

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal



Consejería de Agricultura y Pesca

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL

Cristina Echevarría Ruiz de Vargas
Rodrigo Morillo-Velarde Pérez-Barquero
Javier Cejudo Fernández
Carmen Ortiz Mellet
José M. García Fernández
Ángel de la Torre Casas
Sofía García-Mauriño Ruiz-Berdejo
Luis Felipe Gordo Ingelmo
Alfonso de Cires Segura
Eduardo T. Jiménez Segovia
Juan José Martínez Quesada
María-Cruz González García
Juan M. Benito Hernández
Rosario Álvarez Morales
Rocío Caballero Valcarce
José A. Monreal Hermoso
Lourdes Carmona López
Ana-Belén Fera Bourrellier
Arancha León Morillo

Las investigaciones indicadas en este trabajo fueron financiadas con fondos FEDER (ref. 1FD97-0893-(03-01)) con fondos de la Universidad de Sevilla y El Monte (ref.USE/MONTE 99-4) y con la participación de AIMCRA*.

*Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera.

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL

©Edita: JUNTA DE ANDALUCÍA. **Consejería de Agricultura y Pesca.**

©Textos: Autores

Publica: Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Divulgación.

Colección: Agricultura.

Serie: Cultivos Industriales.

Coordinadores Científicos: Cristina Echevarría Ruíz de Vargas y Rodrigo Morillo-Velarde Pérez-Barquero.

Autores: Cristina Echevarría Ruíz de Vargas, Rodrigo Morillo-Velarde Pérez-Barquero, Javier Cejudo Fernández, Carmen Ortiz Mellet, José M. García Fernández, Ángel de la Torre Casas, Sofía García-Mauriño Ruíz-Berdejo, Luis Felipe Gordo Ingelmo, Alfonso de Cires Segura, Eduardo T. Jiménez Segovia, Juan José Martínez Quesada, María-Cruz González García, Juan M. Benito Hernández, Rosario Álvarez Morales, Rocío Caballero Valcarce, José A. Monreal Hermoso, Lourdes Carmona López, Ana-Belén Feria Bourrellier y Arancha León Morillo.

Fotografías e Ilustraciones: los autores.

I.S.B.N.: 84-8474-164-8.

Dep. Legal: SE-5989-05.

Maquetación e impresión: Axioma Comunicaciones, S.L. (Sevilla).

ÍNDICE

	PRESENTACIÓN.....	9
Capítulo 1.	CONCEPTOS GENERALES DEL METABOLISMO DEL CARBONO Y DEL TRANSPORTE DE SACAROSA.....	11
	Cristina Echevarría, Ana-Belén Fera y Eduardo T. Jiménez	
Capítulo 2.	CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL.....	23
	Luis F. Gordo, Rodrigo Morillo-Velarde, Juan José Martínez, Cristina Echevarría y Sofía García-Mauriño	
Capítulo 3.	ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE DEGRADACIÓN DE LA SACAROSA Y PRODUCCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN LA REMOLACHA DE SIEMBRA OTOÑAL.....	45
	Eduardo T. Jiménez, Sofía García-Mauriño, Rodrigo Morillo-Velarde y Cristina Echevarría	
Capítulo 4.	LOS NIVELES DE ADENILATOS REFLEJAN MAYOR ACTIVIDAD METABÓLICA Y CAPACIDAD RESPIRATORIA EN LA REMOLACHA OTOÑAL RESPECTO DE LA PRIMAVERAL.....	71
	Sofía García-Mauriño, Eduardo T. Jiménez, José A. Monreal, Rodrigo Morillo-Velarde y Cristina Echevarría	
Capítulo 5.	EFFECTO DEL NITRÓGENO SOBRE EL DESARROLLO DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL.....	81
	Juan José Martínez, Rodrigo Morillo-Velarde, Luis F. Gordo, José Luis Bermejo y Cristina Echevarría	
Capítulo 6.	ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN RELACIÓN CON LA NUTRICIÓN NITROGENADA Y EL RÉGIMEN DE RIEGO EN PLANTAS DE REMOLACHA AZUCARERA (<i>Beta vulgaris</i> L.) DE SIEMBRA OTOÑAL.....	101
	Rocío Caballero, Lourdes Carmona, Ángel de la Torre y Alfonso de Cires	

Capítulo 7.	LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN RELACIÓN CON LA NUTRICIÓN NITROGENADA Y CON EL ESTRÉS HÍDRICO.....	115
	Rosario Álvarez, Arancha León y Cristina Echevarría	
Capítulo 8.	UNA ESTRATEGIA PARA LA INHIBICIÓN DEL ESPIGADO DE LA REMOLACHA DE SIEMBRA OTOÑAL.....	131
	María Cruz González, Juan José Martínez, Rodrigo Morillo-Velarde y F. Javier Cejudo	
Capítulo 9.	LOS NIVELES DE PROLINA REFLEJAN LA SITUACIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO DE LA REMOLACHA DEL SUR.....	143
	José A. Monreal, Eduardo T. Jiménez, Rodrigo Morillo-Velarde, Sofía García-Mauriño y Cristina Echevarría	
Capítulo 10.	RESPUESTA VARIETAL EN REMOLACHA AZUCARERA AL ESTRÉS HÍDRICO.....	153
	Rodrigo Morillo-Velarde, Luis F. Gordo, Juan José Martínez, Cristina Echevarría y Sofía García-Mauriño	
Capítulo 11.	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES RESULTANTES DE LA DIMERIZACIÓN DE LA SACAROSA Y DE LA D-FRUCTOSA (DIANHÍDRIDOS DE FRUCTOSA) FORMADOS EN LA RAÍZ DE LA REMOLACHA O DURANTE SU PROCESADO INDUSTRIAL.....	171
	Juan M. Benito, Carmen Ortiz Mellet y José M. García Fernández	

Hasta el siglo XIX no existía otro azúcar que el elaborado a partir de la caña de azúcar. Fue el agrónomo francés Olivier de Serres quien señaló la presencia de la sacarosa en la remolacha y la posibilidad de obtener azúcar cristalizante mediante el tratamiento industrial de la raíz. En 1747 un farmacéutico alemán, Andrés Marggraf, confirmó el descubrimiento de Olivier de Serres, demostrando que a partir de remolacha podía obtenerse azúcar cristalizada de tan buena calidad como la de la caña. En 1802 se obtuvo el primer azúcar de remolacha por un procedimiento industrial. Estas experiencias se extendieron inmediatamente a Francia, Bélgica, Austria, Rusia y otros países europeos.

Los valores de riqueza de sacarosa en esos momentos oscilaban entre 11-14%. La selección genética de variedades con raíces gruesas, sin ramificar y con altas concentraciones de materia sacárida (entre el 18 y el 20% de su peso), en conjunción con un análisis pormenorizado del manejo del cultivo para optimizar su producción han permitido que la remolacha en la actualidad pueda ser cultivada en una gran variedad de áreas climáticas y suelos diversos, con un buen rendimiento del cultivo.

En España, la modificación más profunda de las zonas remolacheras se llevó a cabo en 1972, refundiéndose las diferentes zonas en tres zonas únicas: Zona Duero, Zona Ebro-Centro y **Zona Sur**.

La zona sur es una zona rica en posibilidades, en ella se cultiva la remolacha en secano y en regadío, con un ciclo distinto al resto del país: siembra en Octubre y recolección en Julio, denominada **siembra otoñal**. La zona sur es actualmente la segunda zona remolachera del país.

La **siembra otoñal** se encuentra hoy día en 12 países, todos situados en una estrecha banda, paralelo 40°N-trópico de Cáncer. El 35% de la superficie corresponde a España. Las características específicas de esta práctica de cultivo llevan asociadas una serie de peculiaridades entre ellas: unas **condiciones ambientales muy variables**, las plantas se siembran en otoño, pasan el invierno, y se recogen en verano. La **vernalización** que sufren en las regiones más frías de Andalucía (Jaén) hace que se den problemas de espigado con importantes pérdidas en la cosechas; el periodo de **cultivo es más largo** (nueve meses de media) que en el norte, para conseguir una producción similar, y las **altas temperaturas del verano**, previas a la recolección, causan estragos en la calidad industrial.

La técnica de cultivo de la siembra de otoño no sólo se distingue de la siembra tradicional (primaveral) por las diferentes fechas de siembra y recolección sino también por el uso de algunos factores de cultivo. Especialmente es diferente la preparación del suelo para la siembra, los tipos de variedades (resistentes al espigado, y adaptadas a la zona sur) y el manejo de herbicidas por una mayor competencia de malas hierbas. Además, el riego y recolección requieren un manejo diferencial.

El manejo de algunas de estas técnicas de cultivo se puede considerar un problema resuelto para la siembra de otoño gracias a la investigación y experimentación realizada en nuestro país. Sin embargo, salvo en algunos temas puntuales y aplicados,

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

existen pocos resultados de trabajos de investigación relativos a problemas de siembra de otoño. La respuesta al manejo de ciertos factores de cultivo sigue siendo errática, muy condicionada al año y la localidad y no permite generalizar la recomendación al agricultor, bien sea esta última mejorar la producción de azúcar, la calidad industrial en Andalucía o disminuir el impacto ambiental por reducción de "input" en el cultivo.

AIMCRA, a través de sus iniciativas para la investigación acuerda realizar un proyecto de investigación con la Universidad de Sevilla para desarrollar los primeros estudios sobre la fisiología de la remolacha de siembra otoñal. Esta iniciativa se consolidó en el proyecto titulado: "ESTUDIO DE LOS FACTORES AMBIENTALES Y FISIOLÓGICOS QUE DETERMINAN LA PRODUCCIÓN Y LA CALIDAD DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL", fue financiado con fondos FEDER, (ref. 1FD97-0893-CO3-01) y con fondos de la Universidad de Sevilla y El MONTE, en su proyecto de ref. USE/MONTE 99-4 y con la participación de AIMCRA. En él se realizaron tres subproyectos:

- **Subproyecto 1:** Dirigido por la Dra. Cristina Echevarría Ruíz de Vargas, Profesora Titular de Universidad, del Dpto. de Biología Vegetal y Ecología (Unidad de Fisiología Vegetal), de la Facultad de Biología. En este subproyecto nos orientamos hacia aspectos de la fisiología de la remolacha que pudieran estar relacionados con: i) el estrés durante el periodo de recolección y su influencia en la producción de azúcares reductores. Estudiamos la evolución de las enzimas implicadas en la degradación de sacarosa en la raíz, la producción de prolina, y parámetros de calidad como la producción de azúcares reductores (glucosa); ii) las alteraciones de la respiración de la siembra de otoño en comparación con la siembra de primavera, mediante la determinación de los niveles de adenilatos; iii) la actividad nitrato reductasa en relación con la nutrición nitrogenada y el régimen de riego; y por último, iv) la participación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en el balance C/N de la planta, a través de su participación en la producción de compuestos α -amino y en el estrés hídrico.

- **Subproyecto 2:** Dirigido por el Dr. Javier Cejudo Fernández, Profesor Titular de Universidad del Instituto de Biología Vegetal y Fotosíntesis, centro mixto USE/CSIC. Este subproyecto se orientó hacia el estudio del espigado (la floración) y su posible control con inhibidores de giberelinas, así como la clonación de las invertasas, sacarosa sintasa y GA₂₀ oxidasa de la remolacha.

- **Subproyecto 3:** Dirigido por la Dra. Carmen Ortiz Mellet, Profesora Titular del Dpto. de Química Orgánica de la Facultad de Química. Este subproyecto se encaminó a la identificación de compuestos con un posible valor añadido en remolachas de baja calidad. Se centraron en la identificación de dianhídridos de fructosa (DAFs) en la raíz de remolacha.

Por último la participación de AIMCRA, que desarrolló todos los aspectos relacionados con el diseño de parcelas, recogida de muestras y análisis de los parámetros agronómicos de la remolacha, así como la información de los datos climatológicos.

Este trabajo fue un ejemplo de diseño y coordinación para que las muestras analizadas en cada grupo fueran similares de forma que se pudieran relacionar los

resultados. Así, de cada muestreo de campo, muchos, se obtuvieron cuatro lotes iguales, 3-4 remolachas por lote, y se distribuyeron, en la misma mañana, a los diferentes centros de investigación y a AIMCRA (Valladolid y Sevilla), siendo ya procesados en cada centro según los requerimientos de cada investigación. Los resultados obtenidos han demostrado, a pesar de haber limitado a un número reducido de remolachas cada muestreo, simplemente no era viable el procesamiento de más muestras, un acierto en el diseño experimental ya que existe una gran coherencia entre resultados obtenidos por los diferentes grupos, por diferentes técnicas y evaluaciones, dándole una gran consistencia al estudio.

Este proyecto ha sido también un esfuerzo conjunto para integrar visiones tan alejadas como la investigación aplicada y la investigación fundamental en un convencimiento profundo de que sólo así nos beneficiaremos unos y otros, tal como en su momento lo vislumbraron las políticas de investigación dirigidas a potenciar la colaboración entre la Empresa y la Universidad. No siempre fue fácil hablar un idioma común con acentos radicalmente diferentes, pero no hay nada que supere al deseo y la voluntad de entenderse. Este proyecto ha sido, por parte de todos, un buen ejemplo de ello.

Por último, este proyecto ha generado publicaciones científicas, participaciones a congresos nacionales e internacionales, conferencias e intercambio de ideas con grupos extranjeros, presentaciones de resultados, coloquios y jornadas con los diferentes sectores de la Industria Remolachera y con los Agricultores. Además, ha aportado numerosas ideas y perspectivas que no siempre han sido plasmadas en soportes concretos pero que, sin duda, nutrirán en un futuro próximo la investigación y mejorarán el manejo del cultivo de la remolacha de siembra otoñal.

El libro que presentamos no pretende ser una exposición exhaustiva y pormenorizada de los resultados obtenidos de las tres, cuatro cosechas en algunas ocasiones (periodo 1999 a 2003), estudiadas, ya que éstos están recogidos en las memorias anuales del proyecto, sino destacar los aspectos más relevantes de esta investigación. Los diferentes capítulos son la contribución personal de los autores que lo firman, si bien la colaboración entre todos es la que verdaderamente ha hecho posible este trabajo.

Por último queremos mostrar nuestro agradecimiento a José Antonio Esteban por su apoyo continuo y entusiasmo, a Marcelino Bilbao y Antonio Moreno que participaron en las etapas iniciales del proyecto, y a Nieves por su amabilidad y eficacia.

Cristina Echevarría Ruiz de Vargas
Profesora Titular de Universidad
Rodrigo Morillo-Velarde Pérez-Barquero
Director de Investigación de AIMCRA

**Conceptos Generales del
Metabolismo del Carbono y del
Transporte de Sacarosa**



CAP I. CONCEPTOS GENERALES DEL METABOLISMO DEL CARBONO Y DEL TRANSPORTE DE SACAROSA.

Cristina Echevarría, Ana Belén Fera y Eduardo T. Segovia

Dpto. Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda de la Reina Mercedes nº 6. 41012. Sevilla.

LA FOTOSÍNTESIS

Los únicos organismos capaces de convertir los minerales y el CO_2 (moléculas inorgánicas de bajo contenido energético) en moléculas orgánicas de alto contenido energético son los organismos fotosintéticos. Para ello utilizan la energía de la luz en un proceso que se denomina fotosíntesis, donde la energía luminosa es transformada en energía electrónica y en energía química quedando acumulada en la biomasa sintetizada (Fig. 1). En la fotosíntesis se producen hidratos de carbono, como la sacarosa, y se desprende O_2 (Fig. 1).

Los organismos fotosintéticos engloban a las plantas, algas y bacterias fotosintéticas y son llamados autótrofos. El resto de organismos (hongos y animales) no pueden realizar

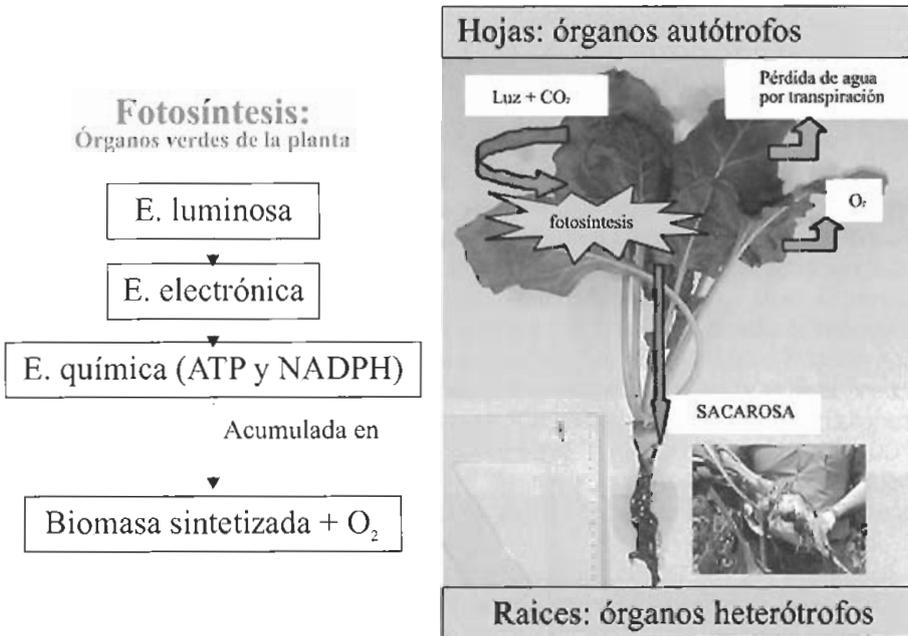


Figura 1: Representación esquemática del concepto de fotosíntesis e ilustración de dicho proceso en la planta.

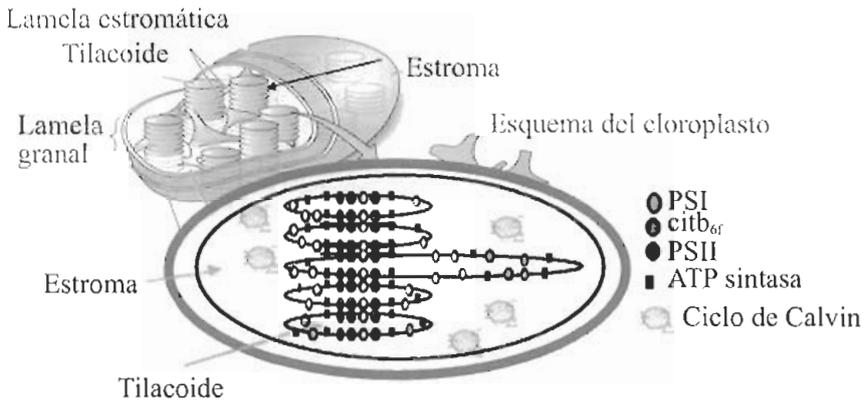


Figura 2: Estructura del cloroplasto.

la fotosíntesis, necesitan alimentarse de la materia orgánica ya sintetizada por lo que reciben el nombre de organismos heterótrofos.

Dentro de la planta podemos aplicar estos dos conceptos a los diferentes órganos y tejidos. Los órganos y tejidos autótrofos son aquellos capaces de realizar la fotosíntesis (hojas fundamentalmente) y los órganos heterótrofos (raíces, flores, frutos y semillas) son nutridos por las hojas y tejidos fotosintéticos (Fig. 1). Algunos de estos órganos heterótrofos, como algunas cubiertas de semillas o frutos, desarrollan tejido fotosintético durante estadios jóvenes, procurándose parte del alimento, aunque en general la mayor parte de la nutrición de estos órganos la soportan las hojas exportando sacarosa (Fig. 1).

La fotosíntesis se realiza en las células fotosintéticas que contienen cloroplastos (Fig. 2). Los cloroplastos están formados por dos membranas. La membrana interior está enormemente apilada recordando los acumuladores de las centrales eléctricas. Estos apilamientos de membranas se llaman grana y cada repliegue, **que constituye un compartimento estanco**, se llama tilacoide (Fig. 2). Haciendo una ampliación de un detalle de la membrana del tilacoide se aprecian una serie de complejos proteicos fijos en la membrana interconectados por moléculas móviles (no mostradas), en definitiva una serie de componentes colocados secuencialmente y que van a permitir el transporte de electrones. De todos estos componentes insertos en la membrana se destaca el fotosistema II (PSII ó P680), el fotosistema I (PSI ó P700), el citocromo b_6f , y la ATP sintasa (Fig. 2). En el estroma se encuentra la RubisCO (Ribulosa bifosfato Carboxilasa Oxigenasa), el enzima que fija el CO_2 , y toda la maquinaria necesaria para la realización del Ciclo de Calvin o ciclo asimilador de CO_2 (Fig. 2).

En el PSI y PSII se encuentran las clorofilas. Las clorofilas son moléculas capaces de captar luz. A este tipo de moléculas se les llama pigmentos. Las clorofilas absorben eficazmente luz roja (680 y 700 nm) y azul y reflejan el verde. Reciben su nombre del cloro, que es un gas de color amarillo verdoso. **Todos** los organismos fotosintéticos poseen clorofila.

La corriente electrónica útil se genera de forma sencilla. La Fig. 3 recoge este proceso. La luz incide en las clorofilas de los fotosistemas liberando un electrón. Este electrón circula de unos transportadores a otros (PQ, citocromo b_6f y PC) hasta el PSI, donde es nuevamente impulsado por la energía luminosa hasta el $NADP^+$ donde finalmente queda atrapado, dando lugar al **NADPH**. Las clorofilas del PSII que han perdido su electrón lo recuperan del agua en una reacción en la que se rompe la molécula de agua en sus componentes, electrones (e^-), protones (H^+) y el O_2 . Del agua se aprovechan todos sus elementos. Los **electrones** ($4e^-$ por cada dos moléculas de agua) proveen de electrones a la corriente electrónica impulsada por la luz y quedarán finalmente acumulados en la molécula de **NADPH**. El O_2 es desprendido a la atmósfera suministrando oxígeno para la respiración. Finalmente, **los protones** (H^+) se van acumulando en el tilacoide, **que es un compartimento estanco**, creándose un gradiente de protones entre el interior y el exterior. Los protones tienden a salir del tilacoide para disipar el gradiente, y lo hacen por otro complejo proteico inserto en la membrana del tilacoide llamado ATP sintasa donde se sintetiza el **ATP** (adenosin trifosfato) (Fig. 3). Si bien el **NADPH** libera la energía acumulada cediendo un electrón (energía redox) el **ATP** libera su energía hidrolizando el enlace fosfato (Energía de enlace fosfato, $\sim P$).

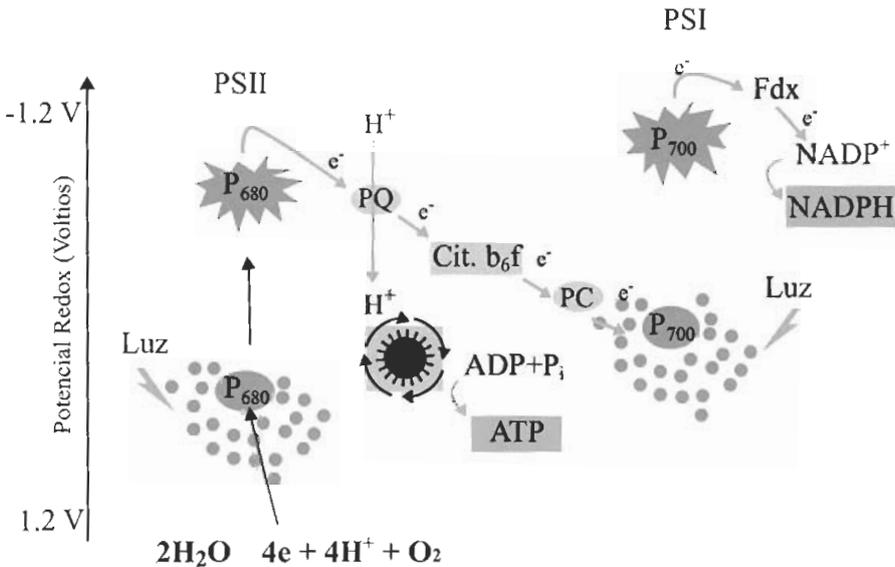


Figura 3: Esquema del transporte fotosintético de electrones. Se señala el cambio de potencial redox que experimentan las clorofilas tras la absorción de luz y los diferentes componentes de la cadena del transporte fotosintético de electrones.

Este proceso es la transformación de la energía luminosa en energía electrónica y finalmente en energía química acumulada en el **NADPH** y en el **ATP** y constituye la parte **fotoquímica** de la fotosíntesis.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

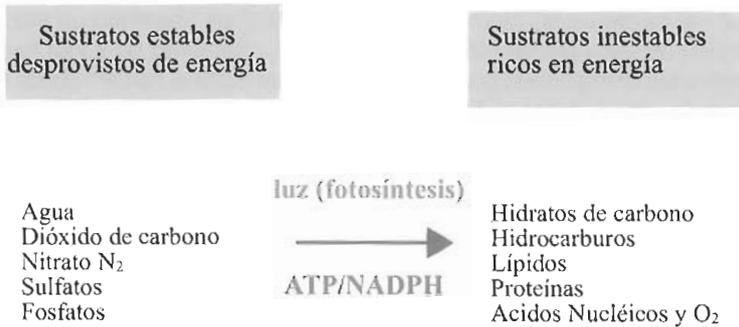


Figura 4: Principales transformaciones de moléculas inorgánicas en moléculas orgánicas utilizando la energía del NADPH y el ATP.

Los electrones acumulados en el **NADPH** reducido serán utilizados para reducir el carbono y también el nitrógeno y el azufre y para todos los procesos metabólicos de la planta. La reducción de estos sustratos inorgánicos estables pero sin energía, dará lugar a sus correspondientes moléculas orgánicas inestables y ricas en energía. El fosfato es el único elemento que no se reduce. Interviene en el metabolismo general de la planta como acumulador y transportador de la energía del ATP, pasando de fosfato inorgánico (Pi) a fosfato rico en energía (~P). La Fig. 4 recoge estas transformaciones.

Este esquema pone en evidencia que el NADPH y el ATP que hay en la célula es común y que debe haber un equilibrio en su utilización, en las diferentes rutas metabólicas para que el crecimiento de la planta sea el adecuado. Por ejemplo, un exceso de abonado nitrogenado puede alterar el balance C/N de la planta destinándose más esqueletos carbonados al crecimiento de los órganos vegetativos de la planta y menos a órganos de reserva y frutos, lo que en cultivos como el de la remolacha merma la producción.

LA REDUCCIÓN FOTOSINTÉTICA DEL CARBONO

La reducción/asimilación del carbono en la planta se da en una serie de reacciones que se recogen en la figura 5. Primero se fija el CO₂ en una reacción de carboxilación catalizada por la RubisCO produciéndose dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Éste se reduce, utilizando el ATP y el NADPH, para producir gliceraldehido-fosfato (triosas fosfato). Parte de esas triosas fosfato se utilizan para abastecer el ciclo que es autocatalítico, y parte se destinan a la síntesis de sacarosa y almidón. Este ciclo se conoce con el nombre de ciclo de Calvin-Benson en honor a los dos investigadores que lo describieron. Ocurre en el estroma del cloroplasto (Fig. 2), y está altamente regulado y acoplado a las reacciones fotolumínicas descritas anteriormente, donde se produce el ATP y el NADPH. Con este ciclo se completa la fotosíntesis que comprende las reacciones fotolumínicas (Fig. 3) y el ciclo de Calvin-Benson (Fig. 5).

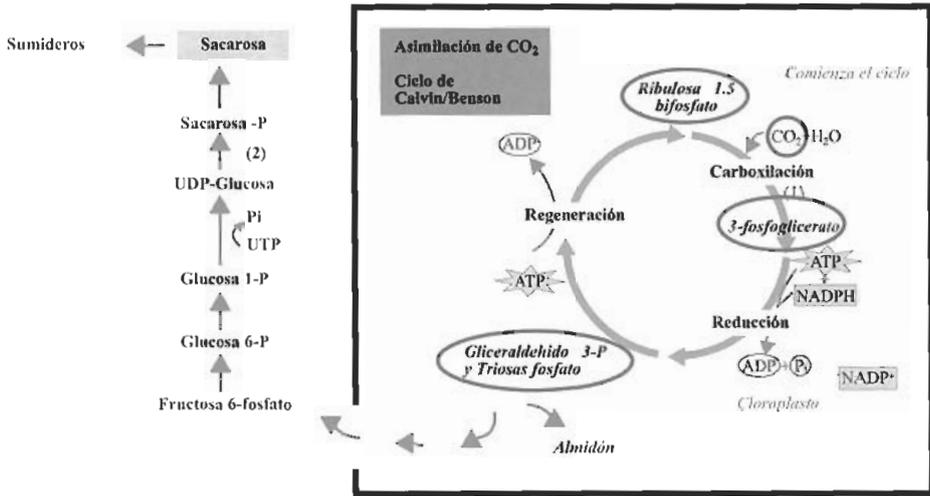


Figura 5: Etapas representativas del Ciclo de asimilación de CO₂ o ciclo de Calvin-Benson y algunos pasos de la síntesis de sacarosa. (1) Enzima Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), (2) Enzima Sacarosa fosfato sintetasa (SPS).

La síntesis de sacarosa se realiza a partir de UDP-glucosa y de Fructosa-6-P, en una reacción catalizada por la Sacarosa Fosfato Sintasa (Fig.5). Cuando las necesidades energéticas y nutricionales de la hoja están satisfechas, el exceso de sacarosa es exportado a los órganos heterótrofos procurándoles el alimento y la energía necesarios para su desarrollo. A diferencia de la glucosa y de la fructosa (azúcares reductores), la sacarosa es un azúcar no reductor, es decir, no reacciona espontáneamente con ningún compuesto, siendo la molécula ideal para ser transportada. Otros azúcares no reductores que se transportan en algunas plantas son la rafinosa, estaquiosa y verbascosa.

TRANSPORTE DE SACAROSA DE LAS FUENTES A LOS SUMIDEROS

El transporte de sacarosa desde las fuentes donde es producida (hojas y partes verdes) a los sumideros, donde se consume y/o se acumula (raíces, frutos, semillas), se realiza por el floema (Fig. 6). Por el contrario,



Figura 6: Representación esquemática de las vías de transporte en la planta.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

el agua y las sales minerales se transportan por el xilema (Fig. 6).

El transporte de sacarosa en el floema se hace por un mecanismo que, por lo simple, los Fisiólogos Vegetales tardaron en aceptarlo. Es un transporte por **flujo en masa**. En los centros de producción de sacarosa (fuentes), la sacarosa sobrante es cargada en el floema (Fig. 7). Esto hace que baje el potencial osmótico en esa parte del floema (Fig. 7, $\Psi_s = -1,7$ MPa), y el potencial hídrico (Fig. 7, $\Psi_w = -1,1$ MPa), produciéndose una entrada de agua que hace que aumente el potencial de presión (Fig. 7, $\Psi_p = 0,6$ MPa). A nivel de los sumideros ocurre el proceso contrario, la sacarosa sale del floema para ser consumida o acumulada en la raíz, produciéndose un aumento del potencial osmótico (Fig. 7, $\Psi_s = -0,7$ MPa) que conlleva una salida de agua en esa parte del floema y una bajada del potencial de presión (Fig. 7, $\Psi_p = 0,3$ MPa). En consecuencia se establece una diferencia de presión hidrostática entre la fuente, con 0,6 MPa, y el sumidero con 0,3 MPa, que tiende a disiparse produciéndose un flujo de agua. Este flujo de agua arrastra a las sustancias en solución como la sacarosa, e incluso a partículas en suspensión transportándolas a lo largo del floema (Fig. 7).

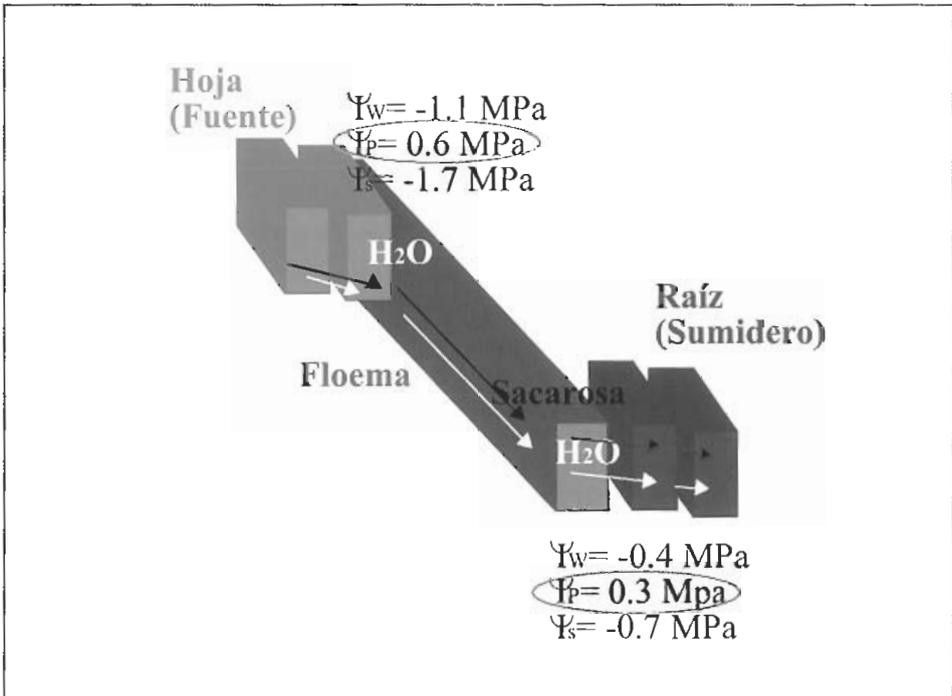


Figura 7: Mecanismo de transporte de sacarosa por flujo en masa.

PARTICIÓN DEL CARBONO

La pregunta que nos podríamos hacer sería ¿cómo se decide, en un momento dado, a qué sumidero va la sacarosa?, o ¿cuanta sacarosa se destina a cada uno de los sumideros: flores, frutos, raíces e incluso hojas nuevas?. Para responder a esta pregunta sabemos que el flujo de sacarosa será mayor cuanto mayor sea la diferencia de presión hidrostática entre dos puntos (fuente-sumidero). Esta diferencia viene determinada por la fuerza del sumidero, siendo ésta igual a la talla del sumidero por su actividad (Fig. 8). La distribución de la materia seca, fundamentalmente fotoasimilados, entre los diferentes sumideros se denomina **partición**, y es un parámetro de gran importancia en la determinación de la productividad de las especies cultivadas (Gifford, et al., 1984). De hecho, la mayor productividad de los cultivares más modernos se debe a un aumento en la proporción de fotoasimilados acumulados en las partes aprovechables, más que a un aumento en la fotosíntesis total de la planta, y esto se consigue mediante un proceso de selección y mejora.

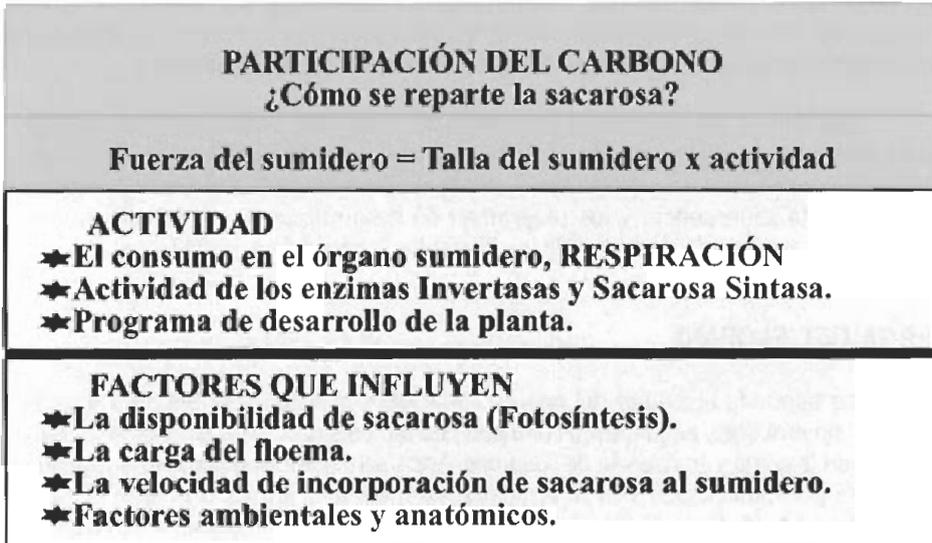


Figura 8: Esquema que destaca algunos conceptos implicados en la partición del carbono, como la fuerza del sumidero, la actividad, y los factores que influyen en la actividad.

La actividad del sumidero viene determinada por el consumo de sacarosa en el órgano sumidero, que a su vez viene determinado, en primera instancia, por la actividad de los enzimas que degradan la sacarosa: las invertasas y la sacarosa sintasa. Ambos parámetros de actividad vienen definidos por el programa de desarrollo del órgano y de la planta, tal como veremos en capítulos posteriores, y por las condiciones ambientales (Fig. 8). Por ejemplo, el comienzo del desarrollo del programa de floración supone un reajuste total de la partición del carbono (sacarosa), destinándose menos a la raíz y más al desarrollo del tallo floral.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

En *Beta vulgaris* y guisante se ha visto que la reducción considerable de las fuentes (eliminación drástica del número de hojas) no reduce el aporte de sacarosa a corto plazo (8 h), sin embargo las raíces empiezan a recibir menos sacarosa que las hojas jóvenes (Fondy and Geiger, 1977); este experimento sugiere que las hojas jóvenes en estas plantas son potentes sumideros.

El estrés hídrico o las altas temperaturas promueven el cierre estomático (poros de la planta por los que penetra el CO₂ para la fotosíntesis y por los que se pierde el agua por transpiración) reduciéndose o incluso anulándose la fotosíntesis, lo que hace que la planta tenga que utilizar sus reservas de carbono esto, en cultivos como el de la remolacha azucarera, puede representar importantes pérdidas en la producción.

El efecto del estrés hídrico puede modificar también el gradiente de presión ya que la falta de agua puede bajar la presión en el floema. En estas condiciones se destinaría más sacarosa a la raíz (Schulz, 1994). Además, la turgencia de las células puede tener un efecto en el transporte a través de la membrana modificando la actividad de las ATPasas (Wyse et al., 1986). También influyen factores anatómicos, por ejemplo, el tamaño final del fruto del manzano está directamente relacionado con el número de células del fruto, factor que se determina durante las primeras fases de su ontogenia.

Por último, las hormonas vegetales, así como los niveles de carbohidratos (sacarosa) o sus metabolitos pueden modificar la relación entre fuente y sumidero (Koch, 1996), en concreto las hormonas tienen un papel relevante controlando el desarrollo de los órganos, la senescencia y los programas de desarrollo que, en definitiva, van a establecer el tamaño y la actividad de los diferentes órganos de la planta.

CARGA DEL FLOEMA

La talla y la actividad del órgano sumidero son determinantes para importar sacarosa, sin embargo, encontramos una serie de factores que también juegan un papel relevante en la carga y transporte de sacarosa, éstos son: i) la disponibilidad de sacarosa (producida por fotosíntesis) y ii) la velocidad de incorporación en el floema. En *Beta vulgaris*, en la hoja, la sacarosa se vierte al exterior de la célula (espacio apoplástico) (Taiz and Zeiger, 2000), y se incorpora al floema mediante un transporte activo que depende de la disponibilidad de ATP.

Durante los meses de diciembre-enero, la remolacha otoñal crece poco. Su fotosíntesis y crecimiento están ralentizados debido a los fotoperiodos cortos y a las bajas temperaturas. La llegada de la primavera, con aumento del fotoperiodo y aumento de temperaturas, posibilita el periodo de máximo crecimiento y también de máxima exportación de sacarosa a la raíz (Gordo, 2003).

DESCARGA DEL FLOEMA

La sacarosa transportada por el floema se descarga en los sumideros a través de los plasmodesmos por la vía simplástica (vía de conexión de las células que comunica los citoplasmas). Sin embargo en las raíces acumuladoras de *Beta vulgaris* y en las hojas nuevas de maíz parece ser que la sacarosa al llegar al sumidero saldría al exterior de las células del floema a los espacios intercelulares ocupados por la pared celular (apoplasto) y se incorporaría al sumidero desde el apoplasto, en un proceso en el que la sacarosa sería invertida por la invertasa ácida de pared, y atravesaría la membrana plasmática en forma de fructosa y glucosa (Taiz and Zeiger, 2000). Una vez en la célula, la glucosa y la fructosa pueden ser consumidas o convertidas en sacarosa y acumuladas en la vacuola.

DEGRADACIÓN DE SACAROSA

El primer paso para la degradación de la sacarosa lo catalizan los enzimas invertasas (ácidas y neutras) y la sacarosa sintasa. En la figura 9 se muestran las reacciones catalizadas por estas enzimas que rompen la sacarosa en fructosa y glucosa o UDP-glucosa, los precursores de todas las rutas metabólicas y energéticas que se desarrollen en el órgano sumidero (Fig. 9). Finalmente, la sacarosa acumulada en la raíz será igual a la sacarosa que llega de las hojas menos la sacarosa consumida.

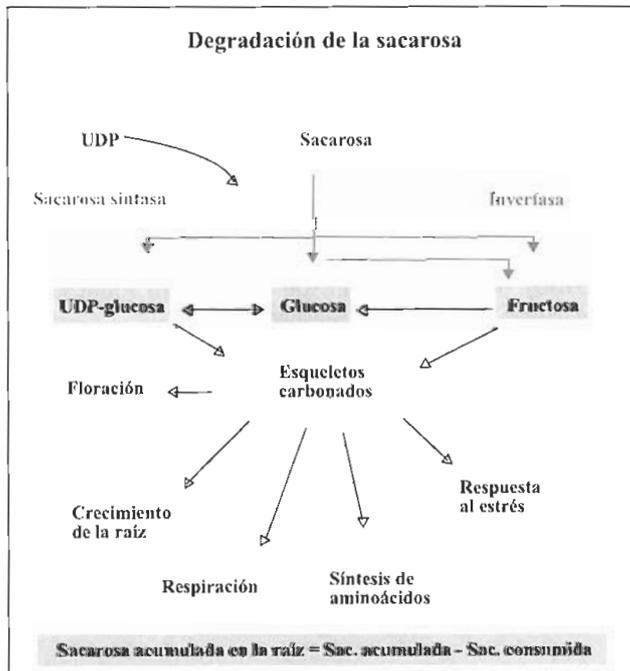


Figura 9: Degradación de la sacarosa por los enzimas Invertasa y Sacarosa sintasa y algunas de las vías de utilización de los esqueletos carbonados.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Esta breve descripción de algunos aspectos de la fotosíntesis, del metabolismo del carbono y del transporte de sacarosa nos pone en antecedente de la perfección y del equilibrio establecidos en una planta para lograr sobrevivir y perpetuarse y nos muestra el largo camino recorrido en lo que concierne a la domesticación de las especies vegetales para su mejor rendimiento en agricultura, a través de los programas de selección o, más recientemente, con la transformación genética de especies vegetales. En este sentido cabe destacar la progresión de la *Beta vulgaris* que pasa de ser una hierba de la que se utilizaban sus hojas para comida de animales con una raíz acumuladora capaz de acumular un 7-8 % de sacarosa, a doblar la capacidad de acumulación de sacarosa, con variedades, cosechas y condiciones en las que se alcanza hasta un 20 % de sacarosa en la raíz y cuyo cultivo representa un tercio de la producción mundial de azúcar.

BIBLIOGRAFÍA

Koch KE (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol* 47: 509-540.

Fondy BR, and Geiger DR (1977). Sugar selectivity and other characteristics of phloem loading in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol* 59: 953-960.

Gifford RM, Thorne JH, Hitz WD, Giaquinta RT. (1984). Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science* 225: 801, 808.

Gordo LF (2003). La calidad tecnológica de la remolacha azucarera. AIMCRA, Ed. Artes gráficas. Valladolid.

Schulz A (1994). Phloem transport and differential unloading in pea seedlings after source and sink manipulations. *Planta* 192: 239-248.

Taiz and Zeiger (2000). Translocation in the Phloem. In *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Wyse RE, Zamski E, Tomos AD (1986). Turgor regulation of sucrose transport in sugar beet taproot tissue. *Plant Physiol* 81: 478-481.

Crecimiento y **D**esarrollo de la
Remolacha **A**zucarera de
Siembr a **O**toñal



CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL

Luis F. Gordo¹, Rodrigo Morillo-Velarde¹, Juan José Martínez¹ Cristina Echevarría² y Sofía García-Mauriño²

¹AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera), Delegación Sur, C/ Metalurgia nº 36, 41080 Sevilla, España.

²Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, España.

INTRODUCCIÓN

La planta de la remolacha, en su desarrollo, responde como cualquier cultivo de forma directa a las interacciones del medio donde se encuentra. Los condicionantes de temperatura, estado hídrico, situación nutricional, etc van a cuestionar su crecimiento y posterior potencial productivo.

Debido a las situaciones climáticas tan diversas que pasa la remolacha de siembra otoñal desde que se siembra hasta que se recoge no nos permite aplicar los modelos nutricionales obtenidos para el otro y mayoritario cultivo de siembra primaveral; aunque si que es cierto que ambos tipos de siembra poseen las mismas necesidades.

Consideramos que el seguimiento evolutivo de los diferentes parámetros de desarrollo de la planta a lo largo de su ciclo, nos puede dar una herramienta factible del conocimiento de su comportamiento frente a los condicionantes agronómicos y climáticos que en su conjunto van a cuestionar la producción final de cara al agricultor y la mayor posibilidad de extracción del azúcar que la raíz contiene.

OBJETIVOS

El poder predecir en tiempo y manera el comportamiento final de producción tanto agrícola como industrial de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Se pretende obtener las curvas patrones del comportamiento evolutivo de la remolacha, curvas que nos servirán para poder caracterizar las necesidades de la planta y sus posibles correcciones puntuales. Este estudio se ha realizado dentro del proyecto de investigación FEDER 1FD97-0893-C03.

LA REMOLACHA EN ESPAÑA Y EN ANDALUCÍA

El cultivo de la remolacha en España representaba el 0,6% de la superficie cultivada. La cuota de azúcar nacional era de 1 Mt, la cual era producida mediante el cultivo de remolacha en cerca de 180.000 ha y de caña aunque como se verá la superficie cultivada es oscilante en el tiempo.

El cultivo se sitúa en tres grandes zonas (Norte, Centro y Sur) que se reparten la cuota de azúcar nacional y a la postre la producción de la raíz (ver Tabla 1). En dicha tabla tanto las hectáreas como las producciones de raíces son estimadas a partir de la cuota asignada, coeficientes que varían con el tiempo.

Tabla 1.- Cuota Nacional de Azúcar procedente de la remolacha

	Azúcar blanco (t)	t de raíz	ha cultivadas
España	985.000	7.500.000	180.000
Zona Norte	595.950	4.500.000	110.000
Zona Sur	325.050	2.520.000	60.000
Zona Centro	64.000	480.000	10.000

España goza de una doble modalidad de cultivo que se distingue por la época de siembra y recolección. Las zonas Norte y Centro siembran en primavera y recogen la cosecha en otoño-invierno y la zona Sur con dos tipos de cultivo (secano y regadío) siembran a finales del otoño para cosechar en primavera-verano. Las condiciones climatológicas que sufren ambas modalidades de siembra diferencian claramente la forma de cultivo y marcan en recolección los rendimientos industriales y agrícolas.

En la Tabla 2 se reflejan las superficies de cultivo y producciones tanto de azúcar como de remolacha en valores medios de las campañas 2000/01 a 2003/04. Las dos últimas columnas informan de las producciones medias por hectárea de raíz y de azúcar ensacado en cada zona y en el conjunto nacional.

Tabla 2.- Producciones medias cuatro últimas campaña

	Azúcar Blanco	t. de Raíz	Ha. Cultivadas	Az t/ha	Raíz t/ha
España	1.037.789	7.169.777	109.688	9,46	65,37
Zona Norte	638.410	4.230.178	57.100	11,18	74,08
Zona Sur	65.939	468.833	5.925	11,13	79,13
Zona Centro	333.440	2.470.766	46.663	7,15	52,95

En la Tabla 3, se indican los resultados de la campaña recientemente finalizada (2003/04). El dato de azúcar blanco producido es estimado aunque muy próximo al real.

Tabla 3.- Producciones medias última campaña

	Azúcar Blanco	t. de Raíz	Ha Cultivadas	Az t/ha	Raíz t/ha
España	913.225	6.519.239	97.700	9,34	66,72
Zona Norte	591.809	4.079.479	52.200	11,34	78,15
Zona Sur	55.356	417.569	5.000	11,07	83,51
Zona Centro	266.060	2.022.191	40.500	6,57	49,93

Las producciones nacionales son oscilantes. La máxima producción de azúcar blanco se produjo en la campaña 2002/03 con 1.200.000 t. Siendo la pasada con 913.000 t la que menos produjo. Lo mismo nos ocurrió con respecto a la cosecha de raíz; con respecto al azúcar envasado por hectárea el máximo rendimiento se dio en la campaña 2002/03 con 10,31 t/ha frente a la 2001/02 que superó escasamente las 8 t/ha. La superficie cultivada ha disminuido en estas cuatro campañas, pasando como media nacional de 120.000 ha en la campaña 2000/01 a 97.700 ha en la pasada. Los aumentos de producción han sido patentes lo que ha motivado que se llegue, como media nacional, casi a la barrera impensable hace unos años de 10 t/ha de azúcar ensacado.

En la siembra otoñal la superficie cultivada ha disminuido en las cuatro últimas campañas un 27% siendo las producciones medias de raíz oscilantes entre 56 t/ha de la campaña 2002/03 a 49 t/ha de la 2001/02. La mayor producción de azúcar ensacado por hectárea la obtuvo la campaña 2002/03 con 8,09 t/ha.

En la Tabla 4 se reflejan las diferentes condiciones de temperatura y pluviometría de la campaña 2003/04 que sufre el cultivo a lo largo de su ciclo según siembras.

La mayor parte de la superficie sembrada en la zona norte se realiza en el mes de marzo, la nascencia plena se efectúa en el mes de abril, la Eto correspondiente en este período es inferior a la de la siembra otoñal para la misma época de cultivo. Uno de los condicionantes que cuantifica la diferencia entre las dos siembras es el valor de la Eto que es sumamente elevada en la siembra otoñal, precisamente en el período en el que el cultivo presenta su máximo desarrollo; la Eto de los meses de mayo a agosto supera los 170 mm, frente a las necesidades de la siembra primaveral (meses de julio a septiembre) que no alcanza los 100 mm. Otro dato importante es la radiación neta recibida en esos meses en los que la siembra primaveral no alcanza los 800 MJ/m², valor que es superado en la siembra otoñal. Hay que destacar como otra diferencia las temperaturas medias que soporta la planta en esos períodos críticos, en los que la siembra otoñal alcanza los 25°C (meses de junio a agosto), mientras que en la siembra primaveral

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Tabla 4.- Datos comparativos climáticos entre las dos siembras. Coloreado los meses de cultivo.

		Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Siembra Primavera	Temp. Media °C	3,6	3,8	9,4	10,6	14,6	21,5
	ETo(P.MON.) mm	12,4	15,6	23,8	26,8	33,4	50,5
	Radiación neta MJ/m ²	211,1	220,8	445,9	554,3	781,8	772,7
	Precipitación mm	71,2	58,8	28,0	49,4	26,6	14,4
Siembra Otoño	Temp. Media °C	3,6	3,8	9,4	10,6	14,6	21,5
	ETo(P.MON.) mm	12,4	15,6	23,8	26,8	33,4	50,5
	Radiación neta MJ/m ²	211,1	220,8	445,9	554,3	781,8	772,7
	Precipitación mm	71,2	58,8	28,0	49,4	26,6	14,4
		Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Siembra Primavera	Temp. Media °C	21,1	23,4	17,9	10,9	8,0	4,5
	ETo(P.MON.) mm	86,0	69,4	60,8	39,0	28,2	17,7
	Radiación neta MJ/m ²	774,1	628,0	389,9	237,7	158,5	152,0
	Precipitación mm	18,4	26,8	17,2	94,0	71,8	23,6
Siembra Otoño	Temp. Media °C	24,8	26,2	22,0	15,5	10,4	10,5
	ETo(P.MON.) mm	212,1	193,0	144,1	72,5	40,8	34,5
	Radiación neta MJ/m ²	895,8	763,2	625,5	350,0	284,9	244,5
	Precipitación mm	0,0	0,2	34,6	162,6	98,4	93,8

no llega a alcanzar en ningún mes de cultivo dicha temperatura. En el período de arranque las diferencias entre una y otra siembra alcanzan los 17°C (primaveral frente a otoñal).

Las precipitaciones por año son superiores en la siembra otoñal (648,6 mm) que en la primaveral (500 mm) aunque muy desuniformemente repartidos en la otoñal; con períodos fuerte de lluvia al comienzo del cultivo (que facilita la nascencia y asentamiento de la planta) y brusca parada en los períodos de más necesidades hídricas.

Todo lo anterior conlleva a hacer un tratamiento diferencial a una u otra siembra, buscando actuaciones propias que rentabilicen el cultivo. Bien es cierto que en el regadío otoñal se alcanzan con naturalidad producciones de 80 t/ha, techo que fácilmente se puede superar con una adecuación correcta del cultivo que se va desarrollando gracias a la investigación aplicada de AIMCRA y al esfuerzo de múltiples agricultores que asumen las recomendaciones que se les proporciona realizando un manejo apropiado del cultivo.

Debido a las condiciones climáticas de la siembra otoñal, ha habido una revolución sustancial en la fecha de siembra que lentamente ha ido siendo adelantada (normalmente se realiza en el mes de octubre), aumentando con ello el ciclo y escapando en la mayor medida posible de las altas temperaturas que se producen en el verano que provocan serios deterioros a la raíz. A su vez el adelantamiento de la siembra ha inducido un desarrollo rápido de la planta provocando la posible invernización de la misma que puede inducir a un aumento sustancial del espigado. Estas siembras tempranas producen una serie de ventajas importantes como son: el mejor aprovechamiento de las lluvias de otoño-invierno; un adelanto sustancial de la nascencia; desarrollo rápido de las hojas; facilidad de la aplicación de los herbicidas de postemergencia; cierre más temprano del ciclo, con una recolección más temprana que lleva a un aumento sustancial de la producción. Frente a las ventajas expuestas existen también inconvenientes como son: el aumento del espigado y la mayor aparición de plagas y enfermedades que van a llevar a la realización de mayor número de tratamientos insecticidas y fungicidas.

Hoy día prácticamente el 95% de la siembra se realiza de precisión utilizando o bien variedades monogérmes genéticas ó con semillas multigérmes calibradas. Una distribución del tipo de semilla utilizada sería:

• Monogérmes pildoradas	52,2%
• Monogérmes desnudas	1,4%
• Multigérmes calibrada pildorada	42,1%
• Multigérmes calibrada	0,3%
• Multigérmes natural	4,0%

Es importante destacar que AIMCRA realiza un control anual de todos los lotes vendidos en el mercado.

DESARROLLO EVOLUTIVO DEL CULTIVO

El estudio evolutivo del cultivo, se ha basado en el seguimiento de 17 campos en la campaña 2001, 4 en la 2002 y 3 en la 2003.

A.- Caracterización climatológica de las tres campañas

En el cuadro adjunto se muestran comparativamente los diferentes datos climáticos, sobre la misma estación meteorológica (Rinconada), de las tres campañas donde se ha realizado este proyecto. La comparación se realiza mensualmente. En la

Mes	Tª Máxima (°C)			TªMinima (°C)			TªMedia (°C)		
	2001	2002	2003	2001	2002	2003	2001	2002	2003
Oct	24,2	25,7	25,4	10,2	14,7	12,5	17,2	19,6	18,4
Nov	18,5	18,0	19,4	6,9	7,2	8,0	12,8	12,0	13,7
Dic	15,9	15,6	16,5	7,1	5,6	8,2	11,3	10,1	12,1
Ene	15,1	16,6	14,8	7,1	6,2	4,5	11,0	10,9	9,2
Feb	18,1	19,1	16,2	7,0	5,4	4,8	12,0	11,7	10,2
Mar	21,1	21,3	21,5	10,6	9,2	9,4	15,6	14,9	15,0
Abr	25,2	23,2	21,9	10,0	10,3	10,6	17,6	16,6	15,9
May	26,3	26,9	29,1	12,4	11,5	13,9	19,3	19,4	21,6
Jun	33,3	31,0	32,3	15,8	16,0	17,1	24,7	23,4	24,6
Jul	32,3	33,6	34,7	16,0	16,7	16,4	24,2	25,0	25,4
Ago	35,7	32,3	41,2	18,2	16,9	21,2	26,6	24,2	30,8

Mes	Precipitación (l/m²)			Radiación (MJ/día)			Eto (mm/día)		
	2001	2002	2003	2001	2002	2003	2001	2002	2003
Oct	16,1	38,2	25,4	14,0	12,3	13,3	2,3	2,9	3,0
Nov	63,9	94,6	141,8	8,8	10,5	9,0	1,5	1,8	1,6
Dic	181,6	59,0	90,8	5,6	7,5	7,5	1,1	1,6	1,1
Ene	171,2	45,0	51,8	6,7	9,2	9,5	1,1	1,6	1,5
Feb	19,2	5,2	61,6	11,1	12,8	12,0	2,2	2,3	1,8
Mar	149,2	91,6	45,6	13,8	16,3	15,8	2,9	3,2	3,4
Abr	4,2	57,6	109,4	23,3	20,2	19,9	5,1	4,3	4,0
May	22,4	11,8	11,4	22,4	25,8	26,3	5,0	5,7	5,8
Jun	1,0	4,0	0,6	28,2	27,7	27,1	6,3	6,4	5,9
Jul	0,4	0,0	0,0	26,0	28,6	28,4	5,7	6,4	5,9
Ago	0,0	0,0	0,0	23,9	25,8	25,8	5,4	5,8	6,2

temperatura media, máxima, mínima, radiación y ETo se representa la media diaria, mientras que la precipitación representa la suma del mes correspondiente.

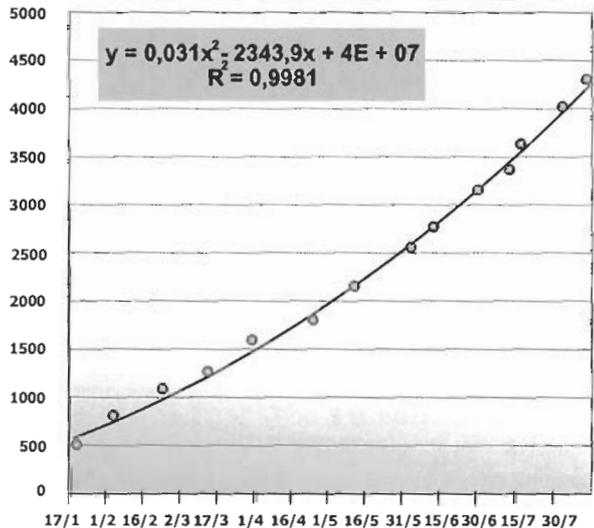
De los datos climatológicos mostrados se destaca el año 2003 con el invierno (Enero-Febrero) más frío que ha existido dando medias mensuales inferiores en más de 1,5°C a los otros años. También se puede mencionar el incremento de temperaturas desde Abril a Mayo donde se produce un aumento en las temperaturas máximas de 7,2°C frente a 3,7°C en el 2002 y 1,1°C en el 2001, así como en las temperaturas mínimas con un incremento de 3,3°C frente a 1,2°C y 2,4°C respectivamente. Aunque en Junio las temperaturas máximas y medias fueron similares al resto de las campañas no ocurrió así con las temperaturas mínimas que se mantuvieron superiores durante este mes.

Sobre las precipitaciones el invierno más lluvioso ha sido el del 2001 con un 340% más que el 2002 y 180% que el 2003. En el período de asentamiento del cultivo (meses de abril y mayo) el año 2003 es el que más agua ha recibido, el 2001 con un 22% sobre aquel es el que menos lluvias han tenido, también el 2002 tan solo ha recibido un 57% de lo que ha tenido el 2003. En su computo general la lluvia recibida en cada año en los meses de octubre a agosto ha sido de 629,2 L para el año 2001; de 407 L en el 2002 y de 538,4 L en el 2003. En términos relativos el año 2002 ha recibido de agua de lluvia un 64% de la que había recibido el 2001 y el 2003 un 85% de la del 2001.

B.- Seguimiento evolutivo

La metodología empleada en este estudio nos permite hablar de tendencias más que de valores absolutos. Con el fin de minimizar el efecto de siembra y fecha de nascencia, el estudio evolutivo se ha basado en referencia a los grados-día acumulados en el cultivo. Algunos autores como Holen consideran que el desarrollo fenológico depende de las temperaturas acumuladas desde la siembra, así indican que para que se produzca la emergencia el número de grados-día acumulados debe de ser de 230 y de 570

Fig. 1.- Relación grados-día y fecha de cultivo



Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

para que la planta presente las primeras hojas verdaderas. La relación grados-día acumulados y las fechas medias de toma de muestra sigue una parábola de segundo grado con R^2 de 0,998, Fig. 1.

• Producción de Raíz

Observando la Fig. 2, el peso de raíz crece lentamente hasta finales de febrero donde a partir de ahí casi sube exponencialmente hasta primeros de junio donde tiende a estabilizarse con un ligero ascenso. Echo que parece producirse cuando las temperaturas medias alcanzan los 25°C y los grados-día acumulados se aproximan a los 3500. La curva de ajuste representa una parábola de tercer grado con un R^2 de 0,993.

• Producción Foliar

La producción de materia foliar -Fig. 3- cumple una parábola de tercer grado con R^2 de 0,989, con un máximo a

finales de mayo, correspondiendo a unos 2500 grados-día. Tanto la pendiente de acumulación positiva del primer período (hasta finales de mayo) como la del segundo negativa son prácticamente iguales. Es de destacar la fuerte pérdida de masa foliar que se produce a partir de la segunda quincena de junio, llegando a perder cerca del 80% hasta el final de las tomas. Se puede indicar que el efecto que parece ser produce esa pérdida de hojas lo marca la temperatura media diaria, que ya en el mes de junio alcanza valores próximos a los 25°C.

Fig. 2.- Evolución de la Producción de Raíz (t/ha)

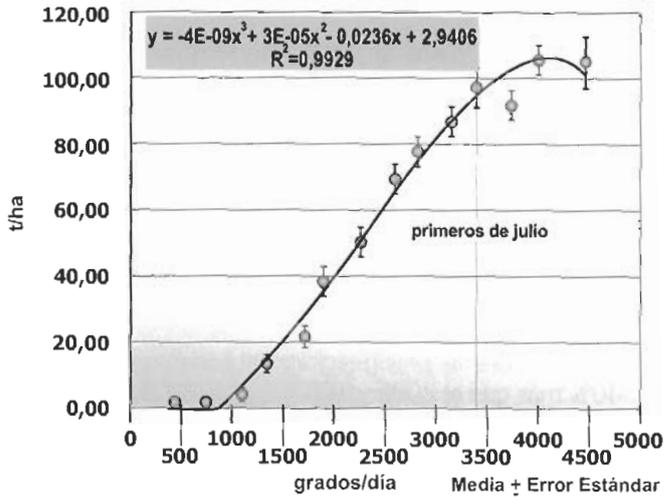
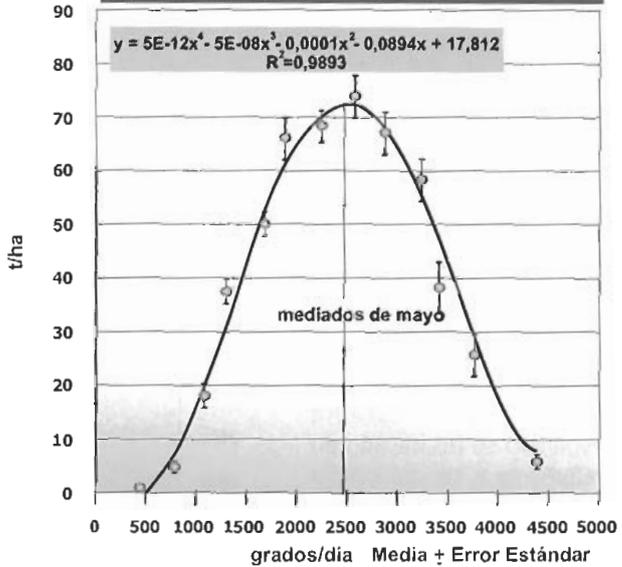
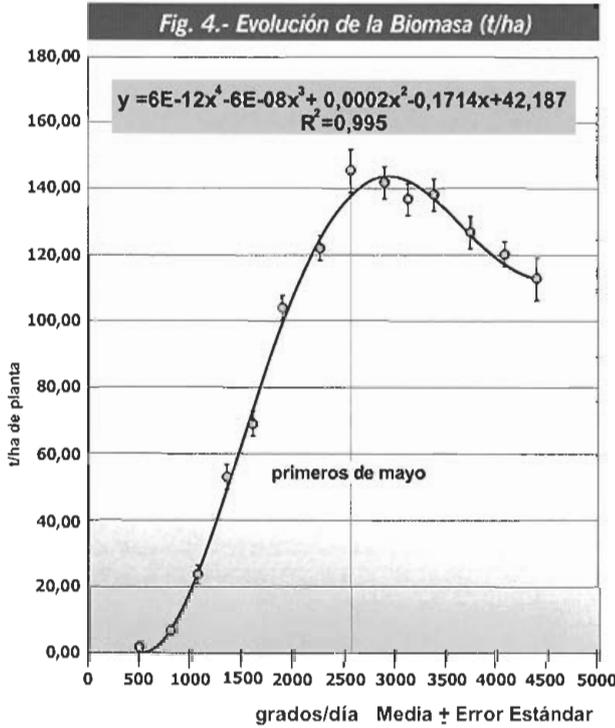


Fig. 3.- Evolución de la Producción de Hojas (t/ha)



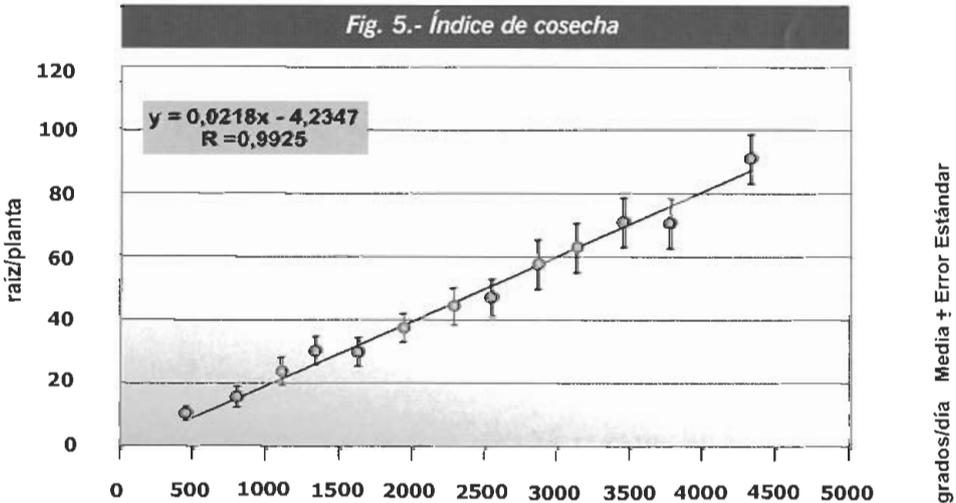


• Producción de biomasa total

Observando la Fig. 4 donde se representa la producción del total de la planta (Hojas+Raíz) podemos ver cómo existe un crecimiento inicial de tipo exponencial hasta mayo. A partir de aquí se produce un descenso en la biomasa hasta las 112 t/ha en final de toma. La curva de ajuste es una parábola de segundo grado con un R^2 de 0,995.

• Índice de cosecha

Denominamos índice de cosecha a la relación que existe entre el peso de la raíz y el de la planta completa. Su estudio evolutivo se puede ver en la Fig. 5. La recta de ajuste frente a los grados-día presenta una pendiente positiva de 0,0218 con un R^2 de 0,993.



Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

• Cobertura

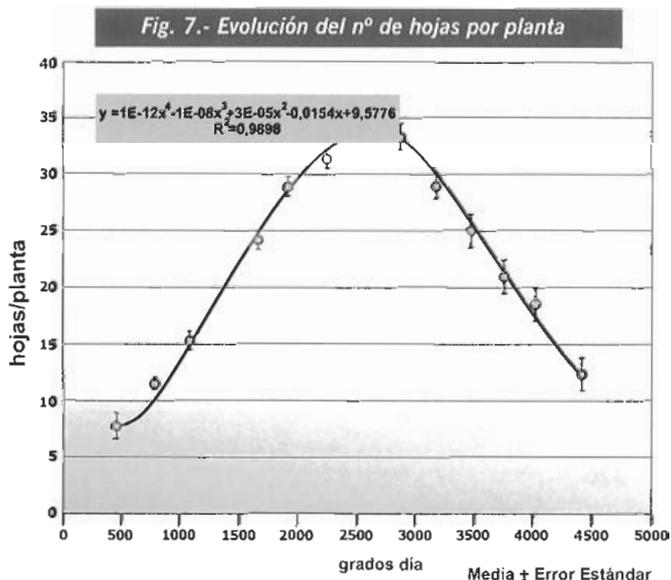
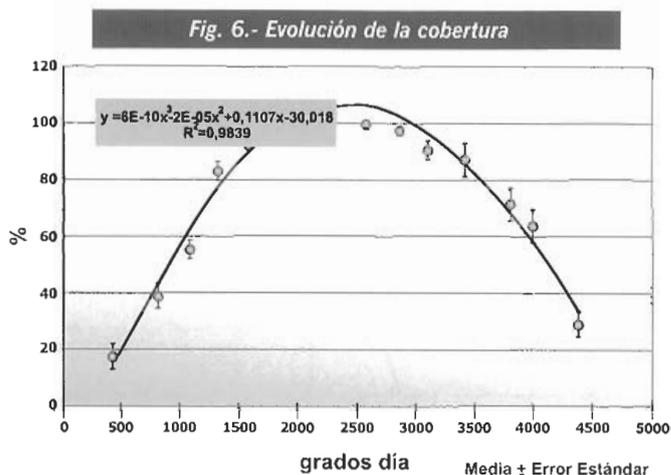
En la Fig. 6 se muestra la evolución de la cobertura a lo largo del ciclo. Se observa como la cobertura crece hasta primeros de mayo, manteniéndose así casi todo un mes, entre valores comprendidos de 2200 a 3200 grados-día. A partir de ese punto la planta comienza a perder hojas hasta alcanzar el 32% de cubrición en el último muestreo. La curva de ajuste es una parábola de segundo grado con un R^2 de 0,984.

• Hojas por planta

La evolución del número de hojas por planta, Fig. 7, va muy pareja con el porcentaje de la cobertura, presenta una parábola de segundo grado semejante a esta, con un máximo que se alcanza a finales de mayo con 34 hojas/planta, para empezar a descender en la segunda semana de junio, cuando ya los grados-día alcanzan valores iguales o superiores a 3000 y las temperaturas medias rondan los 25°C llegando a perder más del 70% de hojas a primeros de agosto, con grados-día próximo a los 4500. La curva de ajuste presenta un R^2 de 0,989.

• Radiación interceptada

La eficiencia del uso de la radiación recibida es importante para mantener un gradual desarrollo de la planta, al depender de ella toda la fotosíntesis. En la Fig. 8 se



representa la tasa de radiación recibida y la interceptada, esta última depende del porcentaje de cobertura del cultivo. Las tasas máximas de aprovechamiento de la radiación se producen cuando los grados-día alcanzan el valor de 2500 reduciéndose casi de la misma manera que había tenido antes de alcanzar ese máximo. A partir de mediados de julio sufre una caída brusca en el aprovechamiento de la radiación, para llegar a mediados de agosto con una eficiencia de tan solo el 30%.

Fig. 8.- Radiación Interceptada y recibida

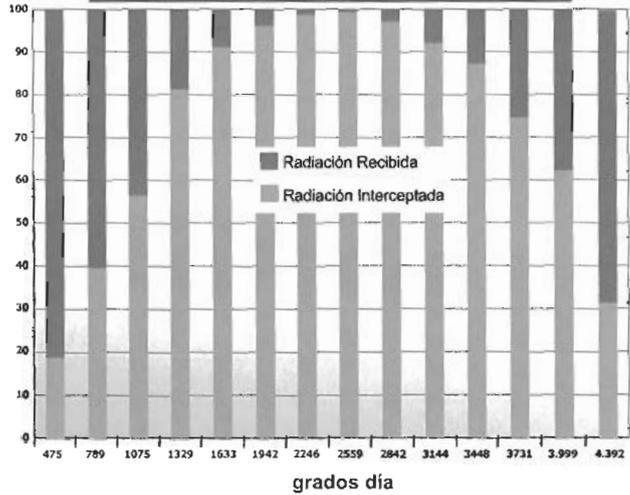
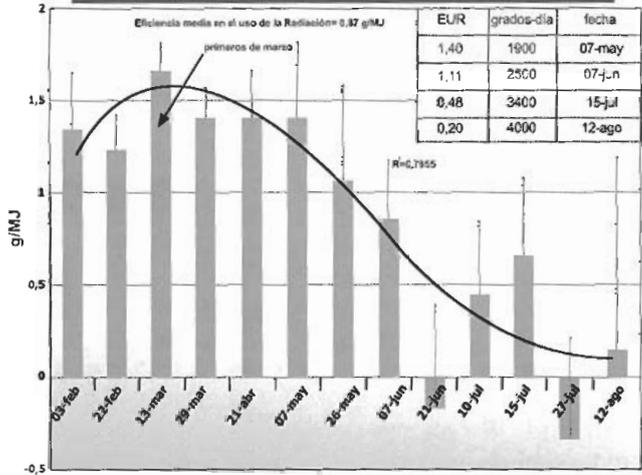


Fig. 9.- Eficiencia del uso de la Radiación (EUR)



Se ha determinado la eficiencia media del uso de la radiación por la planta. Se define como la cantidad de MJ/m² que la planta utiliza para crear un gramo de materia seca. En la Fig. 9 se representa la eficiencia por días desde nascencia. Los datos que existen en la bibliografía corresponden a Cooke y Scott que dan como eficiencia media para el cultivo en Inglaterra de

1,74 g/MJ, y para días muy luminosos de 1,90 g/MJ aquí, en la siembra otoñal se ha obtenido un valor medio de 0,87 g/MJ, este dato es el 50% del que dan los ingleses, es decir que la remolacha en la siembra otoñal desperdicia un 50% de la radiación que recibe en relación a las plantas cultivadas en Inglaterra, este uso en teoría menor puede llevar a confusión pues hay que tener en cuenta que la luminosidad de los cielos andaluces es muy superior a los de Inglaterra y en estas condiciones la menor radiación que recibe el cultivo es mayormente aprovechada por la planta, aunque sí en sus valores absolutos

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

se podría indicar que la capacidad de conversión de la remolacha de siembra otoñal es inferior a aquella, posiblemente debido a que aquí se alcanza la saturación del sistema fotosintético más rápidamente. La pérdida de hojas en la siembra otoñal se hace evidente a partir de primeros de julio pues desde esa fecha hasta el final del cultivo la EUR obtiene valores medios relativamente pequeños. Al tomar valores medios por períodos de grados-día, según la Tabla 5, se obtienen cuatro puntos que se ajustan a una recta con pendiente negativa de 0.42:

Tabla 5.- Valores medios de la EUR según períodos en grados-día

Grados-Día	EUR en g/MJ
a 1.900	1,40
1.900-2.500	1,11
2.500-3.400	0,48
a fin	0,20

• **Tasas de crecimiento relativo**

Se podría definir como la capacidad que tiene la planta por la radiación recibida en producir un kilogramo de tejido nuevo por kilogramo de tejido antiguo.

Para determinar las tasas de crecimiento relativo se aplica en cada punto la siguiente ecuación:

• $T = (\ln(P) - \ln(Pa)) / (GD - Gda)$

• Donde P es la producción en un punto

• Pa es la producción en el punto anterior

• GD son los grados-día del punto

• Gda los grados-día de punto anterior.

Fig. 10.- Relación grados-día y fecha de cultivo

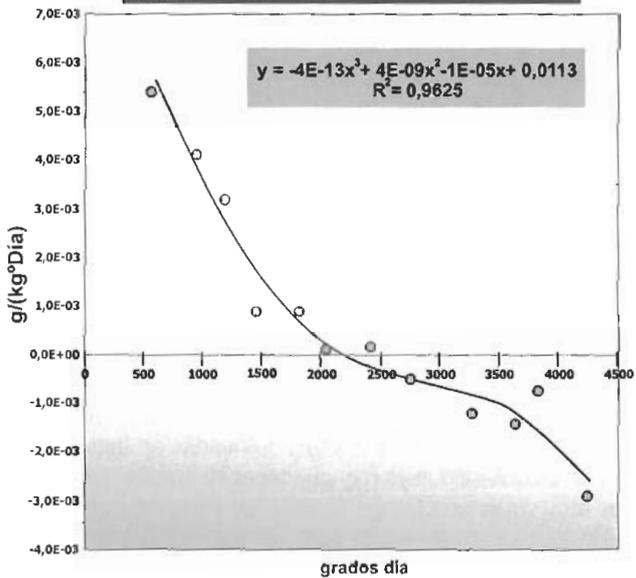


Fig. 11.- Tasa de crecimiento relativo de Raíz

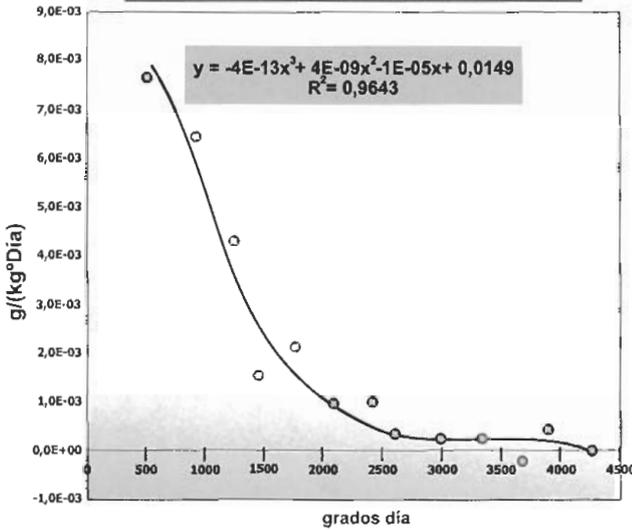
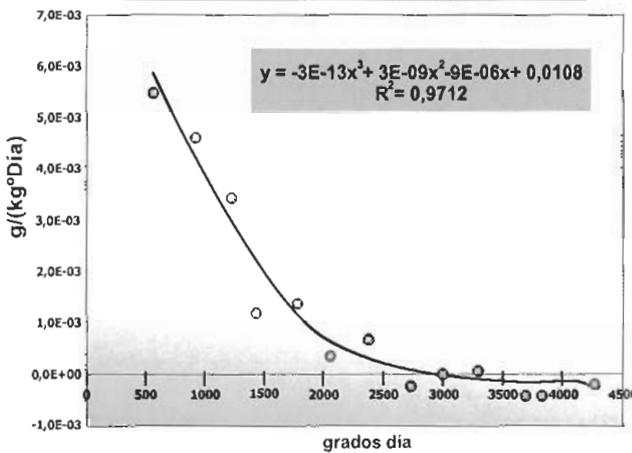


Fig. 12.- Tasa de crecimiento relativo de Planta



La Fig.10, 11 y 12 representan las tasas de crecimiento relativo de las hojas, de la raíz y de la planta completa. Las curvas de ajuste son parabólicas de tercero, todas ellas presentan un R^2 superior a 0,96.

La tasa de crecimiento relativo de hojas es muy alta al principio, disminuye posteriormente al no desarrollarse en proporción a la radiación recibida. Posee un punto, alrededor de los 2500 grados-día, en el que es netamente negativa provocado por la pérdida de masa foliar.

El aprovechamiento de la radiación recibida en la producción de raíz es relativamente alto al comienzo del ciclo, realizando una caída relativa desde el principio del muestreo (gran producción de peso de raíz), para estabilizarse a los 2500 grados-día manteniendo a partir de ese momento prácticamente inalterada.

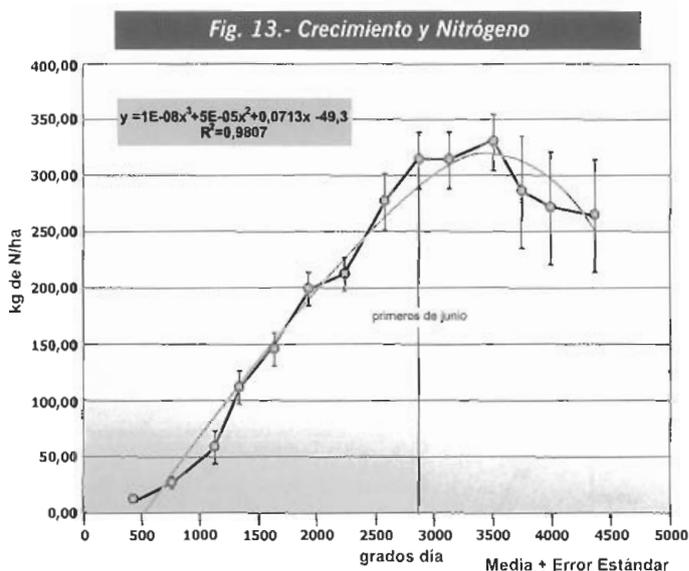
La tasa de crecimiento relativo de la planta (hojas y raíces) es parecida a la de las raíces. Disminuye desde el principio siendo negativa a partir de los 2500 grados-día.

Todo parece indicar que al pasar la barrera de los 2500 grados-día la tasa de crecimiento de la planta se estabiliza y toda la energía que recibe la utiliza para mantenerse.

C.- Evolución de los parámetros químicos analizados

• Nitrógeno total asimilado

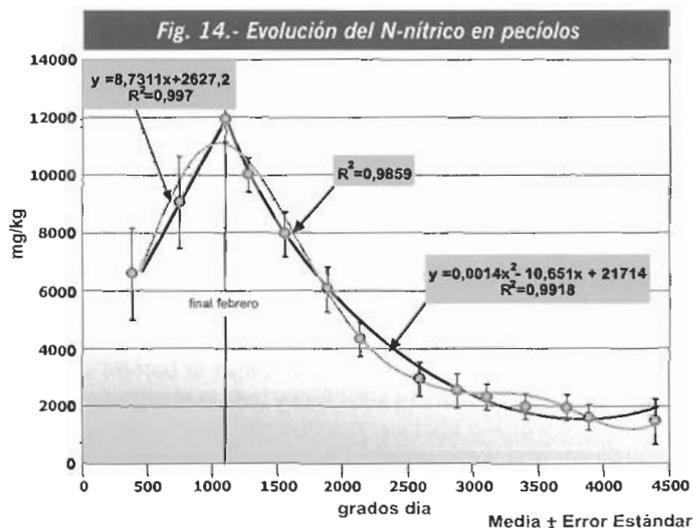
La Fig. 13 representa el nitrógeno asimilado por el cultivo (kg de N/ha). Como se puede observar el nitrógeno tomado aumenta fuertemente hasta primeros de junio (con tasa de asimilación superior a 300 kg/ha), a partir de aquí la planta deja de tomar nitrógeno o al menos lo toma al mismo ritmo que lo pierde (por pérdida de masa foliar). A partir de mediados de julio, cuando los grados-día acumulados superan la barrera de 3500, la pérdida de nitrógeno supera ya los 50 kg/ha, alcanzando al final del cultivo (mediados de agosto), una pérdida próxima a los 100 kg/ha.



La curva de ajuste es una parábola de tercer grado con un R^2 de 0,981.

• Nitrógeno nítrico en peciolo

Éste es uno de los parámetros que consideramos más importante en el desarrollo evolutivo del cultivo y nos va a marcar todos los parámetros de producción, como veremos más adelante.



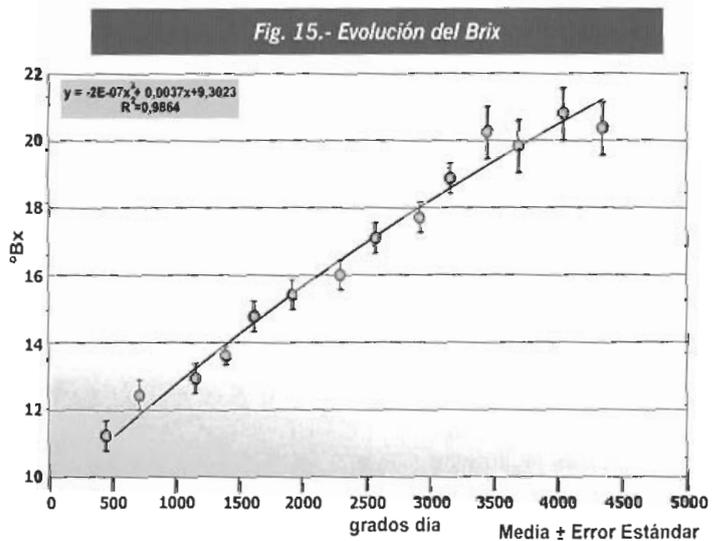
La curva de asimilación global (Fig. 14) la podemos dividir en dos tramos; el primero que corresponde desde el asentamiento del cultivo hasta el máximo de asimilación, la cual se ajusta perfectamente a una recta con un R^2 de 0,997. Dicho punto se nos produce en los aproximadamente 1000 grados-día y que en período de cultivo está alrededor de finales de febrero. En esta época es cuando la remolacha podría necesitar más el nitrógeno mineral.

A partir del máximo y hasta el final del seguimiento, la evolución del contenido de nitrógeno nítrico decrece en forma de parábola de segundo grado, la curva presenta un R^2 de 0,992, la pendiente de decrecimiento marcará los potenciales productivos en la recolección.

Realizado el ajuste con todos los puntos, la parábola presenta un R^2 de 0,986.

• Evolución del Brix

El Brix representa el porcentaje de sólidos solubles que contiene la raíz. Se ha mostrado su evolución en la Fig. 15. La tendencia que presenta es muy semejante a la dada por la polarización en todos los puntos del muestreo, separándose al final del ciclo, por acumulación proporcional de más no azúcares solubles. Desde el comienzo evoluciona positivamente

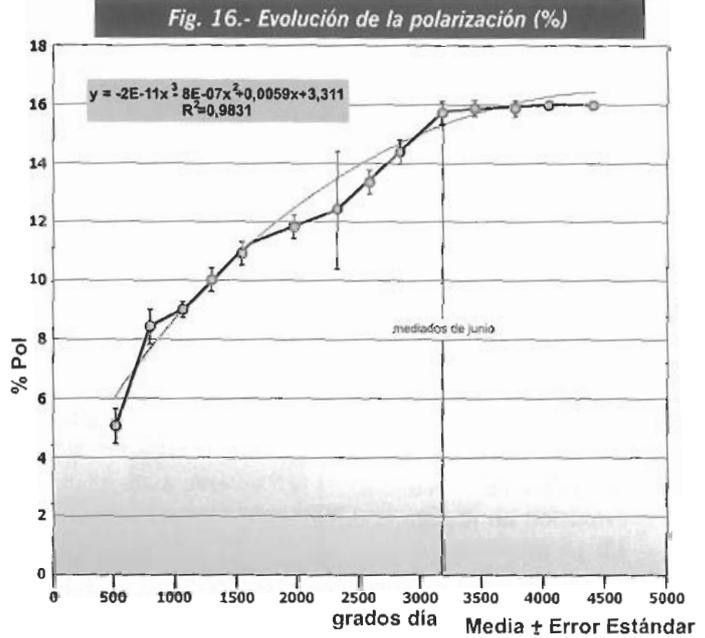


aumentado 9 puntos desde el comienzo hasta que la planta ha acumulado 3500 grados-día (primeros de julio) a partir de dicho punto la tasa de acumulación de solutos se mantiene, tendiendo al final a una ligera disminución. La parábola de ajuste es de segundo grado con un R^2 de 0,986.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

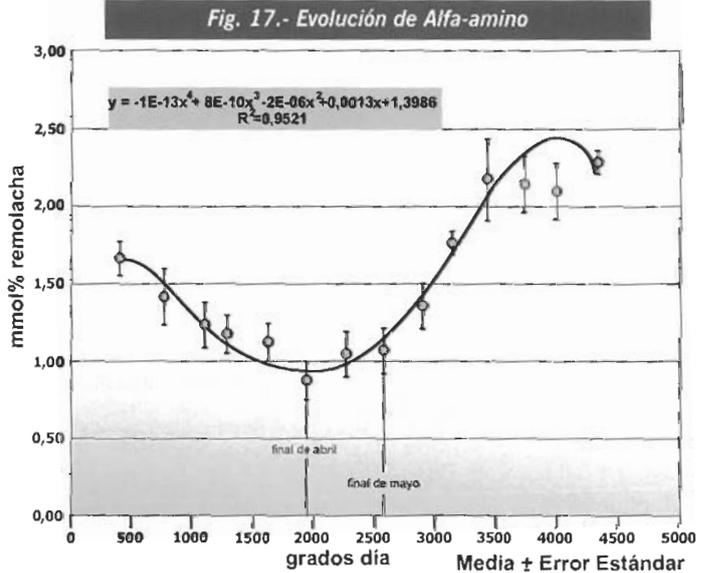
• Evolución de la polarización

La acumulación de sacarosa en la raíz es progresiva a lo largo del cultivo (Fig. 16) hasta mediados de junio, punto donde la pérdida de hojas se hace más patente, a partir de esa fecha el movimiento acumulativo de sacarosa puede ser más debido a la desecación de la raíz que a la propia acumulación de la misma. La curva de ajuste se representa mediante una parábola de tercer grado con un R^2 de 0,983. Desde el principio del cultivo y hasta que la planta recibe los 2500 grados-día ha acumulado el 276% de la sacarosa inicial, a partir de ese punto y hasta mediados de junio aumenta un 13% y de ahí hasta final de cultivo un 6%.



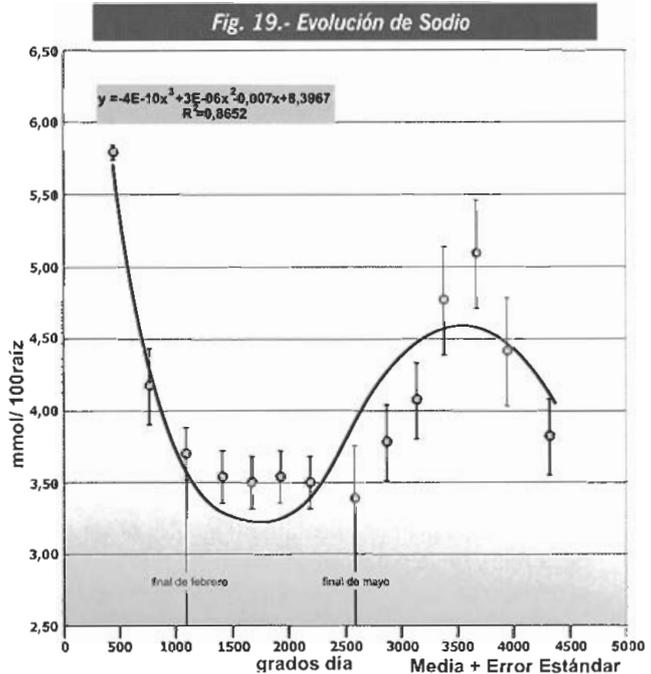
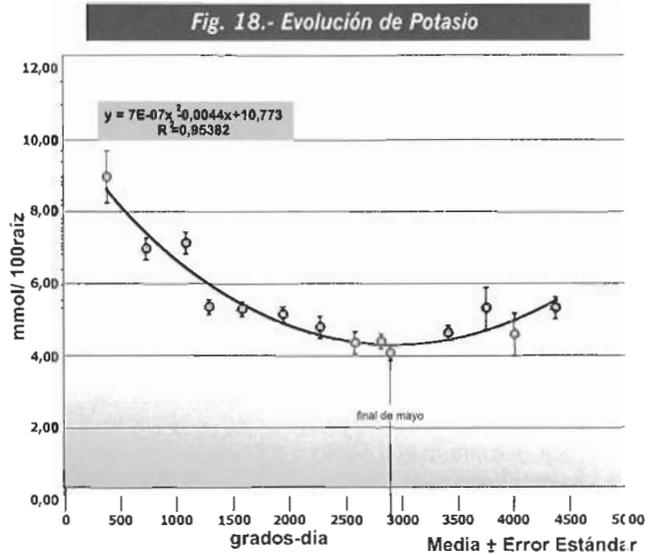
• Evolución de los no-azúcares fácilmente medibles

Como no-azúcares fácilmente medibles y que repercuten muy directamente y negativamente en el rendimiento industrial, provocando que la sacarosa no vaya "al saco", son el nitrógeno a-amino procedente de los aminoácidos, el potasio, sodio y los azúcares reductores.



En la Fig. 17 se presenta la evolución que sigue en el cultivo los contenidos de alfa amino nitrógeno que contiene la raíz frente a los grados-día acumulados. La curva de ajuste es una parábola de cuarto grado con un R^2 de 0,952. Desde el comienzo y hasta finales de abril, con cerca de 2000 grados-día acumulados, la acumulación del nitrógeno a-amino es negativa, a partir de esa fecha y hasta finales de mayo (próximo a los 2500 grados-día) comienza lentamente a aumentar y a partir de esa fecha las acumulaciones de aminoácidos en raíz son fuertemente elevadas hasta llegar a los 3500 grados donde se estabiliza ya en valores relativamente altos. Desde final de mayo a final de recolección se han duplicado los contenidos en alfa-amino-nitrógeno.

Los contenidos de potasio en raíz (Fig. 18) disminuyen fuertemente hasta los 1500 grados-día, a partir de ese punto y hasta los 2500 grados-día la disminución es más lenta manteniéndose en valores prácticamente iguales hasta que supera los 3000 grados-día en que vuelve a tener una tendencia positiva. La curva de ajuste es una



Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

parábola de segundo grado con un R^2 de 0,938.

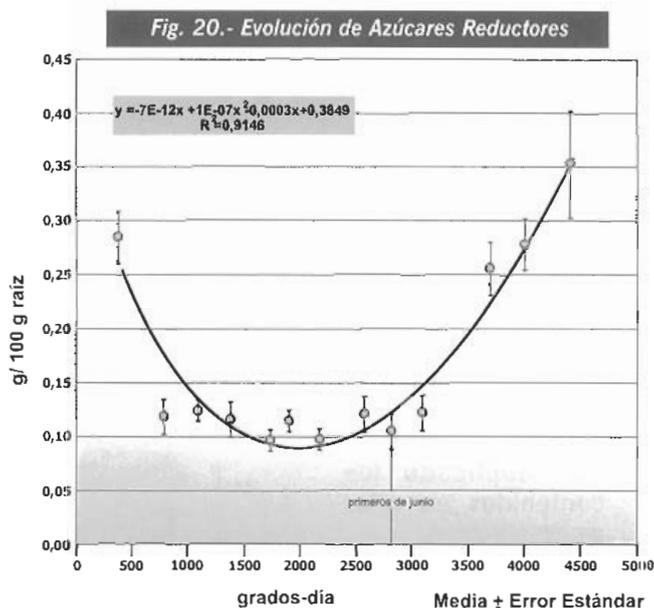
La evolución del sodio de la raíz está representada en la Fig. 19. La curva comienza con altos contenidos para decaer fuertemente hasta que los grados-día superan el valor de 1000 (final de febrero) punto en el que a partir de él los contenidos permanecen constantes hasta que la planta ha superado los 2500 grados-día, a partir de ese punto los contenidos de sodio en la raíz comienzan a ascender hasta presentar un máximo alrededor de los 3700; el aumento de contenido en sodio en ese período es del 56%. A partir de los 3700 grados-día y al final del período pierde un 33% de lo acumulado anteriormente. La curva de ajuste es una parábola de tercer grado con un R^2 de 0.865.

La Fig. 20 representa la evolución del contenido de azúcares reductores (glucosa y fructosa) en la raíz. La planta posee valores relativamente altos en el primer punto de muestreo, para disminuir el 150% ya en el segundo. Desde ese punto que corresponde a un valor aproximado de 800 grados-día se mantiene prácticamente constante hasta superados los 2500 grados-día momento en el que los contenidos de la raíz en azúcares reductores crecen con una pendiente altamente positiva, triplicando su valor al final del cultivo.

La curva de ajuste es una parábola de tercer grado con un R^2 de 0,915. La amplitud del error estándar en los cuatro últimos puntos de los muestreos, nos indica que no todos los campos han sufrido la misma tasa de acumulación de reductores, aunque en todos ellos los contenidos son muy altos.

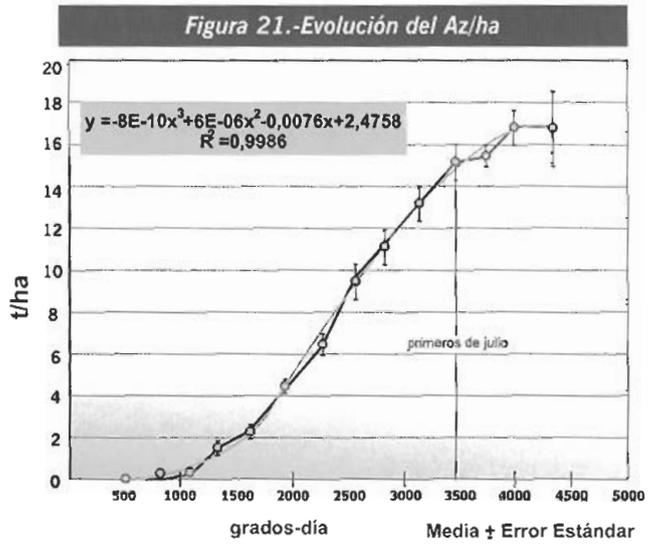
• Evolución del azúcar obtenido por hectárea

El azúcar por hectárea (Fig. 21) al ser un parámetro obtenido a partir del peso de la raíz y de la polarización mantiene una curva muy parecida a la de aquellos. Durante el período de formación de la planta y mientras las condiciones externas le son favorables la evolución del azúcar por hectárea es positiva; aumentado al principio próximo al 50% para pasar a un 20% próximo a los 3500 grados-día, a partir de ese momento se produce

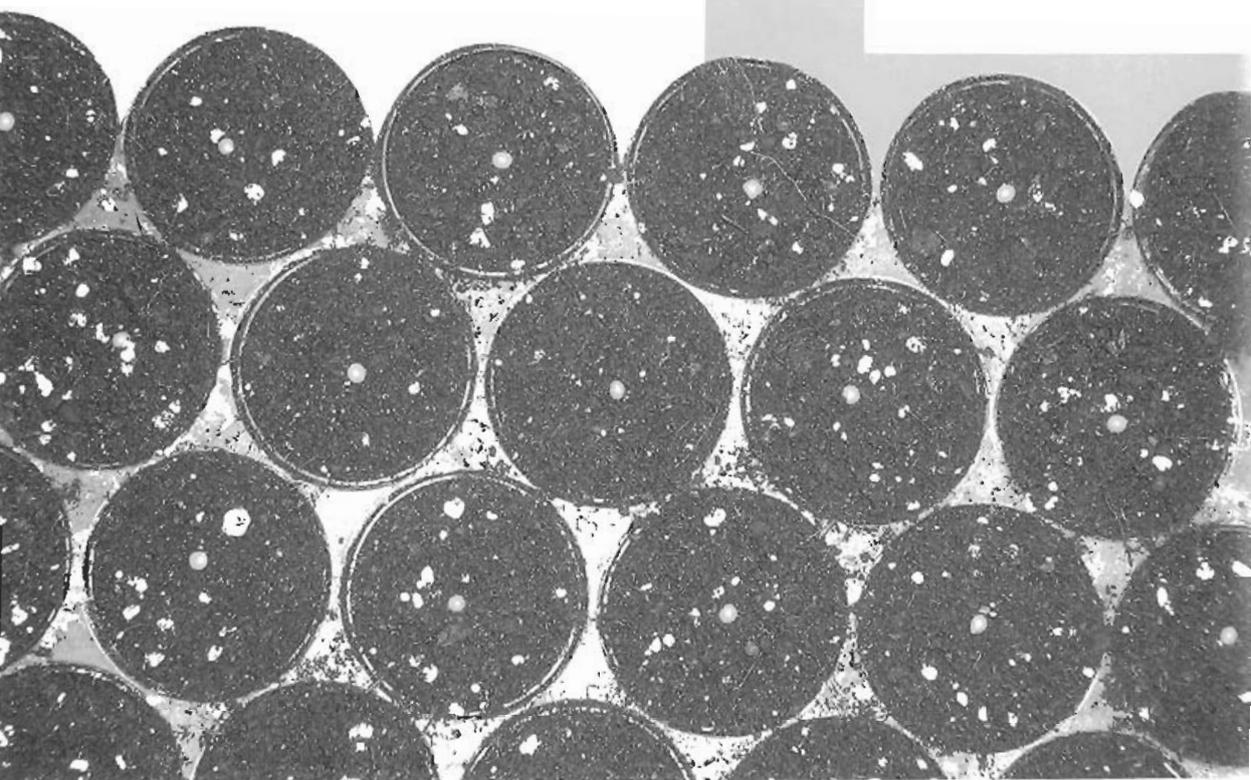


un ligero ascenso más bien motivado por la pérdida de agua con el consiguiente aumento de la polarización y la ligera subida del peso por acoplamiento de los metabolitos.

