

## ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN RELACIÓN CON LA NUTRICIÓN NITROGENADA Y EL RÉGIMEN DE RIEGO EN PLANTAS DE REMOLACHA AZUCARERA (*Beta vulgaris* L.) DE SIEMBRA OTOÑAL

*Rocío Caballero-Valcarce, Lourdes Carmona, Ángel de la Torre, Alfonso de Cires*

Dpto. Biología Vegetal y Ecología (Fisiología Vegetal). Universidad de Sevilla. Apdo. 1095, 41080- Sevilla.

### INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es el elemento más importante de los suministrados como fertilizante al cultivo de remolacha debido a que se requiere en cantidades que muy pocos suelos contienen en formas inmediatamente disponibles para la planta. La adición de nitrógeno al suelo tiene efectos rápidos y muy notables en la apariencia del cultivo, con aumentos en el crecimiento, color y vigor de la cobertura foliar, que inevitablemente el agricultor asocia a una mayor capacidad de producción del mismo. Esto conduce frecuentemente a la fertilización en exceso, aun estando bien establecido que superadas las dosis óptimas los efectos sobre el rendimiento final son negativos y que dan lugar a pérdidas económicas considerables.

Por otra parte, la utilización racional de los medios de producción en agricultura adquiere cada día más importancia, sobre todo en lo que se refiere al uso del agua y de fertilizantes nitrogenados. La polución por nitrato de cursos de agua y acuíferos subterráneos está llegando a ser muy grave y se hace necesaria la limitación en el aporte de nitrógeno como fertilizante. En este sentido, ya se han identificado en nuestra región cultivos y zonas de actuación preferente entre los que se encuentra concretamente el de remolacha en la áreas Valle del Guadalquivir-Sevilla, Valle del Guadalquivir-Córdoba-Jaén y Litoral Atlántico (Orden Conjunta de las Consejerías de Medio Ambiente y Agricultura y Pesca de 27 de Junio de 2001).

Actualmente, son abundantes las formas de nitrógeno que el agricultor dispone para la fertilización de sus cultivos. El nitrógeno presente en los fertilizantes se puede encontrar en forma de sales amoniacales ( $\text{NH}_4^+$ ), sales de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o en forma de amidas ( $-\text{NH}_2$ ). Aunque las plantas pueden absorber por sus raíces amonio o nitrato, las condiciones edáficas, climáticas y de manejo agronómico facilitan la acción de la flora microbiana del suelo, que transforma cualquiera de las formas de nitrógeno utilizadas en el ión nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), siendo éste el mayoritariamente utilizado por las plantas.

## **Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal**

Desde los primeros trabajos en remolacha azucarera de Ulrich (1950) en la Universidad de California, la determinación de los niveles de nitrato en hoja y pecíolo, junto con el análisis de nitrógeno disponible en el suelo se ha revelado como una eficaz herramienta para la determinación de las necesidades nitrogenadas del cultivo. En este sentido, el establecimiento de una correlación entre las dosis y formas de nitrógeno aportadas al cultivo, la cantidad de nitrato presente en los tejidos vegetales y el rendimiento de la cosecha, resulta de gran utilidad a la hora de suministrar adecuadamente dichos fertilizantes, evitando aumentos de los costes de producción y/o problemas medioambientales (Baker et al., 1972; Elliot et al., 1987; Scaife et al., 1983). Sin embargo, no siempre se ha podido establecer una correlación clara entre el contenido en nitrato y la calidad de la cosecha (Marchner, 1995). El nitrato constituye el primer sustrato de la ruta de asimilación de nitrógeno inorgánico hasta el nivel de aminoácido (nitrógeno orgánico). Por otro lado, la gran mayoría de autores coinciden en el papel regulador que ejerce el enzima nitrato reductasa (NR, NADH: nitrato oxidoreductasa, EC. 1.6.6.1), primero que actúa en la ruta y paso limitante del proceso (Beevers y Hageman, 1980; Champigny, 1995). La relación entre actividad NR y nutrición nitrogenada ha sido tratada en la literatura (Santos et al., 1992; Stohr, 1999). Estos estudios ponen claramente de manifiesto que la actividad NR está influenciada por la cantidad y tipo de fuente de nitrógeno disponible para la planta. Por tanto, sería interesante estudiar esta relación en la remolacha de siembra otoñal con el objeto de establecer su utilidad como parámetro indicador del estado de nutrición del cultivo.

