



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
ÁREA DE BIOLOGÍA VEGETAL

CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE ABSORCIÓN DE
NITRATO EN LOS CÍTRICOS E INFLUENCIA DE LA SALINIDAD
SOBRE LOS MISMOS

Memoria presentada por
MIGUEL CEREZO GARCÍA
para optar al grado de
DOCTOR en CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directores:

Dra. PILAR GARCÍA AGUSTÍN

Dr. EDUARDO PRIMO MILLO

Castellón, Julio 1998

Dña. PILAR GARCÍA AGUSTÍN, Dra. en Ciencias Biológicas, Titular de Universidad en el Área de Biología Vegetal del Departamento de Ciencias Experimentales de la Universitat Jaume I y D. EDUARDO PRIMO MILLO, Dr. Ingeniero Agrónomo, Jefe del Departamento de Citricultura del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

CERTIFICAN: Que la memoria titulada “Caracterización de los sistemas de absorción de nitrato en los cítricos e influencia de la salinidad sobre los mismos” que presenta Miguel Cerezo García para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Departamento de Ciencias Experimentales de la Universitat Jaume I bajo su dirección.

Y para que conste a todos los efectos y a petición del interesado, se expide el presente certificado en Castellón a cinco de junio de mil novecientos noventa y ocho.

Pilar García Agustín

Eduardo Primo Millo

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en:

Kinetics of nitrate uptake by *Citrus* seedlings and inhibitory effects of salinity. Cerezo, M., García-Agustín, P., Serna, M.D. y Primo-Millo, E. *Plant Science* (1997)

Igualmente, parte de los resultados han sido presentados en los siguientes foros:

9th Congress of the federation of European Societies of Plant Physiology. Brno, Czech Republic 1994.

IV Congreso Luso-Español de Fisiología Vegetal. XI Reunión Nacional de la S.E.F.V. Estoril, Lisboa 1995.

V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. XII Reunión Nacional de la S.E.F.V. Córdoba, España 1997.

A MI PADRE
A MI MADRE Y HERMANAS

Agradecimientos

El presente trabajo no es el fruto de un trabajo individual, sino de una labor colectiva, en la que han participado de una u otra forma muchas personas, a las que desde estas páginas quisiera expresar mi agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, la Dra. Pilar García Agustín y el Dr. Eduardo Primo Millo su apoyo incondicional durante el tiempo que he permanecido tanto en el Departamento de Citricultura del I.V.I.A. como en el Departamento de Ciencias Experimentales de la UJI. Gracias a su capacidad de trabajo, a su calidad científica y sobre todo a su gran calidad humana, esta tesis ha llegado a buen puerto. También quisiera hacer constar que la amistad que me ha ofrecido Pilar García Agustín durante todos estos años, ha sido uno de los mejores resultados de este trabajo.

Quisiera expresar mi agradecimiento a la Dra. Leonor Lapeña Barrachina. por haberme ofrecido ayuda y buenos consejos siempre que los he necesitado.

En 1993, cuando me incorporé al I.V.I.A., había un grupo de personas trabajando en fisiología vegetal, con ellos me familiaricé y aprendí algunos de los secretos de la fisiología y bioquímica vegetal. Rosaura Gazzola, Aurelio Gómez y Wadii Ben-Cheickh fueron mis compañeros de laboratorio con los que pasé momentos inolvidables durante casi un año; Niceto Muñoz me ayudó con los problemas informáticos y me enseñó las técnicas de ^{15}N y cientos de trucos de laboratorio; Angel Boix y Pepita Giner siempre me han ayudado a superar los momentos bajos. También debo agradecer el buen hacer de Lola Caballer, M José Benaches, M José Bañuls, a todos ellos quisiera dar mi más sincero agradecimiento por hacer que mi paso por el I.V.I.A. fuese lo más grato posible y a Manolo Talón y

Francisco Legaz por permitirme utilizar la infraestructura del Departamento de Citricultura, sin la que en parte este trabajo no habria podido realizarse.

En septiembre de 1993, me incorporé al área de Biología Vegetal del Departamento de Ciencias Experimentales de la Universitat Jaume I de Castellón. En este Departamento he aprendido lo que significan los términos trabajo e investigación. Recién incorporado, me encontré con que la investigación en este Departamento era básicamente química. Esto, en un primer momento me asustó, pero después aprendí a sacarle partido a la química y ésta me abrió puertas que me han ayudado mucho en mis investigaciones. Agradezco la ayuda prestada durante estos años a todos los compañeros de este Departamento, entre otros a los profesores Rosa Llusà y Toni Roig, a Eduardo Peris, del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, al personal administrativo (Merche Campos, Sergi Gil, Conchín Triguero, Vicente Mora y sobre todo a Begonya Herrero, por haber sabido afrontar los problemas propios y ajenos con tan buen humor) y en especial a todos aquellos pertenecientes al área de Química Orgánica, área a la que pertenece Beatriu Escuder, una amiga poco común. Poco a poco y durante el transcurso de estos años, el área de Biología Vegetal ha ido creciendo y a ella se han incorporado personas de gran calidad humana y gran capacidad de trabajo: M Carmen Miralles, Mireya Montalvan, Victor Flors y Victor Reboll. A todos ellos gracias por su amistad, su ayuda, su lealtad y paciencia.

A otras personas que me han aconsejado y resuelto muchas dudas y problemas durante estos años, deseo también expresar mi agradecimiento a Carmen González, Joaquín Moreno, Pedro Carrasco y Juli Pretó, todos ellos profesores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia. Asimismo, me gustaría expresar mi agradecimiento a M^a Amparo Montañana de La Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, por su paciencia y comprensión.

Quisiera reconocer la ayuda prestada por las personas que desde siempre han estado cerca de mí. Mis amigos, los “empresarios” y demás, los que han compartido mis éxitos y fracasos, haciendo los primeros más gratos y los últimos más llevaderos.

Por último, quiero dar las gracias a mi padre por su apoyo y la confianza que depositó en mí, y a mi madre, hermanas y sobrinos por su paciencia durante estos años.

Este trabajo ha sido financiado por la Consellería de Cultura, Educación y Ciencia de la Generalitat Valenciana.

ÍNDICE

Índice

1. Introducción y antecedentes bibliográficos.....	1
1.1. Absorción del nitrógeno por la planta.....	1
1.1.1. Absorción del nitrógeno.....	1
1.1.1.1. Factores que influyen en la absorción de nitrato.....	7
1.1.1.2. Asimilación del nitrógeno por la planta.....	9
1.1.2. Absorción del nitrógeno en los cítricos.....	15
1.1.2.1. Factores que influyen en la absorción del nitrógeno en plantas de cítricos.....	16
1.1.2.2. Asimilación del nitrógeno en plantas de cítricos.....	17
1.2. La salinidad. Un problema creciente en la agricultura.....	19
1.2.1. Clasificación de las plantas por su tolerancia a la salinidad: Halófitas y glicófitas.....	20
1.2.2. Tolerancia salina de las halófitas	22
1.2.2.1. Glándulas salinas	24
1.2.2.2. Adaptación morfológica.....	25
1.2.3. Tolerancia salina de las glicófitas.....	25
1.3. La salinidad y los cítricos.....	29
1.3.1. Efectos causados en el crecimiento y la cosecha.....	29
1.3.2. Utilización de patrones.....	32
1.3.3. Importancia de la variedad.....	39
1.3.4. Membranas celulares en condiciones salinas.....	40
1.3.5. Efectos causados en los parámetros de intercambio gaseoso.....	42
1.4. Interacción nitrato-cloruro.....	45
2. Objetivos y plan de trabajo.....	51
2.1. Objetivos.....	51
2.2. Plan de trabajo.....	52

3. Material y métodos.....	57
3.1. Material vegetal.....	57
3.2. Determinación cinética de la absorción del ion nitrato.....	59
3.3. Inhibición de la absorción de nitrato por sales.....	60
3.4. Efecto del tiempo de pretratamiento y la concentración de cloruro sódico en la absorción de NO_3^-	61
3.5. Efecto de los pretratamientos salinos sobre las concentraciones endógenas de Cl^- y ^{15}N en distintos órganos, la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ y la transpiración.....	61
3.6. Efecto de la luz y la humedad en la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ y la transpiración.....	63
3.7. Efecto del cloruro sódico en la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ en raíces aisladas.....	64
3.8. Efecto del tiempo de pretratamiento y la concentración de nitrato en la absorción del ion nitrato.....	64
3.9. Efecto del pH externo en la absorción de nitrato.....	65
3.10. Caracterización de los sistemas de transporte de alta afinidad: Efecto de algunos inhibidores sobre la absorción de nitrato.....	66
3.11. Caracterización del sistema de transporte de baja afinidad: Efecto de algunos inhibidores sobre la absorción de nitrato.....	67
3.12. Determinaciones analíticas.....	68
3.12.1. Determinación del ion nitrato.....	68

Índice

3.12.2. Determinación de la transpiración.....	69
3.12.3. Determinación del ion cloruro.....	69
3.12.4. Determinación del N total.....	69
3.12.4.1. Análisis de ^{15}N	70
3.12.5. Determinación de la actividad Nitrato Reductasa.....	75
3.12.6. Determinación de la proteína total.....	76
4. Resultados.....	81
4.1. Determinación cinética de la absorción del ion nitrato.....	81
4.2. Inhibición de la absorción de nitrato por sales.....	86
4.3. Efecto del tiempo de pretratamiento y la concentración de cloruro sódico en la absorción de nitrato.....	88
4.4. Efecto de los pretratamientos salinos sobre las concentraciones endógenas de Cl^- y ^{15}N en distintos órganos, la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ y la transpiración.....	91
4.5. Efecto de la luz y la humedad en la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ y en la transpiración.....	95
4.6. Efecto del cloruro sódico en la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ en raíces aisladas.....	97
4.7. Efecto del tiempo de pretratamiento y la concentración de nitrato en la absorción de nitrato.....	98
4.8. Efecto del pH externo en la absorción de nitrato.....	102
4.9. Caracterización de los sistemas de transporte de alta	

afinidad: Efecto de algunos inhibidores sobre la absorción de nitrato.....	103
4.10. Caracterización del sistema de transporte de baja afinidad: Efecto de algunos inhibidores sobre la absorción de nitrato.....	104
5. Discusión.....	111
6. Conclusiones.....	125
7. Referencias Bibliográficas.....	131

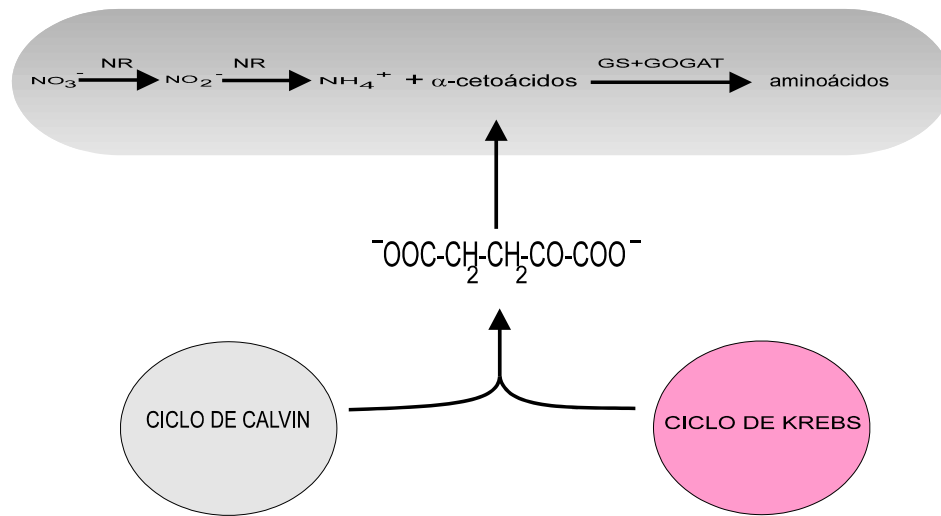
INTRODUCCIÓN

1. Introducción y antecedentes bibliográficos

1.1. Absorción del nitrógeno por la planta

1.1.1. Absorción del nitrógeno

La principal fuente de N inorgánico que absorbe la raíz de la planta, es en forma de NO_3^- , y en menor medida en forma de NO_2^- y NH_4^+ . El NO_3^- una vez en la planta, es reducido a NO_2^- por la enzima nitrato reductasa (NR, EC 1.6.6.1). La nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.7.1) reduce el NO_2^- a NH_4^+ y éste, junto con los α -cetoácidos provenientes del ciclo de Calvin, y en menor medida del ciclo de Krebs, dan lugar a aminoácidos (aa) por la acción de la glutamina sintasa (GS) y la glutamato sintetasa (GOGAT) (Lea y Mifflin, 1979; Guerrero y col., 1981):



Estos autores mostraron como el NO_3^- era absorbido por las plantas de maíz por la zona basal de la raíz primaria en las raíces laterales, translocándose éste rápidamente al resto de la raíz y a la parte aérea de la planta.

El transporte de NO_3^- desde la rizosfera hasta el citoplasma de las células corticales de la raíz es termodinámicamente desfavorable en términos de los gradientes de potencial eléctrico y de potencial químico. De hecho, la concentración de NO_3^- en los suelos está sujeta a grandes fluctuaciones (Barraclough, 1989), que normalmente se encuentran en un rango de entre 0.1 y 5 mM de NO_3^- (Novoa y Loomis, 1981; Barber, 1984). La concentración de NO_3^- , en el citoplasma de células radiculares de cebada expuestas a nitrato, se ha estimado entre 5 y 30 mM (Zhen y col., 1991; King y col., 1992). Asimismo se ha demostrado que excepto bajo determinadas condiciones (King y col., 1992), la absorción de NO_3^- requiere energía, presumiblemente como fuerza protónmotriz.

Utilizando métodos electrofisiológicos (McClure y col., 1990a, 1990b), encontraron que la hiperpolarización, causada por el NO_3^- , estaba estrechamente

Capítulo I

relacionada con la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de las raíces de maíz. En concreto, parece ser que funciona un simporte H^+/NO_3^- cuando la estequiometría H^+/NO_3^- es mayor que 1, el cual sería la causa de la estimulación de la H^+ -ATPasa. Glas y col., (1992) observaron este simporte en células radiculares de cebada, con una estequiometría de $2H^+/1NO_3^-$. Sin embargo, la presencia de un transportador del tipo simporte H^+/NO_3^- en vesículas membranosas aisladas de raíces de maíz, podría ser modulado por el estatus de NO_3^- de las células radiculares como demostraron Ruiz-Cristin y Briskin, (1991) y Lu y Briskin, (1993). Estas observaciones sugieren una estrecha relación entre el transporte de NO_3^- y la actividad de la H^+ -ATPasa de membrana, especialmente en condiciones de absorción de NO_3^- inducida. Matzke y Mengel, (1993) propusieron que la H^+ -ATPasa de membrana estaba implicada en la reabsorción de aniones, la cual se incrementaba al aumentar la absorción de NO_3^- . Santi y col., (1995), observaron que en raíces de maíz inducidas para la absorción de NO_3^- , la actividad de la H^+ -ATPasa de plasmalema, también se incrementaba.

A nivel cinético, la absorción de NO_3^- en plantas superiores ha sido bien caracterizada. La presencia de NO_3^- en el medio induce el desarrollo del sistema de absorción de NO_3^- (Tompkins y col., 1978; Deane-Drummond, 1984; Mac-Kown y McClure, 1988). Así, estudios de la absorción de NO_3^- en plantas de cebada muestran que el flujo de NO_3^- en la planta se reduce a concentraciones bajas de NO_3^- , mientras que a concentraciones altas del ion no se ve afectado (Glass y col., 1990). Esto se podría explicar mediante la existencia de dos sistemas de transporte para la absorción de NO_3^- , uno de baja afinidad y otro de alta afinidad para el ion nitrato. El de baja afinidad sería constitutivo y de primer orden respecto a la concentración externa de NO_3^- . El de alta afinidad sería inducible y saturable por la concentración externa de NO_3^- . También se ha estudiado en plantas de cebada que no han sido inducidas con NO_3^- , que existe un sistema saturable y constitutivo con una baja K_m , tanto para el NO_3^- como para el NO_2^- , y otro con una cinética lineal. El de baja K_m sigue una cinética típica de Michaelis-Menten y se satura con concentraciones entre 40 y 100

μM . El sistema lineal se encuentra en un intervalo de concentraciones de 100 a 500 μM de NO_3^- (Aslam y col., 1992). En cebada el NO_3^- es modulador de la absorción del mismo. La inducción del sistema de absorción del NO_3^- parece ser que depende de una concentración citoplasmática de NO_3^- crítica, pero cuando esa concentración es muy alta se transporta rápidamente a otros lugares, por lo que baja su concentración en la raíz, provocando una deinducción del sistema de absorción. Sin embargo, no está claro si la concentración de NO_3^- de la raíz "per se" o algún producto de la asimilación del NO_3^- son responsables de ese feedback negativo (Siddiqi y col., 1989).

En *C. reimandtii*, Derek y col., (1992) demostraron la inducibilidad del sistema de absorción del NO_3^- . También en esta especie, parece ser, que los mecanismos que controlan la inducción de la absorción del NO_3^- son dependientes de un fenómeno traslacional o post-traslacional. Es posible que la absorción de NO_3^- , dependiente de la inducción, se deba a que la célula regula la absorción de acuerdo con su capacidad de asimilación (Derek y col., 1992).

Agüera y col., (1990) demostraron en girasol, que el NO_2^- unicamente es inductor del sistema de absorción del mismo, y que la absorción de NO_3^- y NO_2^- está mediada por sistemas de transporte inducibles y dependientes de energía, distintos de los respectivos sistemas de reducción enzimática.

La mayoría de estos experimentos se hicieron en especies de cereales y se basaron en medidas químicas de la desaparición de NO_3^- de la solución nutritiva, lo que pudo causar errores al intentar determinar los flujos netos de NO_3^- . Siddiqi y col., (1990) utilizaron $^{13}\text{NO}_3^-$, en plantas de cebada, para comprobar la unidireccionalidad del influjo de NO_3^- en las raíces y confirmaron el patrón bifásico de absorción de

NO_3^- (¹HATS y ²LATS). El sistema de transporte de alta afinidad (HATS) con una cinética típica de Michaelis-Menten que opera a concentraciones de NO_3^- inferiores de 1 mM, y el sistema de transporte de baja afinidad por el NO_3^- (LATS) que opera a concentraciones de NO_3^- superiores a 1 mM y que generalmente sigue una cinética lineal (Doddema y Telkamp, 1979; Goyal y Huffaker, 1986; Pace y McClure, 1986; Siddiqi y col., 1990; Kronzucker y col., 1995a). En otros trabajos a este sistema de transporte se le denominó ³CHATS, por la aparición en plantas inducidas de un sistema de transporte de alta afinidad inducible (⁴IHATS). Las plantas no inducidas con NO_3^- mostraron el sistema de transporte de alta afinidad constitutivo (CHATS) con una cinética saturable (Lee y Drew, 1986; Behl y col., 1988; Klobus y col., 1988; Siddiqi y col., 1989, 1990; Hole y col., 1990). Debido a diferencias significativas en la K_m (Lee y Drew, 1986; Warner y Huffaker, 1989; Aslam y col., 1992) este sistema (CHATS), es considerado como un sistema genéticamente diferente del sistema de transporte de alta afinidad inducible (IHATS) (Rao y Rains, 1976; Doddema y Telkamp, 1979; Breteler y Nissen, 1982; Youngdahl y col., 1982; Clarkson y Lüttge, 1986; Goyal y Huffaker, 1986; Lee y Drew, 1986; Pace y McClure, 1986; Warner y Huffaker, 1989; Aguera y col., 1990; Hole y col., 1990; Siddiqi y col., 1990; Botella y col., 1994). Los valores de las K_m s encontrados para el IHATS en diferentes especies vegetales se encuentran en un intervalo de 5 a 200 μM (Bloom, 1985; Laine y col., 1993; Hasegawa e Ichii, 1994). En algunas plantas, estos dos sistemas (CHATS e IHATS) operan simultáneamente en el estado inducido (Warner y Huffaker, 1989; Aslam y col., 1992) mientras que en otras no está del todo claro (Siddiqi y col., 1990).

Se ha demostrado que el HATS para la absorción de NO_3^- es sensible a inhibidores metabólicos y parece ser un sistema de transporte activo (Jackson y col., 1973; Rao y Rains, 1976; Glass y col., 1990; Siddiqi y col., 1990). El mecanismo de

¹ High affinity transport system

² Low affinity transport system

³ Constitutive high affinity transport system

acoplamiento de energía para el transporte activo de NO_3^- por el HATS ha sido investigado en un limitado número de especies por medio de estudios electrofisiológicos (Ullrich y Novacky, 1981; McClure y col., 1990a; Glass y col., 1992). Estas observaciones serían consistentes con que el mecanismo simporte $2\text{H}^+:\text{NO}_3^-$ es promovido por la energía derivada del gradiente de protones generado por la H^+ -ATPasa del plasmalema (Ullrich y Novacki, 1981; McClure y col., 1990b; Glass y col., 1992; Santi y col., 1995). La absorción de NO_3^- está asociada con la depolarización de la membrana celular (creada por una diferencia de potencial eléctrico $\Delta\Psi$), la cual es inducible por NO_3^- y saturable respecto a la concentración externa de NO_3^- (Glass y col., 1992). Recientemente, Ivashikina y Feyziev, (1998), proponen la existencia, en células de raíz de maíz, de un mecanismo por el cual el balance de carga durante la absorción de NO_3^- esta regulado. Asimismo estos autores muestran un posible mecanismo que regula la absorción de NO_3^- en respuesta a diferentes cationes, y que podría estar relacionado con cambios en los flujos pasivos de NO_3^- a través del plasmalema.

En contraste, con las experiencias realizadas en cereales, existe una escasa información en especies leñosas en lo referente a la cinética de absorción del NO_3^- . Algunos trabajos han estudiado la absorción de NO_3^- en coníferas (Peuke y Tichner, 1991; Kamming-van Wijk y Prins, 1993; Plassard y col., 1994) pero no han aportado resultados concluyentes sobre la identificación de los sistemas de absorción de NO_3^- y de su modo de actuación en diferentes estados de inducción. La baja tasa de crecimiento de muchas coníferas en suelos con NO_3^- como fuente mayoritaria de N ha sido atribuida a la poca capacidad de absorción de los sistemas de transporte de NO_3^- en estas especies (Kronzucker y col., 1995a, 1995b, 1995c). Kronzucker y col., (1995b) estudiaron la cinética de absorción de NO_3^- en la conífera *Picea glauca* (Moench) Voss. con ^{13}N . Estos autores encontraron un sistema de transporte de alta afinidad constitutivo que actuaba en el intervalo de concentración externa de NO_3^- de 2.5 a 500 μM con una $V_{\text{máx}}$ de 0.1 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ y una K_m aparente de 15 μM . Al

⁴ Inducible high affinity transport system

Capítulo I

inducir las plantas durante tres días encontraron un sistema de transporte de alta afinidad diferente del anterior, con una V_{\max} de $0.7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ y una K_m de $100 \mu\text{M}$. Tanto en las plantas inducidas como en las no inducidas se observó un sistema de absorción lineal de baja afinidad que operaba a concentraciones de NO_3^- superiores a 1 mM .

1.1.1.1. Factores que influyen en la absorción de nitrato

La actividad de los sistemas de absorción de NO_3^- en plantas, puede verse afectada por diferentes factores, tales como la fuente de N utilizada, la intensidad de la luz y la humedad del ambiente.

La forma de N disponible (N- NO_3^- , N- NH_4^+ y N-orgánico) influye en la absorción del propio NO_3^- e incluso en la de otros iones. Al suministrar N- NH_4^+ en vez de N- NO_3^- , la planta muestra bajas concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ y altas concentraciones de otros iones, especialmente fosfato (Kirkby y Mengel, 1967; Blair y col., 1970; Barker y Maynard, 1972; Cox y Reisenaner, 1973; De Classen y Wilcox, 1974; Gashaw y Mugwira, 1981; Edwards y Horton, 1982; Hartman y col., 1986; Shelp, 1987). En la mayoría de las especies vegetales el NH_4^+ inhibe la absorción de NO_3^- (Fried y col., 1965; Minotti y col., 1969; Frith y Nichols, 1975; Mackown y col., 1982; Breteler y Sregerist, 1984; Pan y col., 1985; Aslam y col., 1996). Concretamente, se mostró que el NH_4^+ es supresor de la absorción de NO_3^- en trigo (Deigman y Lewis, 1988). En plantas de cultivo al aumentar el NH_4^+ se observa que absorbe menos NO_3^- y más NH_4^+ y viceversa (Wang y Below, 1992). También se ha demostrado en mutantes de *A. thaliana* que algunos productos de la asimilación del NO_3^- y NH_4^+ inhiben la absorción de NO_3^- y NO_2^- por una ruta feedback (Henk y col., 1978), y parece ser que la restricción en la absorción de NO_3^- resulta o bien del efecto ejercido por el NH_4^+ o por factores inhibidores generados durante la asimilación de NH_4^+ , (Rufy y col., 1982). En plantas de tomate (Smart y Bloom, 1998) han mostrado que bajos niveles de NH_4^+ pueden hacer que aumente la absorción de NO_3^- .

En estas plantas, bajo diferentes condiciones experimentales y de crecimiento, el incremento observado en la absorción de NO_3^- está estrechamente relacionado con la salida de protones. Sin embargo, concentraciones muy altas de NH_4^+ , 5000 μM , una concentración que excede la capacidad taxonómica para absorber y asimilar el NH_4^+ , inhibe la absorción de NO_3^- . Estas evidencias sugieren que el efecto del NH_4^+ en la absorción de NO_3^- es dependiente de la concentración de NH_4^+ . Quizás, estos datos podrían clarificar lo comúnmente observado en condiciones de campo, como la disminución del pH en la zona radicular lo que con frecuencia aumenta la absorción de NO_3^- (Haynes y Goh, 1978; Haynes, 1986).

El efecto de los cambios diurnos en la absorción de NO_3^- ha sido descrito con detalle por numerosos autores (Clement y col., 1978; Rufty y col., 1989; Le Bot y Kirkby, 1992; Scaife y Schloemer, 1994; Delhon y col., 1995a). La oscuridad tiene un efecto muy negativo en la absorción de NO_3^- (Mattsson y col., 1988; Delhon y col., 1995a). Se ha propuesto que este efecto sea debido a la incapacidad de la planta, en oscuridad, para asimilar y translocar el NO_3^- (Scaife, 1989; Scaife y Schloemer, 1994). Sin embargo, Delhon y col., (1995b, 1996a) no están de acuerdo con esta hipótesis y postulan que los cambios diurnos en la absorción de NO_3^- son independientes de las inhibiciones en oscuridad, del transporte xilemático de solutos y de la reducción del NO_3^- en las hojas. Una explicación alternativa para esta disminución en la absorción de NO_3^- puede resultar de los cambios del transporte floemático de azúcares a las raíces (Rufty y col., 1989; Raper y col., 1991; Le Bot y Kirkby, 1992). En este sentido, muchas investigaciones sugieren que la estimulación por la luz de la expresión génica y la actividad nitrato reductasa, así como la absorción y la reducción de NO_3^- puede ser minimizada al suministrar azúcares a hojas y raíces (Aslam y Huffaker, 1984; Cheng y col., 1992; Vincentz y col., 1993; Delhon y col., 1996a, 1996b).

Por otro lado, todas aquellas plantas que experimentan bajos potenciales hídricos, muestran una gran variedad de respuestas metabólicas y fisiológicas, como

Capítulo I

son el aumento de la resistencia estomática (Chaves, 1991), porcentajes reducidos de asimilación de CO₂ (Morgan, 1984; Zrenner y Stitt, 1991), niveles hormonales alterados (Zeevart y Creelman, 1988; Davies y Zhang, 1991), y cambios en la expresión génica (Guerrero y Mullet, 1988; Creelman y Mullet, 1991; Bray, 1993). Todos estos factores afectan de un modo u otro a la adquisición de nutrientes como el N (Talouiziete y Champigny, 1988; Larsson y col., 1989), ya que las etapas de asimilación y translocación de NO₃⁻ se ven afectadas por estos fenómenos (Brewitz y col., 1996).

1.1.1.2. Asimilación del nitrógeno por la planta

En la mayoría de las plantas, la mayor parte de la reducción del NO₃⁻ tiene lugar en las hojas. Sin embargo, la contribución de las raíces en la reducción del NO₃⁻ es especialmente intensa durante los primeros estadios del desarrollo (Oaks, 1979).

La enzima nitrato reductasa se considera que es el factor limitante del crecimiento, desarrollo y producción de proteínas en plantas y otros organismos asimiladores de NO₃⁻, respondiendo el gen que la codifica a efectores positivos, tales como el NO₃⁻, un factor plastídico y a luz, y a efectores negativos como el NH₄⁺ (Solomonson y Barber, 1990).

La localización de la nitrato reductasa en la célula no está completamente establecida, aunque hay muchas evidencias de que se encuentra en el compartimento citosólico (Solomonson y Barber, 1990). Mediante técnicas inmunológicas se ha demostrado que la nitrato reductasa está localizada en cloroplastos de hojas de espinacas y también se ha localizado en el citoplasma de hojas de maíz (Campbell, 1988). Esta diferencia en los resultados refleja diferentes asociaciones de la enzima con la membrana del cloroplasto dependiendo del estado fisiológico de la célula (Hoff y col., 1992).

En los organismos eucariotas se han reconocido tres formas de la enzima: a) nitrato reductasa dependiente de NADH (EC 1.6.6.1), b) nitrato reductasa biespecífica de NAD(P)H (EC 1.6.6.2) y c) nitrato reductasa dependiente de NADPH (EC 1.6.6.3) (Guerrero y col., 1981).

Algunas plantas superiores poseen sólo una forma de nitrato reductasa, codificada por un solo gen. Otras plantas poseen 2 ó 3 enzimas nitrato reductasa diferentes con diferentes donores de e^- y/o diferente especificidad por el tejido. Se ha demostrado que las diferentes enzimas son codificadas por genes diferentes (Caboche y Rouzé, 1990).

En tomate y tabaco, sólo se encuentra la nitrato reductasa dependiente de NADH. Trabajos recientes han mostrado, en tomate, que la enzima es codificada por un solo gen, mientras que en tabaco parece que intervienen dos genes (Danniel-Vedele y col., 1989; Vaucheret y col., 1989a, b). En otras especies tales como *Erythrina senegalensis* y *Betula pendula* se vió que contienen únicamente la nitrato reductasa bidependiente de NAD(P)H (Stewart y Orebamjo, 1979; Friemann y col., 1991).

En maíz, cebada y arroz se encuentra la nitrato reductasa específica de NADH y nitrato reductasa bi-específica de NAD(P)H (Redinbaugh y Orebamjo, 1981; Kleinhofs y Warner, 1990). Warner y col., (1987), en cebada y maíz, muestran que la enzima dependiente de NADH se encuentra en las hojas y raíces, mientras que la bi-específica se localiza en la raíz.

La nitrato reductasa de plantas superiores parece ser un dímero de idénticas subunidades de Pm entre 100 y 120 KDa cada una.

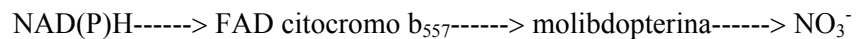
En *Chlorella vulgaris* la nitrato reductasa puede existir como dicho dímero activo o también como tetrámero activo. Cada subunidad de nitrato reductasa contiene tres grupos prostéticos: FAD, hemo (citocromo b_{557}) y el cofactor molibdeno

Capítulo I

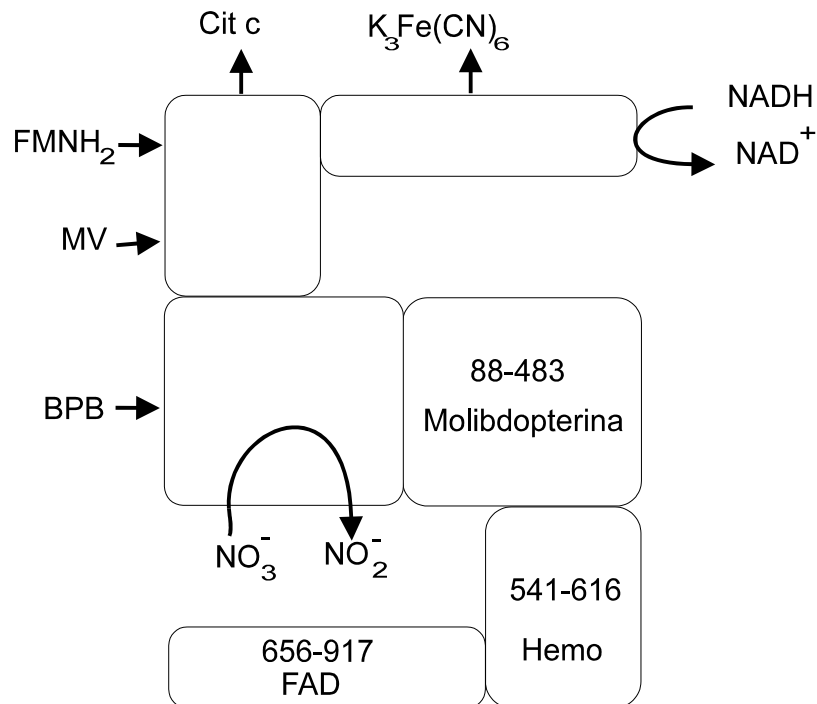
(Mo) (Kleinhofs y Warner, 1990; Solomonson y Barber, 1990).

La estructura dimérica de la molécula es debida al dominio que contiene el Mo, con un Pm de 75 KDa. El grupo hemo se asocia a un dominio de 14 KDa y el grupo FAD se asocia a un fragmento de 28 KDa. Los tres dominios están unidos unos a otros por regiones sensibles a proteasas (Kubo y col., 1988). Un modelo de la estructura de la enzima sería el de Kubo y col., (1988); Chérel y col., (1990) que se representa en el esquema 1.

