

Metabolismo del Nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L. Bajo Déficit Hídrico¹

M. Castrillo*, D. Fernández*, P. Fernández*, B. Molina*, A. Kazandjian*

ABSTRACT

Twelve-day-old bean plants cv. Tacarigua were under water deficit. Decreasing water potential and relative water content were observed. Water deficit resulted in a sudden decrease in nitrate reductase activity and fluctuations in ammonium content. Protein content showed a 56 per cent decrease followed by a 74 per cent increase. Under moderate water deficit, an initial protein degradation appeared to take place, followed by protein synthesis at the expense of accumulated reduced nitrogen. Leaf protein is probably being used as a source of reduced nitrogen for new protein synthesis.

COMPENDIO

Plantas de frijol ("caraota") con doce días de edad de la variedad Tacarigua fueron sometidas a déficit hídrico. Se observó una disminución en los valores del potencial hídrico y el contenido relativo de agua. El drástico descenso en la actividad nitrato-reductasa fue detectado al comienzo del déficit hídrico. El contenido de amonio se mantuvo en altos niveles, mostrando fluctuaciones. En los valores del contenido de proteínas se observó una disminución de un 56 % seguida por un incremento del 74 por ciento. Estos resultados podrían sugerir que, en condiciones de déficit hídrico moderado, se produce una inicial degradación de proteínas seguida por una síntesis proteica a expensas del nitrógeno reducido acumulado. Probablemente las proteínas foliares sirven como fuente de nitrógeno reducido para la síntesis de nuevas proteínas.

INTRODUCCION

Un aspecto importante del metabolismo para el desarrollo de las plantas, es la capacidad de sintetizar proteínas estructurales y enzimas para el reemplazo y recambio. La mayoría de la literatura indica que el déficit hídrico induce una disminución en la síntesis de proteínas (8, 14), ya que en plantas sometidas a déficit hídrico —remolacha y trigo (14), frijoles y avena (8)—, se observa una reducida relación proteína-aminoácido. Hsiao (14) informa que en hojas de maíz en expansión, la población de polisomas es reducida a causa de un desacoplamiento de las unidades ribosomales de ANRm. Otros investigadores señalan la posibilidad de establecer una relación entre la capacidad de los tejidos para conservar los polirribosomas bajo déficit hídrico y su resistencia a la sequía (6)

Hanson y Hitz (12) indican que la degradación de proteínas durante el estrés hídrico asegura una fuente

de nitrógeno necesaria para la supervivencia de la planta. Asimismo, Dhindsa y Cleland (8) sugieren que el estrés hídrico causa en coleóptilos de avena una diferencial inhibición en la síntesis de proteínas, obteniéndose también niveles diferenciales de enzimas.

Por otra parte, la disminución de la actividad nitrato reductasa (ANR) por efecto del déficit hídrico ha sido reportada por varios autores (16, 26, 3, 15, 2, 24, 4). Se ha discutido la razón de la disminución de la ANR en hojas, por efecto del déficit hídrico, planteándose varias alternativas: pérdida de la actividad enzimática debido a un decrecimiento de NO_3^- en el flujo del xilema que llega al "pool" metabólico, asociado con la regulación de nitrato reductasa (NR) (20, 21); una menor tasa de síntesis de la enzima y/o aumento en la tasa de degradación de la enzima

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, puede inferirse que el déficit hídrico influencia de manera notable, secuencial y diferencial el metabolismo de nitrógeno en la planta.

El presente trabajo pretende evaluar el efecto del déficit hídrico moderado sobre la ANR, el contenido de proteínas y de amonio en plantas de frijol, *Phaseolus vulgaris* var Tacarigua

¹ Recibido para publicación el 26 de enero de 1989
Agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) a través del Proyecto S1-1325 y al Decanato de Investigaciones de la Universidad "Simón Bolívar" por el soporte financiero

* Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar. Apdo Postal 89000, Caracas 1080 A, Venezuela.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Ciento cincuenta semillas de frijol de la variedad Tacarigua fueron germinadas en bandejas con papel secante. Siete días después las plántulas fueron transplantadas a potes de tres litros (una planta por pote) que contenía una mezcla de tierra-turba-arena (1-1-1) esterilizada en estufa a 120 °C por 24 horas. Las plantas fueron regadas regularmente y abonadas semanalmente con una solución de Nitroplant 11-18-20, 100 ml de concentración aproximada al 1.5 g/l suplementado con KNO₃ un gramo por litro.

