



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturals
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Impacto de la Deficiencia Combinada de
Nitrógeno y Azufre sobre la Removilización de
Aminoácidos y Azúcares en Plantas de Cebada
(*Hordeum vulgare L.*)

N° 477

Cintia Gabriela Veliz

Tutora: Dra. Carla Caputo
Co-Tutora: Dra. M. Victoria Criado
Tutoa de la Facultad: Dra. Susana Passeron

Departamento de Investigaciones
2010

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carla Caputo por aceptarme en su equipo de investigación para poder realizar mi tesina y por la paciencia con la que me guió en todo lo que emprendí durante este tiempo. Gracias por la calidez con que me enseñaste a trabajar y por permitirme aprender también de mis equivocaciones.

A la Dra. Victoria Criado por todo el material que me facilitó y por su ayuda para poder terminar este trabajo. Gracias por la buena onda de siempre.

A la Dra. Susana Passeron y la Dra. Irma Roberts por todos los conocimientos brindados durante la carrera y por el tiempo dedicado a la corrección de este trabajo.

A M. Angélica por todas las veces que me cubriste cuando lo necesité y Fede por toda la ayuda brindada.

A todos los que forman parte del INBA, por hacerme sentir tan cómoda desde el primer día y por el gran sentido de compañerismo que generan.

A todos mis profesores de la UB por haberme formado como profesional, especialmente a la Dra. Silvia Gonzalez por inculcarme la pasión por esta profesión y por su asesoramiento; al Dr. Sergio Ghio por contactarme con Carla y a la Lic. Liliana d'Huicque por darme la oportunidad de incursionarme en la docencia, por confiar en mí para llevar a cabo esa tarea y por las tantas charlas que tuvimos.

A mis amig@s por bancarme todos estos años y estar siempre presentes a pesar de vernos poco.

A mis compañeros de facultad, en especial a Lu y Ro por acompañarme en la lucha diaria del estudio, por ayudarnos mutuamente y hacer más llevadero todo.

Muy especialmente dedicado con todo mi amor:

A mis padres (Martha y Eduardo), por brindarme siempre todos los medios posibles para cumplir mis sueños, por todos sus sacrificios, por todos sus cuidados y por el inmenso amor que siempre me hicieron sentir.

A mi hermano (Maxi), por ser para mí un ejemplo a seguir; por escucharme y aconsejarme siempre y por contenerme en los momentos que más te necesité. Y a Marisa por aguantar mis locuras y por hacer feliz a una de las personas que más amo en esta Tierra.

A Gustavo, por su eterna paciencia, por alentarme a cumplir este objetivo, por su apoyo incondicional en todo y por el amor que nos tenemos que todo lo supera.

A mis tíos Benito y Estela por todo el apoyo que recibí de ellos en todo momento, por todo su cariño y porque sé que siempre puedo contar con ustedes; a mi abuela Marcelina por su generosa entrega en todos los sentidos y todo el amor que me brindás; y a mi tía Amanda, que sé que me estás cuidando desde el cielo y que me ayudaste a lograr este sueño, gracias por todo lo vivido juntas!!! Te voy a extrañar mucho.

A Dios, porque todo lo que soy y hago es por su gracia.

RESUMEN

Impacto de la Deficiencia Combinada de Nitrógeno y Azufre Sobre la Removilización de Aminoácidos y Azúcares en Plantas de Cebada (*Hordeum vulgare* L.)

En los cereales, la removilización de aminoácidos y azúcares desde las hojas desarrolladas es una fuente importante de nitrógeno (N) y carbono (C) para el crecimiento de los órganos en desarrollo, como es el caso de los granos. Una posible estrategia para mejorar la calidad de los granos sin aumentar el uso de fertilizantes se basa en aumentar la eficiencia de la removilización, y para esto es fundamental estudiar la regulación de este proceso y los factores que lo afectan.

Dado que en los últimos años en la región Pampeana se comenzaron a observar deficiencias de azufre (S), nos propusimos analizar si la deficiencia de este nutriente afecta la removilización de aminoácidos y azúcares en forma diferencial según el status de N de las plantas. Para ello se trabajó con plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L. var. *Scarlett*) regadas con solución nutritiva con dos disponibilidades de N (subóptima y óptima) combinadas con deficiencia o no de S. Al momento de la cosecha se tomaron muestras de los vástagos, de la última hoja expandida (hoja fuente) y de sus exudados floemáticos. En estas muestras se determinaron distintos parámetros bioquímicos encontrándose que la deficiencia de S generó una disminución significativa en la concentración de proteínas en las hojas sólo cuando las plantas contaban con un adecuado suministro de N, y que las plantas deficientes de N con un adecuado suministro de S presentaron una mayor acumulación de azúcares en los tejidos. A su vez, la deficiencia de S generó una inhibición en la exportación de aminoácidos y azúcares sólo en las plantas suficientes de N. Estos resultados estarían evidenciando un efecto del S sobre la síntesis proteica y sobre la eficiencia fotosintética de la planta, y sugieren que la deficiencia de S afecta la removilización de metabolitos en forma diferencial según el status de N de las plantas.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN.....	5
ÍNDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS	8
<hr/>	
INTRODUCCIÓN.....	9
IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CEBADA	9
<i>Características principales</i>	9
<i>Usos comerciales</i>	10
<i>Calidad del grano y la malta</i>	10
IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO COMO NUTRIENTE MINERAL.....	11
<i>Disponibilidad y absorción del N por parte de la planta</i>	11
<i>Asimilación del N en tejido vegetal</i>	12
IMPORTANCIA DEL AZUFRE COMO NUTRIENTE MINERAL	14
<i>Disponibilidad y absorción del S por parte de la planta</i>	14
<i>Asimilación del S en tejido vegetal</i>	15
ALMACENAMIENTO DE N Y S.....	16
ALMACENAMIENTO DE AZÚCARES	17
REMOVILIZACIÓN DE ASIMILADOS.....	18
<i>Floema – Sist. de transporte a larga distancia de sust. orgánicas</i>	18
<i>Removilización de azúcares</i>	18
<i>Removilización de N y S</i>	19
EFECTOS DE LAS DEFICIENCIAS DE N Y S EN LAS PLANTAS	19
<i>Interacción entre nutrientes</i>	20
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
MATERIAL VEGETAL.....	21
CONDICIONES DE CULTIVO	21
<i>En cámara de cultivo</i>	21
<i>En invernáculo</i>	21
DISEÑO EXPERIMENTAL	21
EXTRACCIÓN DE FLOEMA	22
EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE AZUFRE TOTAL EN TEJIDO.....	22
PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	22
DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.....	23
<i>Determinación de clorofila</i>	23
<i>Determinación de proteínas</i>	23
<i>Determinación de aminoácidos totales</i>	23
<i>Determinación de azúcares solubles</i>	23

<i>Cuantificación de RUBISCO (SDS-PAGE)</i>	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	24
RESULTADOS.....	25
ENSAYO EN CÁMARA DE CULTIVO CON PLANTAS DE 19 DÍAS.....	25
ENSAYO EN INVERNÁCULO CON PLANTAS DE 75 DÍAS	25
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	34
CONCLUSIÓN.....	34
PERSPECTIVAS	34
APÉNDICE	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INTRODUCCIÓN	
Figura 1: Foto de cultivo de cebada	9
Figura 2: Esquema del Ciclo del Nitrógeno	12
Figura 3: Esquema de la absorción, asimilación y removilización de N en una planta	13
Figura 4: Esquema de las fuentes más comunes de azufre	15
Figura 5: Asimilación de S y compartimentación de la biosíntesis de cisteína.....	16
Figura 6: Esquema global de la fotosíntesis.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	
Tabla 1: Concentración de KNO ₃ y S-SO ₄ -2 presentes en las soluciones de riego.....	21
Figura 7: Procedimiento de colección de exudado floemático	22
ENSAYO EN CÁMARA DE CULTIVO CON PLANTAS DE 19 DÍAS	
Figura 8: Plantas de cebada al momento de muestrear.....	25
Figura 9: Esquema de numeración y selección de hojas muestreadas	26
Figura 10: Peso seco de la parte aérea de las plantas	26
Figura 11: Concentración de proteínas, aminoácidos, azúcares y clorofila total en las hojas fuente	27
Figura 12: Gel de poliacrilamida de la enzima Rubisco	27
Figura 13: Concentración de aminoácidos y azúcares en los exudados floemáticos	28
ENSAYO EN INVERNÁCULO CON PLANTAS DE 75 DÍAS	
Figura 14: Peso seco, número de macollos, concentración de clorofila y contenido de S total de la parte aérea de las plantas	29
Figura 15: Concentración de proteínas, aminoácidos y azúcares en las hojas fuente y destino	30
Figura 16: Gel de poliacrilamida de la enzima Rubisco	31
Figura 17: Concentración de aminoácidos y azúcares en los exudados floemáticos	31
APÉNDICE	
Tabla 2: Concentraciones de S presentes en las soluciones nutritivas y en el agua empleadas para el riego de las plantas	35

ABREVIATURAS

APS: Adenosin-5'-fosfosulfato

ATP: Adenosín trifosfato

C: Carbono

CO₂: Dióxido de carbono

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

N: Nitrógeno

NH₄⁺: Amonio

NO₂⁻: Nitrito

NO₃⁻: Nitrato

Plantas control: Plantas regadas con alta disponibilidad de N y S

Plantas N- : Plantas regadas con baja disponibilidad de N

Plantas N-/S- : Plantas regadas con baja disponibilidad de N y S

Plantas S- : Plantas regadas con baja disponibilidad de S

RUBISCO: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa

S: Azufre

SAM: S-adenosil-l-metionina

SDS-PAGE: Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SM: Subunidad mayor de Rubisco

Sm: Subunidad menor de Rubisco

SO₄⁻²: Sulfato

INTRODUCCIÓN

En la región Pampeana, la histórica falta de reposición de los nutrientes exportados con las cosechas y la erosión condujeron a una disminución en la disponibilidad de nutrientes en los suelos. En la actualidad, los nutrientes que más frecuentemente limitan la producción de cultivos de granos son el nitrógeno (N), el fósforo y el azufre (S). En el caso del N, las deficiencias se conocen desde hace décadas mientras que las deficiencias de S se han convertido en una limitante importante de la producción agrícola en diversas regiones del mundo desde hace tan sólo unos años atrás, debido principalmente a la disminución de los aportes atmosféricos de este elemento (relacionado a una menor emisión a la atmósfera desde las industrias contaminantes) y al menor uso de fertilizantes nitrogenados y fosforados conteniendo S (Schnug y Haneklaus, 1998).

El uso de fertilizantes ha sido un factor decisivo para el aumento de la producción de cereales. Sin embargo, una proporción importante de los fertilizantes aplicados, especialmente los nitrogenados, no son aprovechados por los cultivos y se pierden del sistema causando problemas en el medio ambiente. Entre ellos se destaca la contaminación de aguas subterráneas con nitratos (NO_3^-) (Rimski-Korsakov et al., 2004) y otros efectos sobre el aire y el agua superficial (Vitousek et al., 1997; Duarte et al., 2006). Estas pérdidas significan además un quebranto económico para los productores (Hirel et al., 2007). Por lo tanto, una de las metas más importantes del manejo de la nutrición mineral de los cultivos es compatibilizar la alta productividad y calidad de los granos con la preservación de los ecosistemas y la reducción de los costos de producción. A su vez, en el caso de los cereales, a este objetivo se le suma el alcanzar una regulación precisa del contenido y calidad de proteínas del grano sin detrimento del rendimiento.

Por ende, una estrategia prometedora para mejorar la calidad de los granos sin aumentar el uso de fertilizantes radicaría en el aumento de la eficiencia en el uso de los nutrientes. Para conseguir este objetivo es fundamental estudiar la regulación de la absorción y removilización de los mismos así como los factores que lo influyen. Pese a la importancia del tema, en cuanto al proceso de removilización, es poco lo que se conoce sobre su regulación a nivel fisiológico, bioquímico y genético.

IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CEBADA

Características principales

La cebada (*Hordeum vulgare L.*) es una planta monocotiledónea anual que pertenece a la familia de las gramíneas, a la cual también pertenecen otras especies como el trigo, arroz, avena, maíz y sorgo, así como también el bambú, la caña de azúcar y los pastos que se utilizan como alimento del ganado. Se cultiva principalmente en climas fríos como cosecha de primavera.



Figura 1: Cultivo de cebada.

Usos comerciales

La cebada es el quinto cultivo de cereal más importante en términos de producción mundial total (FAOSTAT 2006; <http://faostat.fao.org/site/370/default.aspx>) y su grano es el más usado para el malteado y la producción de cerveza (Lapitan et al., 2009).

La cebada cervecera se ha presentado en los últimos años como una alternativa de creciente interés como cultivo de invierno (Marinissen et al., 2009). De hecho, en los últimos diez años la superficie sembrada en Argentina se ha casi triplicado, representando el último año en la provincia de Buenos Aires un área equivalente al 23% del área destinada a trigo. Entre los factores que determinaron el aumento de la superficie sembrada con este cultivo se destacan el mayor consumo local de cerveza, una mayor demanda internacional de cebada y malta, y la menor duración del ciclo de este cultivo en comparación con otros cereales invernales (Giménez y Tomaso, 2008), lo cual permite la siembra de soja de segunda.

Además de ser importante como cultivo, es un modelo de planta establecido tanto para estudios genéticos como fisiológicos (Koorneef et al., 1997; Forster et al., 2000).

Calidad del grano y la malta

La cebada se emplea principalmente para producir malta, la principal materia prima en la fabricación de cerveza. Durante el proceso de malteado los granos de cebada son germinados bajo condiciones estrictamente controladas, para que se sinteticen y/o induzcan las enzimas hidrolíticas necesarias para convertir los componentes de alto peso molecular del grano (azúcares y proteínas de almacenamiento) a biopolímeros más pequeños que luego serán requeridos en la última etapa de la fabricación de cerveza (la fermentación) por parte de las levaduras para producir alcohol (Lapitan, 2009). La actividad hidrolítica comienza durante el proceso de malteado pero ocurre principalmente durante la maceración (primer paso de la fabricación de cerveza) generando un extracto azucarado denominado extracto de malta.

Las determinaciones de calidad de malta son costosas y lentas, por ello en la comercialización se utilizan ciertas características del grano de cebada que se correlacionan con la calidad maltera, principalmente el contenido de N o proteínas y el calibre (tamaño de los granos), relacionado con el contenido de azúcares del grano. La industria maltera y cervecera requieren valores de proteínas entre 10 y 12% ya que valores excesivamente bajos limitan el crecimiento de las levaduras encargadas de la fermentación durante el proceso de producción de cerveza. Por otra parte, contenidos proteicos excesivamente altos disminuyen el rendimiento de la malta en la cervecería (el cual se mide como densidad de extracto de malta) y generan problemas de turbidez en la cerveza (Bishop, 1930; Briggs et al., 2004; García del Moral et al., 1998). En este caso, la fertilización nitrogenada puede generar efectos negativos en la calidad de la malta ya que determina incrementos en el contenido proteico y disminuciones en el extracto de la misma (Eagles et al., 1995; Pomeranz et al., 1976; Zhao et al., 2006).

