterior (**Figura 10 B**).

La concentración de azúcares en los tejidos de las hojas no se vio afectada por el suministro de N, salvo en el caso de las plantas con el crecimiento limitado por este nutriente (1 y 3 mM), donde la cantidad de fotoasimilados sintetizados sobrepasó la cantidad necesaria para sustentar el RGR establecido, generando en consecuencia una alta concentración de azúcares en los tejidos fuente (**Figura 10 C**). Sin embargo la concentración de azúcares en el exudado floemático no se vio afectada con ninguno de los distintos niveles de suministro de nitrógeno (**Figura 10 D**).

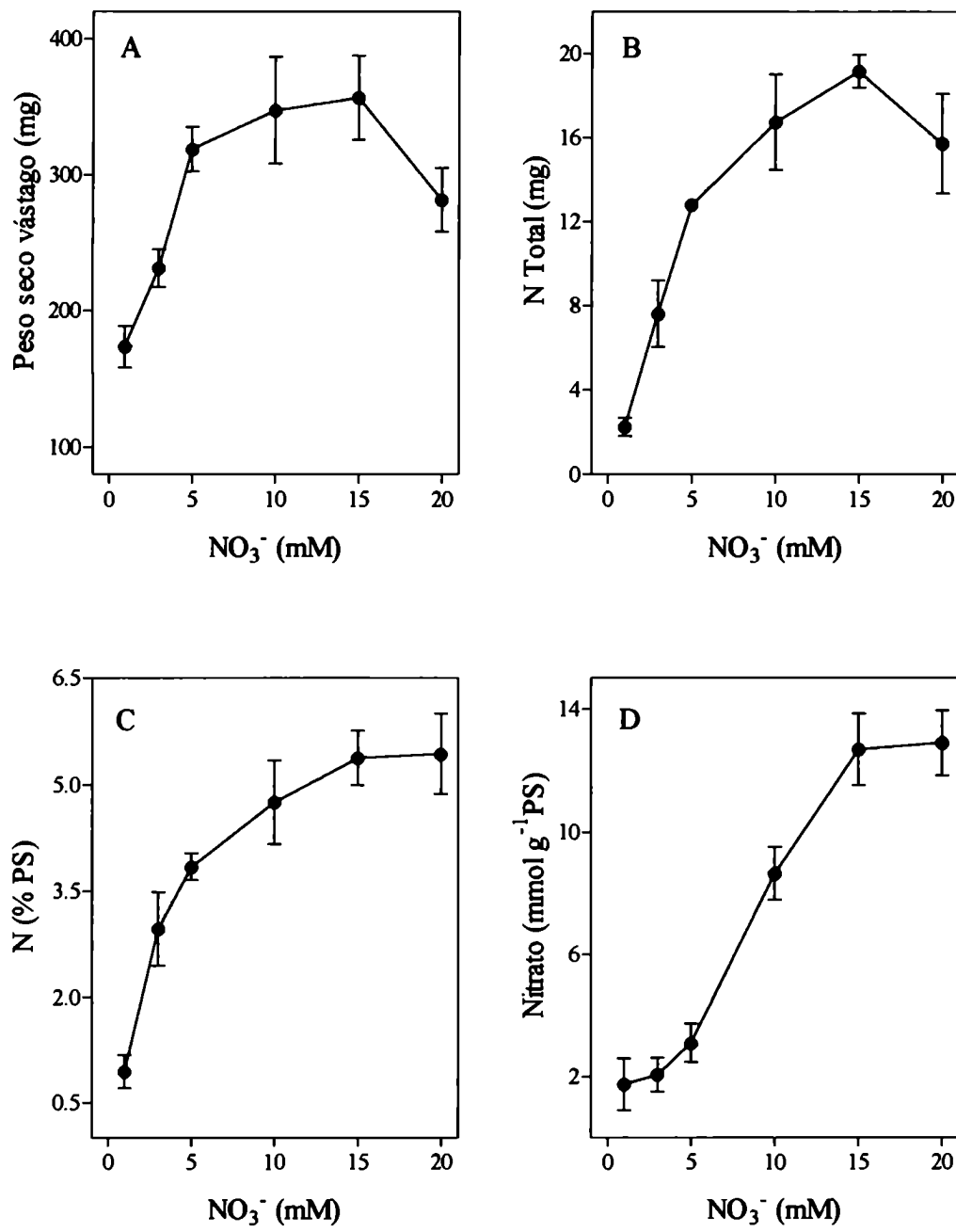


Figura 9: Efecto de la disponibilidad de N sobre plantas cultivadas por 15 días con solución nutritiva conteniendo distintas concentraciones de NO_3^- . Los puntos representan las medias de cuatro repeticiones \pm el error estandar.

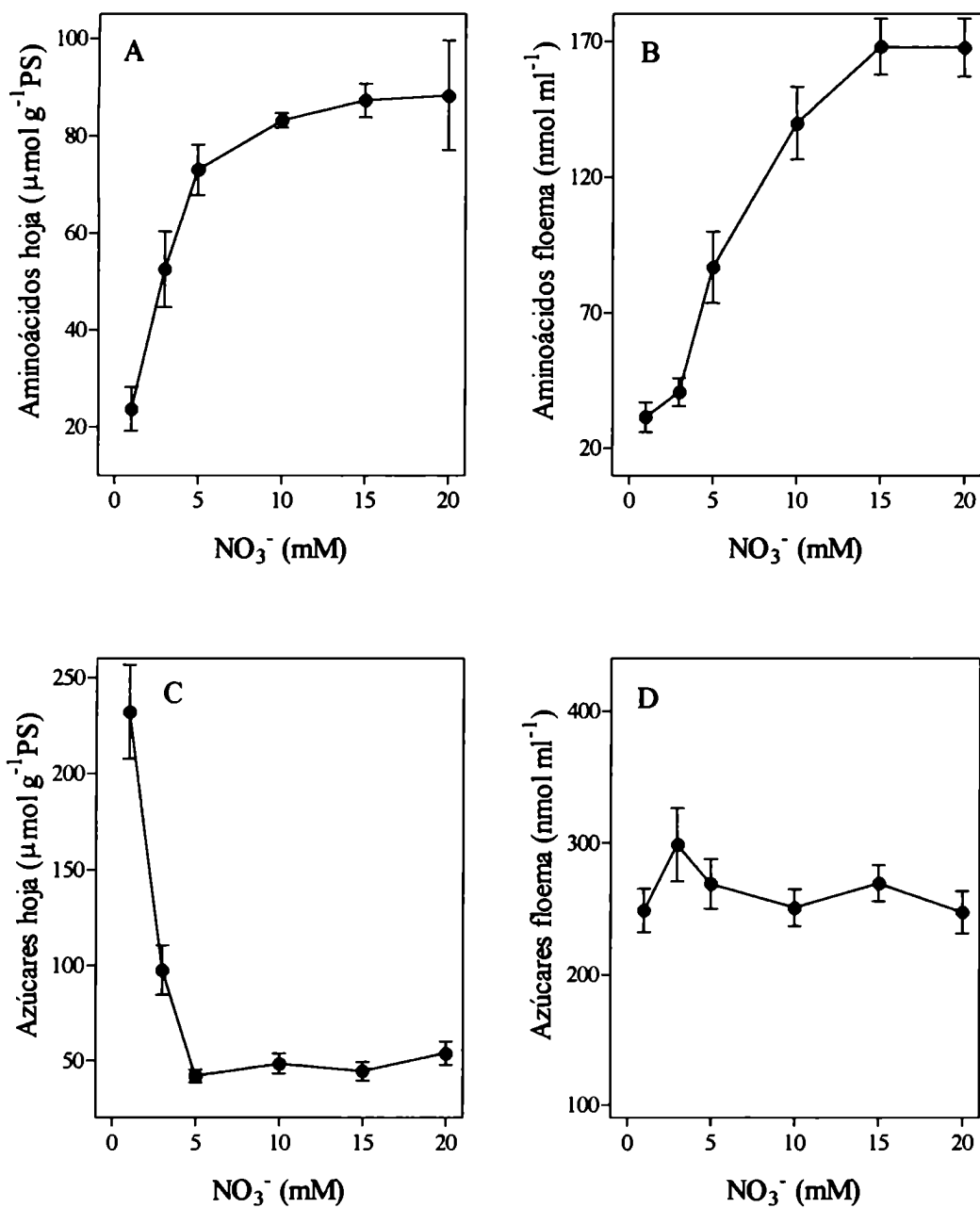


Figura 10: Efecto de la disponibilidad de N sobre plantas cultivadas por 15 días con solución nutritiva conteniendo distintas concentraciones de NO_3^- . Los puntos representan las medias de cuatro repeticiones \pm el error estandar.

Composición de Aminoácidos en Hojas y Exudados Floemáticos de Plantas Cultivadas con Dos Concentraciones Diferentes de Nitrógeno

Este ensayo fue llevado a cabo para determinar si los cambios ocurridos en la concentración de aminoácidos frente a los distintos suministros de nitrógeno, tanto en la solución de exudación del floema como en las hojas, era debido a un aumento indiscriminado de la concentración del total de los aminoácidos o a un aumento de solo ciertos aminoácidos, y en este caso, saber cuales eran los que respondían al tratamiento.

Para esto se cultivaron durante quince días las plantas en las mismas condiciones que en el experimento anterior, fertilizándolas diariamente con solución nutritiva conteniendo 15.0 o 1.0 mM de KNO₃. Para realizar las determinaciones de aminoácidos individuales por HPLC es necesaria una cantidad total de estos metabolitos superior a la usualmente obtenida a partir de 8 hojas, por lo que se recolectó el producto de exudación de 16 hojas, y por lo tanto en este caso cada unidad de muestreo estuvo formada por dos macetas con cuatro plantas cada una.

Las plantas cultivadas con un suministro de 1 mM de KNO₃ presentaron una composición de aminoácidos en los tejidos de las hojas donde los más abundantes fueron: Ala el 19.8 %, Asp el 19.2 %, Ser el 16.0 %, Glu el 15.4 % y Phe el 9.0 %, con el resto de los aminoácidos sumando solo el 20 % restante (**Tabla 4**). Mientras que las plantas que recibieron 15.0 mM de KNO₃ mostraron una concentración de aminoácidos cuatro veces superior a las cultivadas con 1 mM, además de una proporción diferente de los aminoácidos más abundantes, pasando a representar: Asp el 27.2 %, Glu el 20.9 % y Ala el 19.0 % del total de los aminoácidos. Al mismo tiempo se observó una disminución en la cantidad relativa de serina y fenilalanina (**Tabla 4**).

En los exudados floemáticos, en cambio, el alto suministro de nitrógeno solo rindió un aumento de tres veces con respecto a las plantas deficientes (**Tabla 5**), siendo los aminoácidos más abundantes en ambos tratamientos Glu (28.3 y 26.6 %), Ser (15.7 y 17.3 %) y Asp (13.5 y 16.6 %) con 1 y 15 mM respectivamente, que tomándolos juntos representan aproximadamente el 60 % del total de los aminoácidos exudados. Algunos aminoácidos como Tyr, Gly, Pro, Val, Phe, Ile y Leu mostraron una alta abundancia relativa en las plantas con bajo nitrógeno con respecto a las bien provistas, por el contrario Thr, Arg y Gln, mostraron lo opuesto (**Tabla 5**).

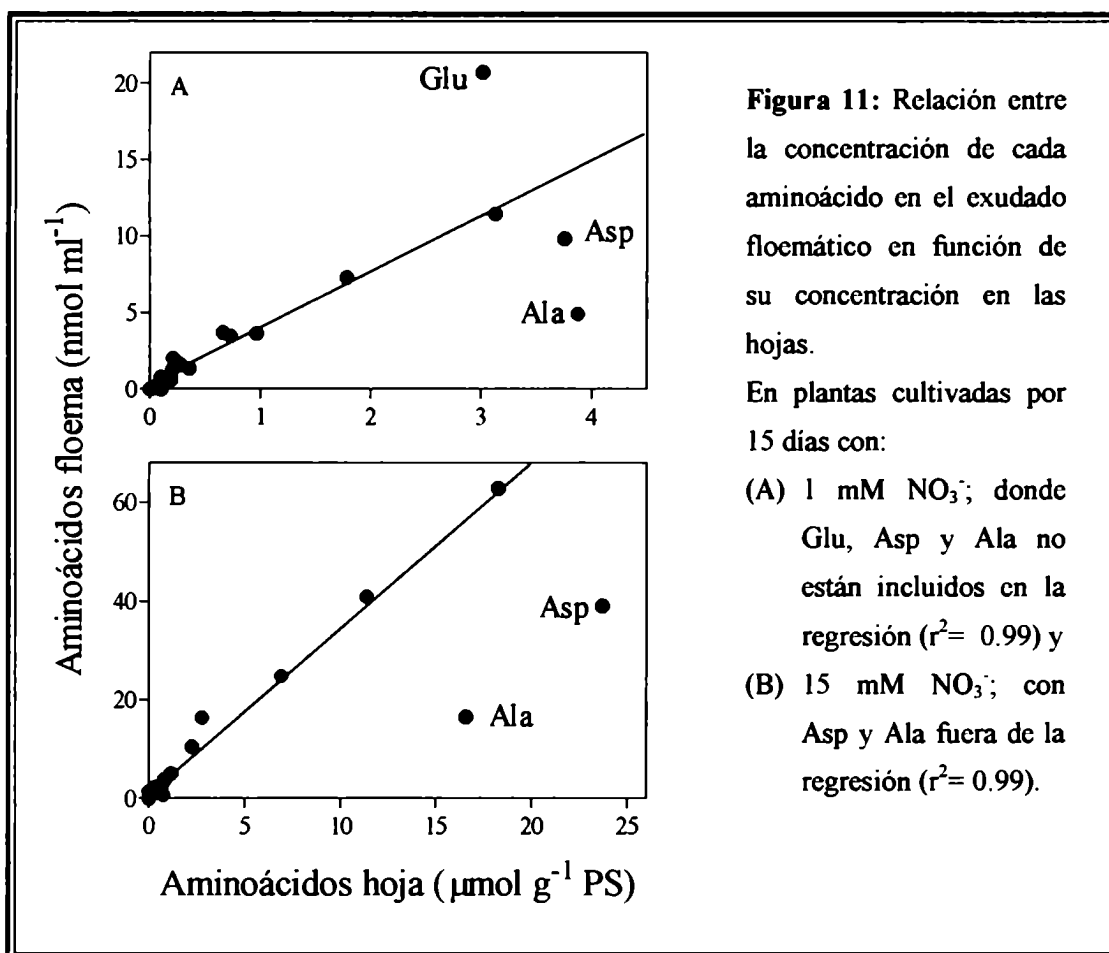
Aminoácido	1.0 mM NO ₃ ⁻		15 mM NO ₃ ⁻	
	μmol g ⁻¹	% del Total	μmol g ⁻¹	% del Total
Ala	3.88 ± 0.41	19.83	16.57 ± 0.90	19.00
Arg	0.11 ± 0.05	0.56	0.35 ± 0.14	0.40
Asn	0.10 ± 0.01	0.52	0.82 ± 0.05	0.94
Asp	3.76 ± 0.34	19.21	23.73 ± 1.38	27.23
Cys-Cys	N.D.	0	0.05 ± 0.01	0.62
Gln	0.97 ± 0.23	4.94	6.94 ± 0.99	7.96
Glu	3.01 ± 0.22	15.40	18.24 ± 0.21	20.93
Gly	0.20 ± 0.05	1.04	0.69 ± 0.05	0.79
His	N.D.	0	N.D.	0
Ile	0.21 ± 0.02	1.06	0.34 ± 0.04	0.39
Lcu	0.27 ± 0.02	1.39	0.60 ± 0.03	0.68
Lys	0.36 ± 0.06	1.82	0.42 ± 0.02	0.48
Met	0.04 ± 0.00	0.23	0.04 ± 0.00	0.05
Phe	1.79 ± 0.30	9.15	2.26 ± 0.19	2.59
Pro	0.19 ± 0.08	0.98	0.75 ± 0.20	0.86
Ser	3.13 ± 0.31	15.97	11.38 ± 0.29	13.06
Thr	0.73 ± 0.139	3.75	2.78 ± 0.05	3.19
Trp	0.05 ± 0.04	0.25	0.04 ± 0.00	0.043
Tyr	0.10 ± 0.04	0.51	N.D.	0
Val	0.66 ± 0.09	3.38	1.16 ± 0.07	1.34
TOTAL	18.61	100	80.22	100

Tabla 4: Composición de aminoácidos en hojas totalmente expandidas de plantas de trigo cultivadas por 15 días con solución nutritiva conteniendo, 1 o 15 mM de KNO₃. Los valores representan las medias de tres repeticiones ± el error estándar. N.D., no detectado.

Aminoácido	1.0 mM NO ₃ K		15 mM NO ₃ K	
	nmol ml ⁻¹	% del Total	nmol ml ⁻¹	% del Total
Ala	4.9 ± 0.96	6.70	16.5 ± 1.17	6.98
Arg	0.21 ± 0.17	0.29	1.81 ± 0.26	0.77
Asn	N.D.	0.0	3.81 ± 0.87	1.61
Asp	9.82 ± 0.81	13.46	39.13 ± 3.5	16.55
Cys-Cys	N.D.	0	0.92 ± 0.17	0.39
Gln	3.63 ± 0.29	4.97	24.8 ± 6.80	10.50
Glu	20.71 ± 2.57	28.34	62.8 ± 6.15	26.57
Gly	1.28 ± 0.25	1.75	2.87 ± 1.03	1.22
His	N.D.	0	N.D.	0
Ile	2.02 ± 0.4	2.76	2.31 ± 0.53	0.98
Leu	1.64 ± 0.20	2.24	2.63 ± 0.52	1.11
Lys	1.356 ± 0.25	1.85	1.73 ± 0.48	0.73
Met	0.15 ± 0.12	0.21	1.27 ± 0.05	0.54
Phe	7.27 ± 0.34	9.94	10.53 ± 0.50	4.46
Pro	0.60 ± 0.49	0.82	0.79 ± 0.34	0.33
Ser	11.46 ± 1.14	15.68	40.95 ± 2.49	17.32
Thr	3.47 ± 0.78	4.75	16.38 ± 0.65	6.93
Trp	0.10 ± 0.08	0.14	0.63 ± 0.13	0.27
Tyr	0.77 ± 0.07	1.06	1.39 ± 0.30	0.59
Val	3.71 ± 0.85	5.07	5.12 ± 0.53	2.17
TOTAL	69.46	100	211.60	100

Tabla 5: Composición de aminoácidos en la solución de exudación floemática de 16 hojas totalmente expandidas de plantas de trigo cultivadas por 15 días con solución nutritiva conteniendo, 1 o 15 mM de KNO₃. Los valores representan las medias de tres repeticiones ± el error estándar. N.D., no detectado.

En cada tratamiento, la relación entre la concentración de cada aminoácido en las hojas y en los exudados floemáticos mostró una relación lineal (Figura 11 A, B). Con la excepción de la concentración del ácido glutámico en el exudado floemático de las plantas cultivadas con 1.0 mM que fue mayor a la esperada por su concentración en los tejidos de las hojas (Figura 11 A), y de Asp y Ala que mostraron una concentración menor a la esperada en ambos tratamientos (Figura 11 A, B).



Efectos del Hambreado de Nitrógeno sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema

Dado que en el primer experimento se observó una dependencia de la cantidad de aminoácidos exportada al floema con la disponibilidad de nitrógeno en el medio de crecimiento, se emprendió un ensayo donde se analizó el efecto de la eliminación de la fuente nitrogenada sobre la de exportación de aminoácidos al floema.

Por lo tanto se cultivaron las plantas con una fertilización nitrogenada de 15.0 mM KNO₃. Cuando las plantas cumplieron los quince días se eliminó el nitrógeno de la solución de riego (día 0) y se permitió que continuaran su crecimiento por siete días más. Durante este período se realizaron muestreos diarios de los vástagos, los exudados floemáticos de 8 hojas y las hojas, para realizar las determinaciones anteriormente nombradas.