Por otro lado, el déficit hídrico en el cultivo de la remolacha, además de provocar una disminución de la producción (peso de raíz), contribuye a la acumulación de compuestos orgánicos de nitrógeno en la raíz (disminución de la pureza del jugo). Entre estos últimos se encuentran, fundamentalmente, aminoácidos y derivados, que actúan como osmorreguladores compatibles (prolina, prolina-betaína, glicina-betaína, etc.), sintetizados como respuesta al estrés hídrico. Estos compuestos, que se sintetizan en la hoja, se transportan a la raíz acumuladora disminuyendo el potencial hídrico y aumentando su capacidad de absorber agua del suelo. La demanda metabólica de estos compuestos podría influir sobre la capacidad de reducción de nitrato de la planta y/o sobre la desviación del nitrógeno asimilado hacia la síntesis de estos aminoácidos y derivados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

- **Material vegetal:** *Toma y preparación de muestras de campo.* Para cada una de las condiciones experimentales, y durante todo el periodo de cultivo en las diferentes campañas, se tomaron tres plantas diferentes, sanas y del mismo aspecto (Tabor et al., 1984). Tras su traslado en hielo carbónico al laboratorio, se lavaron abundantemente con agua destilada, se secaron y se recogieron en una única muestra homogénea todas las hojas y pecíolos, que se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, las muestras se conservaron en congelador a -35 °C. Se anotaron las condiciones climáticas y práctica de cultivo aplicada en cada caso

(Informes-memorias AIMCRA, 2000, 2001 y 2002).

- **Cultivo de plantas en condiciones controladas de crecimiento:** Se utilizaron plantas de 60 días de la var. Claudia. La germinación de las semillas y crecimiento de las plantas se realizó en una cámara de cultivo en condiciones controladas (12 h luz: RFA de entre 350-400  $\mu\text{mol}$  de fotones/ $\text{m}^2$  s a 25 °C y 60% HR; 12 h de oscuridad a 20 °C y 70% HR). Durante la germinación, los cultivos se regaron diariamente con agua destilada, y posteriormente, se traspasaron a cultivos hidropónicos con las soluciones nutritivas correspondientes. En los experimentos de disponibilidad de nitrato en el medio se utilizó una solución nutritiva tipo nitrato (Hewitt, 1966), modificando la concentración final de nitrato según el tratamiento. En los experimentos de estrés hídrico, se utilizó una solución nutritiva con una concentración de 15 mM nitrato. El estrés hídrico se indujo mediante la disolución de polietilenglicol-6000 en el medio de cultivo hasta conseguir unos potenciales osmóticos en las mismas de 0, -0,15, -0,25 y -0,50 MPa. Para cada una de las condiciones experimentales se tomaron varias muestras de hoja, peciolo y raíz y se congelaron rápidamente en  $\text{N}_2$  líquido hasta su procesamiento.

- **Determinación de la actividad NR:** la actividad NR se determinó como producción de nitrito a partir de nitrato. Las muestras se homogeneizaron en  $\text{N}_2$  líquido y se extrajeron rápidamente en relación 3/20 (p/v) en Hepes-KOH, 50mM, pH 7,6, conteniendo albúmina sérica bovina (BSA), 0,5%,  $\text{KPO}_4\text{H}_2\text{-K}_2\text{PO}_4\text{H}$ , pH 7,6, 10 mM Y leupeptina, 5 $\mu\text{M}$  (de Cires et al., 1993a, b). El nitrito formado se determinó colorimétricamente (Hageman y Reed, 1980). Los datos corresponden a la actividad NR durante los primeros 5 minutos del ensayo, corregidos para expresarlos sobre materia seca.

