

BIOMASA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y COMPUESTOS NITROGENADOS EN PLANTAS DE FRIJOL EJOTERO BAJO DIFERENTES DOSIS DE POTASIO*

BIOMASS, ENZYMATIC ACTIVITY AND NITROGEN COMPOUNDS IN SNAP BEAN PLANTS UNDER DIFFERENT POTASSIUM DOSES

Esteban Sánchez Chávez^{1§}, Juan Manuel Soto Parra¹, Juan Manuel Ruiz Sáez² y Luis Romero Monreal²

¹Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Ciudad Universitaria s/n (Campus Universitario I). 31310 Chihuahua, Chihuahua, México ²Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. Granada, España. [§]Autor para correspondencia: ecsanchez@uach.mx

RESUMEN

Uno de los principales factores que regulan la producción de biomasa, actividad enzimática y cantidad de compuestos nitrogenados en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) es el estado nutricional de K, por lo que en esta investigación se estudiaron las respuestas de estos procesos fisiológicos a diferentes concentraciones de K. Las plantas de frijol ejotero cv. Strike se establecieron en cámara de cultivo en la primavera de 2000 en Granada, España, bajo condiciones ambientales controladas: humedad relativa de 60-80%, temperatura 28/22 °C (día/noche), fotoperiodo de 16/8 h (día/noche) y una intensidad luminosa de 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El K fue aplicado a la solución nutritiva en la forma de KOH en dosis crecientes: K1= 1.0 mM, K2= 2.0 mM, K3= 4.0 mM, K4= 8.0 mM, K5= 12.0 mM y K6= 16.0 mM de K⁺. Los resultados indicaron que tanto la deficiencia como la toxicidad de K⁺ ejercieron un efecto sobre el metabolismo nitrogenado similar al que produce el estrés por N. Es decir, bajo condiciones deficientes de K⁺ (K1 y K2) se observó una disminución de las enzimas implicadas en la asimilación de N, tales como: nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamina sintetasa, glutamato sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, resultando en bajas concentraciones de aminoácidos, proteínas, N orgánico y

N total en las plantas de estos tratamientos, explicándose así una reducción en la producción de biomasa de 15% con respecto al tratamiento K3. Con respecto a los tratamientos elevados de K⁺, se observó que las plantas de frijol tratadas con K4, K5 y K6 se caracterizaron por presentar concentraciones elevadas de NO₃⁻ y NH₄⁺, mayor asimilación de N y las máximas concentraciones de compuestos nitrogenados, sin embargo, esto no se vio reflejado en la producción de biomasa, sino al contrario se observó una reducción del 35% en la producción de biomasa radical y foliar. Las dosis muy por encima del óptimo, K5 y K6, se consideraron tóxicas por la disminución del crecimiento de la parte radical y parte aérea, siendo esta última la más afectada.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., asimilación de nitrógeno, nutrición.

ABSTRACT

One of the main factors regulating biomass production, enzymatic activity and the amount of nitrogen compounds in roots and leaves of snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.) is the nutritional status of K, hence the objective of this research was to understand the effect of different

* Recibido: Mayo de 2005
Aceptado: Enero de 2006

potassium concentration on these physiological plant responses. The experiment was carried out with the snap bean cv. Strike in growth chambers during the spring of 2000 in Granada, Spain. The controlled environment conditions were: relative humidity 60-80%, temperature 28/22 °C (day/night), photoperiod 16/8 h (day/night) and luminosity of 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Potassium was applied as nutrient solution of KOH in increasing concentrations: K1= 1.0 mM, K2= 2.0 mM, K3= 4.0 mM, K4= 8.0 mM, K5= 12.0 mM, and K6=16.0 mM of K^+ . Results indicated that both deficiencies and excess of K affected the nitrogen metabolism in the same way that the effect caused by N stress. Under K^+ deficiencies (K1 and K2) there was a decrease in the content of enzymes related to N assimilation such as nitrate reductase, nitrite reductase, glutamine sintetase, glutamine sintase, and phosphoenolpyruvate carboxylase, causing in the plant low concentrations of amino acids, proteins, nitrogen organic compounds, all of which diminished biomass production in 15% when compared to K3. Treatments with higher concentrations of K^+ such as K4, K5 and K6 had the greater concentrations of NO_3^- and NH_4^+ , increased assimilation of N and higher concentration of nitrogen compounds. However, these increments were not related to biomass, accumulation, on the contrary, dry weight of roots and shoots were diminished in 35% due to the toxic effects observed in treatments K5 and K6. Therefore, K^+ doses above the optimal were detrimental for root and shoot growth, being the shoot more diminished.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., nitrogen assimilation, nutrition.

INTRODUCCIÓN

Al igual que el N, el K^+ es el nutriente que se necesita en concentraciones elevadas para un adecuado crecimiento de las plantas, oscilando su concentración en un rango de 2 a 5% de materia seca de la planta, tanto en partes vegetativas, frutos o tubérculos (Daliparthi *et al.*, 1994; Marschner, 1997). El potasio juega un papel esencial en el crecimiento y metabolismo de la planta, puesto que actúa activando enzimas (Evans y Sorger, 1966), funciona como un osmorregulador para mantener la presión de turgencia de los tejidos (Kaiser, 1982), regula la apertura y cierre

estomático de los estomas (Humble y Raschke, 1971), y equilibra la carga de los aniones (Streeter y Barta, 1984). Una deficiencia de K^+ puede disminuir la fotosíntesis de la planta mediante la reducción del área foliar (Huber, 1985) y la fijación neta de CO_2 (Ozbun *et al.*, 1965).