El camino que siguen los e^- desde el NAD(P)H hasta el NO_3^- es el siguiente:



La nitrato reductasa en plantas superiores tiene dos sitios activos: uno para la donación de e^- del NAD(P)H, donde el FAD es reducido, y otro para la reducción del NO_3^- por el Mo (Hoff y col., 1992).



Esquema 1. Modelo estructural y transferencia electrónica a lo largo de los dominios de la nitrato reductasa.

Trabajos recientes han mostrado la secuencia completa de nucleótidos de los genes de la nitrato reductasa de muchas plantas superiores, hongos y algas tales como: pepino (Crawford y col., 1986), tabaco (Calza y col., 1987; Vaucheret y col., 1989a), tomate (Danniel-Vedele y col., 1989), *A. thaliana* (Crawford y col., 1988; Cheng y col., 1988; Wilkinson y Crawford, 1991), soja (Hoff y col., 1991), espinacas (Prosser y Lazarus, 1990), arroz (Choi y col., 1991), *Aspergillus* (Johnstone y col., 1990), *Neurospora* (Okamoto y col., 1991), *Chlamydomonas* (Fernández y col., 1989), *Chlorella* (Cannons y col., 1991). Hoff y col., (1992), han estudiado la secuencia completa de aminoácidos de la nitrato reductasa de las diferentes plantas superiores y han observado que presentan homología entre un 63% y un 91%.

La mayor parte de la nitrato reductasa de plantas superiores son inducibles por el NO_3^- (Warner y Kleinhofs, 1992). Esto implica que la actividad nitrato reductasa, la

Capítulo I

cantidad de nitrato reductasa y la acumulación de mRNA de nitrato reductasa aumentan en respuesta al NO_3^- . Sin embargo, el efecto del NO_3^- parece que se produce a nivel transcripcional (Hoff y col., 1991).

La cinética del proceso de inducción del NO_3^- sobre la síntesis de la nitrato reductasa y su actividad, comprende una fase inicial lenta seguida de otra fase con un incremento exponencial y un establecimiento de un nivel estacionario. El aumento de la nitrato reductasa durante la inducción, parece ser debido a la síntesis *de novo* de la proteína según ha sido estudiado por diversos autores (Kuo y col., 1981; Somers y col., 1983; Remmler y Campbell, 1986; Galangau y col., 1988) ya que la aparición de la proteína precede a la aparición de actividad nitrato reductasa (Somers y col., 1983; Remmler y col., 1986; Deng y col., 1990). La fase lenta representa el tiempo necesario para la síntesis de polipéptidos completos, el ensamblaje entre sí y el de los cofactores con los restos de aminoácidos.

La inducción por NO_3^- de la acumulación de mRNA de la nitrato reductasa ha sido confirmada en muchas plantas (Cheng y col., 1986; Crawford y col., 1988; Galangau y col., 1988; Hamat y col., 1989; Oaks y col., 1990; Bowsher y col., 1991; Callaci y Smarelli, 1991; Hoff y col., 1991).

Otro factor que afecta a la actividad nitrato reductasa es la luz ya que tiene una gran influencia sobre su síntesis, sobre su actividad y sobre la acumulación de su mRNA, los cuales también requieren la presencia de NO_3^- (Rajasekhar y col., 1988). Este fenómeno también es válido para la nitrito reductasa (Warner y Kleinhofs, 1992). El mRNA de la nitrato reductasa y la actividad de la enzima, exhiben un ritmo diurno en hojas y raíces de tabaco, tomate, *A. thaliana* y maíz cuando estos crecen con NO_3^- y un régimen de luz/oscuridad (Galangau y col., 1988; Deng y col., 1990; Bowsher y col., 1991; Cheng y col., 1991). En hojas de tabaco y tomate los niveles de mRNA de la enzima no se modifican durante el día, sin embargo, estos disminuyen durante la noche, alcanzando un nivel mínimo al final de dicho periodo. En oscuridad

la proporción de reducción de NO_3^- en las hojas también depende de la disponibilidad de carbohidratos (Aslam y Huffaker, 1984).

El control de la actividad nitrato reductasa por la luz puede relacionarse con el hecho de que la enzima utilice productos fotosintéticos como donores de e^- . Así pues, se puede pensar que los productos fotosintéticos median el efecto estimulador de la luz sobre la actividad nitrato reductasa (Hoff y col., 1992), como ocurre en plantas de cebada, (Aslam y col., 1973; 1979).

Los plastos intactos, son un prerrequisito para la inducción de la actividad nitrato reductasa por la luz y NO_3^- (Oelmüller y col., 1988). El control plastídico es mediado por una señal originada en éstos, mediando el control transcripcional de genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas (Mohr y col., 1992).

Existe una relación entre la reducción del NO_3^- o NO_2^- y los diferentes niveles de las formas de N. La nitrito reductasa de hojas de cebada es inducida por concentraciones bajas de NO_3^- , pero no por el NO_2^- directamente, sino por la oxidación de éste en las hojas a NO_3^- (Aslam y Huffaker, 1989). También Aslam y col., (1987) mostraron que con la nitrato reductasa de cebada ocurría exactamente lo mismo. Lee y Titus, (1992) demostraron que concentraciones altas de NO_3^- y fosfato inhibían la actividad nitrato reductasa en manzano. El NH_4^+ también es necesario en pequeñas cantidades para la activación de la nitrato reductasa y la acumulación de proteínas en la hoja de pimiento rojo (*Capsicum annuum* L.), (Takacs y Técsi, 1992).

Estudios llevados a cabo por LaBrie y col., (1991) en *A. thaliana* mostraron que el ion clorato hace que aumente el mRNA de la nitrato reductasa, y no el de la nitrito reductasa, pero no ocurre así con la cantidad de enzima, ya que el clorato la inactiva y degrada rápidamente.

Recientemente, Kaiser y Spill, (1991), proponen que la actividad nitrato

Capítulo I

reductasa de hojas de espinaca *in vitro* está modulada por ATP y AMP, es decir, por fosforilación-desfosforilación. El AMP sería un activador y el ATP un inactivador. Shiraishi y col., (1992) muestran que en esta especie la actividad nitrato reductasa, bajo condiciones de “represión” o “derrepresión”, está regulada por cambios en la cantidad de la enzima, más que por activación-inactivación de ésta.

Se ha comprobado que en trigo y cebada los genes de la nitrato reductasa responden a ciertas hormonas (Banowitz, 1992; Lu y col., 1992), tales como citoquininas y el ácido abscísico. Parece ser que ambas hormonas interaccionan más a nivel transcripcional de la nitrato reductasa que con el gen en sí. La citoquinina provoca un aumento en el mRNA de la enzima y el ácido abscísico hace que éste disminuya (Lu y col., 1992).

Por último, también se ha comprobado en maíz que la edad puede afectar a la cantidad de nitrato reductasa, existiendo más en las hojas jóvenes que en las viejas (Kenis y col., 1992).

1.1.2. Absorción del nitrógeno en los cítricos

Los iones NO_3^- y NH_4^+ son las dos formas principales de nitrógeno inorgánico presentes en el suelo que son susceptibles de ser absorbidas por los agrios.

En suelos bien aireados, con un pH próximo a la neutralidad, la nitrificación se produce rápidamente en primavera y verano, cuando la temperatura del suelo es lo suficientemente alta. Por ello, en estas estaciones, la principal forma de nitrógeno absorbible del suelo en las plantaciones de cítricos es el NO_3^- . Sin embargo, se dá también, un suplemento continuo de NH_4^+ por la mineralización de la materia orgánica o por el aporte de fertilizantes amoniacales, de forma que las raíces de los agrios pueden disponer de ambos tipos de iones.

1.1.2.1. Factores que influyen en la absorción de nitrógeno en plantas de cítricos

La absorción de estos iones puede estar afectada por el pH, la temperatura, la composición del medio, la luz y el nivel de carbohidratos en la planta.

En lo que respecta al efecto del pH en la absorción, Wallace y Mueller, (1957) observaron que al aumentar el pH de la solución nutritiva se incrementaba la absorción del $^{15}\text{NH}_4^+$ en plantas de limón Rugoso cultivadas en un medio con arena. En general, se asume que la absorción de NH_4^+ aumenta a pH elevado y que la del NO_3^- aumenta a pH bajo.

La absorción de NO_3^- y NH_4^+ puede verse, también, afectada por la temperatura a la que se encuentran las raíces. Wallace, (1953) observó que la absorción de nitrógeno marcado aumentaba desde los 23°C, alcanzando un nivel máximo a los 32°C, temperatura a partir de la cual la absorción disminuía. Sala y Cuñat, (1982), aplicando a naranjos “Washington Navel”, cultivados en arena inerte, soluciones con diferentes relaciones $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (11:0, 9:2 y 6:5 meq/L), observaron que, independientemente de la temperatura, la absorción total de nitrógeno era mayor en las soluciones que contenían parte del nitrógeno en forma amoniacal. A temperaturas inferiores a 15°C, los árboles que absorbían más nitrógeno eran los que habían sido regados con la solución más rica en NH_4^+ (45.4% de N- NH_4^+), pero a temperaturas superiores, la mayor absorción de nitrógeno correspondió a la solución que contenía el 18.2% de N- NH_4^+ . Esto parece indicar que la temperatura puede afectar las relaciones de absorción de ambos iones. También indicaron que, independientemente de la forma en la que se encontraba el nitrógeno en la solución, la absorción de este elemento aumentó con la temperatura, al menos, en el intervalo comprendido entre 4°C y 28°C.

Los agrios pueden absorber igualmente nitrógeno en forma orgánica. Kato y col., (1985) mostraron, marcando aminoácidos con ^{14}C , que los cítricos pueden

Capítulo I

absorber por las raíces aspartato, asparragina, prolina y arginina y transportarlos y metabolizarlos posteriormente en los diferentes órganos para dar lugar a otros compuestos aminados.

La concentración de nitrógeno en el medio afecta también la tasa de absorción de éste por la planta. Serna y col., (1992) observaron cinéticas diferentes cuando la fuente de nitrógeno era NO_3^- o NH_4^+ . La absorción de NO_3^- se saturaba a 120 ppm de N-NO_3^- en el medio, mientras que la absorción de NH_4^+ lo hacía a 240 ppm de N-NH_4^+ .

A parte de estos estudios en la absorción de NO_3^- por parte de plantas de cítricos, no existen estudios que pongan de manifiesto el patrón de absorción de NO_3^- en este cultivo, así como tampoco hay trabajos que hayan caracterizado estos sistemas de transporte en dicho cultivo de tan gran interés agrícola.

1.1.2.2. Asimilación del nitrógeno en plantas de cítricos

En cuanto a la actividad nitrato reductasa, en los agrios, también es inducible por su sustrato y es afectada por la temperatura. En plantas de cítricos, Kato y Kubota, (1982) mostraron que la actividad máxima se produjo a los 33°C, mientras que a 5°C, su actividad en las hojas y raíces fibrosas fue del 13% y del 10% de la máxima, respectivamente. Estos autores, también indicaron que la reducción de la actividad de esta enzima a bajas temperaturas, está fuertemente asociada con una disminución en la absorción de NO_3^- , e igualmente con su tasa de asimilación para formar aminoácidos.

La nitrato reductasa está presente en la mayoría de los órganos de los cítricos. La primera referencia sobre esta enzima en los cítricos se debe a Bar-Akiva y Sternbaun (1965a, b) que encontraron actividad nitrato reductasa en diversos órganos de los cítricos como embriones en germinación, raíces finas, hojas y frutos. La mayor

actividad apareció en las hojas donde era del orden de 10 veces superior a la de las raíces finas. Kato y Kubota (1982) encontraron igualmente que las hojas contenían 12 veces más actividad que las raíces finas.

Por otra parte, se ha encontrado NO_2^- en el tronco de Satsuma (Fukui y col., 1966), en hojas de diversas variedades (Bar-Akiva, 1972) y en todos los órganos de árboles adultos de naranjo “Hamlin” y pomelo “Marsh” (Wutscher, 1984). Estos hallazgos apoyan la posibilidad de que la reducción del NO_3^- se realice en diferentes órganos de la planta.

La segunda etapa de la reducción del ion NO_3^- consiste en el paso del ion NO_2^- al ion NH_4^+ . Esta etapa la lleva a cabo la nitrito reductasa, como en el resto de plantas superiores, la cual requiere cobre para su actividad. Su acción y distribución en los agríos no ha sido estudiada en profundidad.

En los agríos el NO_3^- se asimila principalmente en las hojas y en menor medida en las raíces y otros órganos.

1.2. La salinidad. Un problema creciente en la agricultura

La salinidad es un fenómeno natural ampliamente extendido sobre la tierra, y la evolución de los organismos vivos ha dado lugar, en muchas especies, a mecanismos de adaptación necesarios para crecer en ambientes salinos.

La utilización de aguas o terrenos salinizados para el cultivo produce pobres rendimientos e incluso, en condiciones extremas, impide la utilización agrícola de amplias zonas que se convierten en improductivas, afectando gravemente a la economía agrícola de algunas regiones.

Capítulo I

Se estima que 1/3 de la superficie de la tierra está afectada en algún grado por el exceso de sales. Además, la necesidad de producir más alimentos está empujando continuamente a la agricultura hacia terrenos marginales, caracterizados frecuentemente por suelos y aguas con un alto grado de salinidad natural.

En un principio el problema de la salinidad se ha limitado a regiones áridas y semiáridas donde la lluvia no es suficiente para lavar las sales. Las técnicas utilizadas por el hombre han afectado al medio ambiente, y las mismas prácticas de cultivo durante años, han dado lugar a una salinización secundaria, ya que algunos factores de gran importancia como características del suelo y cubierta vegetal han ido cambiando con el tiempo.

Existe una variada distribución de suelos salinos entre los distintos países. Dentro de Europa la zona del Mediterráneo es la más afectada y España posee unas 250.000 Ha cuyo rendimiento está disminuido por este problema.

La mejora de esta situación requiere prácticas especiales como el drenaje, la lixiviación, la irrigación controlada y la elección de cultivos tolerantes, así como un mejor conocimiento de la respuesta de las plantas en condiciones de estrés salino.

1.2.1. Clasificación de las plantas por su tolerancia a la salinidad: Halófitas y glicófitas

Las plantas que completan su ciclo de vida en ambientes salinos se han denominado "halófitas", las que no son capaces de hacer esto, se denominan "glicófitas" o "no halófitas". Ha habido mucha discusión en la literatura sobre la clasificación de las plantas en relación a la salinidad en estas dos categorías (Adriani, 1956; Chapman, 1960; Waisel, 1972; Pasternak, 1987). El motivo de la controversia se debe a la dificultad de establecer una clara distinción entre halófitas y glicófitas, ya que en realidad, existe un espectro continuo de tolerancia que va desde las especies

más sensibles que son fuertemente afectadas por 50 mM NaCl, a aquellas especies capaces de completar su ciclo de vida en presencia de 500 mM NaCl (Gorham y col., 1985).

La halófitas, en general, es aquella planta que puede crecer y reproducirse en un habitat natural salino. Jennings (1976) define las halofitas como "la flora nativa de los suelos salinos". Estas plantas se clasifican en: a) halofitas marinas y b) halofitas terrestres. Las primeras crecen permanentemente sumergidas en el agua salada del mar que contiene unas concentraciones de Cl^- y Na^+ de 558 mM y 483 mM, respectivamente (Harvey, 1966) y un potencial osmótico de -20.3 bars. Estas halófitas incluyen principalmente algas pertenecientes a la Phaeophyceae y Rhodophyceae y algunas angiospermas como la *Zostera maritima*. Un rasgo característico de las halófitas marinas es su capacidad para acumular K^+ en preferencia al Na^+ del agua del mar. Las halófitas terrestres habitan en los marjales o pantanos salados y completan su ciclo de vida sólo en presencia de concentraciones de sal, entre 100 y 300 mM (Flowers y col., 1977). Son las denominadas verdaderas halófitas. Pertenecen a este grupo la herbácea *Salicornia stricta*, que alcanza su madurez sólo en presencia de una concentración de NaCl igual a la del agua del mar y también *Aster tripolium* y *Plantago maritima* que crecen más lentamente en un suelo salino. Una característica de las halófitas es la elevada presión osmótica del fluido intracelular, debido principalmente al alto contenido de NaCl.

Las glicófitas son plantas con un grado distinto de tolerancia a la sal. Greenway y Muns (1980) sugieren que las glicófitas se afectan por un exceso de iones en hojas expandidas y por déficit hídrico en tejidos en expansión. La sensibilidad hacia concentraciones elevadas de Cl^- y/o Na^+ es mucho más elevada en glicófitas que en halófitas. Esta diferencia se basa principalmente en una inadecuada compartimentación de iones y su tolerancia salina está relacionada con la exclusión de los mismos.

Capítulo I

Las glicófitas tolerantes a la sal se clasifican en dos categorías: 1) Aquellas especies que aparecen distribuidas en hábitats no salinos pero que han desarrollado variedades halófitas como una respuesta directa a la selección impuesta por hábitats salinos. 2) Aquellas especies, que aunque posean variedades con diferentes grados de sensibilidad a la sal, no se han desarrollado bajo una selección natural impuesta por el medio salino.

Maas (1985) clasificó las plantas de cultivo en cuatro grandes grupos:

a) tolerantes: algodón, cebada, espárrago, jojoba, olivo, palmera datilera y caña de azúcar.

b) moderadamente tolerantes: judía, sorgo, trigo, guisante, remolacha roja y calabaza.

c) moderadamente sensibles: maíz, lino, cacahuete, espinaca, patata, rábano, vid, tomate, lechuga, pepino, pimiento, col, nabo, apio y melón.

d) sensibles: arroz, cebolla, zanahoria, fresa, naranjo, pomelo, albaricoque, almendro, manzano, zarzamora, ciruelo y melocotonero.

La posición de especies individuales en esta clasificación no es constante, ya que puede cambiar según factores tales como: la variedad, la edad de la planta, desarrollo, humedad relativa, temperatura, anaerobiosis, etc. (Maas y Hoffman. 1977).

1.2.2. Tolerancia salina de las halófitas

La inclusión de grandes cantidades de sal es la base esencial de la resistencia en las halófitas. El valor adaptativo de la inclusión de sal es la adquisición de osmóticos baratos desde el punto de vista metabólico y energético, que permiten mantener la turgencia en los diferentes órganos de la planta. Esto se consigue por compartimentación de iones en las vacuolas y solutos neutros en el citoplasma.

Las halófitas terrestres utilizan iones (principalmente Na^+ y Cl^-) para mantener la turgencia al igual que las algas marinas altamente vacuoladas (Cram, 1976; Kaus, 1978).

Se pueden distinguir dos grupos de halófitas según su tolerancia: a) Halófitas que crecen lentamente a concentraciones superiores a 200 mM NaCl. b) Halófitas que continúan creciendo rápidamente en un intervalo de 200-500 mM NaCl. Las especies que pertenecen al primer grupo son monocotiledóneas (Rozema, 1978) y no desarrollan succulencia, aunque algunas tienen glándulas salinas (Lipshitz y Waisel, 1974). La principal regulación de la concentración de iones en las hojas es el control de la absorción y el transporte en el tallo. La extrusión de iones de la parte aérea se produce por una exportación a través del floema o con las glándulas salinas y vesículas. Estas especies se denominan dentro de las halófitas, como "excluidoras" (Greenway, 1968) aunque el término no sea muy exacto porque según Stelzer y Läubli (1978), la *Puccinellia peisonis* que pertenece a este grupo contiene 200 mM Na^+ y 300 mM Cl^- en su tallo, cuando crece a concentraciones externas de 100-250 mM NaCl. Resultados similares se han obtenido en otras plantas herbáceas (Rozema, 1978).

Las especies que pertenecen al segundo grupo mantienen la turgencia con altas concentraciones internas de Cl^- y Na^+ y se denominan "incluidoras". Estos niveles pueden ser tolerados por la planta porque sus concentraciones en el citoplasma son relativamente bajas comparadas con la vacuola, mientras que solutos orgánicos neutros contribuyen al potencial osmótico del citoplasma (Flowers y col., 1977; Wyn Jones y col., 1979). Otras características adicionales son la presencia de glándulas salinas (Jennings, 1976) y un incremento en el volumen de la hoja, asociado con la succulencia (característica morfológica de las xerófitas que crecen en regiones áridas), que se encuentran principalmente en dicotiledóneas. Dentro de este grupo se encuentran: *Suaeda maritima*, *Atriplex nummularia*, *Atriplex hastata* y *Spartina townsendii*. El ajuste osmótico en las halófitas por absorción de sal tiene distintas

Capítulo I

ventajas frente a la síntesis de solutos orgánicos (Epstein, 1980):

1) La absorción de iones inorgánicos es una función primaria de la raíz, así pues este mecanismo de adaptación no requiere la elaboración de estructuras muy especializadas.

2) El ajuste osmótico en el tallo, cuando se efectúa por iones inorgánicos, incluye su movimiento a través del xilema en la corriente de transpiración, un proceso nada costoso desde el punto de vista metabólico.

3) La utilización de iones inorgánicos ahorra la utilización de fotoasimilados que serían necesarios para proveer los esqueletos de carbono y energía necesarios para la síntesis de osmóticos orgánicos.

4) La osmoregulación en las raíces por iones inorgánicos evita la necesidad de transporte de fotoasimilados para la osmoregulación del tallo a la raíz, transporte que procede vía floema y necesita un gasto energético.

1.2.2.1. Glándulas salinas

Las glándulas salinas son estructuras especializadas que poseen muchas halófitas, en la epidermis de sus hojas y tallos. Estas glándulas secretan de forma activa grandes cantidades de sal a través de la cutícula, a la superficie de la hoja, donde puede ser arrastrada por la lluvia. Este mecanismo de exclusión regula la concentración excesiva de sal que puede acumularse en el tejido (Thompson, 1975).

Existen otras estructuras con varios grados de especialización que secretan de forma pasiva agua y solutos a la superficie según la presión de la raíz. Estas estructuras se denominan "hidátodos". Haberlandt (1915) considera las glándulas salinas como hidátodos activos. Los productos de secreción de las glándulas salinas

contienen una gran variedad de elementos minerales. Estos incluyen los cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y los aniones Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} y CO_3^{2-} . En algunos casos existe presencia de material orgánico (Ruhland, 1915), pero la principal sal secretada es el NaCl (Arisz y col., 1955; Helder, 1956). Las glándulas salinas pueden ser unicelulares como en *Spartina townsendii* y en algunas halófitas de la India (Mullan, 1931) o multicelulares como las descritas por Ruhland (1912) en las hojas de *Limonium gmelinii*. Muchas glándulas salinas tienen una típica pared en forma de laberinto, como en *Frankenia*, *Tamarix* y *Limonium*; otras no lo tienen, como en *Avicennia*, *Acanthus* y *Aeiceras*.

1.2.2.2. Adaptación morfológica

La succulencia es una típica adaptación morfológica a sustratos salinos en la mayoría de las especies dicotiledóneas halófitas tanto incluidoras de sal (Longstreth y col., 1984) como excluidoras (Longstreth y Nobel, 1979), es otro mecanismo para evitar excesiva acumulación de sal en el tejido (Jennings, 1968). La succulencia es causada por un transporte preferencial de Na^+ a la vacuola o es inducida por Cl^- (Smith y Struckmeyer, 1977). En las especies incluidoras de sal, aumenta el volumen de las vacuolas y la proporción de espacios intercelulares (Hajibagheri y col., 1984). La succulencia no es una respuesta específica a la salinidad, ya que también es inducida por déficit hídrico, aplicación de fitohormonas, corte de ápices de tallo, etc. Esta adaptación morfológica es una característica de las "xerófitas" que viven en regiones muy áridas. Estos órganos succulentos poseen almacenes internos de agua, aunque su capacidad fotosintética es muy escasa. La cutícula y resistencia estomática elevada, previenen la pérdida de agua desde estos órganos a la atmósfera en condiciones de sequedad.

Esta característica de succulencia, la poseen muchas especies halófitas de Poaceae, Cyperaceae y Junaceae. Muchas halófitas muestran fotosíntesis tipo C4 o CAM, estando ésta última asociada con la morfología de la hoja succulenta (Winter y

col., 1981).

1.2.3. Tolerancia salina de las glicófitas

Los mecanismos fisiológicos que determinan la tolerancia a la salinidad de las plantas superiores ha sido objeto de diversas revisiones (Maas y Nieman, 1978; Greenway y Munns, 1980; Cheeseman, 1988). Las plantas pueden acumular y/o compartimentar determinados iones en respuesta a elevadas concentraciones de sales en el medio, o bien autoprotgerse por exclusión de iones tóxicos.

En un gran número de plantas cultivadas, la tolerancia a la salinidad se asocia con su capacidad de exclusión de sales, que implica la posibilidad de restringir la absorción y/o el transporte de iones tóxicos de las raíces a las partes aéreas (Läuchli y Wieneke, 1979; Levitt, 1980).

La distinción entre plantas excluidoras e incluidoras de sal se ha usado para delimitar las diferentes formas de adaptación a la salinidad. La comparación de especies cercanas que muestran sensibilidad o tolerancia salina, han contribuido al desarrollo del concepto de la exclusión de sal como mecanismo de adaptación. Las glicófitas que comprenden la mayoría de las especies cultivadas, muestran generalmente una relación inversa entre absorción de sal y tolerancia, lo que quiere decir que la "exclusión" es el mecanismo de adaptación predominante (Greenway y Munns, 1980). Sin embargo la clasificación de glicófitas por su capacidad de exclusión de sal es una simplificación excesiva ya que la exclusión es un término relativo.

Las especies de glicófitas consideradas como tolerantes a la salinidad, lo son sólo moderadamente, ya que el límite de concentración salina en el cual pueden desarrollarse está próximo a los 50 mM de NaCl. Sin embargo algunas plantas como la remolacha azucarera, tiene las características típicas de una halófito incluidora de

sal (ancestros halófitas), su crecimiento es aumentado por NaCl y los niveles de Cl⁻ y especialmente Na⁺ en el tallo, aumentan con la concentración externa. Una desventaja de las plantas glicófitas incluidoras es que sus mecanismos de exclusión se saturan a altas concentraciones externas de NaCl y, sin embargo, carecen de los mecanismos de adaptación que poseen las halófitas incluidoras, a nivel celular.

La exclusión de Na⁺ requiere la restricción de la absorción de Na⁺ a nivel de membrana plasmática. El mecanismo molecular de la absorción de Na⁺ es poco conocido (Niu y col., 1995). Existen estudios fisiológicos que sugieren que el influjo de Na⁺ ocurre por un sistema de absorción de potasio de baja afinidad (Rains y Epstein, 1965, 1967). Hasta el momento los canales de potasio que han sido clonados, los cuales presumiblemente funcionan como un sistema de absorción de potasio de baja afinidad, son todos ellos muy selectivos para el Na⁺ (Schroeder y col., 1994). Es posible que existan otros canales de potasio que sean menos selectivos entre el K⁺ y el Na⁺. En efecto, la naturaleza electrogénica del transporte de K⁺ mediado por el HKT1 (proteína de membrana encargada de la absorción de K⁺), y la dependencia del pH de las corrientes asociadas a la expresión de HKT1 en oocitos de *Xenopus*, indicaban que este transportador podría funcionar como el carrier H⁺-K⁺ simporte de intrusión (Schachtman y Schroeder; 1994). Sin embargo, investigaciones posteriores con células de levadura transformadas con el mismo gen parecen sugerir que el HKT1 expresado en estas células opera como un mecanismo de simporte asociado al Na⁺ (K⁺-Na⁺ simporte de intrusión), que al parecer interviene en los mecanismos de resistencia al estrés salino de estas células de levadura transformadas (Rubio y col., 1995).

El ión Cl⁻ es excluido en algunas leguminosas y particularmente en muchos árboles frutales. Abel y Mackenzie (1964) encontraron que las diferencias entre variedades de soja, en su tolerancia salina, estaban relacionadas con la exclusión de Cl⁻. La especie "Jackson", sensible a la salinidad, contenía un 0.9% de Cl⁻ en el tallo,

Capítulo I

mientras que la especie "Lee", tolerante, contenía un 0.05% de Cl^- en este órgano. La capacidad de exclusión de Cl^- en soja está controlada por un único par de alelos (Abel, 1969). En particular, la exclusión de Cl^- en "Lee" está controlada por un par de alelos dominantes, mientras que en "Jackson" parece estar regulada por un par de alelos recesivos (Abel, 1969). Wieneke y Läuchli (1979) con un experimento recíproco de injertos de "Lee" y "Jackson" demostraron que la exclusión de Cl^- en "Lee" está controlada por la raíz. Los estudios de distribución de iones por microanálisis con RX revelaron una acumulación de Cl^- en las células corticales internas de la zona apical de la raíz en "Lee", lo que sugiere que la acumulación de Cl^- en este órgano se produce por el secuestro de Cl^- en las vacuolas de las células del córtex. Además la variedad "Lee" controlaba de forma efectiva el transporte de Cl^- al tallo, al contrario del comportamiento de "Jackson" (Läuchli y Wieneke, 1978).

La cebada es un cultivo tolerante que puede crecer a altas concentraciones de NaCl (>200 mM) y producir buenas cosechas. Sin embargo, se ha observado una clara relación entre la tolerancia salina de algunas variedades y su capacidad de exclusión para el ion Cl^- (Wyn Jones y Storey, 1978).

En *Lupinus luteus* la incapacidad de exclusión de Cl^- se debe a la baja tasa de acumulación de este ión en las vacuolas de las células del parénquima cortical de la raíz (Van Steveninck y col., 1982).

La concentración de Cl^- en hojas de plantas excluyentes es regulada por diferentes procesos de transporte en las membranas. En las plantas excluidoras, sin glándulas salinas, como son las leguminosas, la concentración de Cl^- depende de la velocidad relativa de crecimiento, flujo de iones del simplasma de la raíz al xilema, flujo iónico de los vasos del xilema a las células de transferencia en el parénquima del xilema en la raíz y el tallo y flujo iónico del mesófilo de la hoja al floema (retranslocación). Lessani y Marechner (1978) estudiaron el significado de la retranslocación para regular la concentración de sal en las hojas y su relación a la

Introducción y antecedentes bibliográficos

resistencia salina en distintas especies. No se encontró correlación entre la tasa de retranslocación de Cl⁻ y la disminución del crecimiento por la salinidad.

1.3. La salinidad y los cítricos

1.3.1. Efectos causados en el crecimiento y la cosecha

Los cítricos constituyen un cultivo sensible a la salinidad (Mass y Hoffman, 1977; Mass, 1993) y sufren importantes alteraciones fisiológicas y reducción del desarrollo, incluso a concentraciones moderadas de sales en el medio de cultivo (Cooper y Shull, 1953; Walker y col., 1982, 1983; Behboudian y col., 1986; Syvertsen y Yelenosky, 1988; Lloyd y col., 1990; Bañuls y Primo-Millo, 1995).

También, la sal afecta a los árboles de *Citrus* llevando a una baja producción y frutos pequeños de corteza fina (Chapman, 1968). Puesto que estas características también aparecen en plantas deficientes en N (Embleton y col., 1968), es posible que algunos efectos de la salinidad sean debidos a la reducción de la absorción de N bajo condiciones salinas.

La absorción de Cl^- y Na^+ provoca una reducción en el crecimiento vegetativo y amarilleamiento de las hojas en las que aparecen quemaduras en el ápice y los bordes. Las hojas que se ven afectadas se desprenden de forma prematura, dando lugar a una intensa defoliación de la planta, que provoca importantes alteraciones fisiológicas y en última instancia la muerte.

La contribución relativa de los efectos osmóticos y de iones específicos es difícil de cuantificar y ha sido, durante muchos años, un importante punto de controversia. Las reducciones en las cosechas se dan sin una excesiva acumulación de Cl^- o Na^+ y sin síntomas aparentes de toxicidad, lo que indica que el efecto dominante es osmótico (Bingham y col., 1974; Biorai y col., 1988; Levy y col., 1979; Cerdá y col., 1990; Dasberg y col., 1991). Sin embargo, el impacto de iones específicos depende de la capacidad del patrón para excluir dichos iones. En limonero aparecen

diferencias en las propiedades de transporte del Cl^- y en la tolerancia, de los diferentes patrones, a este ion (Cerdá y col., 1990). Cole (1985), concluyó que las reducciones en las cosechas eran debidas más a la toxicidad del ion Cl^- que al estrés osmótico. Estos resultados indicaban un fallo en la capacidad del patrón para excluir Cl^- cuando las concentraciones del ion en el agua de riego excedían de 2 mM.

Una variable importante para evaluar los efectos de la salinidad en las plantas de cítricos es la relación $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en las soluciones, ya que generalmente los tratamientos salinos contienen cantidades variables de NaCl que son añadidas a las soluciones nutritivas, lo que no es representativo de las condiciones salinas del suelo. Bañuls y col., (1991) mostraron que la adición de 10 ó 20 mM de Ca^{2+} (en una mezcla de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y CaSO_4 a una solución 45 mM de NaCl revertía parcialmente la inhibición del crecimiento al mismo tiempo que se reducía significativamente la defoliación en la variedad "Navel" a pesar de la alta concentración de sal en el medio. La adición de Ca^{2+} , también reducía el transporte de Na^+ y Cl^- a las hojas jóvenes de los patrones mandarino Cleopatra y citrange Troyer. La absorción de Ca^{2+} por las hojas, aumentaba al mismo tiempo que se incrementaba la concentración externa de Ca^{2+} . Zekri y Parsons, (1990a) obtuvieron resultados similares con plántones de *Citrus aurantium* que crecían en una solución 40 mM NaCl a la que se le añadía CaSO_4 , pero no CaCl_2 . El CaSO_4 paliaba los efectos del NaCl posiblemente por el efecto del ión SO_4^{2-} mientras que esto no ocurría con el CaCl_2 debido a que se incrementaba en un 19% el contenido de Cl^- en la solución y por tanto en las hojas. Zid y Grignon, (1985) especularon sobre la posibilidad de que la excesiva absorción de Na^+ de las soluciones de NaCl desplazaban el Ca^{2+} del apoplasto, lo que causaba una necrosis marginal en las hojas, típica de la toxicidad por Na^+ .