La curva de ajuste es una parábola de tercer grado con un R^2 de 0,999.



Actividades **E**nzimáticas de
degradación de la **S**acarosa y
producción de **A**zúcares
Reductores en la **R**emolacha
de siembra otoñal



ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE DEGRADACIÓN DE LA SACAROSA Y PRODUCCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN LA REMOLACHA DE SIEMBRA OTOÑAL

Eduardo T. Jiménez¹, Sofía García-Mauriño¹, Rodrigo Morillo-Velarde², Cristina Echevarría¹

¹Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, España.

²AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera), Delegación Sur, C/Metalurgia nº 36, 41080 Sevilla, España.

INTRODUCCIÓN

La siembra de la remolacha azucarera, *Beta vulgaris*, en la mayor parte de la península (Norte y Centro) se realiza a principios de primavera, y la recolección a finales de septiembre-octubre. Este calendario de siembra-recolección se denomina remolacha de “**siembra primaveral**”. En Andalucía, las altas temperaturas que se alcanzan en verano hacen inviable esta modalidad de cultivo por lo que la siembra se realiza a final de octubre-noviembre y se cosecha desde final de junio hasta mediados de julio. A esta modalidad se la denomina “**siembra otoñal**”. En el sur de la península se encuentra la principal superficie de toda Europa de remolacha cultivada en siembra otoñal.

Los cultivos rara vez obtienen su máximo potencial debido a las limitaciones impuestas por el ambiente, tales como deficiencia hídrica, temperaturas adversas y deficiencias de nutrientes (Kramer, 1980). Bajo condiciones de estrés hídrico, asociado a altas temperaturas, se produce un descenso de la calidad de la remolacha de siembra otoñal (Gordo, 2003), especialmente porque provoca el aumento en la concentración de nitrógeno α -amino (Moro, 1992; Gordo, 2003) y compuestos no sacarídicos como glucosa y fructosa, denominados azúcares reductores (Gordo, 2003). Todos estos compuestos disminuyen la calidad posterior del azúcar obtenida y dificultan su extracción en el proceso industrial.

Los niveles de productividad de la remolacha tras la cosecha vienen determinados por la concentración de sacarosa obtenida en la raíz (%) y por el peso de la misma.

La ruptura de este disacárido no reductor, la sacarosa, almacenado en la vacuola de la raíz durante el primer año de desarrollo de la planta puede originar la acumulación de azúcares reductores, responsables de la disminución de la calidad de la cosecha.

Son varias las enzimas que pueden estar implicadas en esta degradación de la sacarosa en plantas: sacarosa sintasa, invertasa neutra e invertasas ácidas.

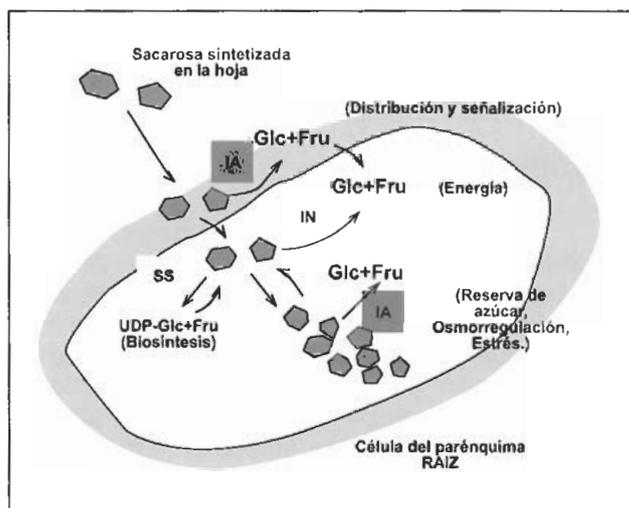
Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Aunque la **sacarosa sintasa (SS)** es capaz de sintetizar sacarosa hay evidencias de que *in vivo* está principalmente implicada en la degradación de la misma. La UDP-glucosa y fructosa que se obtienen en esta degradación están destinadas principalmente a la síntesis de nuevos compuestos. Las invertasas, neutra o alcalina (**IN**; pH óptimo 7,0-7,8) y ácida (**IA**; pH óptimo 4,5) son hidrolasas que rompen la sacarosa almacenada hasta glucosa y fructosa. Estos monosacáridos pueden ser utilizados para la obtención de energía, permanecer acumulados en la vacuola participando en la osmorregulación de la célula o ser transportados hasta células vecinas (ver esquema adjunto)

La acción combinada de estos tres enzimas es responsable de las concentraciones de sacarosa que encontramos en las células de almacenamiento de la remolacha y de los azúcares reductores acumulados.

En este trabajo se ha estudiado la actividad de los enzimas descritos: SS, IN e IA y la relación con el incremento de azúcares reductores que se observa en los períodos de recolección de la

remolacha de siembra otoñal. Este estudio se ha realizado comparando la actividad enzimática y la acumulación de azúcares reductores en dos variedades y en diferentes condiciones hídricas y de abonado nitrogenado.



MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de los ensayos y toma de muestras. Se presentan los resultados de las campañas 1999/2000, 2000/2001 y 2001/2002.

Se describen los ensayos donde se obtuvieron resultados más relevantes:

1-Ensayo Hídrico con dos variedades. Las variedades utilizadas fueron Claudia, variedad convencional y con altos niveles de acumulación de azúcares reductores en período estival, y Ramona, con bajos niveles de acumulación de reductores. Se cultivaron

Cap III. Estudio de las actividades enzimáticas

en dos situaciones hídricas diferentes: Riego a Demanda y Déficit Hídrico. Fueron por tanto cuatro las variables obtenidas y comparadas: Claudia Riego, Claudia Déficit, Ramona Riego, Ramona Déficit.

2-Ensayo de abonado nitrogenado. Se establecieron diferentes niveles de abonado en las parcelas ensayadas: sin abonado, abonado recomendado y abonado en exceso.

3-Ensayo de ciclo de cultivo. Se realizó para evaluar la siembra primaveral en la zona sur. Permite estudiar el comportamiento fisiológico de la remolacha en siembra de primavera y compararla con la siembra otoñal.

El estudio se realizó mediante un Diseño de Bloques Completos al Azar (RCBD) con 4, 5 ó 6 repeticiones.

La toma de muestras se realizó con una frecuencia quincenal durante los meses de invierno y primavera y semanalmente en el período estival. En cada campaña el inicio y la finalización de la toma de muestras se llevó a cabo en diferentes momentos:

1ª campaña (1999/2000): marzo-julio

2ª campaña (2000/2001): enero-agosto

3ª campaña (2001/2002): mayo-agosto. La toma de muestras para la siembra primaveral se prolongó hasta mediados de noviembre.

Preparación de las muestras. Una vez transportadas las muestras al Laboratorio de Fisiología Vegetal eran procesadas. De cada muestreo se trocearon, mezclaron y picaron tres remolachas diferentes permitiendo así obtener una muestra más homogénea. Tras el procesado se almacenaban en porciones de 25g a temperaturas de -35°C hasta el momento de su utilización.

Determinaciones enzimáticas y de metabolitos. Actividad Sacarosa Sintasa. Según método de Morell and Copeland (1985).

Actividad Invertasa Acida y Neutra. Según método de Zhu et al. (1997). Glucosa en raíz. Se determinó espectrofotométricamente usando el test de glucosa de Sigma (HK) Assay kit, GAHK-20.

Determinación de proteínas solubles: Según método de Bradford (1976).

Determinación de sacarosa: Realizada en los laboratorios de AIMCRA en Valladolid.

Determinación de Nitrógeno total en planta. Realizada en los laboratorios de AIMCRA en Valladolid.

RESULTADOS Y DISCUSION

LOS NIVELES DE GLUCOSA EN LA RAÍZ DE LA REMOLACHA

En este trabajo se midió la glucosa como índice de la presencia de azúcares reductores. En la mayor parte del ciclo de desarrollo de la planta en condiciones de siembra otoñal la glucosa no se acumula en la raíz, de la misma forma que ocurre en la siembra primaveral. Sin embargo, en los períodos de recolección de la planta, en las diferentes campañas estudiadas, se observaron incrementos significativos de este monosacárido en la raíz en siembra otoñal. En la primera campaña, en la que los riegos se prolongaron hasta mediados de julio, no se observó este incremento de glucosa en la raíz (Jiménez 2004).

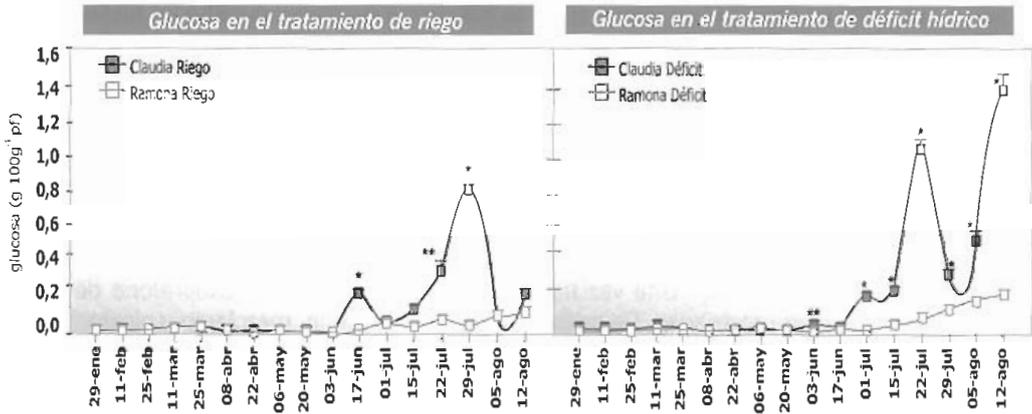


Figura 1. Comparación de la evolución de los niveles de glucosa en la raíz de remolacha durante el ciclo del cultivo en las variedades Claudia y Ramona en el ensayo hídrico (tratamientos de riego y déficit hídrico) realizado durante la 2ª campaña (2000-2001) (Media± ES) (* diferencias significativas con $p < 0,001$; ** diferencias significativas con $p < 0,05$).

Este incremento de glucosa se produjo principalmente en las condiciones de déficit hídrico y en la variedad **Claudia frente a Ramona** (Fig. 1, campaña 2ª). Los riegos finalizaron a final de junio por lo que en el período julio y principios de agosto podría considerarse que la condición “Riego” no era tal, sino que iba aumentando la situación de déficit hídrico en la planta a medida que se adentraba en el período de verano.

En la 3ª campaña estudiada, 2001/2002, vuelve a encontrarse un comportamiento muy parecido con respecto a la acumulación de glucosa (Fig. 2). La variedad Claudia acumula los niveles más altos de glucosa en la raíz, con valores muy superiores a los encontrados en la variedad Ramona. En ambas especies los valores de glucosa acumulada son superiores en la condición de déficit hídrico que en riego durante el periodo comprendido hasta julio. Posteriormente, se produce una brusca acumulación de glucosa en las dos

Cap III. Estudio de las actividades enzimáticas

condiciones, coincidiendo con la finalización de los riegos que se produce a finales de junio. Destacar también los niveles más altos de acumulación de glucosa que se producen en esta 3ª campaña (Fig. 2) respecto de la 2ª (Fig. 1).

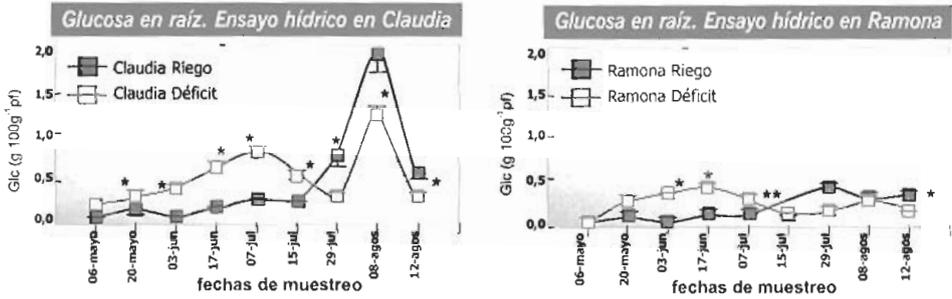


Figura 2. Evolución de los niveles de glucosa en la raíz de remolacha durante el ciclo del cultivo de la remolacha en siembra otoñal (hídrico en Claudia e hídrico en Ramona) realizados durante la 3ª campaña (2001-2002) (Media: ES) (* diferencias significativas con $p < 0,001$; ** diferencias significativas con $p < 0,05$).

Al comparar las diferentes condiciones de abonado (sin abonado, abonado recomendado y abonado en exceso) durante las tres campañas estudiadas, no se encontró un patrón definido de relación entre la acumulación de glucosa con respecto al nitrógeno añadido a la parcela de estudio.

Sin embargo, si se analizan los datos en función del nitrógeno existente en la planta en los diferentes tratamientos de abonado, durante la 2ª y 3ª campaña, sí se observan diferencias. Estos valores de nitrógeno fueron determinados como la cantidad máxima detectada en la planta entre los meses de mayo y junio expresado como kg ha^{-1} , y fueron suministrados por AIMCRA. En función del valor obtenido de nitrógeno en planta se crearon tres grupos artificiales: G1) corresponde al tratamiento de abonado recomendado durante la 2ª campaña,

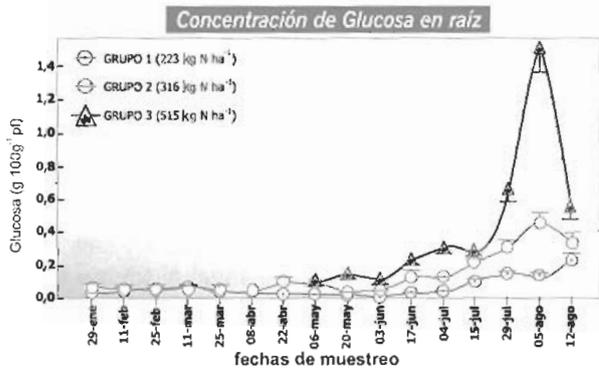


Figura 3. Acumulación de glucosa en la raíz según los niveles determinados de Nitrógeno en planta a lo largo del ciclo de desarrollo del cultivo de la remolacha azucarera. (G1, 223 kg ha^{-1} , tratamiento de abonado recomendado en 2ª campaña, 2000/2001; G2, 316 kg ha^{-1} , tratamiento de abonado en exceso en 2ª campaña, 2000/2001; G3, 515 kg ha^{-1} , tratamiento sin abonado, abonado recomendado y abonado en exceso en 3ª campaña, 2001/2002).

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

con un valor medio de nitrógeno en planta de 223 kg ha⁻¹; G2) corresponde al tratamiento de abonado en exceso durante la 2ª campaña, con un valor medio de nitrógeno en planta de 316 kg ha⁻¹; G3) corresponde a los tratamientos sin abonado, recomendado y en exceso realizados en la 3ª campaña de estudio (2001/2002) con un valor medio de nitrógeno en planta de 515 kg ha⁻¹.

Estos tres grupos (G1, G2, G3) acumularon glucosa en la raíz en diferentes cantidades. El G3, con 515 kg ha⁻¹, presentó los niveles más altos de acumulación de glucosa en raíz, especialmente altos desde finales de julio hasta mediados de agosto. El G2, con 316 kg ha⁻¹, bajó mucho sus niveles de glucosa en raíz y el G1, 223 kg ha⁻¹, presentó los niveles más bajos, con máximos en agosto (Fig. 3).

Estos resultados ponen de manifiesto que el contenido de nitrógeno en la planta está altamente relacionado con la acumulación de glucosa y podría estar en la base de las diferencias observadas entre las dos últimas campañas en casi todos los parámetros estudiados. Además, se evidencia que el contenido de nitrógeno encontrado en la planta no se corresponde con el abonado recibido, debido probablemente a un contenido alto de nitrato en el suelo y al efecto de las condiciones climáticas y agronómicas (lluvias, Tº, textura del suelo) que favorecen que se incorpore el nitrato a la planta o que no sea absorbido por ésta y se pierda por el lavado del suelo. En este sentido, las lluvias fueron muy abundantes durante el invierno de la 2ª campaña. Una vez que el nitrato se ha incorporado a la planta, sí se observa relación entre un alto contenido de nitrato y una mayor acumulación de la glucosa en la raíz.

En general, estos resultados muestran que julio y agosto son las fechas en las que se producen los principales incrementos de glucosa. Fue en la campaña del 2002 (3ª campaña) donde se acumuló más glucosa llegando a concentraciones de hasta un 2%. También se pone en evidencia que por encima del manejo del cultivo, son las condiciones climáticas anuales las que determinan la calidad de la remolacha en cuanto a la acumulación de glucosa. Estas condiciones climáticas determinan en última instancia aspectos tan importantes como la incorporación de nutrientes (como el nitrato) que serán fundamentales para el desarrollo de la planta. A su vez, estos parámetros serán determinantes para la producción, riqueza y calidad de la remolacha recolectada. Sin embargo, esta presión climática anual puede ser paliada por un manejo adecuado del riego, o por la utilización de una variedad adecuada, en este caso fue Ramona, la cual, independientemente de las condiciones climáticas anuales, mostró muy bajos niveles de glucosa en comparación con Claudia.

LA RIQUEZA O POLARIZACIÓN DE LA RAÍZ. NIVELES DE SACAROSA

La sacarosa se acumula en la raíz progresivamente a lo largo del desarrollo de la planta llegando a alcanzar hasta el 20% del contenido de la raíz. La fase de acumulación de sacarosa más acentuada se produce en los meses de mayo y junio. En los meses finales, principalmente agosto, puede sufrir pérdidas, probablemente debidas a una mayor

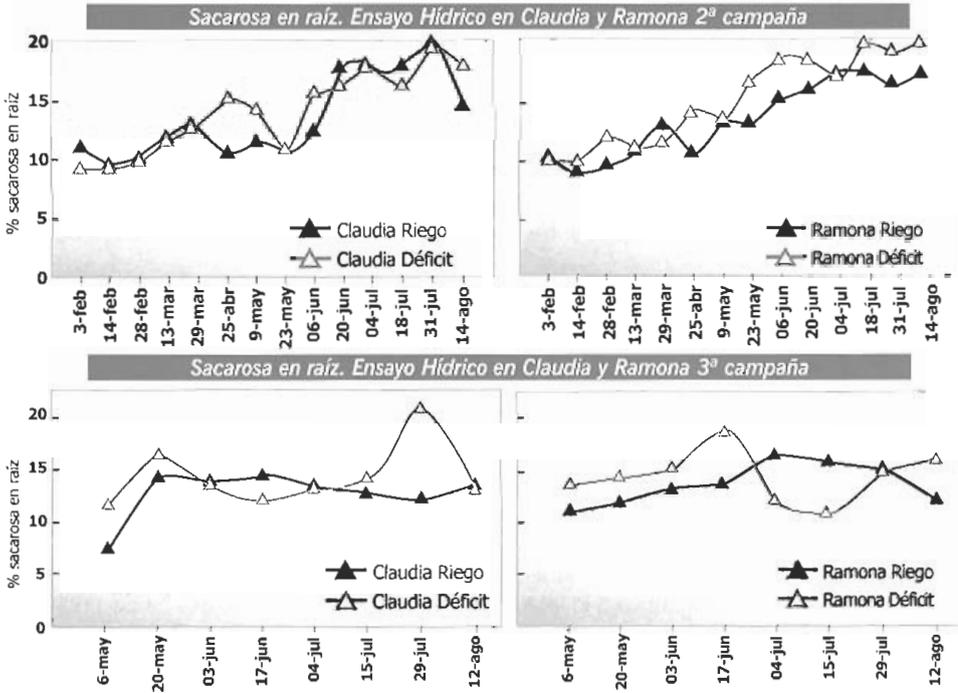


Figura 4. Acumulación de sacarosa en la raíz de remolacha a lo largo del periodo de estudio en el ensayo hídrico en Claudia y Ramona durante la 2^a y 3^a campaña (2000-2001 y 2001-2002).

degradación de la sacarosa acumulada en la raíz para la producción de hexosas, necesarias para mantener: 1) la respiración, que puede llegar a significar casi el 70% de la respiración de la planta (Ribas-Carbó y González-Meller, 2000), especialmente en condiciones de escasez de agua, puesto que las raíces deben desarrollarse más para buscar el recurso hídrico; 2) la biosíntesis de nuevos compuestos primarios necesarios para el mantenimiento de las estructuras celulares.

Si bien Ramona destaca por su baja producción de azúcares reductores (glucosa), los niveles de acumulación de sacarosa en raíz



Figura 5. Acumulación de sacarosa en la raíz según los niveles determinados de Nitrógeno en planta a lo largo del ciclo de desarrollo del cultivo de la remolacha azucarera. (G1, 223 kg ha⁻¹, tratamiento de abonado recomendado en la 2^a campaña, 2000/2001; G2, 316 kg ha⁻¹, tratamiento de abonado en exceso en la 2^a campaña, 2000/2001; G3, 515 kg ha⁻¹, tratamiento sin abonado, abonado recomendado y abonado en exceso en la 3^a campaña, 2001/2002).

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

que se obtienen son equiparables a los de Claudia, incluso con valores superiores en condiciones de secano, observándose nuevamente más variabilidad entre las campañas que la producida por la utilización de estas dos variedades (Fig. 4).

Respecto a los grupos de Nitrógeno en la planta (G1, G2 y G3) se detectan, desde mediados de julio a mediados de agosto, menores niveles de sacarosa en la raíz en el G3, (Fig. 5). Estos resultados muestran que las plantas con mayor contenido en Nitrógeno poseen menor riqueza de la raíz al final del período de recolección.

LOS ENZIMAS QUE DEGRADAN LA SACAROSA

El estudio de la evolución de las actividades Sacarosa Sintasa (SS), Invertasa Neutra (IN) e Invertasa Acida (IA) determinadas in vitro, nos ha permitido realizar una propuesta de modelo de comportamiento de estos enzimas en la raíz de la remolacha azucarera de siembra otoñal a lo largo del desarrollo del cultivo.

La SS presenta los niveles más altos de actividad en todas las campañas, ensayos y tratamientos realizados en este estudio, lo que confirma la importancia de este enzima en la degradación de la sacarosa a lo largo de todo el desarrollo del cultivo. La SS presenta su máxima actividad en el mes de mayo, en la segunda campaña (Fig. 6, 2ª campaña).

Actividad SS específica

The figure consists of four line graphs arranged in a 2x2 grid, showing the evolution of specific Saccharase (SS) activity (U mg⁻¹ prot.) in the roots of beets during the 2nd and 3rd campaigns for Claudia and Ramona varieties under irrigation and deficit conditions. The y-axis for all graphs ranges from 0.4 to 1.6 U mg⁻¹ prot. The x-axis shows sampling dates from late January to early August. Each graph compares 'Riego' (Irrigation, solid line with solid circles) and 'Déficit' (Deficit, dashed line with open circles) treatments. Error bars represent standard error (ES).

- Ensayo Hídrico en Claudia 2ª campaña:** Shows SS activity for Claudia in the 2nd campaign. The 'Riego' treatment generally shows higher activity than 'Déficit', with a peak in late May (around 1.05 U mg⁻¹ prot.).
- Ensayo Hídrico en Claudia 3ª campaña:** Shows SS activity for Claudia in the 3rd campaign. The 'Déficit' treatment shows a significant peak in mid-June (around 1.5 U mg⁻¹ prot.), while the 'Riego' treatment peaks in late July (around 1.25 U mg⁻¹ prot.).
- Ensayo Hídrico en Ramona 2ª campaña:** Shows SS activity for Ramona in the 2nd campaign. The 'Riego' treatment shows a peak in late May (around 1.0 U mg⁻¹ prot.), while the 'Déficit' treatment peaks in late June (around 0.8 U mg⁻¹ prot.).
- Ensayo Hídrico en Ramona 3ª campaña:** Shows SS activity for Ramona in the 3rd campaign. The 'Riego' treatment peaks in late July (around 1.0 U mg⁻¹ prot.), while the 'Déficit' treatment peaks in mid-July (around 1.05 U mg⁻¹ prot.).

fechas de muestreo

Figura 6. Evolución de la actividad Sacarosa Sintasa (SS) específica ($U\ mg^{-1}\ prot.$) en la raíz de remolacha a lo largo del periodo de estudio en el ensayo hídrico en Claudia y Ramona durante la 2ª y 3ª campaña (2000-2001 y 2001-2002) (Media + ES).

54

Cap III. Estudio de las actividades enzimáticas

Posteriormente la actividad desciende permitiendo de esta forma que se alcancen los máximos de polarización que se establecen, en esta campaña, en los 18-20 grados. En la 3ª campaña los valores de SS no sólo no descendieron después de mayo, sino que incluso aumentaron (Fig. 6, 3ª campaña). Esta subida de actividad podría estar en relación a los bajos niveles de polarización que se alcanzaron en la 3ª campaña (Fig. 4 y 5).

La actividad es semejante en las dos variedades (Claudia y Ramona) excepto en la 3ª campaña donde los niveles de actividad SS en Ramona no sobrepasan valores de $1 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$, mientras que en Claudia se alcanzan niveles de actividad de $1,5 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ (Fig. 6). Hay que señalar que si bien los valores de SS para Ramona son más bajos que para Claudia, éstos fueron superiores a los de la 2ª campaña durante los meses de junio y julio (Fig. 6).

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de riego y seco en las dos variedades estudiadas (datos no mostrados).

En relación a los grupos de nitrógeno establecidos se muestra que el G3 (mayor contenido de nitrógeno en planta) presenta una actividad SS específica más alta que G1 y G2 durante los meses de junio y julio (Fig. 7). Se observa, por tanto, la existencia de una asociación entre los altos niveles de nitrógeno en planta en el G3, valores que corresponden a la 3ª campaña, y los altos valores de SS sintasa detectados en el G3 en los meses de junio y julio.

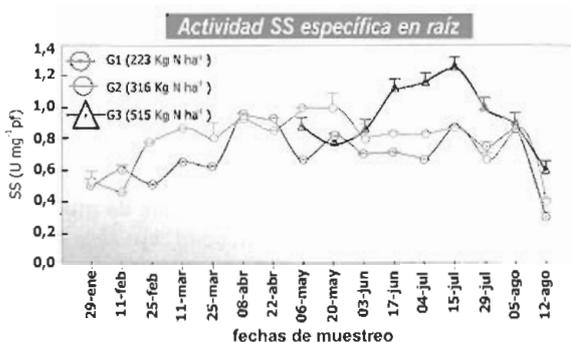


Figura 7. Actividad SS específica en la raíz según los niveles determinados de Nitrógeno en planta a lo largo del ciclo de desarrollo del cultivo de la remolacha azucarera. (G1, 223 kg ha^{-1} , tratamiento de abonado recomendado en la 2ª campaña, 2000/2001; G2, 316 kg ha^{-1} , tratamiento de abonado en exceso en la 2ª campaña, 2000/2001; G3, 515 kg ha^{-1} , tratamiento sin abonado, abonado recomendado y abonado en exceso en la 3ª campaña, 2001/2002).

En conjunto, un análisis global de los resultados pone de manifiesto que los valores alcanzados en mayo en las tres campañas estudiadas son valores bastante homogéneos oscilando alrededor de $1 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ y luego decaen en todos los ensayos. Excepcionalmente, estos valores aumentan en la tercera campaña hasta niveles de $1,7 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ y se mantienen en general más altos que en las otras dos campañas. **Este excepcional aumento de la actividad SS en el mes de junio-julio podría estar en la base de la baja concentración de sacarosa registrada en la 3ª campaña.**

Otro de los enzimas que degradan la sacarosa es la **Invertasa Neutra (IN)**. La actividad Invertasa Neutra o Alcalina (pH óptimo entre 7,0-7,8) está menos caracterizada

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

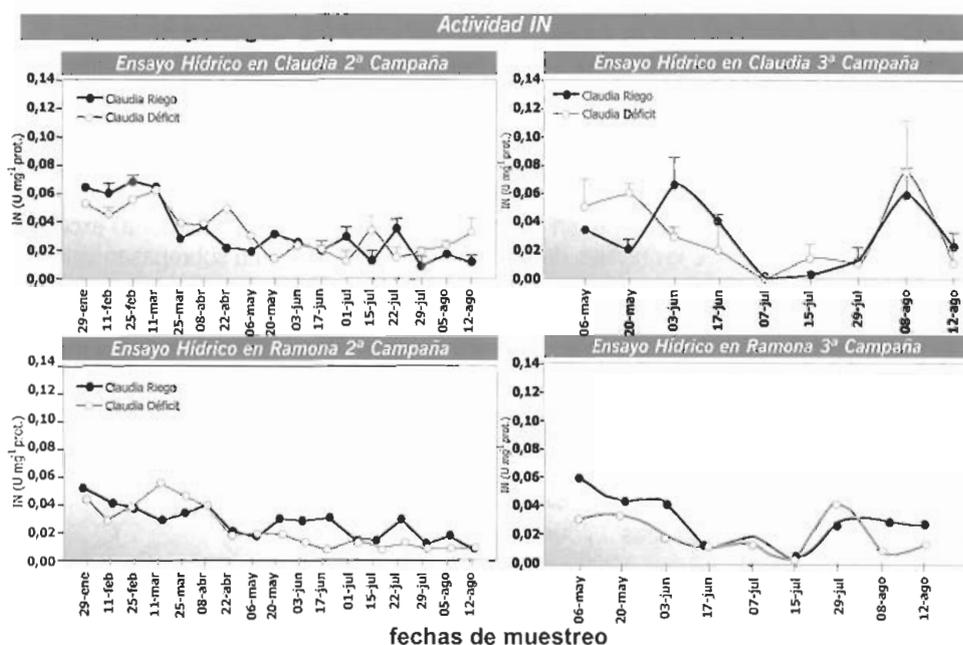


Figura 8. Evolución de la actividad Invertasa Neutra (IN) específica ($U\ mg^{-1}\ prot.$) en la raíz de remolacha a lo largo del periodo de estudio en el ensayo hídrico en Claudia y Ramona durante la 2ª y 3ª campaña (2000-2001 y 2001-2002) (Media \pm ES).

la SS. Por tanto, es posible que la SS tenga una mayor contribución a la degradación de la sacarosa que la IN (Ross, 1996). La IN presenta su máxima actividad en el mes de febrero (cuando la planta está en su 4º mes de desarrollo), mostrando una fuerte caída de actividad hasta el mes de junio en prácticamente todos los ensayos estudiados (Fig. 8). En febrero, cuando la actividad IN es más alta, las hexosas producidas tras la hidrólisis no se acumulan ya que serán rápidamente utilizadas por la planta para su crecimiento, que en ese momento se encuentra en fase activa.

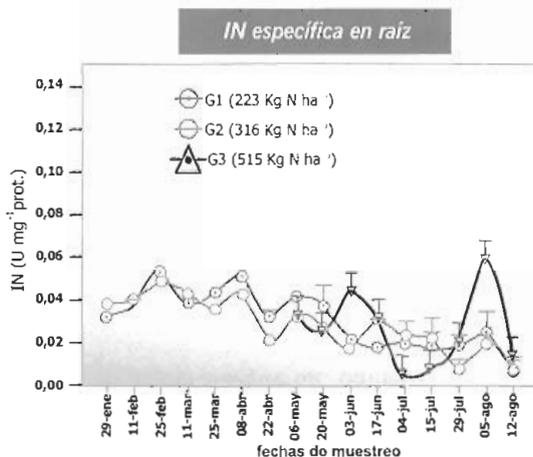


Figura 9. Actividad IN específica en la raíz según los niveles determinados de Nitrógeno en planta a lo largo del ciclo de desarrollo del cultivo de la remolacha azucarera. (G1, 223 $kg\ ha^{-1}$, tratamiento de abonado recomendado en la 2ª campaña, 2000/2001; G2, 316 $kg\ ha^{-1}$, tratamiento de abonado en exceso en la 2ª campaña, 2000/2001; G3, 515 $kg\ ha^{-1}$, tratamiento sin abonado, abonado recomendado y abonado en exceso en la 3ª campaña, 2001/2002).

Cap III. Estudio de las actividades enzimáticas

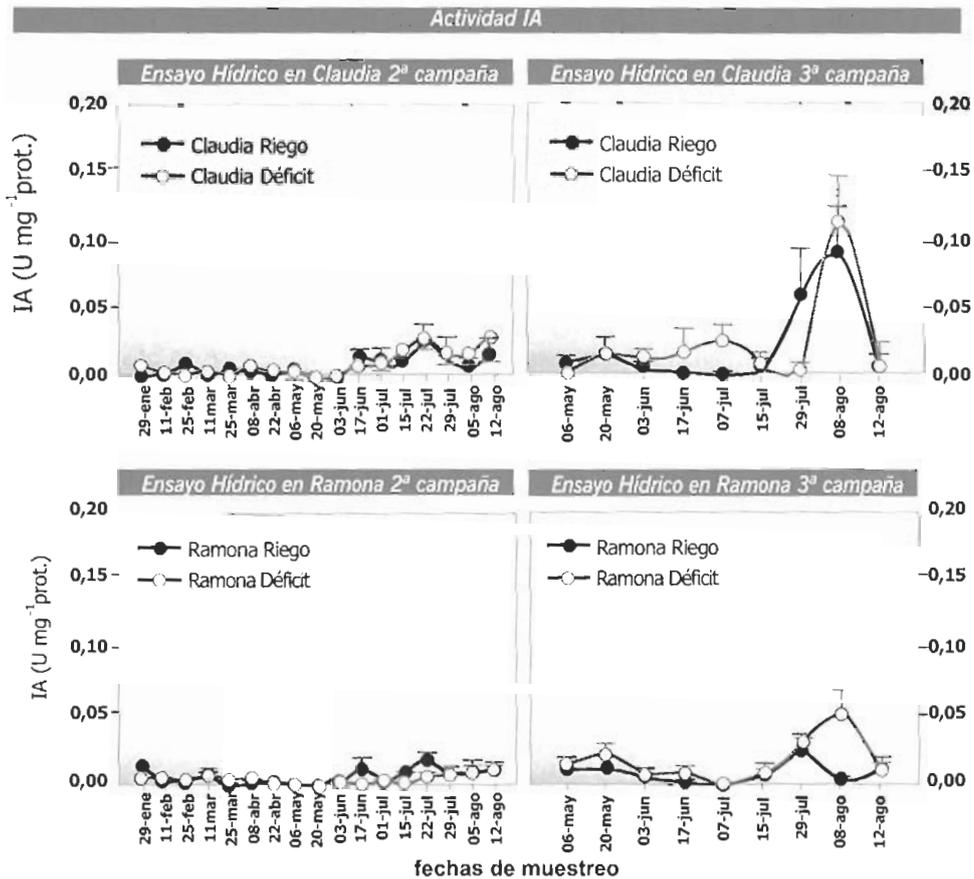


Figura 10. Evolución de la actividad Invertasa Acida (IA) específica (U mg⁻¹ prot.) en la raíz de remolacha a lo largo del periodo de estudio en el ensayo hídrico en Claudia y Ramona durante la 2ª y 3ª campaña (2000-2001 y 2001-2002) (Media ± ES).

Los resultados de los ensayos realizados (Fig. 8) muestran que los valores de actividad IN específica (U mg⁻¹ prot.) son hasta 15-25 veces menores a los detectados para la SS, dependiendo del momento del ciclo y del tratamiento realizado.

De los resultados obtenidos no se desprende la existencia de diferencias significativas entre las dos condiciones hídricas ensayadas (riego y déficit hídrico). Sin embargo con respecto a las variedades utilizadas (Claudia y Ramona) cabe destacar nuevamente la respuesta diferencial de Ramona con valores más bajos que Claudia en la 3ª campaña (Fig. 8).

También se puede apreciar que en la 3ª campaña, en la que la concentración de sacarosa fue muy baja (Fig. 4), los valores de actividad IN fueron excepcionalmente bajos durante el mes de julio (Fig. 8) mientras que los niveles de actividad SS fueron

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

excepcionalmente altos en dicho mes (Fig. 6). Estos resultados parecen indicar que es la alta actividad SS y no la IN la responsable de la pérdida de sacarosa de la 3ª campaña durante el mes de julio.

La agrupación de los niveles de actividad IN en función del contenido de N en planta no muestra diferencias significativas entre los tres grupos creados (G1, G2 y G3) (Fig. 9). Destacan los bajos valores de IN en el G3 en el mes de julio, precisamente en el grupo con menor polarización obtenida.

Estos resultados refuerzan la idea de que la IN no sería responsable de la caída de polaridad de la tercera campaña y que ésta estaría en relación con los altos niveles de SS de la 3ª campaña en los meses de junio y julio. Tampoco se ha observado en este estudio la existencia de una asociación entre la actividad IN y la acumulación de glucosa en la raíz, principalmente en los meses estivales.

El tercer enzima degradativo de la sacarosa que ha sido estudiado en este trabajo ha sido la **Invertasa Acida (IA)**. Trabajos realizados con remolacha cultivada en campo, en ciclo de siembra primaveral (marzo-noviembre) en el Norte de Europa han mostrado la existencia de una alta actividad IA, tanto soluble como insoluble, en las primeras etapas del desarrollo de la planta (marzo-junio). Estos niveles descienden paulatinamente hasta alcanzarse niveles muy bajos desde julio hasta la recolección (noviembre) (Masuda, 1987; Berghall, 1997).

En nuestro estudio en siembra otoñal los niveles de actividad IA fueron muy bajos hasta la recolección (Fig.10). La actividad IA comenzó a ascender en los meses de julio y agosto, especialmente en las dos últimas campañas. Estos incrementos de actividad IA podrían estar altamente relacionados con la acumulación de glucosa que se produce en estos meses finales del cultivo. Los niveles más altos de actividad IA en estos meses se registraron en la variedad Claudia, con respecto a la variedad Ramona, y en la situación de déficit hídrico frente a las situaciones de riego (Fig. 10). En las dos últimas campañas los riegos se interrumpieron en la última semana de junio, por

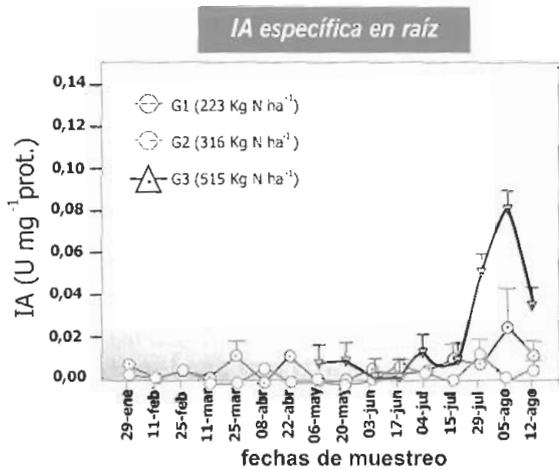


Figura 11. Actividad IA específica en la raíz según los niveles determinados de Nitrógeno en planta a lo largo del ciclo de desarrollo del cultivo de la remolacha azucarera. (G1, 223 kg ha⁻¹, tratamiento de abonado recomendado en 2000/2001; G2, 316 kg ha⁻¹, tratamiento de abonado en exceso en campaña 2000/2001; G3, 515 kg ha⁻¹, tratamiento sin abonado, abonado recomendado y abonado en exceso en campaña 2001/2002).

lo que las altas temperaturas y los altos niveles de evapotranspiración registrados podrían estar haciendo que los cultivos de regadío se comporten, en definitiva, como cultivos de secano durante los últimos muestreos realizados (julio y agosto).

También se observó una actividad IA más alta desde final de julio a mediados de agosto, en los ensayos donde las plantas presentaron un mayor contenido de N (Fig. 11)

El incremento de la actividad IA estaría relacionado con una estrategia de respuesta al estrés térmico e hídrico existente en los meses estivales en Andalucía. Los resultados indican que la variedad Claudia es más sensible al estrés, mientras que Ramona sólo desencadenaría respuestas en situaciones más extremas, como en secano, y siempre con valores por debajo de los de Claudia.

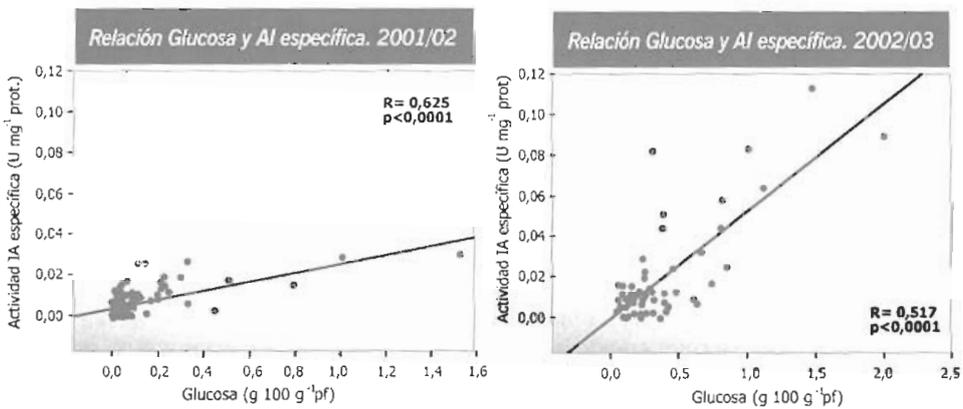


Figura 12. Asociación entre la glucosa en la raíz y la actividad IA durante las campañas agrícolas 2000/2001 y 2001/2002, 2ª y 3ª campañas respectivamente (R, Coeficiente de Correlación de Spearman).

Se ha encontrado correlación entre el contenido de glucosa en la raíz y los niveles de actividad del enzima IA (Fig.12). Esta correlación entre glucosa acumulada y actividad invertasa ácida soluble ya ha sido descrita por diversos autores (Wyse, 1974; Berghall, 1997) en estudios realizados sobre remolachas cultivadas en siembra primaveral, en el período de amontonamiento tras la cosecha. **Excepto los resultados presentados en este estudio, no existe ningún trabajo de estas características realizado en siembra otoñal que muestre una correlación entre la acumulación de glucosa y el aumento de actividad IA durante la etapa de recolección.**

Los otros dos enzimas, Invertasa Neutra y Sacarosa Sintasa, no presentaron una correlación positiva con los niveles de glucosa detectados en la raíz. Esta correlación positiva entre IA y niveles de glucosa se repitió para las dos últimas campañas agrícolas (el estudio no se hizo para la 1ª campaña). Cuando se analizó esta relación en cada uno de los ensayos realizados en las dos campañas referidas se detectó la existencia de una alta correlación ($R > 0,75$) en la situación de "Déficit Hídrico en

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

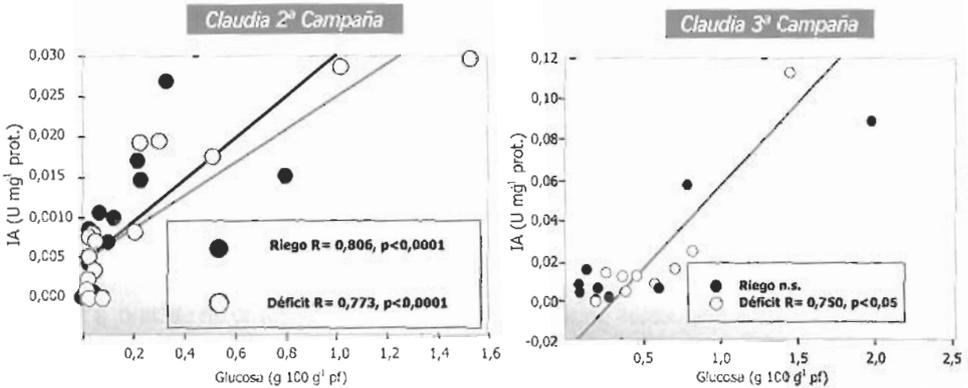


Figura 13. Asociación entre la glucosa en la raíz y la actividad IA en la variedad Claudia en condiciones de déficit hídrico y riego durante las campañas agrícolas 2000/2001 y 2001/2002, 2ª y 3ª campaña respectivamente (R, Coeficiente de Correlación de Spearman).

Claudia" (Fig. 13).

Estos resultados apoyan la existencia de una asociación entre el estado de déficit hídrico, el incremento de los niveles de actividad de la IA (probablemente la IA soluble) y la acumulación de azúcares reductores, destinados principalmente a la respiración de la raíz y a la síntesis de nuevos compuestos para la expansión y crecimiento de este órgano subterráneo. En el tratamiento de riego sólo se observó esta correlación entre actividad IA y glucosa en la 2ª campaña (Fig. 13). En la 2ª campaña, la remolacha en tratamiento de riego se comportó de la misma forma que la que se encontraba en situación de déficit hídrico. Estas correlaciones descritas se produjeron en la variedad Claudia.

En la variedad Ramona no se encontró una correlación significativa entre la actividad IA y la acumulación de azúcares reductores. Esto podría deberse a los bajos valores de esta actividad IA y a la poca cantidad de glucosa acumuladas en raíz en esta variedad. El menor tamaño foliar de la variedad Ramona puede estar en la base de esta respuesta diferencial respecto de Claudia, reduciendo sus pérdidas hídricas por transpiración. De esta forma evitan un incremento de respiración en la raíz, que provocaría un incremento de actividad metabólica de los enzimas que degradan la sacarosa, especialmente IA, y por tanto alta acumulación de azúcares reductores.

EFECTO DEL NITRÓGENO EN LA DEGRADACIÓN DE SACAROSA

En la 3ª campaña, con niveles de Nitrógeno en planta superiores a 500 kg N ha⁻¹, se observan fuertes incrementos en la mayoría de las actividades degradativas de sacarosa (Fig. 7, 9 y 11) y metabolitos como α -aminos (medidos por AIMCRA) y glucosa (Fig. 3). Además, los niveles de polarización (sacarosa) fueron inferiores a los detectados en campañas anteriores, manteniéndose en niveles en torno a 15° a finales de julio (Fig. 5), en la mayoría de los tratamientos. Así, esto nos lleva a sugerir que altos niveles de

nitrógeno en la planta, como los encontrados de forma general en la 3ª campaña, pueden producir un descenso de la calidad del cultivo y su producción. **De ello se deriva que la determinación del nitrógeno en planta es un buen índice para establecer la calidad posterior de la cosecha;** en cualquier caso, un sobreabonado, lejos de ser inocuo, puede tener repercusiones nefastas sobre la calidad del cultivo. El exceso de abonado está asociado a un mayor crecimiento de la hoja, que se expresa mediante el LAI (Índice de Área Foliar). Los valores medios del LAI en los tres grupos fueron: G1, 5,5; G2, 6 y G3, 8,2 (expresados en $m^2 m^{-2}$, AIMCRA 2003a, Martínez et al., gráfico 5, en este libro). A partir de valores aproximados de LAI de 4 no se incrementa la captación de radiación por parte de la planta y por tanto no se produce un incremento de la fotosíntesis. Pero el aumento del porte de la planta producido por el exceso de abonado provoca un aumento de pérdidas por transpiración y costes de mantenimiento, ocasionando una situación de estrés hídrico a la que la planta responde con un aumento de los enzimas que degradan la sacarosa.

MODELO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS ENZIMAS QUE DEGRADAN LA SACAROSA PARA LA REMOLACHA DE SIEMBRA OTOÑAL

Tras este estudio enzimático se plantea el siguiente modelo de actuación de los enzimas implicados en la degradación de la sacarosa (Fig. 14) durante el desarrollo de la remolacha en condiciones de siembra otoñal.

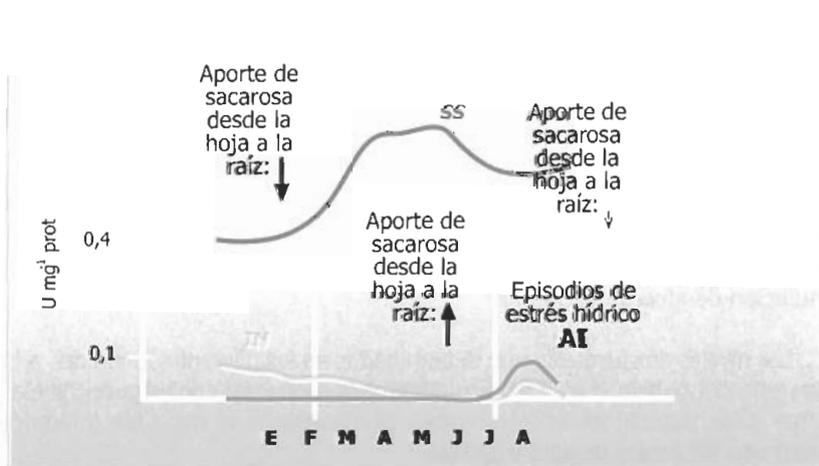


Figura 14. Modelo de actuación de los enzimas que degradan la sacarosa en raíz.

En una primera fase (final de invierno) la actividad IN está en su máximo nivel, mientras que la SS mantiene niveles altos, aunque no máximos, de actividad catalítica. La IA es casi inexistente. El aporte de sacarosa desde la hoja a la raíz es bajo.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

- Entre marzo y junio, la IN decrece su actividad rápidamente. La SS alcanza sus niveles máximos al final de este período. Al final de esta fase la raíz alcanza sus niveles más altos en la mayoría de los ensayos. La IA se mantiene prácticamente indetectable. El aporte de sacarosa desde la hoja a la raíz es máximo.

- En julio y agosto, la actividad IN se mantiene baja, o con leves incrementos. El aporte de sacarosa desde la hoja a la raíz comienza a descender, debido al estrés y cierre estomático. Es un periodo de aporte de sacarosa restringido durante el cual se alcanzan los máximos de polaridad debido fundamentalmente a la pérdida de agua de la raíz. En este periodo la actividad SS desciende, salvo en la 3ª campaña, en la que se registraron polaridades muy bajas. Finalmente, la IA incrementa su actividad, asociada con episodios de estrés, contribuyendo de forma considerable a la degradación de la sacarosa acumulada.