- **Determinación del nitrato:** el nitrato se extrajo según Wallinga et al., 1995, utilizando tampón Hepes-KOH, 5 mM, pH 7,6, en relación 1/25 (p/v). La concentración de nitrato se determinó refractométricamente con varillas reactivas mediante Nitrachek 404 (Schaefer., 1986). Los datos se corrigieron para expresarlos sobre materia seca.

- **Determinación del contenido hídrico relativo (CHR):** se utilizaron discos foliares de 2  $\text{cm}^2$  de superficie. En cada disco se determinó el peso fresco (PF), peso a máxima turgencia (PT; discos sumergidos en agua destilada durante 7 horas en iluminación a 100  $\mu\text{mol}$  fotones/ $\text{m}^2$  s) y peso seco (PS; muestras secadas a 70 °C hasta peso constante). El CHR se definió según Ghoulam et al., 2002, como:  $\text{CHR}(\%) = [(PF - PS)/(PT-PS)] \times 100$

- **Determinación del contenido en Prolina:** se tomaron muestras de 0,5 g de hojas o raíz. Se homogenizaron con 10 ml de ácido sulfosalicílico acuoso al 3% (p/v). El extracto obtenido se trató según Bates et al., 1973.

- **Tratamiento estadístico de los datos:** para analizar los resultados y su nivel de significación, éstos se han obtenido como la media aritmética ( $\bar{X}$ )  $\pm$  el error estándar (ES) de, al menos, tres determinaciones independientes. La significación

## **Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal**

se ha establecido aplicando el test "t de Student" con un nivel mínimo de significación del 5%, considerado habitual en la mayoría de los trabajos biológicos.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **• Campaña 1999-00**

En primer lugar, se procedió a establecer la relación entre concentración de nitrato y actividad NR en hojas de plantas de remolacha cultivadas en condiciones controladas en cámara de cultivo con diferentes concentraciones de nitrato en el medio de riego, desde 15 a 1,5 mM. Como se muestra en la Tabla 1, no se encontraron diferencias significativas en la actividad NR foliar extraíble de plantas cultivadas entre 15 y 3 mM nitrato, poniendo de manifiesto la capacidad del sistema de mantener las mismas tasas de asimilación de nitrato en un rango amplio de disponibilidad de nitrato en el medio. Sin embargo, cuando la concentración de nitrato en el medio fue de 1,5 mM, se obtuvieron valores de actividad NR un 63% inferior a los obtenidos en los casos anteriores. Paralelamente, se determinaron las concentraciones de nitrato en pecíolo y limbo en las mismas hojas (Tabla 1). Como puede observarse, el nitrato en ambos tejidos depende de la disponibilidad de nitrato en el medio. Tanto en el limbo como en el pecíolo, los contenidos en nitrato disminuyeron hasta valores de entre un 58% y un 77%, respectivamente a concentraciones de 8 mM nitrato en el medio. A concentraciones de 5 mM nitrato, los valores fueron menores del 10% en ambos casos. Cuando la concentración de nitrato en el medio fue de 1,5 mM, se determinaron valores de este ion por debajo del 1% del control, tanto en limbo como en pecíolo (Tabla 1). Es interesante señalar, que es en estas condiciones en las que la actividad NR fue significativamente menor, poniendo de manifiesto que las bajas concentraciones de nitrato en los tejidos de la hoja, como consecuencia de la poca disponibilidad del ion en el medio, afectan a la capacidad de reducir nitrato de la misma. Varios autores han estimado que la concentración de nitrato en pecíolos en hojas de remolacha deficiente en nitrógeno se encuentra entre 70y200 ppm, encontrándose valores normales de suficiencia del orden de 20.000 ppm y de hasta 35.000 ppm en casos de fertilización en exceso (Ulrich y Hills, 1967; Draycott , 1993). Estos resultados parecen indicar que la disminución de actividad NR observada a concentraciones de 1,5 mM nitrato en el medio es consecuencia de una situación clara de deficiencia en nitrato. Si esto fuera así, la determinación de actividad NR foliar también podría utilizarse como un indicador del estado nutricional nitrogenado de la planta, junto con la determinación del contenido en nitrato en pecíolo (y/o limbo), que habitualmente se utiliza.