Sin embargo, el contenido proteico de los granos no permite explicar toda la variación existente en el extracto de malta cuando se comparan distintos ambientes y cultivares (Howard et al., 1996). Por ello, además de la concentración, se ha postulado que el tipo de proteínas también influye en la calidad de los granos y, aunque el rol de las diferentes subunidades de hordeínas (proteínas de reserva) no es todavía claro, se sabe que afectan la calidad del extracto de malta (Brennan et al. 1998; Howard et al. 1996; Molina Cano et al., 2000; 2002; Peltonen et al., 1994); esto se debe a que dichas hordeínas se asocian fuertemente con los gránulos de almidón inhibiendo su hidrólisis durante la maceración (Slack et al., 1979). Por otro lado, existen antecedentes en la bibliografía que indican que las diferentes fracciones de hordeínas (B, C, D y Gamma (γ)) (Shewry y Tatham, 1990) y sus proporciones relativas impactan diferencialmente sobre la calidad de la malta (Simic et al., 2007; Molina Cano et al., 2000; Howard et al., 1996; Peton, 2010). Dado que estas fracciones poseen diferente contenido de S (las fracciones B y γ son ricas en S mientras que la fracción C es pobre en este elemento), las variaciones tanto en la disponibilidad de N como en la de S repercuten sobre la cantidad final de cada fracción y por lo tanto sobre la calidad del extracto de malta.

IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO COMO NUTRIENTE MINERAL

El N es un componente esencial de la mayoría de las moléculas biológicas, como los aminoácidos y los nucleótidos, y es cuantitativamente el nutriente mineral que en mayor medida requieren las plantas. Esto se debe a que este macronutriente tiene un papel primordial en el rendimiento de los cultivos ya que interviene en la formación de tejidos verdes, en el establecimiento de los macollos y en la generación del área foliar. Estos parámetros a su vez determinan la acumulación de biomasa y el crecimiento de los cultivos gracias a la cantidad de radiación solar interceptada y a la eficiencia con que dicha radiación es utilizada (Monteith, 1977).

Disponibilidad y absorción del N por parte de la planta

El N se encuentra ampliamente distribuido en la tierra bajo diversas formas (en rocas primarias, atmósfera, suelo y organismos vivos), y aunque aproximadamente el 78% del volumen de la atmósfera terrestre está formada por N, éste constituye menos del 2% de la masa total del N terrestre (Paul y Clark, 1989), y solamente el 0,01% se encuentra en la biosfera como componente de los organismos vivos.

Todos los compuestos nitrogenados que se encuentran en la naturaleza son constantemente transformados en diferentes formas químicas, constituyendo el denominado Ciclo del Nitrógeno (**Figura 2**). Las principales fuentes de N para el suelo son: los restos vegetales y animales, los fertilizantes industriales, las sales de amonio y los NO_3^- incorporados por las precipitaciones y la reducción del N atmosférico realizada por bacterias de vida libre o en simbiosis con ciertas plantas, como las leguminosas, en el denominado proceso de fijación biológica del N (Haynes, 1986).

La mayor proporción del N del suelo (98% del total) se encuentra en la fracción estable de la materia orgánica del mismo (humus). En cada estación de crecimiento solo una pequeña fracción de la reserva del N del suelo (~3%) es mineralizada hasta compuestos inorgánicos como amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) o nitrito (NO_2^-). De ese N mineralizado, la mayor parte es soluble en agua (NO_3^-) y se desplaza por fenómenos de lixiviación a horizontes no alcanzados por las raíces, en tanto que el NH_4^+ puede quedar fuertemente retenido por adsorción en el complejo humus - arcilla o fijado entre las láminas de arcilla, siendo también inaccesible. Otro proceso de pérdida de N para el sistema productivo es la denitrificación que ocurre por vía biológica y consiste en la respiración anaerobia de substratos orgánicos, usando NO_3^- como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria y liberando nitrógeno elemental (N_2) y óxido nitroso (N_2O) a la atmósfera (**Figura 2**) (Powlson, 1993). Por lo tanto, en el suelo se encuentra una gran heterogeneidad en cuanto a la distribución de los distintos compuestos nitrogenados variando su proporción en el espacio con los cambios estacionales asociados con la actividad microbiana y de las plantas (Paul y Clark, 1989). A pesar de la variedad de N existente en el suelo la fuente más importante de este nutriente para muchos cultivos es el NO_3^- .

Para acceder a este N disponible las plantas han desarrollado sistemas de absorción de compuestos nitrogenados de alta eficiencia en las células de la raíz. Además, debido a la existencia de una amplia variación en las concentraciones de N en el suelo, éstas cuentan con mecanismos para regular la actividad de estos sistemas de absorción (Zhang et al., 2007). La absorción del NO_3^- depende básicamente de la concentración del NO_3^- en el suelo, del volumen del suelo explotado y de la densidad de las raíces, así como de la eficiencia de absorción de NO_3^- por parte de las mismas. A su vez, dicha eficiencia se encuentra afectada tanto por la demanda metabólica como por las condiciones ambientales, tales como la intensidad de luz, la temperatura de la raíz y condiciones de estrés (Lawlor, 2002).

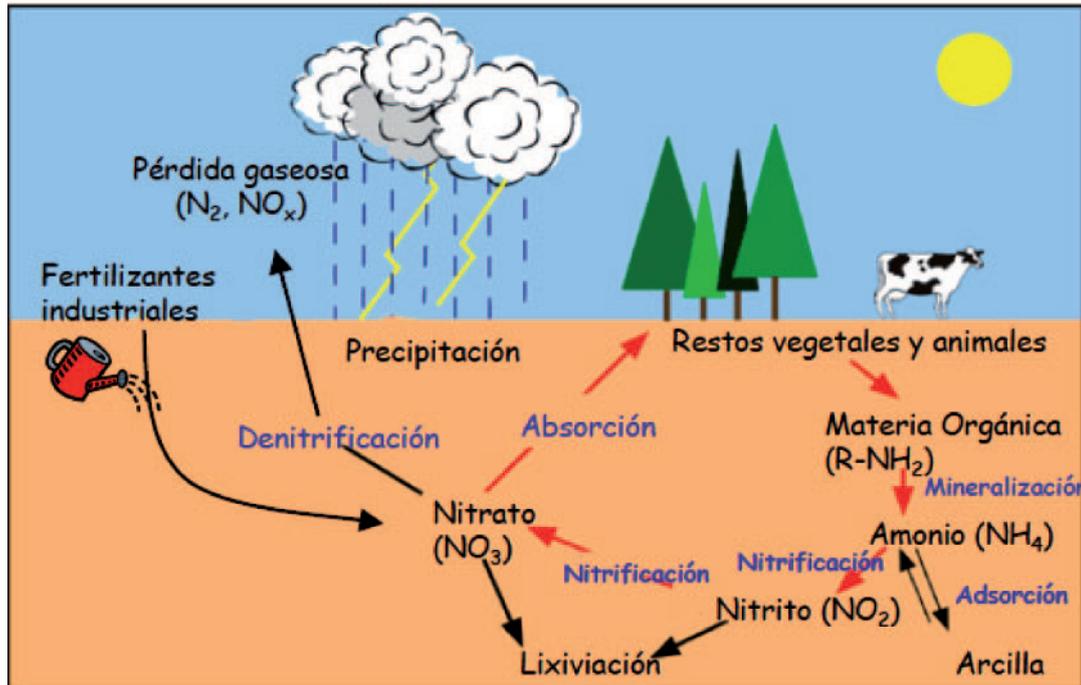


Figura 2: Esquema del Ciclo del Nitrógeno. Abreviaturas: N_2 , nitrógeno elemental; NO_x , óxidos de nitrógeno (Criado, 2009).

Asimilación del N en tejido vegetal

Dependiendo de la especie de planta y su estado fisiológico, el NO_3^- absorbido puede ser almacenado o asimilado tanto en raíces como en hojas (Marschner, 1995; Lexa y Chesman, 1999). En las plantas monocárpicas, como la cebada y el trigo, este N absorbido es asimilado principalmente en las células del mesófilo de las hojas maduras, denominadas “fuente”.

Este proceso involucra dos reacciones catalizadas por enzimas diferentes. En primer lugar, la nitrato reductasa (NR) cataliza la reducción de NO_3^- a NO_2^- en el citosol. El NO_2^- , como es tóxico, es rápidamente transportado a los plástidos (cloroplastos en hojas) donde la enzima nitrito reductasa (NiR) lo reduce a NH_4^+ (Figura 3).

El NH_4^+ , además de poder ser absorbido directamente del suelo, está continuamente siendo generado por una variedad de procesos anabólicos y catabólicos en las hojas, como la fotorrespiración, reducción de NO_3^- , degradación de proteínas y biosíntesis de lignina. Dado que también se trata de un compuesto capaz de causar toxicidad, no se acumula en los tejidos y es rápidamente incorporado a compuestos orgánicos. El principal mecanismo de asimilación de NH_4^+ se da por medio de la enzima glutamina sintetasa (GS) que combina ácido glutámico y NH_4^+ para formar glutamina. Las plantas contienen dos clases de isoenzimas, una en el citosol y la otra en los plástidos de la raíz o en los cloroplastos de las hojas. Luego, la enzima glutamato sintasa (Fd-GOGAT o NAD(P)H-GOGAT), ubicada en los plástidos, transfiere el grupo amida de la glutamina a un α -cetoglutarato produciendo 2 moléculas de glutamato. Finalmente la enzima glutamato dehidrogenasa (GDH) cataliza la deaminación del glutamato o su formación a partir de α -cetoglutarato, participando principalmente en la detoxificación del NH_4^+ producido por la fotorrespiración. Esta enzima presenta básicamente dos formas: una que se encuentra en las mitocondrias, y otra que se localiza en los cloroplastos de los órganos fotosintéticos.

Luego, a partir de los aminoácidos inicialmente sintetizados, se forman el resto de los aminoácidos por reacciones de transaminación, los que junto con las aminas constituyen los primeros productos estables de la asimilación del N. Las enzimas que catalizan estas reacciones son conocidas como transaminasas. Estas enzimas se encuentran en el citoplasma, los cloroplastos, las mitocondrias, los glioxisomas y peroxisomas (Figura 3) (Taiz y Zeiger, 1998).

Finalmente, los aminoácidos sintetizados pueden ser utilizados tanto para la síntesis de proteínas, ser almacenados en las células del mesófilo (principalmente en las vacuolas) o ser transportados vía floema a los órganos en desarrollo (tejidos destino).

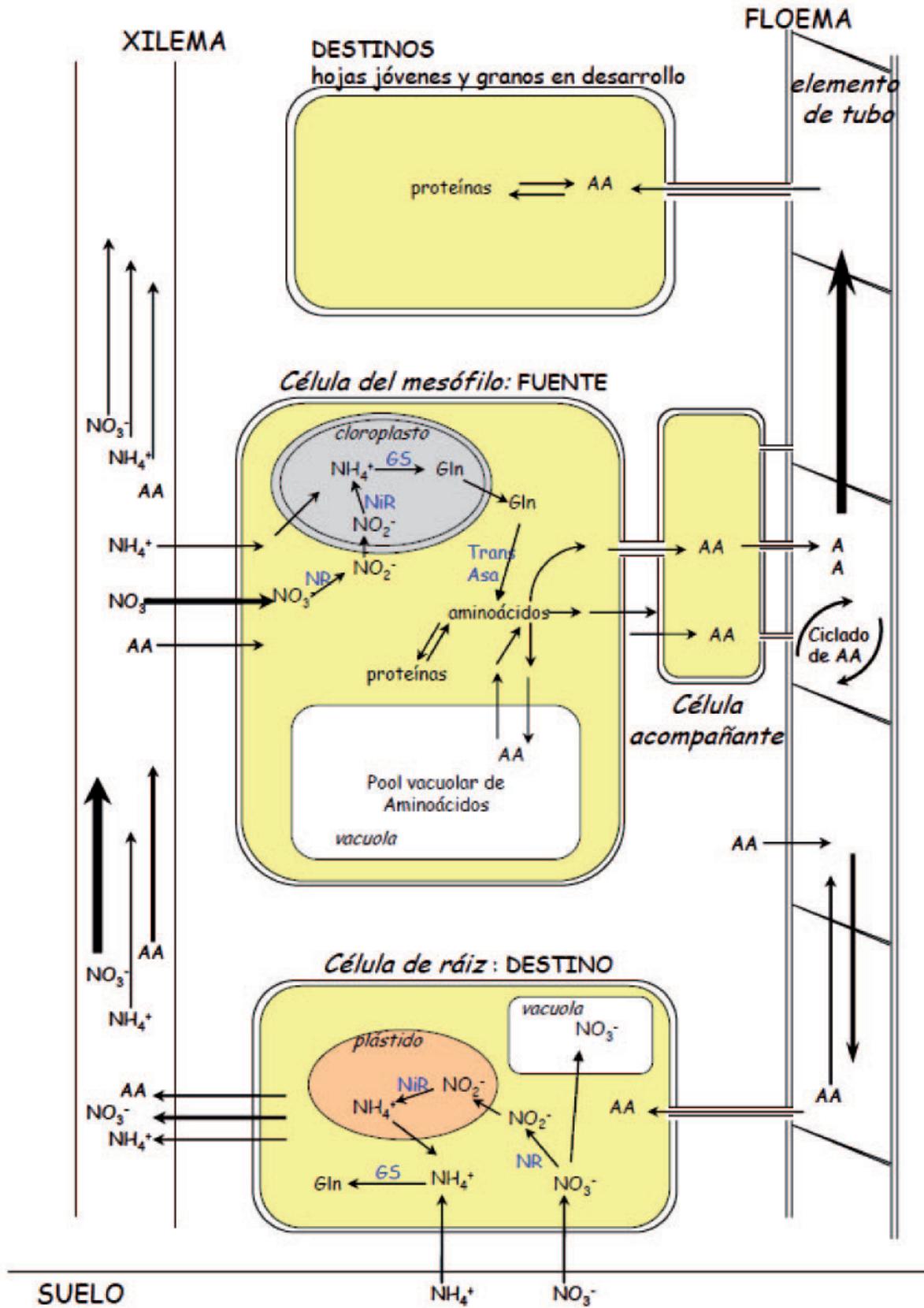


Figura 3: Esquema de la absorción, asimilación y removilización de N en una planta. Abreviaturas: AA, aminoácidos; Gln, glutamina, NR, nitrato reductasa; NiR, nitrito reductasa; GS, glutamina sintetasa; TransAsa, Transaminasa (Caputo, 2001).