Cuando las plántulas tenían 12 días de edad, el riego les fue suspendido a cincuenta de ellas (SR), mientras que el resto se le continuó regando (CR) (control). En una muestra de cinco plantas (réplicas), se midió el potencial hídrico, contenido relativo de agua, ANR, proteínas y amonio. Las mediciones fueron realizadas a los 0, 6 y 12 días después de suspender el riego en el tratamiento correspondiente. Para la primera medición se usaron hojas primarias, y en las siguientes se empleó la primera hoja trifoliada.

Potencial hídrico (Y_w) y contenido relativo de agua (CRA)

Las mediciones de estos parámetros del estado hídrico foliar fueron realizadas al amanecer. El potencial hídrico se midió en discos de hojas, previa equilibración en una cámara C-52 (Wescor) unida a un microvoltímetro de punto de rocío (Wescor). El CRA se determinó usando el método de Turner (22).

Actividad Nitrato Reductasa (EC 1.6.6.1), (ANR)

Se siguió el método reportado por Guerrero (11). Se pesaron 0.2 g de hojas frescas en un cuadrado de 4 mm², añadiéndose al medio de incubación, que contenía: buffer fosfato pH 7.7, 0.1 M; KNO₃ e isopropanol 1% (v/v). La mezcla fue burbujeada con argón, mantenida en oscuridad a 30 °C, tomando alícuotas de 0.5 ml a 0, 10 y 30 minutos para la determinación de nitritos.

Estimación de proteínas

Las proteínas fueron extraídas en buffer fosfato 0.1 M pH 7.7 y precipitadas con ácido tricloroacético al 15%, midiendo su contenido por el método de Bradford (7).

Determinación del amonio

Para la digestión de las muestras secas se empleó el método de Alder y Wilcox (1), utilizándose el mé-

todo reportado por Nelson (18) para la determinación de amonio en las muestras digeridas.

RESULTADOS Y DISCUSION

En las Figs. 1 y 2 se muestran los valores medidos de CRA y Y_w en las hojas de plantas sin riego (SR) y con riego (CR) (control), observándose una disminución de estos parámetros del estado hídrico foliar en las plantas (SR) a lo largo del período de medición.

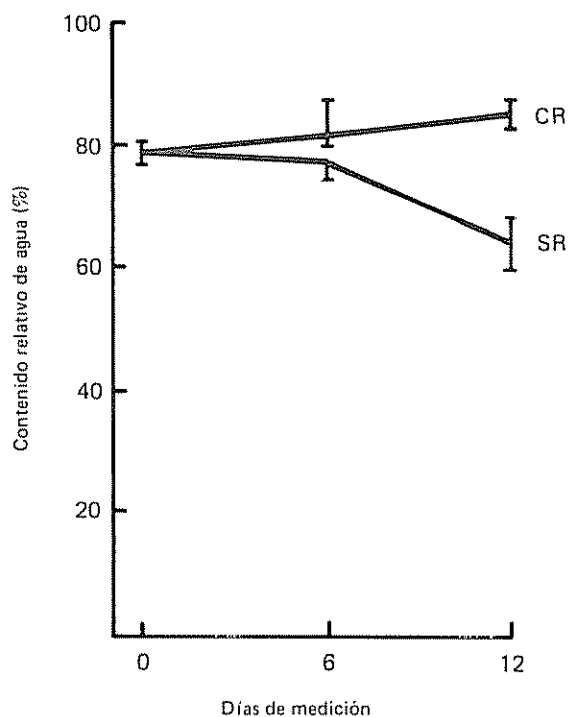


Fig. 1. Contenido relativo de agua (%) en hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. var. Tacarigua sometidas a déficit hídrico (sin riego, SR) y controles (con riego, CR) durante el período de medición. Cada punto representa el promedio de cinco mediciones; las barras verticales muestran la desviación estándar.