Con objeto de establecer una primera relación entre contenido en nitrato y actividad NR en condiciones de cultivo en el campo, durante la campaña 1999-2000 se realizaron varios ensayos, tanto de dosis de abonado nitrogenado (dosis habitualmente recomendada por AIMCRA de 150-170 kg/ha y una en exceso, suplementando la anterior con 300 kg/ha) como de régimen hídrico (secano, sin riego y regadío, riego a demanda del cultivo) en siembra temprana o tardía (Tabla 2). En todos los casos estudiados se

puso de manifiesto que la actividad NR fue siempre mayor en aquellas condiciones de cultivo en las que el contenido en nitrato en peciolo fue superior. Así, tanto en el abonado en exceso como en las situaciones de sequía los contenidos en nitrato en peciolo fueron entre 50 y 150 veces mayores que en sus respectivos controles. Paralelamente, la actividad NR también fue entre 2 y 3 veces mayor (Tabla 2). Estos resultados parecían indicar la conveniencia de incluir la determinación de actividad NR en la elaboración de la recomendación de abonado del cultivo. Es interesante señalar que las menores concentraciones de nitrato determinado estaban por debajo de los valores de deficiencia antes mencionados, mientras que los valores más altos superaban el valor umbral de deficiencia establecido entre 70-200 ppm (Draycott AP, 1993). En todos los casos, los valores de actividad NR fueron muy inferiores a los determinados en hojas de plantas cultivadas en condiciones de laboratorio (Tabla 1, Tabla 2), probablemente debido a factores como la edad de la hoja y por la manipulación y transporte de la hoja desde el campo al laboratorio, condiciones que dificultan la extracción y el ensayo del enzima (Beevers y Hageman, 1980). Por otro lado, está bien descrito en la bibliografía que la actividad NR es uno de los parámetros fisiológicos más sensible a la sequía (Kaiser y Foster, 1989; Foyer et al., 1998), por lo que en principio resulta anómalo que los mayores valores de actividad NR se encuentren en condiciones de secano. Una posible explicación de estos resultados se encuentra al observar los registros de precipitaciones en las parcelas denominadas como de secano (datos aportados por AIMCRA). En este sentido, cabe pensar que, al menos en las primeras fases del cultivo, en las que se determinó la actividad NR, las altas precipitaciones en las parcelas de secano, no produjeron una situación de déficit hídrico acusado.

**Tabla 1. Actividad NR y nitrato en hojas de remolacha cultivadas con diferentes concentraciones de nitrato en el medio en condiciones controladas de laboratorio**

Nitrato en el medio (mM)	Nitrato ( $\mu\text{g/g PS}$ ; ppm)		Actividad NR foliar ( $\mu\text{mol NO}_2\text{-g PS h}$ )
	Limbo	Peciolo	
1,5	60 (< 1)	230 (< 1)	73 (37%)
3,0	70 (1)	560 (2)	190
5,0	340 (5)	2660 (8)	200
8,0	4200 (58)	24500 (77)	190
15,0	7300 (100%)	31466 (100%)	200 (100%)

*Tras dos horas de iluminación en la cámara de cultivo, se tomaron muestras de tejido y se congelaron rápidamente en  $\text{N}_2$  líquido. La actividad NR y el contenido en nitrato se determinaron como se indica en M. y M. Se representa la media, de al menos, tres experimentos independientes con un ES menor del 5%. Entre paréntesis se indican los datos en porcentaje.*

## Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

**Tabla 2. Nitrato en peciols y actividad NR en limbo de hojas de remolacha cultivadas en el campo con diferentes regímenes de riego o abonado nitrogenado**

Tratamiento	Nitrato en peciols ( $\mu\text{g/g PS}$ ; ppm)	Actividad NR foliar ( $\mu\text{mol NO}_2/\text{g PS h}$ )
<b>Abonado nitrogenado</b>		
DR	13	5
DR + 300	740	10
<b>Siembra temprana</b>		
Regadío	32	9
Secano	1300	25
<b>Siembra tardía</b>		
Regadío	13	4
Secano	2100	11

Los datos corresponden a las muestras recogidas el 9 de Mayo de 2000. Los datos de actividad NR corresponden a la media de, al menos, tres determinaciones independientes con ES menor del 5%. Los datos de contenido en nitrato fueron aportados por AIMCRA. DR, dosis recomendada, 150-170 Kg N/ha. DR+300, dosis recomendada (150-170 Kg N/ha) más 300 Kg/ha.

### • Campaña 2000-01

Para confirmar los datos anteriores, en la campaña agrícola 2000-01 se volvieron a determinar los valores de actividad NR foliar en ensayos de dosis de abonado y régimen hídrico en dos variedades (Claudia y Ramona), y se compararon con los valores de nitrato en peciols foliares (Tabla 3). Como en la campaña anterior, se pudo observar que los mayores valores de actividad NR se correspondieron con los valores de más alto contenido en nitrato en peciols. La actividad NR foliar fue mayor en condiciones de secano, tanto para la var. Ramona como para la var. Claudia, así como en la situación de abonado en exceso. En el ensayo de abonado, la actividad NR fue un 49% mayor en la dosis en exceso, correspondiéndose con unos niveles de nitrato en peciols 6 veces superiores a las condiciones de abonado recomendado (Tabla 3). Similares resultados se obtuvieron en los ensayos de régimen hídrico. La actividad NR en la var. Ramona fue sustancialmente superior en condiciones de secano, alcanzándose valores alrededor de 30 veces superiores al control en regadío. También en este caso los valores de nitrato en peciols fueron 3 veces superiores en condiciones de secano. En la var. Claudia, la actividad NR fue un 20% superior en condiciones de secano, correspondiéndose con valores de nitrato en peciols alrededor de 2 veces superiores respecto de la situación de regadío. (Tabla 3). Una posible explicación a los mayores valores de actividad NR encontrados en condiciones de secano podría ser, como en la campaña anterior, que este cultivo no haya llegado a estar sometido a un grado de estrés hídrico suficiente para disminuir la actividad enzimática, y que, este aumento, se deba a la necesidad de derivar masivamente el metabolismo

## Cap VI. Actividad nitrato reductasa

nitrogenado hacia la síntesis de compuestos nitrogenados que funcionen como osmolitos compatibles en la hoja y en la raíz. Para analizar esta hipótesis se compararon los valores de contenido en nitrógeno  $\alpha$ -amino en la raíz en los ensayos antes mencionados (Tabla 3). Como se puede observar, el contenido de estos compuesto fue siempre superior (un 83% en Ramona y un 40% en Claudia) en todas aquella situaciones experimentales de déficit hídrico, esto es, alto nitrato y alta actividad NR. También en el ensayo de abonado, los valores de nitrógeno  $\alpha$ -amino fueron un 30% superiores en el exceso de abonado, correspondiendo con los mayores valores de nitrato en peciolo y actividad NR. (Tabla 3).

**Tabla 3.** Nitrato en peciolo, nitrógeno  $\alpha$ -amino en raíz y actividad NR en limbo de hojas de remolacha de las variedades Ramona y Claudia cultivadas en el campo con diferentes regímenes de riego o abonado nitrogenado.