IMPORTANCIA DEL AZUFRE COMO NUTRIENTE MINERAL

El S constituye un elemento esencial en la nutrición de las plantas y es requerido por éstas en proporciones casi iguales al fósforo (Tisdale, 1990). Este nutriente, además de intervenir en la síntesis de aminoácidos azufrados (cistina, cisteína y metionina), interviene en la síntesis de glutatión, coenzima A, aceites glucósidos, en la formación de puentes disulfuros asociados con las características estructurales de las proteínas, etc.

Además de estas funciones estructurales, el S es un constituyente esencial en la actividad enzimática; se sabe que aproximadamente un 40% de las enzimas (entre ellas ferredoxinas, nitrogenasas, etc.) dependen para su actividad catalítica de la presencia de grupos sulfidrilos (SH). Dichos grupos proporcionan sitios de unión para metales tóxicos o fisiológicamente importantes y se ven involucrados en numerosas reacciones redox debido a su relativa facilidad de oxidación (Benavides, 1998). A su vez el compuesto azufrado conocido como SAM (S-adenosil-l-metionina), agente metilante más importante conocido en todos los organismos, interviene en reacciones de transmetilación claves para la regulación de la expresión génica y la actividad de diversas enzimas (Scott y Eagleson, 1988).

El S también tiene importancia en la formación del cluster sulfuro-hierro del aparato fotosintético y en el sistema de transporte de electrones (Lunde, 2008), interviniendo así en la asimilación del CO₂ por parte de las plantas y en la captura de la energía lumínica necesaria para realizar la fotosíntesis.

Disponibilidad y absorción del S por parte de la planta

El S es uno de los elementos más abundantes sobre la Tierra; en forma natural se encuentra en una mezcla de los cuatro isótopos (³²S, ³³S, ³⁴S y ³⁵S) (Huxtable, 1986; Wainwright, 1984; citados en Benavides 1998). Este elemento se encuentra en estados de oxidación que van desde +6 hasta -2, siendo el sulfato (SO₄⁻²) el más comúnmente utilizado por las plantas como fuente de S del suelo, el cual, en el humus, está en proporciones inferiores al 1%.

El S se encuentra distribuido en la atmósfera, los océanos y los suelos y generalmente es incorporado a estos últimos como impurezas en los fertilizantes, herbicidas y fungicidas. El S que se volatiliza desde los suelos o que son emanados por erupciones volcánicas en forma de dióxido de azufre (SO₂) o ácido sulfhídrico (H₂S), así como los provenientes de procesos biológicos, es regresado a los mismos por medio de las precipitaciones en la forma de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (**Figura 4**).

Si no se toma en cuenta la absorción de SO₂ de la atmósfera, actividad que puede representar un aporte importante de S para muchas plantas (Wainwright, 1984; Rennenberg, 1984), la mayor parte del S es absorbido en forma de SO₄⁻² por las raíces mediante un proceso metabólico mediado por proteínas transportadoras. Los transportadores de SO₄⁻² tienen roles específicos, como la absorción de alta afinidad en las raíces, translocación en los tejidos vasculares y transferencia de célula a célula en hojas y semillas. A su vez algunos miembros de la familia de estos tipos de transportadores tienen localizaciones subcelulares específicas en los plástidos o membranas de los tonoplastos. Debido a sus expresiones diferenciales, estos transportadores contribuyen al control de los flujos de SO₄⁻² en la planta a lo largo del desarrollo de la misma y cumplen un rol importante en la administración del S en toda la planta, estando sujetos a un control negativo de su actividad por medio del monitoreo de la concentración intracelular de SO₄⁻² y de los productos del metabolismo del S (Hesse, 2004; Rennenberg, 1984).

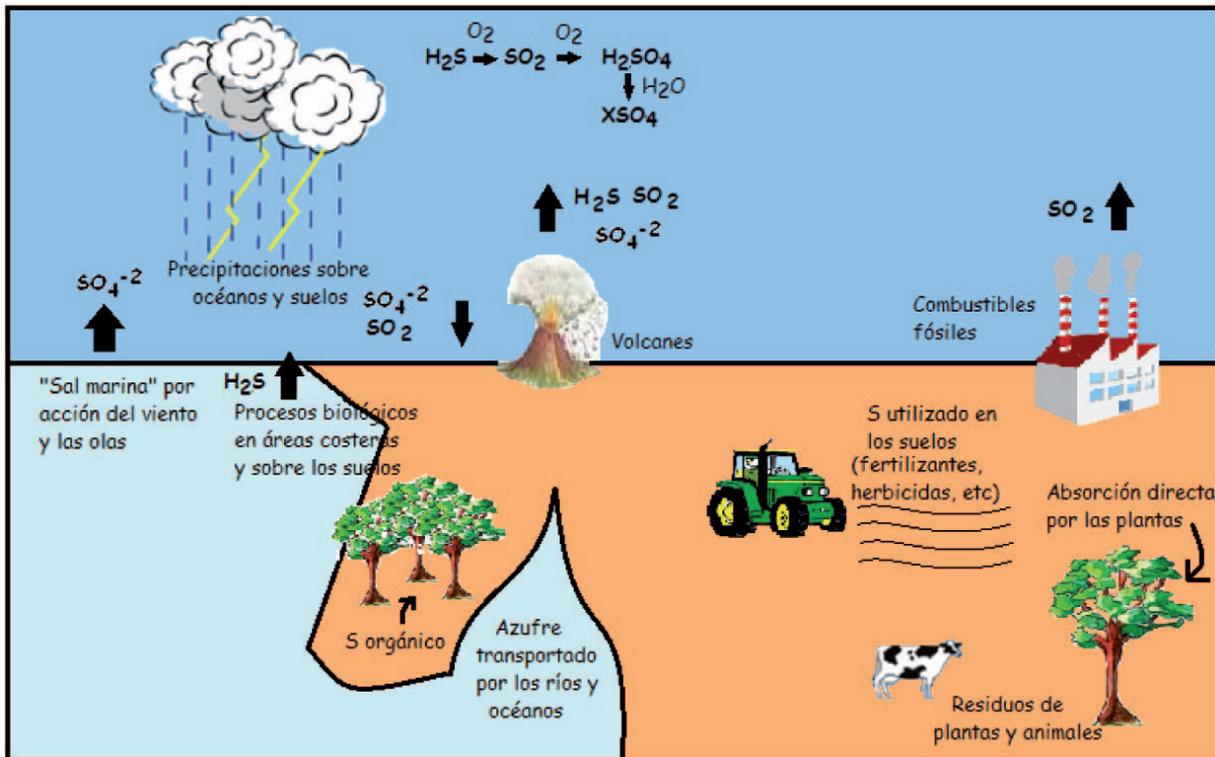


Figura 4: Esquema de las fuentes más comunes de azufre. Abreviaturas: SO_4^{2-} , sulfato; H_2S , ácido sulfhídrico; SO_2 , dióxido de azufre; H_2SO_4 , ácido sulfúrico; O_2 , oxígeno; H_2O , agua; XSO_4 , sal de sulfato.

Asimilación del S en tejido vegetal

Los cloroplastos de las células fotosintéticas constituyen el sitio más importante para la asimilación reductiva del SO_4^{2-} en cisteína (Benavides, 1998). La cisteína es la primer molécula sintetizada en el metabolismo de las plantas que contiene tanto S como N. Este aminoácido azufrado es requerido para la producción de una abundante cantidad de metabolitos claves en diversos caminos metabólicos (Hesse, 2004).

La formación de este aminoácido es el resultado de sucesivos pasos comenzando con la absorción de SO_4^{2-} por los respectivos transportadores, la activación de dicho SO_4^{2-} por unión covalente con ATP en una reacción catalizada por ATP-sulfurilasa para formar APS, su reducción a sulfito (SO_3^{2-}) por la APS-reductasa (APR) y finalmente la reducción del SO_3^{2-} a sulfuro (S^{2-}) por la sulfito reductasa. El sulfuro es entonces transferido a una serina activada por la cisteína sintasa (OASTL, también llamada O-acetilserin(thiol)liasa) para formar cisteína (**Figura 5**). La serina activada, O-acetilserina (OAS), es sintetizada por la serina acetiltransferasa (SAT) la cual forma un complejo con la cisteína sintasa.

A continuación la cisteína sintetizada es incorporada a proteínas y glutatión (GSH), a su vez la cisteína actúa como un dador de sulfuro para la síntesis de metionina y, subsecuentemente, para S-adenosilmetionina y S-metilmetionina (Hesse, 2004).

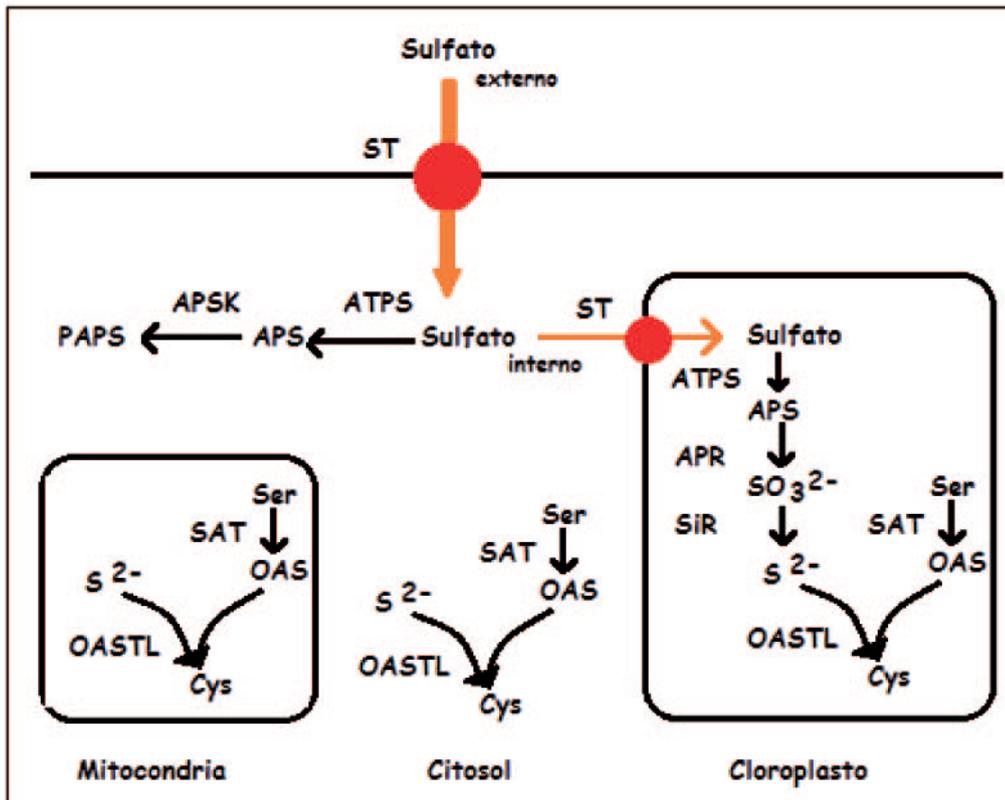


Figura 5: Asimilación de S y compartimentación de la biosíntesis de cisteína. Abreviaturas: OAS, serina activa; Ser, serina; Cys, cisteína; ST, transportador de sulfato; ATPS, ATP sulfurilasa; APSK, APS kinasa; APR, APS reductasa; SiR, sulfito reductasa; OASTL, O-acetilserin(thiol)liasa; SAT, serina acetiltransferasa; APS, adenosin-5'-fosfosulfato; PAPS, fosfoadenosin-fosfosulfato; SO_3^{2-} , sulfito; S^{2-} , sulfuro. (Hesse, 2004).

ALMACENAMIENTO DE N Y S

Cuando la disponibilidad de N en el suelo excede los requerimientos de la planta, éste puede ser almacenado principalmente en forma de NO_3^- , aminoácidos (especialmente arginina, glutamina y asparagina) o proteínas. Sin embargo el NO_3^- juega un papel transitorio en el almacenamiento de N, respondiendo al suplemento y a la demanda del mismo (Heilmeier y Monson, 1994). Muchas plantas pueden tener grandes cantidades de aminoácidos y amidas libres en sus tejidos vegetativos (Millard, 1988), variando mucho su concentración en los tejidos vegetales con diferentes fuentes y regímenes de N. Un alto suministro de N aumenta la concentración total de aminoácidos libres en las hojas de varias especies (Haynes y Goh, 1978; Darrak y Wareing, 1981; Barneix et al., 1984; Heilmeier y Monson, 1994), y existe una rápida respuesta a los cambios en el suministro de N (Barneix et al., 1984). Por otra parte el S también puede ser almacenado como aminoácidos y proteínas, aunque el exceso de S asimilado en aminoácidos y sus precursores reprimen la absorción y asimilación del S tanto cuando el S está en exceso como cuando el N es limitante (Zhao, 1999 citado en Hesse 2004).

El almacenamiento de N y S en las hojas en forma de proteínas ofrece ventajas comparativas con respecto al NO_3^- , SO_4^{2-} o los aminoácidos, tales como la maximización de la ganancia de C por las altas cantidades de Rubisco (la cual representa alrededor del 50% del total de las proteínas solubles de las hojas en las plantas C3). Esto se debe a que dicha proteína no sólo es una fuente importante de N y S durante la senescencia (Millard, 1988; Gilbert, 1997; Gan y Amasino, 1997) sino que además se encuentra disponible en grandes cantidades para la síntesis de azúcares cuando la planta lo demandase. Además, esta forma de almacenamiento de nutrientes es ventajosa en el caso del S debido al umbral límite de acumulación de aminoácidos azufrados existente.

ALMACENAMIENTO DE AZÚCARES

A través de la fotosíntesis los vegetales sintetizan todas las moléculas orgánicas básicas que necesitan para vivir, prosperar y reproducirse. Esta función específica de las plantas (así como también de algunas algas y bacterias fotosintéticas) se basa en la utilización de la energía lumínica para la conversión del CO_2 y el agua en azúcares (como la glucosa, sacarosa, almidón, fructano, etc.) mediante una serie de reacciones dependiente de la luz y otra independiente (ciclo de Calvin) (**Figura 6**).