La Fig. 3 muestra la ANR foliar expresada como porcentaje del control (CR) (moles NO₂⁻·kg⁻¹·h⁻¹) durante el período de medición. Las plantas sin riego (SR) muestran una notable disminución de ANR. Seis días después de suspender el riego ($Y_w = -0.925$ MPa, CRA = 77%) (Figs. 1 y 2), la ANR es severamente reducida (40% de actividad respecto del control, CR) (Fig. 3), debido a la disminución de nitratos en el flujo del xilema (20, 21). Doce días después de la suspensión del riego ($Y_w = -2.0$ MPa, CRA = 66%) la ANR disminuye al 8% respecto del control (CR)

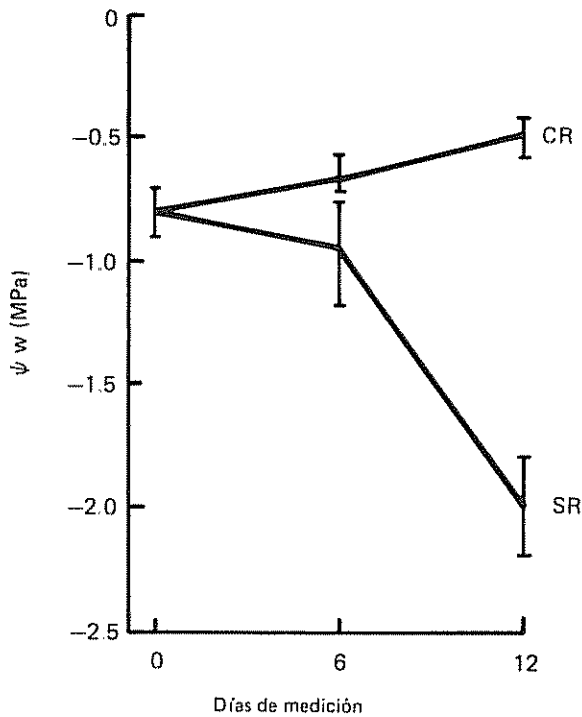


Fig. 2. Potencial hídrico (MPa) en hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. var. Tacarigua sometidas a déficit hídrico (sin riego, SR) y controles (con riego, CR) durante el período de medición. Cada punto representa el promedio de cinco mediciones; las barras verticales muestran la desviación estándar

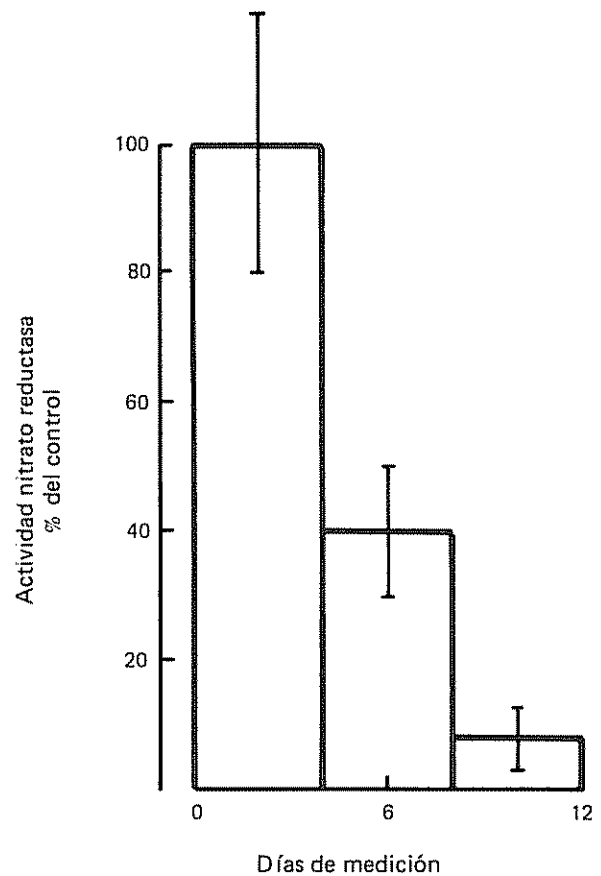


Fig. 3. Actividad nitrato reductasa foliar en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. var. Tacarigua sometidas a déficit hídrico (sin riego, SR), expresada como porcentaje respecto a los valores obtenidos en plantas controles (con riego, CR), durante el período de medición. Se muestran los promedios de cinco réplicas analizadas en cada día de medición; las barras verticales muestran la desviación estándar.