Los macronutrientes, N y K^+ , están íntimamente involucrados en el metabolismo y crecimiento de las plantas, en donde estos nutrientes participan de manera conjunta en diferentes procesos bioquímicos. En el caso del nitrógeno, éste participa directamente en la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares necesarios para el desarrollo. La asimilación de N por las plantas requiere la absorción de NO_3^- , su reducción y la conversión de NO_2^- a NH_4^+ , y la incorporación de NH_4^+ inorgánico a compuestos orgánicos (Sivasankar y Oaks, 1996; Stitt, 1999). Los factores que influyen en la regulación de las enzimas responsables de la asimilación del N son: la etapa fenológica de la planta (Ireland y Lea, 1999); la luz/obscuridad (Migge y Becker, 1996); la concentración de sacarosa (Lam *et al.*, 1996); la fuente nitrogenada: NO_3^- y NH_4^+ (Ruiz y Romero, 1999); el nivel de CO_2 (Edwards y Coruzzi, 1989); la temperatura (Woodall *et al.*, 1996); nutrientes (López-Lefebvre *et al.*, 2000; Ruiz y Romero, 2002), reguladores del crecimiento (Ruiz *et al.*, 2000), productos de la asimilación de N (Padgett y Leonard, 1996) y la variabilidad genética de la especie de que se trate (Ruiz y Romero, 1998).

Por otro lado, un aporte adecuado de K^+ puede ser necesario para el uso eficiente de la fertilización nitrogenada. Dado que el uso del N, esencialmente en la forma de NO_3^- , como fertilizante es un tema importante en la agricultura actual, ya que el NO_3^- como fertilizante es relativamente caro y si no se emplea de manera adecuada puede contribuir a la contaminación de las aguas subterráneas y superficiales a través de la lixiviación y erosión del suelo (Sisson *et al.*, 1991), lo que ha obligado hoy en día a buscar nuevos cultivos, genotipos y sistemas de producción que hagan más eficiente el uso de los nitratos aplicados como fertilizantes.

En diferentes trabajos se ha mostrado la relación del K^+ en la absorción, translocación y asimilación de los NO_3^- en las plantas. Rufty *et al.* (1981) demostraron la estrecha relación entre K^+/NO_3^- a nivel de absorción y transporte.

Por otro lado, se ha demostrado que la ausencia de K^+ afecta también la asimilación de NO_3^- , ya que los NO_3^- son absorbidos y en gran parte asimilados por las raíces (Föster y Jeschke, 1993; Siebrecht y Tischner, 1999). En resumen, un aporte adecuado de K^+ incrementa la absorción y transporte de NO_3^- hacia la parte aérea y conduce a una alta acumulación de NO_3^- (Ruiz y Romero, 2000) y consecuentemente produce una elevada actividad del nitrato reductasa (NR) *in vivo* en hojas (Blevins *et al.*, 1978), mientras que la actividad NR en las raíces declina con la presencia de K^+ (Blevins *et al.*, 1978; Föster y Jeschke, 1993). El K^+ juega un papel importante para la síntesis y activación de la NR, siendo esta considerada la enzima clave del proceso de asimilación de N (Marschner, 1997). Sin embargo, pese al efecto directo del K^+ sobre la absorción, translocación y asimilación de NO_3^- , existe poca información sobre la relación entre estos dos nutrientes inorgánicos, los cuales son básicos para el crecimiento y desarrollo de la planta. Además, la literatura disponible está enfocada sobre el efecto que tiene la deficiencia de K^+ sobre el metabolismo de NO_3^- , examinando solamente la relación raíz-hoja. Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de diferentes dosis de K^+ sobre la producción de biomasa, actividad enzimática y compuestos nitrogenados en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero cv. Strike.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo del cultivo y diseño experimental

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike se germinaron en una cámara a 28 °C durante 48 h. Posteriormente, las plantas de frijol ejotero fueron desarrolladas en cámara de cultivo en la primavera de 2000 en Granada, España, bajo condiciones ambientales controladas: humedad relativa de 60-80%, temperatura 28/22 °C (día/noche), fotoperíodo de 16/8 h (día/noche) y una intensidad luminosa de 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas crecieron en macetas individuales (25 cm de diámetro superior y 25 cm de altura) con un volumen de 8 L llenas completamente con vermiculita. Durante 30 días, antes de la aplicación de los tratamientos experimentales, las plantas recibieron una solución nutritiva completa de Hoagland (pH 6.0-6.1), la cual fue renovada cada tres días.

Posteriormente, 30 días después de la germinación, se aplicaron los diferentes tratamientos de K^+ en la forma de KOH: K1=1.0 mM, K2= 2.0 mM, K3= 4.0 mM, K4= 8.0 mM, K5= 12.0 mM y K6= 16.0 mM de K^+ considerándose la dosis K3 como la óptima según Carbonell-Barrachina *et al.* (1997). El diseño experimental consistió en la distribución completamente al azar de los distintos tratamientos y de sus repeticiones. Cada tratamiento tuvo seis repeticiones con cuatro plantas por repetición.

Muestreo vegetal

Las plantas completas fueron muestreadas a los 60 días después de germinadas, encontrándose en la etapa fenológica de completo desarrollo y madurez del fruto. Las raíces y hojas fueron lavadas tres veces con agua destilada y detergente no ionico al 1% (Wolf, 1982). Una parte del material vegetal muestreado (5 g de raíz y hoja) fue utilizado en fresco para el análisis de la nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa (NiR), glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa), nitratos (NO_3^-), amonio (NH_4^+), aminoácidos y proteínas. La producción de biomasa radical y foliar se obtuvo como un promedio de cada órgano estudiado en base a peso seco.

Análisis vegetal

Para la determinación de las actividades enzimáticas NR, NiR y GOGAT, tanto en raíces como en hojas, se utilizó un medio de extracción optimizado con base en los métodos empleados por Farnden y Robertston (1980), Groat y Vance (1981), Lillo (1984), Kaiser y Lewis (1984), y Singh y Srivastava (1986).

Extracción de las enzimas NR, NiR y GOGAT. Una cantidad de 1 g de material vegetal fresco (hojas y raíces) fue homogeneizado en un tampón fosfato (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.5) que contenía 2 mM de EDTA, caseína soluble al 1.5% (p/v), 2 mM de DTT y PVP soluble al 1% (p/v). El homogenado resultante fue filtrado y centrifugado a 5000 rpm durante 5 min; en seguida el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 15000 rpm durante 20 min, obteniéndose de esta manera el extracto enzimático utilizado para medir las actividades NR, NiR y GOGAT.