Existen dos grandes protagonistas en la fotosíntesis: por un lado la clorofila, pigmento unido a las membranas tilacoides de los cloroplastos implicada directamente en las reacciones lumínicas y que absorbe los fotones de las porciones roja y azul del espectro visible, transmitiendo fotones de la porción verde. Por otro lado la enzima Rubisco, proteína más abundante en la Tierra que fija el C en el ciclo de Calvin actuando como carboxilasa (enzima que añade C del CO_2 a otra molécula) pero que a su vez puede funcionar como oxigenasa (enzima que añade oxígeno a otra molécula) (Nabors 2006).

Los productos de la fotosíntesis son usados para sintetizar almidón en los cloroplastos y sacarosa en el citoplasma. Una parte de estos productos es utilizada por las hojas para su mantenimiento y crecimiento mientras que el resto se exporta hacia otros lugares de la planta donde se utilizan o se almacenan.

Todos los órganos fotosintéticos contienen uno o más pools de reserva diurno de azúcares. Las reservas proveen los sustratos necesarios para mantener nutrientes de fuentes carbonadas a los granos durante el período de oscuridad y durante la última etapa del llenado del grano, cuando el aparato fotosintético está senesciendo. En cereales se ha comprobado que el tallo constituye un lugar de almacenamiento temporal de azúcares que son enviados a la espiga durante el periodo de llenado del grano. El almacenamiento diurno de sacarosa parece ser mucho más importante que el almacenamiento transiente de almidón, siendo este azúcar el predominante en la corriente del floema. Aunque son poco los trabajos que indican que los pools de fructano sirven como una fuente neta de C durante el período de oscuridad, el fructano es la reserva de carbohidratos más importante a largo término en tejidos vegetativos (revisado por Schnyder, 1993).

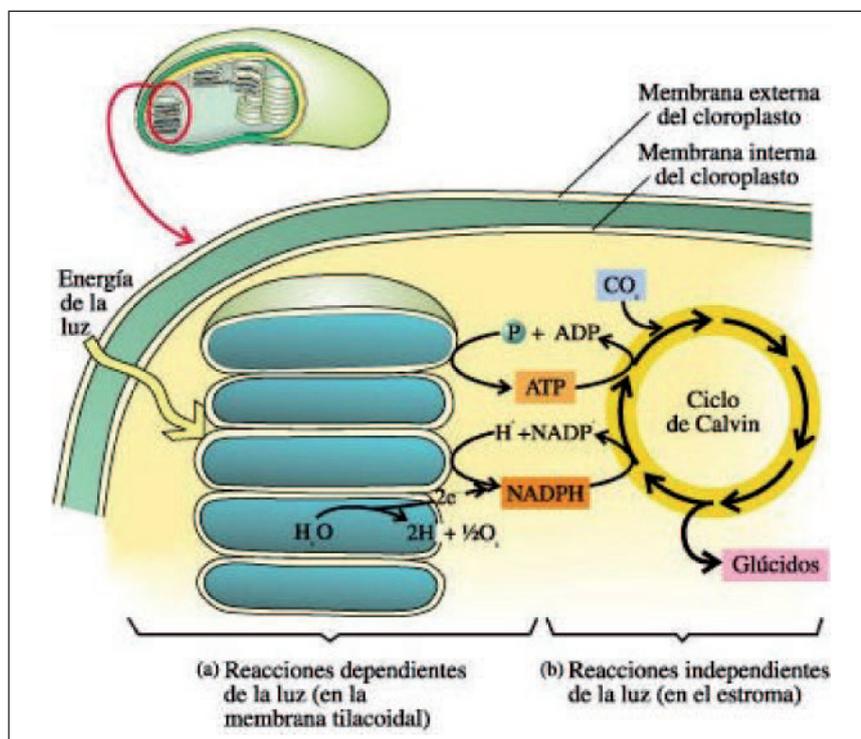


Figura 6: Esquema global de la fotosíntesis. Abreviaturas: H_2O , agua; H, hidrógeno; O_2 , oxígeno; P, fósforo; CO_2 , dióxido de carbono; ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosín difosfato; NADP^+ , forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADPH, forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; e⁻, electrón. (Curtis, 6^o edición, 2000)

REMOVILIZACIÓN DE ASIMILADOS

Para promover el desarrollo de los tejidos destino (por ejemplo para la síntesis de proteínas en el grano en desarrollo) una porción importante de los productos asimilados en los tejidos fuente son removilizados. De estos, el principal compuesto exportado es la sacarosa (principal fuente de C) y luego se encuentran los aminoácidos (principales fuente de N y S orgánicos). Por ende estos compuestos pueden provenir de dos vías, 1) de aquellos recientemente absorbidos y/o asimilados ó 2) de la removilización de los mismos previamente asimilados y almacenados en pools de reserva en los tejidos vegetativos. (Hawkesford y De Kok, 2006; Hirel et al., 2007). Para ello las plantas vasculares tienen un mecanismo complejo que regula la cantidad de metabolitos que se exportan desde los tejidos fuente hacia los tejidos destino.

Floema – Sistema de transporte a larga distancia de sustancias orgánicas

El tejido encargado del transporte a larga distancia de los metabolitos orgánicos producidos por la planta, principalmente aminoácidos y azúcares, es el floema, el cual está formado por dos tipos celulares relacionados: los elementos cribosos y las células acompañantes.

Los elementos cribosos son células altamente modificadas que durante la maduración pierden el núcleo y las mitocondrias y que poseen abundantes perforaciones en las paredes celulares en las zonas donde se unen a otros elementos cribosos para formar conductos conocidos como tubos cribosos por donde viajan los metabolitos. Las células acompañantes, que se caracterizan por tener un protoplasma denso, núcleo y numerosas mitocondrias, se encuentran conectadas a los elementos cribosos por un conjunto de plasmodesmos de tal forma que la funcionalidad metabólica de dichos elementos depende de los procesos que ocurren en las células acompañantes (Nabors, 2006).

En el floema, los metabolitos sintetizados en las hojas son concentrados para luego ser liberados de manera controlada en los tejidos destino. Ambos procesos son afectados por factores ambientales, bioquímicos, fisiológicos y de desarrollo que en conjunto determinan la cantidad de metabolitos que pueden ser descargados en los tejidos destino.

El proceso de carga y descarga en el floema involucra gran cantidad de proteínas transportadoras de iones, agua, azúcares y aminoácidos en la membrana. Tanto en la carga como en la descarga del floema existen mecanismos apoplásticos, simplásticos o su combinación (Tofiño, 2007). El transporte simplástico se basa en la comunicación entre el complejo tubo criboso-célula acompañante y las células del mesófilo vecinas a través de la red interconectada de protoplastos (plasmodesmos). Este transporte es más común en los vegetales de climas cálidos. Por otra parte el transporte apoplástico es más común en los vegetales de climas templados o fríos, y se basa en el pasaje de moléculas a través del conjunto de espacios intercelulares y las paredes que forman el espacio circundante fuera de los protoplastos. Con frecuencia estos vegetales almacenan azúcares en las paredes celulares de las células cercanas al floema. Las células anexas absorben los azúcares y los pasan a los elementos de los tubos cribosos a través de los plasmodesmos (Nabors, 2006).

Removilización de azúcares

Determinadas porciones de C se asignan para proveer las necesidades del metabolismo inmediato de la hoja y para satisfacer la demanda metabólica durante el ciclo de 24 horas. Las reservas foliares son, en consecuencia, accesibles para ser reasignadas y exportadas en las noches o durante los periodos de estrés cuando la fotosíntesis es muy baja. Cerca de la mitad del C recién asimilado se exporta inmediatamente de la hoja vía floema; la otra mitad es almacenada transitoriamente como almidón en el cloroplasto (Tofiño, 2007).

Durante el periodo de llenado del grano la espiga se convierte en el sumidero de los fotoasimilados y la removilización de azúcares se torna más importante. Los carbohidratos almacenados en pre-anteses son cruciales para el rendimiento del grano. En trigo se ha demostrado que el balance entre fuente y sumidero influye en la removilización de los azúcares almacenados (González, 2008).

En la tasa de exportación de sacarosa influye el balance entre síntesis de sacarosa y almidón durante el día y la eficiencia degradativa nocturna del almidón. Además, la concentración de sacarosa desempeña un papel central en la distribución del CO_2 asimilado, a través de la regulación de la expresión de genes asociados con la síntesis del almidón o fructano (Tofiño, 2007).

Removilización de N y S

Los procesos de removilización de las reservas de N y S dentro de la planta varían de una especie a otra y pueden ser influenciados por la disponibilidad de estos dos nutrientes en el suelo en los distintos períodos del desarrollo de las plantas, por el momento de la aplicación del fertilizante y por condiciones ambientales como la luz o estreses bióticos y abióticos. Por ejemplo, en condiciones de alta disponibilidad de N y/o S después de la floración, éstos llegan al grano principalmente vía xilema en forma de NO_3^- (Marschner, 1995) y SO_4^{2-} (Anderson, 2005), respectivamente. En consecuencia, una importante proporción del N y S presente en los órganos vegetativos no es aprovechada y se pierde en los restos vegetales. Pero cuando la concentración en el suelo es baja, el proceso de removilización vía floema cobra importancia. Entonces el N llega al grano principalmente como glutamina y glutamato (Raymond y Hanson, 1979) mientras que el S lo hace como S-metil metionina (Bourgis et al. 1999) y glutatión (Rennenberg, et al 1979). En estos casos la eficiencia de dicha etapa de removilización se convierte en el factor principal en la determinación de la concentración final de proteínas en el grano (Dalling, 1985; Fitzgerald et al., 2001; Barneix, et al., 1992), a la vez que influye sobre la calidad de las mismas y por ende, sobre la calidad maltera y cervecera de los granos (Savin et al., 2006).

EFFECTOS DE LAS DEFICIENCIAS DE N Y S EN LAS PLANTAS

Como se mencionó anteriormente, el N y el S son elementos esenciales para el normal desarrollo de las plantas. Debido a que ambos nutrientes tienen una movilidad diferente dentro de la planta los síntomas provocados por sus deficiencias se evidencian en distintos estratos de la misma. En el caso del N, por tratarse de un nutriente muy móvil, la sintomatología de deficiencia comienza a visualizarse en las hojas inferiores y posteriormente se extiende hacia las hojas jóvenes. Ésta se manifiesta con clorosis y necrosis en las hojas, es decir que las mismas se tornan de color más claro (verde pálido a amarillo) hasta que terminan por caerse; esto se debe a una disminución en la formación de clorofila y de la actividad enzimática. Por otro lado, los síntomas de las deficiencias de S se visualizan primero en las hojas jóvenes, por tratarse de un nutriente escasamente móvil en el floema. Al igual que ocurre frente a deficiencias de N, la deficiencia de S provoca la aparición de hojas uniformemente amarillas o verdes pálidas por el declive del contenido de clorofila para finalmente presentarse totalmente amarillas (Ferraris, 2007). Por ejemplo, en arroz Lunde et al. (2008) demostraron que bajo deficiencias de S el aparato fotosintético es severamente afectado debido a una reducción en el contenido de clorofila y de la enzima Rubisco. Del mismo modo, Gilbert et al. (1997) al examinar la relación entre la concentración y la actividad de Rubisco en hojas de diferentes estadios de desarrollo de plantas de trigo, durante un episodio de privación de S, pudieron determinar el temprano impacto de este estrés nutricional en la fotosíntesis y en la actividad de Rubisco en hojas jóvenes en expansión, remarcando la necesidad de los cereales de tener un suplemento continuo de S externo.

Además del efecto sobre la actividad fotosintética, el principal efecto que se le atribuye a la deficiencia de N es el retardo en el crecimiento de la planta asociado a la dificultad en la síntesis de proteínas. Por otra parte, la disponibilidad del S influye sobre la composición general de las proteínas (Ferraris, 2007, Luo 2000). En el caso del trigo, se sabe que las fuentes escasas de N afectan el rendimiento y la calidad del grano (Howarth, 2008), mientras que la baja disponibilidad de S tiene un efecto sobre los niveles de glutatión en el endosperma y la proporción en que esta proteína de reserva se encuentra con respecto a otras proteínas de almacenamiento del grano, teniendo en consecuencia efectos sobre el producto final obtenido a partir de dichos granos, como el caso de la elasticidad y la calidad de la masa (Howarth, 2008). Del mismo modo, el limitado suministro de S en cultivos de trigo repercute en la firmeza y estabilidad de la masa durante el proceso de panificación debido a la menor proporción de aminoácidos azufrados esenciales que forman puentes disulfuro (Ferraris, 2007).

A su vez deficiencias prolongadas de S estimulan la acumulación de glutamina, arginina y asparagina como fuente de reserva del N, probablemente debido a una limitación en la síntesis de proteínas bajo este estrés nutricional, al mismo tiempo estas limitaciones en el suministro de S producen una reducción de los niveles de aminoácidos azufrados como la cisteína y metionina (Hesse, 2004).

Finalmente, como se mencionó en la sección de calidad del grano y la malta, las proporciones en las que se encuentran las diferentes fracciones de hordeínas están influenciadas por la disponibilidad de N y de S, repercutiendo sobre la calidad maltera. En observaciones previas del grupo de trabajo se observó que el contenido de hordeínas global aumentó con la fertilización nitrogenada y azufrada. En cuanto al análisis de cada fracción de hordeínas se observó que la proporción de hordeínas B (ricas en S) disminuyó con la fertilización nitrogenada y aumentó con la fertilización azufrada, mientras que la proporción de hordeínas C (pobres en S) aumentó con la fertilización nitrogenada. Además dicha fertilización nitrogenada no afectó la proporción de hordeínas D (de alto peso molecular) pero la fertilización azufrada disminuyó la proporción de este último tipo de hordeínas (Petón, RAFV 2010).

Interacción entre nutrientes

En las plantas se ha encontrado una estrecha relación entre el estado nutricional del N y del S (Rendig et al., 1976; Reuveny et al., 1980). El metabolismo de estos dos nutrientes minerales se ve modificado por las disponibilidades tanto de N como de S, debido a que ambas se encuentran íntimamente interrelacionados (Koprivova y Rennenberg, 2004). En *Arabidopsis* se observó que una deficiencia de S no sólo conlleva un cambio en el metabolismo del S sino también del N (Dubousset et al 2009). A su vez Nikiforova et al. (2004, 2005) observaron una significativa disrupción del metabolismo del N en respuesta a la deficiencia de S dando lugar a una acumulación de NO_3^- , serina, triptófano y O-acetilserina (OAS), mientras que el contenido de cisteína, S-adenosil-l-metionina (SAM) y glutatión decreció frente a esta deficiencia. Por otro lado, Sunarpi y Anderson (1997) observaron que bajos niveles de N promueven la pérdida de S de las hojas maduras en beneficio de las hojas en crecimiento, mientras que altos niveles de NO_3^- inhiben este proceso. En consecuencia, la removilización del S desde las proteínas no ocurre ante una deficiencia de S a menos que también la planta sufra de deficiencia de N (Sunarpi y Anderson, 1997). Estos datos sugieren que la disponibilidad de N debe ser tenida en cuenta a la hora de monitorear la respuesta de las plantas ante una deficiencia de S y viceversa. Estas interacciones mutuas se deben básicamente a las similitudes en el comportamiento de estos nutrientes en el suelo y en el cultivo y por el hecho de que ambos intervienen en procesos fisiológicos comunes (Ferraris, 2007).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos

Objetivo general

Comprender los mecanismos internos que determinan en los cereales la eficiencia de la removilización de nutrientes desde los tejidos fuente hacia los destino y determinar el modo en que los factores externos regulan estos procesos.

Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de la deficiencia de S sobre la removilización de aminoácidos y azúcares vía floema en plantas de cebada.
- Analizar si el status de N de las plantas interfiere en la respuesta a la deficiencia de S.

Hipótesis

- La deficiencia de S inhibirá el transporte de aminoácidos y azúcares vía floema al generar una reducción de los niveles de aminoácidos en las hojas y una disminución en la capacidad fotosintética de la planta.

- Dado que se ha observado que la removilización del S se encuentra acoplada a aquella del N, la disminución en la disponibilidad de N provocará un aumento de la tolerancia de las plantas frente a la deficiencia de S.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas de cebada (*Hordeum vulgare L.*) de la variedad Scarlett. Para ello se germinaron semillas en papel de filtro húmedo durante 48 horas a 25°C en oscuridad para fomentar el desarrollo de las raíces.

CONDICIONES DE CULTIVO

En cámara de cultivo

Las plántulas fueron sembradas en macetas de 350 cm³, utilizando vermiculita como sustrato, a razón de 5 plantas por maceta, considerando a cada maceta como una unidad de muestreo. Éstas fueron mantenidas en cámara de cultivo durante 19 días bajo condiciones controladas de temperatura (25°C), con un fotoperíodo de 16 h luz y una densidad de flujo de fotones de 300 μmol m⁻² s⁻¹.

En invernáculo

Las plántulas fueron sembradas en macetas de 750 cm³, utilizando vermiculita como sustrato, a razón de 5 plantas por maceta, considerando a cada maceta como una unidad de muestreo. Éstas fueron mantenidas en un invernáculo ubicado en el campus de la Facultad de Agronomía de la UBA con luz natural, por un período de 75 días, durante los meses de junio a agosto de 2010.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un ensayo de interacción de NxS, por lo cual las macetas fueron divididas en cuatro tratamientos y cada uno fue regado durante todo el período de crecimiento con solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) con una disponibilidad de N y S como se indica en la tabla 1.

Las disponibilidades de N fueron elegidas en base a trabajos previos realizados por el grupo de trabajo (Caputo y Barneix, 1997; Gelso, 2009) y las de S en base a la bibliografía (Dubousset, 2009; Varin, 2010).

Tratamiento	KNO ₃ (mM)	S-SO ₄ ⁻² (mM)	
	<i>Cámara/Invernáculo</i>	<i>Cámara</i>	<i>Invernáculo</i>
Plantas control	10	1,2	1,2
Plantas S-	10	0,101	0,001
Plantas N-	2	1,2	1,2
Plantas N-/S-	2	0,101	0,001

Tabla 1: Concentración de KNO₃ y S-SO₄⁻², expresados en mM, presentes en las soluciones de regado según los tratamientos establecidos y según las condiciones de cultivo.

En ambos ensayos se tomaron muestras de los vástagos, la última hoja expandida (hoja fuente) y su exudados floemáticos. Además, en el ensayo de invernáculo se recolectaron todas las hojas en desarrollo (hojas destino). Los vástagos se secaron en estufa a 60°C por 48h, las hojas fueron almacenadas en freezer a -50°C y los exudados a -20°C.

En el ensayo en invernáculo, a su vez, se determinó el número de hojas y macollos presentes por cada tallo principal.

EXTRACCIÓN DE FLOEMA

La colección del exudado floemático se llevó a cabo por la técnica de exudación facilitada (Caputo y Barneix, 1997; **Figura 7**). Se cortó la última hoja expandida de las cinco plantas de cada maceta y se las colocó en tubos de 10 ml conteniendo 1 ml de una solución de EDTA 20 mM (pH 6). Estas hojas fueron preincubadas por 15 min en oscuridad para eliminar los restos celulares remanentes del corte efectuado y para evitar contaminación con el exudado xilemático. Luego, fueron transferidas a otro tubo conteniendo 1 ml de la misma solución e incubadas por 3 h en oscuridad. Tanto la preincubación como la incubación fueron realizadas en oscuridad para evitar que las hojas transpiren y absorban solución por xilema.

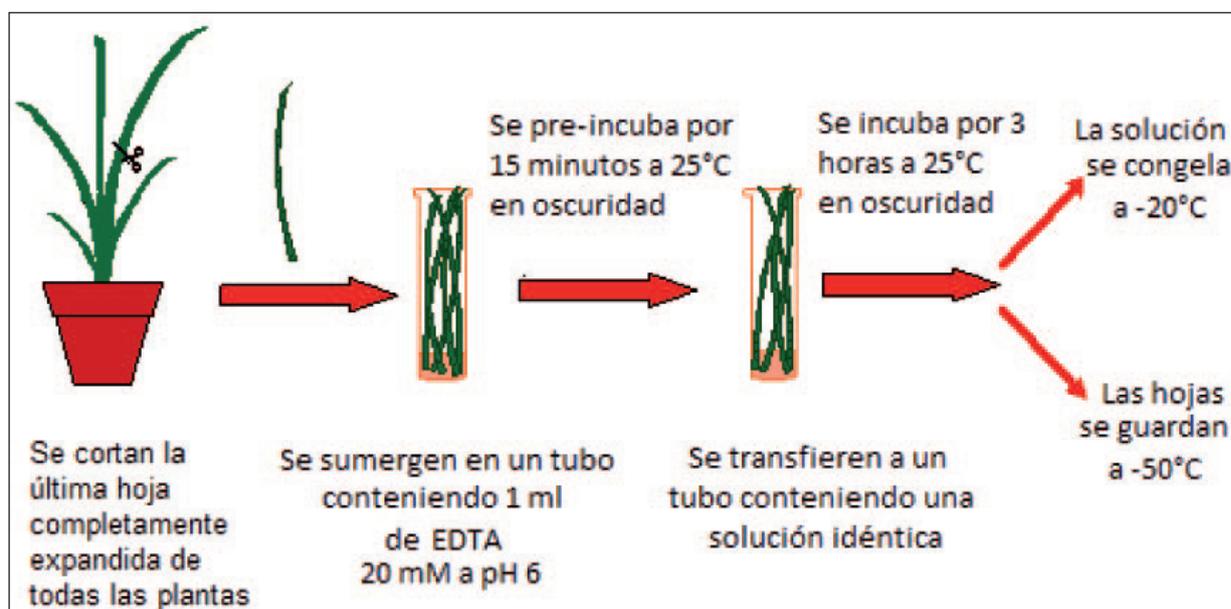


Figura 7: Procedimiento de colección de exudado floemático (Caputo y Barneix, 1997).

EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE AZUFRE TOTAL EN TEJIDO VEGETAL

La extracción del S total del material vegetal se realizó mediante una digestión completa de 0,5 g de material seco con 2 ml de ácido nítrico (HNO_3) 65% a 150°C durante 1 h y posterior agregado de 2 ml de ácido perclórico (HClO_4) 70% a 205°C durante 2 h. Luego de enfriado se llevó a volumen con agua bidestilada (50 ml finales) y se determinó por turbidimetría el contenido de S como sulfato de bario empleando Tween 80 como estabilizador, según el método propuesto por San Martín et al. (1987). Se realizó una lectura de absorbancia a una longitud de onda de 410 nm y se utilizó como patrón una solución estándar de sulfato de potasio (K_2SO_4) de concentraciones conocidas.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

El tejido foliar congelado se molió en mortero con N líquido, se tomaron 250 mg de material vegetal pulverizado homogeneizado con polyvinylpyrrolidona (PVPP) 1% (p/p) y se le agregó 1 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; β -Mercaptoetanol 1 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM). Las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas a 10.000 xg, a 4°C por 20 min y los sobrenadantes fueron utilizados para las determinaciones bioquímicas.

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Determinación de clorofila

En el ensayo de cámara la concentración de clorofila fue determinada por el método de Arnon (1949). Para ello se tomaron 50 mg del tejido molido y se le agregaron 1,5 ml de acetona 80%; luego de agitar con vortex se centrifugaron las muestras a 10.000 xg durante 10 min y se realizó una lectura de la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 652 nm para determinar la clorofila total. Esta concentración (expresada como mg de clorofila por peso fresco) se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$D.O. \times ml \text{ Vf} / (34,5 \text{ ml/mg} \times g \text{ pf}) = \text{mg clorofila/g pf}$$

D.O.= absorbancia a 652 nm

ml Vf = ml de acetona agregados

34,5 = coeficiente de absorción específica de la clorofila total (clorofila a + b)

g pf = gramos de material molido empleado para la medición

En ensayos posteriores se utilizó para la medición de clorofila un equipo de medición SPAD-MINOLTA con el cual se midieron las concentraciones directamente sobre el tejido (técnica no invasiva).

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976). Para ello se mezcló el extracto con 1 ml del reactivo de Bradford (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml etanol absoluto, 100 ml ácido fosfórico 85% p/v, llevado a volumen con H₂O) y luego de incubar dicha mezcla durante 20 min a temperatura ambiente se leyeron las absorbancias a 595 nm. La concentración fue calculada a partir de una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

Determinación de aminoácidos totales

Para la determinación de aminoácidos, tanto en los tejidos foliares como en los exudados floemáticos, se utilizó el método de ninhidrina (Yemm y Cocking, 1955), que consiste en incubar durante 15 min a 100 °C una mezcla de 0,5 ml de muestra, 0,25 ml de buffer citrato de sodio 0,2 M (pH 5), 0,1 ml de una solución de ninhidrina en éter monometílico del etilenglicol (metilcelosolve) 5% (p/v), y 0,5 ml de cianuro de potasio (KCN) 10 mM en metilcelosolve en una proporción 1:49 v/v, para luego dejar enfriar y leer la absorbancia a 570 nm. Para el cálculo de las concentraciones se realizó una curva de calibración utilizando glicina como patrón.

En el caso particular de los tejidos foliares, previo a la determinación se precipitaron las proteínas a fin de eliminar las interferencias de las mismas en la medición. Para ello se mezcló el sobrenadante del extracto de tejido con ácido tricloroacético (TCA) 5% (v/v) en una relación 1:4, estas muestras fueron incubadas en hielo por 10 min y centrifugadas a 10.000 xg por el mismo período de tiempo. Este sobrenadante fue el utilizado para las determinaciones de aminoácidos.

Determinación de azúcares solubles

Para la determinación de azúcares solubles, tanto en los tejidos foliares como en los exudados floemáticos, se utilizó el método de anthrona (Yemm y Willis, 1954) que consiste en incubar a 100 °C durante 10 minutos 0,2 ml de muestra con 1 ml de una solución 0,2% de anthrona en H₂SO₄ 75%. Luego de enfriar se lee la absorbancia a 630 nm. Para estas determinaciones se realizó una curva de calibración utilizando sacarosa como patrón.

En el caso de los tejidos foliares, previamente se deben extraer los azúcares hirviendo durante 10 min 50 µl del extracto de tejido para luego clarificarlos utilizando 75 µl de la solución Carrez I (150 g

$\text{I}^{-1} \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{H}_2\text{O}$) y 75 μl de Carrez II (300g $\text{I}^{-1} \text{ZnSO}_4$). Seguidamente, se lleva a 1,5 ml con agua destilada, y se las centrifuga a máxima velocidad por 5 min. Los sobrenadantes se utilizaron para las determinaciones de azúcares solubles.

Cuantificación de RUBISCO (SDS-PAGE)

Para la preparación de las muestras se mezclaron los extractos con CB (cracking buffer) 4X en una relación 4:1, luego fueron calentadas durante 5 min a 100°C y se guardaron en freezer a -20°C hasta el momento de usarlas.

Las proteínas se separaron en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% revelándose por tinción con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (p/v) en constante agitación. Los valores de las densidades de las bandas fueron obtenidos usando el software Image J, disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados fueron analizados por la técnica de análisis de varianza (ANOVA) de dos factores utilizando el software Statistica (R).

RESULTADOS

ENSAYO EN CÁMARA DE CULTIVO CON PLANTAS DE 19 DÍAS

Para llevar a cabo el estudio de interacción de NxS y determinar el impacto que dicha interacción tiene sobre la removilización de aminoácidos y azúcares vía floema, se trabajó con plantas jóvenes de cebada cultivadas bajo condiciones controladas analizando, además, el desarrollo global de la planta y los principales componentes de la maquinaria fotosintética (concentración de clorofila y Rubisco).