(Fig. 3). Es ampliamente conocido, que esta enzima es inducida por su sustrato (NO_3^-) (25); pudiendo ser la poca disponibilidad de nitratos, la causa de la drástica disminución de ANR observada en el presente trabajo.

Los valores del contenido de amonio expresados como porcentaje del control ($\text{g/kg}^{-1}\text{PS}$), presentan fluctuaciones no acentuadas (Fig. 4), siguiendo una tendencia diferente a la presentada en la Fig. 3 para la ANR. El contenido de proteínas foliares expresado como porcentaje del control ($\text{g/kg}^{-1}\text{PS}$) se muestra en la Fig. 5, observándose fluctuaciones acentuadas, disminución del 56 % respecto de las plantas de control (CR) para el sexto día sin riego seguida de un incremento al 74 % en cuanto al control

Los valores del contenido de amonio obtenidos en hojas de plantas bajo déficit hídrico moderado, muestran valores altos y pequeñas fluctuaciones (Fig. 4). Al respecto ha sido reportada una acumulación de formas reducidas de nitrógeno (12), en plantas sometidas al estrés hídrico. Las evidencias sustentan la idea de que la falta de agua disminuye a gran escala el su-

plemento de NO_3^- en la planta por absorción de la raíz; entonces el nitrógeno reducido encontrado en las plantas bajo déficit hídrico puede provenir de otras vías metabólicas que no son del "pool" interno de nitrato, procedente del flujo del xilema, lo cual explica los altos valores obtenidos en este trabajo.

La síntesis proteica puede inicialmente inhibirse en forma reversible en tejidos jóvenes bajo déficit hídrico, lo cual ha sido asociado con un desarreglo de los polisomas (5, 17, 19).

Lo arriba expuesto concuerda con los actuales resultados, donde se observa una marcada reducción y un incremento posterior en el contenido de proteínas en hojas de plantas bajo déficit hídrico, que pudiera ser interpretado como una inicial degradación de pro-

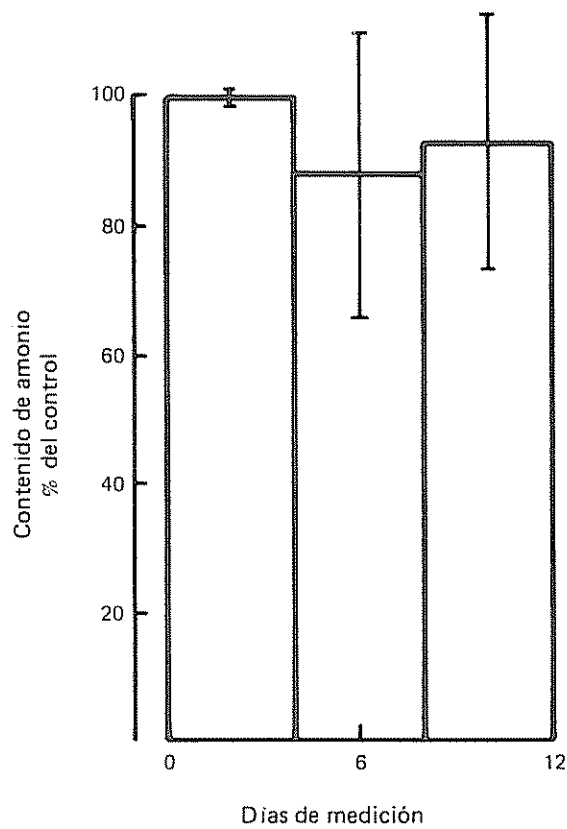


Fig. 4. Contenido de amonio foliar en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. var Tacarigua sometidas a déficit hídrico (sin riego, SR) expresado como porcentaje respecto a los valores obtenidos en plantas controles (con riego, CR), durante el periodo de medición. Se muestran los promedios de cinco réplicas analizadas en cada día de medición; las barras verticales muestran la desviación estándar.