Ensayo de la actividad NR. La medición de la actividad NR se realizó siguiendo la metodología de Kaiser y Lewis (1984). En un volumen final de 2 mL, la mezcla de reacción contenía: 0.6 mL de tampón fosfato (100 mM de K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.5), 0.2 mL de KNO_3 100 mM, 0.2 mL de cisteína 10 mM, 0.2 mL de NADH 2 mM, y 0.6 mL de extracto enzimático. La actividad NR fue detenida por la adición de 0.1 mL de acetato de zinc 1 M después de la incubación de las muestras en oscuridad a 30 °C durante 30 min. Posteriormente, y con el fin de eliminar el precipitado formado tras la adición del acetato de zinc, se centrifugaron las muestras a 2000 rpm durante 15 min.

Los NO_2^- del sobrenadante procedente de la última centrifugación fueron cuantificados por el método de Hageman y Hucklesby (1971). Además, se preparó un blanco, el cual contenía todos los reactivos y en el que se substituyó el volumen del extracto enzimático por tampón fosfato. La actividad NR se expresó como μmol de NO_2^- formados por mg proteína $^{-1}$ min $^{-1}$.

Ensayo de la actividad NiR. La medición de la actividad de NiR fue determinada a través de la desaparición de los NO_2^- del medio de reacción (Lillo, 1984). El medio de reacción contenía 0.25 mL de tampón fosfato (50 mM disuelto K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.5), 50 μL de KNO_2 20 mM, 75 μL de dimetil-viológeno 5 mM, 75 μL de ditionito sódico 145 mM disuelto en $NaHCO_3$ 300 mM, y 50 μL de extracto enzimático. Después de una incubación en oscuridad a 30 °C durante 30 min, la mezcla de reacción se agitó vigorosamente hasta la oxidación del dimetil-viológeno (variación del color azul a blanco) que conlleva la detención de la actividad NiR. Después de la adición de 5 mL de agua desionizada (Millipore RX-21), se tomó una alícuota de 1 mL y se procedió a la cuantificación de los NO_2^- no transformados por la actividad NiR, por el método de Hageman y Hucklesby (1971).

Se realizó un blanco que consistió en la omisión de KNO_2 en el ensayo y extracto enzimático, un estándar de KNO_2 20 mM que consistió en la mezcla de ensayo sin extracto enzimático, y finalmente, también se realizó un control para cada muestra sin KNO_2 con el fin de determinar la cantidad de KNO_2 presente en el extracto enzimático. La actividad NiR se expresó como μmol NO_2^- transformados por mg proteína $^{-1}$ min $^{-1}$.

Ensayo de la actividad GOGAT. La actividad GOGAT fue ensayada espectrofotométricamente a 30 °C por medio de la oxidación de NADH a una longitud de onda de 340 nm, esencialmente como indican Groat y Vance (1981), y Singh y Srivastava (1986). La disminución de la absorbancia lineal, al menos durante 10 min, fue registrada durante 5 min. La mezcla de reacción consistió en 0.75 mL de tampón fosfato (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.5) que contenía mercaptoetanol al 0.1% (v/v) y 1 mM de EDTA, 0.2 mL de 2-oxoglutarato 18.75 mM, 0.1 mL de amino-oxiacetato 15 mM, 0.1 mL de NADH 1.5 mM, 0.15 mL de extracto enzimático, y finalmente 0.2 mL de L-glutamina 75 mM que inicia la reacción enzimática. Se hicieron dos controles, el primero sin 2-oxoglutarato y el segundo sin L-glutamina, con el fin de corregir la oxidación endógena del NADH. La actividad GOGAT se expresó como μmol NADH oxidados por mg proteína $^{-1}$ min $^{-1}$.

Extracción y ensayo de la actividad GS. La extracción de la enzima GS se realizó siguiendo el método de Rees *et al.* (1995). Para ello, se homogeneizó una cantidad de 0.5 g de material vegetal fresco con 5 mL de tampón HEPES 0.2 M, pH 7.9. El homogenado se centrifugó a 16000 rpm durante 20 min, y el sobrenadante obtenido se utilizó para medir la actividad GS.

El análisis de la actividad GS se basó en el descrito por Slawky y Rodier (1988). La mezcla de reacción contenía: 0.6 mL de $MgCl_2$ 50 mM, 0.2 mL de EDTA-Na 5 mM, 0.4 mL de glutamato potásico 100 mM, 0.15 mL acetato amónico 50 mM, 0.4 mL de extracto enzimático, y 0.25 mL de ATP 8 mM que inició la reacción. La mezcla de reacción fue incubada en luz en un baño de agua a 30 °C durante 15 min, tras lo cual se inhibió la reacción enzimática por la adición de 0.25 mL de H_2SO_4 1 N. La mezcla se centrifugó (11000 rpm, 2 min), y del sobrenadante resultante se tomó 50 μL para cuantificar el Pi procedente de la utilización enzimática del ATP.

La concentración del Pi fue determinada usando el método colorimétrico del vanadomolibdofosfórico (Hogue *et al.*, 1970), a una longitud de onda de 430 nm y frente a una curva patrón de K_2HPO_4 (5-100 μM).

Se realizó un blanco que consistió en la omisión del extracto enzimático y del glutamato, siendo substituidos los volúmenes correspondientes por tampón HEPES. La

actividad GS se expresó como $\text{nmol Pi mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Extracción y ensayo de la actividad PEPCasa. La extracción y actividad de la PEPCasa se realizó siguiendo el método de Vance y Stade (1984), modificado por Ocaña *et al.* (1996). Se homogeneizó 0.5 g de material vegetal fresco en 5 mL de tampón maleico-KOH 100 mM, pH 6.8, que contenía 100 mM de sacarosa, B-mercaptoetanol al 2% (v/v), y etilenglicol al 20% (v/v). A continuación el material homogeneizado se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min, desechándose el residuo y sometiendo al sobrenadante a una segunda centrifugación de 16000 rpm durante 20 min. El sobrenadante obtenido en la última centrifugación se utilizó para determinar la actividad PEPCasa.