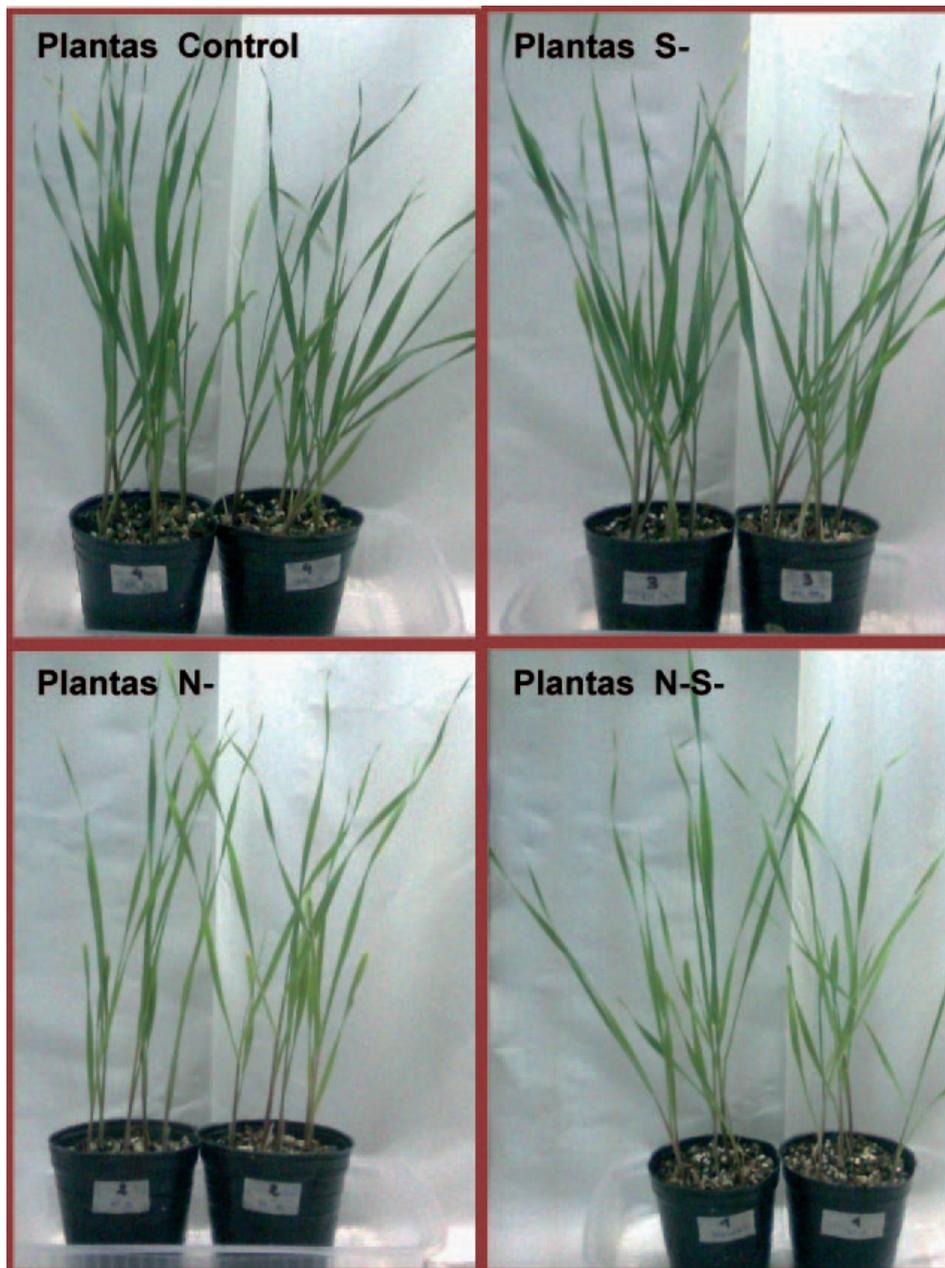


Figura 8: Plantas de cebada al momento de muestrear.

Debido al efecto del N sobre el crecimiento de las plantas, en el caso de los tratamientos de bajo N la última hoja expandida (hoja muestreada) fue la hoja número 2, mientras que para los tratamientos de alto N fue la hoja 3 (**Figura 9**).

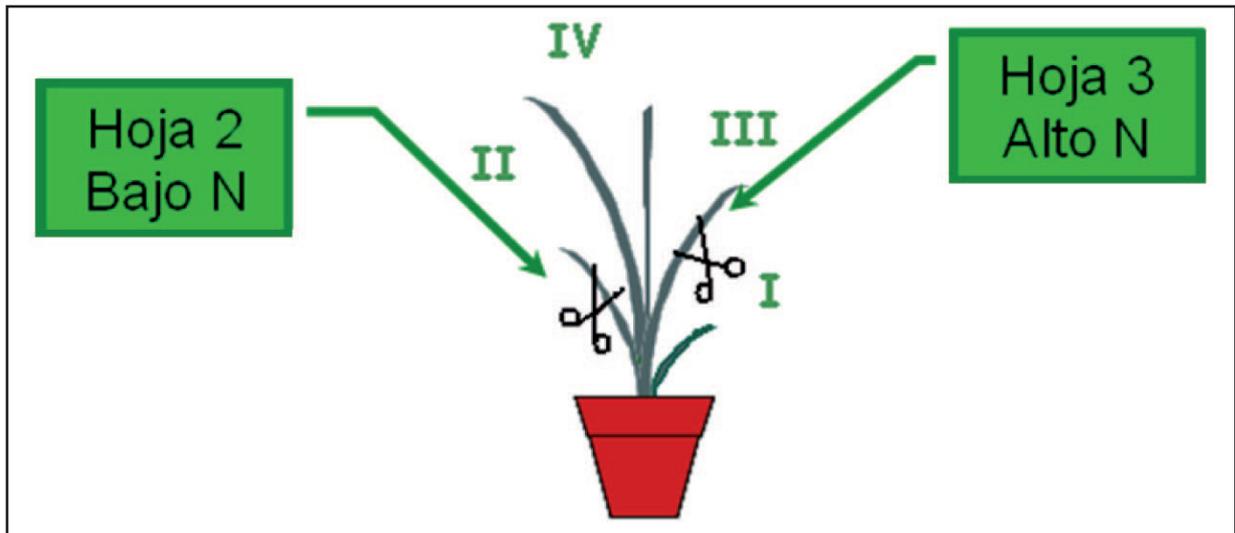


Figura 9: Esquema de numeración y selección de hojas muestreadas de plantas jóvenes según el estado de desarrollo de las mismas.

Las plantas cultivadas con deficiencia de N, independientemente de la disponibilidad de S, presentaron menor biomasa y una disminución en el nivel de desarrollo de las mismas con respecto a las control, mientras que la deficiencia de S no provocó efecto alguno sobre este parámetro (**Figura 10**).

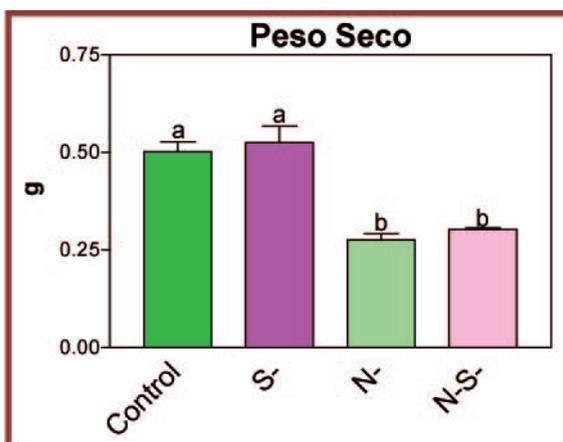


Figura 10: Peso seco de la parte aérea de las plantas cultivadas con diferentes concentraciones de N y S. Las barras representan las medias \pm el error estándar, $n=4$. Las letras indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Análisis sobre tejido foliar:

Cuando se analizaron diferentes parámetros bioquímicos en las hojas se observó que la baja disponibilidad de N produjo una caída en la concentración de proteínas independientemente de la disponibilidad de S, mientras que la deficiencia de S generó una disminución significativa en la concentración de proteínas sólo cuando las plantas contaban con un adecuado suministro de N (**Figura 11A**).

Por otra parte, la concentración de aminoácidos en el tejido foliar sólo estuvo influenciada por la disponibilidad de N con la que contaban las plantas y no por el S, visualizándose una notoria caída de los mismos en los tratamientos con bajo N (**Figura 11B**).

A su vez, sólo las plantas deficientes únicamente de N (plantas N-) presentaron una mayor acumulación de azúcares en los tejidos en comparación con el resto de los tratamientos (**Figura 11C**).

Con respecto a la concentración de clorofila total en los tejidos, se visualizó una disminución de este parámetro sólo en las plantas deficientes de N independientemente del suministro de S (**Figura 11D**).

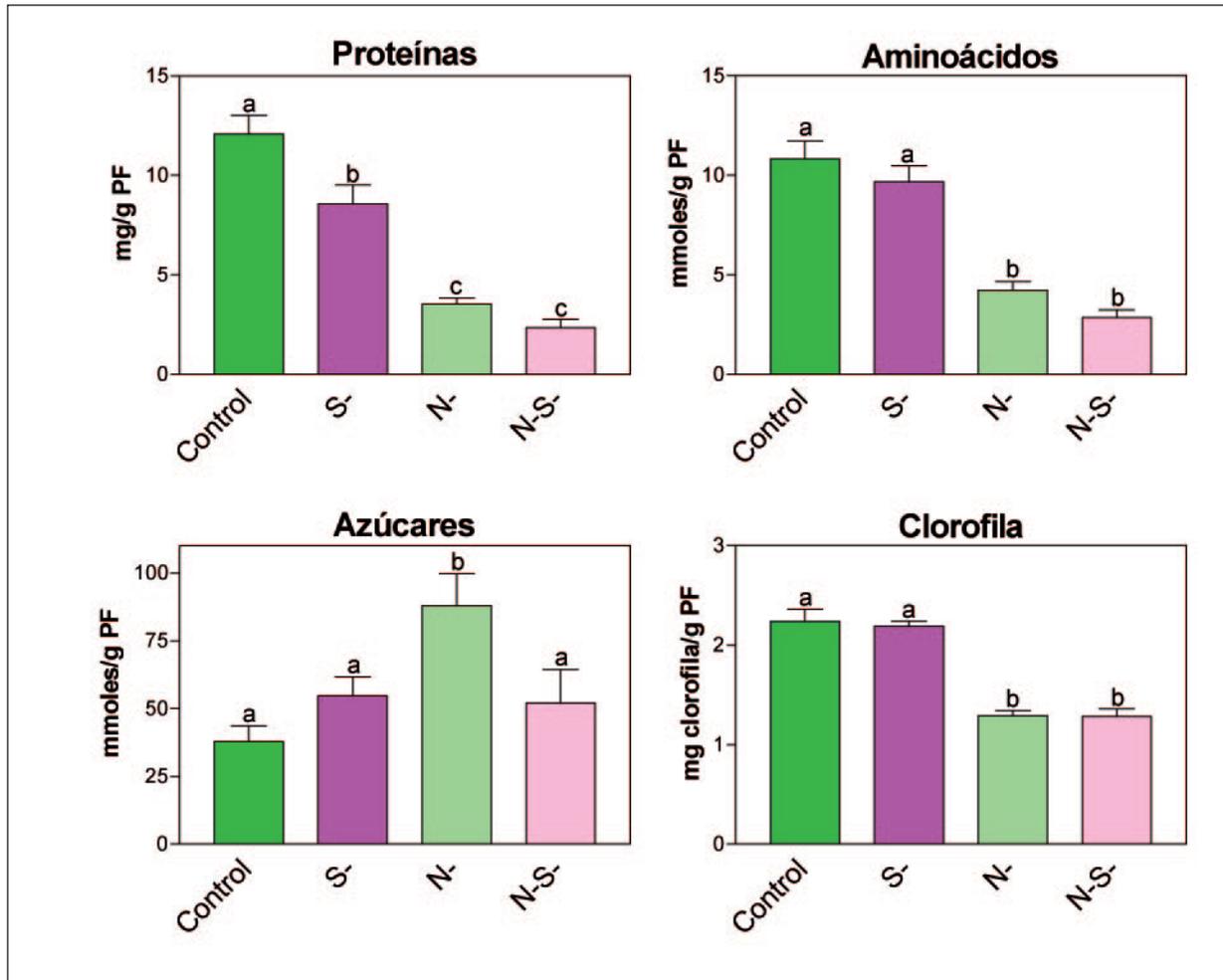


Figura 11: Concentración de proteínas (A), aminoácidos (B), azúcares (C) y clorofila total (a+b) (D) en las hojas fuente de las plantas cultivadas con diferentes disponibilidades de N y S. Las barras representan las medias \pm el error estándar, n=4. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al análisis de la abundancia de la enzima Rubisco, tanto en el caso de la subunidad mayor como en el de la subunidad menor, se observó una caída en la concentración de ambas de más del 50% con respecto al control frente a la baja disponibilidad de N, mientras que la baja disponibilidad de S generó, a su vez, una leve disminución de la concentración de esta enzima (aproximadamente del 10%) (**Figura 12**).

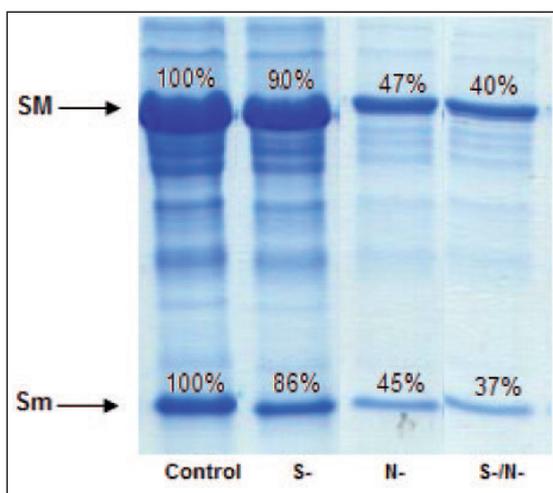


Figura 12: SDS-PAGE al 15%, cada calle fue sembrada con 3,75 mg de tejido fresco. Las flechas indican la posición de la subunidad mayor (SM) y menor (Sm) de la enzima Rubisco. Los porcentajes indican el valor relativo de la subunidad mayor y menor de la enzima Rubisco, en función a los valores del control (100%).

Análisis sobre exudado floemático:

Finalmente, en el análisis de los exudados floemáticos (**Figura 13A y B**) se observó una brusca disminución de la exportación de aminoácidos y azúcares vía floema en las plantas deficientes de N independientemente de la disponibilidad de S, mientras que la deficiencia de S generó una inhibición en la exportación de ambos metabolitos sólo en las plantas suficientes de N (plantas S-).

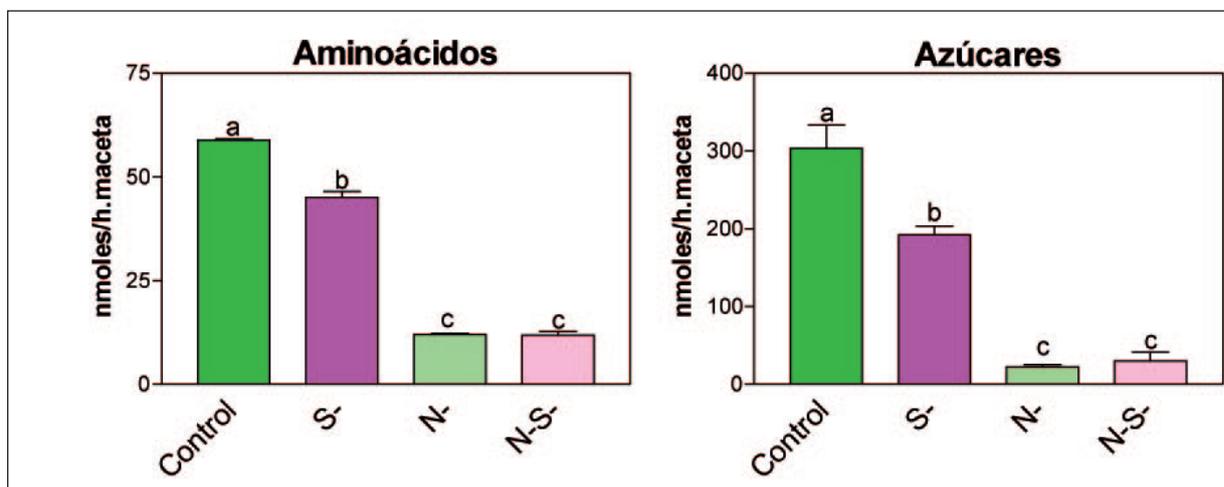


Figura 13: Concentración de aminoácidos (A) y azúcares (B) en los exudados floemáticos de las hojas fuente de las plantas cultivadas con diferentes disponibilidades de N y S. Las barras representan las medias \pm el error estándar, $n=4$. Las letras indican diferencias significativas ($p<0.05$).