teínas, sustentada por los valores del contenido de amonio y una posterior síntesis a expensas del amonio acumulado, evidenciando un reajuste en el metabolismo del nitrógeno en condiciones de déficit hídrico moderado, nivel al cual la ANR es severamente reducida (Fig. 3). Dungey y Davies (9) plantean que la degradación de proteínas puede tomar lugar bajo déficit hídrico. Nuevas proteínas sintetizadas, cambios cualitativos y cuantitativos en el patrón de aquellas bajo estrés hídrico han sido reportados (13, 23).

Los resultados logrados en este trabajo muestran una disminución drástica de la ANR a consecuencia de la merma de nitratos procedentes del flujo del xilema; una inicial disminución del contenido de proteínas causada por degradación, lo cual es mantenido por los altos valores del contenido de amonio logrados y un subsecuente aumento en el contenido de proteínas, que indica una nueva síntesis proteica.

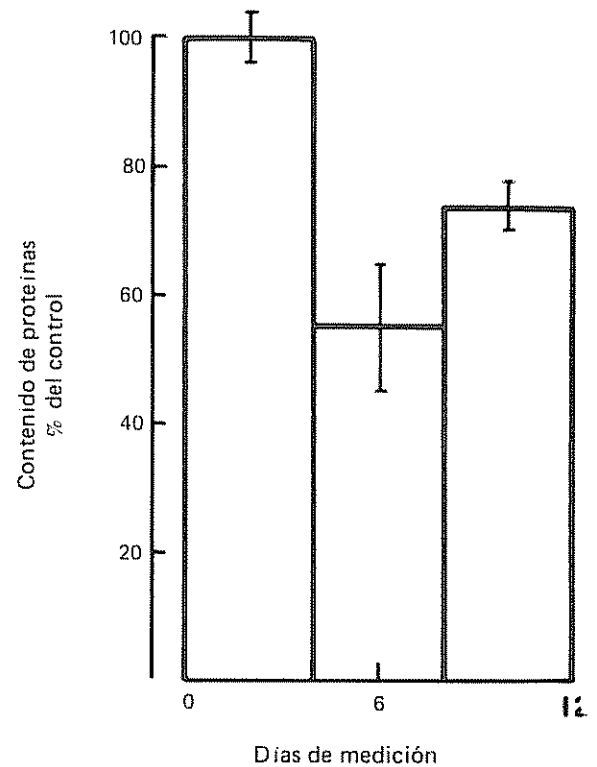


Fig. 5. Contenido de proteínas foliares en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. var Tacarigua sometidas a déficit hídrico (sin riego, SR) expresado como porcentaje respecto a los valores obtenidos en plantas controles (con riego, CR), durante el periodo de medición. Se muestra el promedio de cinco réplicas analizadas en cada día de medición; las barras verticales representan la desviación estándar.

La reducida ANR y el balance entre los contenidos de amonio y proteínas, observados en el presente trabajo nos permite concluir que en plantas de *Phaseolus vulgaris* var Tacarigua sometidas a un moderado déficit hídrico, hubo una inicial degradación de proteínas y una subsecuente síntesis proteica a expensas del nitrógeno reducido acumulado, producto de la inicial degradación, lo cual denotaría un reajuste en el que las proteínas foliares actúan como fuente de N reducido para la síntesis de nuevas proteínas.

LITERATURA CITADA

- 1 ALDER, P.R.; WILCOX, G.E. 1985. Rapid perchloric acid digest methods for analysis of major elements in plant tissue. *Soil Science Plant Annals* 16:1153-1163.