Tratamiento	Nitrato en peciolos ( $\mu\text{g/g PS}$ ; ppm)	Actividad NR foliar ( $\mu\text{mol NO}_2\text{-g PS h}$ )	Nitrógeno $\alpha$ -amino en raíz (meq/100g PS)
<b>Abonado nitrogenado</b>			
DR	1634	2,35	2,3
DR + 300	9780	3,50	3,0
<b>Variedad Ramona</b>			
Regadío	520	0,28	1,8
Secano	1628	7,74	3,3
<b>Variedad Claudia</b>			
Regadío	1842	2,60	2,5
Secano	3250	3,12	3,5

Los datos de contenido en nitrato representan la media de siete determinaciones realizadas por AIMCRA entre el 28 de Marzo y el 19 de Junio de 2001. Los datos de actividad NR son la media de siete determinaciones obtenidos en el mismo período. Los datos de contenido en nitrógeno  $\alpha$ -amino corresponden a la media de cuatro determinaciones realizadas por AIMCRA entre el 3 de Julio y el 13 de Agosto de 2001. DR, dosis recomendada, 150-170 kg N/ha. DR+300, dosis recomendada (150-170 kg N/ha) más 300 kg/ha. Todos los datos con un ES menor del 5%.

### • Campaña 2001-02

En esta última campaña, y utilizando los mismos ensayos de abonado nitrogenado y régimen hídrico, se intentó confirmar nuestra hipótesis inicial según la cual los valores mayores de actividad NR foliar, en condiciones de déficit hídrico moderado en la que la actividad aún no está afectada por la situación de déficit, responderían a una alta demanda metabólica de compuestos nitrogenados que, acumulándose en diversos tejidos de la planta, actúen como osmolitos compatibles, disminuyendo el potencial hídrico celular y aumentando la capacidad de absorber y/o retener mayor cantidad de agua que de un

### **Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal**

conjuntamente actividad NR y contenido en prolina en limbos de hojas de remolacha en los diferentes ensayos (Tabla 4). Como se puede observar, de nuevo los valores de actividad NR fueron mayores en condiciones de secano (2,5 y 1,8 veces superiores en Ramona y Claudia, respectivamente), correspondiéndose con los valores más altos de nitrógeno  $\alpha$ -amino en raíz, que fueron aproximadamente 2 veces superiores al de regadío, en ambas variedades. Cuando se analizó el contenido en prolina en limbo de hojas, se observaron valores más altos en condiciones de secano, de entre aproximadamente 2 y 5 veces superiores para las variedades Ramona y Claudia, respectivamente (Tabla 4). Similares resultados se encontraron en el ensayo de abonado, en los que la actividad NR, el contenido en nitrógeno  $\alpha$ -amino en la raíz y el contenido en prolina en limbo fueron superiores en las situación de exceso de abonado (Tabla 4).

Con objeto de establecer una correlación entre el contenido en prolina en limbo y el de nitrógeno  $\alpha$ -amino en la raíz, se determinó el contenido en prolina en ambos tejidos de plantas sometidas a distintos grados de estrés hídrico en condiciones controladas de laboratorio (Tabla 5). Se puede observar que el contenido en prolina en el limbo foliar aumenta paulatinamente hasta 14 veces respecto al control a medida que aumenta el grado de estrés hídrico en la planta. Este comportamiento sería el resultado de una adaptación foliar al estrés hídrico consistente en la acumulación de éste y, probablemente, de otros aminoácidos y compuestos nitrogenados que actuarán como osmolitos compatibles y disminuirán el potencial hídrico de la hoja. En esta situación, el mantenimiento de un potencial hídrico foliar adecuado, disminuiría considerablemente los efectos negativos del déficit hídrico sobre el metabolismo fotosintético en general. En la raíz, se observa un importante incremento de hasta 250 veces en situaciones de alto estrés hídrico (Tabla 5). En este tejido, la alta acumulación de osmolitos compatibles establecería un potencial hídrico lo suficientemente bajo para que la raíz pudiera seguir extrayendo agua del sustrato en estas condiciones de déficit hídrico.