EL ENSAYO DE SIEMBRA PRIMAVERAL EN ANDALUCÍA

Dentro de la tercera campaña agrícola se introdujo un nuevo tipo de ensayo, denominado “ensayo de siembra”. El ensayo consistió en realizar en el sur una “siembra primaveral” (utilizada en la Zona Centro y Norte), para compararla, en las mismas condiciones ambientales, con la “siembra otoñal”. La siembra otoñal se realiza en el mes de octubre y se recolecta en agosto, mientras que la siembra primaveral se siembra al final de febrero o principios de marzo (según la finca) y se recolecta en noviembre.

Ambas siembras se realizaron en la misma finca (La Caridad, Alcalá del Río, Sevilla). Además de este ensayo se realizó una siembra primaveral en otra finca auxiliar (La Candileja, Santaella, Córdoba) de la que sólo se tomaron muestras a partir de septiembre y hasta la recolección. Por último, las muestras de este ensayo se compararon también con muestras de siembra primaveral realizada en la Zona Centro (concretamente en la provincia de Valladolid).

En este “ensayo de siembra” se utilizó la variedad Ramona en todas las fincas descritas.

• Acumulación de glucosa en la raíz

Los niveles de glucosa fueron determinados en las diferentes siembras, a lo largo del desarrollo del cultivo (Fig. 15). En la siembra otoñal se encontraron niveles muy superiores a los detectados en la siembra primaveral. Las mayores diferencias se encontraron en los meses de julio y agosto.

En la siembra primaveral (Fig. 15) existen diferencias significativas entre los valores más altos registrados en junio, julio y agosto (alrededor de 0,1 g 100 g⁻¹pf) y el resto de los valores de septiembre a noviembre, poniendo de manifiesto que en cualquier estadio de desarrollo la remolacha responde al estrés térmico e hídrico con un aumento de azúcares reductores. En siembra primaveral, tanto en la finca de la Caridad como en

la de Santaella los valores de glucosa fueron considerablemente más bajos que en la siembra otoñal durante el periodo de la recolección (Fig. 15), no superando los 0,1 g 100 g⁻¹ pf. En la siembra primaveral realizada en Valladolid (Zona Centro remolachera) no se detectó acumulación de glucosa en ninguno de los muestreos realizados.

En conjunto, estos resultados muestran que, durante el período estudiado, los factores ambientales relacionados con el periodo estival de Andalucía (altas temperaturas y déficit hídrico) determinan una alta acumulación de glucosa en la raíz. Se obtienen valores de glucosa en siembra otoñal hasta cuatro o cinco veces superiores a los encontrados en la siembra primaveral.

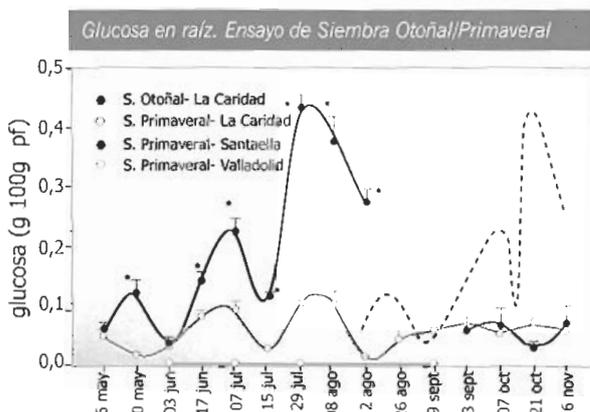


Figura 15. Evolución de los niveles de glucosa en la raíz de remolacha durante el ciclo del cultivo en el ensayo de siembra (Otoñal-La Caridad, Primavera-La Caridad, Primavera-Santaella y Primavera-Valladolid) realizados durante la 3ª campaña (2001-2002) (Media ± ES) (* diferencias significativas con $p < 0,001$; ** diferencias significativas con $p < 0,05$).

También hay que destacar que en las condiciones de estrés térmico e hídrico del verano andaluz se acumula menos glucosa en remolachas jóvenes (12-22 semanas para la siembra primaveral) que en remolachas maduras (26-36 semanas para la remolacha otoñal), (Fig. 15; periodo de junio a agosto). Teniendo en cuenta que las remolachas primaverales son más pequeñas y contienen menos agua, estas diferencias serían aún más marcadas referidas a gramo de peso seco. Estos resultados indican que es la interacción de unas condiciones ambientales estresantes con un estado de desarrollo de remolacha madura lo que en definitiva desencadena la máxima acumulación de glucosa en la raíz durante la recolección.

• Evolución de los niveles de sacarosa en raíz

Los niveles de sacarosa acumulados en la raíz fueron muy bajos tanto en la siembra otoñal como en la primavera (como fue común en la 3ª campaña). En la finca de Santaella, siembra primavera, los niveles de sacarosa en raíz fueron más altos (14,3%) en el último muestreo (Fig. 16).

Estos resultados muestran que con independencia de las condiciones ambientales que se dieron durante la época de recolección para la remolacha otoñal y primavera (altas temperaturas en la siembra otoñal y moderadas en la siembra primavera), la

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

concentración de sacarosa (riqueza) fue baja en ambas; sin embargo, la calidad de la producción de la siembra primaveral fue muy superior a la de la otoñal debido, entre otras razones, a la diferencia en la acumulación de glucosa.

Actividades implicadas en la degradación de la sacarosa. Ensayo de siembra primaveral

• Actividad Sacarosa Sintasa (SS)

La actividad SS específica (Fig. 17) pone de manifiesto que en la siembra primaveral los máximos de actividad SS

se dieron en los meses de junio y principios de julio, aproximadamente a mediados del desarrollo del cultivo, y los mínimos el 15 de julio. A partir de esta fecha, los valores fluctuaron hasta la fecha de recolección. No se observaron diferencias significativas entre las dos fincas de siembra primaveral en el sur (La Caridad y Santaella). Destacan los bajos valores de actividad para la siembra primaveral de la zona Norte (Valladolid).

Tampoco hubo diferencias significativas entre los valores de actividad SS específica de la siembra otoñal y primaveral durante el período de recolección (Fig. 17; se han desplazado los valores de siembra otoñal para realizar dicha comparación, puntos discontinuos), poniendo de manifiesto que es el estado de desarrollo y no las condiciones ambientales lo que parece determinar la actividad de este enzima.

• Actividad Invertasa Neutra (IN)

Las diferencias encontradas en la actividad IN específica (Fig.17) no fueron significativas cuando se compararon los valores por fechas de muestreo, ya que la variabilidad fue considerable. Esto pone de manifiesto que la actividad IN es baja

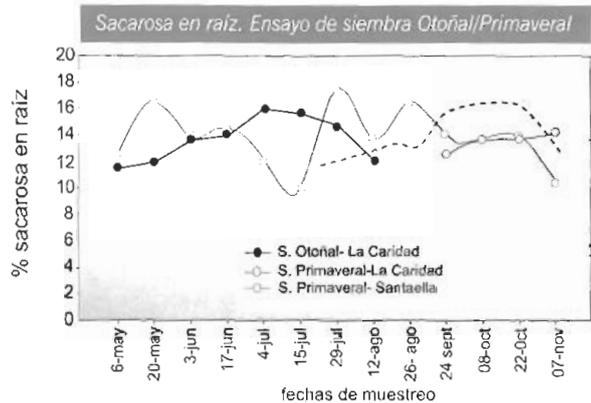


Figura16. Evolución de los niveles de sacarosa en la raíz de remolacha durante el ciclo del cultivo en el ensayo de siembra (Otoñal-La Caridad, Primavera-La Caridad, Primavera-Santaella y Primavera-Valladolid) realizados durante la 3ª campaña (2001-2002).

durante julio y principios de agosto independientemente de la edad del cultivo.

Nuevamente los valores de IN registrados en las dos fincas de siembra primaveral en la zona sur (La Caridad y Santaella) no mostraron diferencias significativas (Fig.17).

• **Actividad Invertasa Ácida (IA)**

Los niveles de actividad IA fueron valores bajos respecto a las otras dos actividades descritas anteriormente. Como es característico en la variedad Ramona los niveles de actividad IA fueron más bajos que los obtenidos para la variedad Claudia (Fig. 17).

En la actividad IA específica, los valores más altos se obtuvieron en el muestreo del 29 de julio de la siembra otoñal. No fueron significativas las diferencias de actividad IA específica observadas entre la siembra otoñal (Fig. 17, puntos discontinuos) y la siembra primaveral al final del desarrollo del cultivo.

En la siembra primaveral en Valladolid la IA fue prácticamente inexistente.

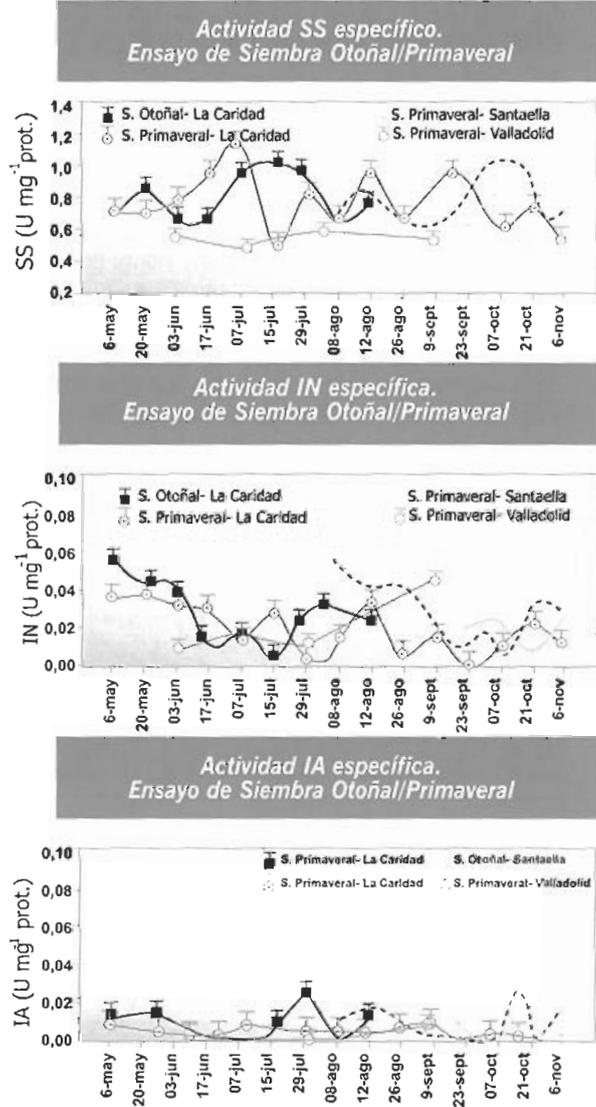


Figura 17. Evolución de las actividades específicas implicadas en el metabolismo de la sacarosa en la raíz de la remolacha durante el ensayo de siembra (Otoñal-La Caridad, Primaveral-La Caridad, Primaveral-Santaella y Primaveral-Valladolid) realizado durante la 3ª campaña (2001-2002) (Media ES). La línea de puntos discontinuos corresponde a los valores de la siembra otoñal desplazados a la derecha para comparar los periodos de recolección en las dos siembras.

EL METABOLISMO DEGRADATIVO DE LA SACAROSA Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE PROLINA EN LA RAÍZ.

Los resultados presentados en este libro (Monreal et al., Fig. 2) muestran la existencia de una mayor acumulación de prolina, osmolito compatible, en la raíz en situación de déficit que en riego en la variedad Claudia. En la variedad Ramona esta mayor acumulación en déficit sólo fue significativa en el mes de junio. Así, la síntesis de prolina y su acumulación ante situaciones de estrés hídrico y/o térmico sería una respuesta al estrés usada prioritariamente en la variedad Claudia.

La síntesis de prolina para realizar el adecuado ajuste osmótico en las células podría estar relacionada con la acumulación de glucosa como consecuencia de la rotura de la sacarosa. La correlación observada entre los niveles de ambos metabolitos fue siempre alta ($R > 0,715$), positiva y significativa (Tabla 1) tanto en la variedad Claudia como en Ramona, a pesar de que los niveles de acumulación de ambos metabolitos fueron diferentes.

Así, tanto la prolina como la glucosa podrían ser usados como buenos indicadores de la situación de estrés en la que se encuentra la planta.

Tabla 1. Asociación entre los niveles de prolina y glucosa en el ensayo de abonado (recomendado y exceso), ensayo hídrico en Claudia (Riego y Déficit) y ensayo hídrico en Ramona (Riego y Déficit) en las tres campañas donde se estudiaron glucosa y prolina (1999/2000, 2000/2001 y 2001/2002).

Ensayo	Tratamiento	Coefficiente de correlación de Spearman, R	Nivel de significación, P
Abonado	A. Recomendado	0,846	<0,0001
	A. Exceso	0,727	<0,0001
Hídrico en Claudia	Claudia Riego	0,790	<0,0001
	Claudia Déficit	0,880	<0,0001
Hídrico en Ramona	Ramona Riego	0,718	<0,0001
	Ramona Déficit	0,809	<0,0001

El mecanismo general de respuesta a las situaciones de estrés hídrico, provocada por escasez de aporte hídrico o por alta evapotranspiración debida a una superficie de

intercambio foliar alta, consistiría en la aceleración del cierre estomático, limitando la transpiración e incrementando la temperatura de la planta. Esta nueva situación de la planta produce un descenso de la fotosíntesis (Salvucci and Crafts-Bradner, 2004). Los tejidos de la planta tienen que recurrir a la utilización de carbohidratos para metabolizarlos de forma rápida para iniciar la respuesta que le asegure tolerancia a la nueva situación de estrés. La principal movilización de estos carbohidratos se producirá en la raíz e irá destinada a la síntesis de osmolitos. Esta movilización, mediante el incremento de la acción de los enzimas degradativos de sacarosa incrementará el contenido de azúcares reductores, que también juegan un papel como osmolito (Hasegawa et al., 2000), en la raíz de la remolacha, pero produciendo la disminución de la calidad de la misma.

CONCLUSIONES

- Los tres enzimas implicados en la degradación de la sacarosa desempeñan su función en diferentes momentos del desarrollo del ciclo de vida de la planta. La IN actúa principalmente en el período invernal. La SS presenta niveles de actividad más altos que las dos invertasas (IN e IA) durante todo el desarrollo, lo que sugiere un papel fundamental en el metabolismo degradativo de la sacarosa en la raíz de *B. vulgaris* L. Este enzima está especialmente activo en el período primaveral (abril-mayo). La actividad IA aparece cuando la planta se encuentra bajo situación de estrés.

- Existe una buena correlación entre la actividad IA y la acumulación de glucosa. Esta correlación es especialmente alta en la variedad Claudia en situación de déficit hídrico y en altos valores de incorporación de nitrato en planta.

- En el período estival, la variedad Ramona acumula menos glucosa y presenta menos actividad IA que la variedad Claudi.

- El exceso de nitrógeno incorporado por la planta es uno de los principales factores que afectan a la alta variabilidad de riqueza y calidad de la remolacha encontrada entre las diferentes campañas estudiadas. El efecto que produce este exceso de nitrógeno en planta detectado es una mayor acumulación de glucosa, α -aminos y prolina en la raíz de la remolacha, disminuyendo la calidad industrial de la raíz.

- Las condiciones climáticas y los altos valores de N en planta parecen estar en la base de la baja calidad y polaridad de la 3ª campaña. Los altos niveles de actividad SS registrados en junio podrían estar en relación con la baja polaridad.

- La siembra primaveral en Andalucía acumula poca glucosa y mantiene unos bajos niveles de actividad de los enzimas de degradación de sacarosa, incluso en el período estival. Este ensayo ha permitido poner en evidencia que los máximos niveles de glucosa se producen por interacción de un estado de desarrollo de la planta (remolacha madura) y las condiciones ambientales de estrés del verano andaluz.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

• La acumulación de prolina y glucosa, como respuesta a las situaciones de estrés hídrico, se produce de forma destacada en la variedad Claudia. La variedad Ramona presenta una mayor resistencia al estrés.

BIBLIOGRAFÍA

AIMCRA (2003a). Memorias de los trabajos efectuados en la Campaña 2002/2003. Ed. Artes Gráficas, Valladolid.

Berghall S, Briggs S, Elsegood SE, Eronen L, Kuusisto JO, Phillip EJ, Theobald TC, Wallander P (1997). The role of sugar beet invertase and related enzymes during growth, storage and processing. *Zuckerind* 122: 520-530

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 284-254

Gordo LF (2003). La calidad tecnológica de la remolacha azucarera. AIMCRA, Ed. Artes gráficas. Valladolid.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant Cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51, 463-499.

Jiménez E (2004). Tesis Doctoral. Factores ambientales y fisiológicos que influyen en la riqueza y la calidad de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Universidad de Sevilla.

Kramer RK (1980). Drought stress and the origin of adaptations. En NC Turner, Kramer PK, eds, *Adaptation of Plant to Water and High Temperature Stress*, John Wiley and Sons, New York, pp 7-20.

Masuda H, Takahashi T, Sugawara S (1987). The occurrence and properties of alkaline invertase in mature roots of sugar beets. *Agr Biol Chem* 51: 2309-2314

Morell M, Copeland L (1985). Sucrose Synthase of soybean nodules. *Plant Physiol* 78: 149-154

Moro J (1992). Calidad tecnológica de la remolacha en Andalucía. INIA. Informe técnico. 24pp

Ribas-Carbó M, González-Meler MA (2000). Fisiología de la respiración de las plantas. En J Azcon –Bieto, M Talón, eds, *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, McGraw Hill Interamericana, Madrid, pp 217-232

Ross HA, McRae D, Davies HV (1996). Sucrolytic enzyme activities in cotyledons of the faba bean. *Plant Physiol* 111: 329-338

Salvucci ME, Crafts-Bradner SJ (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiol Plant* 120, 179-186.

Sturm A (1999). Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol* 121: 1-7

Zhu YJ, Komor E, Moore PH (1997). Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiol* 115: 609-616

Los niveles de **A**denilatos
reflejan mayor actividad
metabólica y capacidad respiratoria
en la **R**emolacha **O**toñal respecto
de la **P**rimaveral



LOS NIVELES DE ADENILATOS REFLEJAN LA MAYOR ACTIVIDAD METABÓLICA Y CAPACIDAD RESPIRATORIA DE LA REMOLACHA OTOÑAL RESPECTO A LA PRIMAVERAL

Sofía García-Mauriño¹, Eduardo T. Jiménez¹, José A. Monreal¹, Rodrigo Morillo-Velarde², Cristina Echevarría¹

¹Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, España.

²AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera), Delegación Sur, C/Metalurgia nº 36, 41080 Sevilla, España.

INTRODUCCIÓN

La remolacha de **siembra primaveral** se cosecha a finales de otoño, cuando las temperaturas están en descenso y los fotoperiodos son progresivamente más cortos.

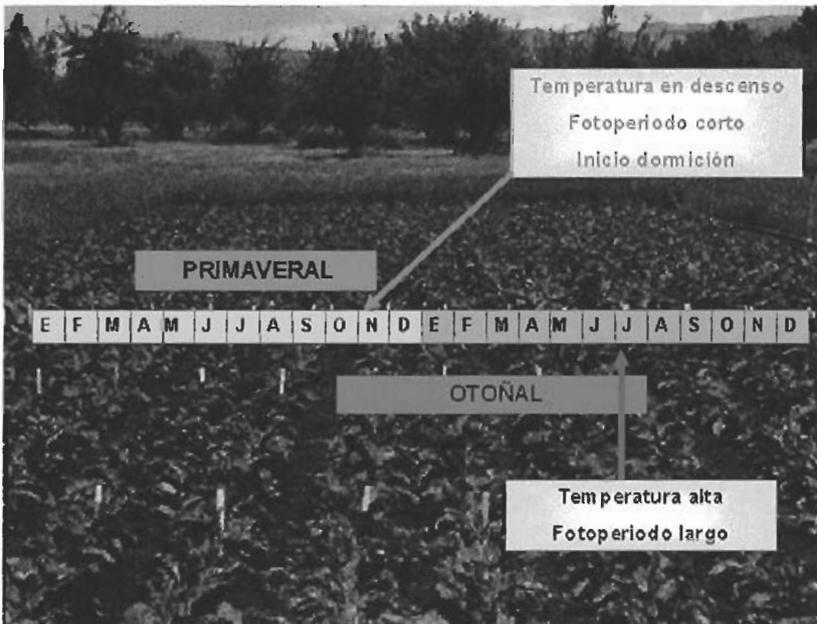


Figura 1. Representación de los factores ambientales existentes en el momento de la cosecha de la remolacha de siembra otoñal y de siembra primaveral.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Temperaturas bajas y fotoperiodos cortos son señales ambientales que inducen el periodo de dormición que ocurre al final del primer año de cultivo de esta especie bianual. Por el contrario, la remolacha de **siembra otoñal** se cosecha en pleno verano, cuando las temperaturas son altas y los fotoperiodos largos. Por tanto, es de esperar que las plantas sometidas a las dos variantes de cultivo se encuentren en estados metabólicos distintos en el momento de ser cosechadas.

La última fase del metabolismo respiratorio de los carbohidratos está asociada a la síntesis de ATP en las mitocondrias. Si la demanda de ATP en la planta es alta, se respirarán los carbohidratos fotosintetizados para satisfacerla, siempre que haya ADP disponible para la síntesis de ATP. En general, una relación ATP/ADP alta sugiere una situación de alta actividad metabólica.

La variación en el contenido de adenilatos en las raíces de remolacha de **siembra primaveral** ha sido descrita por Shugaev y Bukhov (1997). El estadio pre-cosecha se caracteriza por un alto nivel de ADP y una relación ATP/ADP baja, es decir, una situación que concuerda con un estado de baja actividad metabólica atribuible a un sistema mitocondrial poco activo (Shugaev, 2001).

Por el contrario, no existe bibliografía referente al contenido de adenilatos de la remolacha de **siembra otoñal**. Presumiblemente, el distinto estado metabólico en el que se encuentran la remolacha de siembra primaveral y la de siembra otoñal debe reflejarse en diferentes niveles de adenilatos.

En este trabajo se han cuantificado adenilatos (ATP y ADP) en las raíces de remolacha para evaluar su estado metabólico y para analizar si existe una relación entre dicho estado y las diferencias observadas entre la remolacha de **siembra otoñal** y la de **siembra primaveral**.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Material vegetal:** Se han empleado variedades comerciales de remolacha (Claudia, Ramona y Monatunno), que han sido cultivadas por AIMCRA en varias localidades próximas a Sevilla. Se presentan los resultados correspondientes a las campañas 1999/2000, 2000/2001 y 2001/2002.

- **Preparación de las muestras:** Cada muestra estaba formada por secciones delgadas de al menos tres raíces distintas, obtenidas tras la llegada de las remolachas al laboratorio e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido.

- **Cuantificación de adenilatos:** Los adenilatos se extrajeron con HClO_4 0.6 M (Bukhov et al., 1995). La cuantificación de ATP se realizó en extractos neutralizados con K_2CO_3 2 M usando un ensayo de bioluminiscencia de Sigma. En dicho ensayo, se produce una señal luminosa que se detecta y cuantifica en un luminómetro, y que es proporcional a la concentración de ATP en la muestra ensayada (Bukhov et al., 1995). De la misma

manera, se determinó la cantidad de ADP contenida en las muestras tras su conversión enzimática en ATP (Schultz et al., 1993). Todas las determinaciones se han realizado por triplicado y se presentan las medias de los datos obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 2 se muestran los resultados obtenidos en raíces de **siembra otoñal** de cuatro ensayos de campo distintos, durante la campaña 1999/2000. ATP y ADP mostraban una tendencia a disminuir en las raíces, con valores mínimos en el periodo de cosecha, y siempre con valores de ADP inferiores a los de ATP, ocasionando una relación ATP/ADP relativamente alta. Estos datos sugerían un estado de actividad metabólica superior a la descrita para la remolacha primaveral.

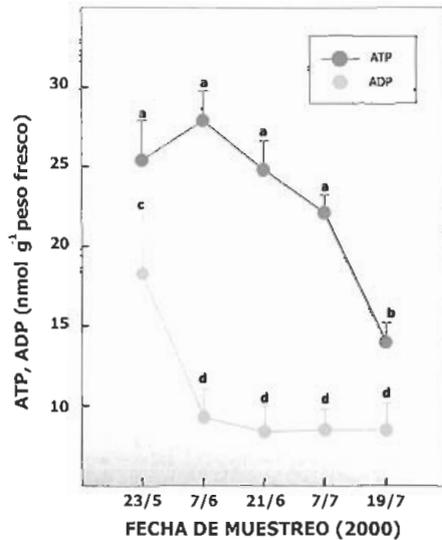


Figura 2. Contenido de ATP y ADP en raíces de remolacha de siembra otoñal en la campaña 1999/2000. Cada punto es la media \pm ES de ocho muestras distintas. Las medias con la misma letra no difieren de forma significativa para $P < 0.05$.

El patrón general de las variaciones de adenilatos en la remolacha de **siembra otoñal** se analizó durante la campaña 2000/2001 durante todo el desarrollo de remolacha en ensayos de campo (Fig. 3) y cultivadas en paralelo en el invernadero de la Facultad de Biología (Fig. 4). Se observó un aumento inicial de ATP y ADP, seguido de un descenso de ADP que ocasionó un máximo en la relación ATP/ADP (fase de crecimiento exponencial y máxima actividad metabólica); a continuación, un descenso gradual de ambos adenilatos, con uno o más picos en la relación ATP/ADP en la fase

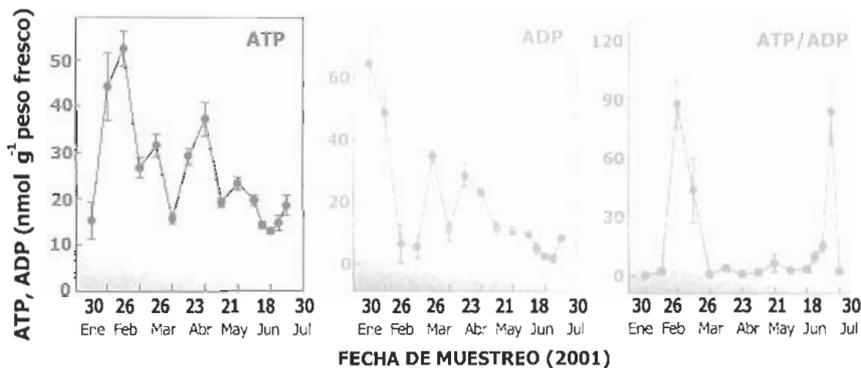


Figura 3. Contenido en ATP y ADP, y relación ATP/ADP en raíces de remolacha de siembra otoñal durante la campaña 2000/2001. Cada punto es la media \pm ES de ocho muestras distintas.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

final causados, presumiblemente, por aumentos puntuales de la actividad respiratoria en respuesta a cambios ambientales. Este patrón se ha repetido en las tres campañas analizadas.

Durante la campaña 2001/2002, se cultivaron remolachas en **siembra primaveral** y en **siembra otoñal**, en la misma localidad, de manera que ambos cultivos estuviesen expuestos a las mismas condiciones ambientales. En el momento de la cosecha, se observa que el contenido en ATP y ADP (Fig. 5 y Fig. 6) era superior en las remolachas en siembra primavera. El ATP podría acumularse como consecuencia de una disminución de su uso, lo cual, unido a un aumento de ADP que no dispara la actividad mitocondrial (que causaría su descenso), sugiere un estado general de baja actividad metabólica.

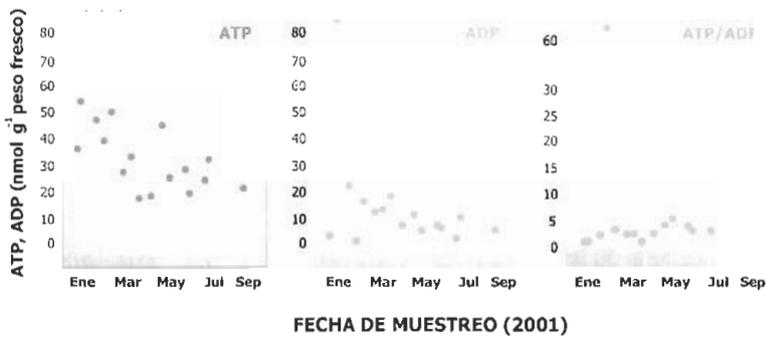


Figura 4. Contenido en ATP y ADP, y relación ATP/ADP en raíces de remolacha cultivada en invernadero durante la campaña 2000/2001.

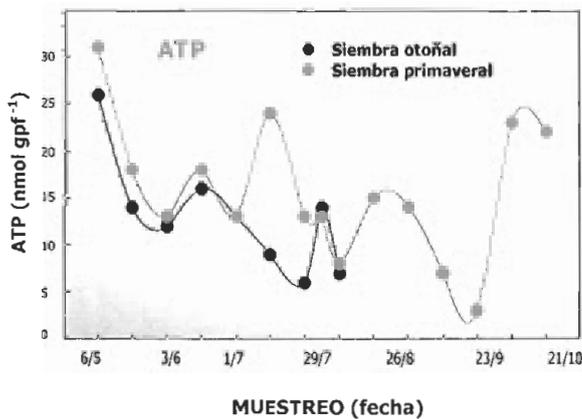


Figura 5. Contenido de ATP en raíces de remolacha de siembra otoñal y de siembra primaveral en la campaña 2001/2002. *B. vulgaris* cv. Ramona se cultivó en la misma finca en siembra otoñal (círculos negros) y siembra primaveral (círculos rojos).

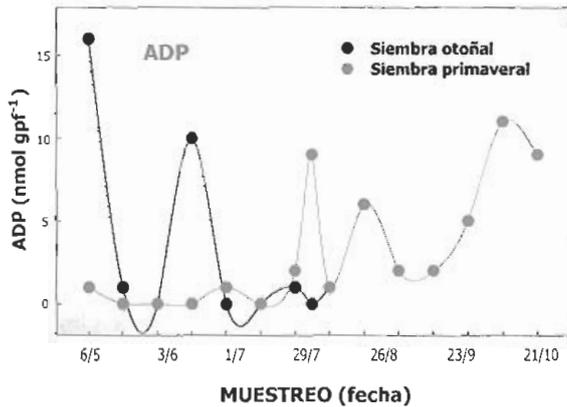


Figura 6. Contenido de ADP en raíces de remolacha de siembra otoñal y de siembra primaveral en la campaña 2001/2002. *B. vulgaris* cv. Ramona se cultivó en la misma finca en siembra otoñal (círculos negros) y siembra primaveral (círculos rojos).

Además, la relación ATP/ADP (Fig. 7) era baja y estable, lo que contrasta con la altamente variable observada en el caso de la remolacha de siembra otoñal. En el caso de la remolacha primaveral, la situación correspondía a plantas iniciando el periodo de dormición al final del primer año de cultivo. Por el contrario, los resultados obtenidos para la remolacha otoñal sugerían un sistema funcional y activo.

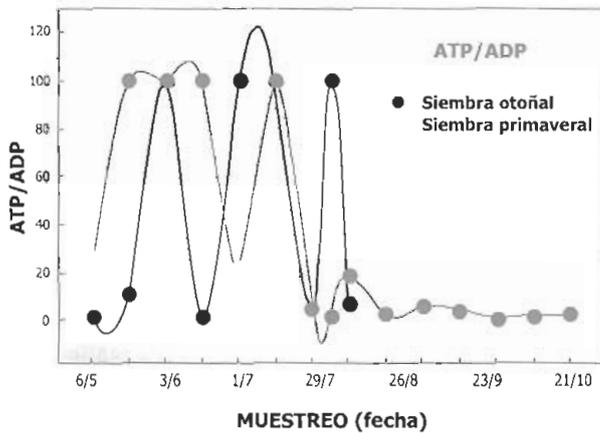


Figura 7. Contenido de ATP/ADP en raíces de remolacha de siembra otoñal y de siembra primaveral en la campaña 2001/2002. *B. vulgaris* cv. Ramona se cultivó en la misma finca en siembra otoñal (círculos negros) y siembra primaveral (círculos rojos).

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Las condiciones climáticas en el momento de la cosecha fueron muy distintas para ambos tipos de siembra. Cuando se cosecha la remolacha otoñal (verano), las condiciones climáticas (altas temperaturas y escasa o inexistente precipitación) propician que las plantas se vean sometidas a estrés hídrico y térmico. Por el contrario, cuando se cosecha la remolacha primaveral (finales de otoño) es improbable que se produzcan dichas situaciones de estrés. Por tanto, es de esperar una diferente actividad metabólica asociada a las **respuestas a estrés**, en ambos tipos de siembra. En la Tabla 1 se muestra que el contenido en glucosa y prolina era significativamente mayor en las raíces de siembra otoñal que en las raíces de siembra primaveral en el momento de la cosecha. La prolina es un osmolito compatible que se ha asociado al ajuste osmótico de las plantas en las respuestas a estrés hídrico (Yeo, 1998). Por otro lado, en las respuestas al estrés podría estar implicada una movilización de la sacarosa de reserva (por ejemplo, para sintetizar prolina u otros osmolitos compatibles), y acumularse glucosa en la raíz como remanente. Como un factor más del aumento de actividad metabólica que sería de esperar en las respuestas a estrés, se muestra en la misma Tabla que la tasa respiratoria en la remolacha otoñal era casi el doble de la correspondiente a la remolacha primaveral en sus respectivas épocas de cosecha.

Tabla 1. Prolina, glucosa y tasa respiratoria en raíces de remolacha de siembra otoñal y de siembra primaveral en el momento de la cosecha. La remolacha otoñal se muestreó desde el 15 de Julio al 12 de Agosto, y la primaveral desde el 7 de Octubre hasta el 6 de Noviembre de 2002. Se muestran las medias \pm ES (n = 6).

	Siembra otoñal	Siembra primaveral	t test (n=6)
Prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}$ pf)	4.79 \pm 0.17	1.79 \pm 0.14	P < 0.001
Glucosa (mg g ⁻¹ pf)	0.69 \pm 0.16	0.30 \pm 0.15	P = 0.017
Respiración ($\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ min}^{-1}$)	93.33 \pm 6.43	52.00 \pm 5.82	P < 0.001

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de la existencia de diferencias en el estado metabólico en ambos tipos de siembra. Dichas diferencias pueden estar relacionadas tanto con el estado de desarrollo de la planta (iniciando o no el periodo de dormición) como con las respuestas a estrés (ver esquema presentado en la Fig. 8). El estado metabólico de la remolacha de **siembra otoñal** (alta capacidad respiratoria y alta actividad metabólica) es totalmente distinto del de la de **siembra primaveral** (baja capacidad respiratoria y baja actividad metabólica) en el momento de la cosecha. Esta diferencia puede ser la base fisiológica que subyace en algunas de las diferencias que se observan entre los cultivos de remolacha en siembra otoñal y siembra primaveral.

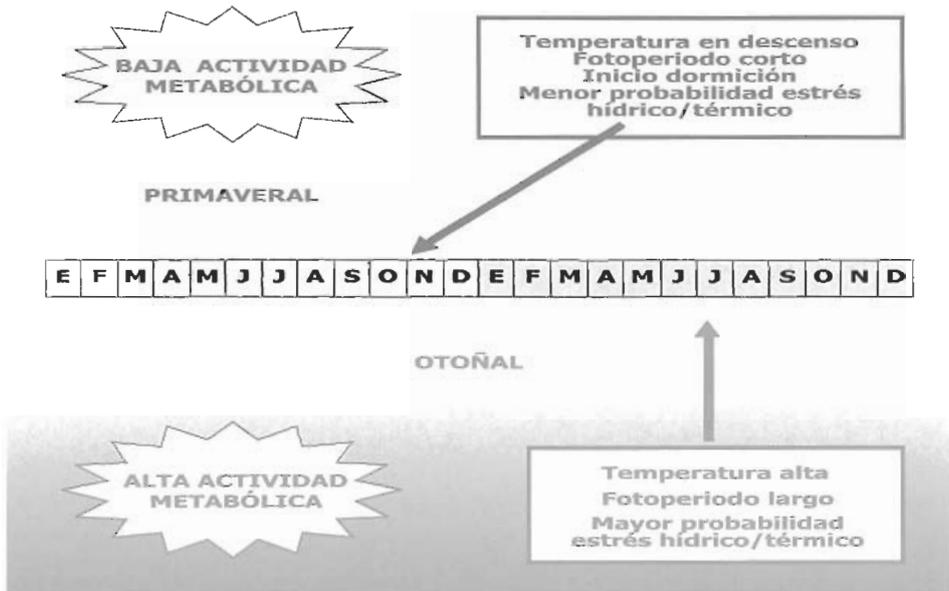


Figura 8. Representación de los factores ambientales existentes y de la situación metabólica resultante en el momento de la cosecha de la remolacha de siembra otoñal y de siembra primaveral.

BIBLIOGRAFÍA

Bukhov NG, Bondar VV, Drozdova IS (1995). Long-term effects of blue or red light on ATP and ADP contents in primary barley leaves. *Planta* 196: 211-216

Schultz V, Sussman I, Bokvist K, Tornheim K (1993). Bioluminometric assay of ADP and ATP at high ATP/ADP ratios: assay of ADP after enzymatic removal of ATP. *Anal Biochem* 215: 302-304

Shugaev AG (2001). Developmental changes in the NAD content in sugar-beet root mitochondria and their effect on the oxidative activity of these organelles. *Russian J Plant Physiol* 48: 582-587

Shugaev AG, Bukhov NG (1997). Opposite trends of seasonal changes in ADP content and respiration rate in sugar beet roots. *J Plant Physiol* 150: 53-56

Yeo A (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology *J Exp Bot* 49: 915-929

CAPÍTULO V

Efecto del **N**itrógeno sobre el desarrollo de la **R**emolacha Azucarera de **S**iembr a **O**toñal



EFFECTO DEL NITRÓGENO SOBRE EL DESARROLLO DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL

Juan José Martínez¹, Rodrigo Morillo-Velarde¹, Luis F. Gordo¹, José Luis Bermejo¹ y Cristina Echevarría²

¹AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera), Delegación Sur, C/Metalurgia nº 36, 41080 Sevilla, España.

²Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, España.

INTRODUCCIÓN

De todos los nutrientes de las plantas, una aplicación de nitrógeno en la mayoría de las situaciones tiene los efectos más espectaculares sobre el aspecto del cultivo (Draycott y Christenson, 2003). En el cultivo de la remolacha azucarera, el nitrógeno no solo determina el desarrollo del cultivo, sino que también actúa sobre la producción de sacarosa y la calidad industrial. Cada uno de estos parámetros poseen óptimos de nitrógeno diferentes (Shock, C. C. et al, 2000).

Existen muchos estudios sobre el efecto del nitrógeno sobre el desarrollo de la remolacha en siembra primaveral (Armstrong et al, 1986; Draycott, 1993; Draycott y Christenson 2003; Shock C.C., 2000, etc.), pero estos estudios son casi inexistentes cuando se trata de la modalidad de siembra otoñal. Aunque en principio la respuesta al nitrógeno de las dos modalidades de siembra debiera ser la misma, los factores climáticos afectarán tanto a la demanda de nitrógeno como a la limitación del crecimiento (temperatura invernal, evapotranspiración estival, etc.), y por lo tanto a la eficiencia del uso que del nitrógeno tenga el cultivo según la zona de implantación.

Es necesario un adecuado manejo de la fertilización nitrogenada para reducir el impacto ambiental de las prácticas agrícolas así como obtener un incremento de la rentabilidad de la producción.

Este estudio se ha realizado integrado en el proyecto FEDER-1FD97-0893-C3-01.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han realizado ensayos durante 3 años (2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003), en 3 fincas diferentes de la provincia de Sevilla.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Los datos concretos de estos ensayos se muestran en la Tabla 1.

Los ensayos se dispusieron en bloques completos al azar con al menos 4 repeticiones.

Las muestras para seguimiento evolutivo a lo largo del ciclo fueron tomadas de 3 repeticiones y para análisis de recolección se tomaron de todas las repeticiones existentes. La metodología empleada para la determinación de los parámetros fue la misma todos los años.

Para el estudio de la evolución de los diferentes parámetros se tomaron muestras quincenales de las plantas existentes en 1 metro lineal (0.5m²).

La determinación del contenido de nitratos de las muestras se realizaron sobre materia seca por el método descrito por López Rita (1990).

El contenido de nitrógeno total se determinó con un micro-Kjeldahl sobre materia seca.

El contenido de nitratos en jugo de peciolo se determinó con NITRACHEK 404, aplicándose la corrección correspondiente para obtener los resultados sobre materia seca.

Para la determinación de los resultados de recolección se tomaron 6 m² de superficie.

Tabla 1.

* Dosis Recomendada de Nitrógeno en U. F. según propuesta de AIMCRA

** DR: Dosis Recomendada; DR+300: Dosis recomendada más 300 U.F.; SA: Sin aporte de nitrógeno; DR/2: la mitad de la dosis recomendada.

Finca	Localidad	Año Recol	DR *	Tratamientos**	Repeticiones
La Caridad	Alcalá del Río	2001	150	DR, DR+30	6
La Caridad	Alcalá del Río	2002	180	SA, DR, DR+30	4
La Reunión de S.Andrés.	Guillena	2002	150	SA, DR, DR+300	4
El Cerro	Carmona	2003	180	SA, DR, DR/2	4

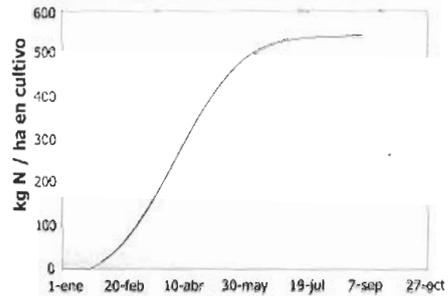
Los datos obtenidos fueron analizados en el paquete estadístico SPSS v8.0. con análisis de la varianza (ANOVA) y análisis de regresión. Todos los coeficientes r² que se muestran corresponden a valores ajustados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de poder hablar del efecto del nitrógeno sobre el desarrollo de la remolacha de siembra otoñal es importante conocer cuál ha sido la disponibilidad de nitrógeno que ha tenido el cultivo.

La cantidad de nitrógeno que incorpora la remolacha de siembra otoñal sigue una curva como la que se muestra en el gráfico 1 con un aumento progresivo hasta alcanzar su máximo a partir de Mayo-Junio (AIMCRA 2002, 2003 y 2004).

Gráfico 1. Modelo de evolución de la cantidad de nitrógeno encontrada en el cultivo



Como se observa en la Tabla 2, existe una discrepancia entre el nitrógeno aportado y el nitrógeno encontrado en el cultivo.

Como se observa en dicha tabla, la cantidad de nitrógeno máximo encontrado posee cierta correspondencia con la finca y el año. Por ejemplo, se puede observar como el ensayo de La Caridad realizado en el año 2001-2002 muestra los valores más altos de extracción de nitrógeno. Este hecho se pudo observar en campo, donde no existió diferencia visual entre tratamientos (aún siquiera con el tratamiento donde no se aportó nada de nitrógeno). Debido a esta falta de correspondencia entre el nitrógeno aportado y el encontrado, tomamos la extracción máxima de nitrógeno mostrada en Mayo-Junio como estimador de la disponibilidad de nitrógeno (nitrógeno que va a ser capaz de tomar el cultivo) que ha tenido el cultivo.

Tabla 2.
Relación entre el nitrógeno aportado y la cantidad máxima de nitrógeno encontrada en el cultivo en los meses de Mayo-Junio, ordenados de menor a mayor según este último parámetro. (EC: El Cerro; LC: La Caridad; LR: La Reunión de San Andrés. *: kg de N/ha)

Año recoi	Finca	Tratamiento	Aportado*	Max*	Grupo
2003	EC	SIN APORTE	0	209	1
2001	LC	DR	150	223	1
2003	EC	DR/2	90	250	1
2002	LR	SIN APORTE	0	259	
2002	LR	DR	150	285	2
2003	EC	DR	180	299	2
2001	LC	DR+300	450	316	2
2002	LC	SIN APORTE	0	420	
2002	LR	DR+300	450	455	3
2002	LC	DR	180	519	3
2002	LC	DR+300	480	569	3

Esta determinación de la disponibilidad de nitrógeno para el cultivo nos permite agrupar los diferentes tratamientos según este parámetro. Hemos reunido los tratamientos

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Gráfico 2. Cantidad de nitrógeno determinado en los diferentes grupos realizados

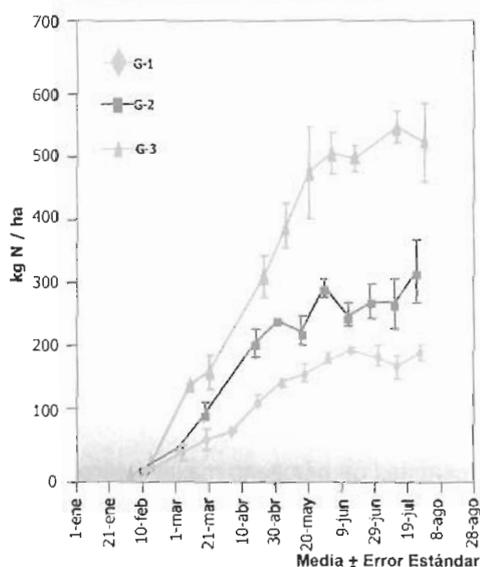
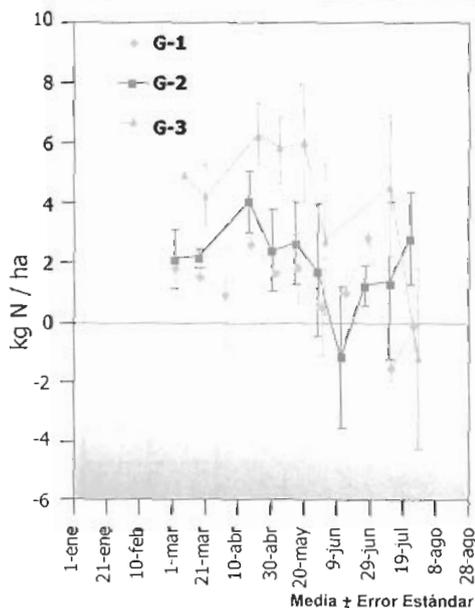


Gráfico 3. Tasa de incorporación de nitrógeno (kg N ha⁻¹ día⁻¹) del cultivo en los diferentes grupos realizados

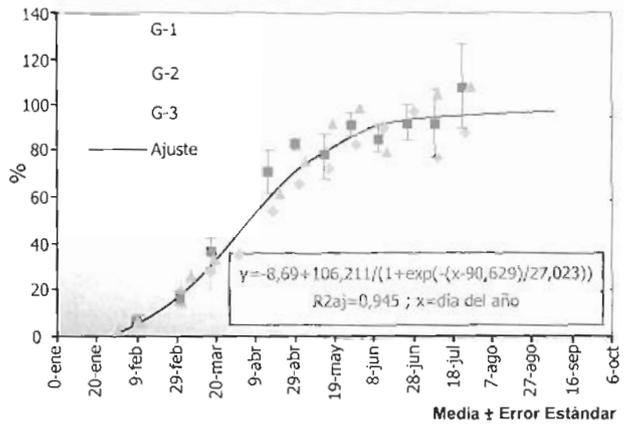


en 3 grupos según la tabla 2: Los 3 menores valores (G-1), los 3 intermedios (G-2) y los 3 mayores (G-3). Hemos promediado sus valores para evitar la correspondiente variabilidad entre fincas y años, y los hemos comparado entre sí. Para el estudio de la evolución a lo largo del ciclo, las medias se han realizado quincenalmente.

En el gráfico 2 se muestra la cantidad de nitrógeno observada en el cultivo en los diferentes grupos. Como se observa estos grupos siguen la curva característica mostrada en el Gráfico 1. En los 3 casos existe un incremento lineal hasta Mayo. Desde esta fecha prácticamente no existe un aumento del contenido en nitrógeno del cultivo en ninguno de los 3 grupos. Tanto el incremento como el nivel final alcanzado es dependiente de la disponibilidad de nitrógeno que ha poseído el cultivo. La media del valor máximo alcanzado en Mayo-Junio para el grupo 1 es de 217 kg N/ha, para el grupo 2 es de 300 kg N/ha y para el grupo 3 es de 515 kg N/ha. Observando el gráfico podemos ver que a la salida del invierno (Febrero) los 3 grupos poseen la misma cantidad de nitrógeno, no existiendo diferencia entre ellos. Es decir, que una mayor disponibilidad de nitrógeno no implica una mayor captación en las primeras fases del cultivo. A partir de Marzo, cuando existe un intenso crecimiento vegetativo, la captación de nitrógeno por parte del cultivo se ve potenciada por la disponibilidad de dicho nitrógeno. En Mayo se alcanza el máximo desarrollo foliar al tiempo que las condiciones ambientales se hacen más duras para la planta. Es a partir de este momento cuando deja de aumentar la cantidad de nitrógeno del cultivo manteniéndose estable hasta el final del ciclo estudiado.

La tasa de aparición de nitrógeno en el cultivo (gráfico 3) muestra diferencias según el grupo al que hagamos referencia. Durante casi todo el ciclo, y principalmente durante el periodo de crecimiento vegetativo, el grupo 3 presenta tasas superiores al resto, mostrando valores medios alrededor de 4 kg N ha⁻¹ día⁻¹ en Marzo y entre 5 y 6 kg N ha⁻¹ día⁻¹ en Abril y Mayo. Los valores de Marzo de los grupos 1 y 2 se encuentran alrededor de 2 kg N ha⁻¹ día⁻¹. Estos 2 tratamientos muestran un pico máximo en Abril con valores de aproximadamente 4 kg N ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento 2 y de 2,5 kg N ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento 1.

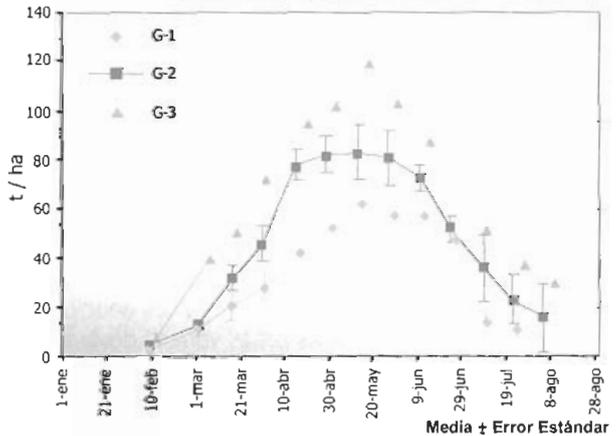
Gráfico 4. Relación porcentual entre el nitrógeno encontrado en el cultivo y el máximo encontrado en Mayo-Junio



Aunque, como hemos visto, la tasa de incorporación de nitrógeno del cultivo (en kg N ha⁻¹ día⁻¹) es diferente según el grupo, si representamos el contenido de nitrógeno del cultivo en porcentaje sobre el contenido final, observamos que los tres grupos se ajustan a la misma curva (gráfico 4). Esto parece significar que la tasa de incorporación es proporcional al contenido final y por lo tanto proporcional a la disponibilidad de nitrógeno. Es decir, demuestra la alta afinidad y capacidad de absorción de la remolacha para el nitrógeno (Marschner, H. 1995).