Estos resultados indican que la concentración de Ca^{2+} en el medio es un importante factor en la toxicidad de iones específicos. En general, cuando la relación $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es muy alta, las excesivas cantidades de Na^+ y Cl^- absorbidas por las raíces, se transportan a las hojas donde causan la necrosis y la abscisión de estos órganos.

Capítulo I

Las especies de cítricos son mucho más sensibles a las sales de cloruro que a las sales de sulfato. La reducción del crecimiento así como las lesiones foliares en *C. lemon* (Eaton, 1942; Cerdá y col., 1979) y *C. aurantium* (Bhambota y Kanwar, 1970) fueron mayores en medios con Cl^- que en aquellos que contenían SO_4^{2-} . Sin embargo, Mobayen y Milthorpe, (1980) no detectaron diferencias en el crecimiento, en tres patrones diferentes, cuando se trataron con NaCl o Na_2SO_4 a concentraciones superiores de 152 mM.

Cooper y col., (1952) comprobaron que las concentraciones de Na^+ eran siempre considerablemente más bajas que las concentraciones de Cl^- en las hojas de cítricos y que las concentraciones de Na^+ , también eran más bajas en plantas que presentaban quemaduras foliares que en las plantas con hojas totalmente quemadas. Los daños foliares en árboles de ciruela fueron atribuidos al efecto del ión Cl^- por Hoffman y col., (1989), encontraron que el Na^+ no se acumulaba en las hojas hasta que éstas estaban seriamente dañadas. El Cl^- se acumula mucho más rápidamente en las hojas que el Na^+ . En frutales con hueso y almendros, el Na^+ se acumula en los tejidos leñosos limitando su transporte a las hojas (Bernstein y col., 1956). Después de que el sodio se acumule en raíces, tronco y ramas es transportado a las hojas. Bernstein y col., (1956) especularon que la senescencia de las células del parénquima podrían liberar Na^+ aumentando así el transporte de este ion varios años después de su acumulación. En los cítricos, probablemente, se den estos fenómenos. La capacidad del patrón *Poncirus trifoliata* para restringir el transporte de Na^+ a las hojas, fue atribuido por Walker, (1986), a la acumulación de altas concentraciones de Na^+ en los tejidos de raíces proximales y tallo basal.

La salinidad disminuye el tamaño de las hojas (Syvertsen y col., 1988; Lloyd y Howie, 1989a). Este efecto, está relacionado con la gran abscisión de las hojas en primavera, lo que reduce el área total foliar y saliniza los árboles. Después de las lluvias invernales, parece como si los tratamientos salinos aumentaran la producción

de hojas, probablemente como una respuesta de intensificación del crecimiento debido a la alta escasez de hojas en los árboles estresados con sales. Puesto que la presión de turgencia es generalmente más alta en las hojas salinizadas que en las hojas control, Lloyd y Howie, (1989a) concluyeron que la pérdida de hojas en primavera, era probablemente debida a concentraciones tóxicas de Na^+ , Cl^- o los dos juntos, y no al déficit hídrico.

Recientemente, Cerdá y col., (1990) encontraron una disminución en la producción de frutos, en limonero, aunque el tamaño de los mismos no se veía afectado. Otros autores también encontraron que la salinidad tiene un efecto mínimo en la calidad del fruto (François y Clark, 1980), concretamente en la variedad "Valencia" y en la variedad "Verna" de limonero (Nieves y col., 1991a).

1.3.2. Utilización de patrones

La tolerancia de los cítricos a la salinidad, se puede mejorar utilizando patrones excluyentes de sal. Los diversos patrones de cítricos difieren en su capacidad para excluir Na^+ , Cl^- o ambos iones. Embleton y col., (1968) recopilaron los resultados de numerosos estudios y clasificaron los diferentes patrones por su capacidad de exclusión de los iones Na^+ y Cl^- . Desde entonces, se han publicado muchos estudios comparativos en este sentido (Wutscher y col., 1974; Ream y Furr, 1976; Cerdá y col., 1977; Joolka y Singh, 1979; Peynado y Sluis, 1979; Rokba y col., 1979; Grieve y Walker, 1983; Walker y Douglas, 1983; Walker y col., 1983; Sykes, 1985a; Behboudian y col., 1986; Lloyd y col., 1987a; Syvertsen y Yelenosky, 1988; Vardi y col., 1988; Bañuls y col., 1990, 1991; Zekri, 1991).

Sin embargo, hay que destacar que las condiciones bajo las cuales se recogieron todos estos datos comparativos fueron muy diferentes, lo que podría llevar a una clasificación equívoca de los patrones. Un ejemplo de resultados contradictorios, son los que se refieren a la capacidad de los patrones limón rugoso y

naranja dulce para excluir el ión Cl^- . Resultados encontrados en Australia (Grieve y Walker, 1983) mostraron que la variedad limón rugoso acumulaba Cl^- mucho más rápidamente que el naranja dulce, sin embargo experiencias que habían sido realizadas en Texas (Cooper, 1962) mostraron resultados diferentes. La discrepancia en cuanto a las propiedades de transporte del ion Cl^- , por parte de los dos patrones mencionados, fueron contradictorias debido al diferente comportamiento que éstos tuvieron en USA y Australia. Grieve y Walker, (1983), sugirieron que era imposible poder determinar cuales eran las diferencias experimentales o genéticas responsables de este comportamiento sin hacer comparaciones previas directas entre los patrones americanos y australianos. También, contradiciendo las experiencias de Cooper, Levy y Shalhevet, (1990) concluyeron que el naranja amargo era mucho más efectivo que el limón rugoso para excluir Cl^- de las hojas de las variedades de pomelo "Marsh seedless" y de naranja "Washington Navel".

François y Clark, (1980) encontraron que las concentraciones foliares de Cl^- en la variedad "Valencia" sobre limón rugoso eran de 36 mmol Kg^{-1} (0.13%) cuando estos árboles crecían en arena con una concentración de Cl^- de 10 mM. Cole, (1985) encontró, sin embargo, una concentración de Cl^- de 282 mmol Kg^{-1} (1.0%) en hojas de "Washington Navel" sobre el mismo patrón cuando estos árboles habían sido regados con aguas que sólo contenían 2.9 mM de Cl^- . La concentración de Cl^- en el agua de suelo no fue medida en este último caso, pero medidas basadas en la salinidad del suelo indicaron que la concentración de Cl^- podía ser aproximadamente de 16 mM. Cole, (1985), indicó que este salto en la concentración foliar de Cl^- se producía cuando en el agua de riego el Cl^- excedía de 2 mM. Esta incapacidad del patrón para excluir Cl^- cuando su concentración en el medio superaba un cierto umbral, ya había sido investigada con anterioridad. Brusca y Haas, (1958) observaron que la concentración foliar de Cl^- , en limón "Lisbon" injertado en naranja amargo, aumentaba bruscamente de 54 mmol Kg^{-1} (0.19%) a 290 mmol Kg^{-1} (1.03%) cuando la concentración de Cl^- en la solución nutritiva se incrementaba de 15.8 mM (560 ppm) a 23.7 mM (840 ppm).

Otro ejemplo de resultados contradictorios, son las observaciones realizadas por Grieve y Walker, (1983). En plántulas de limón rugoso de 18 meses, crecidas en invernadero, se observó que no excluían el Cl^- con tanta eficacia como los árboles que crecían en el campo. La capacidad relativa de los patrones para excluir las sales varía con la edad y el tamaño de las diferentes especies y cultivos. Sykes, (1985) encontró que el orden con el que plántulas de patrones de naranjos de 3 meses acumulaban Cl^- , no era igual al que presentaban los mismos patrones injertados con otras variedades. Además, existe una relación entre la inhibición del crecimiento de plántulas de patrones no injertados y el grado de acumulación de Cl^- en las hojas (Grieve y Walker, 1983). Como se ha mencionado con anterioridad las diferencias en la relación $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ podrían explicar algunas de las variaciones en la respuesta de los patrones a la salinidad.

La ordenación de patrones realizada por Embleton y col., (1968) estaba basada en datos extraídos de experimentos de campo con árboles injertados que habían sido regados con aguas que contenían Na^+ y Ca^{2+} (Tablas 1 y 2). La mayoría de estos datos proceden de resultados de Cooper y col., (Cooper y col., 1951; Cooper y Gorton, 1952; Cooper y col., 1952; Cooper y Shull, 1953; Cooper y Peynado, 1959; Peynado y Young, 1962) los que indicaban que mandarino Cleopatra, lima Rangpur y *Severinia buxifolia* (Poir.) son los patrones más eficaces para restringir el transporte de Cl^- a diferentes variedades de pomelo. Los patrones más eficaces para restringir el transporte de Na^+ a la variedad, incluían el naranjo amargo, mandarino Cleopatra y naranjo Rusk (Tabla 2). Sin embargo, el intervalo de concentraciones de Na^+ en las hojas, de las diferentes combinaciones variedad/patrón, fue mejor al ser más pobre y pequeña la capacidad de exclusión de Na^+ que la del Cl^- .

Los resultados de numerosos estudios con híbridos, indican que la tolerancia al Cl^- , de los patrones, es heredable. Ream y Furr, (1976) observaron que diferentes patrones híbridos de mandarino Cleopatra y lima Rangpur eran tan eficaces

Capítulo I

restringiendo el transporte de Cl⁻ como sus parientes y además tan tolerantes como mandarina Cleopatra. Sykes, (1985b) describió un test para seleccionar en el invernadero híbridos de cítricos, el cual tuvo un éxito razonable. Sin embargo, el desarrollo de plantas tolerantes a la sal a partir de líneas celulares tolerantes o cultivos de tejidos no tuvo mucho éxito (Spiegel-Roy y Ben-Hayyim, 1985; Ben-Hayyim y Goffer, 1989). Posteriormente, en este sentido García-Agustín y Primo-Millo, (1995), a partir de óvulos no fertilizados del patrón citrange Troyer, utilizando agentes mutagénicos, obtuvieron plantas que se desarrollaban en presencia de 45 mM NaCl.

Una observación interesante realizada por Cerdá y col., (1990) fue el efecto de un interpatrón en la restricción del transporte de Cl⁻. Estos autores observaron que el transporte de Cl⁻ de los patrones naranja Amargo y mandarina Cleopatra a la variedad de limón "Verna" se bloqueaba por un interpatrón de naranja "Sanquina". El transporte de Cl⁻ y Na⁺ fue restringido de forma diferente por todas las combinaciones patrón-interpatrón-variedad ensayadas por Nieves y col., (1990).

Levy y Shalhevet, (1990) demostraron que la concentración de Cl⁻ en el zumo de pomelo, naranja, limón y mandarina indicaba las propiedades de exclusión de Cl⁻ de los patrones. Las concentraciones en el zumo se relacionaban con las de las hojas, habiendo muy poco error debido a la concentración y absorción superficial o a diferencias en la edad fisiológica. Sin embargo, las concentraciones de Na⁺ en el zumo no se relacionaba con el contenido foliar de este ion y no era indicativa de la capacidad del patrón para excluir Na⁺.

Tabla 1. Ordenación de patrones de cítricos en orden decreciente de restricción de Cl⁻, (Embleton y col., 1968)

Nombre común	Nombre botánico
mandarina Sunki	<i>Citrus reticulata</i> (Blanco)
Pomelo	<i>Citrus paradisi</i>
mandarina Cleopatra	<i>Citrus reticulata</i> (Blanco)
naranja China	<i>Severina buxifolia</i> (Poir.) Tenore
lima Rangpur	<i>Citrus hibrid</i>
tangelo Sampson	<i>Citrus paradisi</i> × <i>Citrus reticulata</i>
limón Rugoso	<i>Citrus jambhiri</i> (Lush.)

Introducción y antecedentes bibliográficos

naranja Amargo	<i>Citrus aurantium</i> (L.)
mandarino Ponkan	<i>Citrus reticulata</i> (Blanco)
Citrumelo 4475	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus paradisi</i>
naranja Trifoliata	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.
shaddock Cubano	<i>Citrus hybrid</i>
limón Dulce	<i>Citrus limon</i> (L.)
Calamondin	<i>Citrus reticulata</i> var. <i>Austera</i> × <i>Fortunella</i> spp.
naranja Dulce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
lima Dulce	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swing.
citrange Savage	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus sinensis</i>
Alemow	<i>Citrus macrophylla</i> (Wester)
naranja Rusk	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus sinensis</i>
citrange Troyer	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus sinensis</i>
citrange Carrizo	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus sinensis</i>
Gajanimma	<i>Citrus aurantifolia</i>

Los nombres botánicos son de Swingle, (1967)

Tabla 2. Ordenación de patrones de cítricos en orden decreciente de restricción de Na^+ , (Embleton y col., 1968)

Nombre común	Nombre botánico
naranja Amargo	<i>Citrus aurantium</i> (L.)
mandarina Cleopatra	<i>Citrus reticulata</i> (Blanco)
naranja Rusk	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus sinensis</i>
limón Rugoso	<i>Citrus jambhiri</i> (Lush.)
lima Rangpur	<i>Citrus hybrid</i>
naranja Dulce	<i>Citrus sinensis</i> (L.)
shaddock Cubano	<i>Citrus hybrid</i>
citrange Savage	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus sinensis</i>
Citrumelo 4475	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus paradisi</i>
citrange Troyer	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus sinensis</i>
mandarina Sunki	<i>Citrus reticulata</i> (Blanco)
Pomelo	<i>Citrus paradisi</i> (Macf.)
tangelo Sampson	<i>Citrus paradisi</i> × <i>Citrus reticulata</i>
mandarina Ponkan	<i>Citrus reticulata</i> (Blanco)
Calamondin	<i>Citrus reticulata</i> var. <i>Austera</i> × <i>Fortunella</i> spp.

Los nombres botánicos son de Swingle, (1967)

La acumulación foliar de Na^+ en los cítricos también incrementa al aumentar la concentración de sal en el medio, pero el grado de absorción del patrón no se relaciona con el de absorción de Cl^- . En un estudio comparativo con tres patrones diferentes, Walker y Douglas, (1983) encontraron grandes diferencias en la acumulación de Cl^- en las hojas de lima Rangpur, Khatta Kharma y cidro Etrog, pero pequeñas diferencias para la acumulación de Na^+ . A concentraciones moderadas de sal, mandarina Cleopatra fue más eficiente para excluir Cl^- que Na^+ , mientras que ocurrió lo contrario con naranja Trifoliata (Walker, 1986). Estas diferencias en el transporte relativo de Na^+ y Cl^- , entre los patrones, se dio con patrones injertados en naranjos "Valencia" (Walker y col., 1983). Syvertsen y Yelenosky, (1988) mostraron que el naranja Trifoliata y el naranja Dulce "Pineapple" acumulaban más lentamente Na^+ que Cl^- , mientras que el mandarina Cleopatra acumulaba cantidades similares de los dos iones. Estos datos corroboran que mandarina Cleopatra es más efectivo excluyendo Cl^- , mientras que el naranja Trifoliata tiene gran capacidad para excluir Na^+ , pero es acumulador de Cl^- . Otro ejemplo es, que en naranja "Navel" y mandarina "Clementina" acumulan mucho más Cl^- injertados sobre citrange Troyer que sobre

mandarino Cleopatra, mientras que para el Na^+ se da el fenómeno contrario (Bañuls y col., 1990).

La regulación de la absorción y el transporte de Na^+ y Cl^- parece que está mediado por diferentes mecanismos. La exclusión de Cl^- parece estar controlada principalmente por las membranas radiculares que restringen la entrada de Cl^- a las raíces y sistema vascular (Walker y Douglas, 1983). La composición del patrón en esteroides está relacionada con su capacidad de exclusión de sal. Douglas y Walker, (1983) encontraron una correlación entre la proporción de esteroides "más planos"/"menos planos" en las raíces, una propiedad que puede controlar la permeabilidad de la membrana. Encontraron que los patrones excluidores de Cl^- mantenían esta proporción en un medio salino, mientras que los no excluidores no presentaban esta característica. El mecanismo de exclusión de Na^+ , parece relacionado con la capacidad de las células parenquimáticas del xilema para extraer el Na^+ del xilema y secuestrarlo en las raíces leñosas y tejidos del tallo (Walker, 1986). Storey y Walker, (1987) observaron que el patrón lima Rangpur, tolerante a la sal, exhibía una mayor selectividad sobre el K^+ que sobre el Na^+ , que el patrón cidro Etrog, lo que sugería que esta selectividad podía estar asociada con la tolerancia a la sal de los patrones.

La importancia del Ca^{2+} , el cual es esencial para mantener la integridad estructural y la permeabilidad selectiva de las membranas de la raíz, no puede ser pasada por alto (Hanson, 1984). La exclusión de Na^+ y la selectividad K^+/Na^+ están reguladas por la concentración de Ca^{2+} en el medio.

1.3.3. Importancia de la variedad

Capítulo I

Aunque el transporte de Cl^- a la variedad está regulado principalmente por el patrón, existen evidencias que sugieren que la variedad limita por sí sola la acumulación de Cl^- en algunas combinaciones patrón/variedad. Cooper y col., (1952b) mostraron que las hojas de pomelo "Shary Rojo" acumulaban más Na^+ que las del naranjo "Valencia" cuando los patrones eran mandarino Cleopatra o naranjo Amargo. En contraste, la acumulación de Cl^- , la cual fue 10 veces superior a la de Na^+ , estuvo controlada por el patrón. Los análisis foliares en dos variedades diferentes de limonero sobre el patrón naranjo Amargo, después de un tratamiento salino de tres años, indicaron que el Na^+ y probablemente el Cl^- , eran más altos en "Primofiori" que en "Verna" (Cerdá y col., 1979). Estudios en los que se comparaban limoneros "Verna" y "Fino" injertados sobre naranjo Amargo, cultivados 75 días con NaCl , también mostraron que la acumulación de sales dependía de la variedad. En las hojas de la variedad "Fino" hubo una concentración más alta de Na^+ y Cl^- que en las de la variedad "Verna" (Nieves y col., 1991). Lloyd y col., (1989) encontraron que la variedad de limonero "Prior Lisbon" de un año de edad, acumulaba más Cl^- y más rápidamente que la variedad de naranjo "Valencia" injertadas en patrones de Trifoliata y citrange Troyer. Esto podía estar relacionado con la alta tasa de crecimiento y los requerimientos hídricos del limonero. La variedad de limón también acumuló más Na^+ que la de naranjo, pero la diferencia entre las dos variedades fue menor que la observada entre *Poncirus trifoliata* y citrange Troyer, debido a que el primer patrón es excluidor de Na^+ . Sin embargo, las diferencias entre variedades eran notables al utilizar un patrón u otro aunque los patrones no restringieran el transporte de iones.

Usando combinaciones de naranjo "Navel" y mandarino "Clementino" sobre mandarino Cleopatra y citrange Troyer, Bañuls y col., (1990) mostraron que la variedad "Navel" acumulaba más Cl^- que la variedad "Clementina", injertados sobre mandarino Cleopatra, mientras que no se observaban diferencias al ser injertados sobre citrange Troyer. Behboudian y col., (1986) no observaron diferencias en las concentraciones foliares de Cl^- en naranjo "Valencia", limón "Taylor" y tangelo

"Ellendale" injertados sobre mandarino Cleopatra. Los mecanismos empleados por las variedades para reducir el transporte de iones no están bien caracterizados, pero el transporte de iones está indudablemente relacionado con el crecimiento y vigor de la variedad y con sus requerimientos hídricos (Maas, 1993).

1.3.4. Membranas celulares en condiciones salinas

La tolerancia salina de las plantas glicófitas como los cítricos (Walker y Douglas, 1983), se atribuye en parte a la regulación de la absorción y/o translocación de Cl^- por las raíces.

El transporte de Cl^- tiene un componente pasivo y otro activo (Cram, 1973a). La estructura de la raíz primaria de *Citrus* muestra la existencia de una banda de Caspary en las células de la endodermis (Cossman, 1940; Hayward y Blair, 1942) y células pasaje con plasmodesmata funcional en la endodermis e hipodermis (Walker y col., 1984). Esto sugiere que el Cl^- y otros iones, se mueven a través de las raíces siguiendo una vía simplástica, ya que la banda de Caspary actúa como una barrera al movimiento apoplástico de agua e iones disueltos como el Cl^- (Läuchli, 1976a, b).

Douglas y Walker (1983) encontraron cambios en los esteroides libres de raíces fibrosas en relación con la capacidad de exclusión de Cl^- en tres genotipos de *Citrus* (lima Rangpur, Khatta Kharna y cidro Etrog). El patrón más tolerante y buen excluidor de Cl^- (lima Rangpur) aumentaba su nivel de esteroides (libres + esterificados) mientras que los otros dos patrones, pobres excluidores, disminuían su contenido. Estas alteraciones parecen constituir un buen marcador de la tolerancia salina. Estos ésteres predominan en las membranas mitocondriales (Kemp y Mercer, 1968; Janiszowska y col., 1979) y se ha sugerido una posible influencia en las propiedades de las membranas (Attalah y Nicholas, 1974).

Un cambio común de los tres genotipos sometidos a estrés salino es una

Capítulo I

disminución en la relación sitosterol/estigmasterol, normalmente debido al resultado de un incremento en los niveles de stigmasterol. Estos dos esteroides están relacionados (Bennett y col., 1963; Bennet y Hefmann, 1969) y existen muchos factores tales como: aumento de temperatura, edad del tejido, germinación, luz, tratamiento con hormonas (AIA) y salinidad, que aumentan la conversión de sitosterol a stigmasterol. La razón sitosterol/estigmasterol era máxima en lima Rangpur y mínima en cidro Etrog. La mejor correlación entre composición de esteroides y tolerancia salina se observaba en la medida de la relación de esteroides “más planos”/“menos planos” de la fracción de esteroides libres. Estos, son los únicos que se ha demostrado que afectan a la permeabilidad iónica de la membrana (Grunwald, 1971; Aloni y col., 1977). Además los esteroides “más planos” (colesterol y campesterol) son más efectivos que los “menos planos” (sitosterol y stigmasterol). La relación de estos esteroides puede ser un buen índice de la permeabilidad de la membrana a iones como el Cl⁻.

Los cambios en la razón fosfolípido/esterol también afectan a la permeabilidad de la membrana (Kleinhaus y col., 1979; Pohlmann y Kuiper, 1987). Así una disminución en esta relación, inducida por tratamiento salino en raíces de *Citrus* (lima Rangpur), daría lugar a una disminución de la permeabilidad de la membrana. Lo contrario ocurre en el genotipo de Citrus Khatta Kharna (Douglas y Walker, 1984).

Existe una relación inversa entre la energía de activación de la ATPasa y la razón fosfolípido/esterol libre en los tres genotipos de *Citrus*, sugiriendo que los cambios en la fluidez de la membrana, particularmente aquellos inducidos por esteroides libres, tienen el potencial necesario para influenciar los procesos de transporte iónico activo y pasivo y puede jugar un importante papel en el mecanismo de exclusión de Cl⁻, (Wolfe, 1978; Fischer, 1983). Esta menor relación en la razón fosfolípido/esterol se ha observado en tejido senescente (Less y Thompson, 1980) y está asociada a una pérdida en la regulación de la permeabilidad iónica de las membranas debido a la formación de agregados de esteroides en la matriz lipídica.

Numerosos estudios muestran que un alto nivel de diglicéridos (digalactosa) está relacionado con la sensibilidad de las plantas a condiciones salinas. En cinco patrones de vid, el contenido de digalactosa en raíces, está directamente relacionado con la concentración de Cl^- en hojas. La adición de estos diglicéricos a las raíces de plantas de judía provoca un aumento en la absorción y transporte de Cl^- (Kuiper, 1968).

El nivel de glicolípidos se ve afectado por la salinidad en diversas especies como caña de azúcar (Stuiver y col., 1981), alfalfa (Harzallah-Shkiri y col., 1982) y *Plantago* (Erdei y col., 1980) y se ha observado que tanto en genotipos sensibles como tolerantes, el nivel de glicolípidos en raíces y tallos disminuye en condiciones salinas.

1.3.5. Efectos causados en los parámetros de intercambio gaseoso

Hasta la fecha, ya son muchos los estudios que han determinado los efectos del estrés por sales sobre las relaciones hídricas y los parámetros de intercambio gaseoso en hojas de cítricos (Walker y col., 1982; Behboudian y col., 1986; Lloyd y col., 1986, 1987a, 1987b; Syvertsen y col., 1988; Lloyd y col., 1989; Lloyd y Howie 1989a, 1989b; Lloyd y col., 1990; Bañuls y col., 1996). La salinidad disminuye el contenido de agua de la hoja y el potencial osmótico, mientras que la acumulación de Na^+ y Cl^- hace que las hojas mantengan una presión de turgencia por encima de lo normal. Estas observaciones se hicieron en variedades de naranjo y pomelo, de entre 1 y 2 años de edad, injertadas en patrones de *Poncirus trifoliata*, mandarino Cleopatra o naranjo Dulce (Lloyd y col., 1987a, 1987b, 1990), en variedades de naranjo y limón de 2 años sobre mandarino Cleopatra (Behboudian y col., 1986), en plántones de naranjo Amargo (Zekri y Parsons, 1990b) y en naranjos de 24 años (Lloyd y Howie, 1989b). Walker y col., (1982) observaron una respuesta similar con plántones de "cidro Etrog" pero no con "lima Rangpur", un buen excluidor de Cl^- , el cual no

Capítulo I

realiza un buen ajuste osmótico y tiene una baja presión de turgencia.

La transpiración, tanto en árboles jóvenes como viejos, disminuye por la salinidad (Behboudian y col., 1986; Lloyd y Howie 1989b). Los resultados de Syvertsen y Yelenosky, (1988) en patrones de naranjo Dulce "Pineapple", mandarino Cleopatra, y naranjo Trifoliata mostraron que el estrés por NaCl reduce la transpiración y la conductividad hidráulica de las raíces. Zekri, (1991) comprobó que la conductancia de la raíz y la transpiración disminuía, como consecuencia de la salinidad, de forma similar en plántones de naranjo Amargo y mandarino Cleopatra.

La reducción en la conductancia estomática y en la tasa de fotosíntesis, debida al estrés salino, parece depender tanto del patrón como de la variedad. Lloyd y col., (1987b) observaron que la salinidad reducía más la asimilación de CO₂ en la variedad "Valencia" injertada en el patrón mandarino Cleopatra que cuando se injertaba en el patrón Trifoliata. Esto se atribuyó a la mayor capacidad de Trifoliata para excluir el ion Na⁺. La asimilación foliar de CO₂ en pomelo "Marsh" también era más sensible a la salinidad que las variedades de naranjos "Valencia", "Washington" o "Navel" (Lloyd y col., 1990). Estos autores atribuyeron los efectos perniciosos más al Na⁺ que al Cl⁻. Recientemente, Bañuls y Primo-Millo, (1995) estudiaron el efecto de la salinidad en las variedades "Clementina" y "Navel" injertadas sobre mandarino Cleopatra y citrange Troyer, concluyendo que la reducción en los parámetros de intercambio gaseoso dependían más de la variedad injertada que de las concentraciones de Na⁺ o Cl⁻ en las hojas.

Los factores responsables de los diferentes efectos de la salinidad sobre la fotosíntesis y parámetros de intercambio gaseoso en cítricos son complejos. Las plantas tienen diferentes respuestas dependiendo de la estación, la edad del árbol y las hojas y de las diferentes condiciones ambientales del suelo (Syvertsen y col., 1988). Las diferencias en la tolerancia a la salinidad no sólo dependen de la capacidad de excluir Cl⁻, Na⁺ o de las diferentes variedades, sino también de la capacidad de tolerar

esos iones en las hojas. Los efectos de diferentes relaciones $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ también pueden ser responsables de las diferentes respuestas fotosintéticas. En este sentido, Bañuls y col., (1996) comprobaron que los contenidos de Na^+ y Cl^- en las hojas de diferentes combinaciones variedad/patrón eran más bajas cuando se añadía a la solución de cultivo una concentración de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ de 30 mM.

Los mecanismos por los que el estrés salino afecta a estos parámetros no son muy conocidos. Lloyd y col., (1987b, 1989, 1990) encontraron que la conductancia estomática y la asimilación de CO_2 por unidad de área de hoja se reducían de forma similar por la salinidad. Estos autores sugirieron tres posibles causas para este fenómeno: (1) el cierre de los estomas, por la salinidad, disminuye la capacidad del mesófilo para asimilar CO_2 ; (2) el estrés salino reduce la capacidad de los cloroplastos para fijar CO_2 , lo que produce una señal que cierra los estomas; o (3) el estrés salino perjudica el metabolismo de los cloroplastos y la función celular es simultánea e independiente.

1.4. Interacción nitrato-cloruro

El efecto que tiene la acumulación de un ion sobre la del otro, es un proceso complejo en el que no necesariamente existe reciprocidad. Además, este fenómeno puede llegar a ser muy diferente dependiendo de la especie de que se trate y a veces incluso depende de la variedad dentro de una misma especie. Un ejemplo de este fenómeno es la interacción entre los iones Cl^- y NO_3^- .

Existen aportaciones del efecto inhibitor del NO_3^- en la acumulación de Cl^- , en plantas de cítricos, aunque los experimentos no clarifican el sitio de interacción (Smith, 1977). Experimentos llevados a cabo con discos de hoja de zanahoria y plántulas de cebada han mostrado la existencia de una correlación negativa entre el influjo de $^{36}\text{Cl}^-$ y el $\log_e [\text{NO}_3^- + \text{Cl}^-]_i$ en el mismo tejido (Deane-Drummond y Glass, 1984b). Estos trabajos sugieren que el efecto del ion NO_3^- en el transporte de Cl^- es directo y puede ser atribuido a la acumulación de NO_3^- en la vacuola. Un trabajo de Glass y col., (1985), puso de manifiesto que cuando plántulas de *Hordeum vulgare*, que habían crecido en presencia de CaSO_4 , eran pretratadas con $\text{NO}_3^- + \text{Cl}^-$ se producía un aumento en la sensibilidad a corto plazo del influjo de $^{36}\text{Cl}^-$ al NO_3^- , después de un periodo de 2 h.

El efecto del cloruro en el transporte de nitrato es menos conocido. La interpretación de los resultados, resulta a menudo confusa para la reducción y translocación de NO_3^- durante el transcurso de las experiencias. Una ventaja en este sentido, ha sido el uso de $^{36}\text{ClO}_3^-$ como marcador para NO_3^- (Deane-Drummond y Glass 1984a), pudiéndose usar así tiempos de influjo cortos. En plántulas de cebada el ion cloruro inhibe directamente el influjo $^{36}\text{ClO}_3^-/\text{NO}_3^-$ ($K_i = 35 \mu\text{M}$) al ir acumulándose éste (Deane-Drummond y Glass, 1984b). La aparente ausencia de cualquier efecto inmediato del Cl^- en la absorción neta de NO_3^- es difícil de entender y se ha sugerido que el Cl^- podría afectar el eflujo de NO_3^- (Deane-Drummond y

Glass, 1982). Posteriormente, Deane-Drummond, (1984), encontró que la absorción de Cl^- en plántulas de *Pisum sativum* es más sensible a la concentración interna de Cl^- en experimentos cortos, pero prevalece la acumulación total de $\text{NO}_3^- + \text{Cl}^-$ en experiencias con tiempos de exposición largos. La preferencia para la acumulación de NO_3^- sobre la acumulación de Cl^- parece dominar cuando la concentración de Cl^- es baja con lo que en estas condiciones el transportador de Cl^- es sensible al NO_3^- externo. La actividad de este transportador de Cl^- sensible a NO_3^- varía con las condiciones de crecimiento del material vegetal, y cuando la acumulación de Cl^- es alta, el NO_3^- externo tiene un efecto mínimo en el influjo de $^{36}\text{Cl}^-$.

La salinización con NaCl inhibe la absorción de NO_3^- en algunas plantas (Helal y col., 1975; Frota y Tucker, 1978; Luque y Bingham, 1981; Aslam y col., 1984; Pessarakli y Tucker, 1985; 1988; Botella y col., 1994) pero no en otras (Langdale y Thomas, 1971). Excepcionalmente, otros autores (Shimose, 1963; Lunin y col., 1964) observaron un incremento en la concentración de N en plantas de arroz y judía que habían crecido en sustratos salinos. Como ocurre en el caso del estrés hídrico, la disparidad en estos resultados es probablemente debida a un efecto producido por el crecimiento de los órganos sobre la concentración de N en los mismos.

Por otra parte se han aportado resultados contradictorios sobre la inhibición por Cl^- en la absorción de NO_3^- . Estudios en los que se utilizaron raíces de cebada mostraron que la absorción neta de NO_3^- no fue sensible a la presencia de Cl^- en el medio externo (Cram, 1973; Smith, 1973). Además, Glass y col., (1985) observaron que el influjo de $^{13}\text{NO}_3^-$ en raíces de cebada tampoco se veía afectado por la presencia de Cl^- externo. En contraste con estos resultados, Aslam y col., (1984) encontraron que el ion Cl^- inhibía fuertemente la absorción de NO_3^- en plántulas de cebada. Algunos de estos estudios (Cram, 1973; Smith, 1973; Aslam y col., 1984) mostraron que la acumulación previa de Cl^- en células radiculares es la causa de una reducción substancial de la absorción neta de NO_3^- . Sin embargo, el efecto de los iones salinos en los sistemas de transporte de NO_3^- han sido poco estudiados.

Capítulo I

Respecto al antagonismo iónico, se ha sugerido que la absorción de nutrientes por parte de las plantas puede ser perjudicada por los efectos osmóticos de las soluciones salinas, los cuales disminuyen la transpiración y reducen la masa del flujo de iones a las raíces (Lea Cox y Syversten, 1993). Sin embargo, Tanner y Beevers, (1990) presentaron evidencias que demostraban que tasas bajas de transpiración no se relacionaban necesariamente con una reducción de la absorción de iones.