ENSAYO EN INVERNÁCULO CON PLANTAS DE 75 DÍAS

A fin de corroborar los resultados obtenidos en el ensayo anterior y de determinar si la edad de la planta es un factor decisivo en la manifestación de los síntomas típicos causados por deficiencias de S, tales como el retardo en el crecimiento de la planta y disminución en la concentración de clorofila y de Rubisco, se cultivaron plantas durante un período de tiempo más largo y con una menor disponibilidad de S (0,1% de S respecto del control) en invernáculo, ya que en la cámara de cultivo, debido a la intensidad de las luces, no es posible cultivar las plantas durante períodos largos de crecimiento.

Análisis sobre planta entera:

Las plantas cultivadas con deficiencia de N, independientemente de la disponibilidad de S, presentaron menor biomasa y menor número de macollos con respecto a las control, mientras que la deficiencia de S no provocó ningún efecto significativo sobre estos parámetros (**Figura 14A y B**).

Por otra parte, la cuantificación de clorofila, tanto de la última hoja expandida como la de las últimas hojas en desarrollo (datos no mostrados) de cada planta, reveló que sólo la deficiencia de N fue determinante en la caída de este parámetro, mientras que la disponibilidad de S no la afectó (**Figura 14C**).

Por último, y a fin de determinar si la baja concentración de S en la solución nutritiva estaba efectivamente generando una caída en el contenido de S total de las plantas, se cuantificó el contenido de S total en el tejido seco, observándose que todos los tratamientos contaron con una menor cantidad de S disponible que el control. Sin embargo, las plantas deficientes de N mostraron un contenido de S similar entre ellas independientemente de la disponibilidad de S presente en la solución de riego (**Figura 14D**).

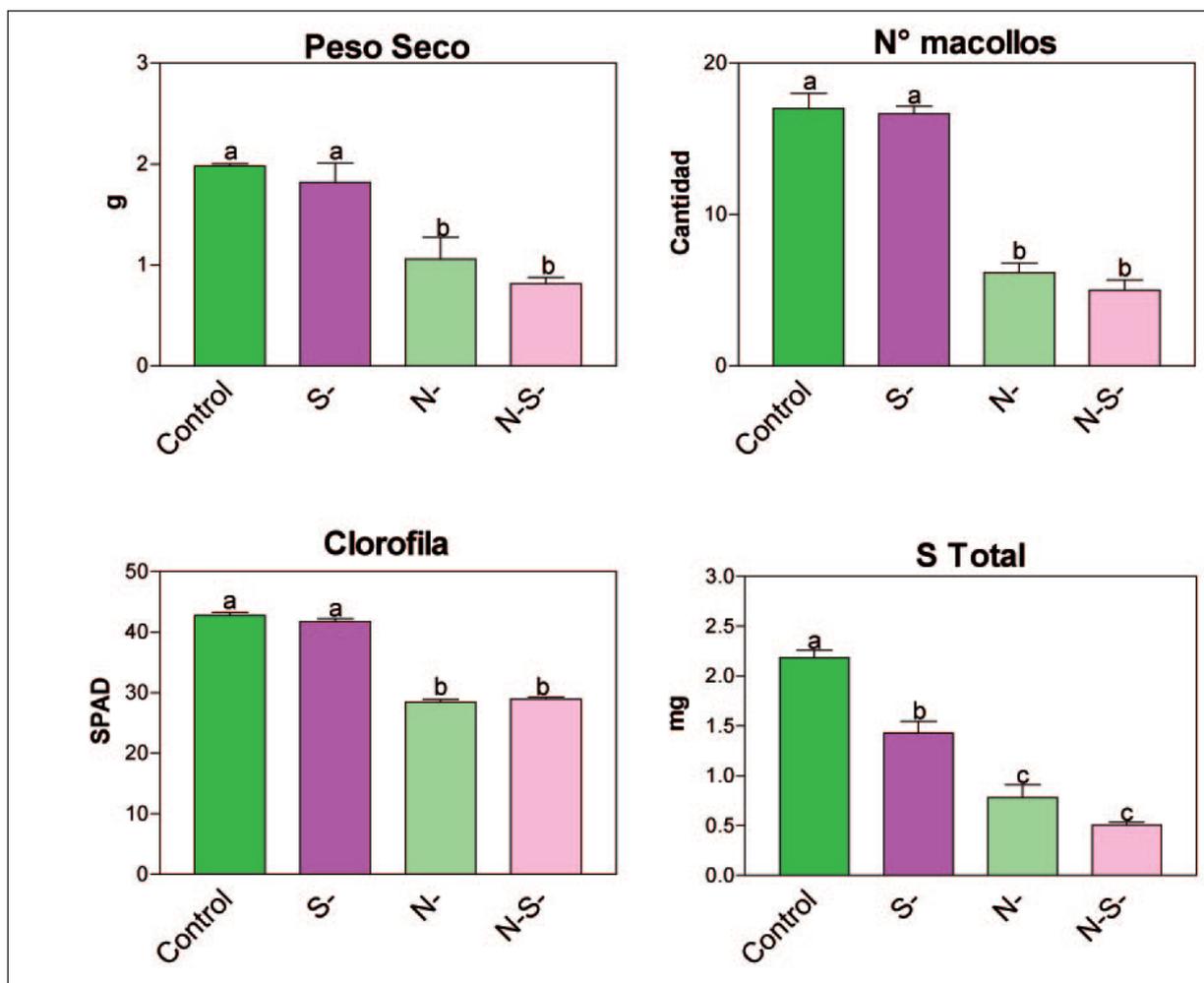


Figura 14: Peso seco (A), número de macollos (B), concentración de clorofila (C) y contenido de S total (D) de la parte aérea de las plantas cultivadas con diferentes concentraciones de N y S. Las barras representan las medias \pm el error estándar, $n=4$ para el caso del peso seco y S total y $n=6$ para el de número de macollos y clorofila. Las letras indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Análisis sobre tejido foliar:

Con respecto al análisis de tejido vegetal fresco se determinó que en las hojas fuente tanto la concentración de proteínas como la de azúcares, de todos los tratamientos, no sufrieron variaciones (**Figura 15A y 15C**), mientras que la concentración de aminoácidos sufrió una caída en las plantas sometidas a deficiencias de N en comparación con las plantas de alto N, independientemente de la concentración de S (**Figura 15B**).

Por otra parte, en las hojas destino se observó que la concentración de proteínas fue similar en todos los tratamientos excepto en las plantas sometidas a la deficiencia conjunta de N y S (plantas N-/S-), en donde dicha concentración disminuyó significativamente (**Figura 15D**); a su vez la concentración de aminoácidos fue mucho menor en las plantas deficientes de N, mientras que el S no generó ningún efecto significativo sobre este parámetro analizado (**Figura 15E**). Finalmente, en las plantas deficientes sólo de N (plantas N-), se evidenció una mayor acumulación de azúcares que en el resto de los tratamientos (**Figura 15F**).

En cuanto a la abundancia relativa de la enzima Rubisco se observó una caída tanto en las hojas fuente como en las destino ante ambas deficiencias por separado que se intensificó aún más en el caso de las plantas N-/S-, en donde la concentración tanto de la subunidad mayor como la de la subunidad menor de esta enzima disminuyó en 30-40% con respecto al control (**Figuras 16A y B**).

Análisis sobre exudado floemático:

Finalmente, al analizar la exportación de aminoácidos y azúcares vía floema se determinó que el transporte de aminoácidos sólo se vio inhibido cuando las plantas eran deficientes de N y que el S no generó cambios en el transporte de este metabolito (**Figura 17A**).

Con respecto al transporte de azúcares, no existieron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos (**Figura 17B**).

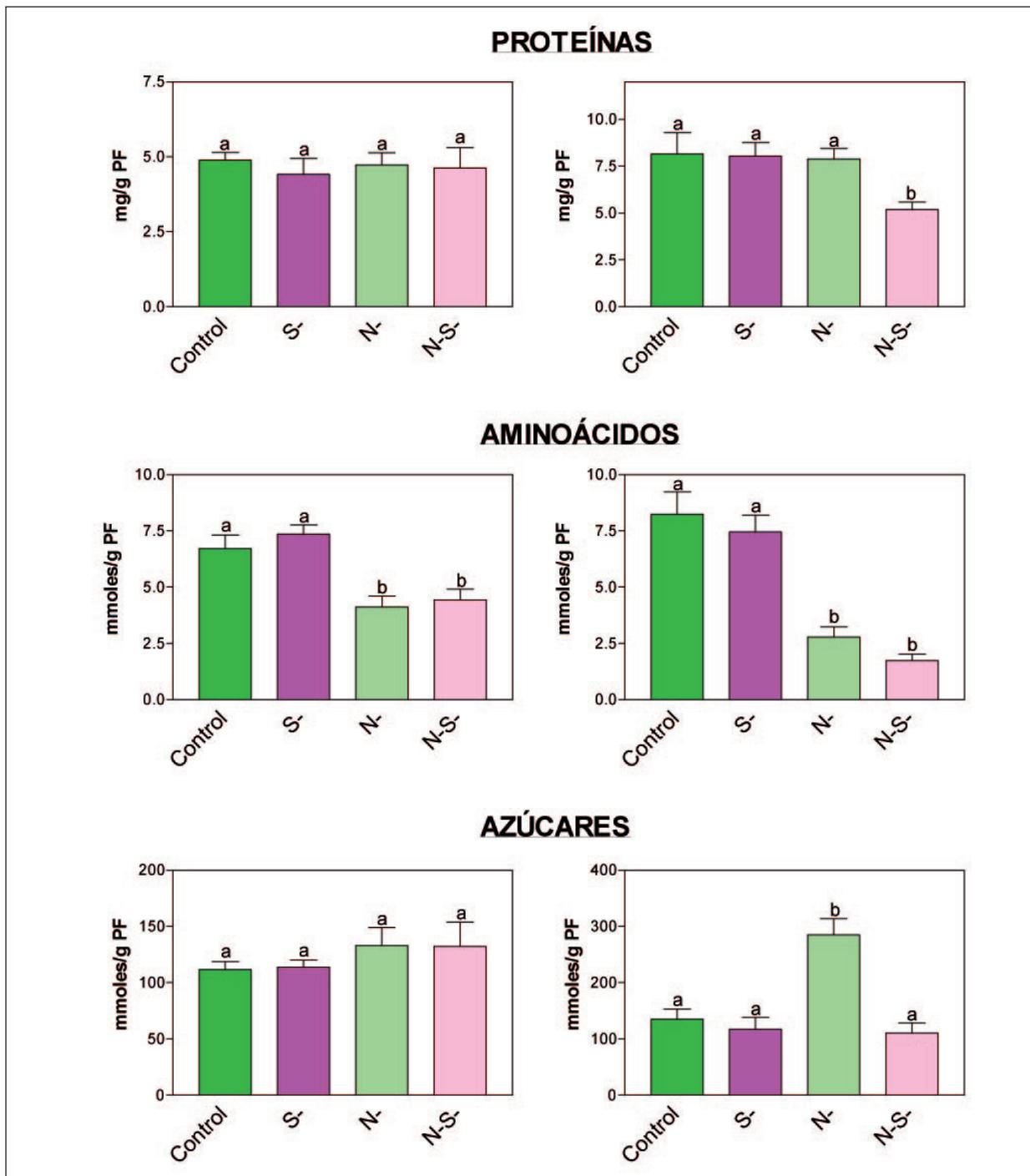


Figura 15: Concentración de proteínas (A), aminoácidos (B) y azúcares (C) en las hojas fuente y concentración de proteínas (D), aminoácidos (E) y azúcares (F) en las hojas destino de las plantas cultivadas con diferentes disponibilidades de N y S. Las barras representan las medias \pm el error estándar, n=4. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

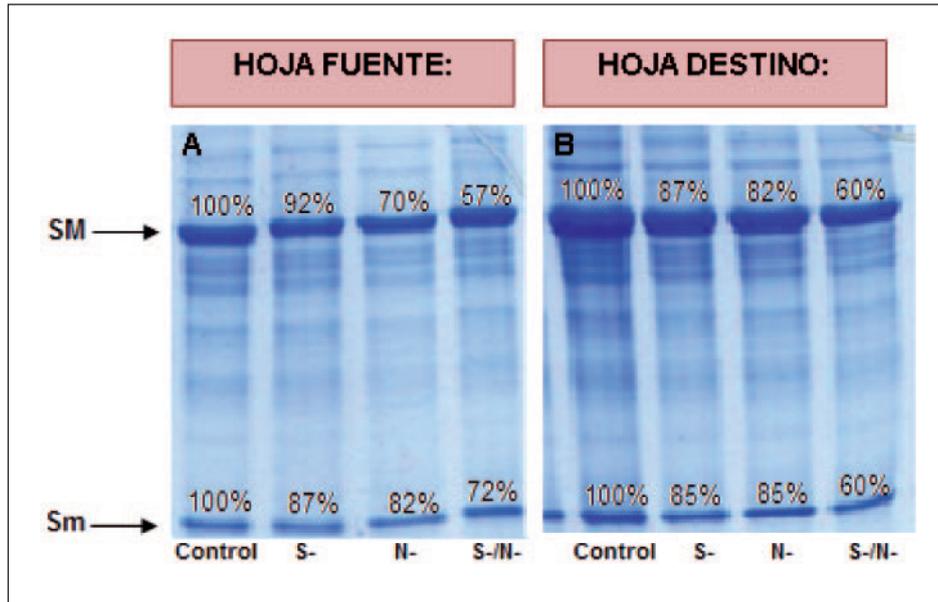


Figura 16: SDS-PAGE al 15%, cada calle fue sembrada con 4 mg de tejido fresco de las hojas fuente (A) y destino (B). Las flechas indican la posición de la SM y Sm de la enzima Rubisco. Los porcentajes indican el valor relativo de la subunidad mayor y menor de la enzima Rubisco, en función a los valores del control (100%).