Otra forma de interpretar este hecho pasa por la idea de que conociendo la cantidad de nitrógeno que posee el cultivo en un momento dado, sería posible estimar la cantidad final que incorporará.

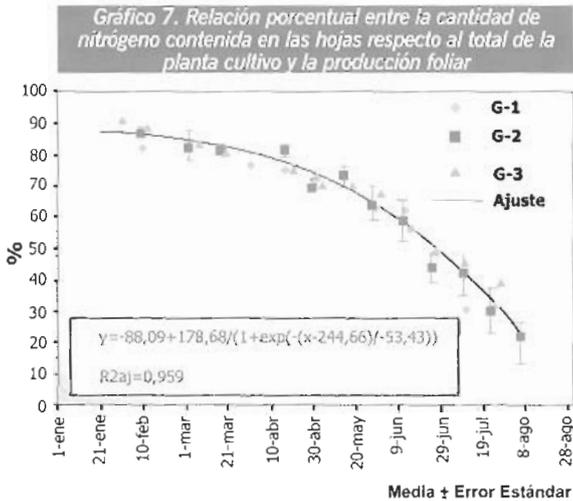
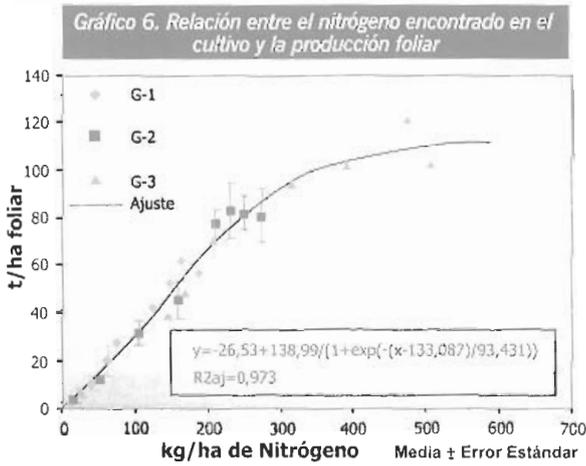
Gráfico 5. Evolución de la producción foliar de los diferentes grupos realizados



DESARROLLO FOLIAR

Una mayor disponibilidad de nitrógeno implica un mayor desarrollo foliar (gráfico 5). Esto es de hecho una de las mayores diferencias existentes en el desarrollo producido por el nitrógeno. Aunque inicialmente, en Febrero cuando el cultivo está poco desarrollado, no se observan diferencias

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal



se representa la producción foliar de los diferentes grupos frente al nitrógeno incorporado por el cultivo. Como se observa esta relación se ajusta a una curva de tipo sigmoide con un $r^2_{aj} = 0,973$ para los 3 grupos.

La dependencia del nitrógeno que posee el desarrollo foliar es casi lineal hasta los 250-300 kg N/ha incorporados. Por otra parte, esta curva presenta un desarrollo foliar mayor del 90% sobre el final, con 350 U.F. incorporadas. Debido a que consideramos que la limitación del crecimiento foliar que se da en Mayo-Junio (al menos en los grupos con mayor disponibilidad de nitrógeno) proviene de las condiciones climáticas existentes en nuestra zona, es posible que en otras zonas varíe el desarrollo foliar máximo debido al nitrógeno.

El papel de las hojas como sumidero de nitrógeno se observa claramente en el gráfico 7. Al comienzo del ciclo estudiado el 90% del nitrógeno que posee la planta se

significativas entre grupos, en algo más de 20 días el grupo 3 muestra una clara diferenciación respecto a los otros 2 grupos, mostrando el grupo 2 valores intermedios 15 días después.

Durante el periodo de desarrollo vegetativo, la producción foliar aumenta, siendo su tasa de incremento mayor cuanto mayor es la disponibilidad de nitrógeno del cultivo. A partir de finales de Mayo y principios de Junio la producción foliar comienza a decrecer, debido más a las condiciones adversas de nuestra zona que a cualquier acción motivada por el nitrógeno. De hecho la eficiencia del uso del nitrógeno que presentan en Junio los diferentes grupos son: 106.77, 95.95 y 60.28 kg Peso seco de biomasa/kg N (respectivamente G-1, G-2 y G-3).

Esta dependencia de la producción foliar del nitrógeno disponible la podemos observar en el gráfico 6. En este gráfico

encuentra en las hojas. Este porcentaje decae paulatinamente hasta el final del ciclo. Inicialmente esta caída es suave, estando hasta Junio por encima del 60%. En los meses estivales el descenso de nitrógeno porcentual de las hojas se reduce más rápidamente hasta alcanzar el 20% del nitrógeno de la planta en Agosto.

Este efecto del nitrógeno sobre el desarrollo foliar se ve reflejado tanto en el grado de cubrición del terreno (Cobertura) como en el LAI (Índice de Área Foliar).

Respecto a la evolución de la cobertura (gráfico 8) observamos cómo durante todo el ciclo el grupo 1 mantiene niveles de cobertura inferiores al resto, alcanzando valores superiores al 90% sólo durante 1 mes. En cambio, no existen diferencias significativas entre los grupos 2 y 3. Como el desarrollo foliar debe ir encaminado a obtener la más rápida y continua cobertura del terreno para obtener la mayor captación de radiación solar posible, podemos suponer que el grupo 1 ha poseído mermas en el desarrollo, mientras que el grupo 2 aún teniendo menos nitrógeno que el grupo 3, no ha demostrado menores posibilidades de crecimiento potencial. Este hecho lo podremos comprobar más adelante.

Para comprobar cuál es la cantidad de nitrógeno que optimiza el desarrollo foliar respecto a la cobertura, representamos la cobertura frente al nitrógeno incorporado por el cultivo (gráfico 9). Para los 3 grupos este

Gráfico 8. Evolución de la cobertura de los diferentes grupos realizados, hasta Mayo inclusive

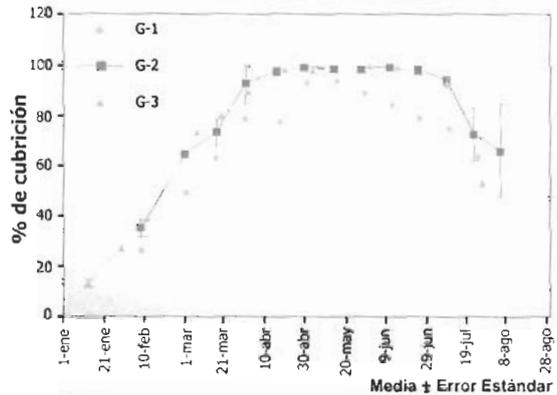


Gráfico 9. Relación entre la cobertura y la cantidad de nitrógeno encontrado en el cultivo, hasta Mayo inclusive

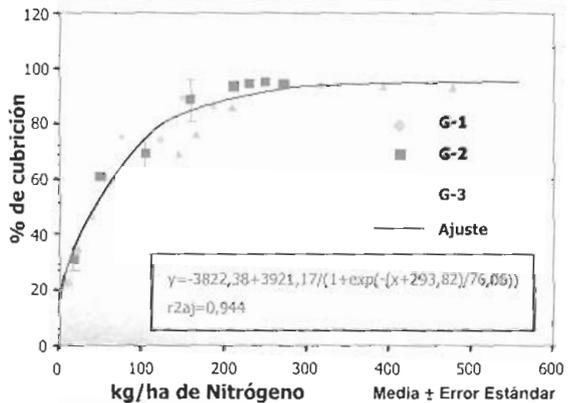
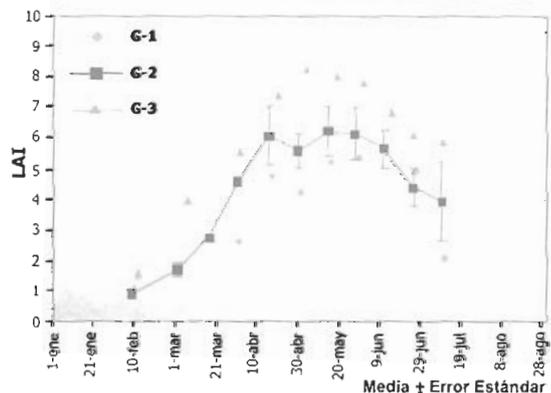


Gráfico 10. Evolución del LAI (Índice de Área Foliar) de los diferentes grupos realizados hasta Mayo inclusive



Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Gráfico 11. Relación entre el LAI y la cantidad de nitrógeno encontrada en el cultivo, hasta Mayo inclusive

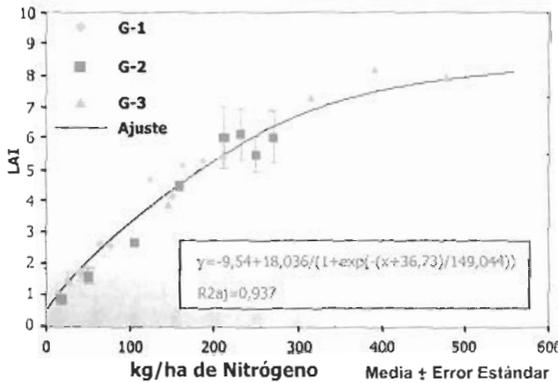


Gráfico 12. Evolución del peso de hoja individual de los diferentes grupos realizados

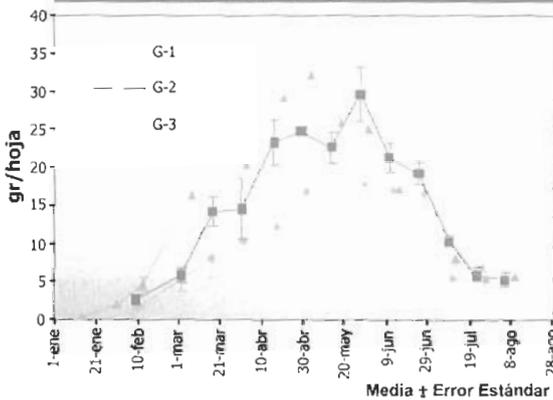
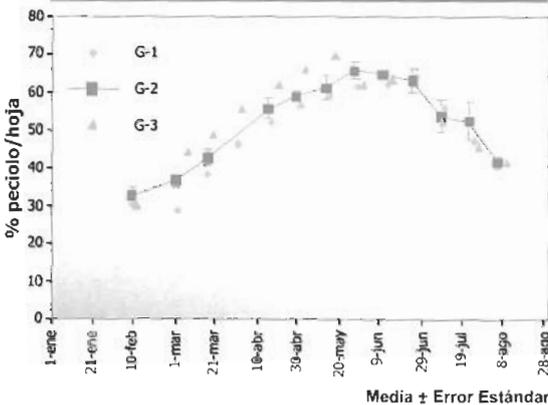


Gráfico 13. Evolución de la relación porcentual del peso del peciolo frente al peso total de la hoja de los diferentes grupos realizados



comportamiento se ajusta a una curva con un $r^2_{ajustado} = 0,944$. Como se observa, se obtiene el 90% de cobertura con 200 kg N/ha, mientras que incorporaciones superiores a 250 kg N/ha no aportan mejora en el grado de cobertura del terreno.

De igual forma se ha representado el LAI mostrado por los diferentes grupos frente al nitrógeno incorporado (gráficos 10 y 11). Lo primero que se observa es que el grupo 3 ha mostrado niveles de LAI de hasta 8 (superior a 4 a partir de primeros de Marzo), el grupo 2 de hasta 6 (superior a 4 a primeros de Abril), y el grupo 1 muestra niveles máximos de LAI de aproximadamente 5 (alcanzado solo en Mayo-Junio).

De igual forma que la cobertura, el LAI muestra una relación matemática estrecha ($r^2_{ajustado} = 0,937$) respecto al nitrógeno incorporado. Draycott (1993) considera que un LAI óptimo para la remolacha se encuentra entre 4 y 5. En las condiciones ensayadas estos valores lo encontramos entre 150 y 200 kg N/ha incorporados, por lo que esta sería la incorporación mínima requerida por el cultivo para alcanzar dicho LAI.

Un aumento en la disponibilidad de nitrógeno implica un incremento en el tamaño de las hojas individuales, un incremento del tamaño del peciolo respecto al limbo, pero no en el número de hojas producidas (gráficos 12, 13 y 14).

CONCENTRACION DE NITRÓGENO EN TEJIDOS

En general, el contenido de nitrógeno en los tejidos es superior cuanto más disponibilidad de nitrógeno ha tenido la planta, como se puede observar en los gráficos 15,16 y 17.

La remolacha es una planta con un alto comportamiento nitrofilico (con gran avidez por el nitrógeno). Esta planta acumula nitratos de reserva principalmente en vacuolas existentes en el peciolo.

El contenido de nitratos en jugo de peciolo posee un comportamiento muy característico en la remolacha azucarera en siembra otoñal (memorias AIMCRA 2002, 2003, 2004). La concentración en peciolo crece desde nascencia hasta Febrero o Marzo donde muestra un pico máximo. Posteriormente esta concentración decrece hasta que en recolección se suelen encontrar los niveles mínimos. En el gráfico 18 se muestra la evolución del contenido de N(NO₃) sobre materia seca tomada en el jugo de peciolo de los 3 grupos. Como se observa la concentración de N(NO₃) en peciolo es correspondiente con la disponibilidad de nitrógeno a lo largo de todo el ciclo. Mayor disponibilidad implica una mayor concentración.

Gráfico 14. Evolución del número de hojas por planta de los diferentes grupos realizados

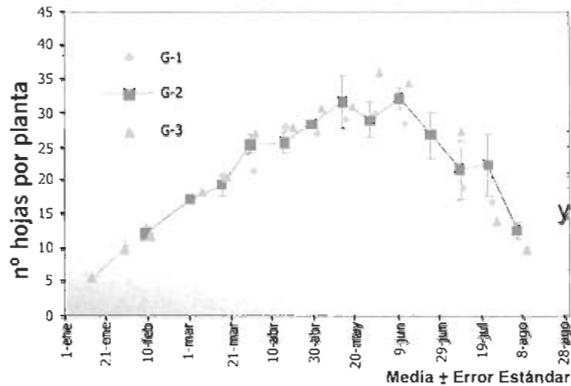


Gráfico 15. Evolución de la concentración de nitrógeno total en limbos

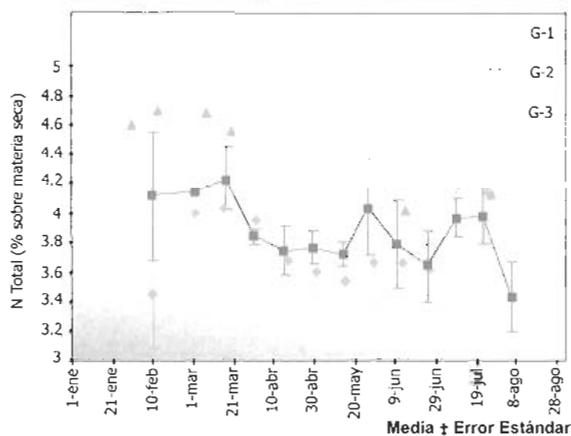
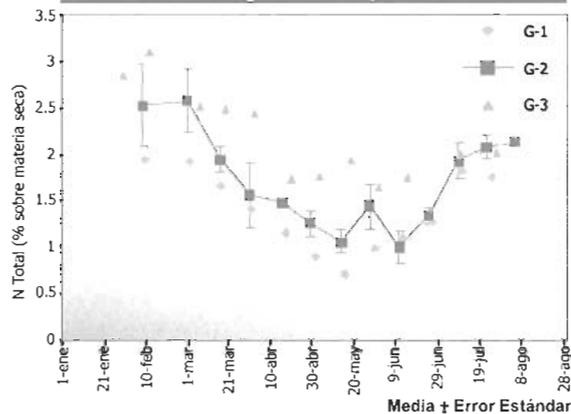
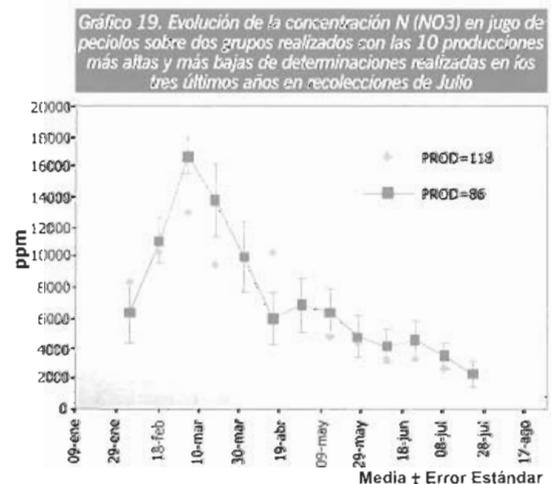
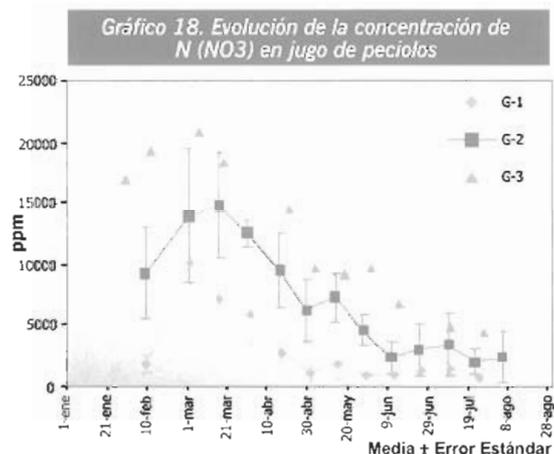
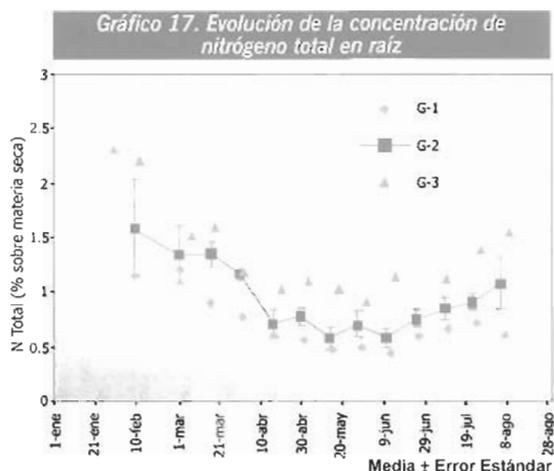


Gráfico 16. Evolución de la concentración de nitrógeno total en peciolo



Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal



Diferentes autores (Analogides, 1988, Draycott, 1993; Draycott and Christenson, 2003, etc.) describen la posible utilidad de la concentración de N(NO₃) en peciolo como herramienta para un buen manejo del nitrógeno en el cultivo de la remolacha azucarera. Ahora bien, esta utilidad se ve mermada por la dificultad de definir la relación entre el N(NO₃) en peciolo y los parámetros de producción y calidad obtenidos en recolección. Para intentar dar algo de luz a esta relación hemos tomado todas las determinaciones evolutivas realizadas en AIMCRA en los 3 últimos años y las hemos relacionado con los resultados finales en recolección de Julio. Para ello se han tomado estas determinaciones (36 en total), se han ordenado en orden decreciente según el parámetro a estudiar, y se han tomado dos grupos de 10 con medias quincenales. Estos dos grupos están compuestos por los 10 resultados más bajos y por los 10 resultados más altos. Los parámetros a estudiar han sido: Producción, Polarización, IEA (Índice Económico del Agricultor) y VTIR (Valor Tecnológico e Industrial de la Remolacha).

Los resultados se muestran en los gráficos 19, 20, 21 y 22. Como se observa no existe una clara diferencia entre las mayores y las menores producciones respecto a la evolución del N(NO₃), especialmente en las últimas fases del desarrollo. Esto puede ser debido a que en los dos casos las producciones son bastante altas (86 y 118 t/ha), por lo que faltarían

tratamientos con bajas producciones para observar diferencias respecto a este parámetro. Si observamos la evolución del N(NO3) respecto a los grupos formados por las más altas y más bajas polarizaciones, podemos ver que hasta Marzo no existen diferencias entre estos dos grupos. A partir de aquí los tratamientos con mejor polarización (17.3) evolucionan de forma inferior a los de menor polarización (13.5). Observamos que los tratamientos con polarización más alta poseen valores inferiores a 4000 ppm a partir de mediados de Abril y alrededor de 2000 ppm desde finales de Mayo. El grupo con menor polarización no baja de 4000 ppm de N(NO3). El IEA muestra diferencias significativas desde Marzo, presentando los menores contenidos en N(NO3) el grupo de mayor IEA final (108 respecto a 77 del otro grupo). Los mejores resultados se han obtenido con valores inferiores a 2000 ppm a partir de Junio. La mayor diferencia entre las evoluciones se muestran cuando los tratamientos son agrupados respecto al VTIR. En este caso las diferencias se marcan desde el comienzo de los análisis, siendo muy superiores en el caso de los tratamientos cuya media final es de 75 frente a los tratamientos cuya media es de 87. Se puede observar como el mejor VTIR se ha conseguido con valores cercanos o inferiores a 2000 ppm desde mediados de Abril.

Lo anteriormente expuesto nos permite decir que para obtener mejores polarizaciones, IEA y VTIR, la concentración de N(NO3) en materia seca sobre jugo de peciolo debe estar alrededor o ser inferior a 2000 ppm de N(NO3) al menos 3 semanas antes de recolección, estando con valores de 4000 ppm o inferiores al menos 5 semanas antes de dicha recolección.

Gráfico 20. Evolución de la concentración N (NO3) en jugo de peciolo sobre dos grupos realizados con las 10 polarizaciones más altas y más bajas de determinaciones realizadas en los tres últimos años en recolecciones de Julio

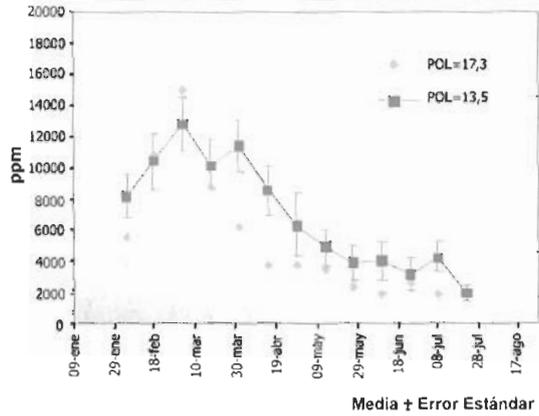
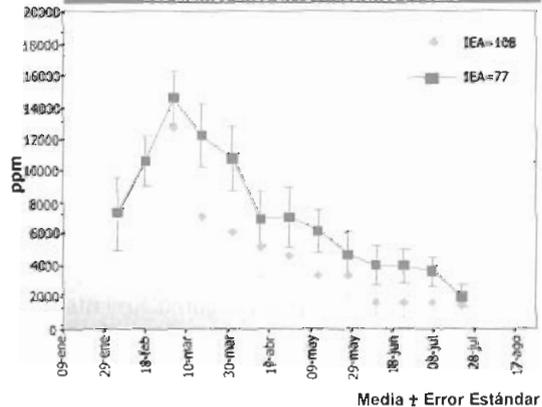


Gráfico 21. Evolución de la concentración N (NO3) en jugo de peciolo sobre dos grupos realizados con los 10 valores de IEA más altos y más bajos de determinaciones realizadas en los tres últimos años en recolecciones de Julio



Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Gráfico 22. Evolución de la concentración N (NO₃) en jugo de peciolo sobre dos grupos realizados con los 10 valores de VTIR más altos y más bajos de determinaciones realizadas en los tres últimos años en recolecciones de Julio

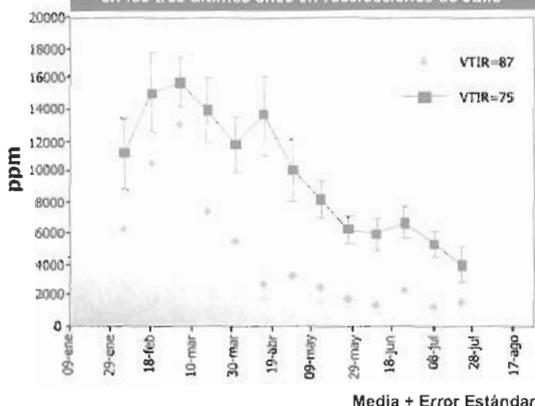
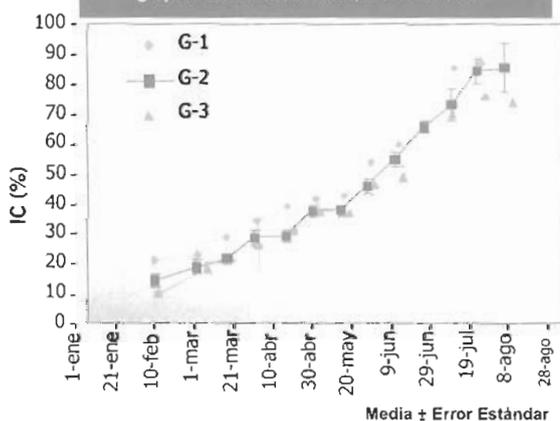


Gráfico 23. Evolución del Índice de Cosecha de los tres grupos realizados. Media ± Error Estándar



DESARROLLO DE LA RAÍZ

El desarrollo de la raíz suele estar ligado al desarrollo foliar, especialmente durante la fase de desarrollo vegetativo. Ahora bien, esta relación varía con dependencia de la cantidad de nitrógeno disponible para el cultivo. En el gráfico 23 se muestra la evolución del Índice de Cosecha (IC) de los diferentes grupos realizados. El IC viene definido como la relación porcentual entre el elemento cosechable (en nuestro caso la raíz) y el total de biomasa producida. Como se observa durante casi todo el ciclo estudiado el IC del grupo 1 es superior al resto, igualándose al final con el grupo 2. Los grupos 2 y 3 mantienen similar IC durante el periodo vegetativo (hasta Mayo), mostrando mayor crecimiento el grupo 2 desde esta fecha. Al final del periodo, el IC de los 3 grupos muestra una tendencia a la estabilización, con valores diferentes según el grupo, 74% para G-3 y alrededor de 85% para los otros dos grupos.

Esta diferencia entre los grupos es posiblemente debida a que una mayor disponibilidad de nitrógeno promueve un mantenimiento del desarrollo vegetativo con un mayor desarrollo foliar y un mayor reparto de asimilados hacia la parte aérea (Scott, R.K. y Jaggard, K.W. 1993; Gastal, F. y Lemaire, G., 1997).

Aunque el balance entre parte aérea y raíz sea menor debido a una mayor disponibilidad de nitrógeno por parte del cultivo, el nitrógeno promueve el crecimiento general de la planta, y es por esto por lo que la producción de raíz (gráfico 24) del G-3 es superior durante casi todo el ciclo, la producción del G-1 es inferior y la de G-2 posea valores intermedios. El grupo 1 presenta su máximo de producción a partir de principios de Junio, no aumentando sustancialmente dicha producción a partir de aquí. El grupo 3 presenta este máximo e incluso decremента desde finales de Junio, mientras que el grupo 2 mantiene un crecimiento continuado hasta el final del ciclo estudiado.

Los resultados obtenidos en recolección corresponden a lo observado en la evolución, con mayores producciones de G-3 en Junio (aunque sin diferencia significativa) y con mayores producciones de G-2 en Julio (esta vez con diferencia significativa frente a G-1).

Durante la fase vegetativa, la polarización (gráfico 25) evoluciona de forma inversa a la disponibilidad de nitrógeno, de tal forma que las mayores polarizaciones las presenta G-1 y las menores las presenta G-3. Ya en Junio, las polarizaciones de G-1 y G-2 se hacen similares, siendo inferiores las de G-3. Esto mismo ocurre en las recolecciones de Junio y Julio donde el grupo 3 posee algo más de 1° Pol (% de sacarosa sobre peso fresco de la raíz) de diferencia.

Gráfico 24. Evolución de la producción de raíz a lo largo del ciclo de los tres grupos realizados y resultados de recolección de Junio y Julio. Media \pm Error Estándar

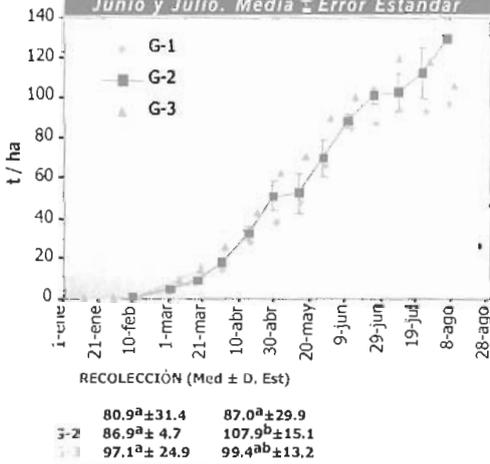


Gráfico 25. Evolución de la polarización a lo largo del ciclo de los tres grupos realizados y resultados de recolección de Junio y Julio. Media \pm Error Estándar

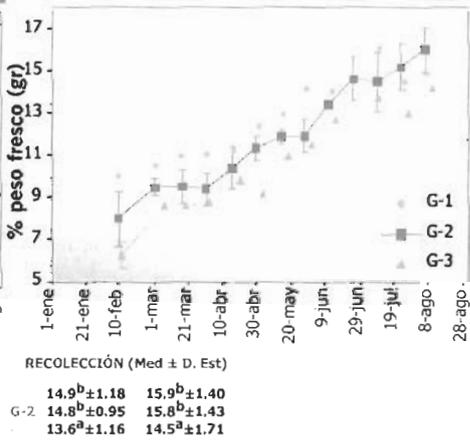


Gráfico 26. Evolución de la concentración de nitrógeno α -amino a lo largo del ciclo de los tres grupos realizados y resultados de recolección de Junio y Julio. Media \pm Error Estándar

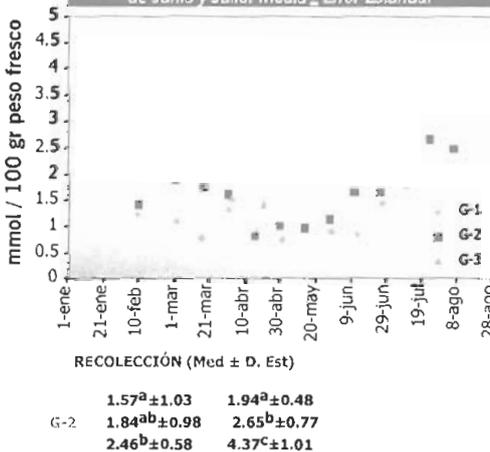
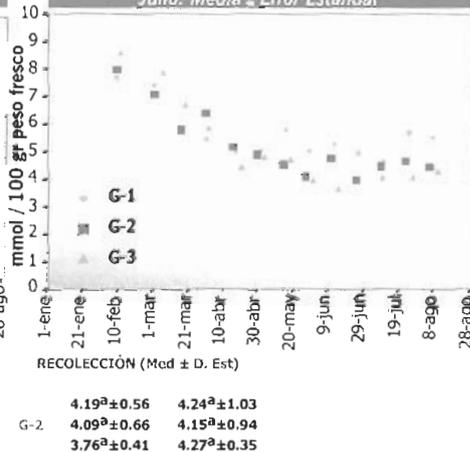
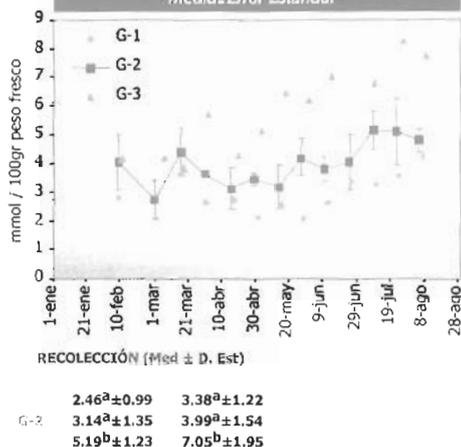


Gráfico 27. Evolución de la concentración de potasio a lo largo del ciclo de los tres grupos realizados y resultados de recolección de Junio y Julio. Media \pm Error Estándar



Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Gráfico 28. Evolución de la concentración de sodio a lo largo del ciclo de los tres grupos realizados y resultados de recolección de Junio y Julio. Mediat. Error Estándar



Uno de los elementos que más es afectado por la nutrición nitrogenada en la composición de la raíz es el nitrógeno α -amino (gráfico 26). Como se observa en el gráfico 26 existe una clara diferencia entre los 3 tratamientos, tanto al comienzo del estudio (donde G-3 y G-2 son superiores a G-1), como al final, donde G-3 evoluciona con valores muy superiores al resto, y G-2 y G-1 muestran clara diferencia entre sí. Los resultados en recolección vuelven a confirmar este comportamiento, con clara diferencia significativa entre los grupos.

Respecto al potasio (gráfico 27), parece existir cierta diferencia durante las primeras fases de desarrollo del G-3

que presenta valores superiores. A partir de Mayo, existe una tendencia inversa a la cantidad máxima de nitrógeno encontrada en el cultivo, con valores superiores en G-1 e inferiores en G-3. En recolección no existen diferencias significativas entre tratamientos, pero las medias parecen mostrar esta tendencia, especialmente en la recolección de Junio.

El sodio (gráfico 28) muestra un comportamiento similar al nitrógeno α -amino, es decir presenta mayor valor a mayor disponibilidad de nitrógeno por parte de la planta. En recolección, y a diferencia del nitrógeno α -amino, no existen diferencias significativas entre los grupos 1 y 2, aunque las medias si muestran esa tendencia.

La evolución de los azúcares reductores (gráfico 29) del grupo 1 y 2 es similar a lo largo de todo el ciclo estudiado, mientras que el G-3 muestra valores superiores desde Mayo hasta Julio. En recolección, las medias muestran esta tendencia aunque sin diferencias significativas.

Los parámetros de raíz anteriormente estudiados (Producción, polarización y elementos melacígenos: nitrógeno α -amino, potasio, sodio y azúcares reductores) representan aquellos parámetros con significación económica, tanto para el agricultor como para la industria azucarera. Estos parámetros económicos se pueden reunir en dos: IEA y VTIR. Los resultados de estos dos parámetros se muestran en la Tabla 3.

Los mejores resultados económicos para el agricultor los presenta el grupo 2 tanto en la recolección de Junio como en la realizada en Julio, mostrando diferencia significativa con G-3 en Junio y con los dos grupos en Julio. Aunque los valores de IEA de los grupos 1 y 3 son inferiores al de G-2, el motivo es posiblemente diferente. En el caso del grupo 1 parece haber existido una cierta carencia de nitrógeno lo que no le permitió un desarrollo vegetativo óptimo, y por lo que ha visto mermada

Tabla 3

	IEA		VTIR	
	JUNIO	JULIO	JUNIO	JULIO
G-1	66.6 ^b ±27.6	78.1 ^a ±30.8	84.7 ^b ±3.1	81.4 ^b ±3.6
G-2	74.0 ^b ±19.6	96.0 ^b ±24.4	83.2 ^b ±4.2	79.9 ^b ±4.0
G-3	46.9 ^a ±19.2	68.4 ^a ±24.0	79.5 ^a ±3.7	71.9 ^a ±6.6

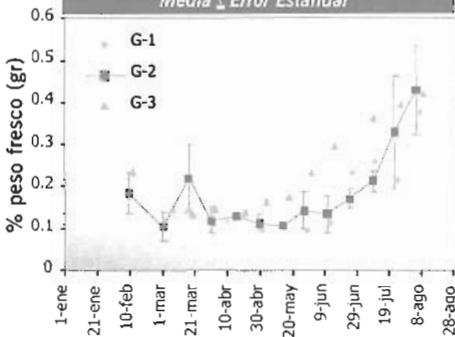
TEST LSD con P<0,05. Diferentes letras representan diferencias significativas.

su producción de raíz. En el caso del grupo 3 es el exceso de nitrógeno lo que ha mantenido demasiado tiempo este desarrollo vegetativo, no permitiendo la acumulación de sacarosa en la raíz.

La calidad industrial (VTIR) se ve claramente afectada por un exceso de nitrógeno disponible (G-3) debido sobre todo a la acumulación de nitrógeno α -amino y sodio y a la menor polarización presentada.

En el gráfico 30 se puede observar la correspondencia entre el VTIR y el nitrógeno incorporado. Inicialmente el valor del VTIR se incrementa debido principalmente al incremento de la polarización. Es por ello que existen grandes diferencias entre los 3 grupos. Los mayores niveles de VTIR se alcanzan con incorporaciones entre 200 y 250 kg N/ha (estando el óptimo en 220 kg N/ha), existiendo una caída de este parámetro a medida que la planta incorpora más nitrógeno.

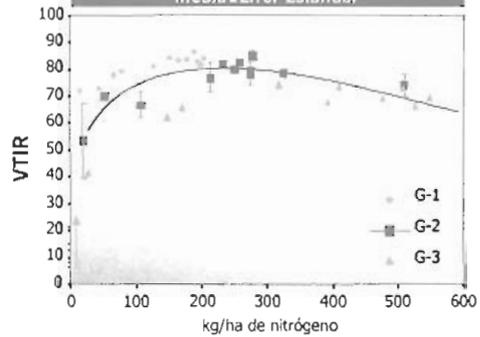
Gráfico 29. Evolución de la concentración de azúcares reductores a lo largo del ciclo de los tres grupos realizados y resultados de recolección de Junio y Julio. Media \pm Error Estándar



RECOLECCIÓN (Med \pm D. Est)

G-1 0.18^a±0.05 0.34^a±0.18
 G-2 0.21^a±0.14 0.37^a±0.15
 G-3 0.21^a±0.05 0.40^a±0.10

Gráfico 30. Relación entre el VTIR y la cantidad de nitrógeno encontrada en el cultivo. Media \pm Error Estándar



CONCLUSIONES

En nuestras condiciones experimentales no existe correspondencia entre el nitrógeno aplicado y el encontrado en el cultivo.

El nitrógeno estimula el desarrollo vegetativo, con mayor producción foliar, mayor tamaño de las hojas, mayor proporción de peciolos y menor índice de cosecha.

Una aplicación inadecuada de nitrógeno (tanto por exceso como por defecto) reduce los parámetros económicos tanto por la reducción de IEA como por la reducción de la capacidad de extracción de la sacarosa (este último caso se produce por una aplicación excesiva).

BIBLIOGRAFÍA

AIMCRA (2002). Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2001/02. Siembra otoño 2000, zona sur. AIMCRA. Valladolid

AIMCRA (2003). Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2002/03. Siembra otoño 2001, zona sur. AIMCRA. Valladolid

AIMCRA (2004). Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2003/04. Siembra otoño 2002, zona sur. AIMCRA. Valladolid

Analogides, DA (1988). Time dependent interrelationships of plant nitrogen status and crop performance with reference to sugar beet. D.S. Jenkinson, and K.A. Smith (eds) Nitrogen efficiency in agricultural soils. Elsevier Applied Science. London and New York: 145-157

Armstrong, M.J., Mildord, G.F.J., Pocock, T.O., Last, P.J. y Day, W. (1986). The dynamics of nitrogen uptake and its remobilization during the growth of sugar beet. J. agric. Sci., Camb., 107: 145-154

Draycott, A.P. (1993). Nutrition. D.A. Cooke y R.K. Scott (ed). The sugar beet crop. Science into practice. Chapman & Hall, London, UK

Draycott, A.P. y Christenson, D.R. (2003). Nutrients for sugar production. Soil-Plant Relationships. CAB International. Cambridge, USA.

Gastal, F. y Lemaire, G. (1997). Nitrogen Nutrition and Growth of Cultivated Swards. JF Morot-Gaudry (ed). Nitrogen assimilation by plants. Physiological, biochemical and molecular aspects. Science Publishers, Inc. Plymouth, UK

Lopez Rita, J y Lopez Melida, J (1990). El diagnóstico de suelos y plantas. 4ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Segunda Edición. Harcourt Brace & Company, Publishers. Academic Press. Cambridge. UK

Shock, C.C., Seddigh, M., Saunders, L.D., Stieber, T.D. y Miller, J.G. (2000). Sugar beet nitrogen uptake and performance following heavily fertilized onion. *Agron. J.*, 92: 10-15

Scott, R.K. y Jaggard, K.W.. (1993). Crop physiology and agronomy. D.A. Cooke y R.K. Scott (ed). The sugar beet crop. Science into practice. Chapman & Hall, London, UK

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



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 (NH_4^+), sales de nitrato (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 (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 peciolo, 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 peciolos, que se congelaron inmediatamente en N₂ 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 μmol de fotones/ 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 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 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 μM (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 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 μmol fotones/ 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: $\text{CHR}(\%) = [(\text{PF} - \text{PS})/(\text{PT} - \text{PS})] \times 100$

- **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 (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 los 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 (Beever 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 (µg/g PS; ppm)		Actividad NR foliar (µmol NO ₂ -/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 N₂ 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 ($\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g PS h}$)
Abonado nitrogenado		
DR	13	5
DR + 300	740	10
Siembra temprana		
Regadío	32	9
Secano	1300	25
Siembra tardía		
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 a portados 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

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 α -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 α -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 α -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 peciolo ($\mu\text{g/g PS}$; ppm)	Actividad NR foliar ($\mu\text{mol NO}_2\text{-g PS h}$)	Nitrógeno α -amino en raíz (meq/100g PS)
Abonado nitrogenado			
DR	1634	2,35	2,3
DR + 300	9780	3,50	3,0
Variedad Ramona			
Regadío	520	0,28	1,8
Secano	1628	7,74	3,3
Variedad Claudia			
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 periodo. Los datos de contenido en nitrógeno α -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

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 α -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 α -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 α -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 α -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 α -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

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 α -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 ($\mu\text{mol NO}_2\text{-}^-\text{/g PS h}$)	Prolina en hojas ($\mu\text{mol/g PF}$)	Nitrógeno α -amino en raíz ($\text{meq}/100\text{g PS}$)
Abonado nitrogenado			
DR	10	1,25	2,30
DR + 300	11	1,80	4,80
Variedad Ramona			
Regado	10	1,13	2,20
Secano	25	2,60	4,50
Variedad Claudia			
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 α -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%.

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 CO₂ 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 CO₂ 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

Kaiser W, Foster J (1989) Low CO₂ 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

La **F**osfoenolpiruvato **C**arboxilasa
en relación con la **N**utrición
Nitrogenada y con el
Estrés **H**ídrico



LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN RELACIÓN CON LA NUTRICIÓN NITROGENADA Y CON EL ESTRÉS HÍDRICO

Rosario Álvarez, Arancha León y Cristina Echevarría

Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla, Avenida de la Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, España.

INTRODUCCIÓN

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31) es un enzima citosólico ampliamente distribuido en plantas, algas verdes y microorganismos pero ausente en levaduras y animales (Chollet et al., 1996). Cataliza la β -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de HCO_3^- y de un catión divalente, generalmente Mg^{2+} , para producir oxalacetato (OAA) y Pi (Chollet et al., 1996). El OAA producido es rápidamente transformado a malato por la malato deshidrogenasa (MDH), siendo éste el primer producto estable de la reacción. El malato producido puede ser utilizado como fuente de carbono y poder reductor en múltiples contextos fisiológicos de la planta.

La PEPC ha sido muy estudiada en plantas C_4 y CAM en las que juega un papel esencial en el metabolismo fotosintético del carbono. En órganos no fotosintéticos, como la raíz, la PEPC tiene una función anaplerótica mediante la que repone oxalacetato (OAA) para el ciclo de Krebs en condiciones en que la demanda de esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos es alta (Huppe y Turpin, 1994). Estos aminoácidos estarían destinados a la síntesis proteica, o a su utilización como osmolitos (prolina, glicina-betaína) en respuesta a situaciones de estrés.

La PEPC está regulada por un mecanismo de fosforilación reversible, tanto en plantas C_3 como C_4 y CAM (Echevarría y Vidal, 2003). Cuando la PEPC está fosforilada es menos sensible al L-malato (su efector negativo), responde mejor a glucosa 6-P, y es más eficaz a pH subóptimo pero fisiológico de 7,1 y 7,3 (Echevarría et al., 1994, Echevarría y Vidal, 2003). *In vitro*, las diferencias entre una PEPC fosforilada y una PEPC defosforilada sólo se detectan a pH subóptimo de 7,3. Si se determina la actividad *in vitro* del enzima a pH 8 (pH óptimo) las diferencias del estado de fosforilación de la PEPC no se detectan.

Para determinar el grado de fosforilación *in vivo* de la PEPC se utiliza el test del malato, que mide la sensibilidad del enzima al L-malato (IC_{50}) en condiciones subóptimas de pH 7,3 y PEP 2,5 mM. En estas condiciones de ensayo, el enzima fosforilado presenta una IC_{50} para el L-malato de 2 a 3 veces mayor que el enzima defosforilado (Jiao y Chollet, 1991). La PEPC puede, por tanto, aumentar su actividad por dos mecanismos:

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

1) aumentando la cantidad de enzima, que se evalúa a pH óptimo de 8, y/o 2) aumentando el estado de fosforilación del enzima, que se evalúa determinando la sensibilidad del enzima al L-malato (IC_{50}). Una IC_{50} alta representa un enzima fosforilado y más activo en presencia de su efector negativo el L-malato.

Existen datos experimentales que muestran que la presencia de una alta concentración de nitrato aumenta el flujo de carbono hacia la PEPC para suministrar esqueletos carbonados al ciclo de Krebs (Vidal et al., 2002). En general, la actividad de la PEPC repercute en el balance C/N de la planta. Cuando la síntesis de aminoácidos y proteínas es intensa, en periodos de desarrollo de la planta muy activos, la PEPC suministra esqueletos carbonados extras, es decir que no provienen de la fotosíntesis, recapturando el CO_2 respirado. Estos esqueletos de carbono son utilizados tanto en la respiración como en la síntesis de proteínas. Esta es la llamada función anaplerótica de la PEPC que juega un papel importante tanto en hojas como en órganos sumergidos como las raíces.

La conexión de la PEPC con el metabolismo del nitrógeno ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios. Así, el suministro de nitrato a hojas de trigo iluminadas deficientes en nitrógeno, aumenta significativamente la actividad PEPC-quinasa (enzima responsable de la fosforilación) y el estado de fosforilación de la PEPC, produciendo la activación del enzima y la disminución de la sensibilidad a su efector negativo, el L-malato (Vidal et al., 2002).

En este capítulo se presentan los resultados de los perfiles de actividad PEPC a la largo del cultivo de la remolacha y su grado de fosforilación *in vivo*, en distintos ensayos de campo y laboratorio, con el objeto de establecer cuál es su contribución al desarrollo de la planta, así como, la posible implicación de este enzima en la nutrición nitrogenada y las respuestas a condiciones de estrés hídrico de las raíces de remolacha de siembra otoñal.

MATERIALES Y MÉTODOS

· Cultivo de plantas en condiciones controladas de laboratorio

La germinación de las semillas (variedad Claudia), se llevó a cabo durante dos semanas, a 25°C y en macetas con vermiculita suplementadas con agua. Una vez germinadas, las plantas se traspasaron a cultivos hidropónicos que contenían el medio nutritivo de Hewitt (Hewitt, 1966) suplementado con 1mM (nitrato limitante) o con 15 mM (nitrato a demanda) de NO_3Ca y se mantuvieron en las siguientes condiciones: fotoperiodo de 12 h de luz; intensidad luminosa de 350-400 $\mu Em^{-2}s^{-1}$; 60-70 % de humedad relativa y una temperatura de 25°C. La solución nutritiva se cambió cada 7 días.

Para las medidas se utilizaron 3 tejidos diferentes: 1) raíces secundarias, 2) 3 cm desde el ápice de la raíz principal, y 3) el resto de la raíz principal.

• Extracción de la PEPC

Para extraer el enzima, 0,5 g de muestra de raíz se homogeneizaron en un mortero a 4°C con 1 ml de tampón de extracción que contenía Tris-HCl 100 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 20% (v/v), 2-mercaptoetanol 14 mM, PMSF, 1 mM y KF 10 mM. El extracto obtenido se centrifugó a 13.000 r.p.m. a 4°C y el sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad PEPC. La determinación de proteínas solubles en los extractos crudos se realizó según el método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

• Determinación de la actividad y estado de fosforilación *in vivo* de la PEPC

La determinación de la actividad PEPC en condiciones óptimas se realizó espectrofotométricamente utilizando un ensayo acoplado a la malato deshidrogenasa (MDH) en el que se registra la oxidación del NADH a 340 nm (Echevarría et al., 1994). Una unidad enzimática corresponde a la cantidad de PEPC que cataliza la carboxilación de 1 μ mol de fosfoenolpiruvato (PEP) por minuto en las condiciones óptimas de ensayo (pH 8).

Para determinar el estado aparente de fosforilación *in vivo* de la PEPC de raíz hemos utilizado el test del malato, basado en el cálculo de la sensibilidad del enzima (IC_{50}) a su inhibidor el L-malato. La IC_{50} se define como la concentración de inhibidor requerida para inhibir al 50% la actividad del enzima. Para ello se determinó la actividad PEPC en condiciones subóptimas de pH (7,3) y en presencia de diferentes concentraciones de L-malato. Unos valores altos de IC_{50} indican que el enzima se encuentra fosforilado (PEPC más activa) mostrando menos sensibilidad al L-malato. Unos valores bajos de IC_{50} indican que el enzima se encuentra desfosforilado (PEPC menos activa) y por lo tanto muestra más sensibilidad a su inhibidor (Jiao y Chollet, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

• Campaña 1999-2000

Ensayos con plantas cultivadas en condiciones controladas de laboratorio

En la primera campaña (1999/2000), se determinó la actividad PEPC y el grado de fosforilación en tres tejidos diferentes de la raíz de plantas de remolacha. Las plantas fueron cultivadas en condiciones controladas, en cámara de cultivo, y con dos concentraciones de nitrato (NO₃Ca) en el medio de riego, 1 mM (nitrato limitante) y 15 mM (nitrato a demanda). En la Fig. 1 se muestra el desarrollo de la raíz y de las hojas de plantas de 30 y 75 días de tratamiento. A los 30 días de desarrollo el tratamiento con alto nitrato se manifiesta, fundamentalmente, en un espectacular aumento del porte vegetativo de la planta, mientras que el efecto en la raíz fue menos pronunciado (Fig. 1, 30 días). Sin embargo, a los 75 días de tratamiento, el efecto de alto nitrato se manifiesta claramente en la raíz, produciendo raíces el doble de grandes (Fig. 1, 75 días).