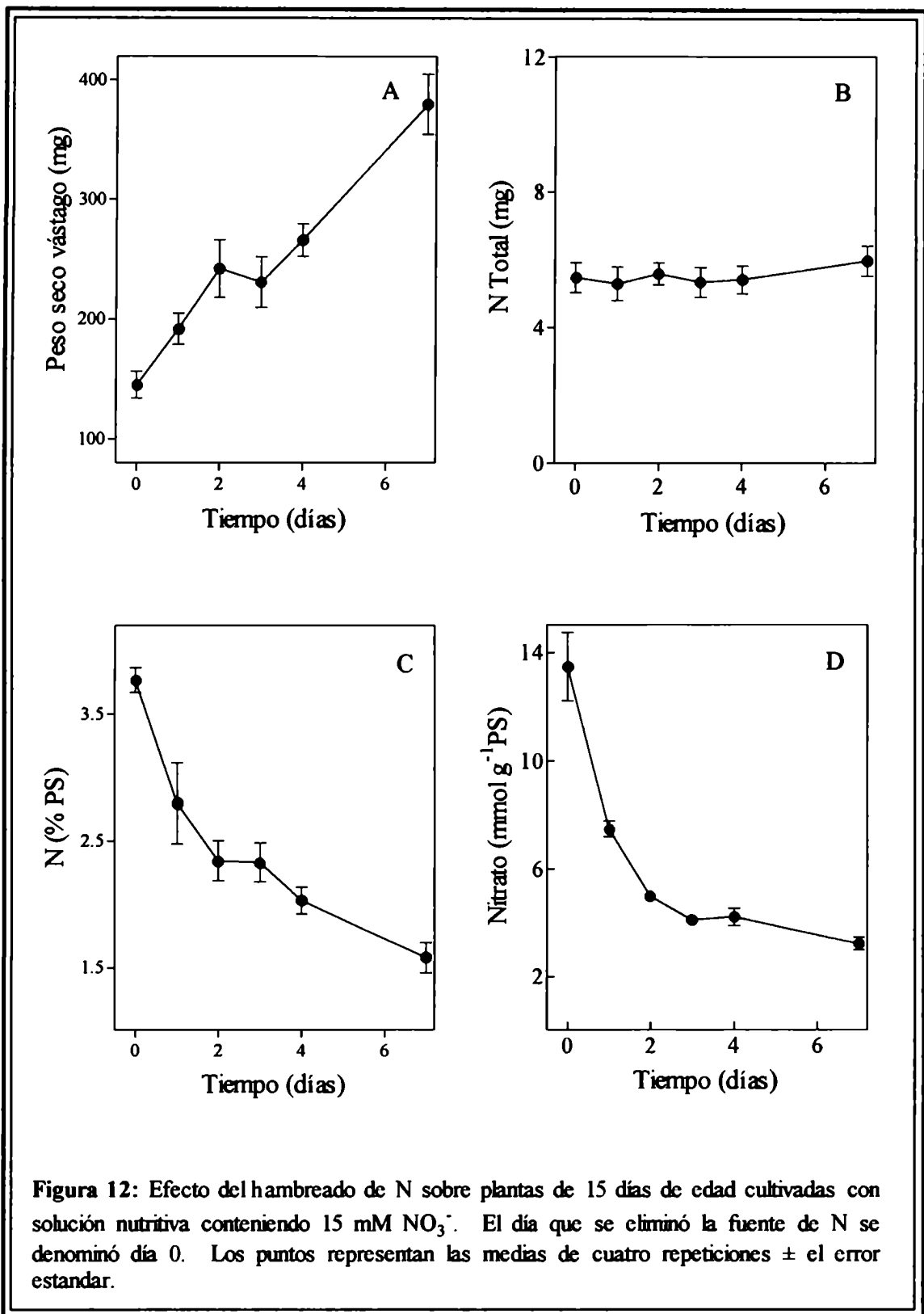
Cuando las plantas que crecían en condiciones óptimas de nitrógeno sufrieron un hambreado del mismo de la solución nutritiva, el contenido total de nitrógeno de las plantas, permaneció constante en función del tiempo (**Figura 12 B**). A pesar de este hecho, el crecimiento del vástago continuó por los 7 días ensayados (**Figura 12 A**). Como consecuencia, se observó una disminución continua de la concentración de nitrógeno total (**Figura 12 C**).

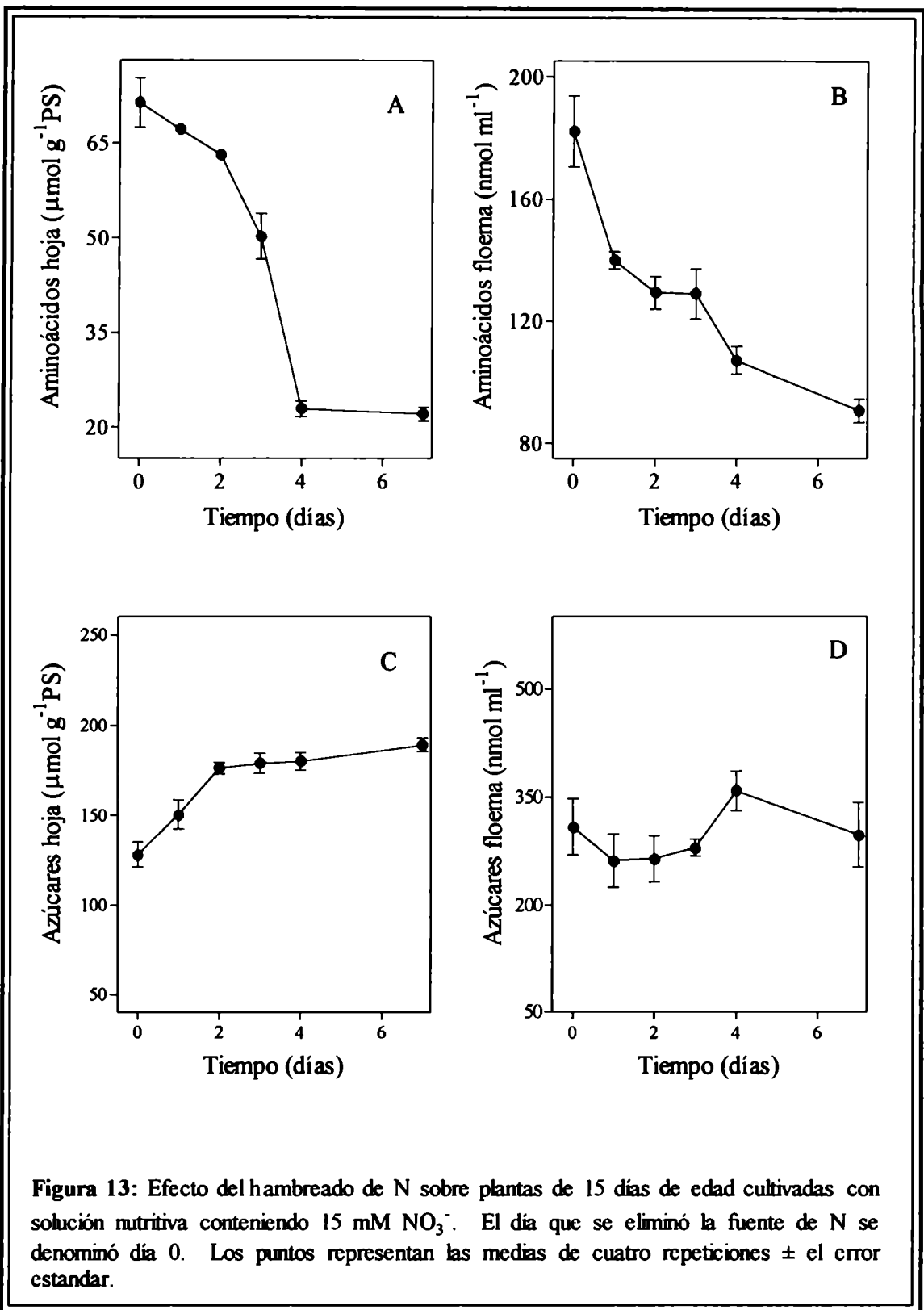
La concentración de nitrato en los tejidos disminuyó durante los primeros días y luego permaneció constante en un nivel bajo (**Figura 12 D**), mientras que la concentración de aminoácidos en los tejidos de las hojas disminuyó rápidamente solo a partir del segundo día (**Figura 13 A**). Por el contrario, los aminoácidos en el exudado floemático disminuyeron rápidamente durante el primer día y luego lentamente hasta el séptimo día. (**Figura 13 B**).

La concentración de azúcares solubles en las hojas aumentó durante los primeros dos días, probablemente como consecuencia de una disminución en el ritmo de crecimiento relativo (**Figura 13 C**), pero en los exudados floemáticos la concentración de azúcares no fue afectada (**Figura 13 D**).

Relación entre la formación del Pool de Aminoácidos en las hojas y la exportación de Aminoácidos al Floema

En este último ensayo, se analizó la habilidad de recuperación de las plantas deficientes en nitrógeno luego del agregado del mismo a la solución nutritiva, y se estudio la formación del *pool* de aminoácidos libres en las hojas y su relación con los cambios en la exportación al floema.





Debido a que en condiciones de deficiencia de N el RGR es mucho menor, y por lo tanto el material obtenido por planta es menor e insuficiente para realizar los análisis posteriores, se cultivaron 8 plantas por maceta y se utilizaron 16 hojas por muestra para la obtención de exudados floemáticos. Las plantas se cultivaron por 10 días con solución nutritiva sin nitrógeno, para lograr un consumo total de las reservas nitrogenadas provenientes de la semilla, sin llegar a la muerte de la planta. Al décimo día (día 0 del experimento) se comenzó la fertilización con 15 mM de KNO_3 en la solución nutritiva, y a diferentes tiempos a partir del día 0 se realizaron las mismas colecciones que en los ensayos anteriores.

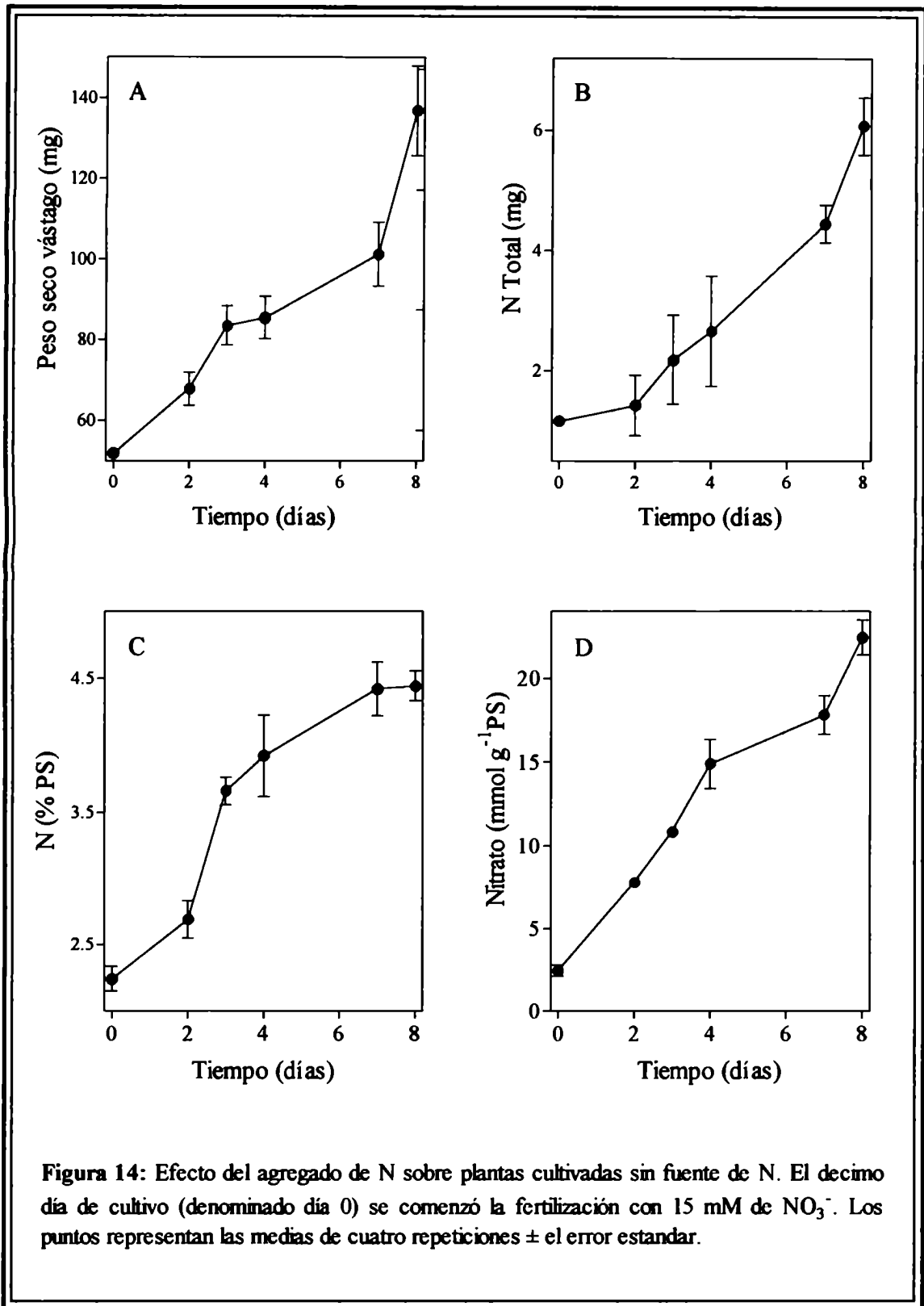
El peso seco del vástago fue en aumento a lo largo de todo el tiempo ensayado, durante los primeros siete días luego del agregado del N al medio, el aumento fue lineal mientras que desde el séptimo al octavo día el valor obtenido sobrepasó en gran medida a lo esperado en base a la pendiente anteriormente establecida (**Figura 14 A**). La acumulación de N del vástago aumentó siguiendo un comportamiento similar al peso de las plantas, pero sin embargo solo se observó un aumento a partir del segundo día (**Figura 14 B**), mientras que la concentración de N en los tejidos aumentó ampliamente durante los tres primeros días y alcanzó una meseta al séptimo día (**Figura 14 C**). La concentración de nitrato en los tejidos, en cambio aumentó linealmente desde el primer hasta el octavo día (**Figura 14 D**).

Los aminoácidos libres en las hojas también aumentaron lentamente durante los 8 días siguientes a la adición de NO_3^- a la solución de riego (**Figura 15 A**), en cambio la cantidad de aminoácidos exudados del floema aumento marcadamente durante los primeros días, sin aumento posterior detectable (**Figura 15 B**).

La concentración de azúcares solubles en las hojas disminuyó durante los dos primeros días luego de la adición de nitrógeno, mientras que los azúcares exudados del floema no se vieron modificados. (**Figura 15 C, D**).

Discusión

Los nutrientes, especialmente el N, ejercen un control estricto sobre el crecimiento y metabolismo de una planta y sus efectos han sido extensivamente estudiados y revisados (Rabe, 1993; Feller & Fisher, 1994; Fernandes & Rossiello, 1995; Ingestad & Ågren, 1995).



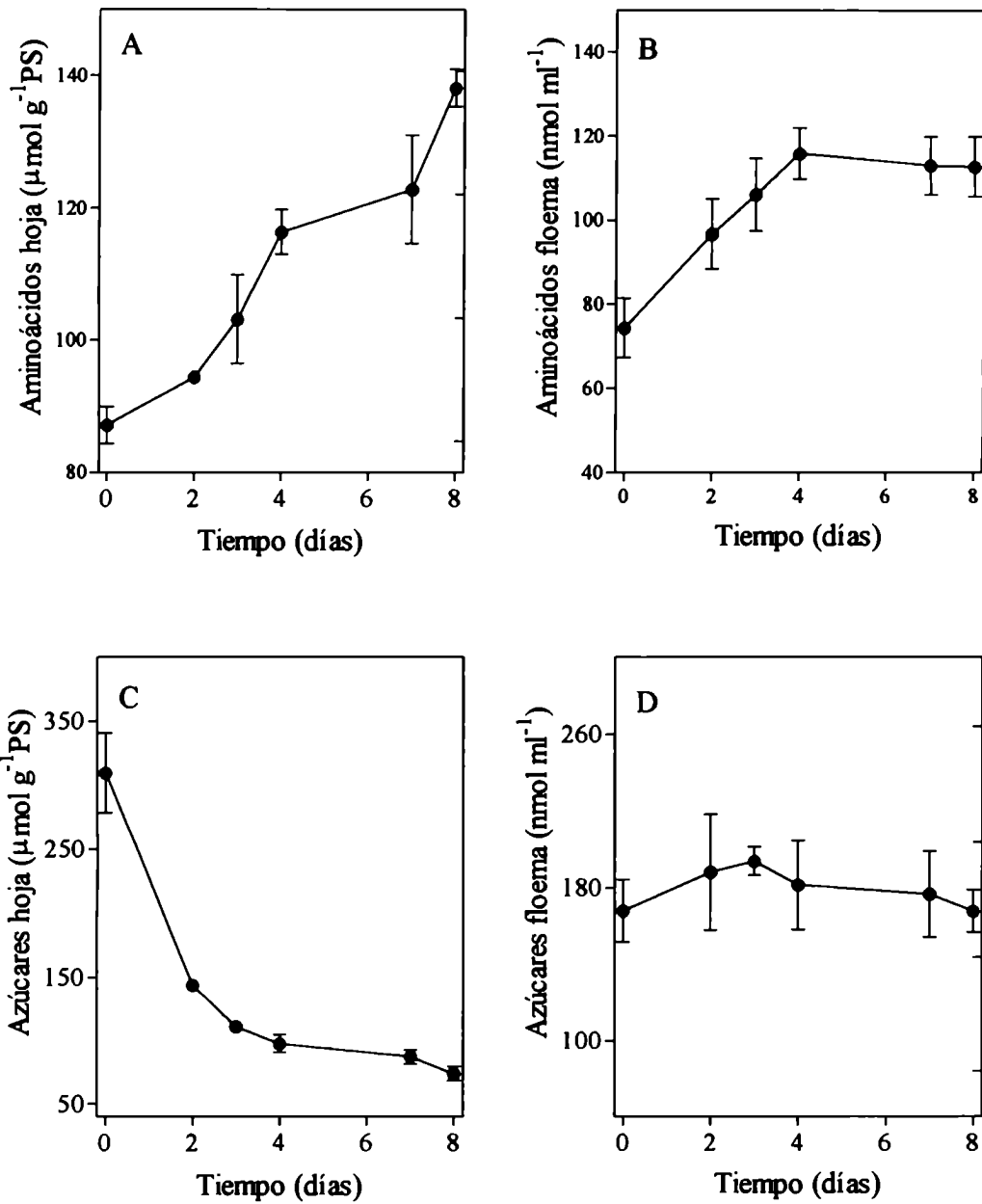


Figura 15: Efecto del agregado de N sobre plantas cultivadas sin fuente de N. El décimo día de cultivo (denominado día 0) se comenzó la fertilización con 15 mM de NO_3^- . Los puntos representan las medias de cuatro repeticiones \pm el error estándar.

En rasgos generales, nuestros resultados con los diferentes regímenes de nitrógeno, coinciden con la información disponible. Las plantas creciendo bajo condiciones limitantes de nitrógeno producen menor biomasa, acumulan menor contenido total de nitrógeno y muestran una concentración también menor de nitrógeno total, nitratos y aminoácidos libres que las plantas bien provistas (**Figuras 9 y 10**). Sin embargo, estos resultados también presentan alguna evidencia en lo concerniente a los cambios ocurridos con la exportación de aminoácidos al floema en respuesta a los cambios en el suministro de nitrógeno.

Los experimentos presentados indican que la tasa de exportación de azúcares al floema no se ve afectada por el suministro de nitrógeno, al menos en el rango ensayado, y es independiente de la concentración de azúcares en las hojas, en las cuales fue mayor cuando el crecimiento estuvo limitado y disminuyó cuando el crecimiento fue restablecido (**Figuras 10, 13 y 14 C, D**).

En cambio, la tasa de exportación de aminoácidos al floema, sí se vio altamente influenciada por el abastecimiento de nitrógeno, dado que en las plantas suplementadas con diferentes concentraciones de este nutriente, la concentración de aminoácidos en la solución de exudación aumentó en función de la concentración de NO_3^- en el medio, hasta alcanzar una meseta a partir de 10 mM N (**Figuras 10 B**). Cuando se suministró N a las plantas que habían sido cultivadas en ausencia del mismo, los aminoácidos en el exudado floemático aumentaron en forma más rápida que en las hojas, mostrando una respuesta rápida y sensible al cambio en las condiciones de crecimiento (**Figura 15 B**). Una similar sensibilidad de respuesta también se observó al eliminar el N del medio de crecimiento de plantas cultivadas en condiciones óptimas de dicho nutriente, ya que la exportación de aminoácidos disminuyó con más rapidez durante los primeros días, cuando la de las hojas permaneció constante (**Figura 13 B**).

De la **Figura 16 (A-C)** se desprende que la cantidad de aminoácidos exportada al floema no dependería directamente de la concentración del total de los aminoácidos libres en las hojas, sugiriendo un control de la exportación por medio de la compartimentalización de estos, en al menos dos *pools*,

Un *pool* exportable que suministra los aminoácidos exportados al floema, y que depende de la absorción de nitrógeno, y un *pool* de almacenamiento menos sensible, donde los aminoácidos se acumulan cuando el nitrógeno no es limitante (**Figura 10 A**), y se vacía lentamente cuando el *pool* de exportación se encuentra agotado (**Figura 13**

A), y finalmente es llenado nuevamente en forma lenta cuando se restablece el equilibrio (**Figura 15 A**).

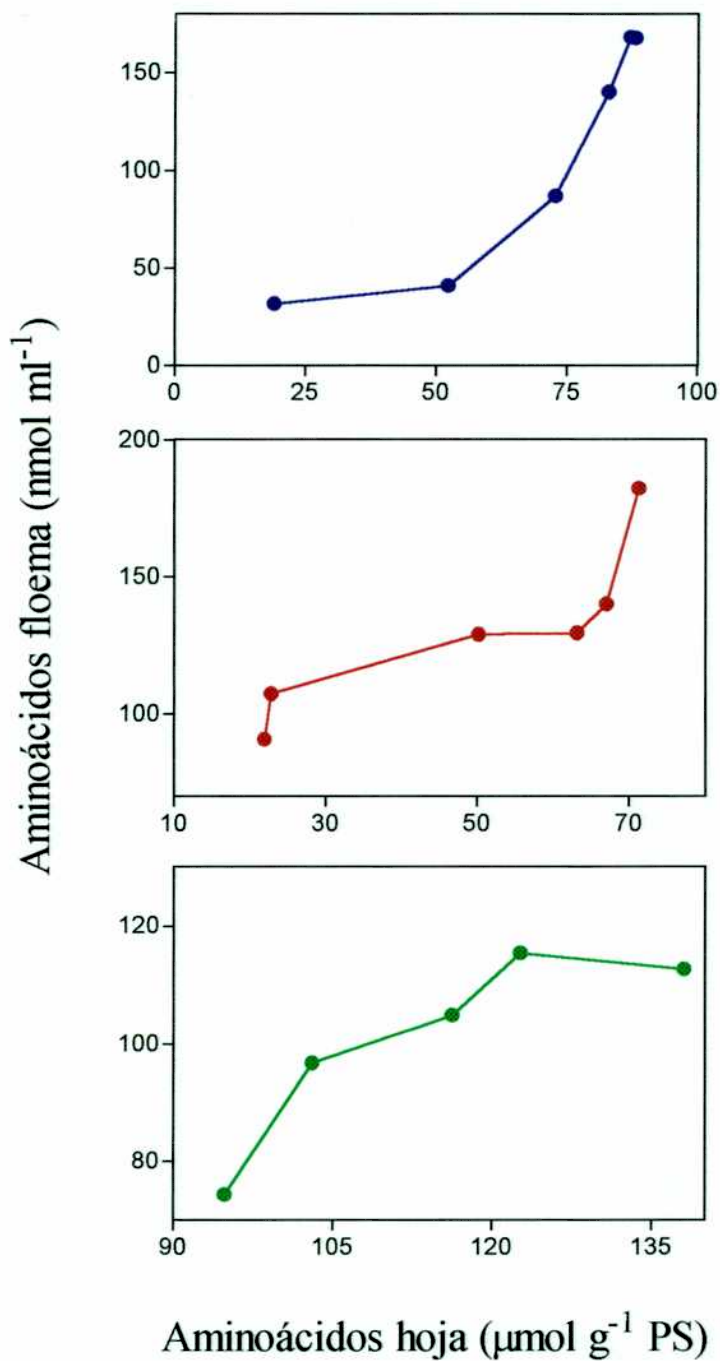


Figura 16: Relación entre la concentración de aminoácidos en las hojas y sus exudados floemáticos en (A) Primer ensayo, plantas cultivadas por 15 días con distintas concentraciones de N; (B) Segundo ensayo, plantas cultivadas con 15 mM NO_3^- a las que se les eliminó la fuente de N y (C) Tercer ensayo, plantas cultivadas en ausencia de nitrógeno a las que se comenzó a fertilizar con 15 mM NO_3^- .