Introducción y antecedentes bibliográficos

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. Objetivos y plan de trabajo

2.1. Objetivos

Los objetivos concretos de este trabajo son estudiar la cinética de absorción del nitrato por las raíces de los cítricos y caracterizar los posibles sistemas de transporte de este ion a través de las membranas. Por otro lado, se trata de determinar la influencia de la salinización con NaCl sobre la incorporación del nitrato a la planta, así como los efectos específicos de los iones Cl^- y Na^+ en los sistemas de transporte del NO_3^- .

Se proponen también unos objetivos más generales, como son el aportar información básica que permita mejorar la fertilización nitrogenada de este cultivo y conocer más profundamente las consecuencias que la salinidad ocasiona sobre la nutrición del mismo.

2.2. Plan de trabajo

El plan de trabajo que se ha seguido en esta investigación puede concretarse en los siguientes puntos:

1º) Determinar las velocidades de absorción neta de NO_3^- , por las raíces de dos especies de cítricos - mandarino Cleopatra y citrange Troyer - en función de las concentraciones de este ion en la solución externa.

2º) Establecer los posibles sistemas de transporte de NO_3^- , a través de las membranas, de acuerdo con la evolución de las tasas de absorción en los diferentes intervalos de concentración de NO_3^- , en el medio.

3º) Determinar el efecto de la presencia de diferentes sales (NaCl y KCl) en el medio de cultivo, sobre la absorción del nitrato a través de distintos sistemas de transporte.

4º) Estudiar la influencia de los pretratamientos, con diferentes tiempos y distintas concentraciones de las anteriores sales, sobre la absorción del NO_3^- , por las raíces y su acumulación en los distintos órganos de la planta.

5º) Establecer los efectos diferenciales de la reducción de la transpiración inducida por la salinidad y de la acumulación del ion Cl^- en los distintos órganos, sobre la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$.

6º) Determinar la influencia de la nutrición previa con NO_3^- o de la privación de este ion, sobre la tasa de absorción neta de NO_3^- , por las raíces.

7º) Estudiar la influencia del pH del medio externo sobre la absorción de nitrato por los diversos sistemas de transporte.

Capítulo II

8º) Caracterizar los diferentes sistemas de transporte de nitrato a través de las membranas de las células radiculares, mediante la aplicación de diferentes inhibidores específicos.

Objetivos y plan de trabajo

MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y métodos

3.1. Material vegetal

Las plántulas utilizadas, dependiendo de la experiencia, procedían de semillas de citrange Troyer (híbrido de *C. sinensis* (L.) Osbeck \times *P. trifoliata* (L.) Raf.) y/o mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort.) germinadas con arena en invernadero a una temperatura de 24-28°C durante el día y 16-18°C durante la noche, con una humedad relativa del 80% y un fotoperiodo de 16 horas. El riego se efectuó tres veces por semana con la solución nutritiva de Hoagland modificada, a pH 5.8-6.2 (Legaz, 1993) (tabla 3).

Dos semanas antes de iniciar las experiencias de absorción, plántulas de aproximadamente 4 meses de edad, con características similares de altura, peso y estado de brotación, se trasladaron a una cámara de cultivo CONVIRON CMP 3244, donde se mantuvieron a una temperatura constante de 27°C, con humedad relativa del 65% y fotoperiodo de 16 horas, con una intensidad luminosa de 1200 PAR¹.

¹ Photon flux density ($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$)

Tabla 3. Solución nutritiva de Hoagland (1940) modificada por Legaz (1993)

Macronutrientes		
	KNO ₃	0.40 g/L
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.82 g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.40 g/L
	H ₃ PO ₄	0.07 g/L
Micronutrientes		
	H ₃ BO ₃	2.86 mg/L
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.20 mg/L
	MoO ₃	0.09 mg/L
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.11 mg/L
	MnSO ₄	9.15 mg/L
	Fe-Sequestrene	67.0 mg/L

3.2. Determinación cinética de la absorción del ion nitrato

Para iniciar las experiencias de la cinética de la absorción de NO_3^- , las plántulas se extrajeron del semillero, se lavaron con abundante agua destilada y se trasladaron a una solución con 0.2 mM de CaSO_4 , bien aireada. Posteriormente, se mantuvieron en oscuridad durante 6 días, a 27°C y 65% HR. Después de este periodo las plántulas se trasladaron a una solución aireada de Hoagland libre de N y se mantuvieron durante 3 días con luz continua. La intensidad de luz empleada durante este periodo fue de 1200 PAR. La luz continua se utiliza para eliminar posibles fluctuaciones en la absorción de NO_3^- , debidas a la luz.

La absorción de NO_3^- , se determinó introduciendo 6 plántulas de mandarino Cleopatra o citrange Troyer, en tubos pyrex de 200 mL, conteniendo 1 mM de MES^2 (pH 6), 0.2 mM de CaSO_4 y NaNO_3 en el intervalo de concentraciones entre 0.01 a 10 mM. Las soluciones se mantuvieron fuertemente aireadas. Las pérdidas de agua de las soluciones, debidas a la evaporación y la transpiración, se compensaron mediante adición de agua destilada tamponada con 1 mM de MES, (pH 6). Dependiendo de la concentración externa de NO_3^- , se tomaron alícuotas de un volumen comprendido entre 0.25 y 1 mL, cada 30 min durante un periodo de al menos 6 h.

Las tasas de absorción se determinaron midiendo la desaparición de NO_3^- de las soluciones en función del tiempo (apartado 3.12.1.). Las tasas de absorción se calcularon mediante una regresión lineal.

Las representaciones gráficas de los dobles inversos de las tasas de absorción

² ácido (2-[N-Morfolino]etano sulfónico).

versus las concentraciones de sustrato, se sometieron a análisis de regresión lineal. Las constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m y $V_{m\acute{a}x}$) se calcularon a partir de estas ecuaciones de regresión en un intervalo de concentraciones entre 0.01-1 mM de NO_3^- (Segel, 1975). La tasa de absorción de NO_3^- se expresó como $\mu\text{moles NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ P.F.³ raíz h^{-1} .

3.3. Inhibición de la absorción de nitrato por sales

Para estudiar el efecto de las sales NaCl y KCl en los sistemas de transporte de NO_3^- se procedió exactamente igual que en el apartado anterior (3.2.), aunque adicionando sales a las soluciones de absorción.

En el intervalo de concentraciones de NaNO_3 entre 0.01 y 1 mM se añadieron concentraciones finales de 0, 2.5, 5, 10 y 20 mM de NaCl o KCl en mandarino Cleopatra y de 0, 0.25, 0.5 y 1 mM en citrange Troyer.

A concentraciones de 3 y 6 mM de NaNO_3 se añadieron concentraciones finales de NaCl o KCl (0, 30, 60, y 120 mM) en ambos patrones.

La absorción neta de NO_3^- se midió y calculó del mismo modo que se ha descrito en el apartado 3.2.

3.4. Efecto del tiempo de pretratamiento y la concentración de cloruro sódico en la absorción de nitrato

³ Peso fresco

Para determinar el efecto de los pretratamientos con NaCl y KCl en la absorción de NO_3^- , plántulas de ambos patrones, se cultivaron durante 21 días en solución de Hoagland, libre de N, a la cual se adicionó NaCl o KCl a concentraciones finales de 0, 30, 60 y 120 mM. Los pretratamientos se llevaron a cabo en condiciones ambientales controladas, a 27°C, 65% HR y 16 h de fotoperiodo, con una intensidad luminosa de 1200 PAR. Después del periodo de salinización se midió la absorción de NO_3^- , en una solución desprovista de NaCl, como se ha descrito en el apartado 3.2.

Tras el periodo de absorción, las raíces se separaron del resto de la plántula, posteriormente se lavaron con agua destilada, se secaron en estufa de aire forzado a 68°C durante 48 h, se pesaron, se molieron y se almacenaron a temperatura ambiente, hasta el momento de proceder al análisis del ion Cl^- (apartado 3.12.3.).

3.5. Efecto de los pretratamientos salinos sobre las concentraciones endógenas de Cl^- y ^{15}N en distintos órganos, la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ y la transpiración

Plántulas de citrange Troyer, se mantuvieron durante 21 días en la solución nutritiva de Hoagland, libre de nitrógeno, adicionada de NaCl con concentraciones finales de 0, 30, 60 ó 120 mM. Estas soluciones se mantuvieron aireadas durante el tiempo que duró la experiencia, y se renovaron dos veces por semana. Las condiciones de cultivo fueron de 27°C, 65% HR y fotoperiodo de 16 horas, con una intensidad luminosa de 1200 PAR.

Tras finalizar el periodo de pre-tratamiento con NaCl se introdujeron diez plántulas en tubos pyrex de 200 mL que contenían 1 mM de MES (pH 6), 0.2 mM de CaSO_4 y 5 mM de $^{15}\text{NO}_3\text{K}$ (96% átomos de ^{15}N en exceso). Las soluciones se mantuvieron constantemente aireadas y a volumen constante, por adición de agua

destilada tamponada con 1 mM de MES (pH 6), a lo largo de las 24 horas que duró la experiencia. Las condiciones ambientales durante el periodo de marcaje fueron de 27°C, 65% HR y luz continua con una intensidad luminosa de 1200 PAR.

Una hora antes de finalizar el experimento se midió la transpiración en las hojas tal como se describe en el apartado 3.12.2.

Posteriormente, las plántulas se fraccionaron en raíces, tallos y hojas. Estas fracciones se lavaron con agua destilada, se secaron en estufa de aire forzado a 68°C durante 48 h, se pesaron, se molieron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior análisis. En cada una de las fracciones se analizó el contenido de Cl⁻ y de ¹⁵N total como se describen en los apartados 3.12.3. y 3.12.4. respectivamente.

En este experimento la absorción de ¹⁵NO₃⁻ se determinó por la medida del ¹⁵N total analizado en los distintos órganos de las plántulas.

3.6. Efecto de la luz y la humedad en la absorción de ¹⁵NO₃⁻ y la transpiración

Plántulas de citrange Troyer fueron tratadas con 0 y 60 mM NaCl durante 21 días. Tras finalizar el pre-tratamiento salino las plántulas se dividieron en cuatro grupos.

Capítulo III

Dos de ellos se mantuvieron durante 24 h a 27°C y 65% HR y luz continua con intensidades luminosas de 1200 ó 400 PAR. La solución de absorción contenía 1 mM de MES (pH 6), 0.2 mM de CaSO₄ y 5 mM de ¹⁵NO₃K (96% átomos de ¹⁵N en exceso).

Los otros se distribuyeron en cámaras que mantenían humedades relativas del 40 ó 90%, permaneciendo 24 h en la anterior solución, a 27°C y luz continua con una intensidad luminosa de 1200 PAR.

Una hora antes de finalizar el experimento se midió la transpiración en los cuatro grupos de plántulas como se describe en el apartado 3.12.2.

Posteriormente, las plántulas se fraccionaron en raíces, tallos y hojas. Estas fracciones se manipularon como en el apartado 3.5. y se almacenaron para el posterior análisis de ¹⁵N.

La absorción de ¹⁵NO₃⁻ se determinó por la medida del ¹⁵N total analizado en los distintos órganos de las plántulas.

3.7. Efecto del cloruro sódico en la absorción de ¹⁵NO₃⁻ en raíces aisladas

El procedimiento seguido en este experimento es idéntico al que se ha descrito en el apartado 3.5., a excepción de que las concentraciones finales de los tratamientos con NaCl fueron 0, 60 y 120 mM. Tras 21 días de tratamiento las raíces se aislaron del resto de la plántula.

Posteriormente, las raíces se mantuvieron durante 24 h a 27°C, en una solución de absorción que contenía 1 mM de MES (pH 6), 0.2 mM de CaSO₄ y 5 mM de ¹⁵NO₃K (96% átomos de ¹⁵N en exceso). Seguidamente, las raíces se lavaron, se secaron en estufa de aire forzado a 68°C durante 24 h, se pesaron, se molieron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se realizaron los análisis de Cl⁻ y ¹⁵N total como se describen en los apartados 3.12.3. y 3.12.4. respectivamente.

3.8. Efecto del tiempo de pretratamiento y la concentración de nitrato en la absorción del ion nitrato

Después de mantener plántulas de mandarino Cleopatra durante 6 días en oscuridad, en las mismas condiciones descritas en el apartado 3.2., se trasladaron a soluciones nutritivas de Hoagland, libres de N, a las que se adicionó KNO₃ hasta alcanzar concentraciones finales de 0.2, 3 y 10 mM.

Las plántulas se mantuvieron en estas soluciones durante un periodo máximo de 8 días, a 27°C, 65% HR y fotoperiodo de 16 h, con una intensidad luminosa de 1200 PAR.

Diariamente, se extrajeron plántulas de estas soluciones, que se utilizaron para medir la absorción de NO₃⁻ como se ha descrito en el apartado 3.2. En las plántulas pre-tratadas con 0.2 mM KNO₃, las soluciones de absorción contenían 0.2 mM NO₃⁻, mientras que en las plántulas pre-tratadas con 3 ó 10 mM KNO₃ las soluciones de absorción contenían 3 mM NO₃⁻.

3.9. Efecto del pH externo en la absorción de nitrato

Capítulo III

El efecto del pH en la absorción de NO_3^- se estudió en plántulas de mandarina Cleopatra, no inducidas con KNO_3 , que se cultivaron hidropónicamente como se ha descrito en el apartado 3.2. Las soluciones de absorción contenían 0.2 mM de CaSO_4 , 1 mM de MES-TRIS⁴ (pH 4, 5, 6, 7, 8 ó 9) y 0.2 ó 3 mM de NaNO_3 .

Las medidas de absorción de NO_3^- se realizaron como se ha descrito en el apartado 3.2.

3.10. Caracterización de los sistemas de transporte de alta afinidad: Efecto de algunos inhibidores sobre la absorción de nitrato

El efecto de distintos compuestos con posible acción sobre la absorción de NO_3^- , tales como 2,4-DNP⁵ y KCN (inhibidores metabólicos), p-HMB⁶ (agente bloqueante de grupos SH, que forman parte de los centros activos de los transportadores iónicos), DCCD⁷, DES⁸ y ortovanadato sódico (inhibidores de la H^+ -ATPasa del plasmalema) fue evaluado en plántulas de mandarina Cleopatra

⁴ (Tris(hidroximetil)-aminoetano).

⁵ 2,4-dinitrofenol.

⁶ p-hidroximercuribenzoato.

⁷ N-N'-d ciclohexil-carbodiimida.

⁸ Dietilstibesterol.

inducidas y no inducidas con KNO_3^- .

Para iniciar esta experiencia, las plántulas de mandarino Cleopatra, se mantuvieron en oscuridad durante 6 días, a 27°C y 65% HR, en una solución aireada que contenía 0.2 mM de CaSO_4 . Después de este periodo, un grupo de plántulas se trasladó a una solución aireada de Hoagland, libre de N, y se mantuvieron durante 3 días a 27°C, 65% HR y luz continua con una intensidad luminosa de 1200 PAR (plántulas no inducidas). Otro grupo de plántulas se traslado a una solución aireada de Hoagland con 0.2 mM KNO_3 , donde permanecieron el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad que las anteriores (plántulas inducidas).

La absorción de NO_3^- se determinó introduciendo 10 plántulas en soluciones de absorción que contenían 1 mM de MES (pH 6), 0.2 mM de CaSO_4 , 0.2 mM de NaNO_3 adicionadas o no con cada uno de los inhibidores (20 μM de 2,4-DNP, 0.1 mM de KCN, 0.1 mM de p-HMB, 0.1 mM de DCCD, 0.1 mM de DES ó 0.1 mM de ortovanadato sódico). Durante el periodo de absorción se mantuvieron unas condiciones de 27°C, 65% HR e iluminación continua con una intensidad luminosa de 1200 PAR.

En las experiencias con DCCD, DES u ortovanadato sódico, las plántulas fueron además preincubadas con 0.1 mM de cada uno de ellos durante 24 horas, antes de realizar las medidas de absorción.

Para los experimentos con DCCD o DES, todas las soluciones incluyendo los controles, contenían 0.25% (v/v) de etanol para facilitar la disolución de estos compuestos.

3.11. Caracterización del sistema de transporte de baja

afinidad: Efecto de algunos inhibidores sobre la absorción de nitrato

En estos experimentos se utilizaron plántulas de citrange Troyer tratadas de la misma forma que se ha descrito en el apartado 3.2.

Posteriormente, estas plántulas se separaron en tres grupos, dos de los cuales se mantuvieron durante 24 h a 27°C, 65% HR e iluminación continua con una intensidad luminosa de 1200 PAR, en soluciones de absorción que contenían 1 mM de MES (pH 6), 0.2 mM de CaSO₄ y concentraciones de ¹⁵NO₃K (96% átomos de ¹⁵N en exceso) de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 mM. Seguidamente en un grupo se separaron las raíces del resto de la plántula, se lavaron y se utilizó el material fresco para las determinaciones de la actividad nitrato reductasa y de la proteína total, (apartados 3.12.5. y 3.12.6. respectivamente). En el segundo grupo de plántulas se separaron los diferentes órganos (raíces, tallos y hojas), se lavaron, se secaron en estufa de aire forzado a 68°C durante 24 h, se pesaron, se molieron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta el posterior análisis de ¹⁵N total.

Un tercer grupo de plántulas se mantuvo durante 24 h a 27°C, 65% HR e iluminación continua con una intensidad luminosa de 1200 PAR, en soluciones de absorción que contenían 1 mM de MES (pH 6), 0.2 mM de CaSO₄, 5 ó 30 mM de ¹⁵NO₃K (96% átomos de ¹⁵N en exceso). Estas soluciones fueron adicionadas o no con cada uno de los inhibidores (20 µM de 2,4-DNP, 0.1 mM de KCN, 0.1 mM de p-HMB, 0.1 mM de DCCD, 0.1 mM de DES ó 0.1 mM de ortovanadato sódico). En las experiencias con DCCD, DES u ortovanadato sódico, las plántulas fueron además preincubadas con 0.1 mM de cada uno de ellos durante 24 horas, antes de realizar las medidas de absorción. Para los experimentos con DCCD o DES, todas las soluciones, incluyendo los controles, contenían 0.25% (v/v) de etanol.

Seguidamente el material vegetal se separó en raíces, tallos y hojas, se lavaron los diferentes órganos, se secaron en estufa de aire forzado durante 48 h a 68°C, se

pesaron y se molieron, almacenándose a temperatura ambiente hasta el posterior análisis de ^{15}N total (apartado 3.12.4.).

La absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ se determinó por la medida del ^{15}N total analizado, en las raíces, tallos y hojas de las plántulas.

3.12. Determinaciones analíticas

3.12.1. Determinación del ion nitrato

El NO_3^- de las soluciones de absorción, se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia, a 212 nm (A.P.H.A. y col., 1980). La curva patrón se realizó a partir de una solución stock 1 M de KNO_3 , que contenía HCl 1 M 2% (v/v). El blanco se preparó con agua destilada, HCl 1 M (2% v/v) y 0.2 mM MES.

3.12.2. Determinación de la transpiración

Para medir la transpiración en las hojas de las plántulas se utilizó un autoanalizador portátil de fotosíntesis LCA 4. Para ello se seleccionaron dos hojas de cada plántula, de manera que presentaran el mismo área y el mismo estado fisiológico de crecimiento. Las medidas siempre se realizaron en el interior de la cámara de cultivo según las condiciones de cada experiencia.

Las medidas se realizaron de forma automática en cada una de las hojas durante 20 minutos a intervalos de tiempo de 1 minuto. Estas medidas se promediaron en cada uno de los casos, y la tasa de transpiración se expresó como $\text{mol H}_2\text{O}/\text{m}^2 \text{ s}$.

3.12.3. Determinación del ion cloruro

Capítulo III

A 500 mg de materia seca, de cada uno de los órganos se les añadió 100 mL de una solución de ácido acético glacial al 10% y ácido nítrico al 0.7%. La mezcla se agitó y se dejó en reposo durante toda la noche a temperatura ambiente, posteriormente, se filtró y la concentración de iones Cl^- se determinó con un clorímetro automático Corning-926, adicionando alícuotas de 0.5 mL del filtrado, al tampón ácido combinado Corning nº 00156206 P siguiendo el método de Gilliam, (1971).

3.12.4. Determinación del N total

El nitrógeno total se analizó en los diferentes órganos de las plántulas por el método semimicro Kjeldahl, descrito por Bremner (1965a), utilizando un analizador semi-automático (Tekator). Para ello, se pesaron 500 mg de materia seca de cada uno de los órganos y se introdujeron en un tubo digestor, al cual se añadió un catalizador, compuesto por 5 g de K_2SO_4 y 0.005 g de selenio, y 10 mL de H_2SO_4 concentrado. Los tubos se colocaron en un bloque digestor durante 30 min a 420°C . Una vez enfriados, se añadieron 50 mL de agua destilada para recoger los restos de la pared. Los digestos diluidos, se alcalinizaron con 60 mL de NaOH al 40% y se destilaron en corriente de vapor durante 5 min. El amoníaco destilado se recogió en 25 mL del indicador-ácido bórico y se valoró con H_2SO_4 0.05 N de factor conocido. El punto final de valoración se detectó, al virar la solución de color verde a morado-rojizo. Paralelamente, se realizó un ensayo en blanco. La concentración se expresó en gramos de N por 100 g de peso seco de tejido.

3.12.4.1. Análisis de ^{15}N

Para la determinación experimental de la relación isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, el nitrógeno se tuvo que transformar previamente en nitrógeno molecular (N_2). Las transformaciones químicas que tienen lugar en este proceso fueron descritas por

Bremner, (1965b), Saniger y Sanz, (1974) y se resumen en las tres etapas siguientes:

- Conversión del nitrógeno marcado contenido en el material vegetal a la forma amoniacal y determinación de su concentración (método semimicro Kjeldahl).
- Conversión del amonio a nitrógeno elemental (N_2) por oxidación con hipobromito sódico en vacío.
- Determinación de la abundancia isotópica relativa de ^{15}N en el N_2 , por espectrometría de emisión.

Para la determinación por rutina de las abundancias isotópicas relativas, las transformaciones de las dos últimas etapas, descritas anteriormente, no han de ser necesariamente cuantitativas; sólo se ha de cuidar que el gas a analizar no contenga contaminación de N_2 atmosférico o residuos de la reacción con hipobromito sódico (CO_2 , O_2 , etc.). Para convertir el amonio a nitrógeno elemental, se partió de las soluciones amoniacaes valoradas que se utilizaron para determinar el nitrógeno total. La concentración de nitrógeno en estas soluciones era insuficiente para determinar directamente la abundancia isotópica de ^{15}N . Con el fin de concentrarlas, se acidificaron ligeramente con 3 mL de H_2SO_4 0.08 N y después se evaporaron a sequedad en una estufa. El residuo se resuspendió con agua destilada a la concentración de 1 mg en 100 μL , que es la ideal para que origine una presión de N_2 en el tubo de descarga de 100 μL .

Para pasar el nitrógeno de la forma amoniacal a N_2 se procedió de la siguiente forma: en un tubo de Rittenberg (fig. 1) se añadió la muestra en una rama, y el reactivo (hipobromito sódico) en la otra. El reactivo se preparó *in situ* en un vaso de precipitados al mezclar volúmenes iguales de una solución saturada de bromo y otra de hidróxido sódico. Ambas ramas del tubo se congelaron con nitrógeno líquido y se hizo el vacío hasta alcanzar 3 mTorr para eliminar los gases que pudiera contener la muestra (N_2 , O_2 , CO_2). El tubo se aisló del sistema de vacío y se descongeló por inmersión en agua a temperatura ambiente. Se congeló nuevamente con nitrógeno

Capítulo III

líquido y se repitió el proceso de evacuación de gases. Se descongeló y se hizo reaccionar la muestra ((NH₄)₂SO₄ acuoso) con el reactivo hipobromito sódico, mezclando las soluciones de ambas ramas. Se congeló el tubo de Rittenberg para retener los gases contaminantes producidos en la reacción (O₂, CO₂, etc.) y se colocó en comunicación con un tubo de Pyrex sellado en un extremo y con dos estrechamientos (fig. 2). Una vez producido y transferido el N₂ a este tubo se selló y cortó con un soplete. Este tubo se utilizó para la determinación de ¹⁵N en un espectrómetro de emisión Jasco-N15.

Una vez preparados los tubos de descarga, antes de su lectura se excitó por descarga eléctrica de alto voltaje (8-10 Kvolt) de una bobina de Tesla. Una vez excitado el tubo, se leyó en un espectrómetro de emisión. Después de los pertinentes ajustes de ganancia del fototubo, amplificación, etc., se procedió al registro del espectro. Dicho registro se realizó siempre por triplicado y hasta que no se observó cambio con el tiempo.

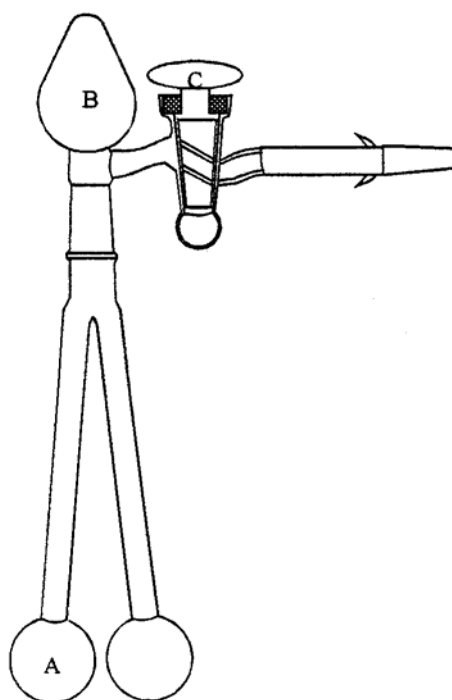


Figura 1. Sistema de preparación de muestras: A, bulbos del tubo de Rittenberg; B, ampolla de reacción; C, llave de paso.

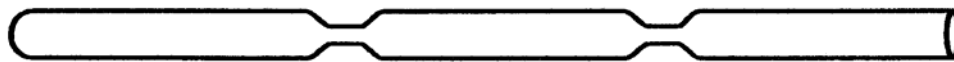


Figura 2. Tubo de descarga antes de ser cortado.

En la figura 3 se representa un espectro de emisión típico. La línea recta AJ se tomó como base del pico $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$, y BC como la base de los picos $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ y $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$. Los puntos E y F son el máximo del pico $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ y $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ respectivamente. Si la altura de los puntos A, B,....., y J se describen como H_a , H_b ,....., y H_j respectivamente, las alturas de los picos $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ son H_e - H_c , y la altura del pico $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ es H_h - H_a . El porcentaje aparente de ^{15}N se puede calcular utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ aparente} = X = 100/(1 + 2R) \quad (1)$$

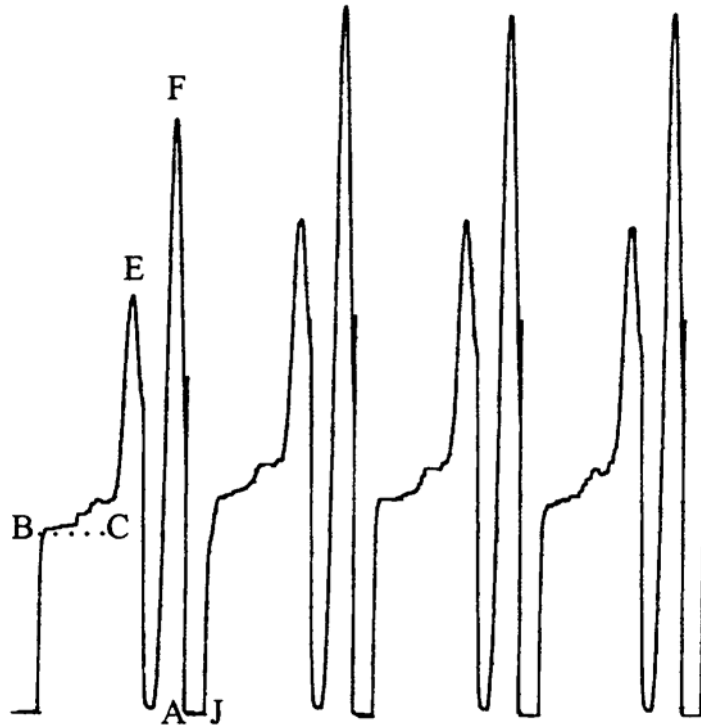


Figura 3. Espectro de emisión típico.

donde R se define como:

$$R = I_{28}A_{29}/I_{29}A_{28} = (I_{28}/I_{29})/(A_{29}/A_{28}) \quad (2)$$

I_{28} e I_{29} son las intensidades (alturas de los picos) de los picos $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ y $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ respectivamente.

$$(I_{28}/I_{29}) = (Hh-Ha)/(He-Hc) \quad (3)$$

El % ^{15}N aparente está directamente relacionado con el % ^{15}N real. En nuestras condiciones todas las lecturas se realizaron con una atenuación de 32 X. El % ^{15}N real se representa por Y, y el % ^{15}N aparente por X. Dos tubos estandar adyacentes se denotan por (X_i, Y_i) y $(X_i + 1, Y_i + 1)$, la relación que existe entre X e Y se puede escribir como:

$$Y = [(Y_{i+1} - Y_i)/(X_{i+1} - X_i)] (X - X_i) + Y_i \quad (4)$$

reemplazando $(Y_{i+1} - Y_i)/(X_{i+1} - X_i)$ por $K(g)_i$, la ecuación se simplifica:

$$Y = K(g)_i(X - X_i) + Y_i \quad (5)$$

Donde g muestra la ganancia, por ejemplo, $K(32)_i$. Después de un tiempo largo de medida para varios tubos de descarga, el valor inicial medido se representa por $X_i + \Delta X$. El valor X_{i+1} del siguiente tubo estandar se midió también como $X_{i+1} + \Delta X$ como se ve en la ecuación 4. Esta ecuación es aplicable para la misma región de ganancia.

Así:

$$(X_{i+1} + \Delta X) - (X_i + \Delta X) = (X_{i+1} + \Delta X) - (X_i + \Delta X) = X_{i+1} - X_i \quad (6)$$

Como el valor $Y_{i+1} - Y_i$ es una constante, el valor $K(g)_i$ es un número fijo que depende del analizador. Así, $K(g)_i$ debe escribirse $K(g)$. La ecuación 6 debe reescribirse como:

$$Y = K(g)(X - X_i) + Y_i \quad (7)$$

Si el valor de $K(g)$ se conoce, tan solo hace falta un tubo de descarga estandar (cuyo enriquecimiento es conocido) para cada rango de ganancia. Generalmente, se mide el valor de un tubo estandar después de medir una serie de tubos.

La cantidad de N absorbido (N_a) durante el periodo de marcado, por un órgano, procedente de la solución nutritiva, se calculó mediante la siguiente ecuación:

Capítulo III

$$Na = 10 \times (\%N \times Ps \times E_2 / E_1)$$

%N = Concentración de nitrógeno (gr/100 gr peso seco)

Ps = Peso seco

E₁ = Enriquezamiento de la solución nutritiva

E₂ = Atomos % de ¹⁵N en exceso en cada órgano

3.12.5. Determinación de la actividad Nitrato Reductasa

Para la determinación de la actividad nitrato reductasa se siguió el método de Meyerhoff y col., (1994). La extracción se realizó triturando en un mortero de porcelana, refrigerado con hielo, 2 g de raíces a las que se les añadieron 6 mL de tampón de extracción (0.1 M de Tris-HCl (pH 8.5), 20 μM de FAD, 2 μM de Na₂MoO₄, 2 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 0.01 mM de leupeptina y 2.5% de PVPP (p/v)). Una vez triturado y homogeneizado el material vegetal, se centrifugó en una centrifuga SORVAL 5R en un rotor J-20 durante 15 min. a 4°C y 16000 rpm.

El ensayo de actividad nitrato reductasa se realizó al añadir 200 μL del extracto crudo, obtenido después de centrifugar, al medio de reacción consistente en 1 mL de tampón de ensayo (50 mM de K₃PO₄ (pH 7.5), 20 mM de KNO₃, y 3 mM de NADH hasta 1 mL con agua destilada. La reacción fue llevada a cabo en un baño termostataado a 30°C durante dos horas. De cada extracción se realizaron tres repeticiones y se preparó un blanco que no contenía extracto crudo que se sustituía por agua destilada. La reacción se interrumpió eliminando el exceso de NADH, al añadir a cada tubo de ensayo 100 μL de ZnAc 1 M.

La actividad nitrato reductasa se midió leyendo la absorbancia a 540 nm, del NO₂⁻ formado, después de añadir a cada uno de los tubos 2 mL de una mezcla 1:1 de sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl y de N-(1-Naftil)-etilendiamina al 0.02% (p/v) en

agua. La curva patrón se realizó a partir de una solución stock 1 mM KNO₂.

La actividad nitrato reductasa se expresó como $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{g P.F. raíz h g}$ proteína total.

3.12.6. Determinación de la proteína total

La cuantificación de la proteína total, presente en el extracto crudo utilizado en el anterior apartado, se realizó siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

A 100 μL de extracto crudo se le añadieron 5 mL de reactivo de Bradford y se leyó la absorbancia a 595 nm. La curva patrón se realizó con cantidades adecuadas de una solución 0.1% (p/v) de BSA⁹.

La cantidad de proteína se expresó como μg de proteína/g P.F. de raíz.

Todos los experimentos así como las determinaciones analíticas se repitieron al menos tres veces.

⁹ Seroalbúmina Bovina

Capítulo III

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Determinación cinética de la absorción del ion nitrato

La absorción neta de NO_3^- por las raíces de plántulas intactas de mandarino Cleopatra y citrange Troyer se ha estudiado en un amplio intervalo de concentraciones externas de NO_3^- (0.01-10 mM), (fig. 5).