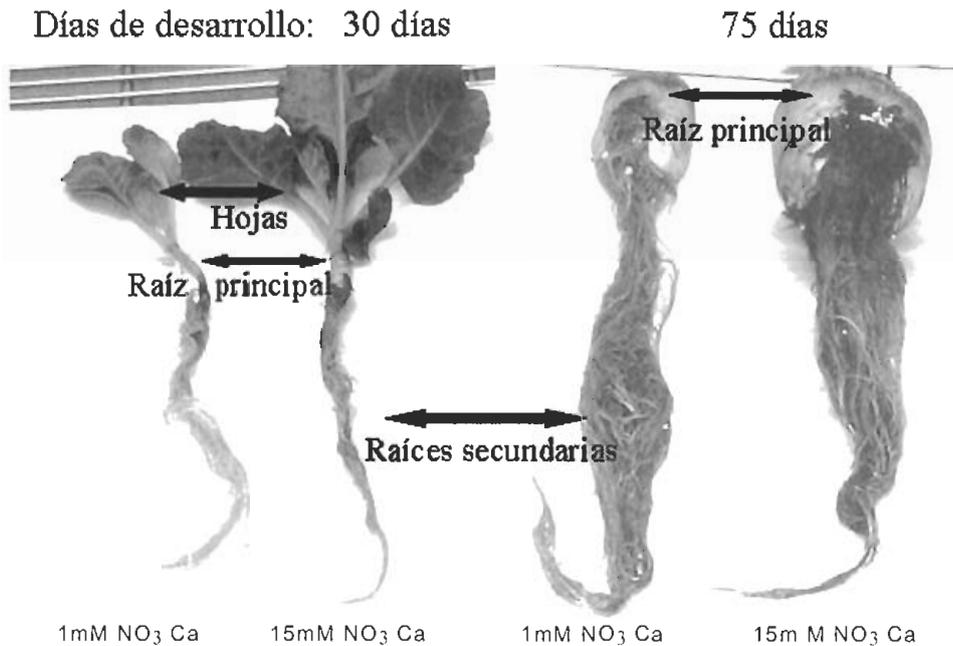


Figura 1. Desarrollo de la raíz y hojas de plantas de remolacha cultivadas en condiciones controladas de laboratorio con distintas concentraciones de nitrato.

En la Fig. 2 se muestra la actividad específica de la PEPC ($\text{U mg}^{-1} \text{ prot.}$). Las determinaciones se hicieron en tres partes diferenciadas de la raíz. En las raíces secundarias, en el ápice de la raíz principal (que llamaremos ápice) y en el resto de la raíz principal (que llamaremos también raíz acumuladora). En raíces secundarias los valores son, en general, más altos (0,07 a 0,1 $\text{U mg}^{-1} \text{ prot.}$) que en los otros dos tejidos (Fig. 2a), con ligeras variaciones dependiendo del aporte de nitrato, y se mantienen estables durante el desarrollo. En el ápice, la actividad PEPC específica muestra valores de 0,03 y 0,06 $\text{U mg}^{-1} \text{ prot.}$, manteniéndose también estable con la edad del cultivo (Fig. 2b). En la raíz principal, la actividad aumenta con el desarrollo, alcanzando valores de 0,09 $\text{U mg}^{-1} \text{ prot.}$, próximo a los de las raíces secundarias, a los 75 días. En este tejido, a partir de los 45 días, las actividades son entre un 30 y un 50 % más altas en plantas cultivadas con alto nitrato (Fig. 2c).

Para conocer el estado de fosforilación en los diferentes tejidos se determinó la IC_{50} para el L-malato (ver materiales y métodos). Los perfiles observados en los diferentes tejidos fueron muy diferentes. En las raíces secundarias, los niveles de fosforilación son bajos y se mantienen bajos durante el desarrollo (Fig. 2d). Estos bajos valores de fosforilación se ven compensados por la abundancia del enzima en este mismo tejido, tal como se muestra en la Fig. 2a. Es decir, menos fosforilado (Fig. 2d), menos activo, pero muy abundante, casi el doble, que en el ápice y en la raíz principal (Fig. 2a, b y c).

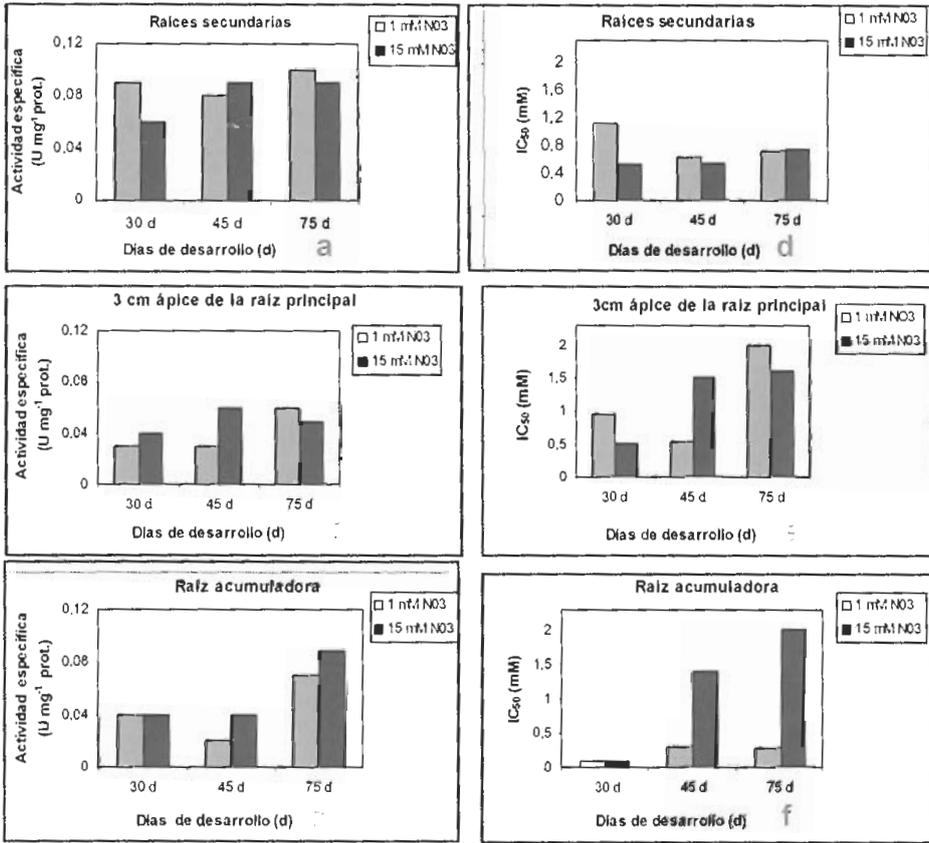


Figura 2. Actividad PEPC específica (U mg⁻¹ prot.) y sensibilidad al malato (IC₅₀ (mM) en relación con el abonado y edad del cultivo en plantas cultivadas en condiciones controladas de laboratorio.

En el ápice, la IC₅₀ va aumentando con el desarrollo, con altos valores de fosforilación de la PEPC a los 75 días, alcanzándose valores de IC₅₀ de 1,6 a 2 mM (Fig. 2e). En este tejido el efecto del nitrato no muestra una tendencia clara (Fig. 2e). Por el contrario, en la raíz acumuladora, en plantas cultivadas con nitrato limitante, la PEPC se mantiene desfosforilada en los tres estadios de desarrollo estudiados (Fig. 2f); sin embargo, en plantas cultivadas sin limitación de nitrato se produce un espectacular aumento de la fosforilación de la PEPC a lo largo del desarrollo de la raíz (Fig. 2f). Esta enorme diferencia en el estado de fosforilación de la PEPC de la raíz acumuladora en plantas crecidas en nitrato a demanda, podría, en conjunción con otros factores, estar en la base de las diferencias en el desarrollo de la raíz mostradas en la Fig. 1.

Estos resultados muestran la importancia de la PEPC en las raíces secundarias desde los primeros estadios de desarrollo, donde podría desempeñar un papel fundamental en la absorción de nutrientes (Vidal et al., 2002). En la raíz acumuladora la fosforilación

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

de la PEPC es fuertemente inducida por nitrato dando raíces dos veces superiores en tamaño y poniendo de manifiesto el papel relevante de este enzima en la utilización del nitrógeno y en el crecimiento de la raíz.

· Campañas 2000/2001 y 2001/2002

Estudio de los ensayos de campo

Evolución de la actividad PEPC de la raíz y estado de fosforilación del enzima en los ensayos de abonado (variedad Claudia).

En la Fig. 3 se representan los valores de actividad específica de la PEPC ($U\ mg^{-1}\ prot.$) para las muestras de campo abonadas con una dosis de nitrógeno recomendada y una dosis de nitrógeno en exceso (recomendada + 300) tanto de la campaña 2000/2001 como de la 2001/2002. En esta última campaña se incluyó, además, un ensayo sin abonado nitrogenado. Estas campañas corresponden a la 2ª y 3ª campañas estudiadas. Se observa que los valores de actividad PEPC son muy parecidos en los dos tratamientos de la 2ª campaña, oscilando entre 0,05 y 0,1 $U\ mg^{-1}\ prot.$ La actividad es muy baja en los meses de invierno. A la salida del invierno la actividad aumenta hasta el mes de Mayo y luego disminuye con la edad del cultivo hasta el mes de Agosto. Los máximos de actividad se registran en los meses de Abril y Mayo, coincidiendo con el periodo de máximo desarrollo vegetativo (Fig. 3, gráfico 1).

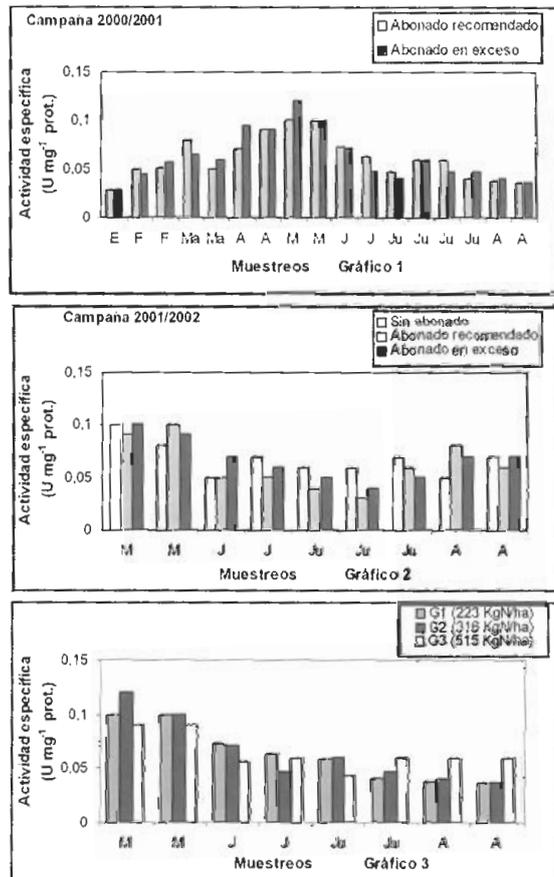


Figura 3. Actividad PEPC específica ($U\ mg^{-1}\ prot.$) en relación con el abonado nitrogenado en muestras de campo.

En la campaña 2001/2002 las muestras se tomaron a partir de Mayo (Fig. 3, gráfico 2). Se observa que el pico máximo de actividad específica de la PEPC también se produce en Mayo, coincidiendo estos resultados con los de la campaña anterior. La actividad descendió desde valores altos de Mayo ($0,1 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$) hasta los mínimos del 15 de Julio ($0,03 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$). De entre estos datos cabe destacar que a finales de Julio y en el mes de Agosto se produjo un incremento de la actividad PEPC específica manteniéndose los valores de PEPC en torno a $0,06\text{-}0,07 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ Al igual que en la campaña anterior no se detectaron diferencias entre los distintos tratamientos con nitrato. En ambas campañas los valores de actividad obtenidos en Abril y Mayo son muy parecidos, indicando que el papel fisiológico del enzima en este período es relativamente independiente de las condiciones ambientales y está más ligado al estadio de desarrollo de la planta. Sin embargo, durante los meses estivales la actividad PEPC fue más alta (un 60%) en la 3ª campaña (Fig. 3, gráficos 1 y 2).

Según lo referido en este libro (Martínez et al.), existe una discrepancia entre el nitrógeno aportado y el nitrógeno incorporado por la planta. Esto contribuye a que no encontremos diferencias entre los diferentes tratamientos de nitrato (Fig. 3.) Para evitar este problema, se midió la cantidad de nitrato máximo en planta en kg N ha^{-1} (medidas realizadas por AIMCRA) en las campañas estudiadas, y se establecieron tres grupos de nitrógeno: **G1**, 223 kg ha^{-1} ; **G2**, 316 kg ha^{-1} ; **G3**, 515 kg ha^{-1} (Tabla 1, Martínez et al., en este libro) que reflejan únicamente la disponibilidad de nitrógeno que tuvo la planta en base a los valores máximos de nitrógeno incorporado de Mayo a Junio. Al agrupar los resultados según este criterio, se observa que los valores más altos de actividad específica de la PEPC se producen en Mayo, coincidiendo con un período de crecimiento activo de la raíz y con la máxima producción foliar (gráfico 5, Martínez et al., en este libro), sin embargo existen muy pocas diferencias entre los diferentes grupos de nitrógeno. Por el contrario, durante el período estival, sí se establecen diferencias entre los diferentes tratamientos con valores de actividad un 50% superior en el G3. (Fig. 3, gráfico 3).

En la Fig. 4, en los gráficos 4 y 5, se representan los valores de IC_{50} para el inhibidor L-malato de los distintos ensayos de abonado. En la campaña 2000/2001 (Fig. 4, gráfico 4) se destacan los bajos niveles de fosforilación del enzima durante los meses de invierno. La fosforilación aumenta a la salida del invierno sin que haya una tendencia clara entre los tratamientos, sin embargo en Mayo y Junio la PEPC está más fosforilada en el abonado en exceso (Fig. 4, gráfico 4); posteriormente, los valores fluctúan sin una tendencia clara. En general, aunque los perfiles son muy heterogéneos en las dos campañas, la PEPC de las muestras abonadas con una dosis de nitrógeno en exceso está más fosforilada (valores de IC_{50} hasta $2,5 \text{ mM}$), que las muestras abonadas con una dosis recomendada o sin abonado (valores de IC_{50} entre $0,5$ y 1 mM) (Fig.4, gráficos 4 y 5).

Cuando se representan los valores de IC_{50} por grupos de nitrógeno se observa que durante los meses de máximo crecimiento de la planta (Mayo y principios de Junio), la PEPC está mucho más fosforilada (valores de IC_{50} entre $1,5$ y 2 mM) en los grupos con más nitrógeno (G2 y G3) (Fig. 4, gráfico 6), mientras que en el G1 los valores son bajos y permanecen bajos con la única excepción de una subida en Agosto.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Durante los meses estivales la IC_{50} descendió en todos los grupos excepto en el G1 en el mes de Agosto.

Estos resultados indican que el nitrógeno aumenta la actividad de la PEPC aumentando su nivel de fosforilación (tenemos la misma cantidad de enzima pero más activa) durante el período de máximo crecimiento de la raíz (Mayo y Junio). Estos resultados están en consonancia con los descritos en la literatura en donde se muestra que la adición de nitrógeno a plantas de tabaco crecidas en hambre de nitrógeno promueve la activación de la PEPC aumentando el grado de fosforilación del enzima (Vidal et al., 2002). Los resultados mencionados fueron obtenidos en hojas, sin que por el momento se hayan descrito datos respecto a la interacción del nitrógeno y la fosforilación de la PEPC en raíces, excepto los presentados en este trabajo.

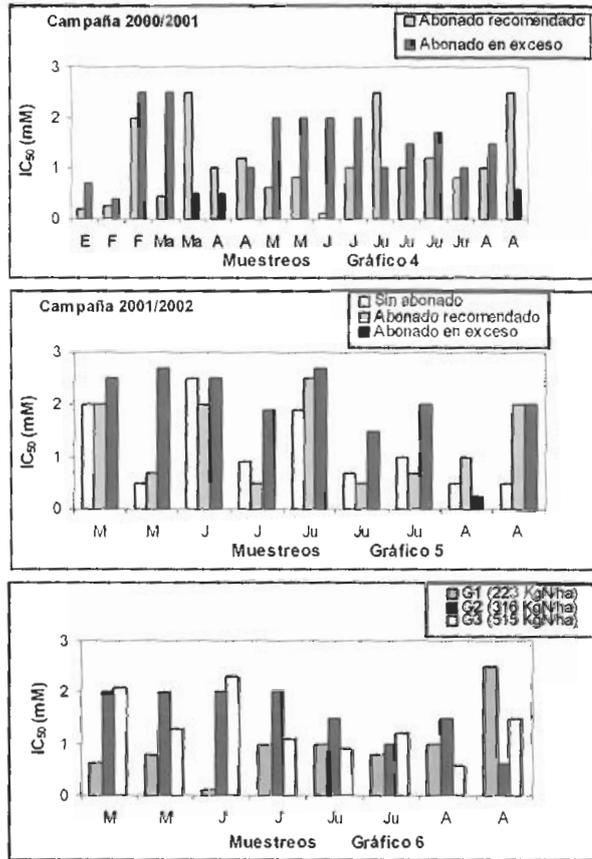


Figura 4. Sensibilidad al málico (IC_{50} (mM)) en relación con el abonado nitrogenado en muestras de campo.

Finalmente, como la actividad *in vivo* de la PEPC va a depender de la cantidad de enzima (actividad determinada a pH 8) y de su grado de fosforilación (IC_{50}) hemos definido un índice que refleje, basado únicamente en la combinación de estos dos parámetros, la eficacia del enzima *in vivo*. Para ello hemos multiplicado los valores de abundancia del enzima (actividad a pH 8), por su grado de fosforilación (IC_{50}) y le hemos llamado "Índice de actividad *in vivo*" (IA). Los valores de IA se reflejan en la Fig. 5, y muestran que el índice de actividad es máximo durante los meses de Mayo y Junio coincidiendo con un periodo de máximo desarrollo de la planta. Durante este periodo,

en los grupos de nitrógeno el óptimo de actividad PEPC se obtiene en el G2 (316 kg ha⁻¹). Valores inferiores o superiores inciden negativamente en el IA de la enzima. Además, con valores inferiores a 300 kg ha⁻¹ el IA de la PEPC permanece muy bajo pudiendo repercutir negativamente en el desarrollo de la raíz. En efecto, la producción de raíz de las plantas de G1 fue del orden de un 33% inferior a la de los otros grupos (gráfico 24 de Martínez et al., en este libro). También se observa que los máximos de IA de la PEPC coinciden con el máximo desarrollo foliar (gráfico 5 de Martínez et al., en este libro) y por tanto con el periodo de mayor aporte de sacarosa procedente de las hojas. En este periodo (final de Abril y Mayo), excepto en el G3, se dan los máximos valores de actividad sacarosa sintasa (Fig. 7, Jiménez et al., en este libro).

Todos estos factores analizados en su conjunto dibujan un panorama que indica que un aumento del aporte de sacarosa (máximo de hojas en Mayo) se traduce

en la raíz en un aumento de la actividad de los enzimas que traducen esa sacarosa en materiales de construcción favoreciendo el crecimiento de la raíz. En este momento, y a dosis altas de nitrato, es cuando se estimula la síntesis de proteínas. Es en este punto donde la PEPC cumple una función relevante y fundamental, suministrando esqueletos carbonados extras al ciclo de Krebs cuando la demanda es muy alta, permitiendo así la incorporación del nitrato a aminoácidos y a proteínas y permitiendo el crecimiento de los órganos de la planta. Esta es la llamada "función anaplerótica" de la PEPC. Los resultados indican también que por debajo de 300 kg ha⁻¹, la producción de raíz es menor, coincidiendo con valores bajos de IA para la PEPC durante este periodo de desarrollo.

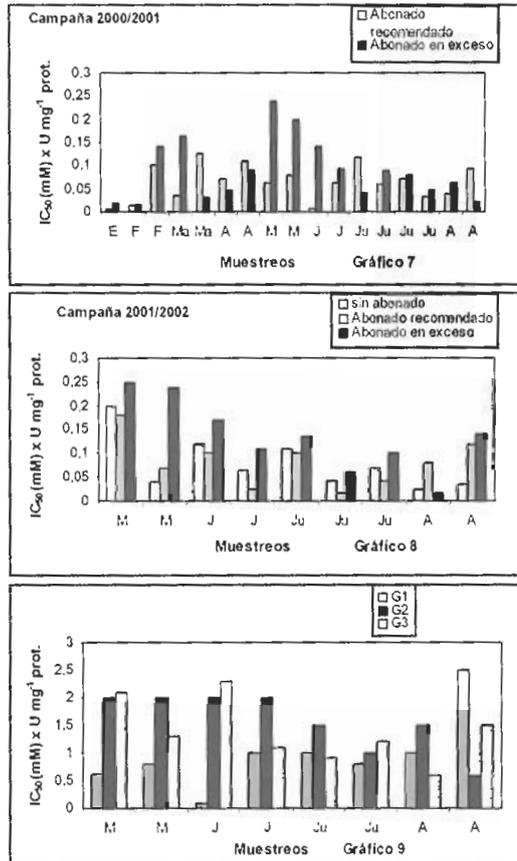


Figura 5. Índice de Actividad in vivo de la PEPC (IC₅₀ (mM) x U mg⁻¹ prot.) en relación con el abonado nitrogenado en muestras de campo.

A partir del mes de Junio, los factores limitantes del desarrollo del cultivo vienen determinados por la edad de la planta y las condiciones de estrés del verano andaluz, y no por la disponibilidad de nitrato, mostrando los cultivos un IA para la PEPC bajo (Fig. 5, gráfico 9) ya que el crecimiento de la raíz se detiene (gráfico 24, Martínez et al., en este libro). En este periodo en que las altas temperaturas disminuyen la fotosíntesis y hay menos aporte de sacarosa de las hojas, el mantenimiento de hojas y raíces, mayores cuanto más nitrato, se hace a costa de la sacarosa acumulada en la raíz, traduciéndose en una bajada de la polarización en cultivos con exceso de nitrato (gráfico 25 de Martínez et al., en este libro).

Adicionalmente, nuestros resultados muestran que a partir de Junio los valores de IA para la PEPC disminuyen, indicando que no hay excesiva competencia por los esqueletos carbonados para la síntesis de proteínas ya que el crecimiento de la raíz está detenido. En efecto, los niveles más bajos de proteínas, en relación al peso fresco, se detectan durante este periodo del cultivo (Jiménez, 2004). En esta situación se acumulan osmolitos como prolina y glicina-betaína que contribuyen a la subida de compuestos α -amino. Por otro lado, la bajada de actividad de la PEPC se corresponde con una subida de la invertasa ácida (Fig. 11, Jiménez et al., en este libro) indicando que durante este periodo los esqueletos carbonados se obtienen mayoritariamente vía invertasa ácida, a partir de la sacarosa acumulada, y sin una intervención fundamental de la PEPC. En efecto, los resultados presentados en este libro muestran que la utilización de DMDP (un inhibidor de la actividad invertasa) disminuye de forma drástica la síntesis de prolina (Monreal et al., Tabla 2). Sin embargo, se necesitan trabajos posteriores para determinar la contribución exacta de la PEPC al crecimiento de la raíz y a la respuesta al estrés; en cualquier caso, nuestros resultados permiten sugerir que en la raíz de remolacha, la PEPC se vislumbra como un enzima fundamental que permite, a través de la regulación de su estado de fosforilación, conectar el crecimiento de la raíz con los periodos de máxima eficacia fotosintética, aporte de sacarosa y disponibilidad de nitrato.

· Evolución de la actividad PEPC y estado de fosforilación en los ensayos de campo de déficit hídrico y riego (variedad Ramona)

El déficit hídrico en el cultivo de la remolacha contribuye a la acumulación de compuestos orgánicos de nitrógeno en la raíz, entre los que se encuentran aminoácidos y derivados como prolina y glicina-betaína, que actúan como osmolitos compatibles en el citoplasma. Estos compuestos, que se sintetizan en la hoja, se transportan a la raíz disminuyendo el potencial hídrico y aumentando su capacidad de absorber agua del suelo.

En este apartado hemos determinado la actividad PEPC y su grado de fosforilación en relación a la disponibilidad de agua de la planta para estudiar el posible papel de la PEPC en la respuesta al estrés, en las raíces de remolacha de siembra otoñal. El estudio se ha realizado en la variedad Ramona. Como índice de estrés hídrico de la planta se han utilizado los niveles de prolina (Monreal et al. en este libro).

En los gráficos 10 y 11 de la Fig. 6, se muestra la actividad específica de la PEPC de la raíz ($U\ mg^{-1}\ prot.$) en los ensayos de campo, en condiciones de déficit hídrico y riego. En la campaña 2000/2001 se observa que los valores de actividad PEPC van oscilando a lo largo del cultivo y no se detectan diferencias entre las dos condiciones. Los valores de actividad más altos corresponden a $0,06\ U\ mg^{-1}\ prot.$ (Fig. 6, gráfico 10). En la campaña 2001/2002 los valores de actividad específica de la PEPC son muy homogéneos en ambas condiciones (gráfico 11) y oscilan entre $0,04$ y $0,07\ U\ mg^{-1}\ prot.$ En general, se obtienen valores de actividad específica de PEPC en el mes de Mayo más bajos que en las muestras del ensayo de abonado donde se utilizó la variedad Claudia (Fig. 3, gráficos 1 y 2).

Los valores de IC_{50} para el L-malato en estos muestreos (Fig. 7; gráficos 12 y 13) presentaron diferentes tendencias en las dos campañas analizadas. En la campaña 2000/2001 los valores de IC_{50} son muy heterogéneos y no se puede establecer una relación clara entre las dos condiciones. En la campaña 2001/2002 la IC_{50} fue mayor en los ensayos

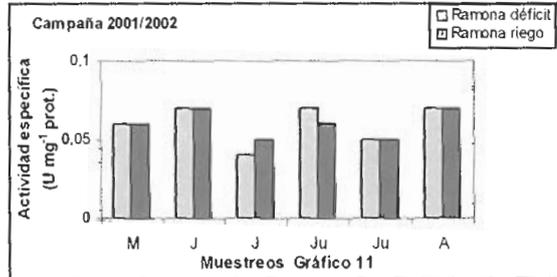
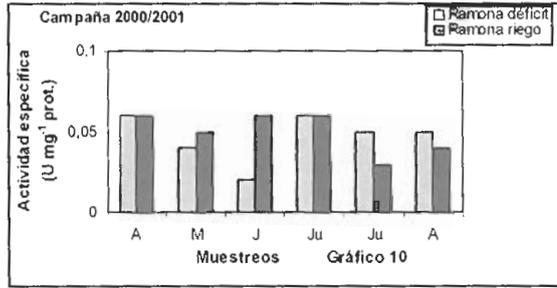


Figura 6. Actividad PEPC específica ($U\ mg^{-1}\ prot.$) en relación con el estrés hídrico en muestras de campo.

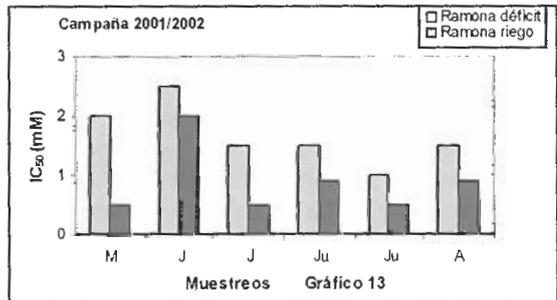
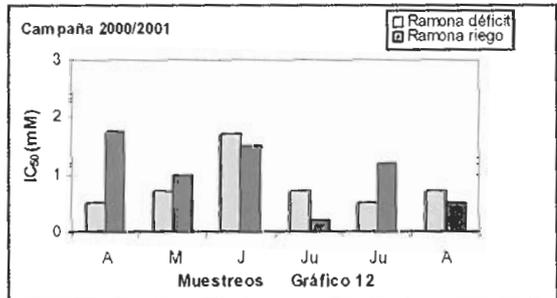


Figura 7. Sensibilidad al málico (IC_{50} (mM)) en relación con el estrés hídrico en muestras de campo.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

de déficit hídrico que en los de riego, con valores de IC_{50} entre un 40 y un 50% más altos que los de las muestras de regadío (gráfico 13). Las diferentes respuestas entre las dos campañas pudo deberse a diferencias en el régimen de lluvias (Tabla 1, Morillo-Velarde, en este libro) que indican un aporte por lluvias de 367 mm para el 2001 y de 215 para el 2002, o bien al nivel de nitrógeno en planta ya que las plantas de la cosecha del 2000/2001 pertenecen al G2, mientras que las de la campaña 2001/2002 pertenecen al G3 con mayor LAI (Martínez et al., gráfico 5) y mayores pérdidas por transpiración.

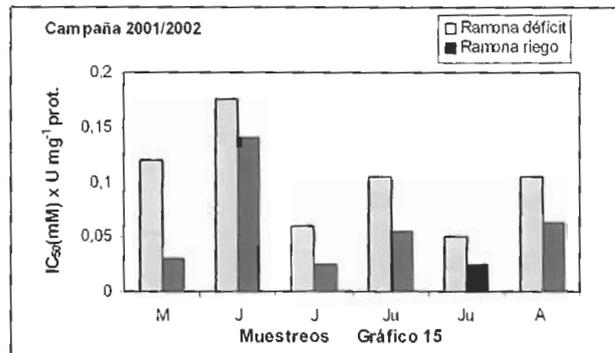
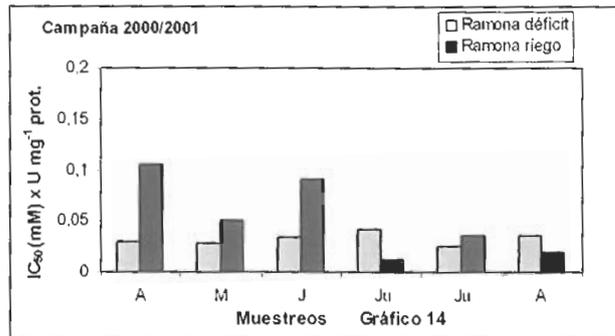


Figura 8. Índice de Actividad in vivo de la PEPC (IC_{50} (mM) x $U\ mg^{-1}\ prot.$) en relación con el estrés hídrico en muestras de campo.

Los índices de actividad *in vivo* (IA), dado que las actividades son muy homogéneas, reproducen el perfil de fosforilación del enzima (Fig. 8), con IA superiores en secano que en regadío en la campaña 2001/2002 (Fig. 8, gráfico 15). Los valores de prolina utilizados como índice de estrés nos muestran que, en efecto, los cultivos de secano padecieron un estrés hídrico superior al de regadío y acumularon más prolina en la raíz (Fig. 2, Monreal et al., en este libro). La contribución real de la PEPC a la síntesis de este osmolito en la raíz es difícil de determinar, ya que la prolina en la remolacha se sintetiza mayoritariamente en la hoja (Caballero-Valcarce et al., en este libro). Sin embargo, la PEPC puede contribuir a la respuesta al estrés ya que el malato producido puede en sí mismo acumularse y utilizarse como osmolito. En este sentido se ha visto que plantas de sorgo cultivadas en estrés salino acumulan una mayor cantidad de malato respecto a las plantas controles (Echevarría et al., 2001, García-Mauriño et al., 2003). Además, el malato es el osmolito principal de las plantas CAM (plantas crasas con fijación nocturna de CO_2) y que representa uno de los máximos exponentes en la adaptación al estrés hídrico en el reino vegetal.

CONCLUSIONES

- En plantas de laboratorio se muestra que la PEPC está poco fosforilada en las raíces secundarias, esta merma de actividad se ve compensada, en parte, por la abundancia del enzima. Por el contrario, en la raíz acumuladora el nitrato induce la fosforilación de la PEPC. Estos altos valores de fosforilación de la PEPC, junto con otros factores, podrían estar en la base del aumento de tamaño de las raíces bien abonadas respecto de las raíces crecidas en nitrato limitante.

- En los ensayos de campo, los máximos valores de IA para la PEPC se dan a finales de Abril, Mayo y principios de Junio, indicando una función relevante del enzima en el crecimiento de la raíz. La actividad óptima de la PEPC (determinada a pH 8) es muy similar en los diferentes ensayos de abonado, sin embargo, el nitrógeno, al igual que en los ensayos de laboratorio, aumentó el grado de fosforilación del enzima (PEPC más activa), en condiciones subóptimas de pH (7,3) y presencia del inhibidor malato (IC_{50}), condiciones fisiológicas del citoplasma *in vivo*.

- En los meses estivales se produce una bajada del aporte de sacarosa procedente de la hoja que determinar una detención del crecimiento. Los resultados obtenidos en este trabajo establecen que este diálogo podría llevarse a cabo a través de la PEPC y de su regulación por fosforilación, manteniendo bajos los valores de IA para la PEPC y limitando el crecimiento de la raíz a pesar de la disponibilidad de nitrato.

- En situaciones de estrés hídrico, manifestado por valores superiores de prolina en secano respecto del regadío, los valores de IA para la PEPC son más altos. En estas condiciones el aumento de IA para la PEPC se establece por un aumento de la fosforilación del enzima. La contribución real de la PEPC a la síntesis de este osmolito en la raíz, es difícil de determinar, ya que la prolina, en la remolacha, se sintetiza mayoritariamente en la hoja, sin embargo, el malato producido vía PEPC puede en sí mismo acumularse y utilizarse como osmolito.

BIBLIOGRAFÍA

Bradford, M.M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Chollet, R., Vidal, J., O'leary, M. (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous highly regulated enzyme in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 47: 273-298.

Echevarría C, García-Mauriño S, Alvarez R, Soler A, y Vidal J. (2001). Salt stress increases the Ca^{2+} -independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in sorghum leaves. *Planta*, 214: 283-287.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Echevarría, C., Pacquit, V., Bakrim, N., Osuna, L., Delgado, B., Arrio-Dupont, M., Vidal, J. (1994). The effect of pH on the covalent and metabolic control of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum* leaf. *Arch Biochem Biophys.*, 315 (2): 425-430.

Echevarría, C., Vidal, J. (2003). The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Plant Physiol Biochem.*, 41: 541-547.

García-Mauriño S, Monreal JA, Alvarez R, Vidal J y Cristina Echevarría. (2003). Characterization of salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of *Sorghum vulgare*: independence of osmotic stress, involvement of ion toxicity and significance of dark phosphorylation. *Planta*, 216: 648-655

Hewitt EJ (1966). The composition of the micronutrient solution. En : "Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition" . Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux of Hort., Tech. Commum. N° 22. Farnham Royal.

Huppe, H.C., Turpin, D.H. (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.*, 45: 577-607.

Jiao, J., Chollet R. (1991). Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ and crassulacean acid metabolism plant. *Plant Physiol.*, 95: 981-985.

Jiménez-Segovia, E-T (2004). "Factores ambientales y fisiológicos que influyen en la riqueza y la calidad de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Vidal, J., Bakrim, M., Hodges, M. (2002). The regulation of plant phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation, En FOYER, C.; NOCTOR, G. *Advances in Photosynthesis; Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon Metabolism*, Edotado po Kluwer Academic Publisher., 12: 135-150.

Una Estrategia para la Inhibición del Espigado de la Remolacha de Siembra Otoñal



UNA ESTRATEGIA PARA LA INHIBICIÓN DEL ESPIGADO DE LA REMOLACHA DE SIEMBRA OTOÑAL

María Cruz González¹, Juan José Martínez², Rodrigo Morillo-Velarde² y Francisco Javier Cejudo¹

¹Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja, Avda Américo Vespucio 49, E-41092, Sevilla. ²AIMCRA, Apartado 4210, 41080-Sevilla.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas de degradación de sacarosa juegan un papel fundamental en la distribución de carbono entre los distintos órganos de la planta. Además, estudios recientes muestran que las hexosas producidas por estas enzimas participan en vías de señalización celular e intercelular que son esenciales para coordinar el crecimiento y desarrollo de la planta (Koch, 2004). La sacarosa puede degradarse por dos tipos de enzimas, sacarosa sintasa e invertasas (Sturm y Tang, 1999). La sacarosa sintasa cataliza la formación reversible de UDP-glucosa y fructosa, mientras que las invertasas catalizan la formación irreversible de fructosa y glucosa. Hay tres tipos de invertasas en plantas que difieren en sus propiedades bioquímicas y en su localización celular por lo que están implicadas en distintas funciones (Roitsch y González, 2004). Las invertasas neutras están localizadas en el citosol y su función principal es la de generar glucosa y fructosa como fuente de energía para el metabolismo celular. Hay además dos tipos de invertasas ácidas, las que están localizadas en la pared celular, cuya función principal es la de distribución de sacarosa y señalización celular, y las que están localizadas en la vacuola, que tienen funciones relacionadas con almacenamiento de sacarosa, osmo-regulación y respuesta a estrés abiótico (Sturm, 1999; Roitsch y González, 2004). Para llevar a cabo todas estas funciones se necesita una gran coordinación de la expresión de los genes que codifican para estas enzimas (Koch, 2004). Por este motivo en los últimos años se ha incrementado el interés en el estudio de las mismas. Buena parte de estos estudios se han realizado con plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, de la que ya se conoce la secuencia de su genoma y para la que se dispone de una gran cantidad de herramientas moleculares y genéticas. Sin embargo, en plantas de gran importancia económica, como la remolacha azucarera, el conocimiento de los genes del metabolismo de la sacarosa es muy escaso.

Otro aspecto muy importante de la biología de las plantas es el control de la floración. Este es un problema de enorme importancia económica en el caso de la remolacha ya que el cultivo predominante en Andalucía, como en el resto del área Mediterránea, se realiza con ciclo otoñal. La remolacha es una planta que vernaliza, es decir, el frío invernal es una señal que hace que la planta florezca durante la primavera

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

cuando los días son largos (Sung y Amasino, 2004). El tallo floral de la remolacha es de naturaleza leñosa por lo que ha de eliminarse manualmente con antelación a la cosecha mecanizada. Además, la propia inducción del tallo floral, comúnmente conocida como espigado, provoca pérdida de parte de la sacarosa acumulada en la raíz.

OBJETIVOS

La participación del grupo de investigación del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis en este proyecto se ha centrado en tres objetivos:

- Aislamiento de genes del metabolismo de la sacarosa de la remolacha azucarera y estudio de su expresión para establecer la contribución de cada uno de ellos en la síntesis y acumulación de sacarosa, así como en la respuesta a cambios ambientales que resultan estresantes para la planta como la sequía o el calor.
- Control hormonal por giberelinas del proceso de espigado. Aislamiento del gen de la GA20 oxidasa, uno de los más importantes en la síntesis de giberelinas.
- Estrategias de inhibición del espigado en la remolacha de siembra otoñal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Aislamiento y clonación de genes para invertasas de remolacha azucarera y análisis de sus patrones de expresión.**
- *Aislamiento y clonación de genes para invertasas de remolacha azucarera*

La estrategia ha consistido en utilizar oligonucleótidos degenerados en zonas muy conservadas de los genes que codifican para estas enzimas. Para realizar la búsqueda por PCR hemos preparado una genoteca a partir de mRNA extraído de meristemo apical y de hoja. Todos los genes clonados en este proyecto se han depositado en la base de datos del EMBL, en la que aparecen con los siguientes códigos:

Accession#: **AJ422050**

Description: Beta vulgaris mRNA for *neutral invertase* (ninv gene)

Accession#: **AJ422051**

Description: Beta vulgaris mRNA for *acid vacuolar invertase* (vacinv gene)

Accession#: **AJ422052**

Description: Beta vulgaris mRNA for *exocellular acid invertase 1* (exinv1 gene)

Accession#: **AJ422053**

Description: Beta vulgaris mRNA for *exocellular acid invertase 2* (exinv2 gene)

• Patrón de expresión de los genes del metabolismo de la sacarosa en remolacha

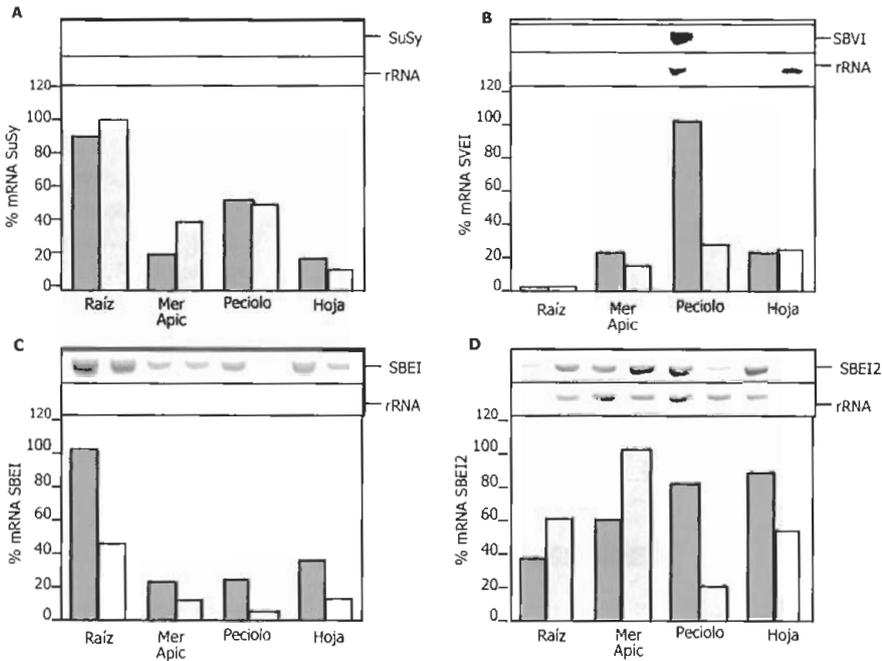


Figura 1. Patrón de expresión de la sacarosa sintasa (SuSy) y de las invertasas vacuolar (SBVI), exocelular 1 (SBE1) y 2 (SBE2).

Combinando las técnicas de northern-blot y RT-PCR se determinó en primer lugar el patrón de expresión de los distintos genes (sacarosa sintasa, invertasa neutra e invertasas ácidas vacuolar o de pared celular). Para ello se utilizaron plantas de las dos variedades (Claudia y Monatunno) con las que se ha desarrollado la mayor parte de este proyecto. En la Fig. 1 se muestran los datos obtenidos para la variedad Claudia.

En resumen este análisis mostró un alto nivel de expresión de sacarosa sintasa en raíz (Fig. 1A), siendo menor en el resto de los órganos de la planta. En cuanto a las distintas invertasas, mientras que la invertasa neutra mostró niveles similares en todos los órganos analizados, la invertasa ácida vacuolar mostró expresión específica en el pecíolo (Fig. 1B). Esta es la primera vez que se describe expresión de invertasa vacuolar en este órgano de la planta. Dada la importancia del pecíolo en la transferencia de sacarosa desde el órgano productor, la hoja, hasta el órgano de acumulación, la raíz, se ha realizado un estudio en profundidad de los factores que regulan la expresión de invertasa vacuolar en pecíolo. Los resultados de este estudio muestran que hay dos factores importantes en la expresión de este gen, el primero es el estado de crecimiento de la planta, el nivel de expresión es alto en estadios tempranos de crecimiento (32 días) y va disminuyendo progresivamente conforme avanza el desarrollo de la planta hasta los 72 días. Además, durante las 24 horas del día se aprecian importantes oscilaciones de expresión, siendo alta en la mitad del día para disminuir y alcanzar los niveles mínimos durante la noche (Fig. 2). Esta oscilación se mantiene cuando las plantas se someten a

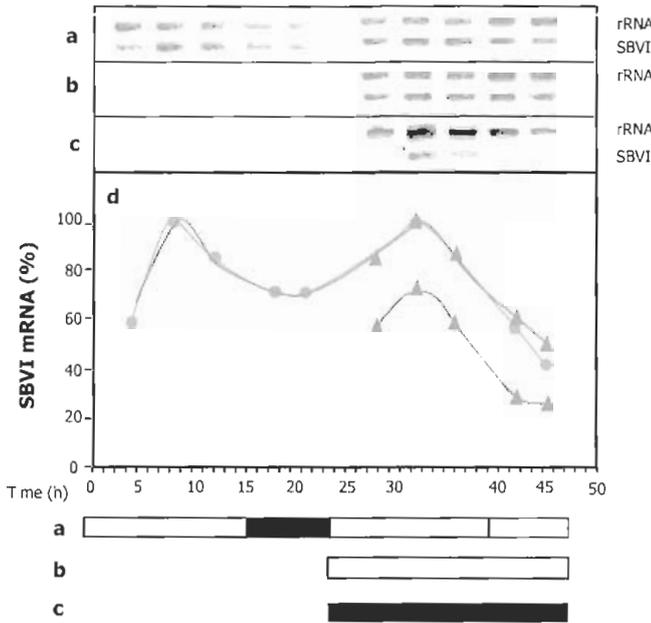


Figura 2. Oscilación circadiana de la expresión de invertasa vacuolar en peciolo de plantas de remolacha de 32 días. Las barras a, b y c indican los periodos de luz y oscuridad.

un segundo periodo de 24 horas con iluminación continua o bien en oscuridad continua, lo que indica que la invertasa vacuolar está sometida a control circadiano en peciolo de remolacha (Fig. 2). Por último, de los genes para las dos invertasas ácidas de pared celular que hemos aislado, una de ellas (SBE1) mostró mayor expresión en raíz (Fig. 1C), mientras la otra (SBE2) mostró un alto nivel de expresión en tejidos verdes (Fig. 1D). En el caso de la raíz, el nivel de expresión de las invertasas es mucho menor que el de la sacarosa sintasa.

Estos resultados permiten concluir que las variaciones de sacarosa de la raíz dependen fundamentalmente de sacarosa sintasa. Es probable que la invertasa de pared (SBE1), la que mayor nivel de expresión muestra en

raíz, esté implicada en funciones específicas como la de degradar sacarosa en el apoplasto, lo que aumentaría el efecto sumidero de sacarosa por parte de la raíz.

Æ Evolución de la expresión de los genes del metabolismo de la sacarosa en raíces en ensayos de campo.

Se han realizado ensayos de campo para analizar la expresión de los genes del metabolismo de la sacarosa en distintas condiciones de cultivo. Se han estudiado distintas variables como las variedades de remolacha (Claudia, sensible a espigado, Monatunno, resistente y Ramona, con un bajo contenido en azúcares reductores), efecto de abono nitrogenado, ausencia o no de riego y tratamientos con paclobutrazol, un inhibidor de síntesis de giberelinas que se ha utilizado para inhibir el espigado (ver más adelante). En todos estos ensayos se han tomado muestras en las que se ha analizado el nivel de expresión de los distintos genes en estudio por los métodos mencionados anteriormente. Es importante resaltar que, aunque hay variabilidad en los datos debido a la complejidad de los experimentos realizados y a la dificultad de análisis de RNAs en raíces de plantas de remolacha de un porte considerable, hemos apreciado las mismas tendencias en las

repeticiones de los ensayos que se han realizado en las distintas campañas. Las principales conclusiones que se pueden obtener son:

La expresión de sacarosa sintasa en raíz muestra un comportamiento similar en todos los ensayos: hay niveles altos en fases tempranas de crecimiento (marzo) que va descendiendo paulatinamente hacia el final de los muestreos (junio-julio). Esto ocurre en todos los ensayos realizados: de las variedades Claudia y Monatunno, de siembra tardía o temprana y abonado. Hay sin embargo excepciones

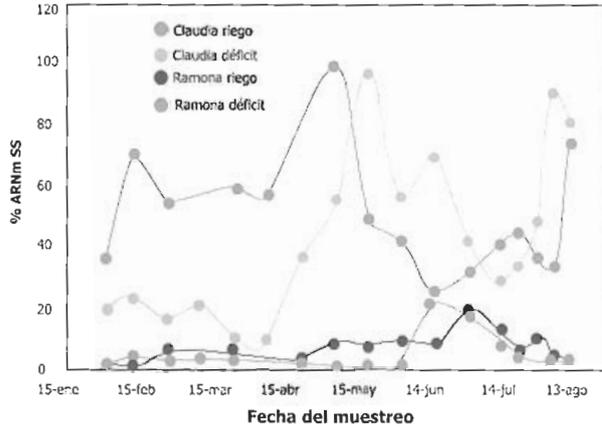


Figura 3. Patrón de expresión de la sacarosa sintasa en raíces de las variedades de remolacha Claudia y Ramona en condiciones de riego adecuado y sin riego (déficit), cuyos muestreos se realizaron en las fechas indicadas.

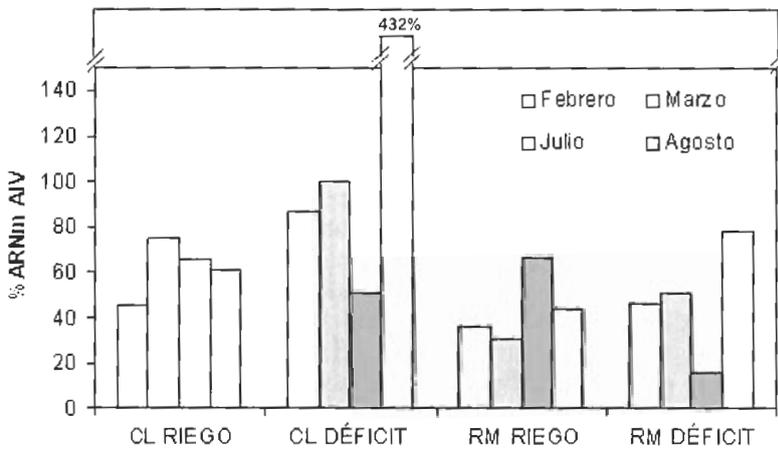


Figura 4. Nivel de expresión de la invertasa vacuolar en raíces de las variedades de remolacha Claudia (CL) y Ramona (RM) en condiciones de riego adecuado y sin riego (déficit). Los muestreos se realizaron en los meses indicados.

notables. La más importante es que cuando sube la temperatura se aprecia un incremento en la expresión de sacarosa sintasa en los ensayos de abonado nitrogenado en exceso y siembra tardía, que podría explicar el incremento de azúcares reductores en la raíz en estas condiciones.