Teniendo en cuenta que el aumento de nitrógeno  $\alpha$ -amino en la raíz disminuye los parámetros de calidad de la cosecha, los resultados parecen confirmar nuestra hipótesis inicial en la que la determinación de la actividad NR puede ser de utilidad al respecto. En este sentido, un ligero déficit hídrico en el cultivo se traduciría en un aumento del contenido en nitrógeno  $\alpha$ -amino en la raíz, y, por tanto de una disminución de la calidad. Si tenemos en cuenta la capacidad de las plantas de remolacha para sintetizar compuestos osmorreguladores nitrogenados como prolina, prolina-betaína, glicina-betaína y otros en situaciones de estrés hídrico, resultaría razonable encontrar valores de actividad NR en exceso. En estas condiciones, la demanda de aminoácidos que soporten una adecuada síntesis de los compuestos osmorreguladores exigiría una adecuada funcionalidad de la ruta de asimilación de nitrato y, por tanto, de actividad NR, primer enzima de la misma.

Del conjunto de resultados obtenidos en este trabajo sobre la utilización de la actividad NR como índice del estado nutricional del cultivo respecto al nitrógeno, concluimos que sería interesante estudiar varias modificaciones en el ensayo para hacerlo más adecuado al objetivo que se pretende. Sobre la base de los trabajos de Witt y Jungk (1974), una vez determinada la actividad NR en cada hoja decidida en el protocolo de muestreo, se determinaría la actividad NR "adicional" tras incubar una segunda muestra

## Cap VI. Actividad nitrato reductasa

de la misma hoja en nitrato y en iluminación. Si el incremento de actividad es significativo, podría concluirse que el aporte de nitrato es insuficiente y decidir si en esa fase del cultivo es conveniente aumentar la fertilización. En caso contrario, podremos concluir que se han superado las dosis de fertilización adecuadas.

**Tabla 4. Actividad NR y prolina en limbo y nitrógeno  $\alpha$ -amino en raíz de plantas de remolacha de las variedades Ramona y Claudia cultivadas en el campo con diferentes regímenes de riego o abonado nitrogenado.**

Tratamiento	Actividad NR foliar ( $\mu\text{mol NO}_2\text{-g PS h}$ )	Prolina en hojas ( $\mu\text{mol/g PF}$ )	Nitrógeno $\alpha$ -amino en raíz ( $\text{meq}/100\text{g PS}$ )
<b>Abonado nitrogenado</b>			
DR	10	1,25	2,30
DR + 300	11	1,80	4,80
<b>Variedad Ramona</b>			
Regado	10	1,13	2,20
Secano	25	2,60	4,50
<b>Variedad Claudia</b>			
Regado	9	0,30	2,20
Secano	17	1,40	5,00

Los datos de actividad NR y contenido en prolina representan la media de siete determinaciones realizadas entre el 6 de Mayo y el 12 de Agosto de 2002. Los datos de contenido en nitrógeno  $\alpha$ -amino son la media de cuatro determinaciones realizadas por AIMCRA entre el 15 de Julio y el 12 de Agosto de 2002. DR, dosis recomendada, 150-170 kg N/ha. DR+300, dosis recomendada (150-170 kg N/ha) más 300 kg/ha. Todos los datos con un ES menor del 5%.

**Tabla 5. Prolina en limbo y raíz de plantas de remolacha de la variedad Claudia sometidas a distintos grados de estrés hídrico en condiciones controladas en laboratorio.**

Prolina en el Tejido ( $\mu\text{mol/g PF}$ )	Contenido Hídrico Relativo Foliar (%)			
	84%	73%	65%	44%
Limbo	0,47	1,92	3,30	7,14
Raíz	0,21	0,42	0,35	5,25

Se representan la media de, al menos, cinco determinaciones independientes con un ES menor del 5%.