Lohaus & Heldt (1997) registraron un aumento de la misma magnitud en la concentración de aminoácidos en el apoplasto, en el floema y en el citosol al fumigar las plantas con NH₃. De donde concluyeron que en el citosol se encuentra el *pool* exportable de aminoácidos y sugirieron que su concentración determina la cantidad de aminoácidos factibles de ser exportados.

En condiciones supraóptimas de N, la tasa de exportación al floema es superior a la necesaria para sustentar el crecimiento, por lo que es factible suponer que la proporción que es exportada en exceso, es la primera que se elimina del floema al eliminarse el N, causando la súbita disminución observada, mientras que si la deficiencia continúa por más tiempo la tasa de exportación es mantenida en medida de lo posible a costa de la removilización de los aminoácidos almacenados en las hojas. El comportamiento inverso se observa en el caso de las plantas cultivadas en condiciones subóptimas de N. La cantidad de aminoácidos circulantes por el floema aumenta rápidamente solo hasta alcanzar la concentración mínima capaz de sustentar el nuevo RGR, y luego la prioridad cambia hacia la formación de un *pool* de aminoácidos libres en las hojas, como se puede suponer del aumento gradual y tardío de la concentración de aminoácidos en las hojas.

La composición de aminoácidos en el floema difiere entre especies y nuestros resultados mayormente coinciden con los datos previos obtenidos tanto con trigo (Hayashi & Chino, 1986) como con especies no - leguminosas (ver pagina 22 introducción), siendo en nuestro caso también el ácido glutámico el aminoácido más abundante tanto con bajo como alto N, mientras que el resto de los aminoácidos cambiaron su proporción relativa de acuerdo al suministro de nitrógeno. En las hojas la concentración de aminoácido también se vio afectada por el suministro de N, al igual que la composición, ya que solo con alto N, el ácido aspártico fue el aminoácido más abundante seguido por Ala y Glu, mientras que los tres alcanzaron una proporción relativa similar con bajo N. Estos tres aminoácidos alcanzan a sumar el 60 % del total en las hojas banderas de trigo durante la senescencia natural (Peeters & Van Laere, 1994)

Aunque la concentración de la mayoría de los aminoácidos individuales en el floema es proporcional a su concentración en las hojas, algunos aminoácidos son favorecidos o discriminados en su transporte al floema. El ácido glutámico fue exportado en una concentración mayor a la esperada por su concentración en las hojas

cuando el suministro era bajo, mientras que la alanina y el ácido aspártico fueron exportados en menor proporción en ambos tratamientos (**Figura 11**). Otros autores también han observado que algunos aminoácidos son transportados preferencialmente, mientras que el transporte se encuentra restringido para algunos otros (Riens *et al.*, 1991; Weiner *et al.*, 1991; Lohaus *et al.*, 1994).

En conclusión, los resultados de estos experimentos indican que la tasa de exportación de azúcares al floema es independiente del estatus de nitrógeno de la planta, mientras que la de aminoácidos muy probablemente dependa de la concentración del nitrógeno recientemente absorbido y reducido en el compartimento citoplasmático y no dependa, por lo menos directamente, del total de aminoácidos libres en las hojas, que si bien incrementa con la disponibilidad de nitrógeno, es vaciado lentamente luego de una deficiencia, mientras que la exportación de aminoácidos al floema decae rápidamente.

Relación entre la Exportación de Aminoácidos y de Azúcares al Floema

Un problema central de la fisiología vegetal es explicar como el crecimiento y la productividad de la planta dependen de su metabolismo y del entorno. Para esto es importante considerar la habilidad de la planta de producir fotoasimilados (C) y compuestos nitrogenados, esenciales para el crecimiento, que ampliamente determinan hasta donde puede ser explotado el potencial genético.

La asimilación de N está cercanamente relacionada con el metabolismo del carbono a través de la incorporación y la reducción del nitrato y su subsecuente producción de aminoácidos y proteínas ya que todos estos procesos requieren el suplemento de C (Heilmeyer & Monson, 1994). Mientras que durante el desarrollo la planta necesita el suplemento de N para sintetizar los componentes claves del aparato fotosintético. Los factores que probablemente afectan en mayor medida el tamaño de los reservorios de C y N en los tejidos son los cambios ambientales y en especial la disponibilidad de estos nutrientes. Sin embargo dado que el intercambio de C y N entre los sistemas de transporte y con los tejidos es diferente, la relación N/C establecida en cada compartimento es distinta, y varía también con las especies (Rooney, 1994).

Durante el llenado del grano de trigo se obtuvieron resultados de la removilización de N desde las hojas que sugieren la existencia de una relación entre la cantidad de azúcares y aminoácidos transportados hacia la espiga estableciendo una relación N/C que limitaría el contenido de proteínas en el grano por unidad de peso seco (Barneix *et al.*, 1992). Además Winter y colaboradores (1992) sugirieron que la exportación al floema de aminoácidos podría estar regulada por el metabolismo o el transporte de sacarosa. Sin embargo, en la serie de ensayos anteriormente expuestos no obtuvimos evidencias que indiquen que la exportación de aminoácidos esté influenciada por el flujo de sacarosa al floema, sino que probablemente depende de la disponibilidad de aminoácidos en el citosol, generados a partir de la reducción del N recientemente absorbido.

Con el objetivo de verificar el requerimiento de la exportación de azúcares al floema para estimular la exportación de aminoácidos, se emprendieron experimentos con plantas de la variedad pro-INTA Isla Verde en estado de crecimiento vegetativo.

Efecto de la Intensidad Lumínica sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema

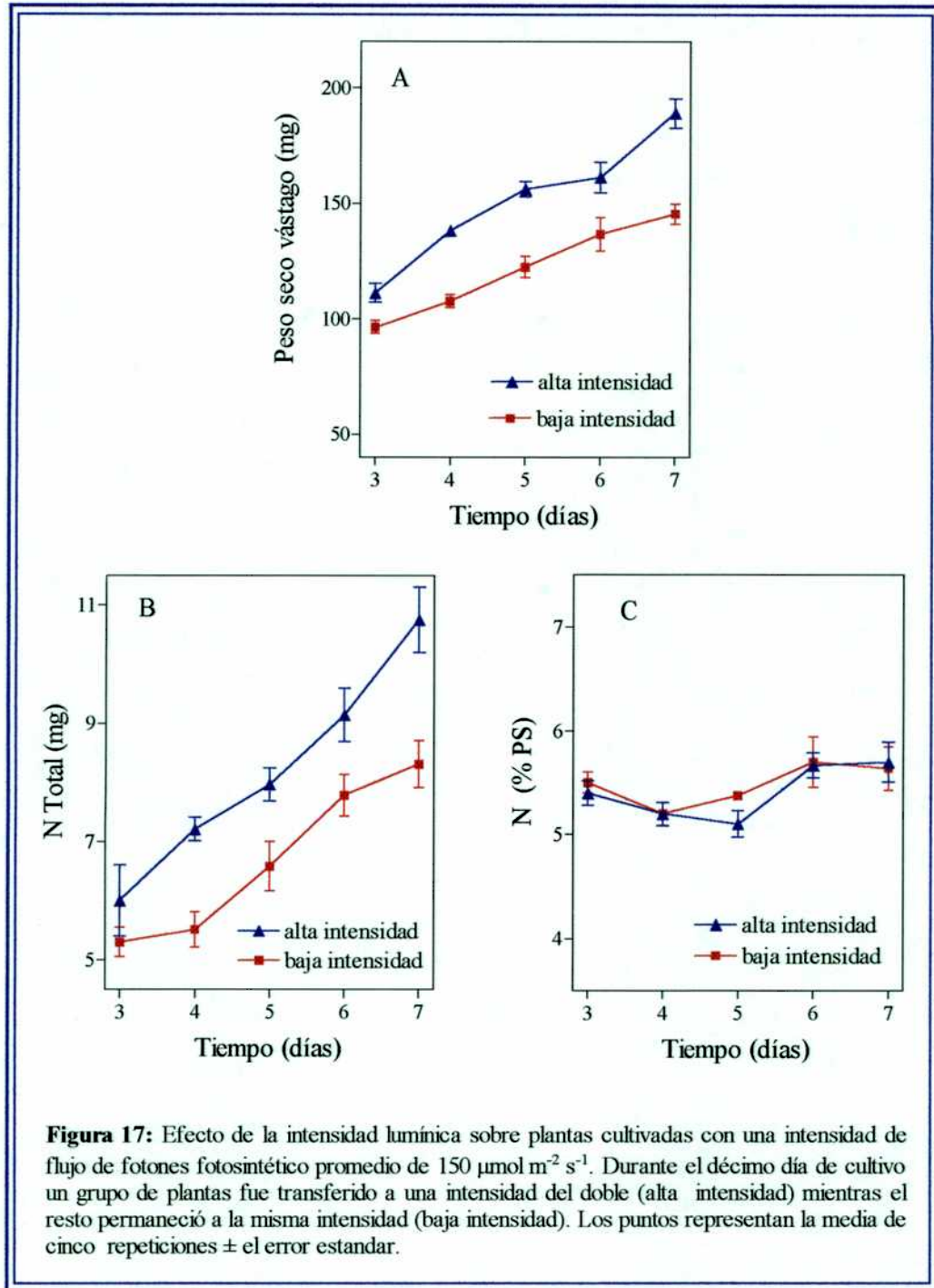
Se emprendió un ensayo en el cual se sometieron las plantas a dos intensidades lumínicas, como una forma de generar cambios en el metabolismo fotosintético y en la disponibilidad de sacarosa.

Se cultivaron las plantas por 10 días con un suplemento alto de N (10 mM KNO₃) a una densidad de flujo de fotones fotosintético promedio de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Transcurrido ese tiempo, un grupo de plantas fue transferido a una intensidad lumínica del doble de la anterior (día 0), permitiendo que continuaran su crecimiento por una semana más, mientras que el resto se mantuvo en las mismas condiciones como control.

Se coleccionaron periódicamente a lo largo de la semana, los exudados floemáticos de 10 hojas, las hojas y los remanentes de los vástagos. Posteriormente se determinaron los aminoácidos libres y los azúcares solubles de las hojas y de los exudados floemáticos, como así también el contenido de N y el peso total de los vástagos.

Como resultado del aumento en la intensidad lumínica, las plantas produjeron mayor biomasa y acumularon más cantidad de nitrógeno total que las plantas que permanecieron siempre a la misma intensidad (**Figura 17 A, B**). Sin embargo la concentración de nitrógeno en el vástago no se vio afectada por la intensidad lumínica (**Figura 17 C**).

Al cabo de tres días de haberse efectuado el cambio de intensidad la concentración de azúcares en las hojas ya se encontraba a un nivel superior al de las plantas control, pero permaneció constante por el resto del experimento. (**Figura 18 A**). Por el contrario, la concentración de azúcares en el exudado floemático no difirió entre tratamientos cuando se realizaron los análisis al tercer día, comenzando a aumentar en las expuestas a la mayor intensidad a partir de ese momento para llegar a una meseta al sexto día (**Figura 18 C**).



Independientemente de los cambios acontecidos en la concentración de azúcares, no se vieron afectados en ningún momento ni la concentración de aminoácidos en las hojas, ni su cantidad en el exudado floemático, a causa del cambio de intensidad (**Figura 18 B, D**). Por lo tanto, la relación aminoácidos/azúcares circulante por el floema de las plantas que fueron transferidas a una mayor intensidad lumínica, fue disminuyendo con el tiempo, mientras que en las plantas control permaneció constante (**Figura 18 E**).

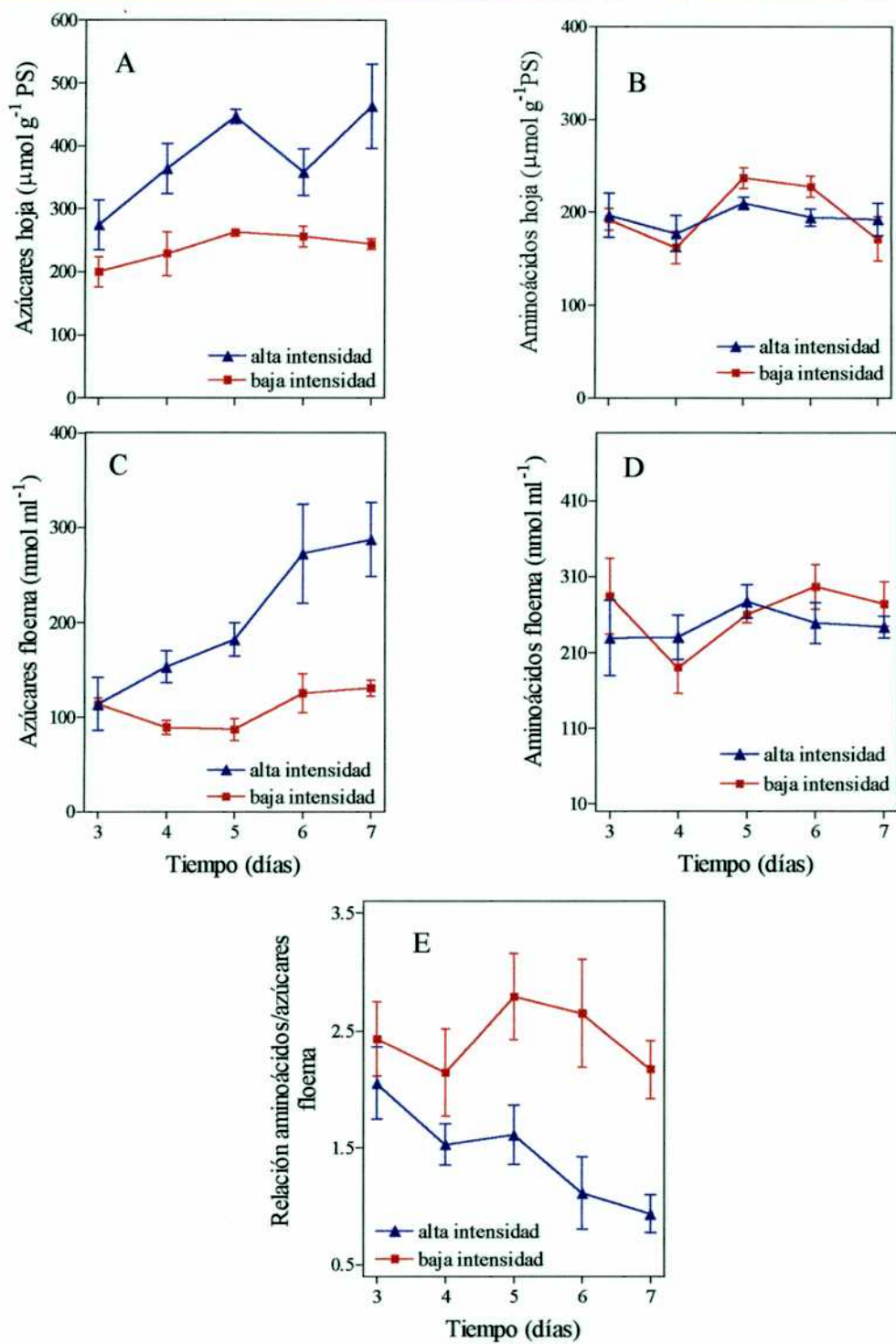


Figura 18: Efecto de la intensidad lumínica sobre plantas cultivadas con una intensidad de flujo de fotones fotosintético promedio de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante el décimo día de cultivo un grupo de plantas fue transferido a una intensidad del doble (alta intensidad) mientras el resto permaneció a la misma intensidad (baja intensidad). Los puntos representan la media de cinco repeticiones \pm el error estándar.

Relación entre un Estrés Inducido por Oscuridad Continua y la Exportación de Aminoácidos al Floema

Como la exportación de aminoácidos al floema no se vio afectada por el cambio en la intensidad lumínica, para comprobar la independencia del transporte de aminoácidos del transporte de azúcares, se sometieron las plantas a un período de oscuridad continua para estudiar si una disminución drástica del metabolismo fotosintético causaba también una disminución del transporte de aminoácidos.

En este caso se cultivaron las plantas por 15 días con un buen suministro de N (10 mM KNO₃). El día 15 se las dividió en dos grupos, un grupo control se mantuvo bajo el mismo fotoperíodo, mientras que el otro grupo fue mantenido en oscuridad continua por 72 h. Se tomaron muestras a las 0, 24, 32, 48 y 72 h de comenzados los tratamientos diferenciales, de las plantas control y de las tratadas. Asimismo se tomo un subgrupo de las plantas mantenidas en oscuridad y a las 32 h se las paso a condiciones de luz por 16 h más antes del muestreo, coincidiendo con el ciclo diurno de las plantas control.

Se coleccionaron los exudados floemáticos y sus 10 hojas por muestra. Posteriormente se determinaron los aminoácidos libres y los azúcares solubles de las hojas y de los exudados floemáticos, también se determinó la concentración de proteínas de las hojas.

Como consecuencia del período de oscuridad continua, tanto la concentración de azúcares en las hojas como en la solución de exudación floemática disminuyó rápidamente durante las primeras 24 h de oscuridad, permaneciendo en un valor bajo hasta las 72 h (**Figura 19 A, C**).

En cambio, la concentración de aminoácidos en la solución de exudación del floema de las plantas mantenidas en oscuridad, aumentó hasta las 48 h, mostrando en ese momento un valor 5 veces superior al observado en las plantas control (**Figura 19 D**).

La concentración de aminoácidos libres en las hojas también aumentó rápidamente durante las primeras 24 h, y continuó con un aumento de menor magnitud durante las 48 h restantes (**Figura 19 B**), mientras que la concentración de proteínas solubles en las hojas disminuyó un 30 % durante las primeras 24 h de oscuridad, y al cabo de las 72 h en esas condiciones eran un 50 % de la inicial (**Figura 19 E**).

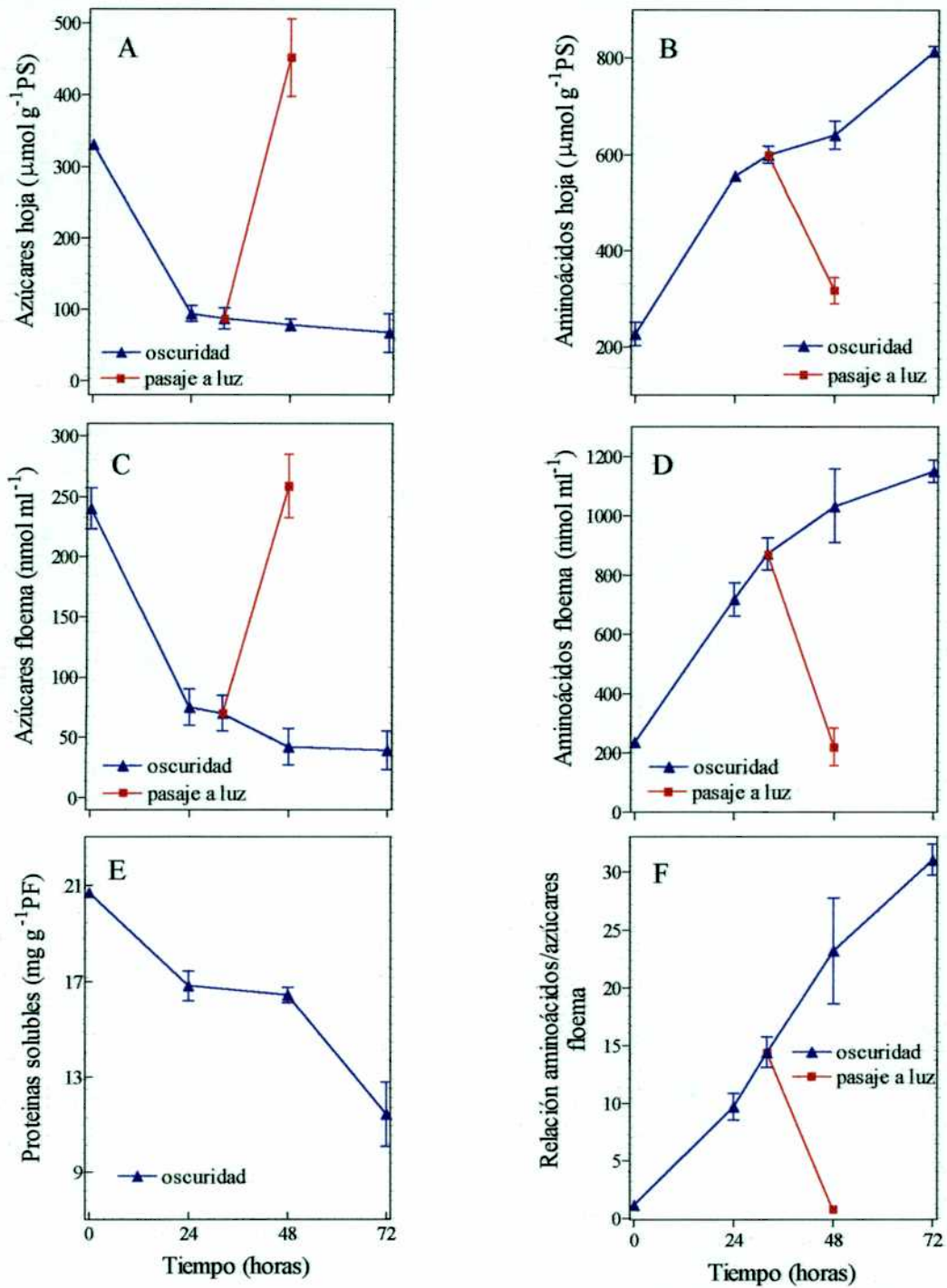


Figura 19: Efecto de la oscuridad sobre plantas cultivadas con solución nutritiva con 10 mM NO_3^- . El día 15 de cultivo fueron sometidas a oscuridad por 72 h. Luego de 32 h en oscuridad un grupo fue transferido nuevamente a la luz por 16 h. Los puntos representan las medias de cinco repeticiones \pm el error estandar.