La actividad enzimática PEPCasa se determinó espectrofotométricamente por oxidación del NADH a una longitud de onda de 340 nm durante 3 min, adicionando 25 μL de extracto enzimático a 0.975 mL de tampón bicina-KOH 0.1 M, pH 8.5 que contiene 10 mM de NaHCO_3 , 5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de NADH, y 2 mM de PEP.

Se preparó un blanco que consistió en la omisión del extracto enzimático en el ensayo, el volumen correspondiente fue sustituido por tampón bicina-KOH. La actividad PEPCasa se expresó como $\mu\text{mol NADH oxidados mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Determinación de aminoácidos y proteínas solubles. Los aminoácidos y las proteínas solubles se cuantificaron siguiendo los métodos propuestos por Yemm y Cocking (1955) y Bradford (1976), respectivamente.

Se homogeneizó una cantidad de 0.5 g de material vegetal fresco (raíces y hojas) con 5 mL de tampón fosfato (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0). El material homogeneizado fue filtrado y centrifugado a 10000 rpm durante 15 min, resultando un sobrenadante que fue utilizado para la cuantificación de estos compuestos nitrogenados. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0 a 4 °C.

Para la cuantificación de los aminoácidos solubles, se adicionó 0.1 mL de extracto a 1.5 mL de reactivo de ninhidrina [1:1 (v/v) cloruro de estaño (80 mg de cloruro

de estaño disueltos en 50 mL de tampón citrato 200 mM, pH 5); ninhidrina (2 g de ninhidrina disueltos en 50 mL de etilenglicol)], y esta mezcla se introdujo a 100 °C durante 20 min. A continuación y una vez enfriada la mezcla se le añadió 8 mL de propanol al 50%. Pasados 30 min, se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 570 nm, frente a curva patrón de glicina (solución madre de glicina: 10 mg/50 mL).

En la cuantificación de las proteínas solubles se tomó 0.1 mL de sobrenadante y se adicionó a 0.9 mL de tampón fosfato (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0) y a 5 mL de azul cromassie (Cromassie al 10% (p/v) más Etanol del 96% al 5% (v/v) + H_3PO_4 del 85% al 10% (v/v). Transcurridos 20 min, las muestras se midieron colorimétricamente a una longitud de onda de 595 nm, frente a una curva patrón de albúmina (solución madre de albúmina: 10 mg/50 mL). La concentración de aminoácidos y proteínas solubles se expresaron como mg g^{-1} de peso fresco.

Determinación de las distintas formas nitrogenadas.

Las concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ fueron analizadas a partir de una extracción acuosa del material seco. El análisis de los NO_3^- se realizó siguiendo el método de Cataldo *et al.* (1975). A 100 μL de la extracción acuosa se le añadió 0.4 mL de una solución al 10% (p/v) de ácido salicílico en ácido sulfúrico al 96%, y 9.5 mL de NaOH 2 N. La concentración de NO_3^- se cuantificó por colorimetría a una longitud de onda de 410 nm frente a una curva patrón de KNO_3 (50-500 $\mu\text{g/mL}$). Para el NH_4^+ se tomó un volumen de 100 μL de la extracción acuosa, y la concentración de esta forma nitrogenada se determinó siguiendo el método de Krom (1980). Las concentraciones de NO_3^- y de NH_4^+ se expresaron como mg g^{-1} peso de materia seca.

En relación con el análisis de N orgánico (Norg), se sometió a 0.15 g de material seco a un proceso de mineralización. A 100 μL del mineralizado se le añadieron 1 mL del reactivo A [8.5% (p/v) de salicilato sódico más 0.06% (p/v) de nitroprusiato sódico] y 1 mL del reactivo B [4% (p/v) de NaOH más 0.625% (p/v) de dicloroisocianurato sódico], y transcurridos 45 min se procedió a la medición colorimétricamente a una longitud de onda de 630 nm, frente a una curva patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-20 $\mu\text{g/mL}$) (Krom, 1980). La concentración de N orgánico se expresó como mg g^{-1} . La concentración de N total (Nt) se obtuvo

mediante la suma de las concentraciones de NH_4^+ , NO_3^- y de N orgánico, expresándose como mg g^{-1} de materia seca.

Análisis estadístico

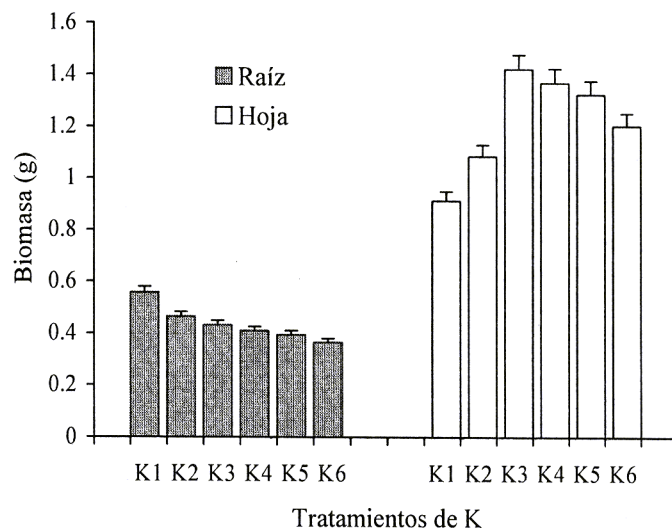
Todos los datos fueron sometidos a un análisis de varianza. Las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron comparadas utilizando la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 0.05% (SAS, 1987). Los niveles de significancia están representados por * a $p < 0.05$, ** a $p < 0.01$, *** a $p < 0.001$ y NS como no significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El potasio (K^+) junto con el nitrógeno (N), es uno de los elementos que mayor influencia tiene sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Shuman, 1994; Pettigrew y Meredith, 1997). Los tratamientos de K^+ afectaron significativamente la producción de biomasa radical ($p < 0.01$) y foliar ($p < 0.01$) (Figura 1). En lo que se refiere a la producción de biomasa foliar, el tratamiento K3, fue el que presentó el mayor valor, con incrementos de 36 y 15%, con relación a los mínimos valores presentados en K1 y K6 respectivamente, mientras que la producción de biomasa radical obtuvo su máximo valor en K1, con un incremento del 35% con relación a K6 (Figura 1).