Durante el periodo inicial de absorción se encontró un aumento lineal del NO_3^- absorbido con el tiempo. Seguidamente, se observó que la tasa de absorción de NO_3^- descendía a medida que el NO_3^- iba agotándose en la solución (fig. 4). La tasa de absorción se calculó en el periodo inicial, cuando la absorción de NO_3^- es una función lineal del tiempo. La medida de la desaparición química de NO_3^- de las soluciones utilizadas en este estudio podría servir sólomente para estimar la absorción neta de NO_3^- , más que el influjo del mismo, puesto que es posible que, durante el periodo de absorción (6 h), se produzca eflujo de NO_3^- desde las raíces.

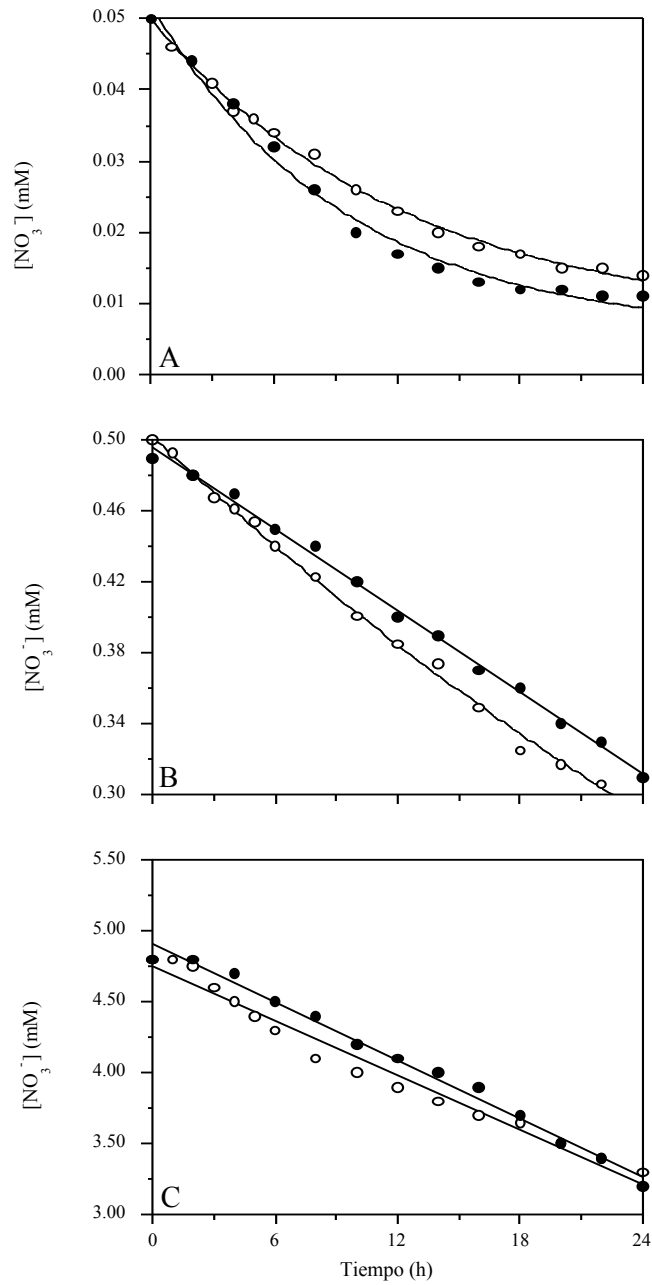


Figura 4. Disminución de la concentración de NO_3^- en función del tiempo, en soluciones de absorción con 0.05 (A), 0.5 (B) y 5 (C) mM NaNO_3 . \circ mandarino Cleopatra, \bullet citrange Troyer.

Capítulo IV

Los análisis cinéticos en ambos patrones, sugieren que la absorción de NO_3^- en cítricos sigue un modelo bifásico dependiendo de la concentración externa (fig 5 A y B). De este modo, la absorción de NO_3^- muestra una curva típica de Michaelis-Menten hasta la concentración de 1 mM de NO_3^- . Los valores de las K_m s aparentes del sistema de transporte saturable a bajas concentraciones en plántulas de citrange Troyer y mandarina Cleopatra son 282 y 281 μM respectivamente, y los correspondientes a las $V_{\text{máx}}$ s son 0.27 y 0.25 $\mu\text{mol de NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ PF de raíz h}^{-1}$ (tabla 4).

La absorción neta de NO_3^- aumentó linealmente a altas concentraciones (1-10 mM). Durante esta fase las pendientes fueron de 0.238 y 0.173 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ PF de raíz h}^{-1}$ para el citrange Troyer y el mandarina Cleopatra, respectivamente (fig. 5)

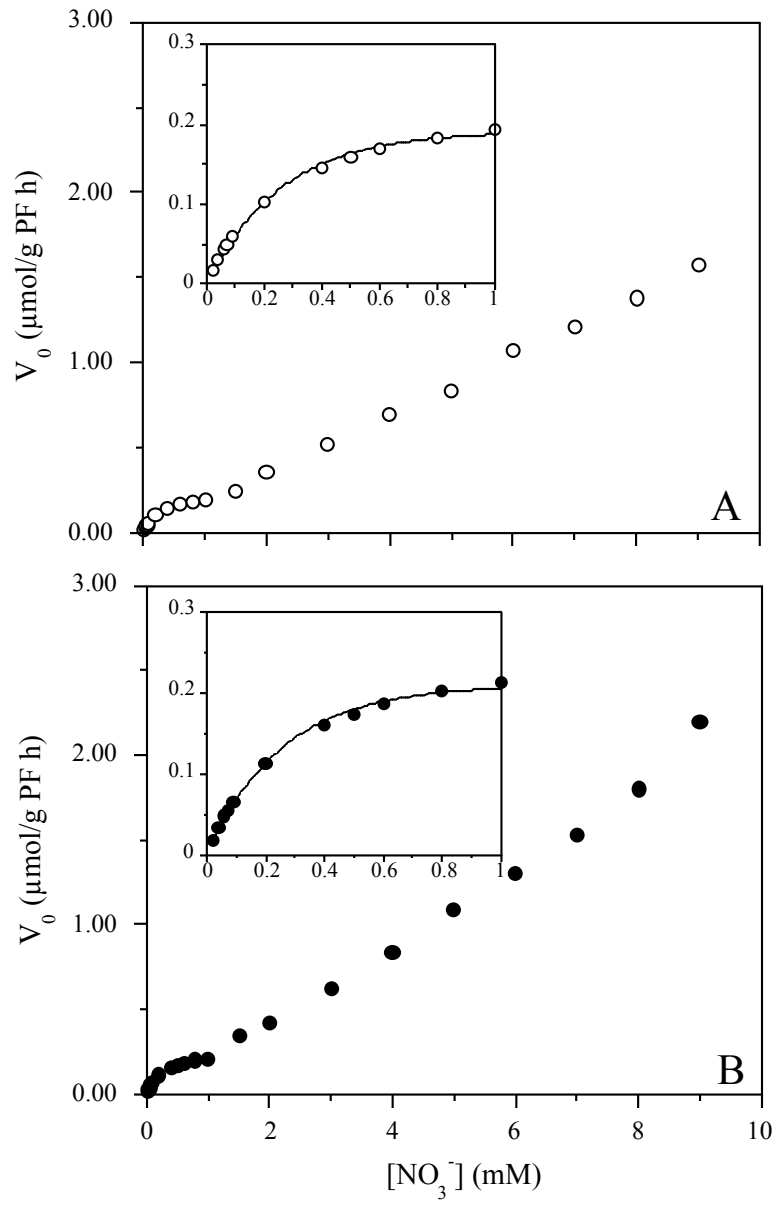


Figura 5. Absorción de NO_3^- en función de la concentración del sustrato (NO_3^-) por plántulas de mandarina Cleopatra (A) y citrange Troyer (B).

Tabla 4. ^aConstantes cinéticas de la absorción de NO₃⁻ por el sistema de transporte de alta afinidad e inhibición por NaCl y KCl.

mandarino Cleopatra				citrange Troyer			
(mM)	K_m	V_{máx}	Ki	(mM)	K_m	V_{máx}	Ki
Control	281±8	0.25±0.01		Control	282±6	0.27±0.02	
2.5 NaCl	259±15	0.23±0.03		0.25 NaCl	311±5	0.29±0.01	
5 NaCl	260±10	0.22±0.03		0.50 NaCl	325±8	0.24±0.01	
10 NaCl	562±5	0.27±0.01	10000±30	1 NaCl	437±6	0.21±0.01	1819±30
20 NaCl	653±5	0.26±0.01					
2.5 KCl	272±10	0.26±0.01		0.25 KCl	310±6	0.29±0.05	
5 KCl	300±12	0.26±0.01		0.50 KCl	324±4	0.24±0.04	
10 KCl	550±10	0.28±0.02	10676±100	1 KCl	436±10	0.21±0.01	1844±25
20 KCl	658±10	0.24±0.01					

^aK_m y Ki se expresan como μM; V_{máx} en μmol g⁻¹ peso fresco raíz h⁻¹

4.2. Inhibición de la absorción de nitrato por sales

La adición de NaCl a la solución nutritiva inhibió la absorción neta de NO_3^- a bajas concentraciones externas del mismo (< 1 mM). La representación gráfica de Lineweaver-Burk de los datos (fig.6 A y B) muestra que la inhibición es posiblemente competitiva, ya que las líneas de regresión se aproximan a un punto de intersección común. Las K'_m s aparentes en presencia de diferentes concentraciones de Cl^- en el medio de absorción se muestran en la tabla 4. Los valores de las K'_m s aumentan cuando la concentración externa de Cl^- asciende (tabla 4). La concentración de NaCl que dobla la pendiente $1/V$ versus $1/S$ es de 1 mM para citrange Troyer y 10 mM para mandarina Cleopatra y las K_i s son 1819 y 10000 mM respectivamente (tabla 4). El valor medio de la $V_{\text{máx}}$ es aproximadamente de $0.26 \mu\text{mol de NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ PF de raíz h}^{-1}$ para ambos patrones. Resultados similares se obtuvieron cuando NaCl se sustituyó por concentraciones iguales de KCl (tabla 4).

Sin embargo, a altas concentraciones externas de NO_3^- (3 y 6 mM), la absorción de NO_3^- no se inhibió cuando se adicionó NaCl o KCl a concentraciones finales de 30, 60 y 120 mM en la solución de absorción (tabla 5).

Tabla 5. Efecto del NaCl y KCl en la ^aabsorción de NO_3^- por el sistema de transporte de baja afinidad.

(mM)	mandarino Cleopatra		citrango Troyer	
	NaNO ₃ 3 mM	NaNO ₃ 6 mM	NaNO ₃ 3 mM	NaNO ₃ 6 mM
Control	0.52±0.02	1.07±0.05	0.62±0.07	1.30±0.12
30 NaCl	0.50±0.06	0.85±0.05	0.60±0.05	1.43±0.05
60 NaCl	0.54±0.08	1.23±0.01	0.58±0.08	1.30±0.10
120 NaCl	0.54±0.05	0.85±0.01	0.63±0.06	1.75±0.15
30 KCl	0.52±0.07	1.20±0.10	0.59±0.03	1.37±0.08
60 KCl	0.58±0.14	0.97±0.03	0.54±0.08	1.36±0.10
120 KCl	0.61±0.07	0.99±0.06	0.60±0.01	1.31±0.01

^aLa absorción de NO_3^- se expresa en $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco raíz h^{-1} .

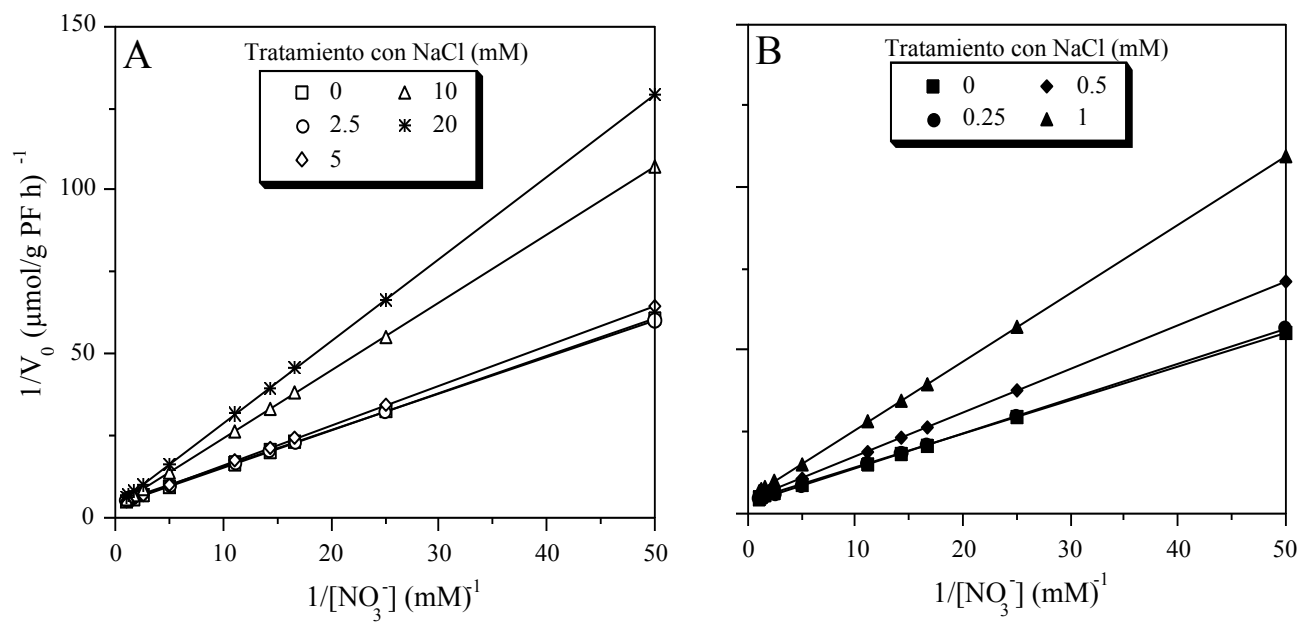


Figura 6. Efecto del NaCl en la cinética de absorción de NO_3^- por el sistema de transporte de alta afinidad en plántulas de mandarino Cleopatra (A) y citrango Troyer (B). Las ecuaciones correspondientes a mandarino Cleopatra son: $y = 1.136x + 4.037$ ($r^2 = 0.98$); $y = 1.118x + 4.300$ ($r^2 = 0.99$); $y = 1.206x + 4.160$ ($r^2 = 0.97$); $y = 2.064x + 3.700$ ($r^2 = 0.98$); $y = 2.507x + 3.843$ ($r^2 = 0.98$), para 0, 2.5, 5, 10 y 20 mM NaCl. En citrango Troyer: $y = 1.037x + 3.672$ ($r^2 = 0.97$); $y = 1.066x + 3.438$ ($r^2 = 0.98$); $y = 1.343x + 4.145$ ($r^2 = 0.99$); $y = 2.092x + 4.790$ ($r^2 = 0.97$), para concentraciones de NaCl de 0, 0.25, 0.5 y 1 mM.

4.3. Efecto del tiempo de pretratamiento y la concentración de cloruro sódico en la absorción de nitrato

La absorción neta de NO_3^- a altas concentraciones se redujo drásticamente, cuando las plántulas fueron pre-estresadas, con concentraciones finales de NaCl (30, 60 y 120 mM), previamente a las medidas de absorción de NO_3^- en una solución no salina. Las plántulas de citrange Troyer parecen estar más afectadas por los tratamientos con NaCl que las plántulas de mandarina Cleopatra (fig. 7 A, B). Después de 21 días de exposición a 120 mM NaCl, la tasa de absorción de NO_3^- en citrange Troyer se redujo aproximadamente un 74% respecto a los controles, sin embargo en mandarina Cleopatra se encontró una reducción próxima al 52% (fig. 7 A y B). El KCl disminuyó la absorción de NO_3^- de una manera similar (fig. 7 C y D).

Las concentraciones de Cl^- en las raíces alcanzaron valores más altos en citrange Troyer que en mandarina Cleopatra, cuando las plántulas se trataron con la misma solución salina (fig. 8). En ésta, se muestra que la absorción neta de NO_3^- se correlacionó negativamente con la concentración de Cl^- en las raíces ($r^2 = 0.95$ y $r^2 = 0.93$ a 3 y 6 mM de NO_3^- externo, respectivamente)

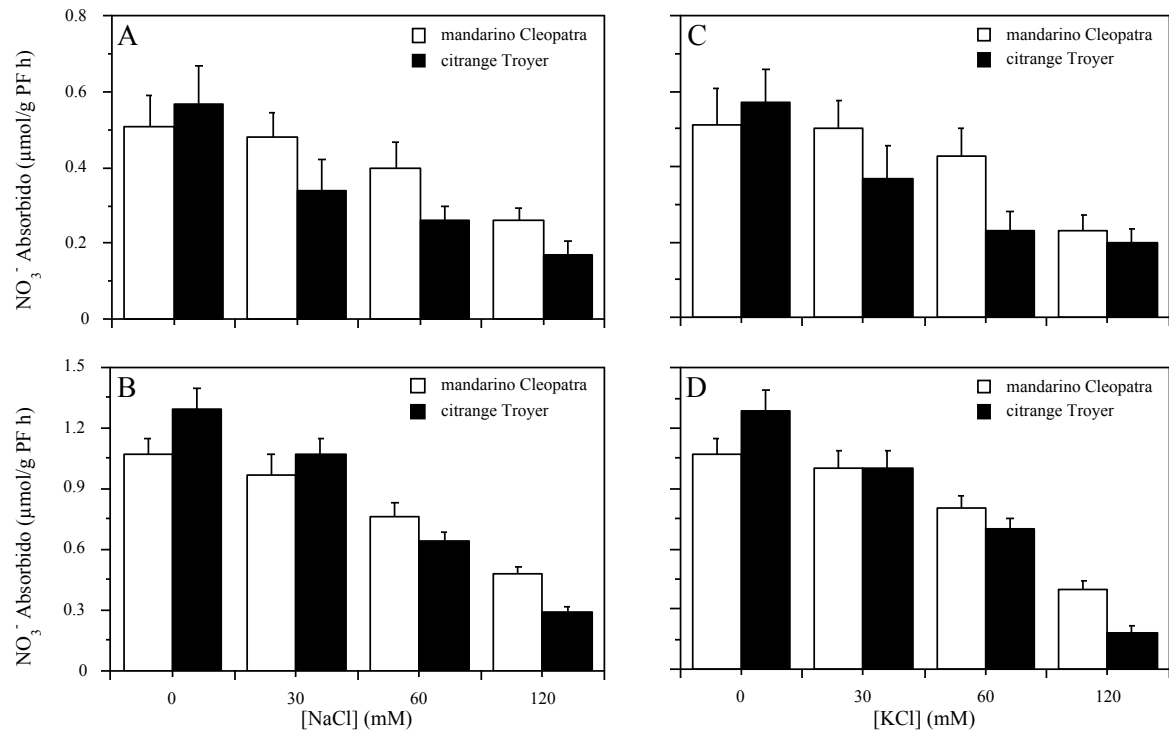


Figura 7. Efecto de los pretratamientos con NaCl (A y B) y KCl (C y D) a (0, 30, 60 y 120 mM) durante 21 días, en la absorción neta de NO_3^- por raíces de citrange Troyer y mandarino Cleopatra a 3 (A y C) y 6 (B y D) mM de NO_3^- externo.

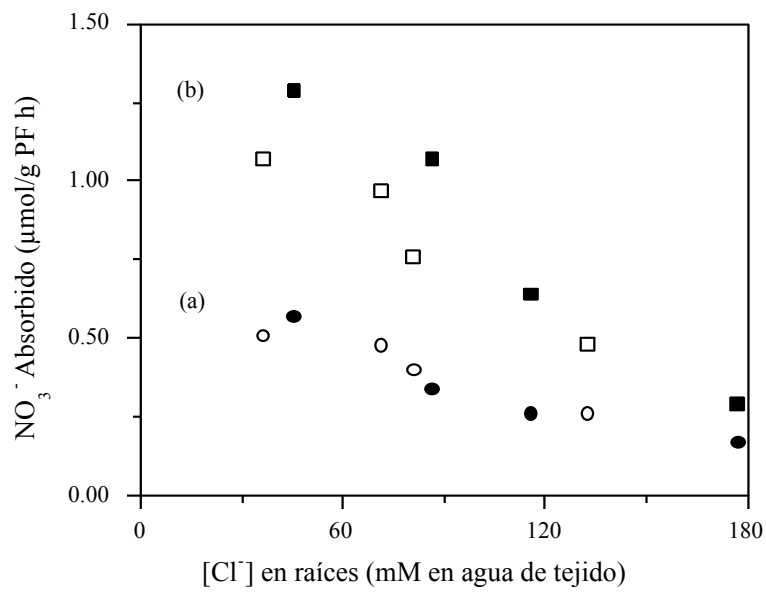


Figura 8. Relación entre las tasas de absorción de NO_3^- y la concentración de Cl^- en raíces de citrange Troyer y mandarina Cleopatra después de los pretratamientos con soluciones crecientes de NaCl (0, 30, 60 ó 120 mM) durante 21 días. (a) concentración externa de NaNO_3 3 mM; \circ valores para mandarina Cleopatra, \bullet valores para citrange Troyer; $y = -0.0029x + 0.6403$; $r^2 = 0.95$. (b) concentración externa de NaNO_3 6 mM; \square valores para mandarina Cleopatra, \blacksquare valores para citrange Troyer; $y = -0.0067x + 1.4482$; $r^2 = 0.93$.

4.4. Efecto de los pretratamientos salinos sobre las concentraciones endógenas de Cl^- y ^{15}N en distintos órganos, la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ y la transpiración

En este experimento, las plántulas de citrange Troyer fueron pre-estresadas con NaCl (0, 30, 60 y 120 mM) antes de realizar las medidas de absorción neta de $^{15}\text{NO}_3^-$ en una solución no salina. La absorción neta de $^{15}\text{NO}_3^-$ por las raíces, disminuyó según aumentaron los niveles de NaCl del pretratamiento salino (Tabla 6). En esta experiencia también se midió el incremento de las concentraciones de Cl^- en los diferentes órganos de las plántulas (raíces, tallos y hojas) así como el descenso de la tasa de transpiración en los diferentes tratamientos salinos (Tabla 6).

La acumulación de ^{15}N en los órganos se correlacionó negativamente con su concentración de Cl^- ($r^2 = 0.98$ para raíces, $r^2 = 0.92$ para tallos y $r^2 = 0.98$ para hojas; fig. 9 A, B y C respectivamente), mientras que la absorción neta de $^{15}\text{NO}_3^-$ se correlacionó positivamente con la tasa de transpiración ($r^2 = 0.989$; fig. 10).

Tabla 6. Efecto de los pretratamientos con NaCl (0, 30, 60 y 120 mM) durante 21 días sobre las concentraciones endógenas de Cl⁻ y ¹⁵N en los distintos órganos de las plántulas, la absorción neta de ¹⁵NO₃⁻ por las raíces y la transpiración. La concentración de ¹⁵NO₃⁻ en las soluciones de absorción fue de 5 mM.

[NaCl], mM	[Cl ⁻]			[¹⁵ N]			Absorción de ¹⁵ NO ₃ ⁻	Transpiración
	Raíces	Tallos	Hojas	Raíces	Tallos	Hojas		
0	200±18	58±3	76±5	22.77±1.10	2.98±0.05	9.50±0.09	1.90±0.09	0.39±0.04
30	259±20	225±24	169±10	13.58±0.33	1.57±0.08	2.71±0.07	0.99±0.05	0.32±0.01
60	299±15	309±22	507±22	7.88±0.09	1.77±0.07	2.27±0.04	0.65±0.03	0.27±0.02
120	338±31	338±28	873±13	5.58±0.08	0.94±0.02	0.83±0.03	0.39±0.02	0.24±0.01

[Cl⁻] = μmol/g PS órgano. [¹⁵N] = μmol/g PS órgano. ¹⁵NO₃⁻ absorbido = μmol/g PS raíz h. La transpiración se expresa en mol H₂O /m² s a 1100 μmol/mol CO₂

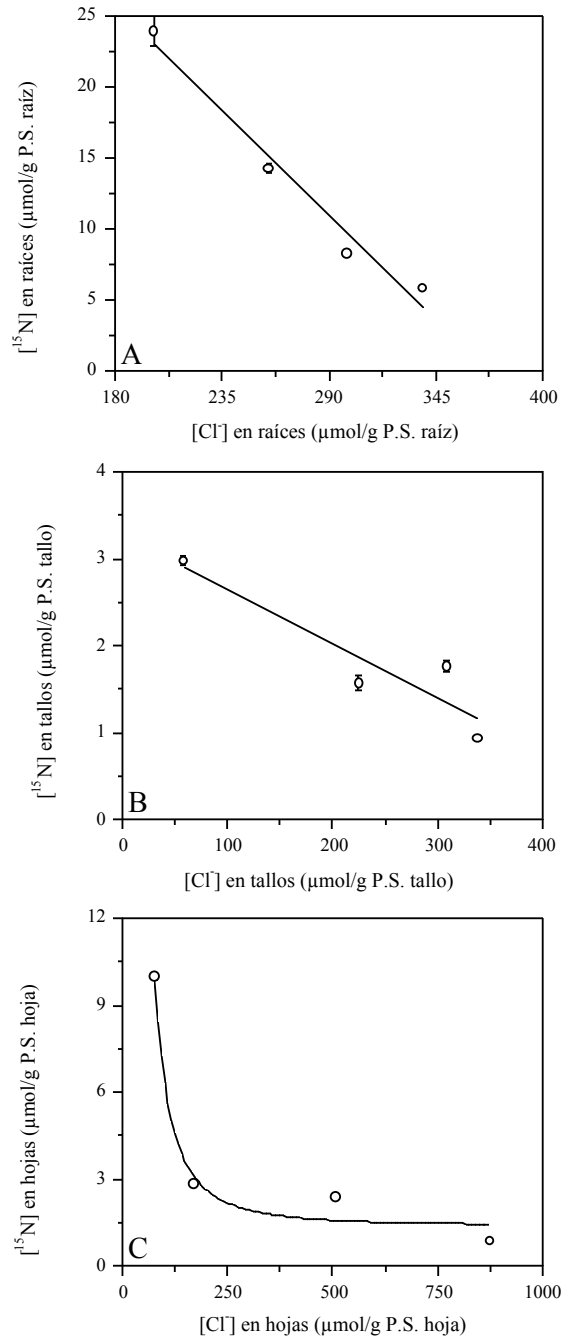


Figura 9. Relación entre las concentraciones de ^{15}N y Cl^- en raíces (A); tallos (B) y hojas (C) después de los pretratamientos con soluciones crecientes de NaCl (0, 30, 60 y 120 mM) durante 21 días.

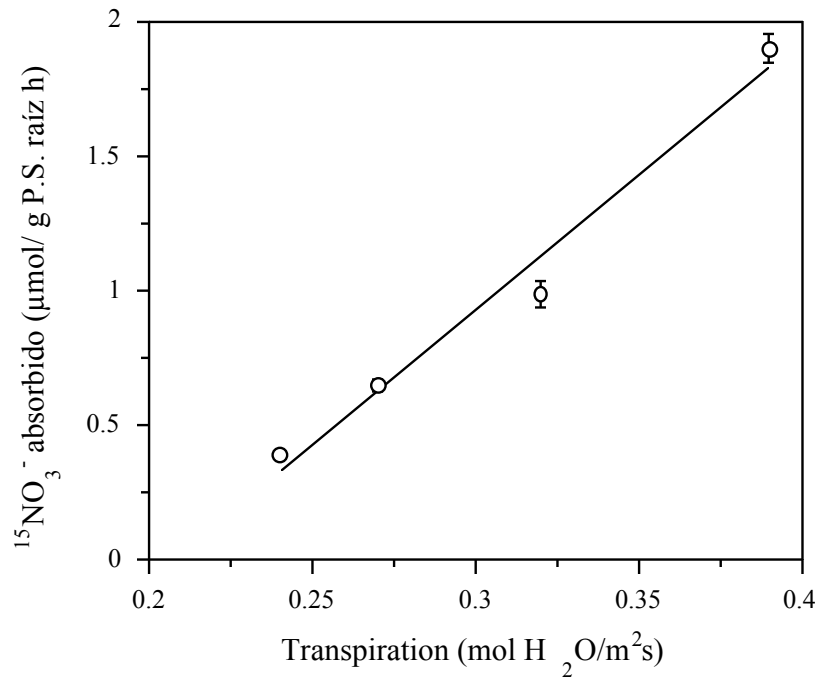


Figura 10. Relación entre la absorción neta de ¹⁵NO₃⁻ por las raíces y la transpiración en plántulas pretratadas con soluciones crecientes de NaCl (0, 30, 60 y 120 mM) durante 21 días.

4.5. Efecto de la luz y la humedad en la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ y en la transpiración

La reducción de la intensidad de la luz de 1200 a 400 PAR provocó una disminución del 18% en la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ mientras que la tasa de transpiración se redujo un 56.4%. A consecuencia de la exposición previa de las plántulas a 60 mM de NaCl durante 3 semanas, la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ se redujo cerca del 71%, cuando las medidas se realizaron a 1200 PAR. En estas mismas condiciones la tasa de transpiración sólo disminuyó un 30.7%. Cuando la intensidad de la luz se redujo a 400 PAR, la tasa de absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ en las plántulas de citrange Troyer salinizadas, permaneció prácticamente constante, si bien la tasa de transpiración disminuyó un 66.6% (fig. 11 A, B).

Por otra parte, la tasa de transpiración de las plántulas control fue 2.5 veces mayor, a baja humedad relativa (40%), que a alta humedad relativa (90%). En plántulas salinizadas este incremento fue 3 veces superior (fig. 11 B). En contraste, la humedad tuvo un pequeño efecto en la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$, tanto en plántulas estresadas como en plántulas no estresadas con sal, considerando cada grupo separadamente. No obstante, tal como se ha observado en experimentos previos, la salinización redujo drásticamente la absorción neta de $^{15}\text{NO}_3^-$ (fig. 11 A).

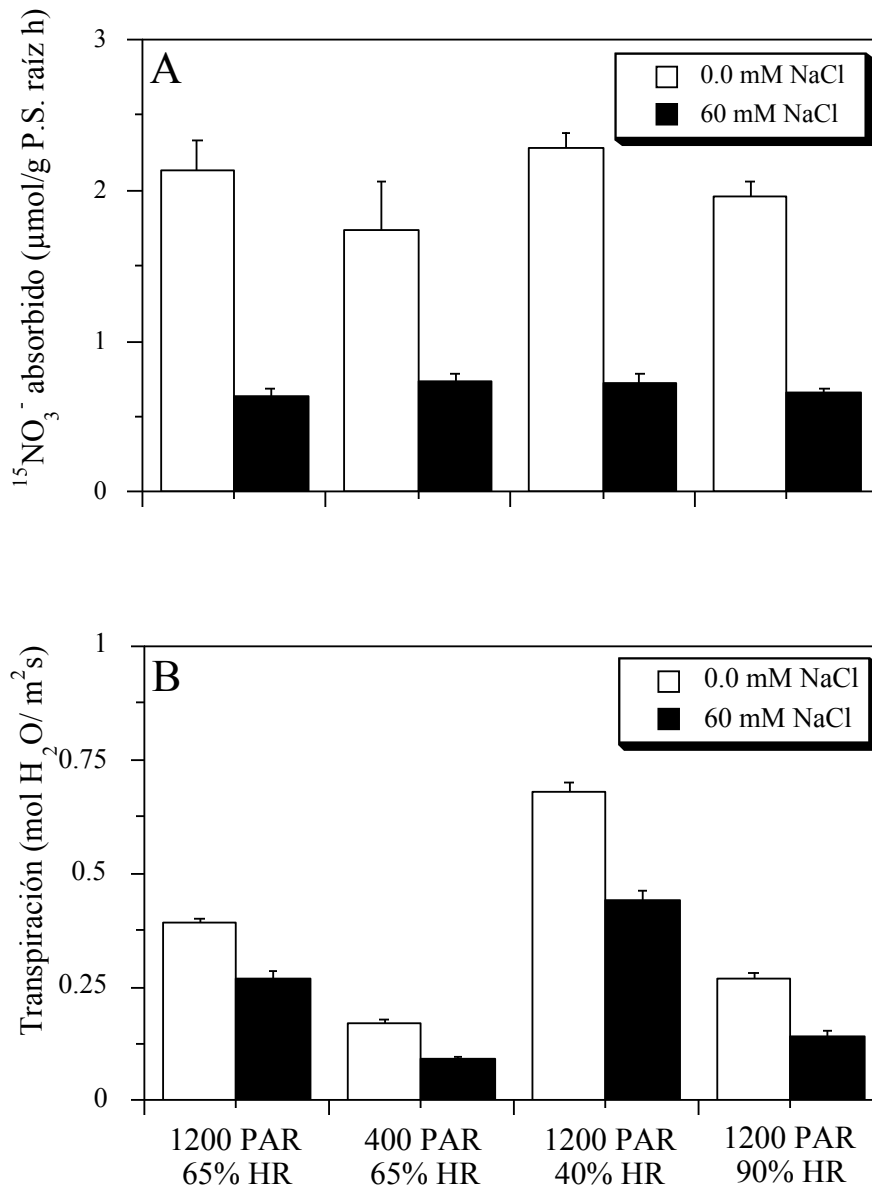


Figura 11. Efecto de las diferentes intensidades luminosas y humedades relativas en la tasa de absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ por las raíces (A) y en la transpiración (B) de plántulas de citrange Troyer, tratadas y no tratadas con sal. La concentración de $^{15}\text{NO}_3^-$ en la solución de absorción fue de 5 mM.

4.6. Efecto del cloruro sódico en la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ en raíces aisladas

Adicionalmente un posterior experimento utilizando raíces aisladas, mostró que los pretratamientos con 60 y 120 mM de NaCl, además de incrementar la concentración de Cl^- en los tejidos radiculares, produjeron unas inhibiciones de las tasas de absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ próximas al 79% y el 87% respectivamente con respecto a las raíces aisladas no tratadas (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de los pretratamientos con NaCl (60 y 120 mM) durante 21 días en la concentración de Cl^- y la absorción neta de $^{15}\text{NO}_3^-$ por raíces aisladas.