Finalmente, como consecuencia del aumento de la concentración de aminoácidos y de la disminución de los azúcares en el floema, la relación entre ambos en el floema aumentó constantemente durante el experimento, hasta alcanzar un valor 30 veces superior al de las plantas control luego de las 72 h de oscuridad (**Figura 19 F**).

El efecto de las 32 h de oscuridad sobre todos los parámetros medidos pudo ser revertido volviendo las plantas a un ambiente luminoso por 16 h. La concentración de azúcares en el exudado floemático y en las hojas sufrieron un aumento hasta un valor similar al de las plantas control (**Figura 19 A, C**). De la misma manera, la concentración de aminoácidos en las hojas, en el exudado floemático, como así también su relación, disminuyeron al mismo nivel que al de las plantas control (**Figura 19 B, D y F**). Es importante hacer notar que el pasaje al ambiente luminoso se hizo coincidir con el comienzo del período lumínico correspondiente al fotoperíodo.

Ritmo Diario de Exudación Floemática de Azúcares y Aminoácidos

Ha sido mencionado que el flujo de la solución circulante por floema varía a lo largo del día, viéndose restringido durante la noche y disminuyendo la concentración tanto de azúcares como de aminoácidos (Winter *et al.*, 1992), pero dado que en el ensayo anterior observamos que un período de oscuridad mayor al nocturno, generaba respuestas opuestas en la exudación de ambos metabolitos, decidimos analizar los exudados floemáticos obtenidos a lo largo del ciclo nocturno diario.

Con este fin se analizaron los exudados floemáticos obtenidos a lo largo de la noche del día quince de cultivo con 10 mM de NO_3^- . La mitad de las macetas fueron colocadas bajo luz continua durante 24 h, mientras que la otra mitad permaneció con el fotoperíodo sin alteraciones. Se tomaron muestras a las 0, 4 y 8 h de comenzada la noche y a las 24 h siguientes (al comienzo de la noche del día siguiente). Se determinaron los aminoácidos libres y los azúcares solubles de las hojas y de sus exudados floemáticos, como también la actividad de la enzima nitrato reductasa.

Durante el período nocturno la concentración de azúcares solubles en las hojas disminuyó un 70 % (**Figura 20 A**), mientras que la concentración de aminoácidos libres en las hojas no se encontró afectada en función del tiempo (**Figura 20 B**), aún cuando la actividad de la enzima nitrato reductasa disminuyó progresivamente (**Figura 20 F**),

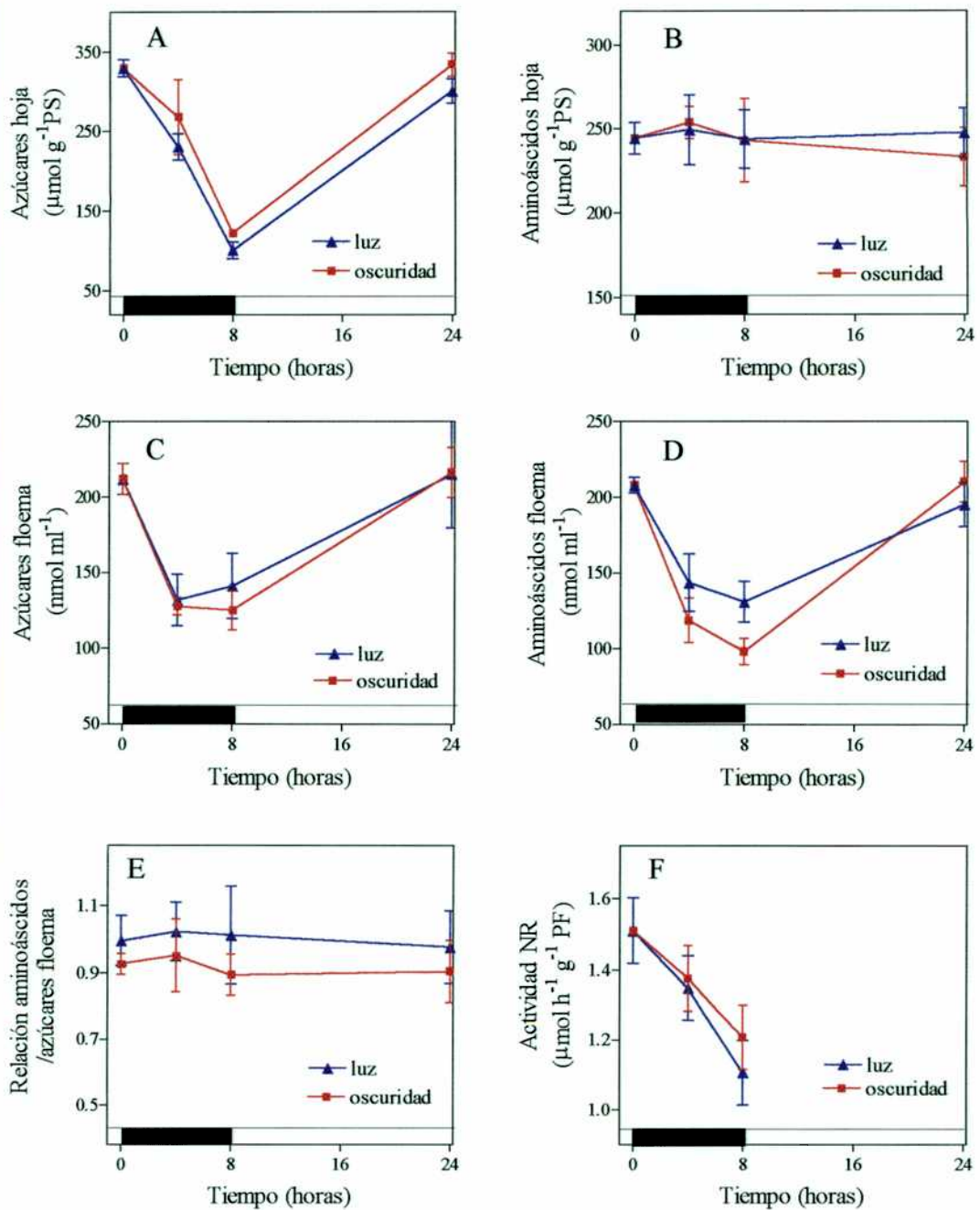


Figura 20: Ritmo diario de exudación floemática de plantas cultivadas por 15 días con solución nutritiva conteniendo 10 mM NO_3^- . Un grupo de plantas se mantuvo en luz continua su durante las 24 h (luz), mientras que el resto permaneció sin alteraciones (oscuridad). La hora 0 corresponde al comienzo de la noche, la que se identifica por la barra negra. Los puntos representan las medias de cinco repeticiones \pm el error estándar.

Sin embargo, se observó un decrecimiento progresivo de la concentración de aminoácidos en la solución de exudación del floema hasta las 8 horas, alcanzando un valor similar al original luego de las 16 h de luz subsiguientes (**Figura 20 D**), mostrando el mismo comportamiento que los azúcares exportados que también disminuyeron durante la noche (**Figura 20 C**). Como consecuencia, la relación aminoácidos/azúcares permaneció constante durante todo el período determinado (**Figura 20 E**).

En las plantas sometidas a luz continua durante el periodo nocturno, se observó para la concentración azúcares y de aminoácidos en las hojas, como para la actividad de la enzima NR, el mismo comportamiento que en las plantas con el fotoperíodo sin alteraciones (**Figura 20 A, B, E**).

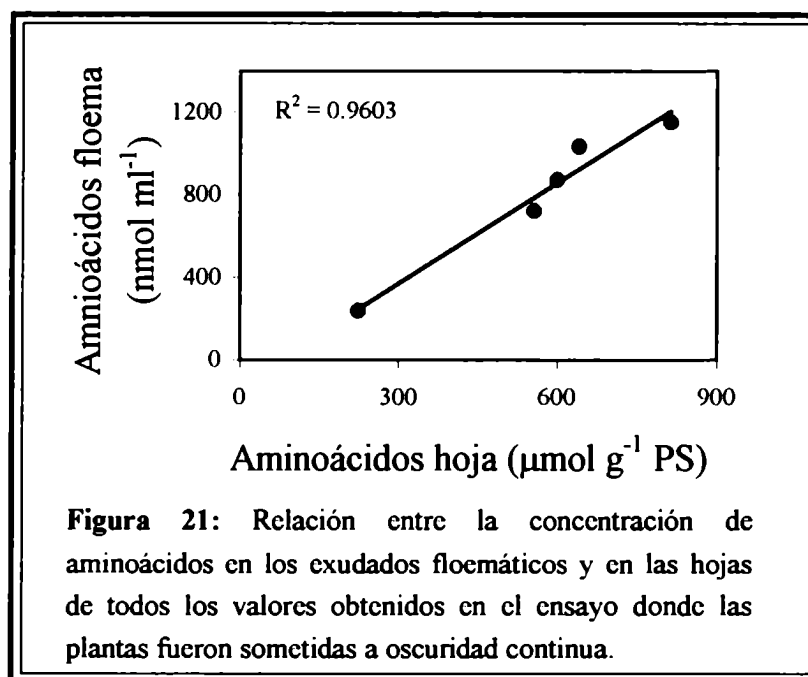
En cuanto a la concentración de aminoácidos y azúcares en la solución de exudación del floema se observó un decrecimiento progresivo de la misma magnitud que en las plantas mantenidas con el fotoperíodo, no existiendo diferencias significativas entre ambos tratamientos (**Figura 20 C, D**), por lo tanto la relación aminoácidos/azúcares permaneció constante durante todo el experimento en ambos tratamientos (**Figura 20 E**).

Discusión

En los resultados obtenidos por Winter y colaboradores (1992) a partir de un estudio realizado durante el ciclo diurno/nocturno en plantas de cebada, encontraron que la translocación de aminoácidos y azúcares parecía estar restringida durante la noche, y que además se producía una disminución en el volumen de exudación al floema desde 50 a 20 $\mu\text{mol h}^{-1}$ del día a la noche respectivamente. Sin embargo como también observaron una disminución en la concentración de sacarosa en las hojas, propusieron que la demanda de este metabolito por parte de las células fuente del mesófilo era la causante de la exportación reducida, sugiriendo un acoplamiento del transporte de aminoácidos al flujo de masa de sacarosa, como un camino simple para el ajuste general de la exportación desde las hojas tanto de azúcares como de aminoácidos.

Pero esta explicación no es posible sustentarla luego de los resultados obtenidos con las plantas sometidas a oscuridad continua por 72 horas, donde la concentración de azúcares exudados desde el floema disminuyó con el tiempo, mientras que la de

Pero esta explicación no es posible sustentarla luego de los resultados obtenidos con las plantas sometidas a oscuridad continua por 72 horas, donde la concentración de azúcares exudados desde el floema disminuyó con el tiempo, mientras que la de aminoácidos aumentó progresivamente hasta que la relación aminoácidos/azúcares alcanzó un valor 30 veces superior al obtenido con las plantas control (**Figura 19 F**). Este incremento en la concentración de aminoácidos en la solución de exudación se debió probablemente al aumento de la concentración de aminoácidos libres en las hojas, causado por una inducción de la proteólisis, como indica la disminución de la concentración de proteínas producida por la oscuridad (**Figura 19**), ya que, contrariamente a lo observado en el capítulo anterior, los valores obtenidos en este ensayo para la concentración de aminoácidos en los exudados floemáticos correlacionaron linealmente con los obtenidos en las hojas (**Figura 21**).



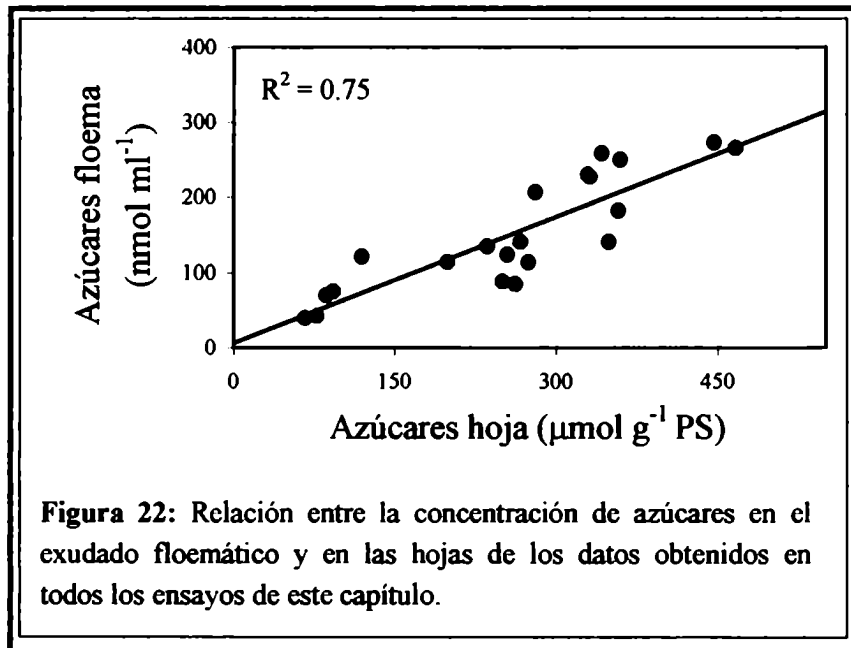
Por otro lado, las plantas que sufrieron un aumento en la intensidad lumínica no afectaron su tasa de exportación de aminoácidos al floema, a pesar que sí lo hicieron con la de azúcares, luego de haber aumentado la concentración de estos metabolitos en las hojas. En consecuencia, en estas plantas, con una mayor disponibilidad lumínica, la relación entre los aminoácidos y los azúcares exportados al floema fue disminuyendo con el tiempo, mientras que en las plantas mantenidas con la misma intensidad permaneció constante (**Figura 18**).

Una forma de explicar los resultados obtenidos por Winter y colaboradores surge del último experimento, donde también se pudo observar una disminución de ambos metabolitos en el exudado floemático durante la noche, tanto estuvieran las plantas en oscuridad como en luz (**Figura 20 C, D**). Los resultados obtenidos con los azúcares pueden explicarse por la disminución en la concentración de azúcares en las hojas (**Figura 20 A**), mientras que la disminución observada en los aminoácidos podría ser una consecuencia de la disminución en la actividad de la enzima NR (**Figura 20 E**), ya que como se observó con anterioridad, el *pool* de aminoácidos exportable dependería de los aminoácidos sintetizados a partir del N recientemente absorbido.

Otra interpretación posible podría ser que la exportación de aminoácidos y azúcares al floema y/o el flujo floemático, se encuentren sujetos a un ritmo circadiano. Si bien esta conclusión parece apresurada, ya que sería necesario realizar ensayos más extensos para comprobar esta hipótesis, es factible proponerla dado que los ritmos circadianos se encuentran muy extendidos entre las plantas y se han documentado en una gran variedad de especies cubriendo un amplio espectro de actividades, desde el movimiento de las hojas y la conductancia de CO₂ a la regulación de la expresión de genes y la fosforilación de proteínas, como ocurre con la regulación de la expresión y de la actividad de la enzima nitrato reductasa (**Figura 20 F**) (Lillo, 1994; Pilgrim *et al.*, 1993; Rouby *et al.*, 1995).

La totalidad de los experimentos indican que el ritmo de exudación de aminoácidos al floema no se ve afectado por la intensidad lumínica al menos en el rango utilizado, y se muestra independiente de la concentración de azúcares tanto en el floema como en las hojas, rechazando la hipótesis que la tasa de exportación de aminoácidos al floema se encuentra limitada por la exportación de azúcares para mantener constante la relación aminoácidos / azúcares en el floema.

En cambio encontramos que, cuando la luz es el factor limitante del crecimiento, la concentración de azúcares en el floema depende de la concentración de estos metabolitos en las hojas, dado que estos dos parámetros mostraron una correlación positiva entre ellos ajustándose a una recta con un R² de 0.75 al graficar las medias obtenidas en todos los ensayos (**Figura 22**).



Efecto de las Citocininas sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema

Las citocininas han sido definidas como sustancias que estimulan la división celular en las plantas y que interaccionando con las auxinas determinan el patrón de diferenciación celular. Hoy en día el término 'citocinina' es usado para todos los compuestos purínicos con un sustituyente N6 en el carbono 5. Las citocininas se producen principalmente en las puntas de las raíces y se mueven por xilema hacia el vástago, donde participan en el control del crecimiento y desarrollo (Van Staden & Davey, 1979); pero también son sintetizadas en tejidos en activo crecimiento, como las hojas jóvenes y los tallos (Chen *et al.*, 1985). Entre sus efectos se encuentran, la estimulación del desarrollo de los cloroplastos y el aumento de la resistencia de la plantas a diversas formas de estrés (Kamínek, 1992). Como así también la capacidad de afectar las relaciones fuente - destino (Kuiper *et al.*, 1988; Wagner & Beck, 1993), además de retrasar la senescencia en plantas intactas (Noodén *et al.*, 1990) y en hojas cortadas (Singh *et al.*, 1992).

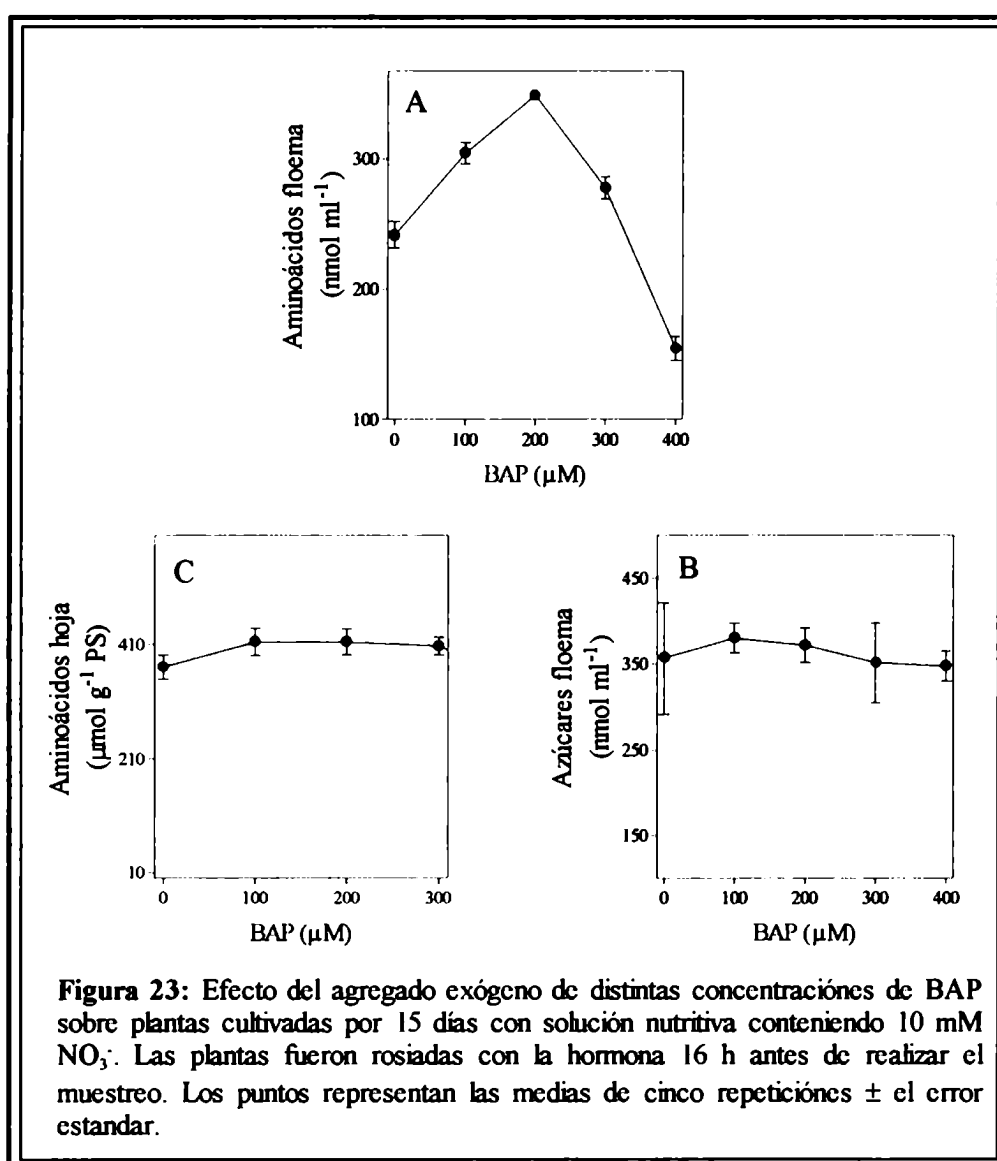
Mediante estudios fisiológicos se ha demostrado que muchas especies de citocininas pueden inhibir la senescencia foliar y que los niveles endógenos de las mismas caen a medida que progresa la senescencia. Además se ha podido retrasar la senescencia en plantas transgénicas de tabaco que sobreproducen citocininas por expresión de un gen bacteriano que codifica la enzima responsable del primer paso de la vía de síntesis de estas hormonas (Smart *et al.*, 1991). Asimismo, se sabe que plantas cultivadas con altos niveles de N evidencian un retraso en la aparición de los síntomas de senescencia y una hipótesis planteada en torno a este tema es que una buena disponibilidad de este nutriente estaría relacionada con una mayor producción de citocininas.