Cabe resaltar que la aplicación de 4.0 mM de K (K3) y en menor grado la dosis de 8.0 mM (K4) resultaron ser los tratamientos óptimos para una eficaz producción de biomasa radicular y foliar en las plantas de frijol ejotero cv. Strike, mientras que los tratamientos por debajo de los óptimos (K1 y K2), se consideraron dosis deficientes de K^+ , caracterizándose por mayor crecimiento radicular y reducido crecimiento de la parte aérea. Las dosis por encima del óptimo, K5 y K6, se consideraron tóxicas por la disminución del crecimiento de la parte radicular y parte foliar, siendo esta última la más afectada.

Un adecuado aporte de K^+ es necesario para el uso eficiente de la fertilización nitrogenada (Sisson *et al.*, 1991; Ruiz y Romero, 2002). Diferentes trabajos han mostrado la implicación del K^+ en la absorción, translocación y asimilación de NO_3^- en las plantas (Siebrecht y Tischner, 1999). Rufty *et al.* (1981) demostraron una relación



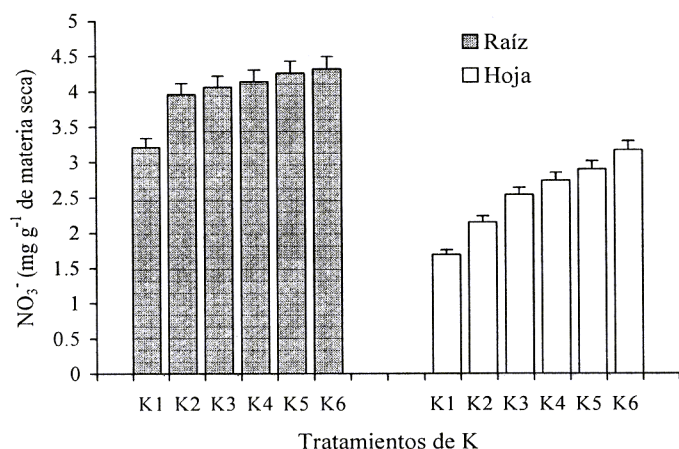
K1 = 1.0 mM; K2 = 2.0 mM; K3 = 4.0 mM; K4 = 8.0 mM; K5 = 12.0 mM; K6 = 16.0 mM de K^+ ; los datos son las medias de seis observaciones $\pm$ error estándar.

Figura 1. Efecto de diferentes dosis de potasio sobre la producción de biomasa radicular y foliar en plantas de frijol ejotero cv. Strike.

estrecha entre la absorción y transporte de K^+/NO_3^- . Se ha comprobado que la limitación de K^+ afecta la asimilación de NO_3^- y el lugar donde se realiza este proceso (Föster y Jeschke, 1993; Siebrecht y Tischner, 1999). Un adecuado aporte de K^+ incrementa la absorción y transporte de NO_3^- hacia la parte aérea, lo que produce un aumento de la disponibilidad de NO_3^- induciéndose la actividad de la NR en hojas (Blevins *et al.*, 1978; Ruiz y Romero, 2000). Por el contrario, cuando el K^+ es limitante se induce la translocación de NO_3^- hacia fuera de las hojas produciéndose su asimilación preferencialmente en las raíces (Blevins *et al.*, 1978; Föster y Jeschke, 1993).

Sin embargo, y pese al efecto directo existente del K^+ sobre la absorción, translocación y asimilación de NO_3^- , hay poca información disponible sobre la relación entre estos nutrientes inorgánicos cuando el K^+ sobrepasa los niveles óptimos. En esta investigación, los niveles de NO_3^- en raíces y hojas ($p < 0.01$) (Figura 2) mostraron una respuesta lineal a la fertilización de K^+ , con las máximas concentraciones registradas en el tratamiento K6, con incrementos de 47 y 26% respectivamente en relación con los valores mínimos presentados en el tratamiento K1. Estos resultados en principio concuerdan con el

sinergismo $K^+-NO_3^-$ que ha sido descrito ampliamente (Rufty *et al.*, 1981), definiendo al K^+ como un catión acompañante de los NO_3^- en la absorción (Blevins, 1985; Rufty *et al.*, 1981). Sin embargo, el efecto positivo que ejerce el K^+ sobre la translocación de NO_3^- hacia la parte aérea, no se observó debido a que los niveles de NO_3^- en las hojas fueron inferiores a los obtenidos en las raíces (Figura 2). Esto probablemente se explique ya que en la etapa tardía del ciclo de la planta en que se realizaron las determinaciones analíticas, las vainas actúan como una demanda de compuestos nitrogenados que en buena parte son proporcionados por las hojas. Una explicación alternativa podría ser la estimulación de la reducción de NO_3^- por la NR cuando su presencia (anión) es elevada lo que reduciría su acumulación (Föster y Jeschke, 1993; Siebrecht y Tischner, 1999).