	[Cl ⁻]	[¹⁵ NO ₃ ⁻]
Control	179±11	1.03±0.12
60 mM NaCl	244±22	0.22±0.01
120 mM NaCl	266±15	0.14±0.02

[Cl⁻] = μmol/g P.S. raíz; [¹⁵NO₃⁻] = μmol/g P.S. raíz h.

4.7. Efecto del tiempo de pretratamiento y la concentración de nitrato en la absorción de nitrato

A concentraciones externas de NO_3^- por debajo de 1 mM, las plántulas de mandarina Cleopatra sometidas a un periodo de privación de NO_3^- , mostraron tasas de absorción de NO_3^- más bajas que las plántulas inducidas por exposición al mismo, después del periodo de privación (fig. 13 A)

La máxima absorción de NO_3^- se alcanzó después de tratar las raíces con 0.2 mM de NO_3^- durante 3 días. (fig. 12 A).

Los valores de las K_m s aparentes, obtenidos de la representación de Lineweaver-Burk, en el sistema de transporte saturable a bajas concentraciones de NO_3^- en plántulas inducidas y no inducidas son de 324 y 281 μM y los de las $V_{\text{máx}}\text{s}$ son de 0.57 y 0.25 $\mu\text{moles g}^{-1}$ PF raíz h^{-1} respectivamente (fig. 13 A).

Como se ha mostrado anteriormente, en plántulas no inducidas e inducidas, también opera un sistema de absorción adicional a altas concentraciones de NO_3^- externo (>1 mM NO_3^-). La respuesta de este sistema a la concentración mostró linealidad en el intervalo entre 1 a 10 mM NO_3^- ($r^2 = 0.99$) (fig. 13 B). La figura 12 B muestra el efecto de los pretratamientos con soluciones de NO_3^- (3 y 10 mM) sobre la absorción de NO_3^- a altas concentraciones externas del mismo. La inhibición de la tasa de absorción de NO_3^- parece ser dependiente de la concentración y el periodo de exposición a la solución de NO_3^- hasta que se alcanza una meseta.

La pendiente de la absorción en plántulas privadas de NO_3^- era de 0.173 $\mu\text{moles/g P.F. h}$ en el intervalo de 1 a 10 mM (fig. 13 B). Después de 24 horas en contacto con una solución 10 mM NO_3^- , la pendiente de la absorción fue de 0.038

Capítulo IV

$\mu\text{moles/g P.F. h}$ en el mismo intervalo de concentraciones, lo que representa una reducción del 78% respecto a las plántulas privadas de NO_3^- (fig. 13 B).

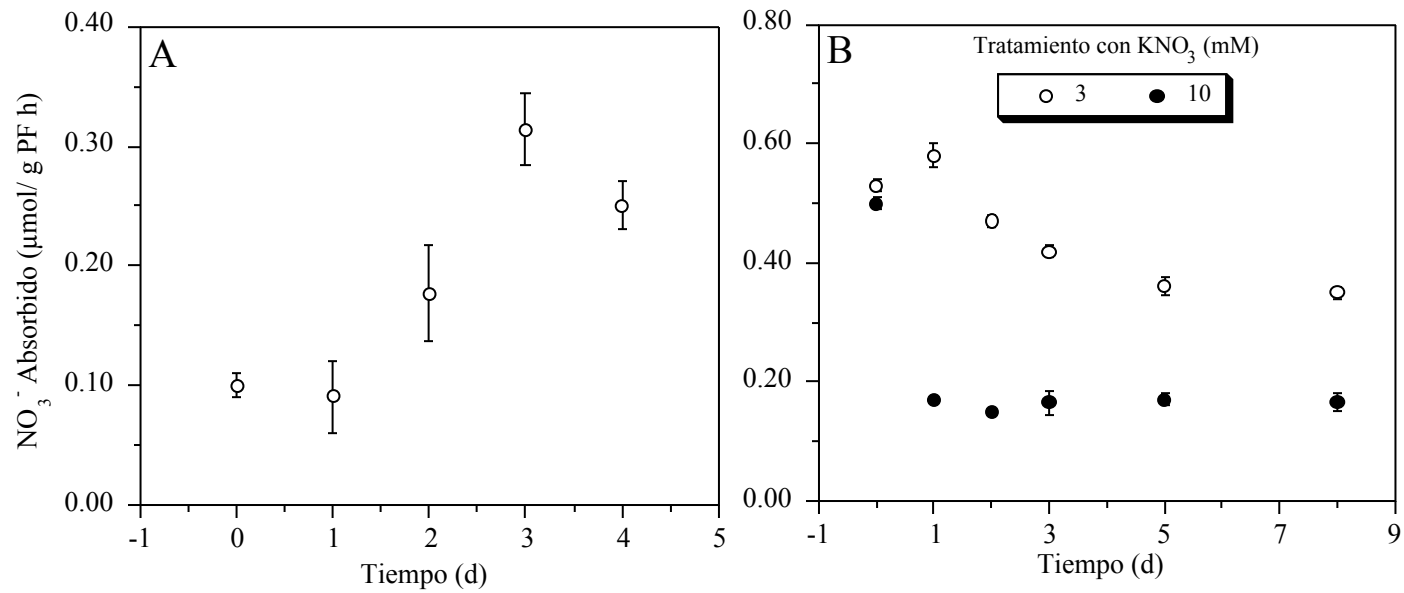


Figura 12. Efecto del tiempo y la concentración de los pretratamientos con NO_3^- , sobre la absorción neta de NO_3^- por las raíces. A: Efecto de los pretratamientos con 0.2 mM de NO_3^- (1-4 días) en el sistema de transporte de alta afinidad ($[\text{NO}_3^-]$ de la solución de absorción = 0.2 mM); B: Efecto de los pretratamientos con 3 ó 10 mM de NO_3^- (1-8 días) en el sistema de transporte de baja afinidad ($[\text{NO}_3^-]$ de la solución de absorción = 3 mM).

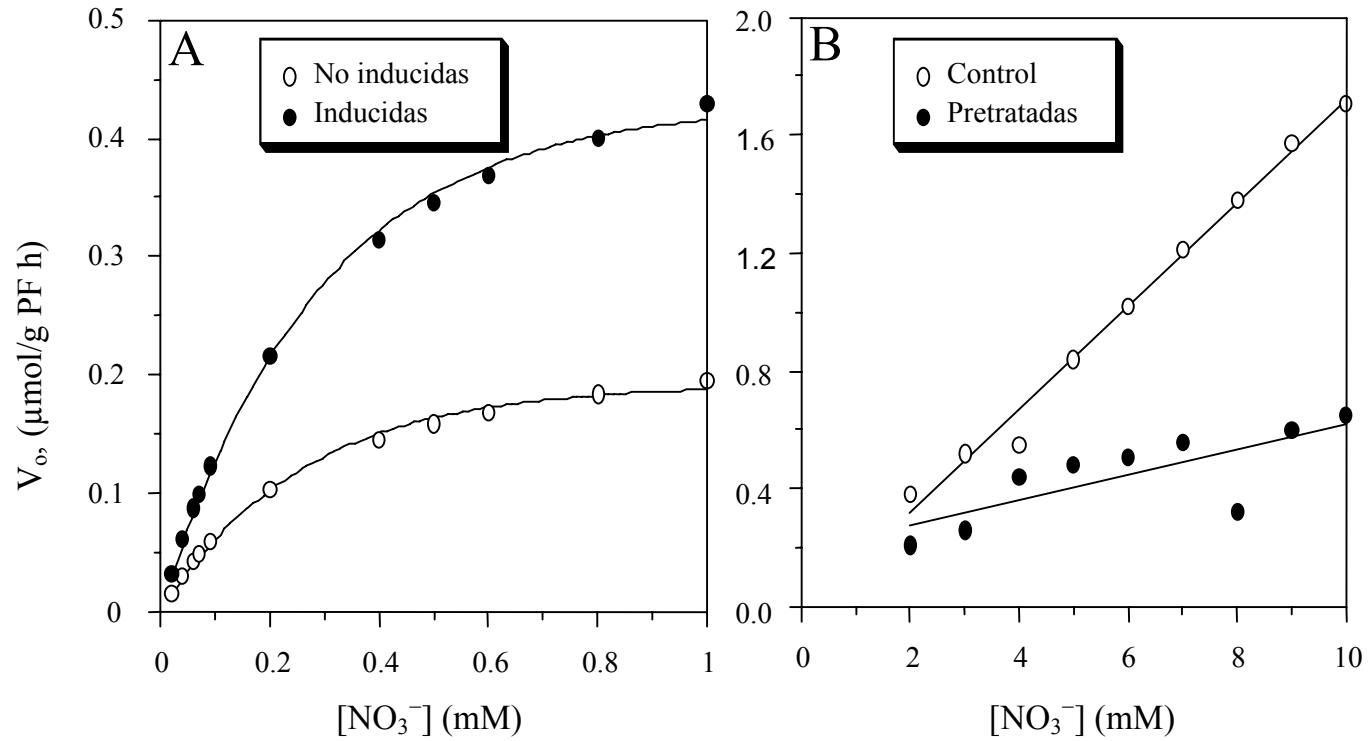


Figura 13. Absorción neta de NO_3^- en función de la concentración externa de NO_3^- por plántulas de mandarina Cleopatra. A: Cinéticas de la absorción de NO_3^- a bajas concentraciones externas de NO_3^- por raíces inducidas con 0.2 mM KNO_3 durante 3 días y no inducidas; B: Cinéticas de absorción de NO_3^- a altas concentraciones externas de NO_3^- por raíces que han sido privadas o pretratadas con 10 mM NO_3^- durante 1 día.

4.8. Efecto del pH externo en la absorción de nitrato

La absorción neta de NO_3^- por las raíces exhibe una marcada dependencia del pH de la solución externa en plántulas de mandarina Cleopatra. La absorción de nitrato era inhibida drásticamente cuando el pH de la solución se incrementaba por encima de 5, a 0.2 mM y 3 mM de NO_3^- externo (fig. 14 A, B).

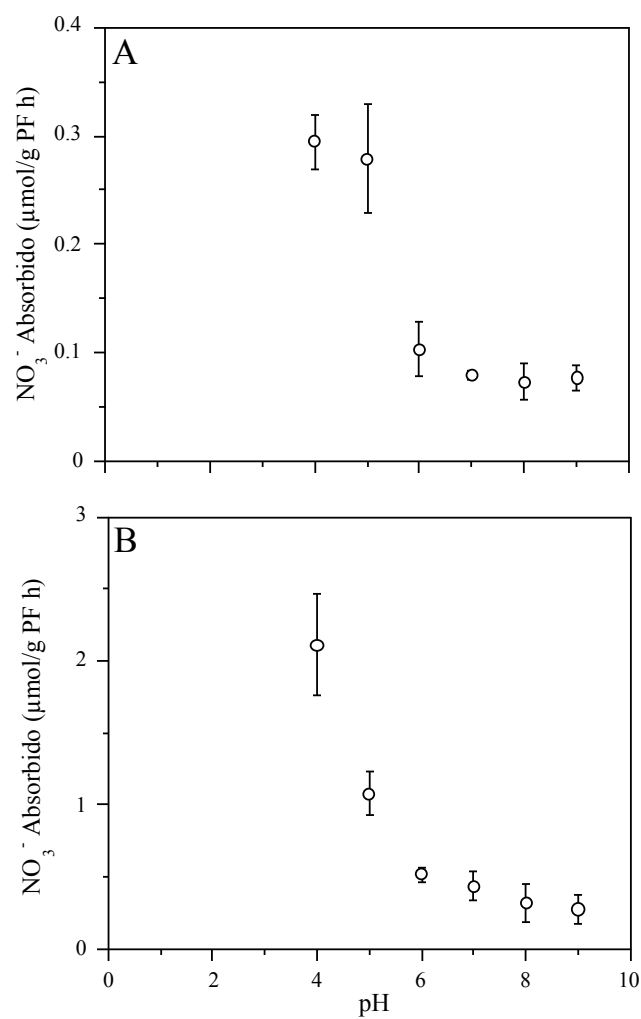


Figura 14. Efecto de los pHs exógenos en la absorción neta de NO_3^- por las raíces de mandarina Cleopatra a 0.2 mM (A) y 3 mM (B) de NO_3^- externo.

4.9. Caracterización de los sistemas de transporte de alta afinidad: Efecto de algunos inhibidores sobre la absorción de nitrato

Los resultados muestran que la presencia de inhibidores de la síntesis de ATP en la solución, tales como 2,4-DNP y KCN, disminuyen fuertemente la absorción de NO_3^- por los sistemas de transporte de alta afinidad de las raíces de mandarina Cleopatra. El 2,4-DNP inhibió la absorción de NO_3^- por los sistemas constitutivo (CHATS) e inducible (IHATS) en un 50% y un 82% respectivamente. Con el KCN, la absorción de NO_3^- por los sistemas CHATS y IHATS se redujo, en un 58% y 48% respectivamente (Tabla 8).

Asímismo, se comprobó que la adición de ácido p-hidroximercuribenzoato (p-HMB: inhibidor de los centros activos con restos de cisteína, por reacción con los grupos sulfhidrilos de éstos), redujo la tasa de absorción de NO_3^- por los dos sistemas de transporte en más del 75% (Tabla 8).

Los tratamientos de las raíces con DCCD, DES u ortovanadato sódico, inhibidores de la H^+ -ATPasa de plasmalema, disminuyeron también la absorción de NO_3^- por ambos sistemas, en más del 59% en todos los casos (Tabla 9).

Tabla 8. Efecto de los inhibidores metabólicos y el p-HMB, en la ^aabsorción de NO_3^- , por los diferentes sistemas de transporte. ^a La absorción de NO_3^- se expresa como $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco raíz h^{-1} . La concentración de NO_3^- de las soluciones de absorción fue 0.2 mM en todos los casos.

Tratamiento	NO_3^- absorbido			
	(no inducidas)	% de inhibición	(inducidas)	% de inhibición
Control	0.1030		0.300	
2,4-DNP	0.0510*	50	0.054*	82
KCN	0.0430*	58	0.157*	48
p-HMB	0.0213*	79	0.076*	75

*Significativo a $p \leq 0.05$ para el test de student.

Tabla 9. Efecto de los inhibidores de la H^+ -ATPasa en la ^aabsorción de NO_3^- por los diferentes sistemas de transporte. ^a La absorción de NO_3^- se expresa como $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco raíz h^{-1} .

La concentración de NO_3^- de las soluciones de absorción fue 0.2 mM en todos los casos.

Tratamiento	NO_3^- absorbido			
	(no inducidas)	% de inhibición	(inducidas)	% de inhibición
Control	0.1030		0.300	
DCC	0.0359*	65	0.092*	69
DES	0.0309*	70	0.073*	75
Vanadato	0.0422*	59	0.080*	73

*Significativo a $p \leq 0.05$ para el test de Student.

4.10 Caracterización del sistema de transporte de baja afinidad: Efecto de algunos inhibidores sobre la absorción de nitrato

En experimentos de absorción efectuados con soluciones que contenían $^{15}\text{NO}_3\text{K}$, se comprobó que, tanto en plántulas inducidas como no inducidas, operaba el sistema de transporte de baja afinidad, (LATS) a concentraciones superiores a 1 mM de $^{15}\text{NO}_3^-$. Este sistema mostró una respuesta lineal ($r^2 \geq 0.973$) a la concentración externa de $^{15}\text{NO}_3^-$, en el intervalo comprendido entre 1 y 50 mM (fig. 15 A).

La representación de la absorción total por unidad de peso seco de raíz y por hora, en función de la concentración externa de $^{15}\text{NO}_3^-$, mostró una pendiente ligeramente superior en plántulas completas que en raíces aisladas, dando valores de 0.14 y 0.078 $\mu\text{mol/g P.S.}^{-1}$ raíz h, respectivamente (fig. 15 A). Sin embargo, los valores de la concentración de ^{15}N en las raíces fueron similares en ambos casos (raíces aisladas y raíces de plántulas completas), lo que indica que la diferencia se debe a la fracción de nitrógeno transportada a la parte aérea (fig. 15 B).

¹ Peso seco

Capítulo IV

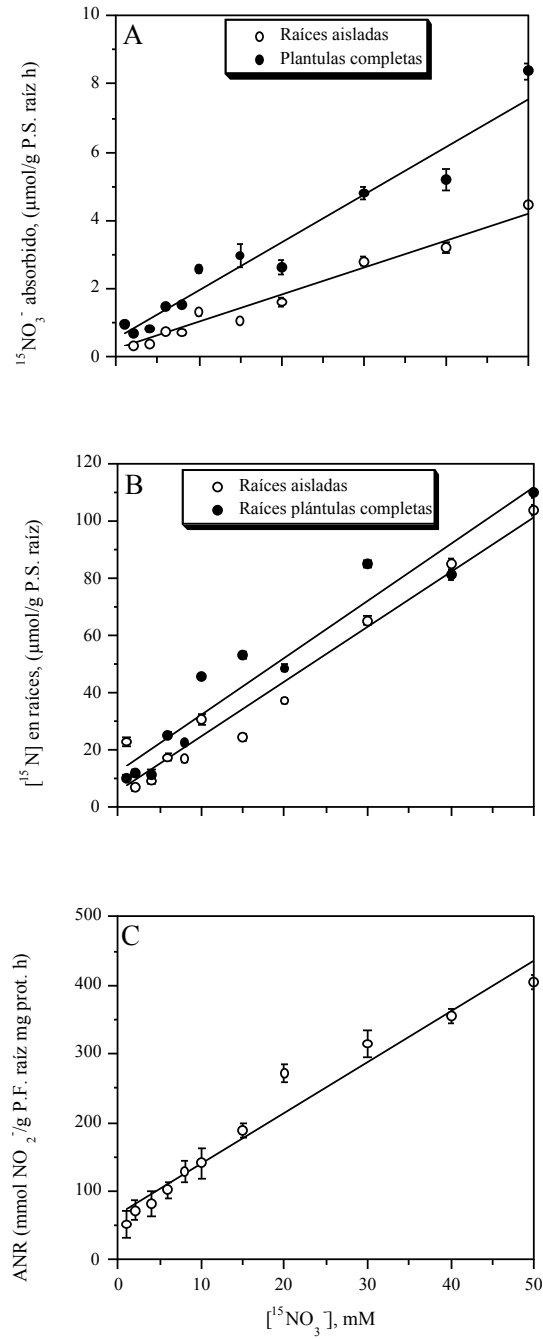


Figura 15. Absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ (A), concentración de ^{15}N (B) y actividad de nitrato reductasa (C) en función de la concentración de sustrato ($^{15}\text{NO}_3^-$) en plántulas de citrange Troyer.

También se comprobó que la actividad nitrato reductasa en raíces presentaba un incremento lineal en función de la concentración externa de NO_3^- (fig. 15 C).

Los efectos de los inhibidores sobre el LATS se determinaron, dentro del intervalo de respuesta lineal, a baja (5 mM) y a alta (30 mM) concentración externa de $^{15}\text{NO}_3^-$.

Los inhibidores de la síntesis de ATP, 2,4-DNP y KCN, redujeron fuertemente la absorción de NO_3^- (en más del 24.5 %, en ambos casos) con la concentración de $^{15}\text{NO}_3^-$ más baja (5 mM). Sin embargo, ninguno de los dos afectó desfavorablemente la absorción con la concentración de $^{15}\text{NO}_3^-$ más elevada (30 mM) (Tabla 10).

El tratamiento de las raíces con los inhibidores de la H^+ -ATPasa, DCCD y DES, provocó, en todos los casos, una reducción significativa de la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ en las dos concentraciones externas de este ion testadas (Tabla 10). El ortovanadato sódico, sin embargo, sólo mostró eficacia a la concentración de $^{15}\text{NO}_3^-$ externo más baja.

Por el contrario, no se observaron efectos del p-HMB sobre la absorción de NO_3^- a ambas concentraciones.

Tabla 10. Efecto de los inhibidores de la síntesis de ATP (2,4-DNP y KCN), de grupos SH (p-HMB) y de la H⁺-ATPasa de plasmalema, sobre la ^aabsorción de ¹⁵NO₃⁻ en el LATS por plántulas de citrange Troyer. ^aLa absorción de ¹⁵NO₃⁻ se expresa como μmol/g P.S. raíz h.

Tratamiento	¹⁵ NO ₃ ⁻ absorbido			
	5 mM ¹⁵ NO ₃ ⁻	% Inhibición	30 mM ¹⁵ NO ₃ ⁻	% Inhibición
Control	1.69±0.11		5.30±0.32	
p-HMB	1.86±0.13 NS	0	5.58±0.13 NS	0
2,4,-DNP	0.88±0.09 *	47.9	5.86±0.11 NS	0
KCN	1.27±0.15 *	24.8	5.30±0.10 NS	0
Vanadato	1.19±0.20 *	29.5	4.80±0.09 NS	9
Control EtOH	3.00±0.15		10.60±0.22	
DCCD	1.24±0.16 *	58.7	3.80±0.14 *	64.1
DES	1.52±0.12 *	49.3	7.36±0.12 *	30.5

* Significativo a p≤0.05 para el test de Student. NS No significativo a p≤0.05 para el test de Student

DISCUSIÓN

5. Discusión

Los resultados presentados sugieren que las especies de *Citrus* estudiadas, tienen, en común con otras muchas especies vegetales, sistemas diferentes para la absorción de NO_3^- (Doddema y Telkamp, 1979; Pace y McClure, 1986; Siddiqi y col., 1990; Aslam y col., 1992; Kronzucker y col., 1995a).

El sistema de transporte de alta afinidad sigue una cinética de Michaelis-Menten y muestra un nivel umbral de saturación a 0.5-0.8 mM de NO_3^- . Previamente, se ha descrito para diferentes especies vegetales un sistema de transporte de alta afinidad constitutivo (HATS) (Goyal y Huffaker, 1986; Hole y col., 1990; Aslam y col., 1992; Kronzucker y col., 1995a). La similitud entre las K_m s aparentes estimadas, en citrange Troyer y mandarina Cleopatra, indican que ambos patrones tienen una afinidad similar por el ion NO_3^- . Estos valores (cerca de 280 μM) son más elevados que los encontrados en otras especies vegetales, que se encuentran normalmente en un intervalo de 5 a 200 μM (Bloom, 1985; Goyal y Huffaker, 1986; Lee y Drew, 1986; Siddiqi y col., 1990; Lainé y col., 1993; Hasegawa y Ichii, 1994; Helal y col., 1995). La $V_{\text{máx}}$, obtenida en cítricos es más baja que aquellas obtenidas en la mayoría de las especies herbáceas, aunque es similar a las obtenidas en otras especies leñosas como las coníferas (Kronzucker y col., 1995a). Los valores similares de las K_m s obtenidas

en ambos patrones de cítricos, contrastan con otros estudios en los que las K_m s varían generalmente entre especies aún dentro de la misma familia botánica. Además, se han presentado evidencias que indican que este sistema de transporte de alta afinidad es un sistema de transporte activo, sensible a inhibidores metabólicos y regulado por el nivel de nitrógeno (Rao y Rains, 1976; Lee y Drew, 1986; Glass y col., 1990; Siddiqi y col., 1990; Aslam y col., 1992).

El sistema de transporte de baja afinidad (LATS) en patrones de cítricos parece operar a concentraciones externas de NO_3^- por encima de 1 mM. Entre 1 y 10 mM de nitrato las tasas de absorción de NO_3^- aumentaron linealmente con la concentración, aunque la pendiente en el citrange Troyer fue mayor que en el mandarino Cleopatra. Siddiqi y col., (1990) mostraron que en la cebada existía un sistema lineal para la absorción de NO_3^- por las raíces, que no se saturaba hasta concentraciones de 50 mM de NO_3^- en el medio externo.

Los resultados, también muestran, que los dos sistemas de absorción de NO_3^- , en células radiculares de *Citrus*, son afectados de modo distinto por la salinidad. Los análisis cinéticos de los datos, indican que las sales de Cl^- (NaCl y KCl) inhiben competitivamente la actividad del sistema que opera a baja concentración (HATS). Debido a que las sales Na^+ y K^+ producen una inhibición similar de la absorción de NO_3^- , es muy probable que los iones Cl^- y NO_3^- compitan por los lugares de unión con el transportador. Sin embargo, la afinidad del sistema de transporte de alta afinidad de NO_3^- por el Cl^- es bastante baja, ya que se necesitan altas concentraciones de Cl^- para que se produzcan los efectos de inhibición en la absorción de NO_3^- . El HATS en mandarino Cleopatra es menos sensible a la inhibición por sales. Probablemente la inhibición de la absorción de NO_3^- por Cl^- depende de las especies vegetales y la concentración de Cl^- en la solución nutritiva. Del mismo modo, Glass y col., (1985) observaron que el influjo de $^{13}\text{NO}_3^-$ por el HATS por raíces de cebada era insensible a la concentración externa de 0.5 mM de Cl^- y sin embargo Aslam y col., (1984) trabajando también en plántulas de cebada, mostraron, que la absorción de NO_3^- se

inhibía drásticamente cuando la concentración de Cl^- era superior a 100 mM.

En contraste, elevadas concentraciones de NaCl en el medio de absorción no inhiben la absorción neta de NO_3^- en el sistema de baja afinidad (LATS) de ambos patrones.

No obstante, los pretratamientos con niveles crecientes de NaCl reducen drásticamente la absorción de NO_3^- por el sistema de transporte de alta concentración. Ambos pretratamientos, NaCl y KCl, inhiben de forma similar la absorción de NO_3^- , lo que sugiere que el proceso sea más sensible a los efectos aniónicos que a los catiónicos. Se han encontrado evidencias, que están de acuerdo con estos resultados, y que mostraron que la absorción de NO_3^- en raíces de cebada es dependiente de la concentración interna más que de la concentración externa de Cl^- (Cram, 1973; Smith, 1973). Por tanto, una posible explicación para el efecto inhibitor del pretratamiento salino podría ser el aumento de la acumulación de Cl^- en las células de la raíz, lo cual está de acuerdo con nuestros resultados, donde se ha obtenido una relación inversa entre la concentración de Cl^- en las raíces y la tasa de absorción neta de NO_3^- por el LATS. Además, el mandarino Cleopatra, que se comporta como un patrón tolerante a la sal en comparación con citrange Troyer, muestra una moderada capacidad para excluir los iones Cl^- , reduciendo su acumulación en los tejidos de la planta (Ream y Furr, 1976, Walker y col., 1983 y Bañuls y col., 1990). Consecuentemente, la absorción neta de NO_3^- a altas concentraciones se inhibe menos con los pretratamientos de NaCl en plántulas de mandarino Cleopatra que en plántulas de citrange Troyer, y este efecto está probablemente relacionado con la concentración de Cl^- alcanzada en las raíces por ambos patrones.

Los resultados obtenidos en lo que se refiere a la acumulación de ^{15}N en órganos de plántulas pretratadas con sal, parecen confirmar, por un lado, trabajos previos que indican que la absorción neta de NO_3^- es sensible al nivel de Cl^- de los tejidos (Cram, 1973; Smith, 1973). Estos autores proponen un feed-back negativo

común de NO_3^- y Cl^- sobre la absorción neta de NO_3^- . Por otro lado, Lea-Cox y Syversten, (1993), encontraron que la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ por la planta bajo condiciones salinas se correlacionaba positivamente con la transpiración. Estos autores sugieren que las reducciones en la absorción de NO_3^- están más estrechamente relacionadas con la reducción de la eficiencia del uso del agua que con el antagonismo por el Cl^- . Debido a estas discrepancias hemos realizado experimentos para evaluar la influencia sobre la absorción neta de NO_3^- , que tiene la acumulación de Cl^- en los tejidos de las plántulas o la reducción de la transpiración.

Para ello, se han estudiado los efectos de diferentes intensidades luminosas y humedades relativas en la absorción neta de $^{15}\text{NO}_3^-$ y en la transpiración en plántulas de cítricos sometidas o no a salinización. El objetivo de este experimento es reducir la transpiración de las plántulas. Los efectos producidos por la baja intensidad luminosa y la alta humedad relativa, muestran que la reducción en la absorción neta de $^{15}\text{NO}_3^-$, causados por la salinización, no pueden ser explicados por la disminución de la transpiración.

De acuerdo con estos resultados, Aslam y col., (1979) han encontrado previamente, que la reducción de la transpiración en cebada tiene una escasa influencia en la absorción de NO_3^- . Es probable, por tanto, que en plántulas tratadas con sal el descenso en la tasa de transpiración sea menos responsable de la inhibición de la absorción de NO_3^- que los efectos iónicos específicos.

Adicionalmente, los experimentos efectuados con raíces aisladas mostraron que los pre-tratamientos salinos producen una inhibición de la absorción neta de $^{15}\text{NO}_3^-$ con respecto a las raíces aisladas no tratadas. Esto indica que el Cl^- endógeno podría reducir la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$, incluso cuando el flujo de la transpiración es suprimido.

En lo que se refiere al efecto de los pretratamientos con NO_3^- , las plántulas que no habían sido expuestas a NO_3^- , anteriormente a las medidas de absorción, mostraron

reducidas tasas de absorción de NO_3^- , dentro del intervalo de bajas concentraciones externas de NO_3^- . Sin embargo, la absorción neta de NO_3^- aumento considerablemente después de la exposición a NO_3^- en la solución. El estudio cinético que se muestra en la figura 13 A, indica que las raíces de plántulas de cítricos poseen dos sistemas de transporte saturables para el NO_3^- (CHATS e IHATS) que operan a bajas concentraciones externas del mismo. En ambos, la relación entre las tasas de absorción y la concentración externa de NO_3^- siguen una cinética de Michaelis-Menten hasta concentraciones de sustrato de 1 mM. Por tanto, se obtienen valores diferentes de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para cada uno de ellos. El sistema de transporte constitutivo en estado no inducido, ha sido encontrado previamente en algunas plantas superiores (Breteler y Nissen, 1982; Behl y col., 1988; Hole y col., 1990; Siddiqi y col., 1990; Aslam y col., 1992; Kronzucker y col., 1995b). En estas investigaciones, el sistema de transporte constitutivo de alta afinidad (CHATS) muestra cinéticas saturables con valores de K_m s normalmente en un intervalo entre 6 y 20 μM . Estos valores son mucho más bajos que la K_m estimada para este sistema en raíces de mandarina Cleopatra. A pesar de la baja capacidad del CHATS, este es claramente esencial para absorber el NO_3^- requerido para inducir el sistema de baja concentración. También se ha encontrado, un sistema de transporte inducible (IHATS) en varias plantas (Rao y Rains, 1976; Doddema y Telkamp, 1979; Breteler y Nissen, 1982; Youngdahl y col., 1982; Lee y Drew, 1986; Pace y Mc Clure, 1986; Goyal y Huffaker, 1989; Warner y Huffaker, 1989; Agüera y col., 1990; Hole y col., 1990; Siddiqi y col., 1990; Botella y col., 1994). En éstas, se necesita normalmente un periodo de tiempo de varias horas de exposición al NO_3^- antes de que el efecto sea aparente. Sin embargo, en *Citrus*, el tiempo de exposición al NO_3^- requerido para la inducción, es inusualmente más largo, ya que son necesarios tres días para una respuesta máxima. Esto coincide con la lenta inducción observada en coníferas por Kronzucker y col., (1995b).

Los valores de K_m s encontrados para el IHATS son mayores que en otras especies de plantas cuyo intervalo está entre 5 y 200 μM (Bloom, 1985; Laine y col., 1993; Hasegawa e Ichii, 1994), los cuales son generalmente más bajos que los

calculados para *Citrus* (324 μM). Por tanto las afinidades aparentes de ambos componentes del NO_3^- en cítricos son menores que en otras plantas. También, la $V_{\text{máx}}$ medida en cítricos es lenta respecto a otras especies vegetales, con la excepción de coníferas, las cuales muestran un valor de $V_{\text{máx}}$ bastante similar a los encontrados para cítricos (Kronzucker y col., 1995b). Además, el factor de aumento de la inducción para la $V_{\text{máx}}$, (sólo 2 veces superior) es inferior al observado en otras plantas en las cuales el flujo incrementa al menos de 5 a 30 veces, como ha sido mostrado por Siddiqi y col., (1990), Aslam y col., (1992) y Kronzucker y col., (1995b).

En algunas plantas, se han encontrado después de la inducción, dos componentes saturables distintos en el intervalo de bajas concentraciones (Breteler y Nissen, 1982; Warner y Huffaker, 1989; Aslam y col., 1992; Kronzucker y col., 1995). Las plántulas inducidas de *Citrus* únicamente muestran un componente, el cual probablemente, es el resultado de la expresión simultánea de los sistemas de alta afinidad constitutivo CHATS e inducible IHATS, estando el primero oculto en el segundo. Los diferentes valores de K_m s estimados para estos sistemas, sugieren que las proteínas de transporte podrían ser distintas y por tanto el proceso de inducción consistiría en la estimulación de la síntesis del transportador inducido.

Los sistemas de transporte de alta afinidad para el NO_3^- , de otras especies distintas de los cítricos, son sensibles a los inhibidores metabólicos y parecen ser sistemas de transporte activo (Jackson y col., 1973; Rao y Rains, 1976; Glass y col., 1990; Siddiqi y col., 1990). El mecanismo de acoplamiento de energía para el transporte activo de NO_3^- por el HATS, ha sido estudiado en algunas especies mediante técnicas electrofisiológicas (Ullrich y Novacky, 1981; McClure y col., 1990; Glass y col., 1992). La absorción del nitrato está asociada con la depolarización de la diferencia de potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) en la membrana celular, que es inducible por el NO_3^- y saturable con respecto a la concentración exógena de este ion (Glass y col., 1992). Estas observaciones son concordantes con un posible mecanismo para la absorción del NO_3^- por el HATS, que incluye un simporte $2\text{H}^+ : 1\text{NO}_3^-$ accionado por

la energía derivada del gradiente de protones generado por la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática (Ullrich y Novacky, 1981; McClure y col., 1990; Glass y col., 1992; Santi y col., 1995).