Sobre la base de estos antecedentes, se decidió estudiar si las citocininas jugaban algún rol en la regulación de la exportación de aminoácidos al floema. Para estos ensayos se utilizó nuevamente la variedad pro-INTA Isla Verde de trigo.

Efecto de Distintas Concentraciones de Citocininas sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema

Como primer paso se analizó el efecto del agregado exógeno sobre los vástagos de distintas concentraciones del compuesto N6-bencil-amino-purina (BAP) catalogado como una citocinina.

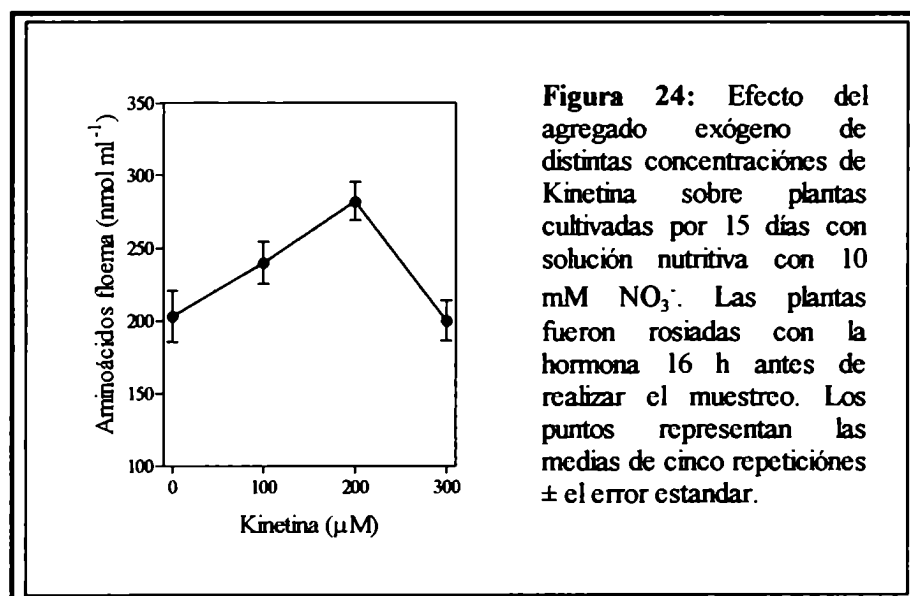
Las plantas se cultivaron durante 15 días con solución nutritiva con 10 mM KNO₃. Luego de transcurrido este tiempo se rociaron los vástagos con distintas concentraciones de una solución 0, 100, 200, 300 o 400 μM de BAP. El muestreo de las plantas se llevó a cabo durante la última hora de luz, mientras que el rociado fue hecho 24, 16 o 3 h antes de realizar el muestreo.



Solo se pudo observar un efecto del agregado de la hormona cuando fueron aplicadas 16 h antes del muestreo, durante el período diurno, mientras que cuando fueron realizadas 24 o 3 h antes, no se observó un efecto significativo (no mostrado), presumiblemente por un exceso o por una falta de tiempo entre la aplicación y el muestreo. Por lo tanto todas las aplicaciones subsiguientes fueron hechas 16 h antes del muestreo.

Como consecuencia del agregado de la hormona, la concentración de aminoácidos en la solución de recolección del exudado floemático aumentó, al aumentar la concentración BAP hasta 200 μM , disminuyendo a concentraciones mayores (Figura 23 A). Mientras que la concentración de aminoácidos en las hojas no se vio afectada por el agregado de citocininas (Figura 23 B). Tampoco se observó ningún cambio en la concentración de azúcares en el exudado floemático (Figura 23 C).

A continuación se ensayó otro compuesto catalogado como una citocinina, la kinetina, la que si bien produjo un efecto similar al del BAP (Figura 24), resultó de menor efectividad para regular la exportación de aminoácidos al floema, por lo que los ensayos subsiguientes se realizaron con BAP.



Relación entre el efecto del agregado de BAP y la Disponibilidad de Nitrógeno sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema

Posteriormente, para estudiar si el efecto de la hormona sobre la exportación de aminoácidos al floema pudiera ser dependiente de la disponibilidad de N de las plantas, se cultivaron plantas con dos niveles de N (5.0 o 10.0 mM NO₃K), a las cuales se les aplicó una dosis de 200 µM BAP al comienzo del día 18 de cultivo, y al final del día se realizaron colecciones de los exudados floemáticos y de las hojas (10 por muestra).

La concentración de aminoácidos en las hojas maduras fue mayor en las plantas cultivadas con 10 mM KNO₃ pero no fue afectada por el agregado de BAP, en cambio, la concentración de aminoácidos exportados por floema además de ser mayor a la mayor concentración de N, aumentó significativamente con el agregado de BAP solo en las plantas cultivadas con 10 mM N (**Figura 25 A, B**).

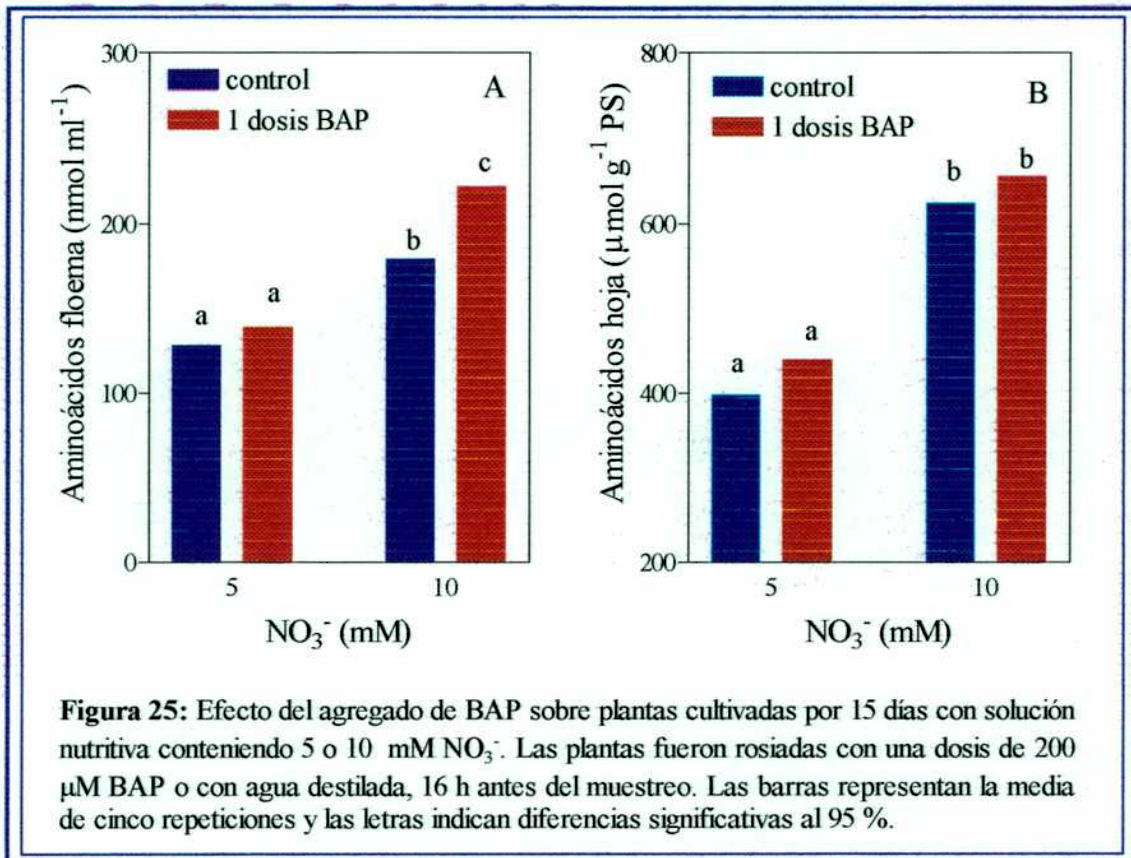


Figura 25: Efecto del agregado de BAP sobre plantas cultivadas por 15 días con solución nutritiva conteniendo 5 o 10 mM NO₃⁻. Las plantas fueron rosiadas con una dosis de 200 µM BAP o con agua destilada, 16 h antes del muestreo. Las barras representan la media de cinco repeticiones y las letras indican diferencias significativas al 95 %.

Respuesta al Agregado de BAP sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema en Oscuridad Continua.

Se evaluó el efecto retardador de la senescencia de las citocininas, sobre la exportación de aminoácidos al floema. Con este fin se cultivaron las plantas con 10 mM NO_3K y a los quince días se las sometió a 48 h de oscuridad, comenzando con el ciclo nocturno diario. Los tratamientos con BAP se llevaron a cabo respetando el inicio del ciclo diurno y se utilizó una concentración de 200 μM . A un grupo se le aplicó una única dosis aplicada 16 h antes del muestreo, otro grupo recibió una primera dosis a las 32 h y una segunda dosis a las 16 h antes de muestrear, mientras que un tercer grupo no fue tratado en absoluto y fue tomado como control. Se hicieron los muestreos a las 0, 24 y 48 h, y se coleccionaron 10 hojas y sus exudados floemáticos por muestra.

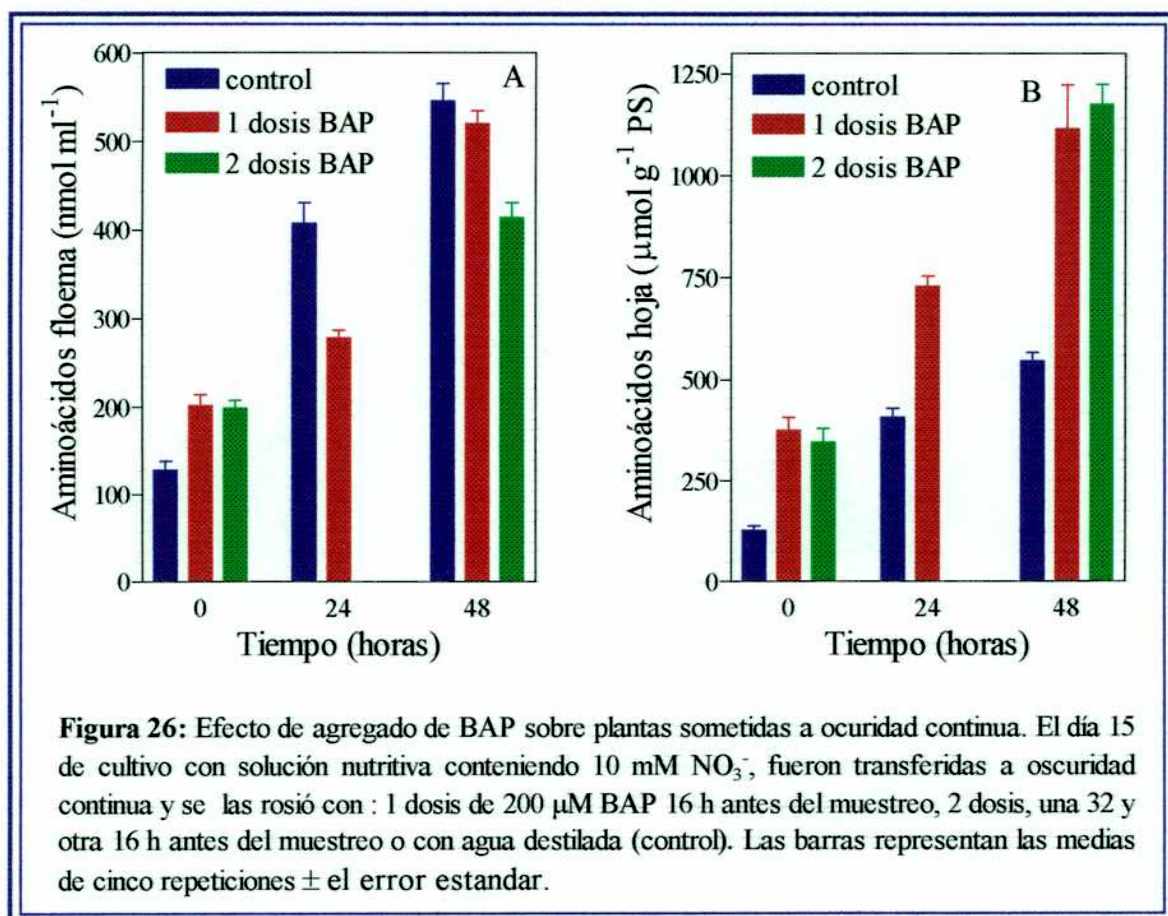


Figura 26: Efecto de agregado de BAP sobre plantas sometidas a oscuridad continua. El día 15 de cultivo con solución nutritiva conteniendo 10 mM NO_3^- , fueron transferidas a oscuridad continua y se las roció con : 1 dosis de 200 μM BAP 16 h antes del muestreo, 2 dosis, una 32 y otra 16 h antes del muestreo o con agua destilada (control). Las barras representan las medias de cinco repeticiones \pm el error estandar.

Se observó que el aumento en la concentración de aminoácidos en la solución de exudado floemático que ocurre luego de 24 h de oscuridad (ver ensayos en oscuridad continúa del capítulo anterior), disminuyó en un 30 % con el agregado de una dosis de citocininas, mientras que para lograr una concentración 25 % menor luego de 48 h de oscuridad, fueron necesarias 2 aplicaciones de 200 μM de BAP, ya que una única dosis aplicada después que las plantas hubiesen estado 32 h en oscuridad, no tuvo efecto alguno. Mientras que en las plantas control, no sometidas a oscuridad, pero que recibieron una o dos dosis de BAP, aumentó su concentración en el exudado floemático, con respecto a las que no sufrieron ningún agregado, pero el efecto no fue aditivo, obteniendo un valor similar con 1 o 2 dosis de hormona (**Figura 26 A**) Las aplicaciones de citocininas no tuvieron efecto alguno sobre el aumento de la concentración de aminoácidos en las hojas maduras sometidas a oscuridad. (**Figura 26 B**).

Discusión

Dado que la senescencia es un proceso importante en la adaptación de las plantas superiores a las condiciones ambientales de estrés externo (Feller & Fischer, 1994), es posible inducirla sometiendo las plantas a un estrés, como es la eliminación de la fuente lumínica por un período mayor al establecido por el fotoperíodo, como consecuencia, en nuestro ensayo se produjo un aumento en la concentración de aminoácidos en las hojas y en el exudado floemático. En este último parámetro, el agregado de citocininas fue capaz de producir una disminución del 30 % del aumento producido luego de 24 h de oscuridad y un 25 % luego de 48 h, con respecto a las que no recibieron la hormona. Mientras que el aumento en la concentración de aminoácidos en las hojas a lo largo del tratamiento de oscuridad no se vio afectado por el agregado de la hormona (**Figura 26**).

Sin embargo con las dos citocininas testeadas se observó un aumento de la exportación de aminoácidos en forma dependiente de la concentración de hormona aplicada con un máximo a los 200 μM , disminuyendo luego hacia el nivel del control con concentraciones más elevadas (**Figuras 23 y 24**). Aunque no se observaron alteraciones en la concentración de aminoácidos en las hojas maduras, que se utilizaron para obtener el exudado, ni en la concentración de azúcares en el exudado floemático. Esto podría deberse a un efecto directo de las citocininas sobre la exportación de aminoácidos, independiente del efecto retardador de la senescencia, el que sería

dependiente del estatus de nitrógeno de la planta, ya que este efecto solo fue observado en condiciones superóptimas de nitrógeno (**Figura 25**).

Estudio de la Exportación de Aminoácidos al Floema en la Línea Ditelosómica para el Brazo Corto del Cromosoma 7B del Cultivar Chinese Spring (CSDT7BL)

En el ensayo a campo realizado con las líneas CSDT7BL y euploide, cuando las plantas se cultivaron con una alta disponibilidad de N se observó durante el llenado del grano una disminución en el transporte por floema de los aminoácidos exportados por la hoja bandera, por lo que luego de haber realizado los ensayos anteriormente expuestos a lo largo de este trabajo de tesis, con el objetivo de avanzar en la comprensión de la regulación de la exportación de aminoácidos al floema, retomamos con nuevas herramientas el estudio de la línea CSDT7BL para estudiar la respuesta de esta última durante el crecimiento vegetativo en plantas jóvenes, y así estudiar los efectos de la ausencia del brazo corto del cromosoma. 7B.

Por lo tanto se emprendieron una serie de ensayos comparativos entre esta línea y la euploide en cámara de cultivo, donde se expusieron las plantas a diferentes regímenes lumínicos y de N, para estudiar el crecimiento y la utilización del N durante el ciclo vegetativo.

Exportación de Aminoácidos al Floema en Plantas de las Líneas CSDT7BL y Euploide Cultivadas con Distintas Disponibilidades de Nitrógeno

En este ensayo, se estudió la influencia de la disponibilidad de N sobre el crecimiento de las plantas. Por lo que se cultivaron plantas de las dos líneas, en cámara de cultivo suplementadas con solución nutritiva conteniendo distintas concentraciones de N (1.0, 5.0, 10.0 o 15.0 mM KNO₃).

A los 15 días de iniciado el tratamiento se coleccionaron los exudados floemáticos (de 10 hojas), las hojas utilizadas para la obtención de los exudados, los vástagos y las raíces de cada maceta, que fueron almacenados, para la determinación de la concentración de aminoácidos y azúcares de los exudados y de las hojas, como así también para la determinación del contenido de nitrógeno y de nitratos de los vástagos.

También se determinó la actividad de la enzima NR, como la concentración de proteínas solubles en los tejidos.

La línea euploide produjo mayor biomasa que la ditelosómica, con todos los tratamientos nitrogenados, si bien se observó una limitación al crecimiento en las plantas de las dos líneas suplementales con 1 mM N (**Figura 27 A**).

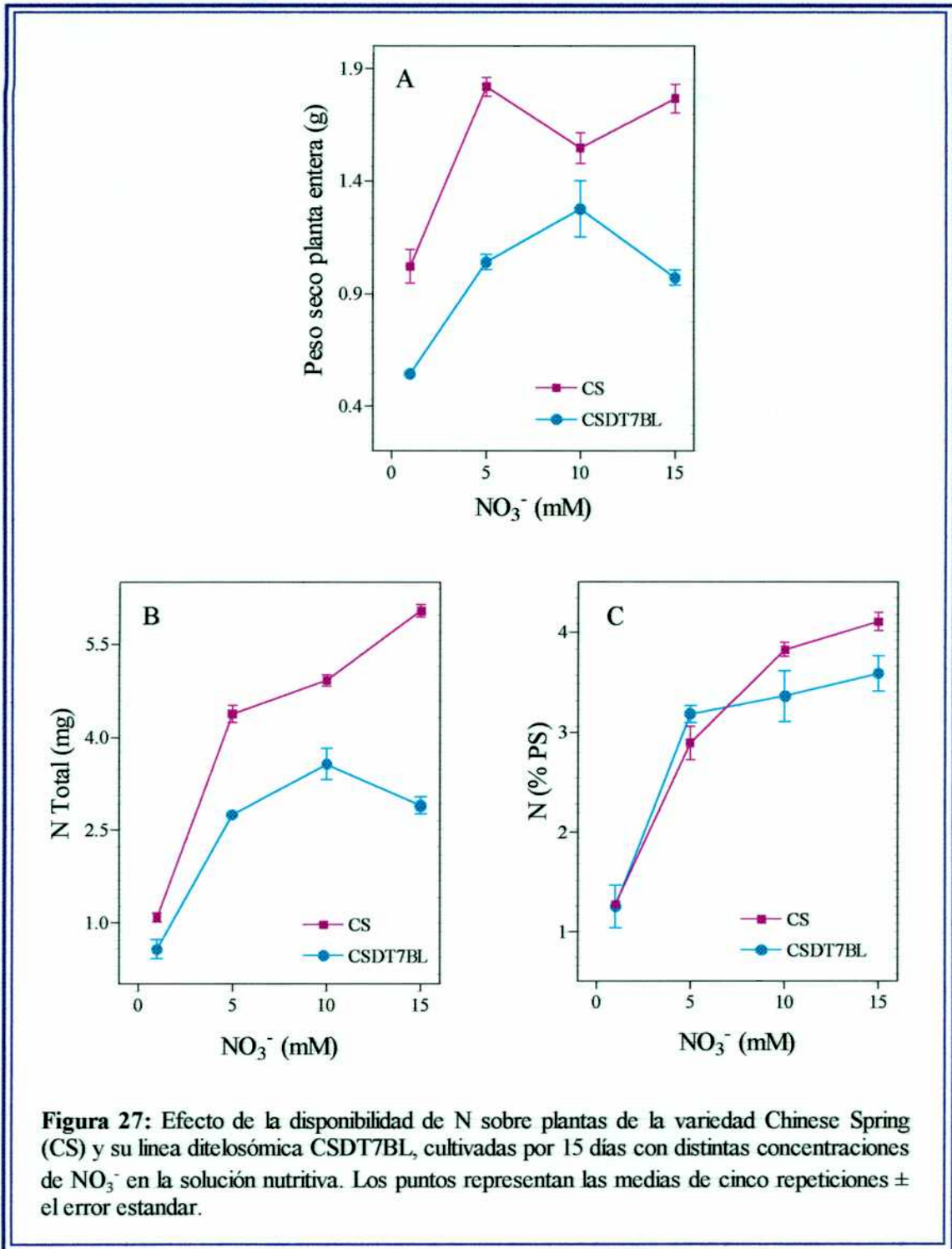
El contenido total de N aumentó ampliamente entre las plantas cultivadas con 1 y 5 mM N de ambas líneas, pero mientras que en la CSDT7BL no se registró ningún aumento en la acumulación a mayores suministros, en las euploides se observó un aumento continuado, con valores superiores a los de las CSDT7BL en todo momento (**Figura 27 B**). Por esto la concentración de nitrógeno en los tejidos aumentó con la disponibilidad de N en el medio, hasta 10 mM en la línea euploide y hasta 5 mM en la ditelosómica. (**Figura 27 C**).