Cuando se comparó la variedad Claudia con Ramona, que acumula menos azúcares reductores, en el ensayo de déficit hídrico se observó un incremento en los niveles de sacarosa sintasa en las muestras correspondientes a finales de julio inicios de agosto, que no se observaba en la variedad Ramona cultivada en las mismas condiciones (Fig. 3). Un nuevo dato que apoya la idea de que la sacarosa sintasa está implicada en la producción de azúcares reductores en respuesta a altas temperaturas.

Las invertasas que hemos analizado no muestran variación de los niveles de expresión en los distintos ensayos realizados, con la excepción de la invertasa vacuolar ácida que se incrementó 4-5 veces durante el último muestreo (agosto) en la variedad Claudia sometida a déficit hídrico (Fig. 4). Este incremento no se observó en la misma variedad cuando se suministró riego adecuado. Es interesante resaltar que tampoco se observó en la variedad Ramona (Fig. 4). Este resultado indica que las invertasas vacuolares, que parecen no tener funciones importantes en el metabolismo de la sacarosa de la raíz de la remolacha, sí tiene una función importante en la respuesta a estrés térmico e hídrico. Apoyando esta idea, también se ha descrito inducción de invertasa vacuolar en raíces de remolacha en respuesta a herida (Rosenkranz et al., 2001). Todos estos resultados ponen de manifiesto que la invertasa vacuolar es probablemente la enzima más relevante en el incremento de azúcares reductores de la raíz, que se produce cuando hay estrés térmico e hídrico al final del ciclo de cultivo y por el propio daño físico en la recolección.

- **Control hormonal por giberelinas del proceso de espigado. Aislamiento y clonación del gen y la GA20 oxidasa**

- *Aislamiento y clonación de la GA20 oxidasa*

Las giberelinas son unas fitohormonas implicadas en el control del crecimiento de la planta, que también tienen gran importancia en procesos como la germinación de la semilla y la floración, entre otros. Se trata de una familia de más de 120 moléculas con actividad biológica variable. Las enzimas que participan en su biosíntesis en plantas se conocen y todos los genes que las codifican han sido identificados y aislados en *Arabidopsis thaliana*. Una de las enzimas clave de la biosíntesis de giberelinas es la GA20 oxidasa. El gen que codifica esta enzima está sometido a regulación por retroalimentación negativa, de manera que cuando la concentración de giberelinas es baja, por ejemplo tras tratamiento con inhibidores de su síntesis, se induce la expresión del gen de GA20 oxidasa. Siguiendo una estrategia similar a la descrita anteriormente para las invertasas, nosotros hemos aislado el gen de GA20 oxidasa de remolacha.

Una vez obtenido el gen hemos realizado el análisis de su expresión. Los tejidos donde se produce mayor nivel de expresión del gen de la GA20 oxidasa son los meristemas radical y apical, pero muestra un nivel de expresión bajo en la parte de la raíz que acumula



Figura 5. Efecto del tratamiento con paclobutrazol (PCB) y giberelinas (GA₃) sobre plantas de remolacha cultivadas en condiciones controladas en cámara.

sacarosa. Hemos probado el efecto de un inhibidor de síntesis de giberelinas, el paclobutrazol, que a una concentración de 500 ppm provocó inhibición del crecimiento de plantas de remolacha (Fig. 5) e inducción de la expresión del gen de GA20 oxidasa en los tejidos verdes y de manera muy notable en meristemo apical, peciolo y hoja nueva, no en cambio en hojas viejas. Estos resultados indican que el paclobutrazol es un inhibidor efectivo de la síntesis de giberelinas en remolacha.



Figura 6. Efecto de los tratamientos con paclobutrazol (PCB) y giberelinas (GA₃) sobre las hojas y peciolo de plantas de remolacha.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

• Control hormonal por giberelinas del proceso de espigado. Estrategias de inhibición del espigado en la remolacha de siembra otoñal

En primer lugar estudiamos el efecto de tratamientos de paclobutrazol en ensayos realizados en cultivo en condiciones controladas en cámaras. El paclobutrazol fue un inhibidor muy efectivo del crecimiento, efecto que se revirtió con tratamiento con giberelinas (Figura 5). El efecto del paclobutrazol es muy evidente sobre la longitud de los peciolos, el color y superficie de la hoja (Fig. 6). Tras comprobar la efectividad del paclobutrazol, iniciamos ensayos de campo para estudiar si las giberelinas están implicadas en la inducción de floración de la remolacha. Se realizaron 4 ensayos que se trataron mediante fumigación con paclobutrazol (5 cc/l), teniendo igual número de parcelas control sin tratar. Los tratamientos se hicieron en mayo, momento en el que se iniciaba el proceso de espigado. Los resultados obtenidos mostraron una inhibición del espigado superior al 90% en todos los casos. Concluimos pues que las giberelinas juegan un importante papel en la floración de la remolacha de siembra otoñal.

En las dos campañas siguientes se diseñaron ensayos para analizar la inhibición del espigado por aplicación de inhibidores de síntesis de giberelinas, estudiando el efecto de dosis, momento de aplicación y analizando no sólo la inhibición de espigado sino también el efecto sobre la productividad y calidad.

En resumen, estos ensayos pusieron de manifiesto los siguientes resultados:

a) Como se muestra en la Fig. 7, resultó más eficiente el tratamiento realizado en el inicio del mes de marzo, cuando no hay aún signos de espigado (15,5% de espigado frente al 26,1% del control sin tratar). Si el tratamiento se hace con anterioridad (mes de enero) o bien cuando ya se aprecian signos de espigado (mes de mayo), el tratamiento pierde eficiencia (23,3% y 22,2%, respectivamente). Por tanto, se puede concluir que

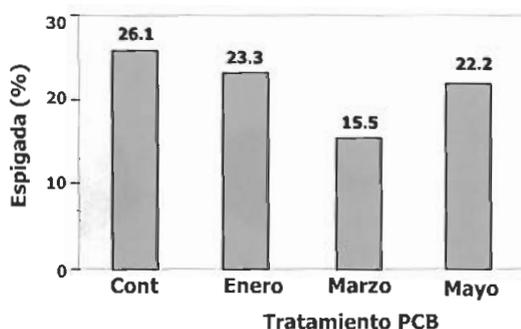


Figura 7. Ensayos de campo del efecto del tratamiento con paclobutrazol (5 cc/l) realizado en las fechas indicadas sobre el porcentaje de espigado de plantas de remolacha de la variedad Claudia

el momento en que se realiza la aplicación tiene gran incidencia sobre el nivel de inhibición del espigado y es uno de los factores más importantes a tener en cuenta.

b) Además del paclobutrazol, se utilizaron inhibidores como la Daminozida y el Mepicuat y se realizaron ensayos en parcelas con siembras tempranas situadas en Jaén, Córdoba y Cádiz, tratando de tener condiciones muy favorables al espigado. De los inhibidores de síntesis de giberelinas utilizados, el paclobutrazol resultó ser el más eficaz en la reducción del espigado.

c) En cuanto a los parámetros de producción y calidad, se analizó el efecto de estos tratamientos sobre el grado de polarización, como determinación del contenido de sacarosa en raíz. Los resultados muestran una clara relación entre el nivel de inhibición de espigado ejercida por los tratamientos con paclobutrazol y el grado de polarización, siendo las muestras con menor espigado las que muestran el mayor grado de polarización (14,8 frente a 13,4 en las muestras no tratadas). Esta diferencia de 1,4 puntos en el grado de polarización es de una gran importancia económica. En cuanto al resto de los parámetros de calidad estudiados, no se observaron efectos significativos sobre el contenido en potasio y nitrógeno alfa amino; sin embargo, el tratamiento con paclobutrazol produjo una disminución del contenido de sodio (4,23 mEq/100 g de peso fresco en las tratadas frente a 5,88 mEq/100 g de peso fresco en las muestras control). Estos resultados indican que la inhibición del espigado provocada por el paclobutrazol produce además un incremento sensible en la productividad y calidad de la sacarosa.

Tabla 1. Efecto del tratamiento con distintas dosis de paclobutrazol a distintos tiempos en ensayos de campo realizados en las localidades indicadas sobre el nivel de espigado (Espig), el contenido en sodio (Na), el contenido en azúcares reductores (AR) y el grado de polarización (Pol).

Tratamiento	Dosis	JARABATA (Badajoz)				TARANCON (Écija)				PLATA (Arcos)			
		Espig	Na	AR	Pol	Espig	Na	AR	Pol	Espig	Na	AR	Pol
Testigo	0	40,81	5,26	0,35	15,4	22,72	4,18	0,16	13,3	8,48	5,12	0,20	14,9
Marzo	1x	22,78	3,43	0,24	16,0	25,36	2,88	0,15	15,2	5,12	4,19	0,18	15,0
	3x	7,80	2,51	0,18	16,7	16,00	2,43	0,14	15,0	6,03	4,14	0,19	15,7
Abril	1x	18,24	3,22	0,22	16,4	11,84	2,77	0,14	14,8	6,51	4,57	0,18	15,5
	3x	12,19	2,32	0,19	17,3	8,79	2,47	0,15	15,6	6,41	4,14	0,18	15,1
1 ^{os} Síntomas	1x	26,40	3,77	0,27	17,1					9,82	5,25	0,19	15,0
	3x	9,85	2,30	0,19	17,5					6,84	5,50	0,22	15,2

En campañas sucesivas hasta la actual (año 2004), se han realizado ensayos optimizando las dosis aplicadas y el tiempo de aplicación, siendo los resultados repetitivos con respecto de los mencionados anteriormente, como ejemplo se muestran los resultados obtenidos en la campaña de 2003 (Tabla 1). Por tanto se puede concluir que la inhibición de la síntesis de giberelinas tiene dos efectos positivos sobre la remolacha de siembra otoñal, en primer lugar una inhibición muy significativa del porcentaje de espigado, objetivo para el que se diseñó este tratamiento. De este efecto se derivan efectos secundarios igualmente positivos y que afectan el incremento del grado de polarización y a la mejora

de la mayor parte de parámetros de calidad (Tabla 1). Probablemente, estos efectos positivos se deben a que las plantas tratadas con paclobutrazol tienen un mejor comportamiento ante las condiciones de estrés hídrico y térmico que son normales en la época de cosecha, como sugiere el hecho de que los mejores resultados se obtuvieron en campañas en que las temperaturas en la época de cosecha fueron más extremas, condiciones que se dieron en los ensayos que se muestran en la Tabla 1. Es importante resaltar sin embargo que el momento de la aplicación del paclobutrazol es un aspecto crucial para que el tratamiento se efectivo.

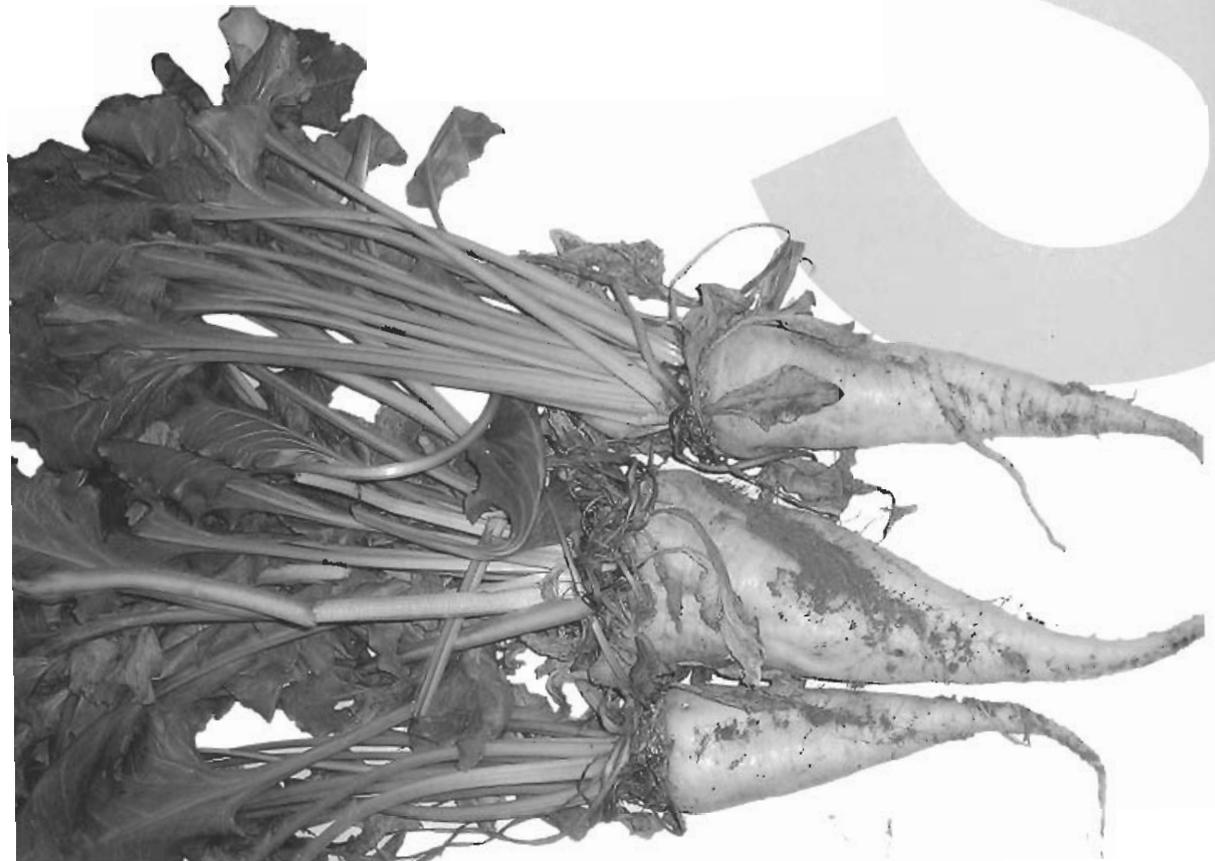
AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto IFD97-0893-C03-02 (Programa FEDER, Ministerio de Ciencia y Tecnología), Proyecto PETRI 95-0641-OP (Ministerio de Ciencia y Tecnología). También queremos agradecer la financiación por parte de la Junta de Andalucía al grupo CVI-182.

BIBLIOGRAFÍA

- Koch K (2004).** Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Op Plant Biol* 7: 235-246
- Roistch T, González MC (2004).** Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9:606-613
- Rosenkranz H, Vogel R, Greiner S, Rausch T (2001).** In wounded sugar beet (*Beta vulgaris* L.) tap-root, hexose accumulation correlates with the induction of a vacuolar invertase isoform. *J Exp Bot* 52: 2381-2385
- Sturm A (1999).** Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol* 121: 1-7
- Sturm A, Tang G-Q (1999).** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 4: 401-407
- Sung S, Amasino RM (2004).** Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr Op Plant Biol* 7: 4-10

Los niveles de **P**rolina reflejan la
situación de **E**strés **H**ídrico de la
Remolacha del **S**ur



LOS NIVELES DE PROLINA REFLEJAN LA SITUACIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO DE LA REMOLACHA DEL SUR

José Antonio Monreal¹, Eduardo T. Jiménez¹, Rodrigo Morillo-Velarde², Sofía García-Mauriño¹, Cristina Echevarría¹.

¹Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, España.

²AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera), Delegación Sur, c/ Metalurgia nº 36, 41080 Sevilla, España.

INTRODUCCIÓN

Muchas plantas sometidas a estrés hídrico ponen en marcha cambios fisiológicos que aumentan su tolerancia a dicho estrés. El **ajuste osmótico** en respuesta al estrés aumenta la capacidad de mantener la turgencia celular a potenciales hídricos bajos. Dicho ajuste implica un descenso del potencial hídrico celular mediante el acúmulo neto de solutos. La **prolina** es un osmolito compatible (es decir, que puede acumularse en el citosol sin perjuicios al metabolismo celular) que se sintetiza en plantas en respuesta al estrés osmótico (Yeo, 1998) y que es un buen indicador de déficit hídrico (Iannucci et al., 2000; Ain-Lhout et al., 2001). La cantidad neta de prolina en la planta en condiciones de estrés hídrico aumenta por la inducción y/o activación de enzimas implicadas en su biosíntesis, así como por disminución de la actividad de enzimas implicadas en su catabolismo (Delauney y Verma, 1993) (ver Fig. 1).

Por otro lado, la acumulación de prolina parece ser un factor común a muchos tipos de estrés: hídrico, térmico, causado por metales pesados o por aumento de acidez, y estrés oxidativo (Hare y Cress, 1997).

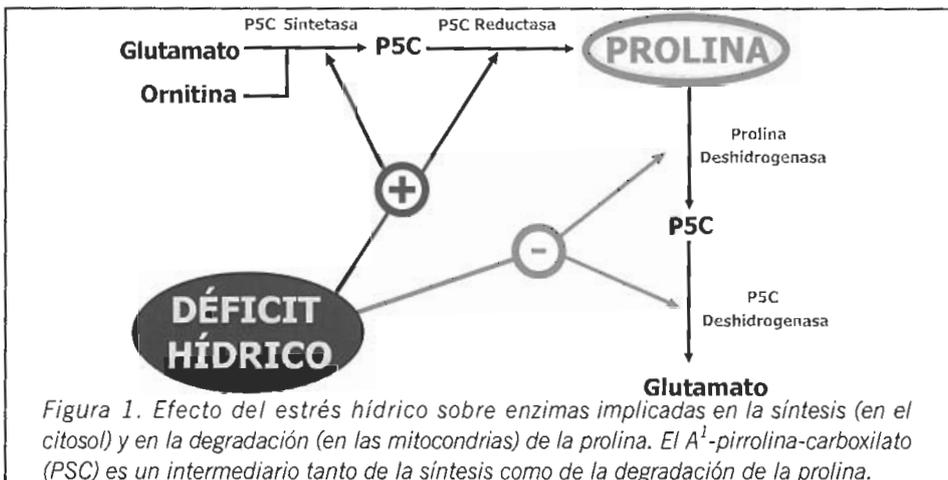


Figura 1. Efecto del estrés hídrico sobre enzimas implicadas en la síntesis (en el citosol) y en la degradación (en las mitocondrias) de la prolina. El A¹-pirrolina-carboxilato (P5C) es un intermediario tanto de la síntesis como de la degradación de la prolina.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

En este trabajo se ha determinado el contenido en prolina en raíces de remolacha como índice del grado de estrés al que estaban sometidas las plantas en las distintas situaciones correspondientes a los ensayos de campo, prestando especial atención a las condiciones hídricas del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

• **Material vegetal:** Se han empleado variedades comerciales de remolacha (Claudia y Ramona), suministradas por AIMCRA y procedentes de ensayos de campo, durante cuatro campañas sucesivas: 1999/2000, 2000/2001, 2001/2002 y 2002/2003.

• **Preparación de las muestras:** Cada muestra estaba formada por una mezcla de al menos tres raíces distintas para cada ensayo y para cada fecha de muestreo.

• **Determinación de prolina:** La prolina se cuantificó empleando ninhidrina según el método de Bates et al. (1973).

• **Determinación de glucosa:** La concentración de glucosa se determinó con el Glc test de Sigma (ST. Louis, Mo., USA)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados corresponden al conjunto de las cuatro campañas estudiadas. En la Fig. 2 se muestra la acumulación de prolina en las variedades Claudia y Ramona en condiciones de riego a demanda y déficit hídrico.

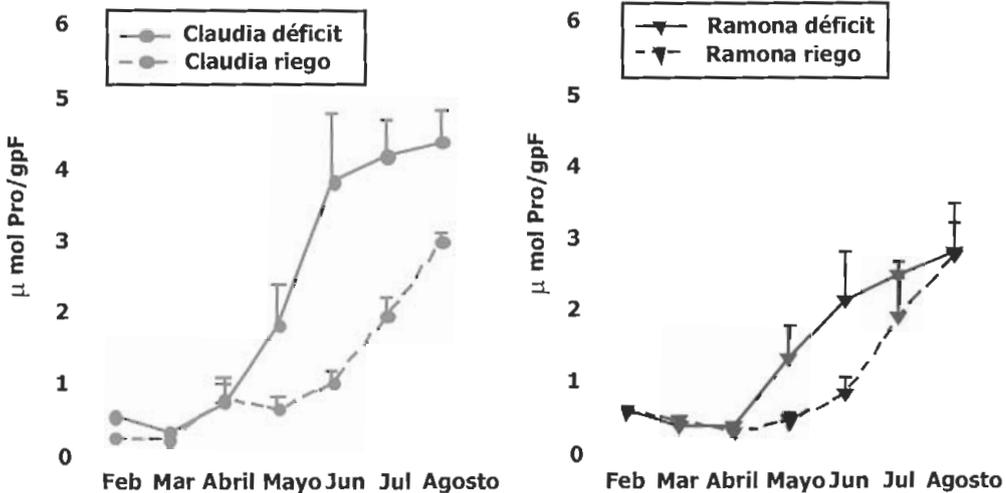


Figura 2. Evolución de los niveles medios de prolina en condiciones de déficit hídrico y riego a demanda. Se muestran los valores medios \pm ES (cuatro campañas) de prolina en las variedades Claudia y Ramona durante el desarrollo de las raíces de reserva.

A partir de Mayo, cuando empieza a subir la temperatura y disminuye el aporte hídrico por precipitación, se produjo un aumento considerable de prolina en las raíces. Dicho aumento fue mayor en déficit hídrico que en riego a demanda.

También se observaron notables diferencias en la respuesta de las dos variedades estudiadas, en general, el contenido en prolina de la variedad Ramona fue siempre inferior al de la variedad Claudia. En la Tabla 1 se muestra el análisis estadístico (t test) de las diferencias en el contenido en prolina debidas al régimen hídrico para cada una de las variedades. Se observó que la variedad Claudia acumulaba significativamente más prolina en respuesta al déficit hídrico a partir del mes de Mayo. Por el contrario, las diferencias relacionadas con el régimen hídrico no eran significativas en la variedad Ramona.

Tabla 1: Comparación de la respuesta al déficit hídrico en Claudia y Ramona. En cada variedad, se contrastó el contenido en prolina en déficit hídrico con el existente en riego a demanda.

	Mayo	Junio	Julio	Agosto
Claudia	NS	$P = 0,005$	$P < 0,001$	$P = 0,009$
Ramona	NS	NS	NS	NS

En la Fig. 3 se compara (ANOVA) la prolina, en las dos variedades y en los dos regímenes hídricos, como media de las cuatro campañas en el mes de Julio. La variedad Claudia acumuló significativamente más prolina en condiciones de déficit hídrico, mientras que la cantidad era inferior en riego a demanda, y similar a la encontrada en Ramona en ambas condiciones.

En conjunto, estos resultados muestran la existencia de condiciones de estrés hídrico en la fase de cultivo anterior a la cosecha. Aunque el estrés es menor en condiciones de riego a demanda, incluso en este último caso se observa incremento de prolina en las raíces. Las dos variedades estudiadas muestran distintos grados de estrés en las mismas condiciones, siendo Ramona mucho más tolerante al déficit hídrico que Claudia. La variedad Ramona también se caracteriza por un menor contenido en azúcares reductores (entre los que está la glucosa).

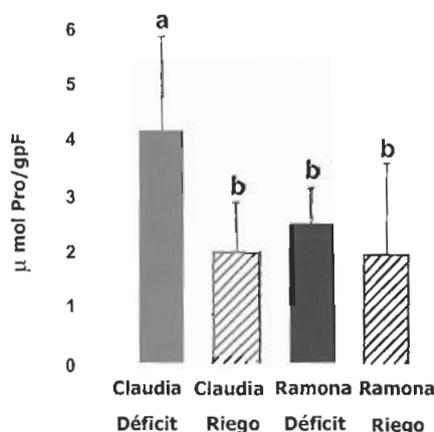


Figura 3. Comparación de la acumulación de prolina en déficit hídrico y riego a demanda en las variedades Claudia y Ramona. Se muestran los valores medios (ES (cuatro campañas) de prolina en las raíces de las dos variedades durante el mes de Julio. Las medias señaladas con la misma letra no difieren para $P < 0.05$

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

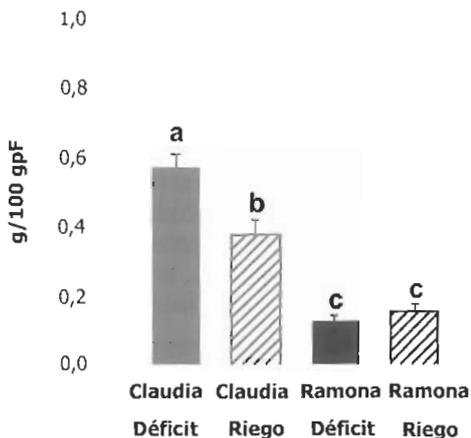
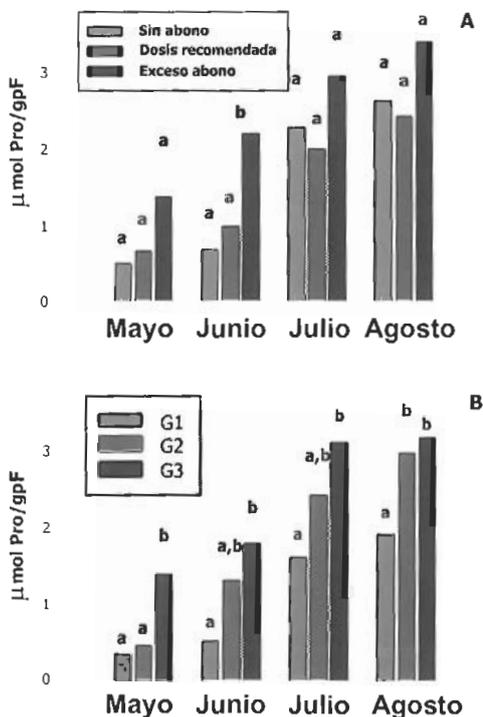


Figura 4. Comparación de la acumulación de glucosa en déficit hídrico y riego a demanda en las variedades Claudia y Ramona. Se muestran los valores medios \pm ES (cuatro campañas) de glucosa en las raíces de las dos variedades durante el mes de Julio. Las medias señaladas con la misma letra no difieren para $P < 0.05$



En la Fig. 4 se compara la glucosa, en las dos variedades y en los dos regímenes hídricos, encontrada como media de las cuatro campañas en el mes de Julio. Las condiciones que favorecen la acumulación de azúcares reductores son en muchos casos las mismas que inducen la de prolina. En efecto, la glucosa en las raíces fue significativamente mayor en Claudia que en Ramona y, en el caso de Claudia, mayor en déficit hídrico que en riego a demanda.

En la Fig. 5 se muestra el efecto del aporte nitrogenado sobre la acumulación de prolina en las raíces. El aporte nitrogenado aumentó el contenido en prolina, sobre todo cuando éste era menor (Mayo y Junio, Fig 5A). Cuando se analiza el nivel de prolina en relación con el contenido en N de la planta (Fig 5B) se hace patente y estadísticamente significativo el aumento de prolina consecuencia del sobre-abonado. No obstante, la fecha de muestreo, y, por tanto, las condiciones de estrés del cultivo, tiene efectos mayores sobre la acumulación de prolina que el abonado nitrogenado.

Figura 5. Variaciones en el contenido en prolina según el abonado nitrogenado. Acumulación de prolina, desde mayo hasta agosto, en la raíces de Claudia en riego a demanda y con distinto aporte de nitrógeno. En la parte superior (A), los datos se refieren al N suministrado al cultivo: sin abonado (SN), dosis recomendada (RN) y exceso de abonado (dosis recomendada + 300 UF, EN). En la parte inferior (B), los datos se refieren al contenido de N en las plantas: 277 kg ha⁻¹ (G1), 300 kg ha⁻¹ (G2) y 515 Kg ha⁻¹ (G3). Se compararon los grupos correspondientes a cada mes (ANOVA), y las medias significativamente diferentes se han marcado con letras distintas.

Para determinar si la acumulación de prolina estaba ligada a una etapa determinada del desarrollo de la raíz de reserva, se cultivó Ramona en siembra otoñal y en siembra primaveral (Fig 6). En el momento de la cosecha, el contenido en prolina en la remolacha otoñal (que se cosecha en verano) era más del doble del de la remolacha primaveral (se cosecha en otoño). En la parte inferior de la Fig. 6 se muestra la variación del contenido en prolina en relación con el tiempo de cultivo; se observa que remolachas otoñales con aproximadamente el mismo tiempo de desarrollo que las primaverales tienen mayor contenido en prolina que éstas. Es, por tanto, la estación de cosecha, y no el tiempo de desarrollo, el factor determinante de la prolina acumulada.

Diversos resultados experimentales sugerían la posibilidad de que en la respuesta a estrés ocurriese la siguiente secuencia de acontecimientos: situación de estrés, movilización de carbohidratos con hidrólisis de sacarosa realizada por la invertasa ácida, utilización de la energía y de los esqueletos carbonados obtenidos en la respiración de los carbohidratos para la síntesis de prolina, y acúmulo de glucosa en las raíces como remanente de la movilización de reservas de la raíz. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en una aproximación experimental encaminada a actuar sobre dichos acontecimientos y obtener cambios en la respuesta de la planta. El tratamiento con antitranspirantes iba encaminado a disminuir el estrés hídrico al reducir las pérdidas de agua por transpiración, se observa que el efecto de dicho tratamiento es distinto en situación de riego (causa un aumento de prolina) que en situación de déficit hídrico (causa una disminución). Presumiblemente, sólo en esta última situación disminuye el estrés sufrido por la planta al mejorar su estado hídrico, mientras que en el primero se originan otro tipo de situaciones estresantes (estrés térmico por disminución de refrigeración, estrés causado por déficit de CO₂ debido al cierre estomático, etc). El tratamiento con AMP, dirigido a cambiar los niveles de adenilatos en la planta y de esa forma incidir sobre la respiración, no tuvo efectos sobre la prolina acumulada. Por último, se apreció una notable disminución en el contenido en prolina en el tratamiento encaminado a disminuir la actividad de la invertasa ácida, enzima que parece estar implicada en las respuestas a estrés de la remolacha en siembra otoñal en el periodo precosecha, y que son causa de

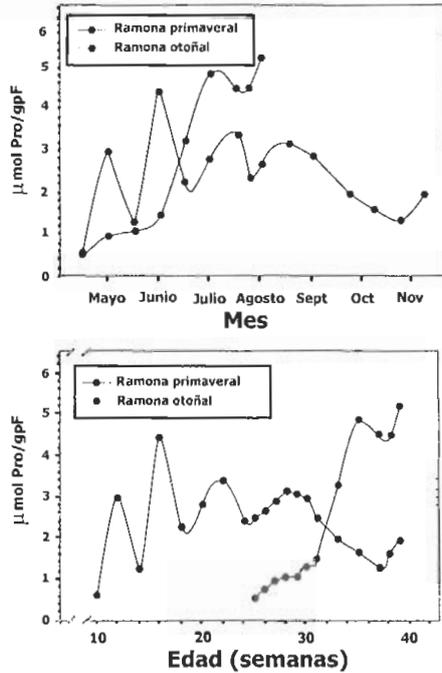


Figura 6. Prolina en las raíces de la variedad Ramona en siembra otoñal y siembra primaveral. Los dos tipos de siembra se realizaron en la misma finca, bajo régimen de riego a demanda y abonado nitrogenado recomendado. En la gráfica superior los datos se presentan según la fecha de muestreo; en la gráfica inferior, según el número de semanas transcurridas desde la siembra hasta la recolección de la raíz.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

la disminución de la calidad de la raíz. Aunque preliminares, estos resultados abren una vía hacia la modificación del metabolismo de la remolacha en vías de una mejor calidad del producto cosechado.

Tabla 2. Repercusión sobre el contenido en prolina de varios tratamientos encaminados a cambiar la situación de estrés o la actividad metabólica de la remolacha. Se realizaron tratamientos con antitranspirantes (tratamientos en Mayo y Junio, y muestreo en Julio) en dos fincas distintas, y se muestra la media de las dos determinaciones. Los tratamientos con AMP y DMDP se realizaron dos semanas, una semana y unas horas antes de la cosecha (0.25 l en cada aplicación). El adenosín-monofosfato (AMP, Sigma) se aplicó por pulverización a una concentración 120 mM (muestreo en Agosto) El inhibidor de invertasa (DMDP, Calbiochem) se aplicó por pulverización a una concentración 33µM (muestreo en Agosto).

Ensayo	Tratamiento	Control (mol prolina g ⁻¹ pf)	Tratamiento, (mol prolina g ⁻¹ pf)
Claudia (riego a demanda)	Antitranspirantes	1,620±0,640	2,625±0,485
Claudia (déficit hídrico)	Antitranspirantes	2,790±0,690	1,405±0,335
Ramona (riego a demanda)	AMP	2,83	2,55
Claudia (déficit hídrico)	DMDP	4,28	1,41

CONCLUSIONES

- El principal factor que determina la acumulación de prolina es el estrés hídrico, aunque el exceso de nitrógeno también aumenta la cantidad de prolina en las raíces.
- Los niveles de prolina inferiores que se detectan en la variedad Ramona indican que ésta tiene mayor resistencia a estrés hídrico que la variedad Claudia.
- La selección de la variedad, el régimen hídrico y el aporte de nitrógeno van a determinar cambios en la calidad de la raíz cosechada.

BIBLIOGRAFÍA

Ain-Lhout F, Zunzunegui M, Diaz-Barradas MC, Tirado R, Clavijo A and García-Novo F (2001). Comparison of proline accumulation in two Mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant Soil* 230, 175-183.

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

Delauny AJ and Verma DPS (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215-223.

Hare PD and Cress WA (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21, 79-102.

Iannuci A, Rascio A, Russo M, Di Fonzo N and Martiniello P (2000). Physiological responses in water stress following a conditioning period in berseem clover. *Plant Soil* 203, 217-227.

Yeo A (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49, 915-929.

Respuesta Varietal en Remolacha Azucarera al Estrés Hídrico



RESPUESTA VARIETAL EN REMOLACHA AZUCARERA AL ESTRÉS HÍDRICO

Rodrigo Morillo-Velarde², Luis Gordo², Juan José Martínez², Cristina Echevarría¹ y Sofía García-Mauriño¹

¹Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, España.

²AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera), Delegación Sur, C/Metalurgia nº 36, 41080 Sevilla, España.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de paliar los efectos del estrés hídrico se ha abordado recientemente mediante el uso de variedades tolerantes. En diferentes condiciones se ha señalado una interacción positiva entre variedades de remolacha azucarera y riego, tanto en condiciones de bajo déficit hídrico (como Van der Beek (1993) en Holanda y Ober *et al* (2003) en el Reino Unido), como en condiciones de alto déficit hídrico (Abdollahian *et al* (2000) en Irán).

En Andalucía se ha comprobado una diferente sensibilidad a la sequía entre variedades comerciales de remolacha, medida esta por el índice S (AIMCRA 1992). Este índice mide la tolerancia a la sequía en forma de reducción de rendimientos causados estos por ambientes/condiciones desfavorables. Se define S como:

$S = (1 - Y_s/Y_r) / (1 - Y_{ms}/Y_{mr})$ donde Y_s es el rendimiento de la variedad en condiciones desfavorables (secano); Y_r es el rendimiento en riego; Y_{ms} es el rendimiento medio en secano y Y_{mr} es el rendimiento medio en regadío.

Un valor bajo de S indica una menor reducción en el rendimiento ante una falta de agua, es decir mas tolerancia a sequía. Se han encontrado valores de S estadísticamente diferentes en variedades comerciales, desde 0.42 a 1.39.

En este trabajo se ha evaluado el comportamiento de dos variedades comerciales de remolacha azucarera, Claudia y Ramona, testigos de AIMCRA, bajo dos condiciones de cultivo diferentes, riego según balance de agua y sin riego (tratamiento de déficit severo) con el objetivo de analizar si existen diferencias entre variedades, en qué momento se produce y qué variables de desarrollo, producción o calidad industrial se ven afectadas. Este estudio se ha realizado dentro del proyecto de investigación FEDER 1FD97-0893-C3-01.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

METODOLOGÍA

Se han realizado cuatro ensayos, cuya localización y principales referencias de los tratamientos aplicados se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Localización de los ensayos y tratamientos.

Ensayo	Finca y localidad	Riego + lluvia(mm)	Número de riegos	Solo Lluvia (mm)
Caridad 2001	La Caridad Alcalá (Se)	868	12	367
Reunión 2002	La reunión Guillena(Se)	696	12	242
Caridad 2002	La Caridad Alcalá (Se)	697	12	215
El Cerro 2003	El Cerro Carmona(Se)	773	15	280

El tratamiento de riego según balance (RAD) ha consistido en la aplicación semanal de las necesidades hídricas del cultivo (ETc) calculadas según el método de la FAO, donde la ETo se ha estimado por el método del tanque evaporimétrico de clase A. El tratamiento de riego deficitario, déficit severo (DH) ha recibido solamente la lluvia. Los valores medidos (enero-julio) se indican en la tabla 1.

Diseño estadístico: Bloques completos al azar (RCBD) con cuatro repeticiones. 16 Muestras quincenales desde primera quincena de febrero hasta la primera de agosto. Los dos muestreos de julio se han considerado como recolección habitual (parcela 6 m²). Se han analizado en cada muestreo 15 variables de desarrollo, producción y calidad según protocolo AIMCRA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- La comparación de medias de tratamientos en recolección (tabla 2) se ha realizado por el test de la *t* de Student para muestras pareadas al 5%. Las diferencias significativas se indican con un asterisco (*). El programa estadístico empleado ha sido S.P.S.S (v.8.0).

- El reagrupamiento de ensayos se ha analizado por un ANOVA de dos vías, siendo los factores fijos: localidad (4) y tratamientos (4), los muestreos se han usado como repeticiones. La homogeneidad de varianzas, requisito para el reagrupamiento en este análisis, se ha comprobado por el test de Levene a $p=0.05$. Para todas las variables ha resultado no significativo, por lo que los cuatro ensayos se han podido reagrupar. En el reagrupamiento, comparando las medias de las distintas variables, el efecto de la localidad ha sido no significativo para todas las variables según el test F a $p=0.05$.

- La comparación de tratamientos y muestreos se ha realizado por un ANOVA

de dos vías, siendo los factores fijos: tratamientos (4, Claudia RAD, Claudia DH, Ramona RAD y Ramona DH) y los muestreos (16) y las repeticiones las cuatro localidades. La homogeneidad de varianzas se ha verificado igualmente por el test de Levene. En los casos en que la diferencia entre tratamientos ha sido significativa, se han comparado las medias por el test de Tukey HSD a $p=0.05$. Para todas las variables estudiadas el muestreo ha sido significativo. Los resultados se muestran variable a variable.

RESULTADOS

En estas condiciones experimentales, los rendimientos medios comparativos se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Producción y calidad media de los ensayos. RAD=Riego a la demanda, DH=Déficit Hídrico

Ensayo	Trat	Peso	Pol	Az/ha	N-min	K	Na	AZred	VTIR
Caridad 2001	DH	65.7	16.3	10.7	2.3*	4.6	5.1*	0.35*	80.6
	RAD	84.1*	17.4*	14.6*	1.9	4.3	3.4	0.19	83.5*
Reunión 2002	DH	68.8	20.2*	13.4	2.4*	4.6	2.4	0.19*	86.5
	RAD	103.8*	17.0	17.6*	1.9	3.8	2.8	0.14	86.2
Caridad 2002	DH	51.5	18.3*	9.4	5.3*	4.8	8.0	0.44	74.8
	RAD	99.2*	15.0	14.9*	4.4	4.3	7.1	0.42	72.8
Cerro 2003	DH	55.6	18.3*	10.2	2.1	5.0	3.1	0.45*	82.8
	RAD	107.7*	14.8	15.9*	2.3	5.2	4.1*	0.34	80.3

(*) = diferencias significativas según t a $p=0.05$

Pol = Polarización (°p)

N-min = Nitrógeno alfa-amino (mmol/100 g R)

Na = Sodio (mmol /100 g R)

VTIR = Valor Tecnológico Industrial de la remolacha (%)

Peso = Producción de Raíz (t/ha)

Az/ha = Rendimiento en azúcar /ha

K = Potasio (mmol/ 100 g R)

Azred =Azúcares reductores (g/100 g R)

Los resultados de recolección coinciden con lo esperado. Un estrés hídrico severo se traduce en una pérdida significativa de producción de raíz y de rendimiento en azúcar, un aumento de la polarización (causada posiblemente por la deshidratación de la raíz) y pérdida significativa de calidad, con un aumento claro de los elementos melacígenos (contenidos en sodio, potasio y nitrógeno alfa-amino).

ANÁLISIS DE VARIABLES:

- **Porcentaje de Cobertura**, las diferencias entre tratamientos con y sin riego son altamente significativas ($p<0.001$). No existen diferencias significativas entre variedades. Los valores medios de los muestreos y de recolección se indican en la tabla 3. El máximo porcentaje de cobertura alcanzado para las dos variedades en riego está en el 99.5% a primeros de junio. En los tratamientos sin riego, el máximo alcanzado está en el 88% a primeros de abril (ver Fig. 1). A partir de entonces decrece y más que con los de riego.

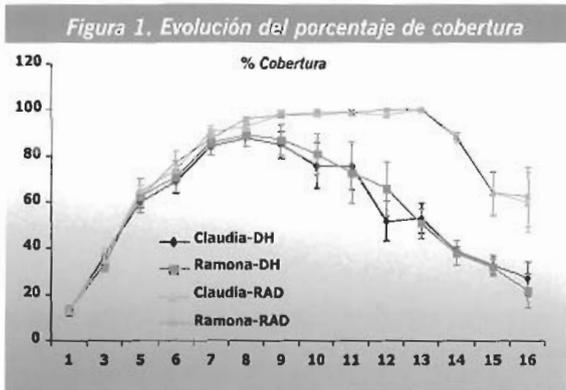


Tabla 3. Porcentaje de cobertura

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	57.63 b	38.8 b
Claudia DH	57.79 b	38.9 b
Ramona RAD	77.20 a	80.4 a
Claudia RAD	76.69 a	82.6 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Número de Hojas**, la diferencia entre tratamientos con y sin riego respecto al número de hojas es significativa ($p < 0.05$). Las dos variedades con riego alcanzan un máximo de 32.3 hojas/planta al final de mayo en tanto sin riego sólo llegan a 27.2 hojas/planta. Los valores medios de todos los muestreos y en recolección se muestran en la Tabla 4. Ramona tiene un número menor de hojas.

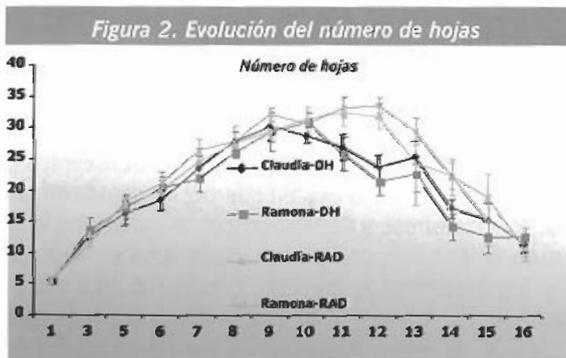


Tabla 4. Número de hojas

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	19.6 c	14.0 d
Claudia DH	20.3 bc	17.7 c
Ramona RAD	22.6 a	20.6 b
Claudia RAD	22.1 ab	22.9 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Índice de Área Foliar (LAI)**, las diferencias entre los cuatro tratamientos son muy significativas ($p=0.007$). Las variedades responden de forma diferente a la falta de agua. En relación con los valores máximos que se alcanzan, Claudia con riego alcanza un LAI de 6.6 en tanto sin riego alcanza un LAI de 5.6, ambos valores al final de mayo. Ramona con riego alcanza 6.1 y sin riego 4.1, al final de abril. En recolección, ver Tabla 5, el LAI disminuye aún con riego y se mantienen las diferencias. Ramona sin riego presenta el menor LAI.

Figura 3. Evolución del Índice de Área Foliar (LAI)

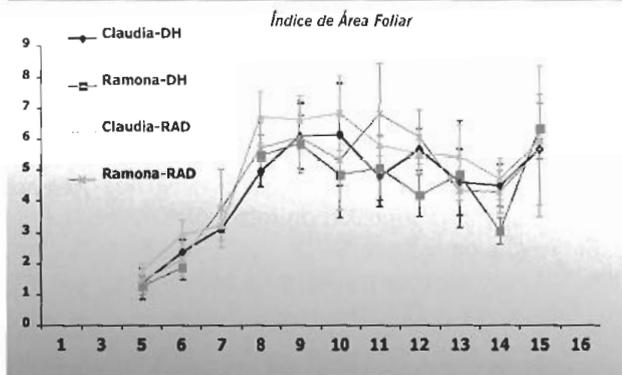


Tabla 5. Índice del Área Foliar (LAI)

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	3.9 b	3.6 b
Claudia DH	4.1 ab	4.9 a
Ramona RAD	4.7 ab	4.6 a
Claudia RAD	5.1 a	4.5 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

Figura 4. Evolución de la producción de raíz (T/ha)

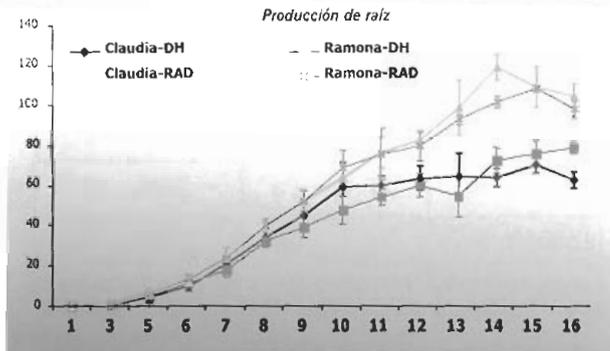


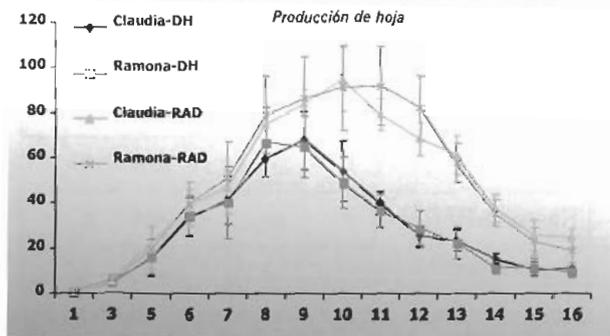
Tabla 6. Producción de Raíz (t/ha)

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	40.6 a	76.6 b
Claudia DH	41.1 a	54.9 b
Ramona RAD	56.4 a	81.5 a
Claudia RAD	57.5 a	96.9 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Producción de Raíz (t/ha)**, las diferencias entre riego y no riego son significativas a partir de mayo ($p < 0.01$, ver Fig. 4) y en la recolección. No hay diferencias significativas entre variedades. Con riego la producción de raíz (parte cosechable) aumenta hasta primeros de julio. Sin riego a partir de mitad de mayo, el peso de la raíz permanece más o menos constante. Los rendimientos medios y los obtenidos en recolección se indican en la Tabla 6.

Figura 5. Evolución de la producción de hoja (T/ha)



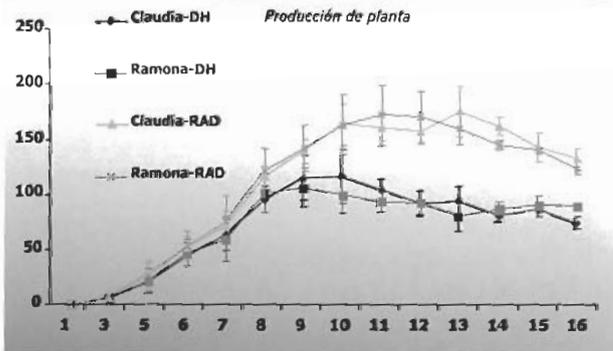
Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	29.03 b	12.5 b
Claudia DH	29.19 b	14.1 b
Ramona RAD	49.78 a	31.6 a
Claudia RAD	48.03 a	35.1 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Producción de Hoja (t/ha)**, las diferencias entre riego y no riego son significativas, aunque hasta mitad de abril los valores son similares (ver Fig. 5). No hay diferencias entre variedades. En la recolección las diferencias entre riego y no riego se aproximan. Los valores medios y en recolección se muestran en la Tabla 7.

• **Producción de la Planta (t/ha)**, el peso de la planta completa, suma de las dos variables anteriores, es diferente estadísticamente entre los tratamientos con y sin riego. No existen diferencias entre variedades. Los resultados de los muestreos se muestran gráficamente en la Fig. 6 y en la Tabla 8.

Figura 6. Evolución de la producción de la planta completa (T/ha)



Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Tabla 8. Producción Total de la planta (t/ha)

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	70.2 b	90.3 b
Claudia DH	71.4 b	86.8 b
Ramona RAD	108.4 a	142.6 a
Claudia RAD	108.5 a	153.9 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Nitrógeno en la Planta (kg/ha)**, no existen diferencias significativas en relación con la cantidad de nitrógeno en la planta respecto a las variedades o el riego ($p=0.074$). Sólo Ramona en déficit tiene menos nitrógeno. La evolución en cada tratamiento se indica en la Fig. 7. Los valores medios de los muestreos y los obtenidos en recolección se muestran en la Tabla 9. Ramona sin riego tiene menos nitrógeno.

Figura 7. Evolución del contenido total de N en la planta completa (kg/ha)

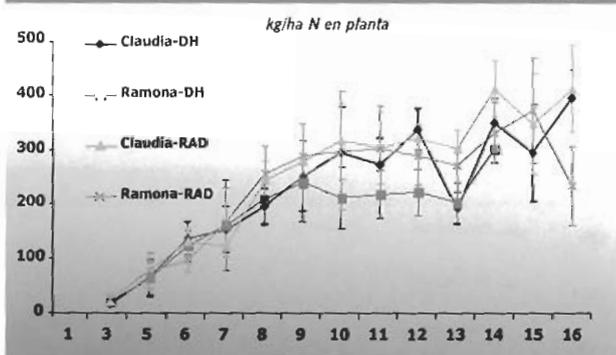


Tabla 9. Cantidad de Nitrógeno en la planta

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	181.1 b	303.3 b
Claudia DH	202.7 a	350.3 a
Ramona RAD	232.2 a	342.4 a
Claudia RAD	234.2 a	337.7 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **NO₃ en el Pecíolo (sobre M.Seca en ppm)**, la evolución del nitrógeno nítrico en el pecíolo (sobre materia seca) es la conocida. Todos los tratamientos responden de manera similar. Las diferencias no son significativas ($p=0.553$). Gráficamente se indican en la Fig. 8 y los valores medios y finales, en recolección en la Tabla 10.