## **Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal**

---

### **BIBLIOGRAFÍA**

AIMCRA (2000) Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 1999/02. AIMCRA. Valladolid

AIMCRA (2001) Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2000/01. AIMCRA. Valladolid

AIMCRA (2002) Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2001/02. AIMCRA. Valladolid

Baker JM, Reed RM, Tucker BB (1972) The relationship between applied nitrogen and the concentration of nitrate-N in cotton petioles. *Soil Sci. Plant Anal.* 3: 345-350

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207

Beevers L, Hageman RH (1980) Nitrate and nitrite reduction. En: *The Biochemistry of Plants*, vol. 5, (B. J. Mifflin, ed.), Academic Press, New York, pp. 115-168

Champigny ML (1995) Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. *Photosynthesis Research* 46: 117-127

De Cires A, de la Torre A, Delgado B, Lara C (1993a) Role of light and CO<sub>2</sub> fixation in the control of nitrate reductase activity in barley leaves. *Planta* 190:277-283

De Cires A, de la Torre A, Lara C (1993b) Involvement of CO<sub>2</sub> fixation products in the light-dark modulation of nitrate reductase activity in barley leaves. *Physiol. Plant.* 89:577-581

Draycott AP (1993) Nutrition. En: *The sugar beet crop. Science into practice* (D.A. Cooke y R.K. Scott eds.). Chapman & Hall, London, UK, pp. 239-278

Elliot DE, Reuter DF, Growden B, Schultz JE, Mulihan PH, Gouzos J, Heanes DL (1987) Improved strategies for diagnosing and correcting nitrogen deficiency in spring wheat. *J. Plant Nut.* 10: 1761-1770

Foyer CH, Valadier MH, Migge A (1998) Drought induced effects on NR activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol.* 117: 283-292

Ghoulam C, Foursy A, Fares K (2002) Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 47: 39-50

Hageman RH, Reed AJ (1980) Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.* 69:270-281

Hewitt EJ (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2nd ed. *Comm. Agri. Bur., Farnham Royal.* UK

## **Cap VI. Actividad nitrato reductasa**

---

Kaiser W, Foster J (1989) Low CO<sub>2</sub> prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiol.* 91: 970-974

Marchner H (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd ed. Academic Press, Inc., London, pp. 461-479

Santos I, Almeida JM, Salema R (1992) Influence of nitrogen nutrition on growth, nitrate reductase and nitrite reductase of seedlings of maize. *J. Plant Nut.* 15: 2531-2544

Schaefer NL (1986) Evaluation of a hand held reflectometer for rapid quantitative-determination of nitrate. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 17: 937-951

Stohr C (1999) Relationship of nitrate supply with growth rate, plasma membrane-bound and cytosolic nitrate reductase, and tissue nitrate content in tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 22: 169-177

Tabor JA, Pennington DA, Warrick AW (1984) Sampling variability of petiole nitrate in irrigated cotton. *Comm. Soil. Plant Anal.* 15: 573-585

Ulrich A (1950) Critical nitrate levels of sugar beet estimated from analysis of petioles and blades, with special reference to yields and sucrose concentrations. *Soil Sci.* 69: 291-309

Ulrich A, Hills FJ (1967) Principles and practice of plant analysis. En: *Soil testing and plant analysis, part II*, SSSA special publication No. 2, pp. 11-24

Wallinga I, Van Der Lee Ji, Houba VJG, Van Vark W, Novozamsky I (1995) *Plant Analysis Manual*. Kluwer Academic Publishers. Dordrech. Holland.

Witt HH, Jungk A (1974) The nitrate inducible nitrate reductase activity in relation to nitrogen nutritional status of plants. En: *Plant Analysis and fertilizer problems* (J. Wehrman, ed.) pp. 519-527