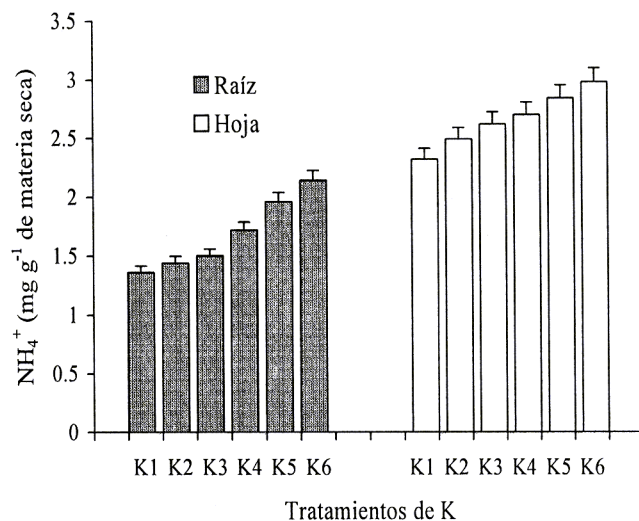
K1 = 1.0 mM; K2 = 2.0 mM; K3 = 4.0 mM; K4 = 8.0 mM; K5 = 12.0 mM; K6 = 16.0 mM de K^+ ; los datos son las medias de seis observaciones $\pm$ error estándar.

Figura 2. Acumulación de NO_3^- en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero cv. Strike en respuesta a diferentes dosis de potasio.

La concentración de NH_4^+ en raíces y hojas ($p < 0.001$) (Figura 3) fue afectada directamente por las dosis elevadas de K^+ , presentando el tratamiento K6 la máxima concentración, con incrementos del 36 y 22% respectivamente, con relación al tratamiento K1 con el que se obtuvo la mínima concentración.

Los resultados son opuestos a lo que se podría esperar ya que existió un claro efecto sinérgico del K^+ aplicado sobre la concentración de NH_4^+ , cuando diversos autores sugieren en la mayoría de los casos, un antagonismo (Marschner,

1997; Mengel y Kirkby, 2001). Una explicación de estos resultados y que se detalla más adelante, es que el NH_4^+ presente en raíces y hojas haya tenido su origen en la reducción de NO_3^- estimulada por la aplicación de K^+ .



K1 = 1.0 mM; K2 = 2.0 mM; K3 = 4.0 mM; K4 = 8.0 mM; K5 = 12.0 mM; K6 = 16.0 mM de K^+ ; los datos son las medias de seis observaciones $\pm$ error estándar.

Figura 3. Acumulación de NH_4^+ en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero cv. Strike en respuesta a los tratamientos de potasio.

El efecto de las diferentes dosis de K^+ sobre la asimilación del N, tanto en raíces como en hojas, se mostró un incremento significativo de las enzimas NR, NiR, GS, GOGAT y PEPCasa a medida que se aumentó la fertilización con K^+ en el medio externo, presentándose en todos los casos y en los órganos estudiados las máximas actividades en K6 y las mínimas en K1 (Cuadro 1). De todas las actividades enzimáticas implicadas en la asimilación del N quizás sea la NR, por ser la limitante de este proceso, en la que se ha estudiado de forma más intensa su relación con el K^+ . Los resultados obtenidos coinciden con los de Ruiz *et al.* (2000) quienes observaron en plantas de pepino, una relación directamente proporcional entre la aplicación de K^+ y la actividad NR.

Ruiz *et al.* (2000) definieron al K^+ , después del N, como el factor nutricional más determinante en la inducción de esta actividad enzimática y por lo tanto de la regulación de NO_3^- , subrayando la importancia de la fertilización

Cuadro 1. Efecto de diferentes dosis de K⁺ sobre actividades enzimáticas en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero cv. Strike.

Tratamiento	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPCasa
----- Raíces -----					
K1	0.018	0.66	0.16	0.20	2.08
K2	0.025	0.76	0.19	0.22	2.77
K3	0.035	0.82	0.22	0.26	3.94
K4	0.039	0.86	0.24	0.56	4.10
K5	0.048	0.99	0.26	0.88	5.00
K6	0.056	1.08	0.28	0.92	5.12
Significancia	**	**	**	**	**
----- Hojas -----					
K1	0.060	0.97	0.54	0.28	4.10
K2	0.064	1.24	0.68	0.32	4.64
K3	0.071	1.54	0.76	0.56	7.87
K4	0.081	1.58	0.84	0.65	8.26
K5	0.115	1.61	1.06	0.76	9.67
K6	0.137	1.65	1.20	0.88	12.35
Significancia	**	**	**	**	***

K1= 1.0 mM; K2= 2.0 mM; K3= 4.0 mM; K4 = 8.0 mM; K5= 12.0 mM; K6= 16.0 mM de K⁺; NR= Nitrato reductasa *in vitro* expresada en M NO₂⁻ formados mg⁻¹ prot. min⁻¹; NiR= Nitrito reductasa expresada en μM NO₂⁻ transformados mg⁻¹ prot. min⁻¹; GS= Glutamina sintetasa expresada en μM Pi mg⁻¹ prot. min⁻¹; GOGAT= Glutamato sintasa expresada en μM NADH oxidados mg⁻¹ prot. min⁻¹; PEPCasa= Fosfoenolpiruvato carboxilasa expresada en μM NADH oxidados mg⁻¹ prot. min⁻¹; **=*p*<0.01; ***=*p*<0.001; Los datos son las medias de seis observaciones.

potásica para el crecimiento y rendimiento en el cultivo de pepino.

En definitiva, el K⁺ podría actuar de dos formas sobre la reducción de NO₃⁻: 1) Estimulando la absorción su translocación hacia la parte aérea, lo que aumentaría su disponibilidad en este órgano y por lo tanto la actividad NR, 2) Induciendo directamente a la actividad NR. Los resultados sugieren una acción indirecta del K⁺ induciendo a la actividad NR a través del incremento de la disponibilidad de NO₃⁻.

Otra actividad enzimática implicada en el metabolismo nitrogenado y que ha sido relacionada con la disponibilidad de K⁺ ha sido la actividad GS. Weidner *et al.* (1996) mencionaron que bajo deficiencia de K⁺ la actividad GS fue significativamente reducida. El (Cuadro 1) muestra que tanto en raíces como en hojas los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos por estos autores, ya que la mínima actividad GS se presentó con la

aplicación de dosis bajas de K⁺. Los resultados indican que las actividades de todas las enzimas implicadas en la asimilación de N fueron muy superiores en hojas respecto a las obtenidas en raíces por lo que el K⁺ induce que la realización del metabolismo de N se produzca en este órgano (Ruiz y Romero, 2002).