2. APARICIO-TEJO, P.; SANCHEZ-DIAZ, M. 1982. Nodule and leaf nitrate reductases and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L. under water stress. *Plant Physiology* 69:479-482.
3. BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 20:495-522.
4. BERGARECHE, C.; SIMON, E. 1988. Nitrate reductase and nitrate content under two forms and three levels of nitrogen nutrition in *Lolium perenne* L. *J. Plant Physiology* 132:28-33.
5. BEWLEY, J.D.; LARSEN, K.M. 1980. Cessation of protein synthesis in water stressed pea roots and maize mesocotyls without loss of polyribosomes. Effects of lethal and non-lethal water stress. *Journal of Experimental Botany* 31:1124-1156.
6. BEWLEY, J.D. 1981. Protein synthesis. In *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Ed by L.G. Paleg; D. Aspinall. Sidney Academic Press. p. 261-282.
7. BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry* 72:248-254.
8. DHINDSA, R.S.; CLELAND, R.E. 1975. Water stress and protein synthesis. I. Differential inhibition of protein synthesis. *Plant Physiology* 55:778-781.
9. DUNGEY, N.O.; DAVIES, D.D. 1982. Protein turnover in the attached leaves of non-stressed and stressed barley seedlings. *Planta* 154:435-440.
10. FOKUTOKU, Y.; YAMADA, Y. 1981. Diurnal changes in water potential and free amino acid content of water stressed and non stressed soybean plant. *Soil Science and Plant Nutrition* 27:195-204.
11. GUERRERO, M.G. 1982. In *Techniques in bioproduktivty and photosynthesis*. Ed by J. Coombs; D.O. Hall. Oxford, Pergamon Press. p. 125-127.
12. HANSON, A.D.; HITZ, W.D. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annual Review of Plant Physiology* 33:163-203.
13. HEIKKILA, J.J.; PAPP, J.E.T.; SCHULTZ, G.A.; BEWLEY, J.D. 1984. Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid and wounding. *Plant Physiology* 76:270-274.
14. HSIAO, I.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24:519-570.
15. HUFFAKER, R.C.; RADIN, I.; KLEINKOPF, G.E.; COX, E.L. 1970. Effects of mild water stress on enzymes of nitrate assimilation and of the carboxylative phase of photosynthesis in barley. *Crop Science* 10:471-474.
16. MATTAS, R.E.; PAULI, A.W. 1965. Trends in nitrate reduction and nitrogen fraction in young corn (*Zea mays* L.) plants during heat and moisture stress. *Crop Science* 5:181-184.
17. MORILLA, C.; BOYER, J.S.; HAGEMAN, R.H. 1973. Nitrate reductase activity and polyribosomal content of corn (*Zea mays* L.) having low leaf water potential. *Plant Physiology* 51:817-824.
18. NELSON, D.W. 1983. Determination of ammonium in KCl extracts of soils by salicylate methods. *Soil Science and Plant Anal.* 14:1051-1062.
19. RHODES, P.R.; MATSUDA, K. 1976. Water stress, rapid polyribosome reduction and growth. *Plant Physiology* 58:631-635.
20. SHANNER, D.L.; BOYER, J.S. 1976a. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiology* 58:499-504.
21. SHANNER, D.L.; BOYER, J.S. 1976b. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiology* 58:505-509.
22. TURNER, N.C. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurements of plant status. *Plant and Soil* 58:339-366.
23. VARTANIAN, N.C.; DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D. 1987. Drought-induced changes in protein patterns of *Brassica napus* var *oleifera* roots. *Plant Physiology* 84:989-992.
24. VENKATARAMANA, S.; MOHAN NAIDU, K.; SINGH, S. 1987. Membrane thermostability and nitrate reductase activity in relation to water stress tolerance of young sugar cane plants. *New Phytology*.
25. VENNESLAND, B.; GUERRERO, M.G. 1978. Reduction of nitrate and nitrite. In *Encyclopedia of Plant Physiology*. Ed by M. Gibbs; E. Latzko. Berlin, Springer-Verlag. v. 6. p. 425-444.
26. YOUNIS, M.A.; PAULI, A.W.; MITCHELL, H.L.; STICKLER, F.C. 1965. Temperature and its interaction with light and moisture in nitrogen metabolism of corn (*Zea mays* L.) seedlings. *Crop Science* 5:321-326.