Estas diferencias no pueden ser explicadas en base a una diferencia en la absorción y asimilación del nitrato ya que si bien la absorción (determinada sobre una base del peso seco de la raíz) aumentó al aumentar la disponibilidad de este nutriente, no se observaron diferencias entre genotipos (**Figura 28 A**), como tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de nitrato libre en los tejidos, la que permaneció muy baja en las plantas abastecidas con 1 y 5 mM N (**Figura 28 B**).

La concentración de proteínas solubles en las hojas maduras fue levemente mayor en la línea CSDT7BL con 1 mM N, pero aumentó al aumentar su disponibilidad sin diferencias entre las líneas (**Figura 28 C**). Ambas líneas también mostraron la misma actividad de NR aumentando a medida que aumentaba el suplemento de N (**Figura 28 D**), a la vez que la concentración de aminoácidos libres en las hojas maduras, en ambas líneas fue menor con 1 mM que en el resto de las concentraciones, donde permaneció constante (**Figura 29 A**), mientras que la concentración de azúcares en las hojas se comportó en forma inversa a la de aminoácidos en las dos líneas (**Figura 29 B**).

La concentración de aminoácidos exudados desde el floema de las plantas ditelosómicas solo aumentó de 1 a 5 mM permaneciendo constante a las concentraciones mayores, en lugar de aumentar en función del aumento en la disponibilidad de N, como lo hicieron las plantas CS (**Figura 29 C**) y como era lo esperado según lo observado con la variedad Klein Chamaco. Aunque la concentración de azúcares exudados permaneció constante y con valores similares en ambas líneas

(Figura 29 D). Por lo tanto la relación aminoácidos/azúcares exudados en las plantas CS aumentó con la disponibilidad de N, mientras que en las CSDT7BL solo aumentó de 1 a 5 mM de N, permaneciendo constante a las concentraciones superiores, indicando una limitación a la exudación de aminoácidos.



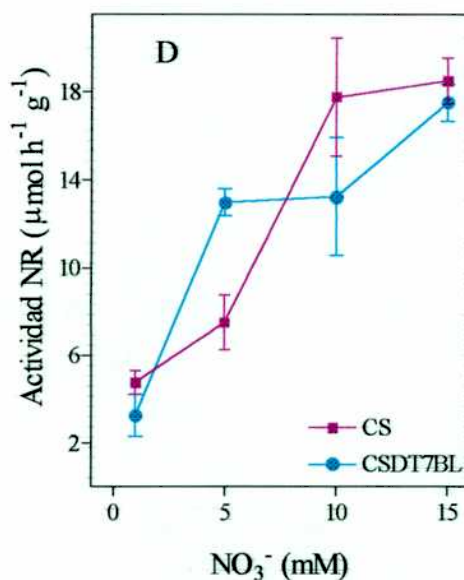
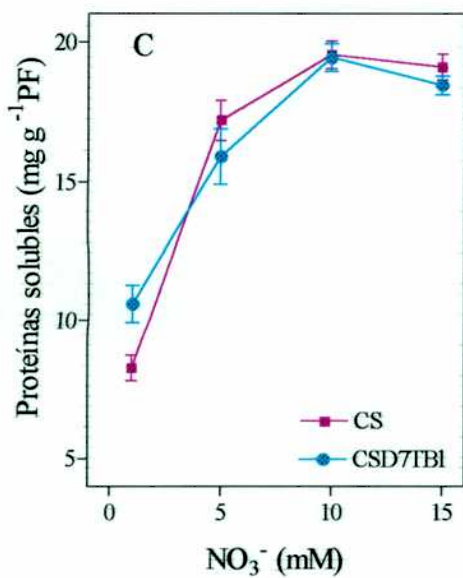
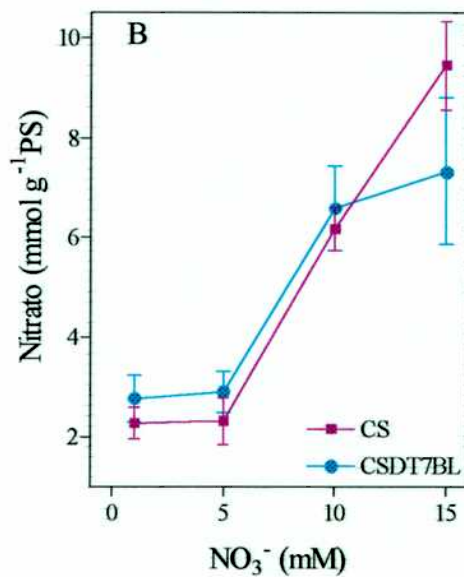
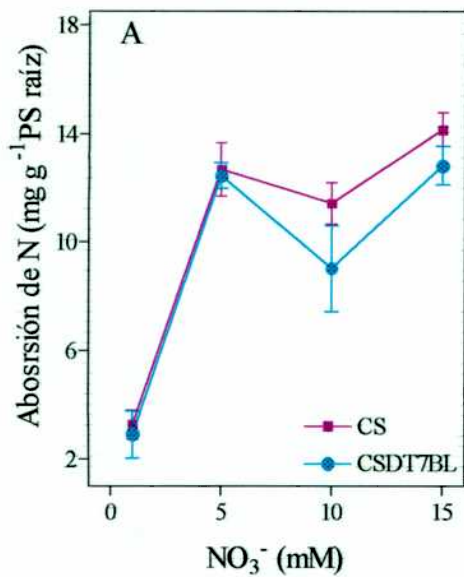


Figura 28: Efecto de la disponibilidad de N sobre plantas de la variedad Chinese Spring (CS) y su línea ditelosómica CSDT7BL, cultivadas por 15 días con distintas concentraciones de NO₃⁻ en la solución nutritiva. Los puntos representan las medias de cinco repeticiones ± el error estandar.

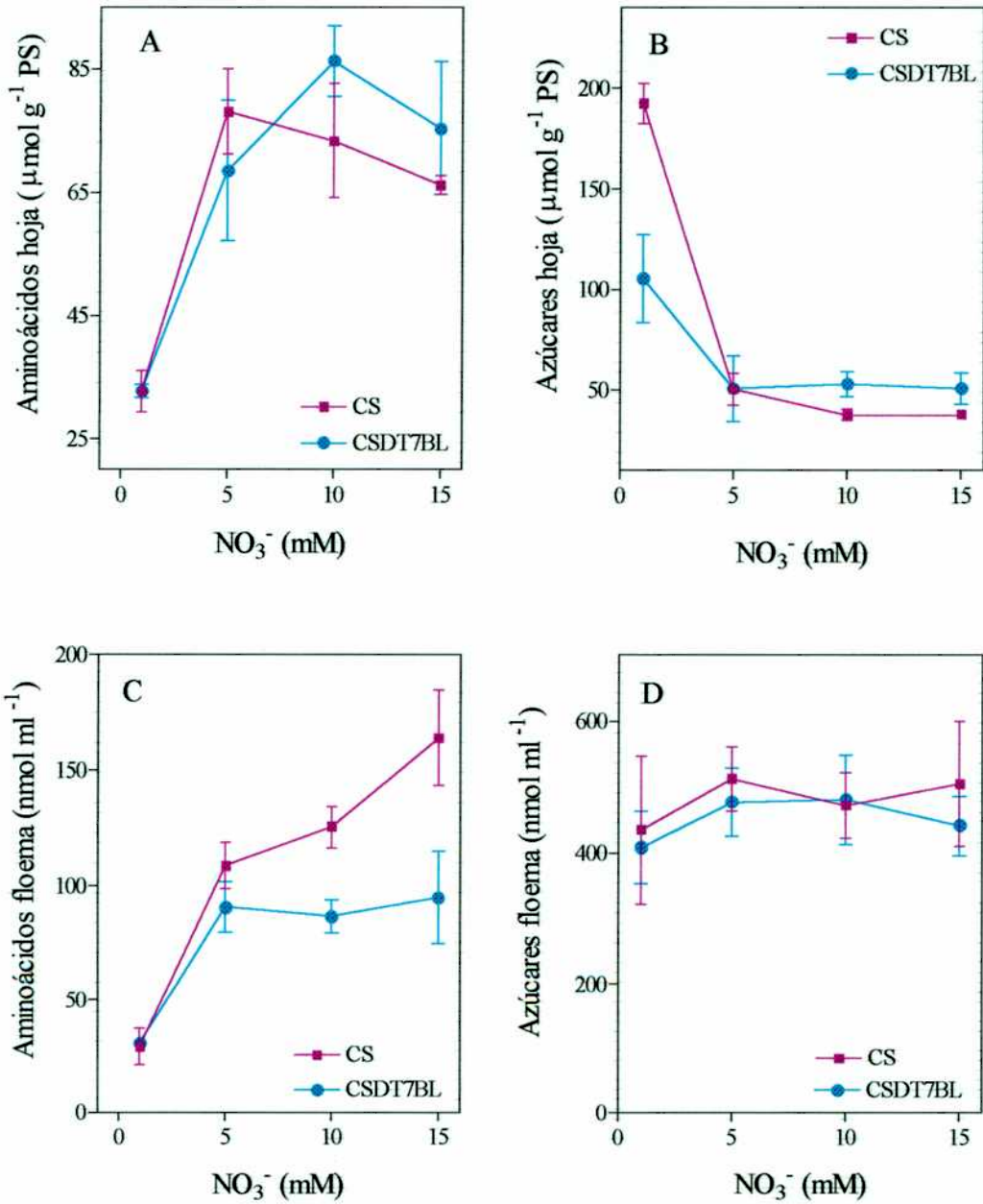
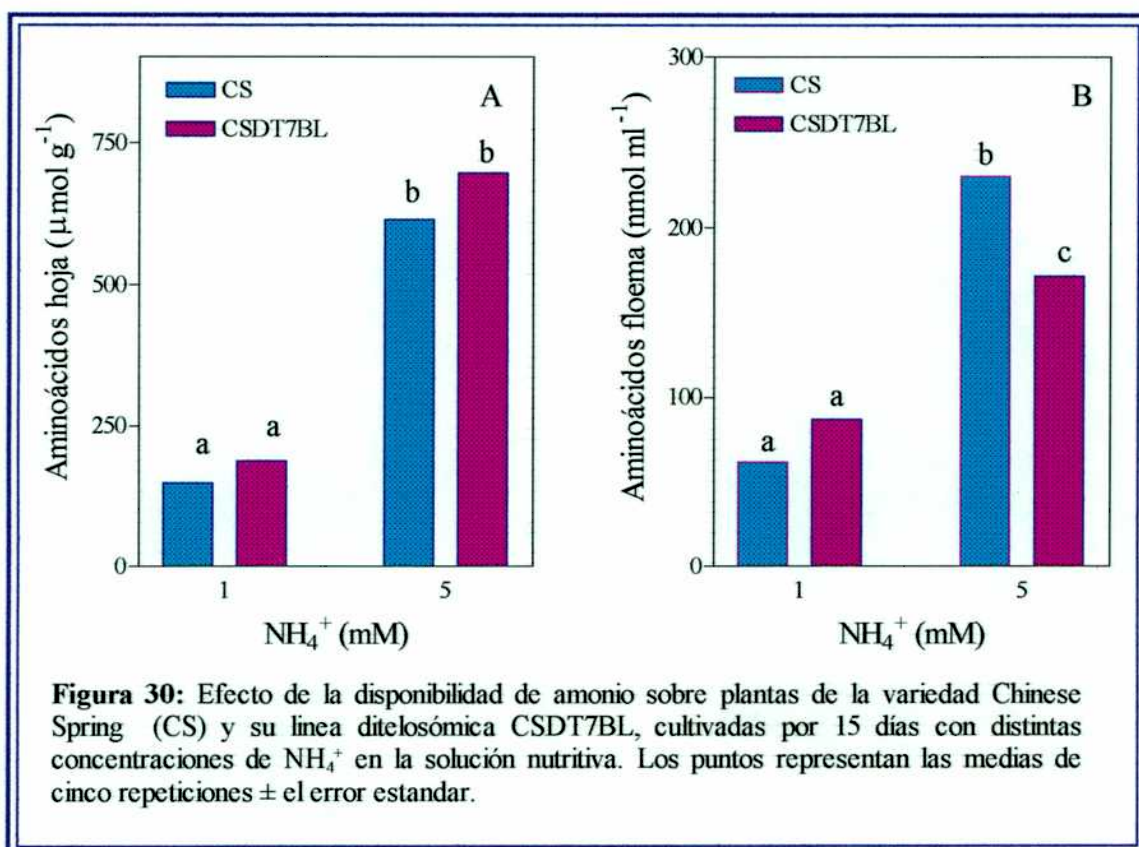


Figura 29: Efecto de la disponibilidad de N sobre plantas de la variedad Chinese Spring (CS) y su línea ditelosómica CSDT7BL, cultivadas por 15 días con distintas concentraciones de NO_3^- en la solución nutritiva. Los puntos representan las medias de cinco repeticiones \pm el error estándar.

Basándose en estos resultados se emprendió un segundo ensayo en el cual las plantas fueron cultivadas con amonio, para estudiar la influencia de la fuente nitrogenada sobre la deficiencia encontrada en transporte. El amonio fue suministrado en dos concentraciones 1 o 5 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$.

En las plantas cultivadas con amonio como única fuente de N, la concentración de aminoácidos libres en las hojas fue mayor en las que recibieron una concentración de 5 mM de dicho nutriente, en ambas líneas (**Figura 30 A**). En cuanto a la cantidad de aminoácidos exudados, estos también aumentaron entre las plantas con bajo y alto N de ambas líneas, pero nuevamente se obtuvo una exudación menor en las CSDT7BL cultivadas con 5 mM (**Figura 30 B**). Evidenciando la independencia de la fuente nitrogenada sobre la deficiencia en la exportación de aminoácidos.



Composición de Aminoácidos en Hojas y Exudados Floemáticos de Plantas de las Líneas CSDT7BL y Euploide

Con el objetivo de determinar si la diferencia en la exudación estaba dada solo por la cantidad de aminoácidos exportados o también por un cambio en la proporción de cada uno de ellos, se realizó un análisis de la composición de aminoácidos presentes en los tejidos de las hojas y en los exudados floemático (de 20 hojas) de plantas de 18 días de edad de las dos líneas, cultivadas ambas con 15 mM de NO_3^- como fuente de N.

La concentración y la composición general de aminoácidos en las hojas no mostraron diferencias entre las líneas, siendo los aminoácidos aspartato, serina, glutamato, treonina y glutamina los más abundantes, con el resto sumando solo un 10 % del total. Sin embargo se observó una mayor proporción de serina y una menor proporción de asparagina en la línea CSDT7BL (**Tabla 6**).

En cambio, en el exudado floemático, si bien los aminoácidos más abundantes resultaron los mismos en las dos líneas, la concentración de algunos de ellos resultó altamente reducida en la línea ditelosómica. La proporción en que cada uno de estos se vio disminuida es la siguiente: 52.3 % Glu, 49.2 % Asp, 50.5 % Gln, 35.4 % Tyr, 100 % Phe, 58.8 % Ile, 43.7 % Val, 70.9 % Gly y 24.3 % Ala (**Tabla 6**).

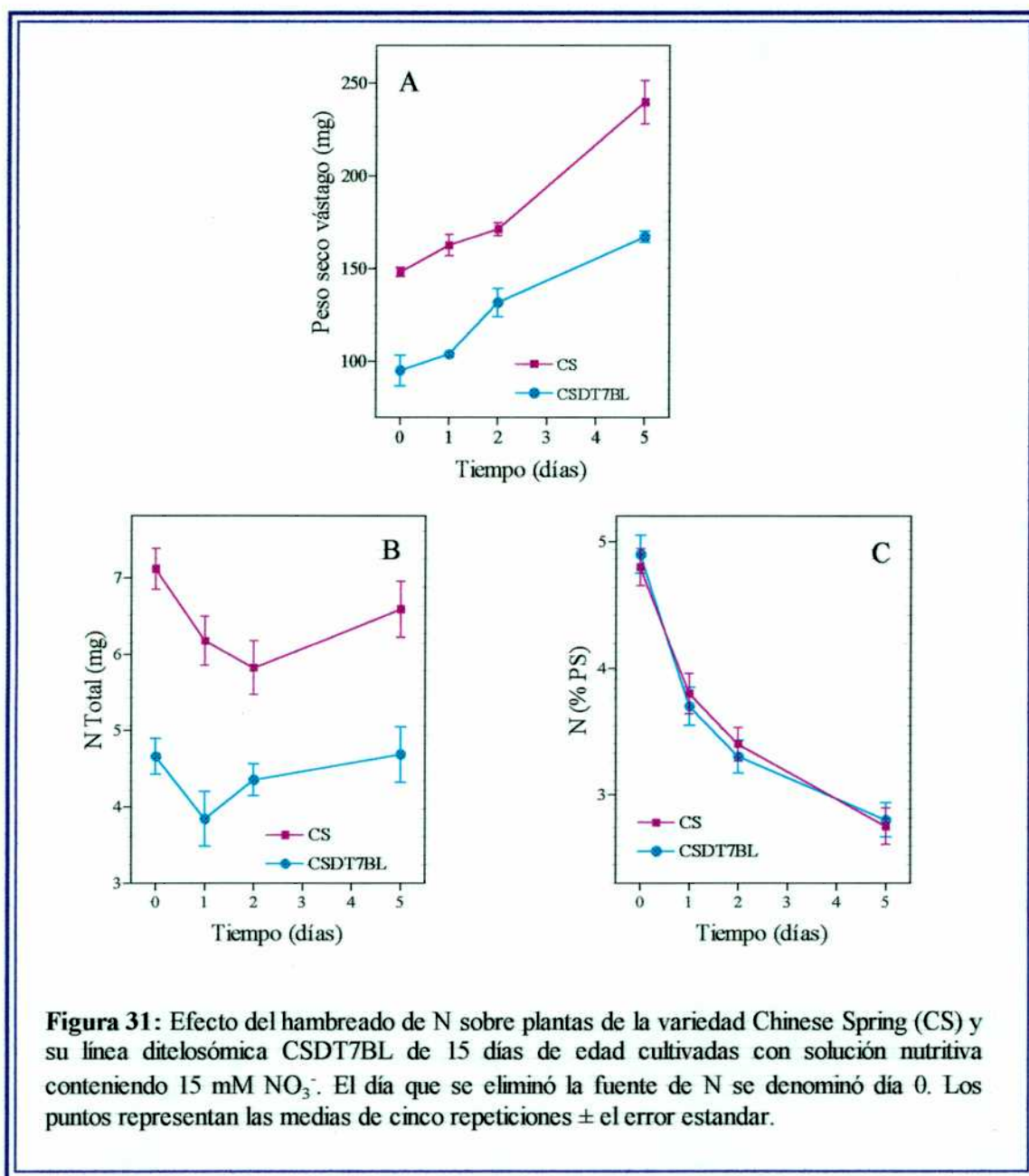
Efectos del Hambreado de Nitrógeno sobre la Exportación de Aminoácidos al Floema de Plantas de las Líneas CSDT7BL y Euploide

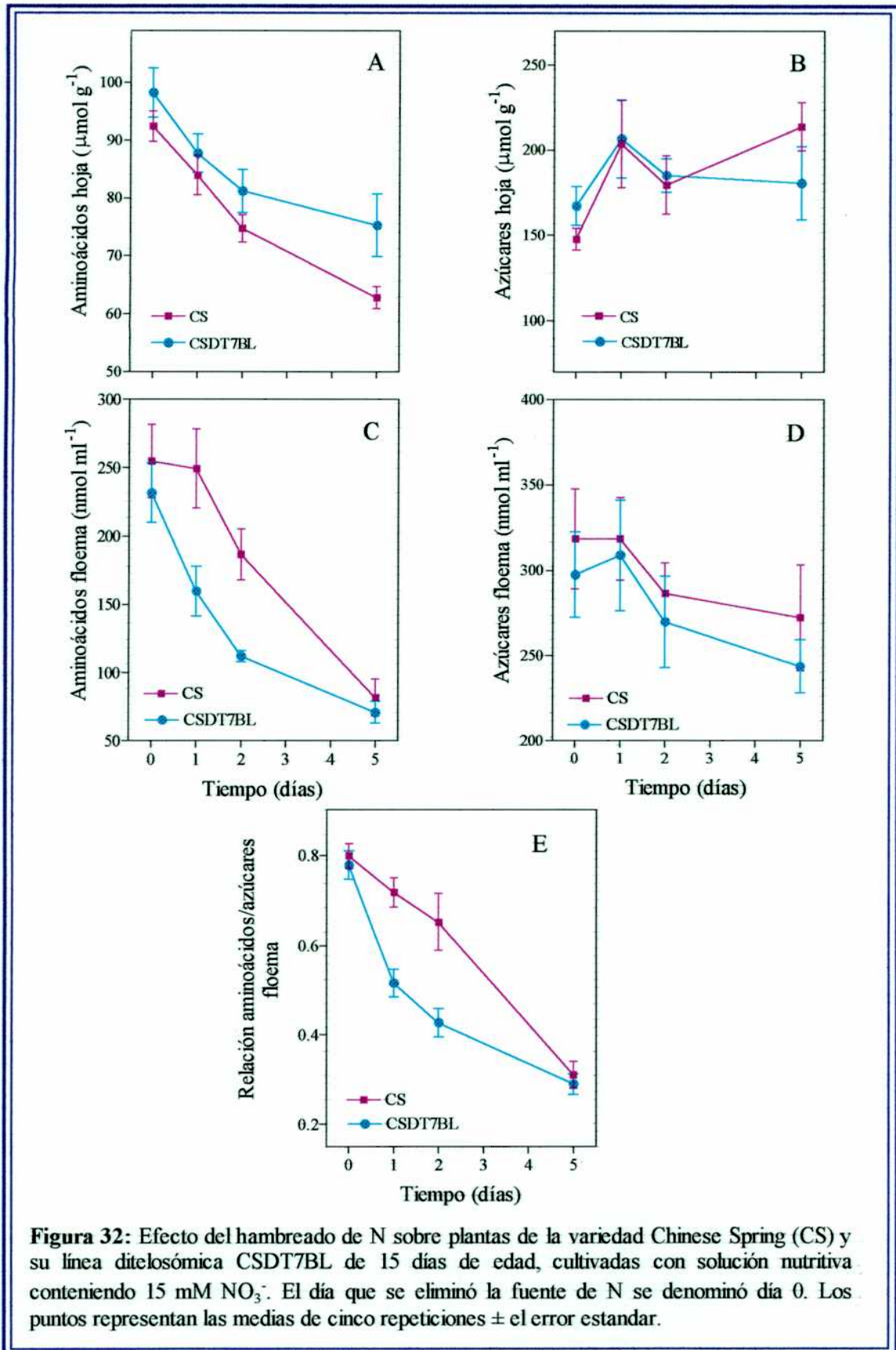
A continuación se procedió a estudiar la respuesta a un estrés nitrogenado, para esto se cultivaron con alto suministro de N (15.0 mM KNO_3) las plantas de ambas líneas durante 15 días. Transcurrido ese tiempo se eliminó el nitrógeno de la solución de regado (día 0) y se permitió que continuaran su crecimiento por 5 días más, durante los cuales se realizaron muestreos de los exudados floemáticos 10 hojas, las hojas y lo remanente de los vástagos, para las determinaciones posteriores de aminoácidos, azúcares, nitrógeno, nitrato y peso.