En los compuestos orgánicos nitrogenados, Weidner *et al.* (1996) observaron una reducción del contenido de proteína bajo condiciones limitantes de K⁺. Setzer *et al.* (1998) y Ruan *et al.* (1998) mencionaron que un aporte adecuado de K⁺ se vió reflejado en el almacenamiento de compuestos orgánicos nitrogenados. En las condiciones experimentales, en que se condujo este trabajo, la mayor concentración de aminoácidos, proteínas y N orgánico ocurrió en las raíces y las hojas de las plantas tratadas con la dosis de 16 mM de K⁺ (K6), mientras que la menor concentración se observó con la dosis de 1.0 mM de K⁺ (K1) (Cuadro 2). El N total mostró una respuesta similar a la de los compuestos nitrogenados orgánicos tanto en raíces como en hojas.

Cuadro 2. Efecto de diferentes dosis de K⁺ sobre la concentración de aminoácidos, proteínas, N orgánico y N total en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero cv. Strike.

Tratamiento	Aminoácidos	Proteína	N orgánico	N total
----- Raíces -----				
K1	0.49	1.58	30.82	35.39
K2	0.53	1.64	32.54	37.94
K3	0.62	1.74	34.20	39.82
K4	0.77	2.39	36.14	42.00
K5	0.97	3.09	37.24	43.46
K6	1.13	3.10	37.62	44.08
Significancia	**	**	*	*
----- Hojas -----				
K1	1.49	6.31	29.40	33.41
K2	1.61	6.88	32.82	37.46
K3	1.92	7.20	40.51	45.83
K4	2.13	7.68	43.11	48.55
K5	2.42	7.89	45.06	50.80
K6	2.60	8.53	46.49	52.64
Significancia	**	**	**	**

K1= 1.0 mM; K2= 2.0 mM; K3= 4.0 mM; K4= 8.0 mM; K5= 12.0 mM; K6= 16.0 mM de K⁺; aminoácidos y proteínas expresados en mg g⁻¹ de peso fresco; N orgánico y N total expresados en mg g⁻¹ de peso seco; los datos son las medias de seis observaciones.

CONCLUSIONES

La deficiencia y el exceso de K⁺ ejercen un efecto sobre el metabolismo nitrogenado similar al que produce el estrés por N. Bajo condiciones deficientes de K⁺ se produjo una disminución de las enzimas implicadas en la asimilación de N, y en consecuencia en concentraciones mínimas de aminoácidos, proteínas, N orgánico y N total en los tejidos de las plantas.

Las plantas de frijol tratadas con dosis altas de K⁺ se caracterizaron por presentar concentraciones elevadas de NO₃⁻ y NH₄⁺, mayor asimilación de N y concentración de compuestos nitrogenados, sin embargo, esto no se vió reflejado en la producción de biomasa.

Las dosis de K⁺ muy por encima del óptimo, causaron un menor crecimiento de la parte radical y parte aérea, siendo esta última la más afectada.

LITERATURA CITADA

Blevins, D. C. 1985. Role of potassium in protein metabolism in plants. *In*: Munson, R. D. (ed.)

Potassium in Agriculture. American Society of Agronomy. Madison, WI. USA. p. 413-424.

Blevins, D. C.; Hiatt, A. J.; Lowe, R. H. and Leggett, J. E. 1978. Influence of K on the uptake, translocation, and reduction of nitrate by barley seedlings. *Agron. J.* 70:393-396.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Carbonell-Barrachina, A. C.; Burló-Carbonell, F. and Mataix-Beneyto, J. 1997. Effect of sodium arsenite and sodium chloride on bean plant nutrition (macronutrients). *J. Plant Nutr.* 20:1617-1633.

Cataldo, D. A.; Haroon, M.; Schrader, L. E.; and Young V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6:71-80.

Daliparthi, J.; Barker, A. V. and Mondal, S. S. 1994. Potassium fractions with other nutrients in crops: a review focusing on the tropics. *J. Plant Nutr.* 17:1859-1886.

Edwards, J. W. and Coruzzi G. M. 1989. Photorespiration and light act in concert to regulate expression of the