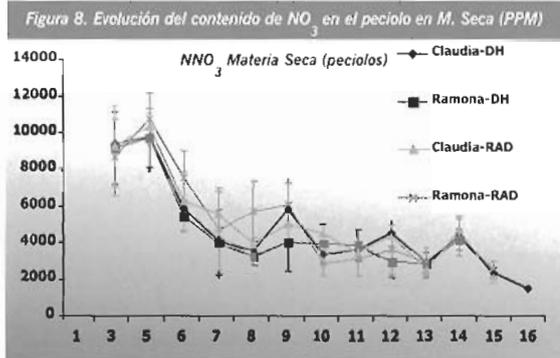


Tabla 10. Nitrógeno NO₃ en el Pecíolo (ppm)

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	5085.40 a	3765.00 a
Claudia DH	4822.48 a	3607.50 a
Ramona RAD	5519.18 a	4088.75 a
Claudia RAD	5145.51 a	3743.70 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• Brix, hasta final de marzo los valores de los cuatro tratamientos son similares (ver Fig. 9). A partir de ahí, las dos variedades sin riego muestran valores más altos de brix que las dos variedades con riego. Las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas ($p<0.001$). No hay diferencias entre variedades. Los valores medios y de recolección se indican en la Tabla 11.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

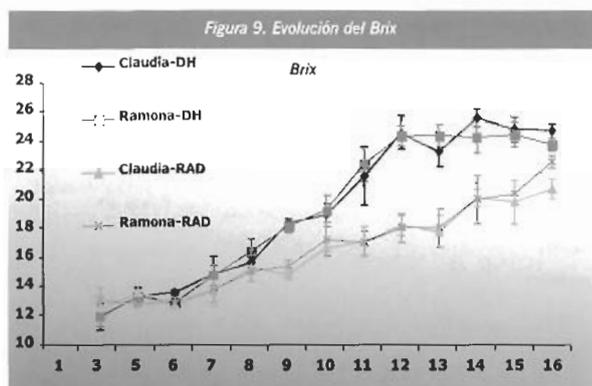


Tabla 11. Brix

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	18.99 a	23.8 a
Claudia DH	19.14 a	24.8 a
Ramona RAD	16.39 b	21.1 b
Claudia RAD	16.29 b	19.9 b

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Polarización**, los contenidos en sacarosa, la polarización, son diferentes estadísticamente entre las variedades con riego y sin riego ($p < 0.01$) aunque hasta marzo son aproximados (ver Fig. 10), esto hace que las diferencias entre medias no sean significativas. Las dos variedades sin riego tienen una polarización superior en recolección, sin diferencias entre variedades. En la Tabla 12 se indican los valores medios y los obtenidos en recolección.

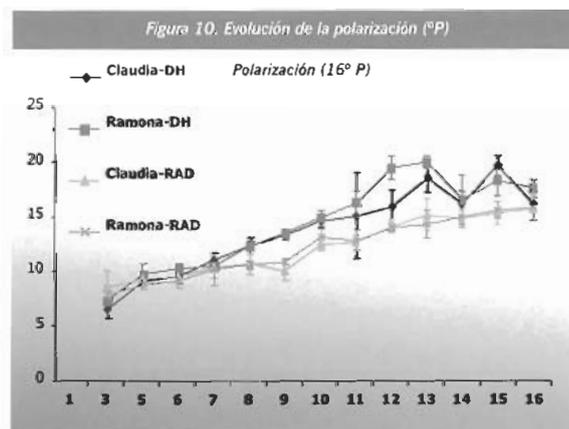


Tabla 12. Polarización (°p)

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	14.02 a	17.12 a
Claudia DH	13.63 a	16.70 a
Ramona RAD	12.07 a	15.80 b
Claudia RAD	12.21 a	15.41 b

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Rendimiento en Azúcar/ha**, el producto de producción de raíz por polarización, el rendimiento en azúcar (teórico), es muy similar por tratamiento hasta primeros de abril. Luego empiezan las diferencias. Las dos variedades con riego tienen un rendimiento superior (ver Fig.11), estadísticamente significativo. No hay diferencias significativas entre variedades en la media de los muestreos y sí en recolección. Claudia es más productiva que Ramona. Los valores medios y en recolección se muestran en la Tabla 13.

Figura 11. Evolución del rendimiento en azúcar/ha

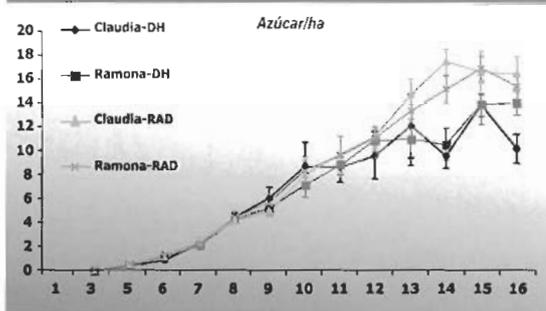


Tabla 13. Rendimiento en Azúcar/ha

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	6.64 a	12.7 b
Claudia DH	6.85 a	11.7 b
Ramona RAD	8.25 a	16.0 a
Claudia RAD	8.46 a	17.2 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

• **Nitrógeno Alfa Amino**, pese que hasta el mes de abril no existen diferencias claras entre tratamientos, a partir de ahí ambas variedades sin riego presentan unos contenidos más altos de nitrógeno alfa-amino (ver Fig. 12). Los valores medios, Tabla 14, muestran diferencias no significativas en Claudia y significativas en Ramona. Estas variedades con riego tienen los valores medios más bajos. En las últimas muestras Claudia aumenta los contenidos (lo que es usual) y Ramona los disminuye.

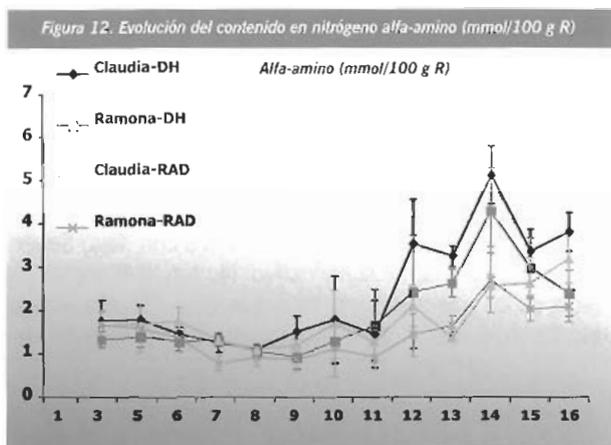


Tabla 14. Contenidos en Nitrógeno alfa-amino (mmol/100 g R)

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	1.87 ab	3.4 a
Claudia DH	2.15 a	3.8 a
Ramona RAD	1.52 b	2.6 b
Claudia RAD	1.71 ab	2.1 b

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Potasio**, el contenido en potasio de la raíz disminuye conforme avanza el cultivo sin que existan diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.506$). La evolución se muestra en la Fig. 13. Los resultados medios y en recolección se muestran en la Tabla 15. En recolección las variedades sin riego tienen más potasio pero las diferencias no son significativas.

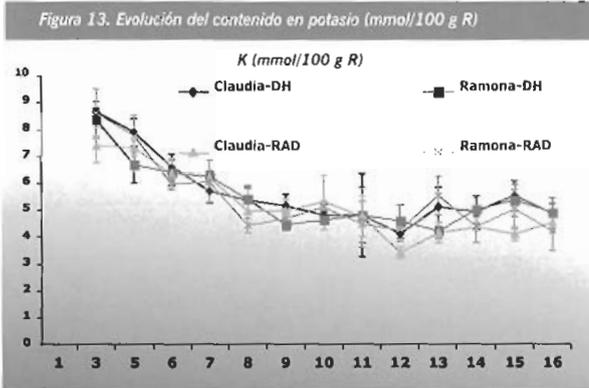
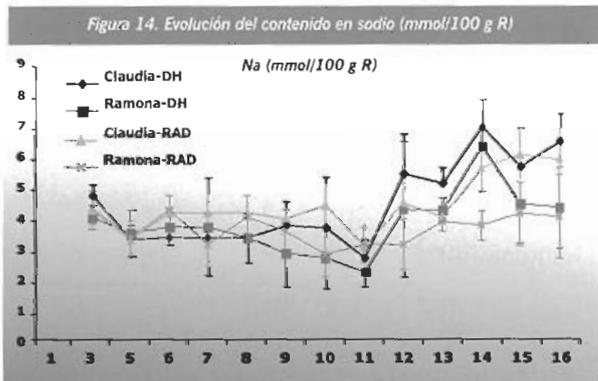


Tabla 15. Contenido en Potasio (mmol/100 g R)

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	5.61 a	5.1 a
Claudia DH	5.78 a	5.2 a
Ramona RAD	5.50 a	4.5 a
Claudia RAD	5.41 a	4.1 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Sodio**, el contenido en sodio de la raíz tiene una evolución poco constante, sin ser significativas las diferencias entre tratamientos ($p= 0.308$, ver Fig. 14). En recolección la variedad Claudia tiene unos niveles más elevados sin llegar a ser significativos (ver Tabla 16). El nivel de sodio no parece depender del riego y sí más de la variedad. Ramona con riego tiene los valores más bajos de sodio en recolección.



Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

Tabla 16. Contenido en Sodio (mmol/100 g R)

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	3.90 a	5.2 a
Claudia DH	4.28 a	5.7 b
Ramona RAD	3.76 a	3.4 a
Claudia RAD	4.28 a	5.3 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

• **Azúcares Reductores**, los azúcares reductores, principales causantes de la calidad de la remolacha en Andalucía, son más o menos constantes hasta abril. A partir de ahí Claudia eleva los contenidos más que Ramona (ver Fig.15). Las diferencias entre tratamientos son significativas ($p<0.001$). Las diferencias entre variedades son estadísticamente diferentes, tanto en valores medios como en recolección (ver Tabla 17). En los últimos muestreos la variedad Ramona baja sensiblemente el contenido en azúcares reductores.

Figura 15. Evolución del contenido en azúcares reductores (g/100 g R)

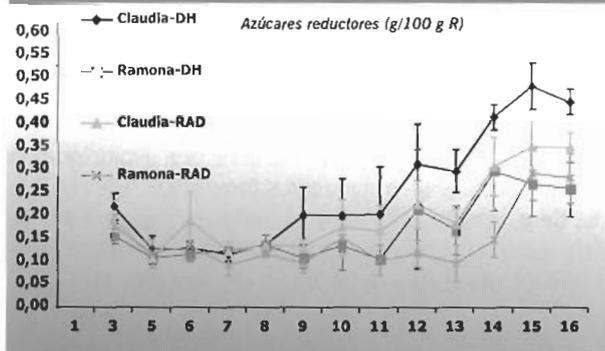


Tabla 17. Contenido en Azúcares reductores (g/100 g R)

Tratamiento	Media (%)	Recolección (%)
Ramona DH	0.18 b	0.28 b
Claudia DH	0.25 a	0.47 a
Ramona RAD	0.15 b	0.19 c
Claudia RAD	0.19 ab	0.31 b

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test Tukey HSD a $p=0.05$.

CONCLUSIONES

En las condiciones de los cuatro ensayos realizados, la falta de riego ha supuesto un déficit hídrico de 480 mm (equivalente a 13 riegos), lo que se ha traducido en una pérdida de 38.5 t/ha de raíz y ganancia de 2 grados polarimétricos, perdiéndose 5 t/ha de azúcar. La calidad se ve gravemente afectada por cuanto los contenidos en sodio aumentan un 7%, el nitrógeno alfa-amino un 13% y especialmente los azúcares reductores un 22 %. En estas condiciones:

- El estrés hídrico severo afecta significativamente al porcentaje de cobertura, número de hojas, producción de raíz, producción de hojas, Brix, polarización, rendimiento en azúcar, nitrógeno alfa-amino en recolección y especialmente a los azúcares reductores.

- El estrés hídrico severo no ha afectado al contenido en nitrógeno nítrico en el peciolo, contenido en potasio y sodio.

- No se han encontrado diferencias entre las variedades Claudia y Ramona en relación con el porcentaje de cobertura, producción de raíz, producción de hojas, NO₃ en el peciolo, Brix, polarización, rendimiento en azúcar, nitrógeno alfa-amino, contenido en potasio.

- El estrés hídrico afecta de forma diferente a las variedades en el número de hojas, Índice de área foliar (LAI), cantidad total de nitrógeno en la planta (la variedad Ramona tiene significativamente menos nitrógeno sin riego), contenido en sodio en la raíz (la variedad Claudia sin riego tiene un nivel más elevado) y a los azúcares reductores (la variedad Ramona presenta unos contenidos mas bajos y aumentan menos si falta el agua).

La variedades pueden ser una buena medida para mejorar la calidad, incluso en condiciones de alto estrés hídrico.

BIBLIOGRAFÍA

Abdollahian Noghabi.M.(2000)."Study evaluation about water stress in Iran". IIRB info nº 7: pp 5-7.

AIMCRA (1992). "Resultados de los trabajos realizados en la campaña 1992/1993". Edit. AIMCRA

Ober.E.S, Clark.C.J.A, Jaggard.K.W, Pidgeon.J.D.(2003). "Progress towards improving the drought tolerance of sugar beet". 1st joint ASSBT-IIRB Congress. S.Antonio, pp 181-188.

Van der Beek.M.A and Houtman.H.J.(1993)."Does interaction between varieties and drought stress exist?". Proceeding IIRB 56 Winter Congress, pp 151-169.

Identificación y cuantificación de azúcares resultantes de la Dimerización de la Sacarosa y de la D-fructosa (dianhídridos de fructosa) formados en la Raíz de la Remolacha o durante su procesamiento industrial



IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES RESULTANTES DE LA DIMERIZACIÓN DE LA SACAROSA Y DE LA D-FRUCTOSA (DIANHÍDRIDOS DE FRUCTOSA) FORMADOS EN LA RAÍZ DE REMOLACHA O DURANTE SU PROCESADO INDUSTRIAL

¹Juan M. Benito, ^{1*}Carmen Ortiz Mellet, José M. García Fernández²

¹*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Profesor García González 1, 41012 Sevilla.*

²*Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC-Universidad de Sevilla, Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla.*

E-mail: mellet@us.es

INTRODUCCIÓN

Dentro del objetivo general del Proyecto, esto es, el estudio de los problemas asociados al cultivo de la remolacha azucarera de siembra otoñal, nuestro grupo abordó los aspectos químicos y analíticos en relación con las posibles variaciones en la composición de azúcares en la raíz durante el desarrollo de la planta. Dada la experiencia previa del grupo sobre reactividad de la sacarosa, se consideraron dos posibles vías de transformación que podrían tener lugar en la planta o durante su procesado industrial: (i) la hidrólisis en sus monosacáridos constituyentes glucosa y fructosa (por vía enzimática o química) y (ii) la reacción de dimerización para dar dianhídridos de fructosa (DAFs). La primera origina azúcares reductores que tienen una incidencia muy negativa en la productividad industrial. En cuanto a la dimerización, se han aislado DAFs de algunas plantas superiores¹ y existen microorganismos capaces de producirlos.²⁻⁸ Por vía química, su formación tiene lugar a partir de fructosa o de sacarosa, previa hidrólisis, en condiciones de activación térmica en medio ácido. Si bien su formación sería negativa para el rendimiento final en sacarosa, las propiedades nutricionales de los DAFs son beneficiosas, lo que podría resultar en el desarrollo de productos alternativos.

DIANHÍDRIDOS DE FRUCTOSA. UNA PERSPECTIVA HISTÓRICA

Estructuralmente, los dianhídridos de fructosa son fructodisacáridos con uno o dos centros spiroacetálicos. Su formación por la acción de ácidos minerales sobre la D-fructosa o la inulina era conocida desde principios del siglo XX.⁹ Sin embargo, los DAFs permanecieron como curiosidades de laboratorio hasta tiempos mucho más recientes. Una revisión de la bibliografía pone de manifiesto un aumento importante en el número de patentes para su preparación a partir de 1989.¹⁰ Esto incluye tanto métodos enzimáticos para la preparación de dianhídridos individuales como métodos químicos para la obtención

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

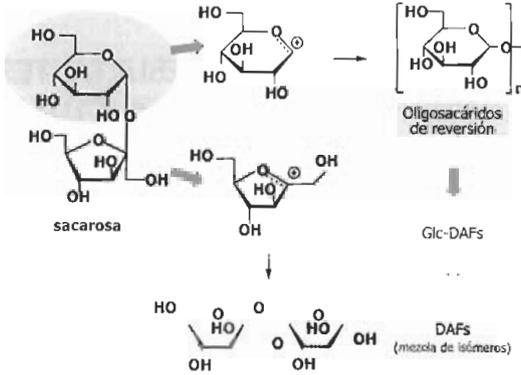


Figura 1: Transformaciones de la sacarosa por la acción de ácidos o activación térmica.

de mezclas, usando fluoruro de hidrógeno anhidro (HF) o el complejo poli(fluoruro de hidrógeno) piridinio como reactivos de activación protónica.¹¹⁻¹⁴ La mayoría de los trabajos mencionan el carácter débilmente calórico de los DAFs e indican propiedades acariogénicas y bifidogénicas. Los beneficios asociados a una población saludable de *Bifidobacteria spp.* en el intestino grueso incluyen la inhibición de la carcinogénesis, la disminución del colesterol en sangre, la estimulación de la síntesis de vitaminas del complejo B y la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas como *E.coli*.

En 1994 se identificaron los DFAs como los componentes no volátiles mayoritarios en caramelos aromáticos comerciales.¹⁵ Hasta trece DAFs isoméricos se han encontrado en esta fracción en el caso de caramelos obtenidos a partir de la D-fructosa, y un dianhídrido mixto adicional conteniendo fructosa y glucosa está presente en el caso de caramelos de sacarosa.¹⁶⁻¹⁸ Durante la caramelización también se forman otros oligosacáridos superiores, resultantes bien de la glicosidación de los DAFs o de la autoglicosidación (“reversión”) de la D-glucosa (Fig. 1). Este esquema de transformaciones resulta ser general para procesos que impliquen el calentamiento de materiales ricos en azúcares en concentraciones elevadas o en presencia de ácidos.

El descubrimiento de que los DFAs se encuentran presentes en alimentos, y las implicaciones que ello conlleva en lo que se refiere a la dieta tanto animal como humana, ha estimulado enormemente el interés en estas familias de compuestos. La existencia de estudios que indican beneficios en la salud asociados al consumo de DAFs abre nuevas posibilidades para el uso de estos compuestos por parte de la industria alimentaria.¹⁹⁻²³ De hecho, se han descrito nuevos procesos de caramelización de fructosa y sacarosa destinados a aumentar la proporción de DAFs. Estos productos ricos en DAFs han encontrado ya aplicación en la alimentación animal, en particular de aves, presentando un efecto protector contra infecciones del aparato digestivo.²⁴ No obstante, el desarrollo de nuevas aplicaciones ha estado limitado debido a la falta de procedimientos eficaces para el análisis de los DAFs y para la preparación de isómeros individuales.

OBJETIVOS

El hecho de que se hayan aislado DAFs de plantas superiores sugiere que estos pudiesen también formarse en la remolacha azucarera por vía enzimática. En cualquier

caso, el proceso de extracción de la sacarosa en la industria azucarera implica el calentamiento de disoluciones concentradas, lo que podría provocar su formación por vía química. En este contexto, los objetivos marcados para este Proyecto han sido:

- Puesta a punto de un método analítico eficaz que permita, simultáneamente, la identificación y cuantificación de fructosa, glucosa, sacarosa y DAFs, si los hubiere, en muestras de remolacha o en muestras procedentes de las diferentes etapas de su procesado industrial.

- Puesto que el término DAFs agrupa a una familia compleja de al menos 13 disacáridos no reductores isoméricos, nos planteamos desarrollar métodos selectivos de síntesis de DAFs para su utilización como patrones analíticos y la identificación individual de cada uno de ellos

- Aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras procedentes de los ensayos de campo planificados conjuntamente con los restantes grupos y con AIMCRA durante las campañas de siembra otoñal 1999-2000 y 2000-2001, así como muestras procedentes de su procesado industrial.

ANÁLISIS DE DAFs EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

El desarrollo de una metodología adecuada para el análisis simultáneo de glucosa, fructosa, sacarosa y DAFs se llevó a cabo en colaboración con el Dr. J. Defaye (Grenoble, Francia) y con la industria Nigay S. A. (Feurs, Francia). Trabajos anteriores habían puesto de manifiesto la formación de cantidades importantes de DAFs durante el proceso de caramelización de la sacarosa (calentamiento en medio ácido), por lo que, independientemente de los objetivos del presente Proyecto, un método de análisis eficaz

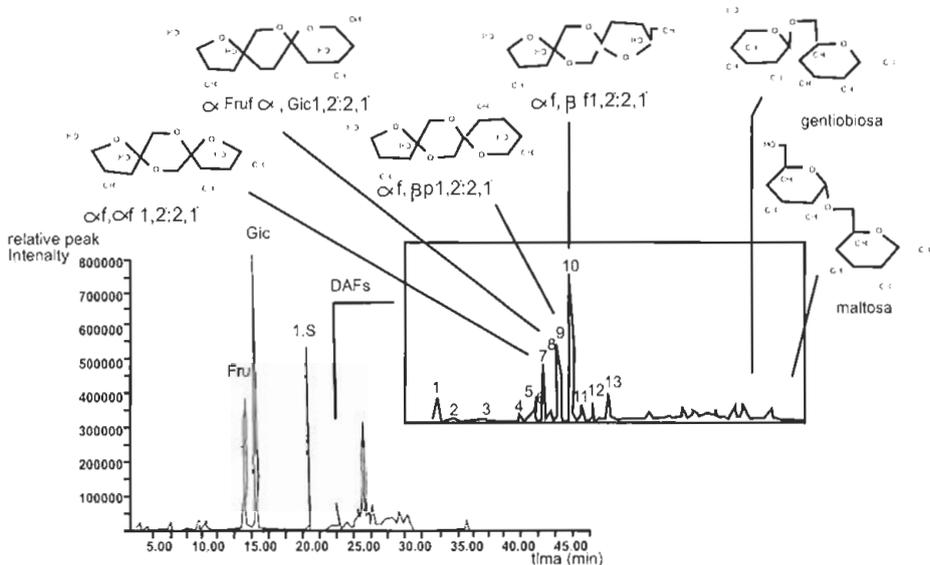


Figura 2. Cromatograma de gases de un caramelo industrial de sacarosa.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

para estos compuestos es de interés en la industria alimentaria. Como técnica analítica escogimos la cromatografía de gases (GC), que proporciona una muy buena resolución, requiere cantidades mínimas de muestra y es automatizable y aplicable a procesos de control de calidad. El protocolo analítico implica una derivatización previa de la muestra (oximación-trimetilsililación) para dotar a los azúcares de suficiente volatilidad. Los azúcares no reductores (sacarosa, DAFs), originan un único pico en el cromatograma, en tanto que los azúcares reductores originan una pareja de picos (correspondientes a las dos posibles oximas sin y anti). La columna utilizada es una HP5MS (5% fenilmetilsiloxano; 30 m x 0.25 mm de diámetro interno) de Hewlett-Packard que permite resolver completamente todos los componentes e integrarlos para su cuantificación respecto a un patrón interno (I.S.; Fig. 2)²⁵.

SÍNTESIS DE PATRONES ANALÍTICOS PARA LOS DAFs

Partiendo de los resultados de los análisis de muestras de productos alimentarios, se han diseñado métodos de síntesis selectivos para los DAFs que se forman en mayor proporción. El objetivo es la asignación de una estructura inequívoca para estos isómeros y poder realizar curvas de calibrado individuales que permitan su cuantificación en mezclas. La metodología sintética desarrollada implica la preparación de derivados de fructopiranosos y de fructofuranosos y su activación con trifluoruro de boro como catalizador ácido. A diferencia de la reacción de dimerización en condiciones "naturales" (tratamiento térmico de la fructosa libre en presencia de un ácido mineral u orgánico), esta reacción conduce preferentemente a un único isómero cuya estructura depende del derivado de partida. De esta manera, hemos preparado diferentes DAFs en forma pura que nos han permitido optimizar el método analítico, identificar inequívocamente estos compuestos y realizar estudios de estabilidad de los mismos²⁶⁻²⁹.

ANÁLISIS DE MUESTRAS DE REMOLACHA

· Campaña 1999-2000

El protocolo analítico desarrollado para los DAFs, basado en la cromatografía de gases, ha sido aplicado de manera sistemática a muestras de raíz de remolacha procedentes de los 8 muestreos realizados en todos los ensayos de campo planteados durante la campaña 1999-2000 en colaboración con AIMCRA. Para todos ellos se cuantificó la relación entre sacarosa y azúcares reductores así como la proporción entre glucosa y fructosa. No se detectó la presencia de DAFs en estas muestras. Los resultados obtenidos están referidos a muestras procedentes de tres raíces proporcionadas por AIMCRA que se lavan, trituran y se congelan inmediatamente hasta el momento de realizar el análisis. Aproximadamente 5 g de este producto se extraen con 10 mL de agua a temperatura ambiente durante 30 min y el extracto se liofiliza antes de su derivatización (oximación-trimetilsililación). Se ha evitado realizar una extracción exhaustiva para no alterar la composición existente en la planta. Los resultados obtenidos sobre contenidos de glucosa y fructosa indican una misma tendencia, independientemente de

la variedad, dosis de abonado, fecha de siembra o tipo de cultivo (secano o regadío). A partir del quinto muestreo se observa un incremento importante en la proporción de azúcares reductores, siendo la proporción de glucosa mayor que la de fructosa (Fig. 3). La representación del conjunto de estos datos frente a la temperatura máxima media alcanzada parece indicar una correlación entre el aumento de la proporción de azúcares reductores y temperaturas ambientales superiores a 25°C (ver Fig. 4). También hemos estudiado la posibilidad de utilizar "serrín" o "papilla" procedentes de la trituración de un mayor número de raíces en las instalaciones de AIMCRA para que los datos tengan una mayor significación estadística. Sin embargo, el análisis de muestras de este tipo mostró un aumento importante en la proporción de azúcares reductores en comparación con las muestras procesadas en el laboratorio, probablemente originado como consecuencia de la liberación de enzimas hidrolíticas por rotura de las células (ver Fig. 5).

• **Campaña 2000-2001**

A la vista de los resultados comentados anteriormente, que descartan la formación de DAFs en la planta, en la campaña 2000-2001 el objetivo fundamental consistió en la aplicación del método basado en la cromatografía de gases al análisis de glucosa y fructosa sobre diferentes ensayos de campo. Un problema que ya se planteó en la campaña anterior es el de la posible desviación de los datos como consecuencia del reducido número de remolachas procesadas

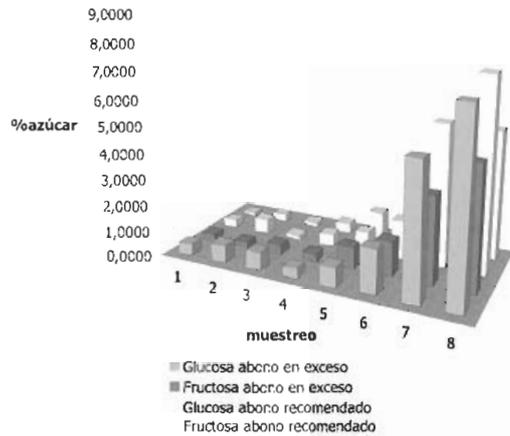


Figura 3. Datos contenidos de glucosa y fructosa (referidos al total de azúcares de raíz) para el ensayo de dosis de abonado realizado en la finca de Las Cabezas.

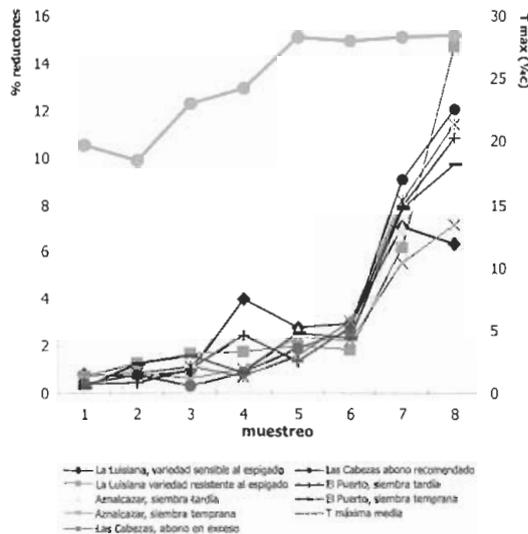


Figura 4. Representación comparativa del total de azúcares reductores en los diferentes muestreos realizados y de la temperatura máxima media.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

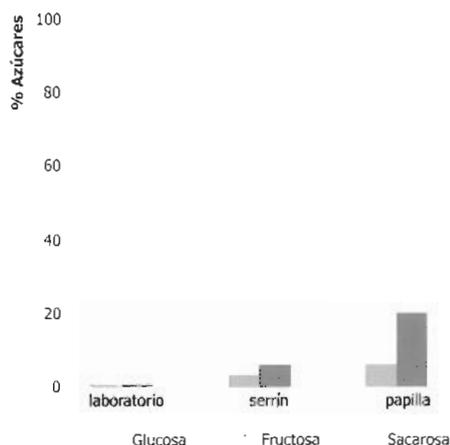


Figura 5. Porcentajes relativos de glucosa, fructosa y sacarosa en extractos de remolacha en función del método de trituración (procesado de laboratorio, serrín y papilla).

Total reductores de ensayo abonado campañas 2000 y 2001

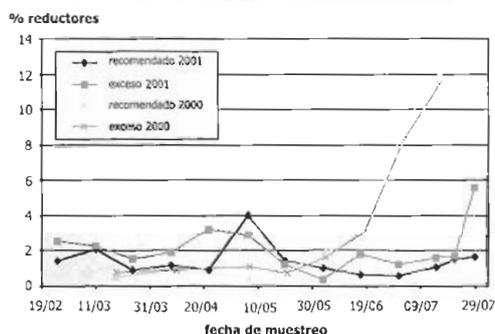


Figura 6. Representación comparativa del total de azúcares reductores en los diferentes muestreos realizados en el ensayo del abonado.

abonado nitrogenado presentan una proporción algo mayor de azúcares reductores que aquellas a las que se les proporcionó la dosis recomendada. Sin embargo, lo más llamativo es que el perfil de variación de estos azúcares con el tiempo es bastante diferente de lo observado en la campaña 1999-2000 para un ensayo similar. Ahora, la proporción de reductores sufre variaciones considerables durante los primeros meses, tendiendo incluso a aumentar, para caer a valores mínimos a finales de mayo o principios de junio. A partir de ahí los reductores aumentan progresivamente, si bien este aumento es mucho menos

para cada medida. Sin embargo, la posibilidad de utilizar papilla o serrín producido en AIMCRA a partir de muestras más representativas quedó descartada al observarse un aumento significativo de azúcares reductores en comparación con las muestras procesadas en el laboratorio (ver apartado anterior). Con objeto de garantizar al menos la comparabilidad de resultados con los obtenidos por los restantes grupos que participaron en el Proyecto, en esta campaña las muestras analizadas proceden de las mismas plantas, procesadas conjuntamente. Asimismo se convino adelantar los muestreos al mes de febrero. Los ensayos que se han analizado son:

- (a) Ensayo de dosis de abonado; variedad Claudia; finca La Caridad (Alcalá del Río).
- (b) Ensayo de estrés hídrico; variedades Ramona y Claudia; finca La Caridad.
- (c) Ensayo de variedades; variedades Monatuno y Claudia; Écija.
- (d) Ensayo de inhibición de la floración; variedad Claudia; finca La Caridad.

ENSAYO DE DOSIS DE ABONADO

Se compararon dos condiciones extremas: aporte de nitrógeno recomendado frente a tratamiento con un exceso de 300 UF. En general, las plantas tratadas con un exceso de

pronunciado que en la campaña anterior (Fig. 6). Otra diferencia significativa es que en la campaña 2000-2001 la relación final de glucosa:fructosa es mucho mayor, del orden de 3 a 1 frente a 1,2:1 en la campaña anterior. Estas tendencias se repiten, de hecho, en todos los ensayos llevados a cabo, lo que induce a pensar que sea debida a factores generales de tipo climatológico.

ENSAYO DE ESTRÉS HÍDRICO

Los resultados de este ensayo indican que diferencias en el aporte de agua no se traducen en diferencias significativas en el contenido de azúcares reductores. Sí hay, en cambio, diferencias importantes en el comportamiento de las dos variedades consideradas en este ensayo. Así, la proporción total de reductores se mantiene, en general, mayor en Claudia que en Ramona, siendo además más variable en la primera. La diferencia se hace mucho más importante al final de la campaña, siendo 12 veces mayor en el muestreo del 29 de julio. En el caso de la variedad Ramona, de hecho, no se observa prácticamente el aumento final de reductores (Fig. 7).

Total reductores ensayo de riego (variedad Claudia vs Ramona)

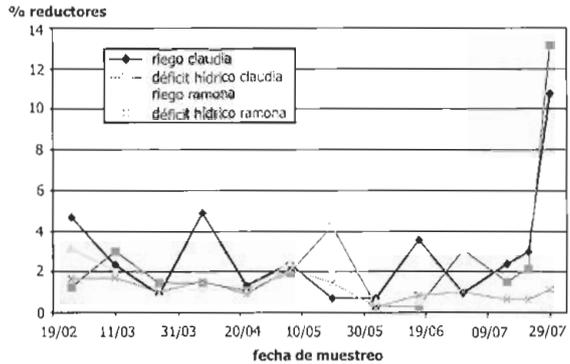


Figura 7. Representación comparativa del total de azúcares reductores en los diferentes muestreos realizados en el ensayo de estrés hídrico.

Total reductores ensayo de variedades (claudia vs monatunno) campaña 2000 y 2001

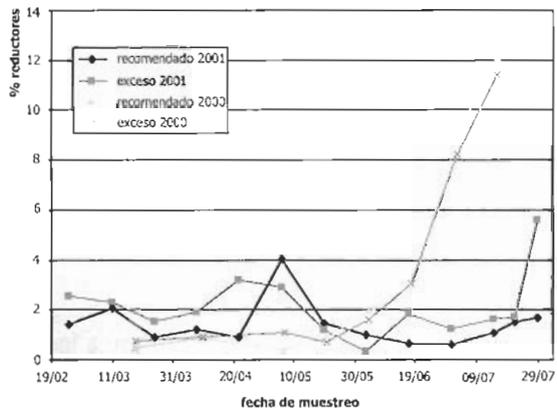


Figura 8. Representación comparativa del total de azúcares en los diferentes muestreos realizados en el ensayo de variedades.

ENSAYO DE VARIEDADES

La tendencia de la variación de los azúcares reductores es similar en las variedades Claudia y Monatunno: descenso durante los primeros meses hasta alcanzar un mínimo a principios de junio y aumento posterior. Este aumento es mucho menos acusado en la campaña 2000-2001 que en la 1999-2000, siendo la proporción final algo mayor

para la variedad Claudia (Fig. 8). Una vez más, se observa una elevada proporción glucosa:fructosa.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA FLORACIÓN

Se analizó el contenido de glucosa y fructosa para muestras tratadas de 0 a 3 veces, en distintas fechas, con el inhibidor de la floración *paclobutrazol*, sin que se observase ninguna correlación entre estos tratamientos y el contenido de azúcares reductores (Fig. 9). En este sentido, puede concluirse que el tratamiento con *paclobutrazol* no induce una pérdida de calidad de la remolacha.

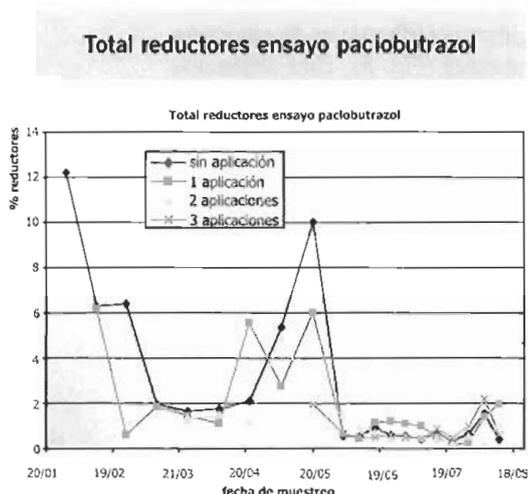


Figura 9. Representación comparativa del total de azúcares reductores en los diferentes muestreos realizados en el ensayo de inhibición de la floración

ANÁLISIS DE MUESTRAS PROCEDENTES DEL PROCESADO INDUSTRIAL

El método analítico también se ha aplicado al análisis de muestras procedentes de prácticamente todas las etapas relativas al procesado de la remolacha por la industria azucarera, incluyendo jugo de difusión, jugo depurado, jarabe, miel de 1ª, melaza y vinaza. Los resultados indican una disminución del orden del 50-60% en azúcares reductores al pasar del jugo de difusión al jugo depurado. La proporción relativa de azúcares reductores permanece después prácticamente constante a lo largo de las diferentes etapas del proceso hasta la melaza (ver Fig. 10). En la vinaza el contenido de azúcares es mínimo. No obstante, tras un proceso de preconcentración consistente en acetilación de la mezcla, separación cromatográfica y desacetilación, se puso de manifiesto la presencia de DAFs en esta fracción (ver Fig. 11). Queda por determinar en qué etapa se forman y si tienen alguna incidencia en el rendimiento industrial. En cualquier caso, un experimento de laboratorio confirmó que los DAFs, a diferencia de la glucosa, fructosa y sacarosa, no son metabolizados por las levaduras, por lo que deben quedar inalterados durante la fermentación de la melaza en las alcoholeras.

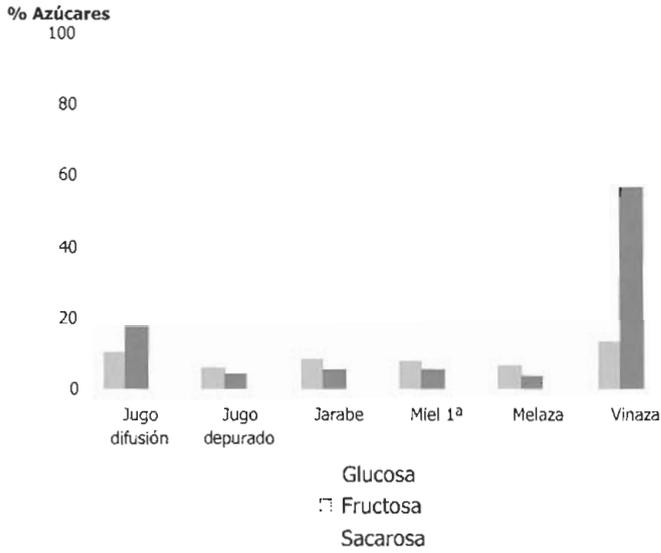


Figura 10. Proporciones relativas de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras procedentes de las diferentes etapas del procesado industrial de la remolacha azucarera.

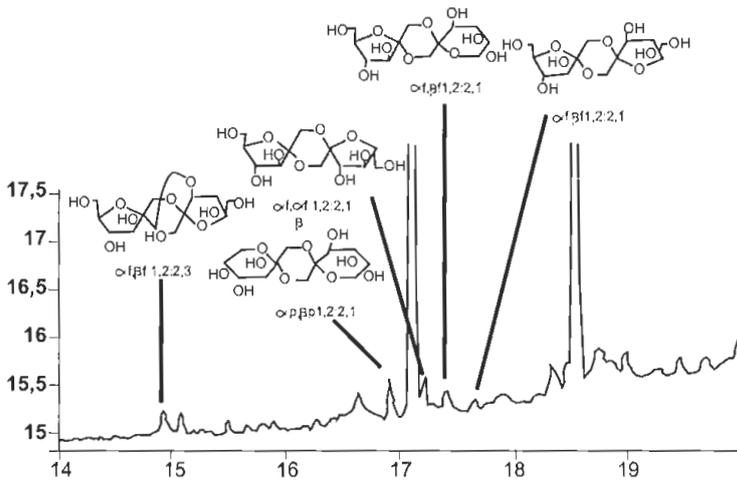


Figura 11. Cromatograma de gases de una muestra de vinaza. Se indican las estructuras de los DAFs mayoritarios.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La cromatografía de gases es una técnica muy apropiada para el análisis, identificación y cuantificación de azúcares en muestras de remolacha y en muestras procedentes de la industria azucarera.

- El tiempo transcurrido entre la trituración de la raíz y la extracción de los azúcares (o su congelación) es un parámetro clave en la proporción de azúcares reductores en el jugo, aumentando también éstos con la disminución del tamaño de las partículas.

- El porcentaje de azúcares reductores en la raíz de remolacha experimenta un incremento importante a partir del mes de mayo, coincidiendo con temperaturas máximas medias superiores a 25°C. En general, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes ensayos efectuados.

- Si bien los perfiles de variación de la proporción de azúcares reductores en la campaña 2000-2001 presentan un aumento al final de la campaña, como en la precedente, este aumento es mucho menos acusado. La mayor proporción de reductores, junto con una variabilidad de los datos también mayor, durante los primeros meses puede deberse a la mayor pluviometría registrada esta campaña y estar relacionada con el metabolismo de la planta en esta fase cuando el aporte hídrico es abundante. Parece significativo el hecho de que un aporte tardío de agua (campaña 1999-2000), con bajos reductores en las etapas iniciales de crecimiento de la planta, se traduzca en un aumento mucho más acusado de la proporción de reductores al final, especialmente de fructosa. Es posible que un riego temprano sea importante para evitar este efecto.

- En cualquier caso, parece que el ciclo de desarrollo de la remolacha a lo largo de la campaña, para siembra otoñal al menos, tiene dos partes diferenciadas, según se desprende de los resultados obtenidos en este subproyecto y de los datos de los restantes subproyectos: una fase inicial hasta finales de mayo, en la que la variabilidad de los datos puede ser mayor, y una fase final a partir de ese momento con una variación más lineal y que, por lo que a nuestros datos se refieren, conducen a una pérdida de calidad.

- La variedad Ramona es una notable excepción a lo anterior. En ella, esta segunda fase no se produce, o al menos no conduce al aumento en la proporción de reductores observado en el caso de Claudia o Monatuno.

- La utilización de paclobutrazol como inhibidor del espigado parece una opción prometedora. El efecto inhibidor no afecta al contenido de azúcares reductores en la raíz.

- Los análisis efectuados ponen de manifiesto la ausencia de DAFs en la remolacha. No existen, por lo tanto, sistemas enzimáticos en la planta que catalicen su formación a partir de sacarosa o fructosa.

• En el procesado industrial de la ramolacha sí se fermentados por las levaduras en las alcoholeras, se acumula no obstante, es muy pequeña y constituye una fracción ma cualquier caso, este resultado permite predecir que si se pro a partir de melazas, previamente a la fermentación, las vin enriquecidas en DAFs, lo que podría suponer una mejora su nutricionales. Esto abre una perspectiva interesante para la como aditivos en la preparación de piensos destinados

BIBLIOGRAFÍA

- ⁽¹⁾ H. Li, W. Zhu, W., C. Yokoyama, N. Harada, *Carbohydr. Res.*
- ⁽²⁾ M. Manley-Harris, B. K. Nicholson, R. A. Thomson, *J. Carboh*
- ⁽³⁾ K. Tanaka, T. Uchiyama, A. Ito, *Biochim. Biophys. Acta*
- ⁽⁴⁾ K. Tanaka, K. Sonobe, T. Uchiyama, T. Matsuyama, *Carb* 344.
- ⁽⁵⁾ T. Matsuyama, K. Tanaka, M. Mashiko, M. Kanamoto, *J.* 1328.
- ⁽⁶⁾ K. Haraguchi, M. Kishimoto, K. Seki, K. Hayashi, S. Kob *Agric. Biol. Chem.* 1988. 52, 291-292.
- ⁽⁷⁾ M. Kawamura, Takahashi, T. Uchiyama, *Agric. Biol. Cher*
- ⁽⁸⁾ T. Matsuyama, K. Tanaka, T. Uchiyama, *Agric. Biol. Cher*
- ⁽⁹⁾ L. M. J. Verstraeten, *Adv. Carbohydr. Chem.* 1967. 22, 2
- ⁽¹⁰⁾ M. Manley-Harris, G. N. Richards, *Adv. Carbohydr. Chem. Bi*
- ⁽¹¹⁾ J. Defaye, A. Gadelle, C. Pedersen, *Carbohydr. Res.* 198
- ⁽¹²⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Carbohydr. Res.* 199
- ⁽¹³⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Carbohydr. Res.* 199
- ⁽¹⁴⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Carbohydr. Res.* 199
- ⁽¹⁵⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Carbohydr. Res.* 199
- ⁽¹⁶⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Zuckerindustrie* 199

• En el procesado industrial de la ramolacha sí se forman DAFs que, al no ser fermentados por las levaduras en las alcoholeras, se acumula en la vinaza. Su proporción, no obstante, es muy pequeña y constituye una fracción marginal en este producto. En cualquier caso, este resultado permite predecir que si se provoca la formación de DAFs a partir de melazas, previamente a la fermentación, las vinazas resultantes resultarían enriquecidas en DAFs, lo que podría suponer una mejora sustancial de sus propiedades nutricionales. Esto abre una perspectiva interesante para la potenciación de las vinazas como aditivos en la preparación de piensos destinados a la alimentación animal.

BIBLIOGRAFÍA

- ⁽¹⁾ H. Li, W. Zhu, W., C. Yokoyama, N. Harada, *Carbohydr. Res.* 1997. 299, 301.
- ⁽²⁾ M. Manley-Harris, B. K. Nicholson, R. A. Thomson, *J. Carbohydr. Chem.* 2003. 22, 1-8.
- ⁽³⁾ K. Tanaka, T. Uchiyama, A. Ito, *Biochim. Biophys. Acta* 1972. 284, 248-256.
- ⁽⁴⁾ K. Tanaka, K. Sonobe, T. Uchiyama, T. Matsuyama, *Carbohydr. Res.* 1979. 75, 340-344.
- ⁽⁵⁾ T. Matsuyama, K. Tanaka, M. Mashiko, M. Kanamoto, *J. Biochem.* 1982. 92, 1325-1328.
- ⁽⁶⁾ K. Haraguchi, M. Kishimoto, K. Seki, K. Hayashi, S. Kobayashi, K. Kainuma, *Agric. Biol. Chem.* 1988. 52, 291-292.
- ⁽⁷⁾ M. Kawamura, Takahashi, T. Uchiyama, *Agric. Biol. Chem.* 1988. 52, 3209-3210.
- ⁽⁸⁾ T. Matsuyama, K. Tanaka, T. Uchiyama, *Agric. Biol. Chem.* 1991. 55, 1413-1414.
- ⁽⁹⁾ L. M. J. Verstraeten, *Adv. Carbohydr. Chem.* 1967. 22, 229-305.
- ⁽¹⁰⁾ M. Manley-Harris, G. N. Richards, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1997. 52, 207-266.
- ⁽¹¹⁾ J. Defaye, A. Gadelle, C. Pedersen, *Carbohydr. Res.* 1985. 136, 53-65.
- ⁽¹²⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Carbohydr. Res.* 1994. 251, 17-31.
- ⁽¹³⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Carbohydr. Res.* 1994. 251, 1-15.
- ⁽¹⁴⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Carbohydr. Res.* 1992. 237, 223-247.
- ⁽¹⁵⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Carbohydr. Res.* 1994. 251, 1-15.
- ⁽¹⁶⁾ J. Defaye, J. M. García Fernández, *Zuckerindustrie* 1995. 120, 700-704.

- ⁽¹⁷⁾ M. Manley-Harris, G. N. Richards, *Carbohydr. Res.* 1996. 287, 183-202.
- ⁽¹⁸⁾ T. J. Christian, M. Manley-Harris, R. J. Field, B. A. Parker, *J. Agric. Food Chem.* 2000. 48, 1823-1837.
- ⁽¹⁹⁾ K. Minamida, K. Shiga, I. N. Sujaka, T. Sone, A. Yokota, H. Hara, K. Asano, F. Tomita, *J. Biosci. Bioeng.* 2005. 99, 230-236.
- ⁽²⁰⁾ H. Hara, K. Kondo, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005. 69, 839-841.
- ⁽²¹⁾ A. Tamura, T. Shiomi, N. Tamaki, N. Shigematsu, F. Tomita, H. Hara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004. 68, 1882-1887.
- ⁽²²⁾ M. Manley-Harris, G. N. Richards, *Zuckerindustrie* 1994. 119, 924-928.
- ⁽²³⁾ M. Tanaka, Y. Nakajima, K. Nishio, H. Hashimoto, *J. Carbohydr. Chem.* 1993. 12, 49-61.
- ⁽²⁴⁾ J. I. Orban, J. A., Patterson, A. L. Sutton, G. N. Richards *Poultry Sci.* 1997. 76, 482-490.
- ⁽²⁵⁾ V. Ratsimba V., J. M. García Fernández, J. Defaye, H. Nigay, A. Voilley *J. Chromatogr. A* 1999. 844, 283-293.
- ⁽²⁶⁾ J. M. Benito, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. Defaye, *Org. Lett.* 2001. 3, 549-552.
- ⁽²⁷⁾ E. M. Rubio, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Org. Lett.* 2003. 5, 873-876.
- ⁽²⁸⁾ J. M. Benito, E. M. Rubio, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Tetrahedron* 2004. 60, 5899-5906.
- ⁽²⁹⁾ E. M. Rubio, M. I. García-Moreno, P. Balbuena, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Org. Lett.* 2005. 7, 729-731.

AGRICULTURA

GANADERÍA

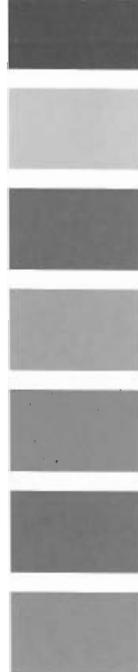
PESCA Y ACUICULTURA

POLÍTICA, ECONOMÍA Y SOCIOLOGÍA AGRARIA

FORMACIÓN AGRARIA

CONGRESOS Y JORNADAS

R.A.E.A



ISBN 84-8474-1 4-8



9

788484 741640

P.V.P.: 9 €



JUNTA DE ANDALUCIA

Consejería de Agricultura y Pesca