Aminoácido	Hojas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)		Exudados floemáticos (nmol ml^{-1})	
	CS	CSDT7BL	CS	CSDT7BL
Ala	13.6 \pm 1.1	11.3 \pm 1.2	13.7 \pm 0.9	10.4 \pm 0.8*
Arg	1.5 \pm 0.0	0.8 \pm 0.4	0.3 \pm 0.3	ND
Asn	0.9 \pm 0.1	ND*	ND	ND
Asp	33.2 \pm 3.2	25.4 \pm 3.5	28.6 \pm 1.8	14.6 \pm 0.4**
Cys-Cys	ND	ND	ND	ND
Gln	13.6 \pm 1.2	18.8 \pm 3.5	18.9 \pm 4.7	9.4 \pm 0.2*
Glu	36.6 \pm 3.9	23.8 \pm 6.0	62.0 \pm 2.7	29.6 \pm 1.5**
Gly	ND	ND	2.7 \pm 1.4	0.8 \pm 0.8
His	ND	ND	ND	ND
Ile	2.0 \pm 0.5	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.02	0.5 \pm 0.04*
Leu	2.5 \pm 0.7	2.8 \pm 0.5	11.6 \pm 1.5	13.0 \pm 1.8
Lys	1.2 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	0.52 \pm 0.1
Met	0.7 \pm 0.7	2.0 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0
Phe	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.9 \pm 0.3	ND*
Pro	1.5 \pm 0.0	1.33 \pm 0.1	ND	ND
Ser	10.4 \pm 0.7	28.5 \pm 5.1*	23.2 \pm 1.8	25.0 \pm 2.5
Thr	24.8 \pm 1.7	25.2 \pm 3.6	15.2 \pm 1.4	10.6 \pm 0.9*
Trp	2.4 \pm 0.7	1.9 \pm 0.1	0.4 \pm 0.4	0.4 \pm 0.4
Tyr	6.7 \pm 0.1	6.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1*
Val	2.0 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	3.2 \pm 0.3	1.8 \pm 0.1*
TOTAL	154.5 \pm 1.7	153.2 \pm 22.4	186.0 \pm 13.5	117.6 \pm 5.0**

Tabla 6: Composición de aminoácidos en las hojas y sus exudados floemáticos obtenidos de 20 hojas completamente expandidas de plantas de la variedad CS y su línea CSDT7BL, cultivadas por 15 días con solución nutritiva conteniendo 15.0 mM NO₃⁻. Los valores representan las medias de tres repeticiones \pm el error estándar. ND, No detectable. Los asteriscos indican diferencias significativas de: * p < 0.05; y ** p < 0.01.

Cuando las plantas de ambas líneas, que estaban creciendo en condiciones óptimas de nitrógeno sufrieron un hambreado del mismo de la solución nutritiva, el contenido total de nitrógeno permaneció constante durante los 5 días ensayados (**Figura 31 B**). Sin embargo se observó un aumento en la biomasa del vástago a lo largo de este período (**Figura 31 A**), en ambos parámetros los valores obtenidos con las plantas CS fueron inferiores a las CSDT7BL. Como consecuencia, se observó una disminución continua de la concentración de nitrógeno total de los vástagos de ambas líneas (**Figura 31 C**).





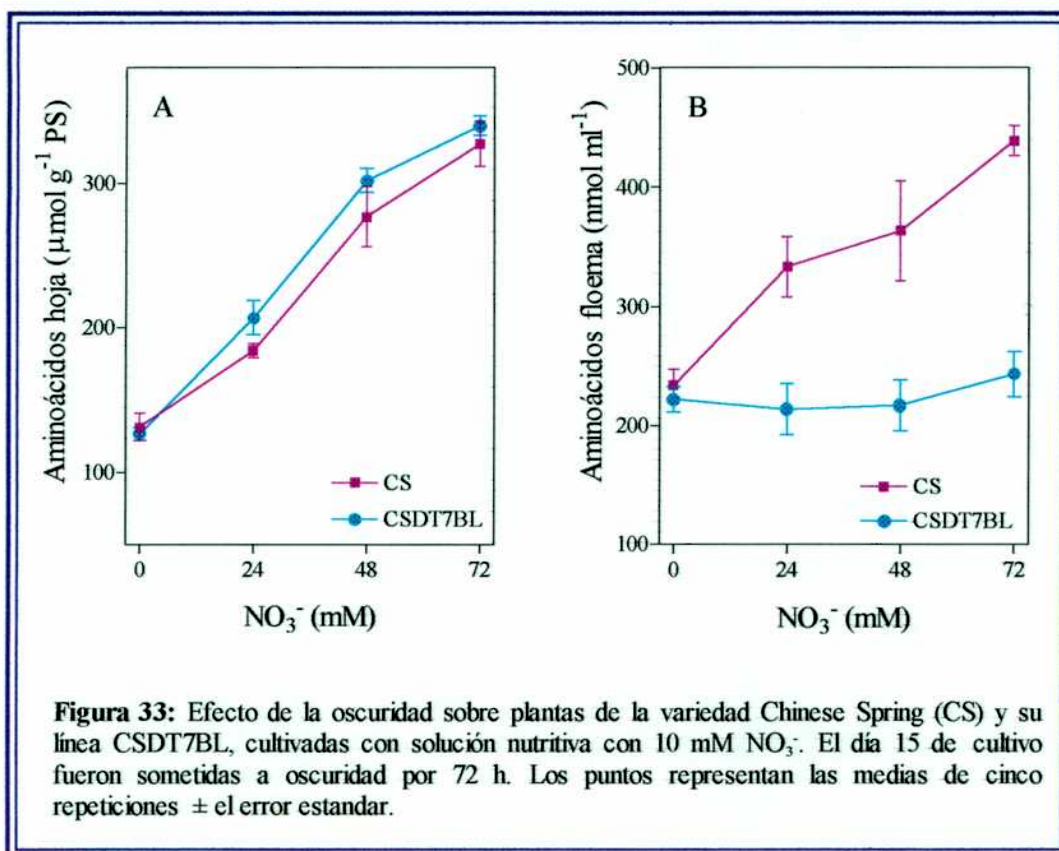
La concentración de nitrato en los tejidos disminuyó durante los primeros días, para permanecer constante a una concentración muy baja de ahí en más, sin diferencias entre las líneas (dato no mostrado). La concentración de aminoácidos en las hojas de las dos líneas fue disminuyendo hasta el último día que se analizó, alcanzando una concentración menor en las plantas CS (**Figura 32 A**). En lo que respecta a la concentración de aminoácidos en los exudados floemáticos también se observó una caída hasta el quinto día, aunque durante los dos primeros días ésta fue significativamente mayor en las plantas de la línea CSDT7BL (**Figura 32 C**), mientras que en las plantas CS la disminución comenzó recién luego del primer día, llegando al quinto día al mismo valor que las CSDT7BL (**Figura 32 C**).

Por el contrario, la concentración de azúcares tanto en las hojas como en la solución de exudación del floema no se vieron afectadas por la ausencia de N para el crecimiento, en ninguna de las líneas (**Figura 32 B, D**). Consecuentemente, la relación aminoácidos/azúcares exportados al floema disminuyó desde el primer momento en las plantas CSDT7BL, evidenciando la incapacidad de estas plantas de regular el nivel de exportación de aminoácidos ante un estrés nitrogenado, mientras que las plantas CS lograron mantenerlo al menos durante los dos primeros días (**Figura 32 E**).

Relación entre un Estrés Inducido por Oscuridad Continua y la Exportación de Aminoácidos al Floema de Plantas de las Líneas CSDT7BL y Euploide

Como se vio con anterioridad, en las plantas sometidas a oscuridad continua se produce un gran aumento tanto en la concentración de aminoácidos en las hojas como en el exudado floemático por lo tanto en este último ensayo, se decidió estudiar la habilidad de las plantas de la línea CSDT7BL para responder al estrés lumínico. Se sometieron entonces plantas de 15 días de edad de ambas variedades, cultivadas en condiciones óptimas de nitrógeno (10 mM NO₃K) a un período de 72 hs de oscuridad. Cada 24 horas desde que se las pasó a oscuridad se coleccionaron los exudados floemáticos y las 10 hojas por muestra, que se analizaron para el contenido de aminoácidos.

Como resultado de las 72 h de oscuridad la concentración de aminoácidos en las hojas de las dos líneas, alcanzó un valor tres veces superior al de la hora cero (**Figura 33 A**). Un comportamiento similar se observó con la cantidad de aminoácidos exportados al floema de las plantas CS, en la que arribó finalmente a un valor del doble del obtenido al iniciar el ensayo. Por el contrario el nivel de exudación de las CSDT7BL permaneció inalterado durante todo el tiempo transcurrido en oscuridad (**Figura 33 B**).



Discusión

En los experimentos llevados a cabo en el campo (Fatta *et al.*, 2000) y en invernáculo (Caputo *et al.*, sin publicar), la línea ditelosómica mostró pequeñas diferencias en peso y rendimiento de grano con respecto a la euploide. Sin embargo, en los ensayos en cámara de cultivo, durante las primeras etapas del crecimiento, bajo condiciones controladas, la línea ditelosómica presentó un peso reducido en un 40 % (**Figura 27 A**). Estas diferencias ya han sido observadas con anterioridad en otros parámetros fisiológicos, los que bajo condiciones ambientales controladas se ven

amplificados con respecto a lo obtenido en el campo (Barneix *et al.*, 1985; Dubcovsky *et al.*, 1996), donde el suplemento de N se espera que sea bajo, y por lo tanto un impedimento metabólico puede dejar de ser el factor limitante para el crecimiento.

En cuanto a la capacidad de utilización del nitrógeno, ambas líneas mostraron tener una tasa de absorción de N similar, al igual que la misma concentración de nitrato y N total en los tejidos (**Figura 27 C y 28 A B**). Lo mismo ocurrió con la actividad de la enzima NR, la concentración de proteínas solubles y la concentración de aminoácidos en las hojas (**Figura 28 C, D y 29 A**). Sin embargo, las plantas CS generaron una biomasa mayor y acumularon más cantidad de N total cuando estuvieron suplementadas con una alta disponibilidad de N (**Figura 27 A, B**). Más aún, la tasa de exportación de aminoácidos al floema se comportó completamente diferente entre las dos líneas, en las plantas CSDT7BL no se vio afectada a distintas disponibilidades de N en el medio, y permaneció al mismo nivel que en las plantas CS suplementadas solo con 5 mM NO₃⁻, las que estuvieron altamente influenciadas por el suplemento de N (**Figura 29 C**), aunque la tasa de exportación de azúcares permaneció inalterada en el mismo valor para las dos líneas (**Figura 29 D**), permitiendo suponer que la falta de aumento en la exportación de aminoácidos no es consecuencia de una disminución en el volumen de exudación, debido al menor tamaño de las plantas CSDT7BL.

Las plantas con la proteólisis inducida por un estrés lumínico, aumentan la concentración de aminoácidos tanto en las hojas como en los exudados floemáticos, por tanto luego de varias horas de oscuridad, las plantas de ambas líneas acumularon aminoácidos en las hojas, pero sorprendentemente solo las CS aumentaron su concentración en el exudado floemático, mientras que en las CSDT7BL permaneció en todo momento al nivel inicial (**Figura 33 A, B**). Por otro lado, en el ensayo de privación de la fuente nitrogenada, la concentración de aminoácidos en el floema cayó con más rapidez en las CSDT7BL que en las CS (**Figura 32 C**), aunque no se observaron diferencias entre genotipos ni en la disminución de los aminoácidos acumulados en las hojas (**Figura 32 A**), ni en el comportamiento de los azúcares exportados al floema (**Figura 32 D**).

Los aminoácidos más abundantes en el floema de trigo son el glutámico, el aspártico y la serina (ver ensayos con la variedad Klein Chamaco, Peeters & van Laere, 1994; Hayashi & Chino, 1986; Fisher & Macnicol, 1986). Y en los exudados

floemáticos de las plantas de las dos líneas estos fueron efectivamente los más abundantes, pero la concentración de algunos aminoácidos en las plantas CSDT7BL fue de la mitad o menos aún del valor obtenido en las plantas CS, mientras que para otros aminoácidos la concentración obtenida en ambas líneas fue similar, no correlacionándose con la cantidad de cada aminoácido en los tejidos (**Tabla 6**). Estos resultados indican la existencia de algún tipo de discriminación para el transporte de algunos aminoácidos, los que serían los responsables de la menor concentración observada en el exudado floemático de las plantas CSDT7BL.

El conjunto de los resultados obtenidos con las plantas en estado vegetativo, sugiere que la línea CSDT7BL posee una deficiencia en la exportación de aminoácidos al floema, siendo ésta, la única diferencia en la utilización del nitrógeno entre ambas líneas. Esta deficiencia se manifiesta en altas disponibilidades de N, porque claramente en las CSDT7BL la exportación de aminoácidos alcanza una meseta a una concentración externa de nitrógeno menor que las CS y no parece depender de la forma en que éste se suministre (nitrato o amonio). Esta deficiencia, que se observó en todos los experimentos realizados, sugiere que en el brazo corto del cromosoma 7B existe información importante para dicho proceso, que no puede ser subsanada totalmente por la información codificada en los cromosomas homeólogos.

Dada la correlación positiva observada en las plantas cultivadas en el campo es factible suponer que la menor concentración de aminoácidos en el exudado floemático de las hojas banderas es la causante de la disminución en la concentración de proteínas en el grano maduro. Esta conclusión se ve avalada por un estudio que se llevó a cabo con tres variedades de *Brassica* sp. con una gran dispersión en el contenido de proteínas en grano, donde también se observó una alta correlación positiva entre estos dos parámetros (Lohaus & Moellers, 2000).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

En lo que respecta a la regulación de la exportación de aminoácidos al floema, los ensayos llevados a cabo a lo largo de este trabajo indican que:

- En un estado de crecimiento estacionario, el *pool* de exportación de aminoácidos al floema proviene preferentemente del nitrógeno recientemente reducido, mientras que en situaciones de estrés este *pool* se provee de los aminoácidos almacenados previamente en las hojas o de los derivados de la proteólisis.
- Existe independencia entre la tasa de exportación de aminoácidos y la de azúcares al floema, y por lo tanto la relación aminoácidos / azúcares se ve modificada según las condiciones de crecimiento a las que se encuentren sujetas las plantas.
- Las citocininas poseen un efecto promotor de la exportación de aminoácidos al floema que sería dependiente de la disponibilidad de N.

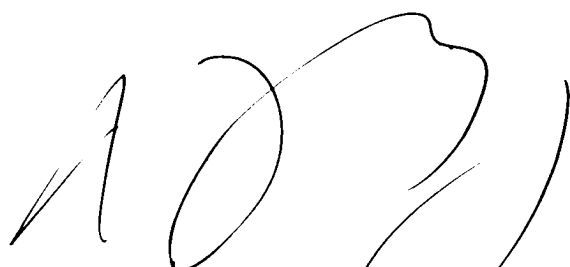
En lo referente al estudio de la línea ditelosómica CSDT7BL de la variedad Chinese Spring, encontramos que:

- Esta línea posee una deficiencia para la exportación de aminoácidos al floema que se manifiesta con alta disponibilidad de N y pareciera ser independientemente de la fuente nitrogenada aportada. Que genera una disminución de la removilización de los compuestos nitrogenados desde los tejidos fuente, hacia los destino..
- Esta deficiencia podría ser la causante de la menor concentración final de proteínas que se obtiene en el grano maduro.

Perspectivas

Como los resultados obtenidos con la línea ditelosómica CSDT7BL indican que posee una deficiencia para la exportación de algunos aminoácidos desde los órganos fuente hacia el floema, y dado que esta exportación requiere de la actividad de transportadores de aminoácidos, que mediante su regulación son puntos clave para el control de la removilización de los compuestos nitrogenados, sería razonable comenzar el estudio de la regulación de la expresión de los transportadores de aminoácidos de trigo, comenzando con el aislamiento y caracterización de secuencias homólogas a transportadores de aminoácidos de otras especies.

Por otro lado dada la correlación positiva encontrada entre las proteínas en grano y los aminoácidos exportados al floema en las plantas de la variedad Chinese Spring y su línea ditelosómica, sería interesante emprender ensayos a campo con una diversidad de variedades de trigo abarcando cultivares de alta y baja proteína, con una diversidad de suministros de nitrógeno, con el objetivo de estudiar el contenido de aminoácidos en el exudado floemático obtenido de hojas bandera a lo largo del llenado de los granos, como medio para discernir si la correlación positiva observada es una consecuencia de la deficiencia sufrida por la línea CSDT7BL o si se trata de un comportamiento generalizado.



DR. ATILIO BARNEIX
INVEST. INDEP.



BIBLIOGRAFÍA

- Agrell D; Oscarson P; Larsson C-M. 1994. Translocation of N to and from barley roots: its dependence on local nitrate supply in split-root culture. - *Physiol. Plant.* 90: 467-474.
- Balachandran ES; Xiang Y; Schobert C; Thompson GA; Lucas WJ. 1997. Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. - *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 14150-14155.
- Barlow CWRO; Donovan GR; Lee JW. 1983. Water relations and composition of wheat ears grow in liquid culture: effect of carbon and nitrogen. - *Aust. J. Plant Physiol.* 10: 99-108.
- Barneix AJ; Arnozis PA; Guitman MR. 1992. The Regulation of Nitrogen Accumulation in the Grain of Wheat Plants (*Triticum aestivum* L.). - *Physiol. Plant.* 86: 609-615.
- Barneix AJ; Causin HF. 1996. The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. - *J. Plant Physiol.* 149: 358-352.
- Barneix AJ; Fatta N; Kade M; Pfluger L; Suárez EY. 1998. Effect of Wheat Chromosome 7BS on Grain Protein Concentration. - *Cereal Res. Comm.* 26 (1): 101-106.
- Barneix AJ, James DM; Watson EF; Hewitt EJ. 1984. Some effects of nitrate abundance and starvation on metabolism and accumulation of nitrogen in barley (*Hordeum vulgare* cv. Sonja). - *Planta* 162: 465-476.
- Barneix AJ, James DM; Watson EF; Hewitt E.J. 1985. Growth of nitrate reductase deficient mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) with different nitrogen supplies. - *Ann. Bot.* 56: 711-718.
- Beniani NF; Busch RH. 1992: Grain protein inheritance and nitrogen uptake and redistribution in a spring wheat cross. - *Crop Sci.* 32: 1471-1475.
- Berecz K; Ragasits I. 1993. Effect of N fertilization on N-content in vegetative parts of wheat during grain development. - *Acta Agro. Hung.* 42: 303-309.
- Botha CE; Cross RHM. 1997. Plasmodesmata frequency in relation to short-distance transport and phloem loading in leaves of barley (*Hordeum vulgare*). Phloem is not loaded directly from the symplast. - *Physiol. Plant.* 99: 355-362.
- Bottacin A; Dal Canal AM; Malagoli M; Quaggiotti S; Ferrari G. 1999. Uptake of nitrate, ammonium, and Sulfate by seedlings of two conifer species: the deciduous larch and the evergreen Scots pine. *In: Plant Nutrition - Molecular Biology and Genetics.* G. Gissel-Nielsen and A. Jensen (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 35-38.
- Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. -*J. Exp. Bot.* 48 (307): 181-199.
- Cameron KC; Haynes RJ. 1986. Retention and Movement of Nitrogen in Soils. *In: Mineral nitrogen in the plant-soil system.* By R.J. Haynes. Academic Press New York. Chap 4 pp 166-220.