- nuclear gene for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Plant Cell* 1:241-248.
- Evans, H. J. and Sorger, G. J. 1966. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17:47-77.
- Farnden, K. J. F. and Robertston, J. G. 1980. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. *In: Bergersen, F.J. (ed.) Methodos for evaluating biological nitrogen fixation.* Jonh Wile & Sons. New York, USA. p. 265-314.
- Föster, J. C. and Jeschke, W. D. 1993. Effects of potassium on nitrate transport and on the contribution of the root to nitrate reduction in the whole plant. *J. Plant Physiol.* 141:322-328.
- Groat, R. G. and Vance, C. P. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 32:169-204.
- Hageman, R. H. and Hucklesby, D. P. 1971. Nitrate reductase. *Methods Enzymol.* 23: 497-503.
- Hogue, E.; Wilcow, G. E. and Cantliffe, D. J. 1970. Effect of soil P on phosphate fraction in tomato leaves. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 95:174-176.
- Huber, S. C. 1985. Role of potassium in photosynthesis and respiration. *In: Munson, R. D. (ed.) Potassium in Agriculture.* American Society of Agronomy. Madison, WI. USA. p. 369-391.
- Humble, G.D. and Raschke, K. 1971. Stomatal opening quantitatively related to potassium transport. *Plant Physiol.* 48: 447-453.
- Ireland, R. J. and Lea, P. J. 1999. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. *In: Singh B. K. (ed.) Plant amino acids. Biochemistry and Biotechnology.* Marcell Dekker. New York, USA. p. 49-109.
- Kaiser, J. J. and Lewis, O. A. H. 1984. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil* 70:127-130.
- Kaiser, W. M. 1982. Correlation between changes in photosynthetic activity and changes in total protoplast volume in leaf tissue from hygro-, meso-, and xerophytes under osmotic stress. *Planta.* 154:538-545.
- Krom, M. D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* 105:305-316.
- Lam, H. M.; Coschigano, K. T.; Oliveira, I. C.; Melo-Oliveira, R. and Coruzzi, G. M. 1996. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:569-593.
- Lillo, C. 1984. Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate in barley leaves. *Physiol. Plant.* 61:214-218.
- López-Lefebvre, L. R.; Ruiz, J. M.; Rivero, R. M.; García, P. C.; Sánchez, E.; and Romero, L. 2000. Role of CaCl₂ in ammonium assimilation in roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *J. Plant Physiol.* 156:672-677.
- Marschner, H. 1997. Mineral nutrition of higher plants. 2a. ed. Academic Press. San Diego CA. USA. p. 245-281.
- Mengel, K. and Kirkby, E. A. 2001. Principles of plant nutrition. 5th ed. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. p. 849.
- Migge, A. and Becker, T. W. 1996. In tobacco leaves, the genes encoding the nitrate-reducing or the ammonium-assimilating enzymes are regulated differently by external nitrogen-sources. *Plant Physiol. Biochem.* 34:665-671.
- Ocaña, A.; Cordovilla, M. P.; Ligeró, F. and Lluch, C. 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase in root nodules of *Vicia faba*: Partial purification and properties. *Physiol. Plant.* 97: 724-730.
- Ozbun, J. L.; Volk, R. J. and Jackson, W. A. 1965. Effects of potassium deficiency on photosynthesis, respiration and the utilization of photosynthetic reductant by mature bean leaves. *Crop Sci.* 5:497-500.
- Padgett, P. E. and Leonard, R. T. 1996. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 47:871-883.
- Pettigrew, W. T. and Meredith, W. R. Jr. 1997. Dry matter production, nutrient uptake, and growth of cotton as affected by potassium fertilization. *J. Plant Nutr.* 20:531-548.
- Ress, T. A. V.; Larson, T. R.; Heldens, J. W. G. and Huning, F. G. J. 1995. In situ glutamine synthetase activity in a marine unicellular alga. Development of a sensitive colorimetric assay and the effects of nitrogen status on enzyme activity. *Plant Physiol.* 109:1405-1410.
- Ruan, E.; Nerson, H. and Edelstein, M. 1998. Eggplant dry matter composition fruit yield and quality as

- affected by phosphate and total salinity caused by potassium fertilizers in the irrigation solution. *J. Plant Nutr.* 23:431-442.
- Rufty, T. W. Jr.; Jackson, W. A. and Raper C. D. R. J. 1981. Nitrate reduction in roots as affected by the presence of potassium and by flux of nitrate through the roots. *Plant. Physiol.* 68:605-609.
- Ruiz, J. M. and Romero, L. 1998. Calcium impact on phosphorus and its main bioindicators: response in the roots and leaves of tobacco. *J. Plant Nutr.* 21:2273-2285.
- Ruiz, J. M. and Romero, L. 1999. Cucumber yield and nitrogen metabolism in response to nitrogen supply. *Sci. Hort. (Amsterdam)*. 82:309-316.
- Ruiz, J. M. and Romero, L. 2000. Nitrogen metabolism and yield response of cucumber (*Cucumis sativus* L. Cv. Brunex) plants to phosphorus fertilisation. *J. Sci. Food Agric.* 80:2069-2073.
- Ruiz, J. M. and Romero, L. 2002. Relationship between potassium fertilization and nitrate assimilation in leaves and fruits of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Assoc. Appl. Biol.* 140:241-249.
- Ruiz, J. M.; Castilla, N.; and Romero, L. 2000. Nitrogen metabolism in pepper plants applied with different bioregulators. *J. Agric. Food Chem.* 48:2925-2929.
- Statistical Analysis System Institute, (SAS Institute) 1987. SAS/STAT Guide for Personal Computers. Versión 6. Cary, NC. USA. p. 1028-1056.
- Setzer, S. J.; Locascio, M. and Hochmuth, G. J. 1998. Nitrogen and potassium application scheduling effects on drip-irrigated tomato yield and leaf tissue analysis. *J. Plant Nutr.* 23:91-101.
- Shuman, L. M. 1994. Mineral Nutrition. In: Wilkinson, R.E. (ed.) *Plant-Environment interactions*. Marcel Dekker. New York, USA. p. 149-182.
- Siebrecht, S. and Tischner, R. 1999. Changes in the xylem exudate composition of poplar (*Populus treniula* x *P. alba*) dependent on the nitrogen and potassium supply. *J. Exp. Bot.* 50:1797-1806.
- Singh, R. P. and Srivastava, H. S. 1986. Increase in glutamate synthase activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant* 66:413-416.
- Sisson, V. A.; Rufty, T. W. and Williamson, R. E. 1991. Nitrogen-use efficiency among flue-cured tobacco genotypes. *Crop Sci.* 31:1615-1620.
- Sivasankar, S. and Oaks, A. 1996. Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem.* 34:609-620.
- Slawky, G. and Rodier, M. 1988. Biosynthetically active glutamine synthetase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*: optimization of the forward-reaction assay. *Mar. Bol.* 97:269-274.
- Stitt, M. 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:178-186.
- Streeter, J. G. and Barta, A. L. 1984. Nitrogen and minerals. In: Munson, R. D. (ed.) *Physiological basis of crop growth and development*. American Society of Agronomy. Madison, WI. USA. p. 175-200.
- Vance, C. P. and Stadel, S. 1984. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 75:261-264.
- Weidner, D.; Johnson, C.; and Decoteau, D. R. 1996. Nitrogen and potassium fertility affects jalapeño pepper plant growth, pod yield, and pungency. *HortScience* 31:1119-1123.
- Wolf, B. 1982. A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 13:1035-1059.
- Woodall, J.; Boxall, J. B.; Forde, B. G. and Pearson, J. 1996. Changing perspectives in plant nitrogen metabolism: The central role of glutamine synthetase. *Sci. Prog.* 79:1-26.
- Yemm, E. W. and Cocking, E.C. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst (Cambridge)* 80:209-213.