Los resultados obtenidos en plántulas de *Citrus* confirman esta propuesta, ya que los sistemas de transporte de alta afinidad son inhibidos por inhibidores metabólicos (2,4-DNP y KCN) e inhibidores de H⁺-ATPasas (DCCD, DES y vanadato). Otra prueba adicional es la respuesta al pH de los sistemas de transporte de NO₃⁻, que son fuertemente inhibidos a medida que aumente la alcalinidad del medio. La observación de un pH óptimo ácido concuerda con estudios previos sobre la dependencia del pH de la absorción del NO₃⁻ (McClure y col., 1986; 1989; 1990).

También se han presentado evidencias acerca de que los grupos sulfhidrilo están a menudo involucrados en la absorción de iones por medio de transportadores (Kochian y Lucas, 1982). Los sistemas de transporte de alta afinidad de las raíces de los cítricos son fuertemente inhibidos en presencia de p-HMB. Esto coincide con la observación de que los transportadores de nitrato contienen grupos SH, que son esenciales para su actividad (Agüera y col., 1990; Aslam y col., 1992). No obstante, no debe descartarse la posibilidad de que este reactivo pueda provocar también efectos inespecíficos sobre los procesos metabólicos relacionados con la absorción de nitrato.

El sistema de transporte de baja afinidad (LATS) ha sido caracterizado previamente como constitutivo (Glass y col., 1990; Siddiqi y col., 1990) y relativamente insensible a los inhibidores metabólicos. El LATS, por tanto, parece tener algunas de las características que podrían esperarse de un sistema de transporte pasivo, mediante un canal que facilitaría el paso del NO₃⁻ a favor de su gradiente de potencial electroquímico. Sin embargo, considerando las determinaciones de las concentraciones de NO₃⁻ citoplasmático (King y col., 1992) y las diferencias de potencial eléctrico a través de la membrana medidos por Glass y col., (1992) en

células de raíz de cebada, es muy improbable, que se produzca un influjo pasivo de NO_3^- por la vía del LATS. Glass y col., (1992) sugirieron que este sistema es termodinámicamente activo y capaz de transportar NO_3^- en contra de su gradiente de potencial electroquímico. Estos autores también indicaron que el sistema de baja afinidad para la absorción de NO_3^- podría estar mediatizado por un co-transporte de protones.

El sistema lineal, que actúa a altas concentraciones de NO_3^- , en las raíces de los cítricos es inhibido por un pH externo alcalino, se muestra sensible a los inhibidores de las H^+ -ATPasas y, al menos a concentraciones externas de NO_3^- relativamente bajas (5 mM), requiere ATP. Estos resultados apoyan la posibilidad de que el LATS sea un sistema de transporte activo, unido a la H^+ -ATPasa, tal como propusieron Glass y col., (1992).

Sin embargo, el transportador que opera en este sistema debe ser distinto al del HATS, ya que el proceso es insensible al p-HMB y, por tanto, a diferencia del sistema de transporte de alta afinidad, no parece contener grupos SH en su centro activo.

Asimismo, un aspecto que hay que resaltar es que, a concentraciones elevadas de NO_3^- en el medio externo (30 mM), la actividad del LATS no se muestra afectada por los inhibidores metabólicos 2,4-DNP y KCN, lo que parece indicar que sus requerimientos energéticos, a partir del ATP, se reducen al aumentar los niveles de NO_3^- exógeno.

Esta observación es importante, ya que indicaría que, con concentraciones externas de NO_3^- moderadas, la entrada de este ion en la célula consumiría energía metabólica para vencer el gradiente electroquímico adverso. No obstante, cuando las concentraciones de NO_3^- en el medio son suficientemente elevadas, dicho ion podría

Capítulo V

atravesar la membrana plasmática, impulsado por su gradiente de concentración y, por tanto, no requeriría energía procedente de la hidrólisis del ATP.

Si asumimos que toda la fase lineal de absorción de NO_3^- se efectúa a través del mismo sistema de transporte, la hipótesis que sugerimos para explicar el funcionamiento de éste es la siguiente:

El transporte del NO_3^- por el sistema de baja afinidad se realizaría mediante un simporte con iones H^+ , que, a concentraciones relativamente bajas de NO_3^- en el medio externo, utilizaría la energía derivada del gradiente de protones generado por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. Sin embargo, a concentraciones externas de NO_3^- muy elevadas, este ion penetraría en la célula bajo el impulso de su gradiente de concentración, acompañado de H^+ y sin consumir energía metabólica.

En este caso, el canal de protones de la H^+ -ATPasa serviría para equilibrar el pH intracelular, facilitando la extrusión del exceso de protones.

Es obvio, que en este sistema (LATS) la concentración de NO_3^- en el citoplasma tiene una notable incidencia en su funcionamiento. Por ello, la absorción de NO_3^- se acelera en plantas que han estado desprovistas de NO_3^- externo, respecto a las que se han alimentado con este ion. La concentración de NO_3^- en el interior de las células radiculares se regularía principalmente por dos mecanismos: Por un lado, mediante su reducción para transformarse en NH_4^+ e incorporarse finalmente a los aminoácidos. En este proceso, el primer paso está catalizado por la enzima nitrato reductasa que, como es bien conocido, es inducible por el sustrato en la mayoría de las plantas y también en los agrios (Shaked y col., 1974) y su actividad es estimulada por el flujo de NO_3^- que entra en la célula (Shaner y Boyer, 1976a, b; Aslam y col., 1984). Por otro lado, está el desplazamiento del NO_3^- desde las raíces a la parte aérea, vía xilema, ya que se ha demostrado (Kubota y col., 1976a, b) que cuando la fuente de N que se suministra a los cítricos por las raíces, es nitrato, éste constituye la

principal fracción nitrogenada que se transporta en la savia.

En lo que se refiere al significado agronómico de los sistemas de absorción de nitrato por las raíces de los cítricos, podemos considerar que en los suelos cultivados con especies de *Citrus*, que no han sido fertilizados durante algún tiempo, la concentración de NO_3^- en la solución del suelo se mantiene por debajo de 1 mM, dependiendo de la humedad de éste y de otros factores que afectan a la evolución de los distintos compuestos nitrogenados del mismo. En estas condiciones de campo, el sistema de transporte de alta afinidad para el NO_3^- (HATS) desempeñaría un papel fundamental en la nutrición nítrica. El sistema de transporte constitutivo (CHATS), cuya capacidad para absorber NO_3^- es muy limitada, tendría también una función de sensor de las variaciones en la concentración de este ion en el entorno de las raíces, induciendo un sistema de mayor capacidad (IHATS) (Behl y col., 1988).

Después de la fertilización nitrogenada, cuando el nivel de NO_3^- en el suelo aumenta considerablemente, el sistema de transporte de baja afinidad por el NO_3^- (LATS) capacita a la planta para absorber cantidades más elevadas de dicho ion en un corto periodo de tiempo. El nitrógeno incorporado a la planta en este proceso, además de atender a las necesidades metabólicas inmediatas, puede ser acumulado en diferentes formas químicas de reserva de N, tanto en las hojas como en otros órganos de almacenamiento (Kubota y col., 1974; Akao y Kubota, 1976; Kato y col., 1984a, b; Legaz y col., 1995).

Capítulo V

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1º) La absorción del ion nitrato por las raíces de los cítricos puede ser realizada por, al menos, tres sistemas de transporte.

2º) Dos de ellos - uno constitutivo (CHATS) y otro inducible (IHATS) - muestran una alta afinidad por el NO_3^- y ambos siguen una cinética de Michaelis-Menten, alcanzando la saturación a concentraciones de NO_3^- externo comprendidas entre 0.5 y 0.8 mM.

3º) En las dos especies de cítricos estudiadas - el mandarino Cleopatra y el citrange Troyer - se encontraron valores similares para las K_{ms} y $V_{máxs}$ de sus respectivos sistemas de transporte saturables constitutivos.

4º) Otro sistema de transporte de baja afinidad para el NO_3^- , opera a concentraciones externas de este ion por encima de 1 mM. La velocidad de absorción de NO_3^- por las raíces, incrementó linealmente con su concentración en el medio, al menos en el intervalo comprendido entre 1 y 50 mM.

5º) La pendiente de esta recta era más acusada en el citrange Troyer que en el mandarino Cleopatra.

6º) El ion Cl^- inhibió competitivamente la absorción del NO_3^- por el sistema de alta afinidad.

7º) Por el contrario, el sistema de baja afinidad fue insensible al Cl^- de la solución externa, aunque fue inhibido cuando las plántulas se pre-trataron con soluciones salinas.

8º) La absorción neta de NO_3^- , por ambos sistemas, fue mucho más severamente afectada por el ion Cl^- en el citrange Troyer que en el mandarino Cleopatra.

9º) La reducción en la absorción de NO_3^- , provocada por la salinización de las plántulas, parece estar más estrechamente relacionada con un antagonismo inducido por la acumulación de Cl^- en los tejidos, que por la disminución en la tasa de transpiración, provocada por el estrés salino.

10º) El pre-tratamiento de las plántulas con soluciones de NO_3^- , redujeron la absorción neta de este ion por el sistema lineal que opera a altas concentraciones externas del mismo.

11º) El sistema de transporte de alta afinidad parece estar mediatizado por un transportador que contiene grupos SH en su centro activo, tiene un pH óptimo ácido y requiere energía para desplazar el nitrato a través de la membrana, en contra de su gradiente electroquímico. Este sistema podría actuar a través de un simporte de NO_3^- y H^+ , que utilizaría el gradiente de H^+ generado por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática.

12º) El sistema de baja afinidad parece también incorporar el NO_3^- a la célula mediante un co-transporte con el H^+ asociado a la actividad de la H^+ -ATPasa, aunque su naturaleza sería distinta a la del anterior. La dependencia de energía metabólica de

Capítulo VI

este sistema estaría en función de la diferencia de concentración del NO_3^- a ambos lados de la membrana.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

7. Referencias bibliográficas

A. P. H. A., A. W. W. A. y W. P. C. F., (1980). Standard methods for the examination of wastewater. Public. Edit. 15 ed, pp 1134.

Abel G.H. y Mackencie A.J., (1964). Salt tolerance of soybean varieties (*glycine max* L. Merrill) during germination and later growth. *Crop. Sci.*, **4**:157-161.

Abel G.H., (1969). Inheritance of the capacity for chloride inclusion and chloride exclusion by soybeans. *Crop. Sci.*, **9**:697-698.

Adriani M.J., (1956). Der Wasserhaushalt der Halophyten. *Encyclopedia of Plant Physiology*, **3**:902-904.

Agüera E., de la Haba P., Fontes A.G. y Maldonado J.M., (1990). Nitrate and nitrite uptake and reduction by intact sunflower plants. *Planta*, **182**:149-154.

Akao S. y Kubota S., (1976). Studies on the nitrogen metabolism in Satsuma mandarin trees. IV. Movements of proline in the leaves concurrent with the sprouting of spring shoots and their early growth. *Bull. Shikoku Agric. Exp. Stn.*, **29**:67-77.

Aloni B., Eitan A. y Livne A., (1977). The erythrocyte membrane site for the effect of temperature on osmotic fragility. *Biochim. Biophys. Acta*, **465**:46-53.

Arisz, W.H., Champhius I.J., Heikens H. y van Tooren A.J., (1955). The secretion of the salt glands of *limonium latifolium* Ktze. *Acta Bot. Neerl.*, **4**:322-328.

Aslam M., Huffaker R. C. y Rains D. W., (1984). Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.*, **76**:321-325.

Aslam M., Huffaker R. C. y Travis R.L., (1973). The interaction of respiration and photosynthesis in induction of nitrate reductase activity. *Plant Physiol.*, **52**:137-141.

Aslam M., Huffaker R. C., Rains D. W. y Rao K.P., (1979). Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings. *Plant Physiol.*, **63**:1205-1209.

Aslam M., Huffaker R.C., (1984). Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. *Plant Physiol.*, **75**:623-628.

Aslam M., Huffaker R.C., (1989). Role of nitrate and nitrite in the induction of nitrite reductase in leaves of barley seedlings. *Plant Physiol.*, **91**:1152-1156.

Aslam M., Rosicham J.L. y Huffaker R.C., (1987). Comparative induction of nitrate reductase by nitrate and nitrite in barley leaves. *Plant Physiol.*, **83**:579-584.

Aslam M., Travis R.L. y Huffaker R.C., (1992). Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, **99**:1124-1133.

Aslam M., Travis R.L., Rains D.W. y Huffaker R.C., (1996). Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport systems in roots of intact barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Planta*, **200**:58-63.

Atallah A.M. y Nicholas H.J., (1974). Function of sterol esters in plants: A hypothesis that liquid crystalline properties of some sterol esters may be significant in plant sterol metabolism. *Lipids*, **9**:613-622.

Banowitz G.M., (1992). The effects of endogenous cytokinin content on benzyladenine-enhanced nitrate reductase induction. *Physiol. Plant.*, **86**:341-348.

Bañuls J. y Primo-Millo E., (1995). Effects of salinity on some *Citrus* scion-rootstock combinations. *Ann. Bot.*, **76**:97-102.

Bañuls J., Legaz F. y Primo-Millo E., (1990). Effect of salinity on uptake and distribution of chloride and sodium in some citrus scion-rootstock combinations. *J.*

Hortic. Sci., **65**:715-724.

Bañuls J., Legaz F. y Primo-Millo E., (1991). Salinity-calcium interactions on growth and ionic concentration of *Citrus* plants. *Plant Soil*, **133**:39-46.

Bañuls J., Serna M.D., Legaz F., Talon M. y Primo-Millo E., (1996). Growth and gas exchange parameters of *Citrus* plants stressed with different salts. *J. Plant Physiol.*, 194-199.

Bar-Akiva A. y Sternbaum A., (1965a). Possible use of the nitrate reductase activity of leaves as a measure on the nitrogen requirement of citrus trees. *Plant Cell Physiol.*, **6**:575-577.

Bar-Akiva A. y Sternbaum A., (1965b). Nitrate reduction in citrus trees leaves. *Plant Soil*, **23**:141-144.

Bar-Akiva A., (1972). Nitrate contents of leaves of differentially fertilized citrus trees. *Com. Soil Sci. Plant Anal.*, **3**:65-69.

Barber S.A., (1984). Soil Nutrient Bioavailability, in: A mechanistic approach, Wiley J. (De), New York.

Barker A.V. y Maynard D.N., (1972). Cation and nitrate accumulation in pea and cucumber plants as influenced by nitrogen nutrition. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **97**:27-30.

Barraclough P.B., (1989). Root growth, macronutrient uptake dynamics and soil fertility requirements of a high-yielding winter oilseed rape crop. *Plant Soil*, **119**:59-70.

Behboudian M.H., Törökfalvy E. y Walker R.R., (1986). Effects of salinity on ionic content, water relations and gas exchange parameters in some citrus scion-rootstock combinations. *Sci. Hort.*, **28**:105-116.

Behl R., Tischner R. y Raschke K., (1988). Induction of a high-capacity nitrate-uptake mechanism in barley roots promoted by nitrate uptake through a constitutive low-capacity mechanism. *Planta*, **176**:235-240.

Ben-Hayyim G. y Goffer Y., (1989). Plantlet regeneration from a NaCl-selected salt-tolerant callus culture of Shamouti orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell Rep.*, **7**:680-683.

Bennett R.D. y Heftmann E., (1969). Biosynthesis of stigmasterol from sitosterol in *Digitalis lanata*. *Steroids*, **14**:403-407.

Bennett R.D., Heftmann E., Preston W.H. y Haun J.R., (1963). Biosynthesis of sterols and sapogenins in *Dioscorea spiculiflora*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**:74:83.

Bernstein L., Brown J.W. y Hayward H.E., (1956). The influence of rootstock on growth and salt accumulation in stone-fruit trees and almonds. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **9**:25-46.

Bhambota J.R. y Kanwar J.S., (1970). Effect of different salt concentrations on sweet-orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Indian J. Agric. Sci.*, **40**:485-494.

Bielorai H., Dasberg S., Erner Y. y Brum M., (1988). The effect of saline irrigation water on Shamouti orange production. *Proc. Intl. Citrus Cong.*, **6**:707-715.

Bingham F.T., Mahler R.J., Parra J. y Stolzy L.H., (1974). Long-term effects of irrigation-salinity management on a Valencia orange orchard. *Soil Sci.*, **117**:369-377.

Blair F.J., Miller H.H. y Mitchell W.A., (1970). Nitrate and ammonium as sources of nitrogen for corn and their influence on the uptake of other ions. *Agron. J.*, **62**:530-532.

Bloom A.J., (1985). Wild and cultivated barleys show similar affinities for mineral nitrogen. *Plant Physiol.*, **65**:553-557.

Botella M.A., Cerdá A. y Lips S.H., (1994). Kinetics of NO_3^- and NH_4^+ uptake by wheat seedlings. Effect of salinity and nitrogen source. *J. Plant Physiol.*, **144**:53-57.

Bowsher C.G., Long D.M., Oaks A. y Rothstein S.J., (1991). Effect of light/dark cycles on expression of nitrate assimilatory genes in maize shoots and roots. *Plant Physiol.*, **95**:281-285.

Bradford M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Ann.*

Capítulo VII

Biochem., **72**: 248-254.

Bray E.A., (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.*, **103**:1035-1040.

Bremner J.M., (1965) Total nitrogen. *In: Methods of soil analysis, Part 2.* De. CA Black pp 1149-1178. *An. Soc. Agron.* Madison. WI.

Breteler H. y Nissen P., (1982). Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. *Plant Physiol.*, **70**:754-759.

Breteler H. y Siegerist M., (1984). Effects of ammonium on nitrate utilization by roots of dwarf bean. *Plant. Physiol.*, **75**:1099-1103.

Brewitz E., Larsson C-M. y Larsson M., (1996). Responses of nitrate assimilation and N translocation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) to reduced ambient air humidity. *J. Exp. Bot.*, **47**:855-861.

Brusca J.N. y Haas A.R.C., (1958). Chloride absorption. Calif. Agric. March 1958, pp 9 and 11-12.

Caboche M. y Rouzé P., (1990). Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet.*, **6**:187-192.

Calza R., Huttner E., Vincentz M., Rouzé P., Galangau F., Vaucheret H., Chérel I., Meyer C., Kronenberger J. y Caboche M., (1987). Cloning of DNA fragments complementary to tobacco nitrate reductase mRNA and encoding epitopes common to the nitrate reductase from higher plants. *Mol. Gen. Genet.*, **209**:552-562.

Callaci J.J. y Smarelli J., (1991). Regulation of the inducible nitrate reductase isoform from soybeans. *Biochim. Biophys. Acta*, **1088**:127-130.

Campbell W.H., (1988). Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiol. Plant.*, **74**:214-219.

Cannons A.C., Lida N. y Solomonson L.P., (1991). Expression of a cDNA clone encoding the heme-binding domain of Chlorella nitrate reductase. *Biochem. J.*, **278**:203-209.

Cerdá A., Caro M., Fernández F.G. y Guillen M.G., (1977). Foliar contents of sodium and chloride on citrus rootstock irrigated with saline waters, *in: Managing Saline Water for Irrigation*, Dregne H.E. (De), pp 155-164. Proc. Int. Salinity Conf.,

Texas Tech Univ. Lubbock, TX.

Cerdá A., Fernández F.G., Caro M. y Guillen M.G., (1979). Growth and mineral composition of two lemon varieties irrigated with saline waters. *Agrochimica*, **23**:387-396.

Cerdá A., Nieves M. y Guillen M.G., (1990). Salt tolerance of lemon trees as affected by rootstock. *Irrig. Sci.*, **11**:245-249.

Clarkson D.T. y Lüttge U., (1986). II. Mineral nutrition: inducible and repressible nutrient transport systems. *Progr. Bot.*, **52**:61-83.

Clement C.R., Hopper M.J., Jones L.H. y Leafe E.L., (1978). The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. II. Effect of light, defoliation, and relationship to CO₂ flux. *J. Exp. Bot.*, **29**:1173-1183.

Cole P.J., (1985). Chloride toxicity in citrus. *Irrig. Sci.*, **6**:63-71.

Colmer T.D., Fan T.W.M., Laüchli A. y Higashi R.M., (1996). Interactive effects of salinity, nitrogen and sulphur on the organic solutes in *Spartina alterniflora* leaf blades. *J. Exp. Bot.*, **47**:369-375.

Cooper W. C. y Gorton B. S., (1952). Toxicity and accumulation of chloride salts in *Citrus* on various rootstocks. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **59**:143-146.

Cooper W.C. y Peynado A., (1959). Chloride and boron tolerance of young-line citrus trees on various rootstock. *J. Rio Grande Valley Hort. Soc.*, **13**:89-96.

Cooper W.C. y Shull A.V., (1953). Salt tolerance of and accumulation of sodium and chloride ions in grapefruit on various rootstock grown in a naturally saline soil. *Proc. Rio Grande Valley Hort. Inst.*, **7**:107-117.

Cooper W.C., (1962). Toxicity and accumulation of salts in citrus trees on various rootstock in Texas. *Citrus Ind.*, **43**:5-7, 9-10, 18-19.

Cooper W.C., Cowley W.R. y Shull A.V., (1952a). Selection for salt tolerance of some subtropical fruit plants. *Texas Avocado Soc. Yearbook*, **5**:24-36.

Cooper W.C., Gorton B.S. y Edwards C., (1951). Salt tolerance of various citrus rootstock. *Proc. Rio Grande Valley Hort. Inst.*, **5**:46-52.

Cooper W.C., Gorton B.S. y Olson E.O., (1952b). Ionic accumulation in

Capítulo VII

citrus as influenced by rootstock and scion and concentrations of salts and boron in the substrate. *Plant Physiol.*, **27**:191-203.

Cox W.J. y Reisenauer H.M., (1973). Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. *Plant and Soil*, **38**:363-380.

Cram W.J., (1973). Internal factors regulating nitrate and chloride influx in plant cells. *J. Exp. Bot.*, **24**:328-342.

Cram W.J., (1976). Negative feedback regulation of transport in cells. The maintenance of turgor, volume and nutrient supply, **in**: Encyclopedia of Plant Physiology: Transport in Plants, *Lüttge U. and Pitman M.G. (Eds)*, Vol. 2A pp 284-316. Berlin/Heidelberg/New York: Springer.

Crawford N.M., Campbell W.H. y Davis R.W., (1986). Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**:8073-8076.

Crawford N.M., Smith M., Bellissimo D., y Davis R.W., (1988). Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:5006-5010.

Creelman R.A. y Mullet J.E., (1991). Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new β -tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Mol. Biol.*, **17**:591-608.

Chapman H.D., (1960). Salt Marshes and Salt Deserts of the World. *Leonard Hill*, London.

Chapman H.D., (1968). The mineral nutrition of *Citrus*, **in**: W. Reuther, L.D. Batchelor, H.J. Webber (Eds), *The Citrus industry*, II, pp 127-274.

Chaves M.M., (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.*, **234**:1-12.

Cheeseman J.M., (1988). Mechanisms of salinity tolerance in Plants. *Plant Physiol.*, **87**:547-550.

Cheng C., Acedo G.N., Dewdney J., Goodman H.M. y Conkling M.A., (1991). Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol.*, **96**:275-279.

Cheng C., Dewdney J., Kleinhofs A. y Goodman H.M., (1986). Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**:6825-6828.

Cheng C., Dewdney J., Nam h., den Boer B.G.W. y Goodman H.M., (1988). A new locus (NIA1) in *Arabidopsis thaliana* encoding nitrate reductase. *EMBO J.*, **11**:3309-3314.

Cheng C.L., Acedo G.N., Cristinsin M. y Conkling M.A., (1992). Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **8**:1861-1864.

Chérel I., Gonneau M., Meyer C., Pelsy F. y Caboche M., (1990). Biochemical and immunological characterization of nitrate reductase deficient nia mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.*, **92**:659-665.

Choi H.K., Juricek M., Huang C., Culley D. y Kleinhofs A., (1991). Analysis of barley nitrate reductase cDNA and genomic clones. *Mol. Gen. Genet.*, **227**:411-416.

Daniel-Vedele F., Dorbe M., Caboche M. y Rouzé P., (1989). Cloning of the nitrate reductase-encoding gene: protein domain structure and amino acid homologies in higher plants. *Gene*, **85**:371-380.

Dasberg S., Bielora H., Haimowitz A. y Erner Y., (1991). The effect of saline irrigation water on "Shamouti" orange trees. *Irrig. Sci.*, **12**:205-211.

Davies W.J. y Zhang J., (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, **42**:55-76.

De Classen M.E.T. y Wilcox G.E., (1974). Effect of nitrogen form on growth and composition of tomato and pea tissue. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **99**:171-174.

Deane-Drummond C.E. y Glass A.D.M., (1982). Studies of nitrate influx into barley roots by the use of $^{36}\text{ClO}_3^-$ as a tracer for nitrate. I. Interactions with chloride and other ions. *Can. J. Bot.*, **60**:2147-2153.

Deane-Drummond C.E., (1984). The apparent induction of nitrate uptake by *Chara corallina* cells following pretreatment with or without nitrate and chlorate. *J. Exp. Bot.*, **35**:1182-1193.

Deigman M.T. y Lewis O.A.M., (1988). The inhibition of ammonium uptake by nitrate in wheat. *New Phytol.*, **110**:1-3.

Delhon P., Gojon A., Tillard P. y Passama L., (1995a). Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants. I. Changes in NO_3^- influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *J. Exp. Bot.*, **46**:1585-1594.

Delhon P., Gojon A., Tillard P. y Passama L., (1995b). Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants. II. Relationship with accumulation of NO_3^- and asparagine in the roots. *J. Exp. Bot.*, **46**:1595-1602.

Delhon P., Gojon A., Tillard P. y Passama L., (1996a). Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants. III. Implication of the Dijkshoorn-Ben Zioni model in relation with the diurnal changes in NO_3^- assimilation. *J. Exp. Bot.*, **47**:885-892.

Delhon P., Gojon A., Tillard P. y Passama L., (1996b). Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants IV. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *J. Exp. Bot.*, **47**:893-900.

Deng M., Moureaux T., Leydecker M. y Caboche M., (1990). Nitrate reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabaccum* leaves. *Planta*, **180**:257-261.

Derek A.W., Alan M.A. y Christopher F.C., (1992). Effect of nitrogen supply on the kinetics and regulation of nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* dangeard. *J. of Exp. Bot.*, **43**:505-615.

Doddema H. y Telkamp G.P., (1979). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiol.*

Plant., **45**:332-338.

Douglas T.J. y Walker R.R., (1983). 4-desmethylsterol composition of *Citrus* rootstocks of different salt exclusion capacity. *Physiol. Plant.*, **58**:69-74.

Douglas T.J. y Walker R.R., (1984). Phospholipids, free sterols and adenosine triphosphatase of plasmamembrane-enriched preparations from roots of *Citrus* genotypes differing in chloride exclusion ability. *Physiol. Plant.*, **62**:51-58.

Eaton F.M., (1942). Toxicity and accumulation of chloride and sulfate salts in plants. *J. Agric. Res.*, **64**:357-399.

Edwards J.H. y Horton B.D., (1982). Interaction of seedlings to $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratios in nutrient solutions. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **107**:142-147.

Embleton T.W., Jones W.W., Labanauskas C.K. y Reuther W., (1968). Leaf analysis as a diagnostic tool and guide to fertilization. *Citrus Ind.*, **3**:183-210.

Epstein E., (1980). Responses of plants to saline environments, in: Genetic engineering of osmoregulation: impact on plant productivity for food, chemicals, and energy, *Rains D.W. et al. (Eds)* pp 7-21, Plenum Press, New York.

Erdei L., Stuiver C.E.E. y Kuiper P.J.C., (1980). The effect of salinity on lipid composition and an activity of Ca^{2+} and Mg^{2+} -stimulated ATPases in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. *Physiol. Plant.*, **49**:315-319.

Fernández E., Schnell R., Ramun L.P.W., Hussey S.C., Silfow C.D. y Lefebvre A., (1989). Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**:6449-6453.

Fischer T.H., (1983). The effect of Na^+ and K^+ on the thermal denaturation of $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -dependent ATPase. *Biochem. J.*, **211**:771-774.

Flowers T.J., Troke P.F. y Yeo A.R., (1977). The mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **28**:89-121.

François L.E. y Clark R.A., (1980). Salinity effects on yield and fruit quality of "Valencia" orange. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **105**:199-202.

Fried M., Zsoldos F., Vose P.B. y Shatokin I.L., (1965). Characterizing the NO_3^- and NH_4^+ uptake process of rice roots by use of ^{15}N labelled NH_4NO_3 . *Physiol.*

Plant., **18**:313-320.

Friemann A., Brinkmann K. y Hachtel W., (1991). Sequence of a cDNA encoding the bi-specific NAD(P)H-nitrate reductase from the tree *Betula pendula* and identification of conserved protein regions. *Mol. Gen. Genet.*, **227**:97-105.

Frith G.J.T. y Nichols D.G., (1975). Preferential assimilation of ammonium ions from ammonium nitrate solutions by apple seedlings. *Physiol. Plant.*, **33**:247-250.

Frota J. N. E. y Tucker T. C., (1978). Absorption rates of ammonium and nitrate by red kidney beans under salt and water stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **42**:753-756.

Fukui H., Motoyama E. y Kubota S., (1966). Studies on the rational application of fertilizer on citrus trees in Seto inland sea area. II. Seasonal changes of organic and inorganic constituents in various parts of young Satsuma orange tree. *Bull. Shikoku Agric. Exp. Stn.*, **14**:37-52.

Galangau F., Daniel-Vedele F., Moureaux T., Dorbe M., Leydecker M. y Caboche M., (1988). Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol.*, **88**:383-388.

García-Agustín P. y Primo-Millo E., (1995). Selection of a NaCl-tolerant *Citrus* plant. *Plant Cell Reports*, **14**:314-318.

Gashaw L. y Mugwira L.M., (1981). Ammonium-N and nitrate-N effects on the growth and mineral compositions of triticale, wheat, and rye. *Agrom. J.*, **73**:47-51*

Gassmann; W; Rubio; F; y Schroeder, JI (1996) *Plant J.* (10)869-82.

Gilliam J. W., (1971). Rapid measurement of chloride in plant material. *Proc. Am. Soc. Soil Sci.*, **35**:512-513.

Glass A.D.M., Shaff J.E. y Kochian L.V., (1992). Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiol.*, **99**:456-463.

Glass A.D.M., Siddiqi M.Y., Ruth T.J. y Rufty T.W., (1990). Studies of the uptake of nitrate in barley. II. Energetics. *Plant Physiol.*, **93**:1585-1589.

Glass A.D.M., Thompson R.G. y Bordelau L., (1985). Regulation of NO_3^- influx in barley. Studies using $^{13}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiol.*, **77**:379-381.

Gorham J., Wyn Jones R.G. y McDonnell E., (1985). Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil*, **89**:15-40.

Goyal S.S. y Huffaker R.C., (1986). The uptake of NO_3^- , NO_2^- , and NH_4^+ by intact wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiol.*, **82**:1051-1056.

Greenway H. y Munns R., (1980). Mechanism of salt salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**:149-190.

Greenway H., (1968). Growth stimulation by high chloride concentrations in halophytes. *Isr. J. Bot.*, **17**:169-177.

Grieve A.M. y Walker R.R., (1983). Uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in salt-treated citrus plants. *Aust. J. Agric. Res.*, **34**:133-143.

Grunwald C., (1971). Effects of free sterols, steryl ester, and steryl glycoside on membrane permeability. *Plant Physiol.*, **48**:653-655.

Guerrero F.D. y Mullet J.E., (1988). Reduction of turgor induces rapid changes in leaf translatable RNA. *Plant Physiol.*, **88**:401-408.

Guerrero M.G., Vega J.M. y Losada M., (1981). The assimilatory reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**:169-204.

Haberlandt G., (1914). In: Physiological plant anatomy, *MacMillan et al.* (Eds) pp 777, London.

Hajibagheri M.A., Hall J.L. y Flowers T.J., (1984). Stereological analysis of leaf cells of the halophyte *Suaeda maritima* (L.). *Dum. J. Exp. Bot.*, **35**:1547-1557.

Hamat H.B., Kleinhofs A. y Warner R.L., (1989). Nitrate reductase induction and molecular characterization in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.*, **218**:93-98.

Hanson J.B., (1984). The function of calcium in plant nutrition, in: Advances in Plant Nutrition, Tinker P.B. y Läuchli A. (Eds), pp 159-208. Praeger Publ. New York.

Capítulo VII

Hartman P.L., Mills H.A. y Jones Jr. J.B., (1986). The influence of nitrate: ammonium ratios on growth, fruit development, and element concentration in “Floradel” tomato plants. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **111**:487-490.

Harvey H.W., (1966). The chemistry and fertility of sea water. Cambridge University Press.

Harzallah-Shkiri F., Guillot-Saloman T. y Signol M., (1982). In: Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids, *Wintermans J.F.G.M. y Kuiper P.J.C. (Eds)*, pp 423, Elsevier, Amsterdam.

Hasegawa H. y Ichii M., (1994). Variation in Michaelis-Menten kinetic parameters for nitrate uptake by the young seedlings in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*, **44**:383-386.

Haynes R.J. y Goh K.M., (1978). Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biological Reviews*, **53**:465-510.

Haynes R.J., (1986). Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In: Haynes R.J. (De) *Mineral nitrogen in the plant-soil system*. N.Y.: Academic Press Inc. 303-58.

Hayward H.E. y Blair W.M., (1942). Some response of Valencia orange seedlings to varying concentrations of chloride and hydrogen ions. *Am. J. Bot.*, **29**:148-155.

Helal M., Koach K. y Mengel K., (1995). Effect of salinity and potassium on the uptake of nitrogen and on nitrogen metabolism in young barley plants. *Physiol. Plant.*, **35**:310-313.

Helder R.J., (1956). The loss of substances by cells and tissues (salt glands), in: Handbuch der Pflanzenphysiologie, *Ruhland W. (Ed)*, pp 468-488. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer.