- Cattaldo DA; Haroon M; Schrader LE; Young VL. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. - *Commun. Soil. Sci. Plant Ann.* 6: 71-80.
- Cooper HD; Clarkson DT. 1989. Cycling of amino - nitrogen and other nutrients between shoot to root in cereals - a possible mechanism integrating shoot to root in the regulation of nutrient uptake. - *J. Exp. Bot.* 40: 753-762.
- Cooper HD; Clarkson DT; Johnson MG; Whiteway JN; Loughman BC. 1986. Cycling of amino-nitrogen between shoots and roots in wheat seedlings. *In: Fundamental ecological and agricultural aspect of nitrogen metabolism in higher plants.* H. Lambers, J.J. Neetson and I. Stulen (Eds.) ISBN 90 247 3258 1. - pp. 97-100.
- Corke H; Atsman D. 1988. Effect of nitrogen nutrition on endosperm protein synthesis in wild and cultivated barley grown in spike culture. - *Plant Physiol.* 87: 523-528.
- Cregan PB; van Berkum P. 1984. Genetic of nitrogen metabolism and physiological / biochemical selection for increased grain crop productivity. - *Theor. Appl. Genet.* 67: 97-111.
- Cronshaw J. 1981. Phloem structure and function. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 465-484.
- Chapin FS III; Schulze ED; Mooney HA. 1990. The ecology and economics of storage in plants. - *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 21: 423-447.
- Chen CM; Ertl JR, Leisner SM; Chang CC. 1985. Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. - *Plant Physiol.* 78: 510-513.
- Chino M; Hayashi H; Nakamura S; Oshima T; Turner H; Sabnis D; Borkovec V; Baker D; Girousse G; Bonnemain CL; Delrot S. 1991. Phloem sap composition. *In: Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation.* J.L. Bonnemain, S. Delrot, W.J. Lucas and J. Dainty (Eds). Ouest Editions, Nantes Cedex. ISBN 2 908261 61 8. pp 64-73.
- Dalling MJ. 1985. The physiological basis of nitrogen redistribution during grain filling in cereals. *In: Exploitation of physiological and genetic variability to enhance crop productivity.* J.D. Harper, L.E. Schrader and R.W. Howell (Eds.) New York: American Society of Plant Physiology, pp 55-69.
- Dannenhoffer JM; Schulz A; Skaggs MI; Boostwick DE; Thompson GA. 1997. Expression of the phloem lectin is developmentally linked to vascular differentiation in cucurbits. - *Planta* 201: 405-414.
- Darrall NM; Wareing PF. 1981. The effect of nitrogen nutrition on cytokinin activity and free amino acids in *Betula pendula* Roth. and *Acer pseudoplatanus* L. - *J. Exp. Bot.* 32: 369-379.
- Dietz K-J; Jäger R.; Kaiser G; Martinoia E. 1990. Amino Acid Transport across the Tonoplast of Vacuoles Isolated from Barley Mesophyll Protoplasts. Uptake of alanine, leucine and glutamine. - *Plant Physiol.* 92: 123-129.

- Donovan GR; Lee JW. 1977. The growth of detached wheat heads in liquid culture. - J. Plant Sci. Lett. 9: 107-113.
- Dubkovsky J; Santa María G; Epstein E. 1996. Mapping of the K⁺/Na⁺ discrimination locus *Knal* in wheat. - Theor. Appl. Genet. 92: 448-454.
- Escherich W; Fromm J. 1994. Evidence for two pathways of phloem loading. - Physiol. Plant. 90: 699-707.
- Essau K. 1969. The phloem. In: *Encyclopedia of Plant Anatomy*. W. Zimmermann; P Ozenda; HD Wulff (Eds.). Borntraeger, Berlin. Vol 5.
- Evert RF; Russin WA; Botha CEJ. 1996. Distribution and frequency of plasmodesmata in relation to photoassimilate pathways and phloem loading in Barley leaf. - Planta 198: 572-579.
- Fatta N; Caputo C; Barneix J. 2000. The absence of the short arm of chromosome 7B produces inhibition of N mobilization and decreases grain protein concentration in wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chinese spring. - Agronomy 20: 423-430.
- Febvay G; Bonnin J; Rabbe Y; Bournoville R; Delrot S; Bonnemain JL. 1988. Resistance of different lucerne cultivars to the aphid *Acyrtosiphon pisum*: influence of phloem composition on aphid fecundity. - Entomol. Exp. Appl. 48: 127-134.
- Feller U; Fischer A. 1994. Nitrogen Metabolism in senescing leaves. - Crit. Rev. Plant Sci. 13 (3): 241-273.
- Fernandes MS; Rossiello ROP. 1995. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. - Crit. Rev. Plant Sci. 14: 111-148.
- Fischer DB; Frame JM. 1984. A guide to the use of the exuding-stylet technique in phloem physiology. - Planta 161: 385-393.
- Fisher DB; Macnicol PK. 1986. Amino Acid Composition Along the Transport Pathway during Grain Filling in Wheat. - Plant Physiol. 82: 1019-1023.
- Fisher DB; Wu Y; Ku MSB. 1992. Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. - Plant Physiol 100: 1433-1441.
- Fisher WN; André B; Rentsch D; Krolkiewicz S; Tegeder M; Breitzkreuz F; Frommer WB. 1998. Amino acid transport in plants. Trends in Plant Sci. 3: 188-195.
- Fisher WN; Kwart M; Hummel S; Frommer WB. 1995. Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. - J. Biol. Chem. 270: 16315-16320.
- Frommer WB; Kwart M; Hirner B; Fischer WN; Hummel S; Ninnemann O. 1994. Transporters for nitrogenous compounds in plants. - Plant Molec. Biol. 26: 1651-1670.
- Frommer WB; Hummel S; Riesmeier JW. 1993. Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 5944-5948.

- Fukuda A; Ishiwatari Y; Abe K; Chino M; Fujiwara T; Hayashi H. 1999. Control of protein content in the rice phloem sap. *In Plant Nutrition - Molecular Biology and Genetics*. G. Gissel-Nielsen and A. Jensen (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands pp 39-45.
- Gamalei YV. 1985. Characteristics of phloem loading in woody and herbaceous plants. - *Sov. Plant Physiol.* 32: 656-665.
- Giaquinta RT. 1983. Phloem loading of sucrose. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34: 347-387.
- Girousse C; Bonnemain JL; Delrot S; Bournouille R. 1991. Sugar and amino acid composition of phloem sap of *Medicago sativa*: a comparative study of two collecting methods. - *Plant Physiol. Biochem.* 29 (1): 41-48.
- Glass ADM; Erner Y; Hunt T; Kronzucker HJ; Okamoto M; Rawat S; Silim S; Schjoerring JK; Siddiqi Y; Vidmar JJ; Wang MY; Zhuo D. 1999. Inorganic nitrogen absorption by plants roots. *Physiology and Molecular Biology. In Plant Nutrition - Molecular Biology and Genetics*. G. Gissel-Nielsen and A. Jensen (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands pp 1-16.
- Gojon A; Plassard C; Bussi C. 1994. Root/shoot distribution of NO_3^- assimilation in herbaceous and woody species. *In A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. J. Roy and E. Garnier (Eds). SPB Academic Pub. The Hague. ISBN 90-5103-086X . pp. 131-147.
- Hanson SD; Cohen JD. 1985. A technique for collection of exudate from Pea seedlings. - *Plant Physiol.* 78: 734-738.
- Hayashi H; Chino M. 1985. Nitrate and Other Anions in the Rice Phloem Sap. - *Plant Cell Physiol.* 26 (2): 325-330.
- Hayashi H; Chino M. 1986. Collection of pure phloem sap from wheat and its chemical composition. - *Plant Cell Physiol.* 27 (7): 1387-1393.
- Hayashi H; Nakamura S; Ishiwatari Y; Mori S; Chino M. 1993. Changes in the amino acid composition and protein modification in the phloem sap of rice. - *Plant, Soil* 155/156: 171-174.
- Haynes RJ. 1986. Mineral nitrogen in the plant-soil system. Academic Press New York.
- Haynes RJ; Goh KM. 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants. - *Biol. Rev.* 53: 465-510.
- Heilmeyer H; Monson RK. 1994. Carbon and nitrogen storage in herbaceous plants. *In: A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. J. Roy and E. Garnier (Eds.) SPB Academic Pub. The Hague. ISBN 90-5103-086X . pp. 149-171.
- Hendrix JE. 1983. Phloem function; an integrated view. - *What's New in Plant Physiol.* 14 (12): 45-48.
- Hoagland DR; Arnon DI. 1950. The water - culture method for growing plants without soil. - *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 347: 1-39.

- Huffaker RC. 1990. Proteolytic activity during senescence of plants. - *New Phytol.* 116: 199-231.
- Imsande J; Touraine B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. - *Plant Physiol.* 105: 3-7.
- Ingestad T; Ågren GI. 1995. Plant nutrition and growth: Basic principles. - *Plant, Soil.* 168/169: 15.
- Ishiwatari Y; Fujiwara T; McFarland KC; Nemoto H; Chino M; Lucas WJ. 1998. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. - *Planta* 205: 12-22.
- Jaworsky EG. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissue. - *Biochem Biophys. Res. Comm.* 43: 1274-1279.
- Johnson VA; Mattern PJ; Schmidt JW. 1967. Nitrogen Relation During Spring Growth in Varieties of *Triticum aestivum* L. Differing in Grain Protein Content. - *Crop Sci.* 7: 664-667.
- Kamínek M. 1992. Progress in cytokinin research. - *TIBTECH* 10:159-164.
- Khan K; Frohberg R; Olson T; Huckle L. 1989. Inheritance of Gluten Protein Components of High-Protein Hard Red Spring Wheat Lines Derived from *Triticum turgidum* var. *Dicoccoides*. - *Cereal Chim.* 66 (4): 397-401.
- King RW; Zeevaart JAD. 1974. Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. - *Plant Physiol.* 53: 96-103.
- Knoblauch M; van Bel AJE. 1998. Sieve tubes in action. - *The Plant Cell.* 10: 35-50.
- Konzak CF. 1977. Genetic control of the content, amino acid composition, and processing properties of proteins in wheat. - *Adv. Genetics* 19:407-582.
- Kuiper D, Schuit J; Kuiper PJC. 1988. - Effects of mineral and external cytokinin concentrations on root growth and shoot to root ratio of *Plantago major* ssp. *Pleiosperma* at different nutrient conditions. - *Plant, Soil* 111: 231-236.
- Kwart M; Herner B; Hummel S; Frommer WB. 1993. Differential expression of two related amino acid transporters with differing substrate specificity in *Arabidopsis thaliana*. - *Plant J.* 4: 993-1002.
- Law CN; Brown JWS. 1977. The co-operative program to grain protein differences among ditelocentric lines of the wheat variety Chinese Spring. IAEA-RC-66/1: 427-441.
- Layzell DB; La Rue TA. 1982. Modeling Carbon and Nitrogen transport to developing soybean fruit. - *Plant Physiol.* 700: 1290-1298.
- Lee RB; Drew MC. 1989. Rapid, Reversible Inhibition of Nitrate Influx in Barley by Ammonium. - *J. Exp. Bot.* 40 (216): 741-752.
- Lemcoff JH; Loomis RS. 1986. Nitrogen influences on yield determination in maize. - *Crop Sci.* 26: 1017-1022.

- Lexa M; Cheeseman JM. 1999. Genetic manipulation of the location of nitrate reduction and its effect on plant growth. *In Plant Nutrition - Molecular Biology and Genetics*. G. Gissel-Nielsen and A. Jensen (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 59-63.
- Lillo C. 1994. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. - *Physiol. Plant.* 90: 616-620.
- Lohaus G; Burba M; Heldt HW. 1994. Comparison of the contents of sucrose and amino acids in the leaves, phloem sap and taproots of high and low sugar-producing hybrids of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). - *J. Exp. Bot.* 45: 1097-1101.
- Lohaus G; Heldt HW. 1997. Assimilation of gaseous ammonia and the transport of its products in barley and spinach leaves.- *J. Exp. Bot.* 48 (315): 1779-1786.
- Lohaus G; Moellers C. 2000. Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. Genotypes and one *B. Carinata* genotype in relation to their seed protein content. - *Planta* 211 (6): 833-840.
- Lowry OH; Rosebrough MJ; Farr AL; Randall RJ. 1951. Protein measurement with Follin phenol reagent. - *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lucas WJ; Bouché-Pillon S; Jackson DP; Nguyen L; Baker L; Ding B; Hake S. 1995. Selective Trafficking of KNOTTED1 Homeodomain Protein and its mRNA Through Plasmodesmata. - *Science* 270: 1980-1983.
- Millard P. 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. - *Plant Cell Env.* 11: 1-8.
- Moing A; Carbonne F; Zipperlin B; Svanella L; Gaudillere JP. 1997. Phloem loading in peach: Symplastic or apoplastic?. - *Physiol. Plant.* 101: 489-496.
- Muller B; Touraine B. 1992. Inhibition of NO₃⁻ uptake by various phloem translocated amino acids in soybean. - *J. Exp. Bot.* 43 (250): 617-623.
- Nakamura S-I; Hayashi H; Mori S; Chino M. 1993. Protein phosphorylation in the sieve tubes of rice plants. - *Plant Cell Physiol.* 34 (6): 927-933.
- Ninnemann O; Jauniaux JC; Frommer WB. 1994. Identification of a high affinity NH₄⁺ transporter from plants. *EMBO J.* 13: 3464-3471.
- Noodén LD. 1988. Whole plant senescence. *In: Senescence and Aging in Plants*. L.D. Noodén and A.C. Leopold, (Eds.) Academic Press, San Diego pp 391-439.
- Noodén LD; Singh S; Letham DS. 1990. Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. - *Plant Physiol.* 93: 33-39.
- Oaks A. 1994. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. - *Can. J. Bot.* 72 (6): 739-750.
- Orlich G. 1998. Analysis of the driving forces of phloem transport in *Ricinus* seedlings: sucrose export and volume flow are determined by the source. - *Planta* 206: 266-271.

- Parker ML. 1980. Protein body inclusions in developing wheat endosperm. - *Ann. Bot.* 46: 29-36.
- Pate JS. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 313-340.
- Paul EA; Clark FE. 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Inc. San Diego.
- Peeters KMU; Van Laere AJ. 1994. Amino acid metabolism associated within N-mobilization from the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum L.*) during grain development. - *Plant Cell Env.* 17: 131-141.
- Pilgrim ML; Caspar T; Quail PH; McClung CR. 1993. Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. - *Plant. Molec. Biol.* 23: 349-364.
- Powlson DS. 1993. Understanding the soil nitrogen cycle. - *Soil Use, Manag.* 9 (3): 86-94.
- Rabe E. 1993. Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. *In: Handbook of plant and crop stress*. M. Pessarakli (Ed.) Marcel Dekker, Inc. N.Y. ISBN 0-8247-8987-3. pp. 261-276.
- Rentsch D; Frommer D. 1996. Molecular approaches towards an understanding of loading and unloading of assimilates in higher plants. - *J. Exp. Bot.* 47: 1199-1204.
- Riens B; Lohaus G; Heineke D; Heldt HW. 1991. Amino acids and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartment and in the phloem sap of spinach leaves. - *Plant Physiol.* 97: 227-233.
- Riesmeier JW; Hirner B; Frommer WB. 1993. Potato Sucrose Transporter Expression in minor Veins indicates a role in Phloem Loading. - *The Plant Cell.* 5: 1591-1598.
- Riesmeier JW; Willmitzer L; Frommer WB. 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. - *EMBO J.* 11: 4705-4713.
- Rodgers CO; Barneix AJ. 1988. Cultivar differences in the rate of nitrate uptake by intact wheat plants as related to growth rate. - *Physiol. Plant.* 72: 121-126.
- Rodgers CO; Barneix AJ. 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.
- Rooney JM. 1994. The carbon and nitrogen dependence of plant development. *In: A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. J. Roy and E. Garnier (Eds.) SPB Academic Pub. The Hague. ISBN 90-5103-086X . pp. 131-147.
- Rouby M; Ponce-Villacís F; Córdoba A; Kenis J. 1995. Regulation of Nitrate Reductase Activity by Nitrate during Light-Dark Transition in Detached Oat Leaves. - *Plant Cell Physiol.* 36 (7): 1399-1403.

- Sakano K; Tazawa M. 1984. Intracellular distribution of free amino acids between the vacuolar and extravacuolar compartments in internodal cells of *Chara australis*. *Plant Cell Physiol.* 25 (8):1477-1486.
- Simpson RJ. 1986. Translocation and metabolism of nitrogen: Whole plant aspect. *In: Fundamental ecological and agricultural aspect of nitrogen metabolism in higher plants*. H. Lambers, J.J. Neetson and I. Stulen (Eds.) ISBN 90 247 3258 1. - pp. 71-96.
- Simpson RJ; Dalling MJ. 1981. Nitrogen Redistribution During Growth in Wheat (*Triticum aestivum* L.). III. Enzymology and transport of amino acids from senescing leaves. - *Planta* 151: 447-456.
- Simpson RJ; Lambers H; Dalling M.J. 1983. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). IV. Development of a quantitative model of the translocation of nitrogen to the grain. - *Plant Physiol.* 71: 7-14.
- Singh S; Letham DS; Palni LM. 1992. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VIII. Translocation, metabolism and biosynthesis of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. - *Physiol. Plant.* 86: 398-406.
- Smart CM; Scofield SR; Bevan, MV; Dyer TA. 1991. Delayed senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. - *Plant Cell* 3: 647-656.
- Spiertz JHJ; Ellen J. 1978. Effects of nitrogen on crop development and grain growth of winter wheat in relation to assimilation and utilization of assimilates and nutrients. - *Neth J. Agric. Sci.* 26: 210-231.
- Thorne JH. 1985. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 317-343.
- Tillard P; Passama L; Gojon A. 1998. Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO₃ uptake in *Ricinus communis* plant?. - *J. Exp. Bot.* 49 (325): 1371-1379.
- Touraine B; Clarkson DT; Muller B. 1994. Regulation of nitrate uptake at the whole plant level. *In: A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. J. Roy and E. Garnier (Eds.) SPB Academic Pub. The Hague. ISBN 90-5103-086X . pp. 11-30.
- Touraine B; Grignon N; Grignon C. 1988. Charge balance in NO₃⁻ fed soybean. Estimation of K⁺ and carboxylate recirculation. - *Plant Physiol.* 88: 605-612.
- Touraine B; Muller B; Grignon C. 1992. Effect of phloem translocated malate on NO₃⁻ uptake by roots of intact soybean plants. - *Plant Physiol.* 93: 1118-1123.
- Turgeon R. 1996. Phloem loading and plasmodesmata. 1 (12): 418-423.
- Turgeon R; Medville R., 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. - *PNAS* 95 (20): 12055-12060.
- Urquhart AA; Joy KW. 1981. Use of phloem exudate technique in study of amino acid transport in Pea plants. - *Plant Physiol.* 68: 750-754.

- van Bel AJE. 1992. Pathways and mechanisms of phloem loading. *In: Carbon partitioning within and between organism*. J.F. Farrar, A.J. Gordon and C.J. Pollock (Eds.). BIOS, Oxford CH 3 pp 53-70.
- van Bel AJE; Ammerlaan A; van Dijk AA. 1994. A three-step screening procedure to identify the mode of phloem loading in intact leaves. - *Planta* 192: 31-39.
- Van Sanford DA; MacKown CT. 1987. Cultivar Differences in Nitrogen Remobilization During Grain Fill in Soft Red Winter Wheat. - *Crop Sci.* 27: 295-300.
- Van Standen J; Davey JE. 1979. The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins. - *Plant cell Environ.* 2: 93-106
- Vidmar JJ; Zhou D; Siddiqi MY; Schjoerring JK; Touraine, B; Glass ADM. 1999. Regulation of the expression of two new members of the *Bch* family of genes *Bch3* and *Bch4*, which encode inducible high affinity nitrate transporters in *Hordeum vulgare*, with relation to nitrate influx. *In: Plant Nutrition - Molecular Biology and Genetics*. G. Gissel-Nielsen and A. Jensen (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 83-94.
- Wagner BM; Beck E. 1993. Cytokinins in the perennial herb *Urtica dioica* L. As influenced by its nitrogen status. - *Planta* 190: 511-518.
- Wang N; Fisher DB. 1994. Monitoring Phloem Unloading and Post-Phloem Transport by Microperfusion of Attached Wheat Grains. - *Plant Physiol.* 104: 7-16.
- Weibull J; Ronquist F; Brishammar S. 1990. Free amino acid composition of leaf exudates and phloem sap. - *Plant Physiol.* 92: 222-226.
- Weiner H; Blechschmidt S; Mohme H; Eschrich W; Heldt HW. 1991. Phloem transport of amino acids comparison of amino acids content of maize leaves and the sieve tube exudate. - *Plant Physiol.* 88: 815-822.
- Winter H; Lohaus G; Heldt HW. 1992. Phloem Transport of Amino Acids in Relation to their Cytosolic Levels in Barley Leaves. - *Plant Physiol.* 99: 996-1004.
- Wyss CS; Czyzewicz JR; Below FE. 1991. Source-sink control of grain composition in maize strains divergently selected for protein concentration. - *Crop Sci.* 31: 761-766.
- Xoconostle - Cázeres B; Xiang Y; Ruiz - Medrano R; Wang H-L; Monzer J; Yoo BC; McFarland KC; Franceschi VR; Lucas WJ. 1999. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. - *Science* 283: 94-97.
- Yemm EW; Cocking EC. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. - *Analyst.* 80: 209-213.
- Yemm EW; Willis AJ. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. - *Biochem. J.* 57: 508-514.
- Yoneyama T; Takeba G. 1984. Compartment analysis of nitrogen flows through mature leaves. - *Plant Cell Physiol.* 25: 39-48.
- Zheng RG; Leigh RA. 1990. Nitrate accumulation by wheat (*Triticum aestivum*) in relation to growth and tissue N concentrations. *Plant, Soil* 124: 157-160.