Henk D., Hofstra J.J. y Feenstra W.J., (1978). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. I. Effect of nitrogen source during growth on uptake of nitrate and chlorate. *Physiol. Plant.*, **43**:343-350.

Hoagland D. R. y Arnon D. J., (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Califor. Agric. Exp. Stat. Cir.*, **347**:1-32.

Hoff T., Stummann B.M. y Henningsen K.W., (1991). Cloning and expression of a gene encoding a root specific nitrate reductase in bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol. Plant.*, **82**:197-204.

Hoff T., Stummann B.M. y Henningsen K.W., (1992). Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Plant.*, **84**:616-624.

Hoffman G.J., Catlin P.B., Mead R.M., Johnson R.S., Francois L.E. y Goldhamer D., (1989). Yield and foliar injury responses of mature plum trees to salinity. *Irrig. Sci.*, **10**:215-229.

Hole D.J., Emran A.M., Fares Y. y Drew M.C., (1990). Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiol.*, **93**:642-647.

Ivashikina N.V. y Feyziev Ya.M., (1998). Regulation of nitrate uptake in maize seedlings by accompanying cations. *Plant Sci.*, **131**:25-34.

Jackson W.A., Flesher D. y Hageman R.H., (1973). Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings. Some characteristics of apparent induction. *Plant Physiol.*, **51**:120-127.

Janiszowska W., Sobocinska J. and Kasprzyk Z., (1979). Distribution of different forms of sterols in three cellular subfractions of *Calendula officinalis* leaves. *Phytochemistry*, **18**:427-430.

Jennings D.H., (1968). Halophytes, succulence and sodium in plants. A unified theory. *New Phytol.*, **67**:899-911.

Jennings D.H., (1976). The effect of sodium chloride on higher plants. *Biol. Rev.*, **51**:453-486.

Johnstone I.L., McCabe P.C., Greaves P., Cole G.E., Brow M.A.D., Gurr S.J., Unkles S.E., Clutterbuck A.J., Kinghorn J.R. y Innis M., (1990). The isolation and characterization of the *cnrA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Gene*, **90**:181-192.

Joolka N.K. y Singh J.P., (1979). Effect of soil salinity on the growth of citrus

rootstoks. *Indian J. Agric. Sci.*, **49**:858-861.

Kaiser W.M. y Spill D., (1991). Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. II. In vitro modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol.*, **96**:368-375.

Kamminga-van Wijk C. y Prins H.B.A., (1993). The kinetics of NH_4^+ and NO_3^- uptake by Douglas fir from single N-solutions and from solutions containing both NH_4^+ and NO_3^- . *Plant Soil*, **151**:91-96.

Kato T. y Kubota S., (1982). Reduction and assimilation of ^{15}N -nitrate by citrus trees in cold season in comparison with summer. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **50**:413-420.

Kato T., Yamagata M. y Tsukahara S., (1985). Metabolism of ^{14}C -L-arginine and ^{14}C -L-proline in excised buds and stem sections of citrus trees (*Citrus unshiu* Marc.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **53**:412-428.

Kato T., Yanagata M. y Tsukahara S., (1984a). Seasonal variations in major nitrogenous components in buds, leaves, bark and wood of Satsuma mandarin trees. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **53**:17-22.

Kato T., Yanagata M. y Tsukahara S., (1984b). Storage forms and reservoirs of nitrogen used for new shoot development in Satsuma mandarin trees. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **52**:393-398.

Kauss H., (1978). Osmotic regulation in algae. *Prog. Phytochem.*, **51**:1-27.

Kemp R.J. y Mercer E.I., (1968). Studies on the sterols and sterols of the intracellular organelles of maize shoots. *Biochem. J.*, **110**:119-125.

Kenis J.D., Silvente S.T., Luna C.M. y Campbell W.H., (1992). Induction of nitrate reductase in detached corn leaves: the effect of the age of the leaves. *Physiol. Plant.*, **85**:49-56.

King B.J., Siddiqi M.Y. y Glass A.D.M., (1992). Studies of the uptake of nitrate in barley. V. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity - Implications for nitrate influx. *Plant Physiol.*, **99**:1582-1589.

Kirkby E.A. y Mengel K., (1967). Ionic balance in different tissues of the

tomato plant in relation to nitrate, urea, or ammonium nutrition. *Plant Physiol.*, **42**:6-14.

Kleinhaus F.W., Lees N.D., Bard M., Haak R.A y Woods R., (1979). ESR determinations of membrane permeability in a yeast sterol mutant. *Chem. Phys. Lipids*, **23**:143-154.

Kleinhofs A. y Warner R.I., (1990). Advances in nitrate assimilation, in: *Biochemistry of Plants*, 16, Mifflin B.J. y Lea P.J. (Eds.), pp. 89-120. Acad. Press, N.Y. ISBN 0-12-675416-0.

Klobus G., Ward M.R. y Huffaker R.C., (1988). Characteristics of injury and recovery of net NO_3^- transport of barley seedlings from treatments of NaCl. *Plant Physiol.*, **87**:878-882.

Kochian L.V. y Lucas W.J., (1982). Potassium transport in corn roots. I. Resolution of kinetics into a saturable and linear component. *Plant Physiol.*, **70**:1723-1731.

Kronzucker H.J., Glass A.D.M. y Siddiqi M.Y., (1995b). Nitrate induction in spruce: an approach using compartmental analysis. *Planta*, **196**:683-690.

Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y. y Glass A.D.M., (1995a). Kinetics of NO_3^- influx in spruce. *Plant Physiol.*, **109**:319-326.

Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y. y Glass A.D.M., (1995c). Compartmentation and flux characteristics of ammonium in spruce. *Planta*, **196**:691-698.

Kubo Y., Ogura N. y Nakkagawa H., (1988). Limited proteolysis of the nitrate reductase from spinach leaves. *J. Biol. Chem.*, **263**:19684-19689.

Kubota S., Fukui H. y Akao S., (1974). Studies on nitrogen metabolism in Satsuma mandarin trees. Part. 3. Seasonal changes with composition of amino acids under different nitrogen nutrition supplies. *Bull. Shikoku Agric. Exp. Stn.*, **28**:133-150.

Kubota S., Kato T., Akao S. y Bunya C., (1976a). ^{15}N absorption and translocation by Satsuma mandarin trees. III. Behavior of nitrogen supplied in early spring. *Bull. Shikoku Agric. Exp. Stn.*, **29**:49-53.

Kubota S., Kato T., Akao S. y Bunya C., (1976b). ^{15}N absorption and translocation by Satsuma mandarin trees. IV. Behavior of nitrogen supplied in early summer. *Bull. Shikoku Agric. Exp. Stn.*, **29**:55-66.

Kuiper P.J.C., (1968). Lipids in grape roots in relation to chloride transport. *Plant Physiol.*, **43**:1367-1371.

Kuo T.M., Kleinhofs A., Somers D. y Warner R.L., (1981). Antigenicity of nitrate reductase from barley leaves in *Hordeum vulgare* L. *Mol. Gen. Genet.*, **181**:20-23.

LaBrie S.T., Wilkinson J.Q. y Crawford N.M., (1991). Effect of chlorate treatment on nitrate reductase and nitrite reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **97**:873-879.

Lainé P., Ourry A., Macduff J., Boucaud J. y Salette J., (1993). Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiol. Plant*, **88**:85-92.

Langdale G.W., Thomas J.R. y Littleton T.G., (1973). Nitrogen metabolism of stargrass as affected by nitrogen and soil salinity. *Agron. J.*, **65**:468-470.

Larsson M., Larsson C-M., Whitford P.N. y Clarkson D.T., (1989). Influence of osmotic stress on nitrate reductase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) and the role of abscisic acid. *J. Exp. Bot.*, **40**:1265-1271.

Laüchli A. y Wieneke J., (1978). Salt relations of soybean mutants differing in salt tolerance: Distribution of ions and localization by X-ray microanalysis, **in**: Plant Nutrition, 1978, Proc. 8th Int. Colloq. Plant Analysis and Fertilizer Problems, pp 275-282. Anckland, New Zealand. Wellington, Government Printer.

Laüchli A. y Wieneke J., (1979). Studies on growth and distribution of Na^+ , K^+ and Cl^- in soybean varieties differing in salt tolerance. *Z. Pflanzernaehr. Bodenk.*, **142**:3-13.

Laüchli A., (1976a). Apoplasmic transport in tissues, **in**: Encyclopedia of Plant

Physiology, New series, *Lüttge U. and Pitman M.G. (Eds)*, pp 3-34. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Laüchli A., (1976b). Pathways of ion transport in roots, **in**: Transport and transfer processes in plants, *Wardlaw J.F. and Passioura J.S. (Eds)*, pp 101-112. Academic Press, New York.

Le Bot J. y Kirkby E.A., (1992). Diurnal uptake of nitrate and potassium during the vegetative growth of tomato plants. *J. Plant Nutr.*, **15**:247-264.

Lea P.J. y Mifflin B.J., (1979). Photosynthetic ammonia assimilation, **in**: Encyclopedia of plant physiology, N.S., Vol. 6: Photosynthesis II, Gibbs M. y Latzko E. (Eds), pp. 445-456. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Lea-Cox J.D. y Syversten J.P., (1993). Salinity reduces water use and nitrate-N-use efficiency of Citrus. *Ann. of Bot.*, **72**:47-54.

Lee H.J. y Titus J.S., (1992). Factors affecting the in vivo nitrate reductase assay for MM 106 apple trees. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, **23**:981-991.

Lee R.B. y Drew M.C., (1986). Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. II. Effect of plant N-status on the kinetic parameters of nitrate influx. *J. Exp. Bot.*, **37**:1768-1779.

Lees G.L. y Thompson J.E., (1980). Lipid composition and molecular organization in plasma membrane-enriched fractions from senescing cotyledons. *Physiol. Plant.* **49**:215-221.

Legaz F., (1993). Absorción, distribución y translocación del nitrógeno en cítricos. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia

Legaz F., Serna M.D. y Primo-Millo E., (1995). Mobilization of the reserve N in citrus. *Plant and soil*, **173**:205-210.

Lessani H. y Marschner H., (1978). Relation between salt tolerance and long-distance transport of sodium and chloride in various crop species. *Aust. J. Plant Physiol.*, **5**:27-37.

Levitt J., (1980). Responses of plants to environmental stresses, **in**: Water, Radiation, Salt and other stresses. Academic Press: New York.

Levy Y. y Shalhevet J., (1990). Ranking the salt tolerance of citrus rootstocks

by juice analysis. *Sci. Hort.*, **45**:89-98.

Levy Y., Shalhevet J. y Biorai H., (1979). Effect of irrigation regime and water salinity on grapefruit quality. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **104**:356-359.

Liphshitz N. y Waisel Y., (1974). Existence of salt glands in various genera of the Gramineae. *New Phytol.*, **73**:507-513.

Longstreth D.J., Bolanos J.A. y Smith J.E., (1984). Salinity effects on photosynthesis and growth in *Alternanthera philoxeroides* (Mart) Griseb. *Plant Physiol.*, **75**:1044-1047.

Longstreth D.J., y Nobel P.S., (1979). Salinity effects on leaf anatomy. Consequences for photosynthesis. *Plant Physiol.*, **63**:700-703.

Lu J., Ertl J.R. y Chen C., (1992). Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.*, **98**:1255-1260.

Lu Q. y Briskin D., (1993). Modulation of the maize plasma membrane carrier by NO_3^- . *Phytochem.*, **33**:1-8.

Luque A. A. y Bingham F. T., (1981). The effect of the osmotic potential and specific ion concentration of the nutrient solution on the uptake and reduction of nitrate by barley seedlings. *Plant Soil*, **63**:227-237.

Lloyd J. y Howie H., (1989a). Response of orchard "Washington Navel" orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck to saline irrigation water. I. Canopy characteristics and seasonal patterns in leaf osmotic potential, carbohydrates and ion concentrations. *Aust. J. Agric. Res.*, **40**:359-369.

Lloyd J. y Howie H., (1989b). Salinity, stomatal responses and whole-tree hydraulic conductivity of orchard "Washington Navel" orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Plant Physiol.*, **16**:169-179.

Lloyd J., Kriedemann P.E. y Aspinall D., (1989). Comparative sensitivity of "Prior Lisbon" lemon and "Valencia" orange trees to foliar sodium and chloride concentrations. *Plant, Cell Environ.*, **12**:529-540.

Lloyd J., Kriedemann P.E. y Aspinall D., (1990). Contrast between Citrus species in response to salinisation: An analysis of photosynthesis and water relations

for different rootstock-scion combinations. *Physiol. Plant.*, **78**:236-246.

Lloyd J., Kriedemann P.E. y Syvertsen J.P., (1987a). Gas exchange, water relations and ion concentrations of leaves on salt-stressed "Valencia" orange *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Plant Physiol.*, **14**:387-396.

Lloyd J., Kriedemann P.E., Prior L. y Grieve A., (1986). Citrus leaf fluorescence: water and salt effects. *Acta Hortic.*, **175**:333-337.

Lloyd J., Syvertsen J.P. y Kriedemann P.E., (1987b). Salinity effects on leaf water relations and gas exchange of "Valencia" orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Plant Physiol.*, **14**:605-617.

Maas E. V. y Hoffman G. J., (1977). Crop salt tolerance-current assessment. *J. Irrig. Drain*, **103**:115-134.

Maas E.V. y Nieman R.H., (1978). Physiology of plant tolerance to salinity, in: Crop tolerance to suboptimal land conditions, Jung G.A. (De), pp 277-299. Am. Soc. Agron. Spec. Publ.

Maas E.V., (1985). Crop tolerance to saline sprinkling water. *Plant and soil*, **89**:273-284.

Maas E.V., (1993). Salinity and citriculture. *Tree Physiol.*, **12**:195-216.

MacKown C.T. y McClure P.R., (1988). Development of accelerated net nitrate uptake. Effects of nitrate concentration and exposure time. *Plant Physiol.*, **87**:162-166.

Mackown C.T., Jackson W.A. y Volk R.J., (1982). Restricted nitrate influx and reduction in corn seedlings exposed to ammonium. *Plant Physiol.*, **69**:353-359.

Mattsson M., Lundborg T. y Larsson C.M., (1988). Nitrate utilization in barley: relations to nitrate supply and light-dark cycles. *Physiol. Plant.*, **73**:380-386.

Matzke H. y Mengel K., (1993). Importance of plasmalemma ATPase in the retention and exclusion of inorganic ions. *Z. Pflanzenernaehr Bodenkd*, **156**:515-519.

McClure P.R., Kochian L.V., Spanswick R.M. y Shaff J.E., (1990a). Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. Effect of nitrate in the membrane potential. *Plant Physiol.*, **93**:281-289.

McClure P.R., Kochian L.V., Spanswick R.M. y Shaff J.E., (1990b). Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. Measurement of NO_3^- and H^+ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol.*, **93**:290-294.

McClure P.R., Omholt T.E. y Pace G.M., (1986). Anion uptake in maize roots: Interactions between chlorate and nitrate. *Physiol Plant* **68**:107-112.

Meyerhoff P.A., García-Agustín P. y Huffaker R., (1994). Precipitation of barley soluble nitrate reductase. Supplement to *Plant Physiol.*, **105**:40.

Minotti P.L., Williams D.C. y Jackson W.A., (1969). Nitrate uptake by wheat as influenced by ammonium and other cations. *Crop Sci.*, **9**:9-14.

Mobayen R.G. y Milthorpe F.L., (1980). Response of seedlings of three citrus-rootstock cultivars to salinity. *Aust. J. Agric. Res.*, **31**:117-124.

Mohr H., Neiminger A. y Seith B., (1992). Control of nitrate reductase and nitrite reductase gene expression by light, nitrate and plastidic factor. *Bot. Acta*, **105**:81-89.

Morgan J.A., (1984). Interaction of water supply and N in wheat. *Plant Physiol.*, **76**:112-117.

Mullan D.P., (1931). On the occurrence of glandular hairs (salt glands) on the leaves of some Indian halophytes. *J. Indian Bot. Soc.*, **10**:184-189.

Nieves M., Cerdá A. y Botella M., (1991b). Salt tolerance of two lemon scions measured by leaf chloride and sodium accumulation. *J. Plant Nutr.*, **14**:623-636.

Nieves M., García A. y Cerdá A., (1991a). Effects of salinity and rootstocks on lemon fruit quality. *J. Hortic. Sci.*, **66**:127-130.

Nieves M., Martínez V., Cerdá A. y Guillen M.G., (1990). Yield and mineral composition of "Verna" lemon trees as affected by salinity and rootstock combination. *J. Hort. Sci.*, **65**:359-366.

Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M. y Pardo J.M., (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.*, **109**:735-749.

Novoa R. y Loomis R.S., (1981). Nitrogen and plant production. *Plant Soil*,

58:177-204.

Oaks A., (1979). Nitrate reductase in roots and its regulation, **in:** *Nitrogen assimilation in plants*, Hewitt E.J. y Cuttings C.V. (Eds.), pp. 217-244. Acad. Press, N.Y. ISBN x-30-024174-6.

Oelmüller R., Schuster C. y Mohr H., (1988). Physiological characterization of a plastidic signal for nitrate-induced appearance of nitrate and nitrite reductase. *Planta*, **174**:75-83.

Okamoto P.M., Fu Y.H. y Marzluf A., (1991). Nit-3, the structural gene of nitrate reductase in *Neurospora crassa*: nucleotide sequence and regulation of mRNA synthesis and turnover. *Mol. Gen. Genet.*, **227**:213-223.

Pace G.M. y McClure P.R., (1986). Comparison of nitrate uptake kinetic parameters across maize inbred lines. *J. Plant Nutr.*, **9**:1095-1111.

Pan W.L., Jackson W.A. y Moll R.H., (1985). Nitrate uptake and partitioning by corn root systems. *Plant Physiol.*, **77**:560-566.

Pasternak D., (1987). Salt tolerance and crop production. A comprehensive approach. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **25**:271-291.

Pate J.S. y Gunning B.E.S., (1972). Transfer cells. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**:173-196.

Pessaraki M. y Tucker T. C., (1985). Uptake of nitrogen-15 by cotton under salt stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **49**:149-152.

Pessaraki M. y Tucker T. C., (1988). Nitrogen-15 uptake by eggplant under sodium chloride stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **52**:1673-1676.

Peuke A.D. y Tischner R., (1991). Nitrate uptake and reduction of aseptically cultivated spruce seedlings, *Picea abies* (L.) Karst. *J. Exp. Bot.*, **42**:723-728.

Peynado A. y Sluis N.J., (1979). Chloride and boron tolerance of young "ruby red" grapefruit trees affected by rootstocks and irrigation method. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **104**:133-136.

Peynado A. y Young R., (1962). Performance of nucellar red blush grapefruit trees on 13 kinds of rootstocks irrigated with saline and boron-contaminated well water over a 3-year period. *J. Rio Grande Valley Hort. Soc.*, **16**:52-58.

Plassard C., Barry D., Eltrop L. y Mousin D., (1994). Nitrate uptake in maritime pine (*Pinus pinaster*) and the ectomycorrhizal symbiosis. *Can. J. Bot.*, **72**:189-197.

Pollard A. y Wyn Jones R.G., (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta*, **144**:291-298.

Prosser I.M. y Lazarus C.M., (1990). Nucleotide sequence of a spinach nitrate reductase cDNA. *Plant Mol. Biol.*, **15**:187-190.

Rains D.W. y Epstein E., (1965). Transport of sodium in plant tissue. *Science*, **148**:1611.

Rains D.W. y Epstein E., (1967). Sodium absorption by barley roots: role of the dual mechanism alkali cation transport. *Plant Physiol.*, **42**:314-318.

Rajasekhar V.K., Gowri G. y Campbell W.H., (1988). Phytochrome mediated light regulation of nitrate reductase expression in squash cotyledons. *Plant Physiol.*, **88**:242-244.

Rao K.P. y Rains D.W., (1976). Nitrate absorption by barley. I. Kinetics and energetics. *Plant Physiol.*, **57**:55-58.

Raper C.D., Vessey J.K. y Henry L.T., (1991). Increase in nitrate uptake by soybean plants during interruption of the dark period with low intensity light. *Physiol. Plant.*, **81**:183-189.

Ream C.L. y Furr J.R., (1976). Salt tolerance of some *Citrus* species, relatives, and hybrids tested as rootstocks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **101**:265-267.

Redinbough M.G. y Campbell W.H., (1981). Purification and characterization of NAD(P)H: nitrate reductase and NADH: nitrate reductase from corn roots. *Plant Physiol.*, **68**:115-120.

Rokba A.M., Abdel-Messih M.N. y Mohamed M.A., (1979). Breeding and screening some citrus rootstocks for salt tolerance in Egypt. *Egypt J. Hort.*, **6**:69-79.

Rozema J., (1978). On the ecology of some halophytes from beach plain in the Netherlands. PhD Thesis Vrije Universiteitte Amsterdam, pp 191.

Rubio F., Gassmann W. y Schroeder J.I., (1995). Sodium-driven potassium uptake transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*, **270**:1660-1663.

Rufty Jr. T.W., William A.J. y David Jr. C.R., (1982). Inhibition of nitrate assimilation in roots in the presence of ammonium: The moderating influence of potassium. *J. of Exp. Bot.*, **33**:1122-1137.

Rufty T.W., MacKown C.T. y Volk R.J., (1989). Effects of altered carbohydrate availability on whole-plant assimilation of $^{15}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiol.*, **89**:457-463.

Ruhland W., (1915). Untersuchungen über die Hautdrüsen der Plumbaginaceen. Ein Beitrag zur Biologie der Halophyten. *J. Wiss. Botan.*, **55**:409-498.

Ruiz-Cristin J. y Briskin D.P., (1991). Characterization of a H^+/NO_3^- symport associated with plasma membrane vesicles of maize roots using $^{36}\text{ClO}_3^-$ as a radiotracer analog. *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**:74-82.

Sala J.M. y Cuñat P., (1982). Influencia de la forma nítrica y amoniacal, en que se administra el nitrógeno, sobre la productividad y absorción de macronutrientes del naranjo W. Navel. *Rev. Agro. Tec. Alim.*, **22**(4):589-597.

Saniger J.M. y Sanz H.G., (1974). Determinación isotópica de nitrógeno en compuestos nitrogenados por espectrometría de masas. Informe interno: pp 1-16. ES. 12027I-2. J.E.N. Madrid.

Santi S., Locci G., Pinton R., Cesco S. y Varanini Z., (1995). Plasma membrane H^+ -ATPase in maize roots induced for NO_3^- uptake. *Plant Physiol.*, **109**:1277-1283.

Scaife A. y Schloemer S., (1994). The diurnal pattern of nitrate uptake and reduction by spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Ann. Bot.*, **73**:337-343.

Scaife A., (1989). A pump/leak/buffer model for plant nitrate uptake. *Plant and Soil*, **114**:139-141.

Schachtman D. y Schroeder J.I., (1994). Structure and transport mechanism

of high affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, **370**:655-658.

Schroeder J.I., Ward J.M. y Gassmann W., (1994). Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K^+ channels in higher plants: biophysical implications for K^+ uptake. *Annu. rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**:441-471.

Segel I. H., (1975). Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems, in: Enzyme kinetics. John Wiley y Sons (Eds), New York, pp 100-160.

Serna M.D., Borrás R., Legaz F. y Primo-Millo E., (1992). The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N-uptake, mineral composition and yield of citrus. *Plant Soil*, **147**:13-23.

Shaked A., Bar-Akiva A. y Mendel K., (1974). Nitrate reductase activity as an indication of the nitrogen status and requirements of citrus trees under orchard conditions. *Proc. 1st Int. Citrus Congr.*, **1**:165-170.

Shaner D.L. y Boyer J.S., (1976a). Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.*, **58**:499-504.

Shaner D.L. y Boyer J.S., (1976b). Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiol.*, **58**:505-509.

Shelp B.J., (1987). Plant characteristics and nutrient composition and mobility of Broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) supplied with NH_4^+ , NO_3^- or NH_4NO_3 . *J. Exp. Bot.*, **38**:1603-1618.

Shiraishi N., Sato T., Ogura N. y Nakagawa H., (1992). Control by glutamine of the synthesis of nitrate reductase in cultured spinach cells. *Plant Cell Physiol.*, **33**:727-731.

Siddiqi M.Y., Glass A.D.M., Ruth T.J. y Rufty T.W. Jr., (1990). Studies of the uptake of nitrate in barley. Kinetics of $^{13}NO_3^-$ influx. *Plant Physiol.*, **93**:1426-1432.

Siddiqi M.Y., Glass A.D.M., Thomas J.R. y Mala F., (1989). Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using $^{15}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiol.*, **90**:806-813.

Smart D.R. y Bloom A.J., (1998). Investigations of ion absorption during NH_4^+ exposure I. Relationship between H^+ efflux and NO_3^- absorption. *J. of Exp. Bot.*, **49**:95-100.

Smith D. y Struckmeyer B.E., (1977). Effects of high-levels of chlorine in alfalfa shoots. *Can. J. Plant. Sci.*, **57**:293-296.

Smith F. A., (1973). The internal control of nitrate uptake into excised barley roots with differing salt contents. *New Phytol.*, **72**:769-782.

Solomonson L.P. y Barber J.M., (1990). Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41**:225-253.

Spiegel-Roy P. y Ben-Hayyim G., (1985). Selection and breeding for salinity tolerance *in vitro*. *Plant Soil*, **89**:243-252.

Stelzer R. y Läuchli A., (1978). Salt and flooding tolerance of *Puccinellia peisonis*. III. Distribution and localization of ions in the plant. *Z. Pflanzenphysiol.*, **88**:437-448.

Stewart C.R. y Orebamjo J.O., (1979). Some unusual characteristics of nitrate reduction in *Erythrina senegalensis* D.C. *New Phytol.*, **83**:311-319.

Storey R. y Walker R.R., (1987). Some effects of root anatomy on K^+ , Na^+ and Cl^- loading of citrus roots and leaves. *J. Exp. Bot.*, **38**:1769-1780.

Stuiver C.E.E., Kuiper P.J.C. y Kylin A., (1981). Effects of salinity and replacement of K^+ by Na^+ on lipid composition in two sugar beet inbred lines. *Physiol. Plant.*, **52**:77-82.

Swingle W.T., (1967). The botany of citrus and its wild relatives. *Citrus Ind.*, **1**:190-430.

Sykes S.R., (1985a). Effects of seedling age and size on chloride accumulation by juvenile citrus seedlings treated with sodium chloride under glasshouse conditions. *Aust. J. Exp. Agric.*, **25**:943-953.

Capítulo VII

Sykes S.R., (1985b). A glasshouse screening procedure for identifying citrus hybrids which restrict chloride accumulation in shoot tissues. *Aust. J. Agric. Res.*, **36**:779-789.

Syvertsen J.P. y Yelenosky G., (1988). Salinity can enhance freeze tolerance of citrus rootstock seedlings by modifying growth, water relations, and mineral nutrition. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **113**:889-893.

Syvertsen J.P., Lloyd L. y Kriedemann P.E., (1988). Salinity and drought stress effects on ion concentration, water relations and photosynthesis characteristics of orchard citrus. *Aust. J. Agric. Res.*, **39**:619-627.

Takacs E. y Técsi L., (1992). Effects of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio on photosynthetic rate, nitrate reductase activity and chloroplast ultrastructure in three cultivars of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Plant Physiol.*, **140**:298-305.

Talouizite A. y Champigny M.L., (1988). Response of wheat seedlings to short-term drought with particular respect to nitrate utilization. *Plant, Cell and Environment*, **11**:149-155.

Tanner W. y Beevers H., (1990). Does transpiration have an essential function in long-distance ion transport in plants? *Plant, Cell and Environ.*, **13**:745-750.

Thompson W.W., (1975). Structure and function of salt glands, **in**: Plants in saline environments, Pljakoff-Mayber A. y Gale J. (Eds), pp 118-156. Heidelberg: Springer-Verlag.

Tompkins G.A., Jackson W.A. y Volk R.J., (1978). Accelerated nitrate uptake in wheat seedlings: effects of ammonium and nitrite pretreatments and of 6-methylpurine and puromycin. *Physiol. Plant.*, **43**:166-171.

Ullrich W.R. y Novacky A., (1981). Nitrate-dependent membrane potential changes and their induction in *Lemna gibba*. *Plant Sci. Lett.*, **22**:211-217.

Van Steveninck R.F.M., Van Steveninck M.E., Stelzer R. y Läubli A., (1982). Studies on the distribution of Na^+ and Cl^- in two species of lupin (*Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius*) differing in their salt tolerance. *Physiol. Plant.*, **56**:465-473.

Vardi A., Spiegel-Roy P., Ben-Hayyin G., Neumann H. y Shalhevet J., (1988). Response of Shamouti orange and Minneola tangelo on six rootstocks to salt stress. *Proc. Intl. Citrus Cong.*, **6**:75-82.

Vaucheret H., Kronenberger J., Rouzé P. y Caboche M., (1989b). Complete nucleotide sequence of the two homologous tobacco nitrate reductase genes. *Plant Mol. Biol.*, **12**:597-600.

Vaucheret H., Vincentz M., Kronenberger J., Caboche M., y Rouzé P. (1989a). Molecular cloning and characterization of the two homologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, **216**:10-15.

Vincentz M., Moureaux T., Leydecker M.H., Vaucheret H. y Cabocha M., (1993). Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant J.*, **3**:315-324.

Walker R. R., Törökfalvy E., Grieve A. M. y Prior L. D., (1983). Water relations and ion concentrations of leaves on salt-stressed *Citrus* plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, **10**:267-277.

Walker R.R. y Douglas T.J., (1983). Effect of salinity level on uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in citrus plants. *Aust. J. Agric. Res.*, **34**:145-153.

Walker R.R., (1986). Sodium exclusion and potassium-sodium selectivity in salt-treated trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) and Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata*) plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, **13**:293-303.

Walker R.R., Sedgley M., Blesing M.A. y Douglas T.J., (1984). Anatomy, ultrastructure and assimilate concentrations of roots of *Citrus* genotypes differing in ability for salt exclusion. *J. Exp. Bot.*, **35**:1481-1494.

Walker R.R., Torokfalvy E. y Downton W.J.S., (1982). Photosynthetic responses of citrus varieties Rangpur lime and Etrog citron to salt treatment. *Aust. J. Plant Physiol.*, **9**:783-790.

Wallace A. y Mueller R.T., (1957). Ammonium and nitrate absorption from

sand culture by rough lemon cuttings. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **69**:183-188.

Wallace A., (1953). Nitrogen absorption and translocation by citrus cuttings at different root temperatures. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **61**:89-94.

Wang X. y Below F.E., (1992). Root growth, nitrogen uptake, and tillering of wheat induced by mixed-nitrogen source. *Crop Sci.*, **32**:997-1002.

Warner R.L. y Huffaker R.C., (1989). Nitrate transport is independent of NADH and NAD(P)H nitrate reductases in barley seedlings. *Plant Physiol.*, **91**:947-953.

Warner R.L. y Kleinhofs A., (1992). Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. *Physiol. Plant.*, **85**:245-252.

Warner R.L., Narayama K.R y Kleinhofs A., (1987). Inheritance and expression of NAD(P)H nitrate reductase in barley. *Theor. Appl. Genet.*, **74**:714-717.

Wieneke J. y Läuchli A., (1979). Effects of salt stress on distribution of Na⁺ and some other cations in two soybeans varieties differing in salt tolerance. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.*, 142.

Wilkinson J.Q. y Crawford N.M., (1991). Identification of the Arabidopsis CHL3 gene as the nitrate reductase structural gene NIA2. *Plant Cell*, **3**:461-471.

Winter K., Osmond C.B. y Pate J.S., (1981). Coping with salinity, in: *Biology of Australian Plants*, Pate J.S. y McComb A.J. (Eds), pp 88-113. University of Western Australia Press (Nedlands).

Wolfe J., (1978). Chilling injury in plants. The role of membrane lipid fenidity. *Plant, Cell and Environ.*, **1**:241-247.

Wutscher H.K., (1984). Nitrate distribution in mature citrus trees. *Hort. Sci.*, **19**:433-434.

Wutscher H.K., Peynado A., Cooper W.C. y Hill H., (1974). Method of irrigation and salt tolerance of citrus rootstocks. *Proc. II Int. Citrus Congress*, Murcia-Valencia, Spain **1**:299-306.

Wyn Jones R.G. y Storey R., (1978). *Aust. J. Plant. Physiol.*, **5**:839-850.

Wyn Jones R.G., Brady C.J. y Speirs J., (1979). Ionic and osmotic relations

in plant cells, in: *Recent Advances in the Biochemistry of Cereals*, Laidman D.L. y Wyn Jones R.G. (Eds), pp 63-104. London/ New York/ San Francisco: Academic.

Youngdahl L.J., Pacheco R., Street J.J. y Vlek P.L.G., (1982). The kinetics of ammonium and nitrate uptake by young rice plants. *Plant Soil*, **69**:225-232.

Zeevart J.A.D. y Creelman R.A., (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, **39**:439-473.

Zekri M., (1991). Effects of NaCl on growth and physiology of sour orange and Cleopatra mandarin seedlings. *Sci. Hort.*, **47**:305-315.

Zekri M., y Parsons L.R., (1990a). Calcium influences growth and leaf mineral concentration of citrus under saline conditions. *HortScience*, **25**:784-786.

Zekri M., y Parsons L.R., (1990b). Response of split-root sour orange seedlings to NaCl and polyethylene glycol stresses. *J. Exp. Bot.*, **41**:35-40.

Zhen R-G., Koyro H-W., Leigh R.A., Tomos A.D. y Miller A.J., (1991). Compartmental nitrate concentrations in barley root cells measured with nitrate-selective microelectrodes and by single-cell sap sampling. *Planta*, **185**:356-361.

Zid E. y Grignon C., (1985). Sodium-calcium interactions in leaves of *Citrus aurantium* grown in the presence of NaCl. *Physiol. Veg.*, **23**:895-903.

Zrenner R. y Stitt M., (1991). Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant, Cell and Environment*, **14**:939-946.