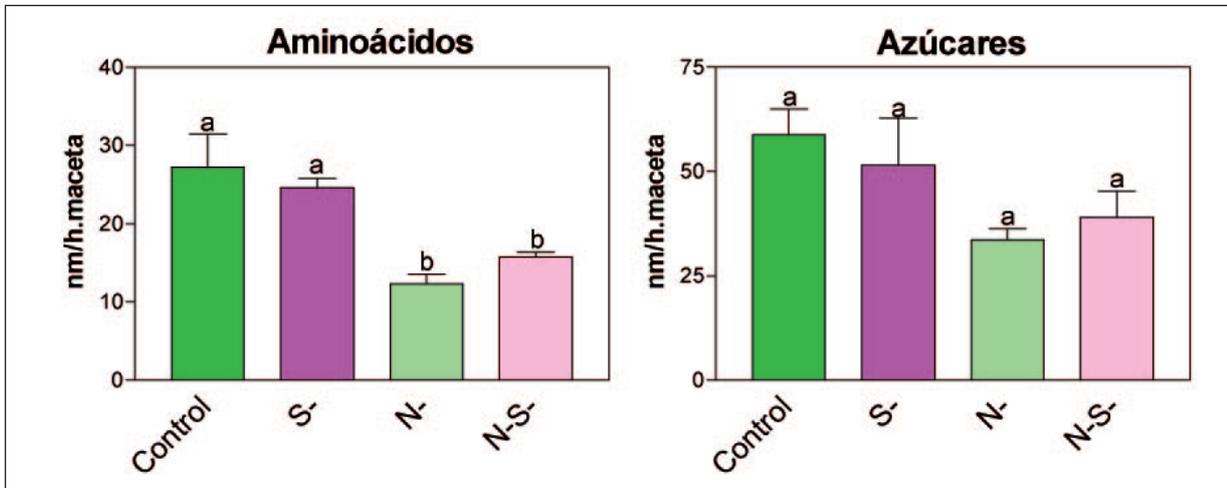


Figura 17: Concentración de aminoácidos (A) y azúcares (B) en los exudados floemáticos de las hojas fuente de las plantas cultivadas con diferentes disponibilidades de N y S. Las barras representan las medias \pm el error estándar, $n=6$. Las letras indican diferencias significativas ($p<0.05$).

DISCUSIÓN

Considerando que la acumulación de biomasa depende de la cantidad de radiación solar interceptada y de la eficiencia con que dicha radiación es utilizada (Monteith, 1977) era de esperarse que el crecimiento de las plantas se viera afectado cuando el desarrollo de los tejidos fotosintéticos se encontrara limitado. Esto ocurrió, tanto en el ensayo de cámara como en el de invernáculo, en las plantas deficientes de N, en donde tanto el tamaño como el estado de desarrollo de las hojas de las mismas se vio disminuida (**Figura 10 y 14A**), ya que el N interviene en la formación de tejidos verdes y en la generación del área foliar (Ferraris, 2007). Por otra parte, el hecho de que la deficiencia de S no afecte el crecimiento y desarrollo de las plantas coincide con las observaciones realizadas sobre este parámetro en plantas de trigo en el trabajo de Gilbert et al. (1997), en el cual la privación del S no tuvo efectos significativos en el índice de crecimiento relativo o en el desarrollo de las hojas. Contrariamente a esto, en el trabajo de Nikiforova et al. (2005) realizado en plantas de *Arabidopsis* sí se encontraron disminuciones en la biomasa, así como en los niveles de proteínas y clorofila bajo condiciones de nula disponibilidad de S. Del mismo modo, en plantas de arroz se encontraron efectos en la apariencia y tamaño de las mismas (plantas más pequeñas y pálidas), así como una marcada reducción del contenido de clorofila frente a deficiencias de S (Lunde, 2008). A pesar de las condiciones de baja disponibilidad de S significativamente importantes con las que se trabajaron, tampoco se lograron observar los efectos esperados en el contenido total de clorofila frente a este estrés nutricional, aunque sí se encontró una marcada caída de esta molécula cuando las plantas carecían de un adecuado suministro de N (**Figura 11D y 14C**).

Estas discrepancias entre los resultados obtenidos y los efectos generados por deficiencias severas de S mencionados en la bibliografía, sumado al alto contenido de S en las plantas S- (**Figura 14D**), nos llevó a plantearnos la posibilidad de la existencia de una fuente no controlada de S que nos estaría impidiendo generar las deficiencias de S deseadas. Al analizar las posibles fuentes no controladas de este nutriente encontramos que el agua de red contenía S (ver apéndice). Como en el ensayo de invernáculo el riego se suplementó con este agua en función de la evapotranspiración no podemos asegurar el suplemento real de este nutriente que recibieron las plantas. Del mismo modo, tampoco podemos descartar la presencia de trazas de S en el agua destilada (ver apéndice) utilizada para la preparación de las soluciones nutritivas. Por ende, no tenemos forma de asegurar que las deficiencias de S alcanzadas en los dos ensayos realizados en este trabajo fueran de la misma magnitud. Como en el ensayo de invernáculo se logró una deficiencia del 40% a pesar del riego con agua de red, se asume que la deficiencia en cámara (donde sólo se usó agua destilada) debiera ser mayor. De aquí en más se analizarán los parámetros medidos teniendo en cuenta lo mencionado.

En ambos ensayos la concentración de aminoácidos en el tejido foliar no se vio afectada por la disponibilidad de S en la planta, pero sí por la disponibilidad de N (**Figura 11B y 15B y E**). Este resultado es lógico ya que el N es uno de los elementos fundamentales en la estructura de los aminoácidos y, por ende, fuentes limitadas de N restringirían la síntesis de estas moléculas. Con respecto al S, este resultado estaría indicando que dicho elemento no tiene un efecto significativo sobre la cantidad de N que puede ser asimilado. Esta observación refutaría en parte la primer hipótesis que planteamos en donde dijimos que la deficiencia de S inhibe el transporte de aminoácidos vía floema a través de una reducción de los niveles de aminoácidos en las hojas.

Con respecto al contenido proteico, se pudo observar que en las plantas de 19 días este parámetro sufrió una disminución cuando la disponibilidad de N era baja debido a la menor cantidad de aminoácidos disponibles. Por otra parte, la disminución en la concentración de proteínas en plantas S- mantenidas en cámara de cultivo con respecto al control estaría indicando que dicha deficiencia estimula la acumulación de aminoácidos como fuente de reserva del N, probablemente debido a una limitación en la síntesis de proteínas bajo este estrés nutricional (**Figura 11A**), y por ello la concentración de aminoácidos en las plantas con baja disponibilidad de S pero con un adecuado suministro de N, presentó valores similares a los del control (**Figura 11B**). Por otro lado, la concentración de proteínas en las hojas fuente de las plantas de 75 días no sufrió cambios aún bajo deficiencias de N (**Figura 15A**). Una posible explicación para esto es que la cantidad de proteínas totales producidas por las plantas control se estaría distribuyendo entre todos los tejidos destino que ésta posee, incluyendo los macollos, los cuales son muchos más numerosos en las plantas de alto N (**Figura 14B**), con lo cual la cantidad de proteínas presente en estas plantas es mayor que la presente en las de bajo N. En cuanto a la concentración de proteínas en las hojas destino (**Figura 15D**), en este caso se pudo observar una interacción del N y S en condiciones de deficiencia donde la

baja disponibilidad conjunta de ambos nutrientes generó una caída en la concentración de proteínas. Este resultado evidenciaría la limitación en la síntesis proteica mencionada anteriormente, sugiriendo que el S está influyendo en la misma, pero esta vez cuando la disponibilidad de N es baja.

La relación entre los efectos sobre el contenido de aminoácidos y proteínas en las hojas con respecto a la escasa disponibilidad de S se vincula al hecho de que las plantas alteran sus metabolismos para compensar las deficiencias de S y N de la mejor manera posible, y, dado que la cisteína (aminoácido azufrado) es el punto de convergencia del metabolismo del N y del S, limitaciones en cualquiera de estos nutrientes no solo afecta la habilidad de la planta de sintetizar cisteína, sino que también restringe la síntesis de proteínas (Hesse, 2004).

A su vez, la disminución en la removilización de aminoácidos vía floema encontrada en el ensayo en cámara de cultivo en plantas S- (**Figura 13A**) indica un efecto del S sobre la tasa de exportación de estos metabolitos. Aunque este efecto no puede ser explicado por una caída en la concentración global de aminoácidos en las hojas, como sugerimos en la primer hipótesis, sí es factible suponer que pueda deberse a una disminución, particularmente, en la proporción de los aminoácidos azufrados como consecuencia de la deficiencia de S. Esto se sustenta en base al hecho de que la composición de aminoácidos en el floema no se correlaciona con aquella presente en las hojas debido a que ciertos aminoácidos son favorecidos mientras que otros son discriminados a la hora de ser transportados por el floema (Caputo y Barneix, 1997; Caputo et al. 2009). Por otro lado, que la exportación de aminoácidos solo se vea afectada en plantas suficientes de N (plantas S-) concuerda con nuestra segunda hipótesis y avala lo reportado por Sunarpi y Anderson (1997) que plantean que la removilización del S desde las proteínas no ocurre ante una deficiencia de S a menos que también la planta sufra de deficiencia de N, sugiriendo la existencia de una removilización de S acoplada a la del N.

Finalmente, la acumulación de azúcares en las plantas N- se explica porque las cadenas carbonadas generadas durante la fotosíntesis no son utilizadas para la formación de otros compuestos orgánicos debido a la limitada presencia de aminoácidos para conjugarse con los hidratos de carbono para dar origen a estructuras derivadas. Pese a esto, en el tejido foliar de las plantas N-/S-, tanto en las plantas de 19 días como en las hojas destino de plantas de 75 días (**Figura 11C y 15F**), no se observó un aumento en la acumulación de azúcares, sugiriendo la existencia de un efecto del S sobre la eficiencia fotosintética. Si bien dicho efecto no pudo ser corroborado firmemente con los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad de Rubisco y clorofila presentes en estas plantas (**Figura 12, 16, 11D y 14C**) sí nos permiten apoyar la primer hipótesis planteada, que sugiere que la disminución en la eficiencia fotosintética podría ser la causante de la caída en la exportación de azúcares, lo cual efectivamente se observó en las plantas S- del ensayo de cámara de cultivo (**Figura 13B**). Contrariamente, esto no estaría ocurriendo de la misma manera en las plantas N-/S- ya que en ellas el factor limitante del crecimiento y exportación de azúcares sería el N.

Estos efectos del S sobre la removilización de aminoácidos y azúcares observados en este trabajo no han sido reportados en datos bibliográficos anteriores y por ello es un punto importante a tener en cuenta para abordar futuros estudios.

CONCLUSIONES

En este trabajo logramos encontrar efectos de la deficiencia de S sobre la removilización de aminoácidos y azúcares vía floema en el ensayo en cámara de cultivo, cuando las plantas contaban con un adecuado suministro de N, lo cual nos permitió apoyar la segunda hipótesis planteada.

Además, los efectos encontrados en la concentración de proteínas y azúcares presentes en el tejido foliar estaría evidenciando posibles influencias del S sobre la síntesis proteica y sobre la eficiencia fotosintética, lo cual a su vez avala la primer hipótesis que se planteó.

Por otro lado, los efectos diferenciales observados entre las hojas fuente y destino en el ensayo llevado a cabo en invernáculo estarían evidenciado la movilidad diferencial que tienen el N y el S dentro de la planta. Por lo tanto, debido a la movilidad intermedia del S en las plantas (comparado por ejemplo con el calcio que es totalmente inmóvil o el N y el P que son muy móviles) (Marschner, 1995; Eriksen et al., 2001; Monaghan et al., 1999) deficiencias de este nutriente disminuirían su concentración en las hojas nuevas, a diferencia de lo que sucede con el N.

Finalmente, la falta de efectos esperados, según la bibliografía, sobre los parámetros que normalmente se ven afectados por el suministro limitado de S (contenido de clorofila, Rubisco, desarrollo de la planta, etc.), se atribuye a una contaminación con fuentes externas de S provenientes, en principio, del agua empleada para la preparación de las soluciones nutritivas y para el riego de las plantas y a las trazas de S presentes en las drogas empleadas para la elaboración de dichas soluciones.

PERSPECTIVAS

Dado que en el ensayo de invernáculo no logramos el nivel de deficiencia de S esperado debido al contenido de S presente en el agua de red utilizada para el riego de las plantas y que, además, no podemos descartar la contaminación con S en el agua destilada utilizada para la preparación de las soluciones nutritivas de ambos ensayos, así como tampoco podemos ignorar la cantidad de trazas de S presentes en las drogas empleadas para el suplemento de nutrientes en dichas soluciones, nos proponemos llevar a cabo un ensayo con solución nutritiva preparada enteramente con agua MilliQ (agua filtrada y purificada por osmosis inversa) y con drogas de alta pureza (libres de contaminantes). Al mismo tiempo, todo el material que se utilice será cuidadosamente tratado a fin de eliminar posibles contaminantes traza de S. Además, si bien en este trabajo se estudió la posible presencia de S en la vermiculita, encontrándose que ésta no posee cantidades medibles de este elemento (datos no mostrados), en este ensayo se utilizará arena lavada como soporte para descartar completamente el posible aporte de S en el sustrato.

Por otro lado, paralelamente a los ensayos presentados en este trabajo, a lo largo de este año se llevaron a cabo ensayos a campo en tres localidades diferentes de la provincia de Buenos Aires (Quiroga, Junín y Carlos Casares) con el mismo diseño que los ensayos llevados a cabo en este trabajo. Se realizaron muestreos desde anthesis hasta madurez y a partir de ellos nos proponemos analizar los parámetros mencionados en este trabajo así como también determinar la influencia de las variaciones en la removilización de aminoácidos sobre la expresión de las diferentes clases de hordeínas en diferentes momentos del llenado de los granos para visualizar la manifestación de los efectos del estrés nutricional en función del tiempo (proyecto presentado a CONICET para tesis doctoral).

APÉNDICE

Determinación de S en las soluciones de riego

Se determinó la concentración de S en las soluciones de riego, utilizando agua MilliQ como blanco de absorbancia, observándose que:

Muestra	Concentración Medida (mM)	Concentración Teórica (mM)
Solución S ⁺¹	2	1,2
Solución S ⁻¹ (cámara)	0,33	0,01
Solución S ⁻¹ (invernáculo)	0,24	0,001
Agua destilada	0,15	-
Agua de red	0,26	- ²

Tabla 2: Concentraciones de S presentes en las soluciones nutritivas y en el agua empleadas para el riego de las plantas de los ensayos de este trabajo.¹Todas las soluciones nutritivas fueron preparadas en agua destilada. ²La concentración máxima admitida en el agua, según las normas de calidad de consumo de AySA, es ≤ 200 ppm de SO_4^{-2} (equivalentes a 2 mM de S).

Tanto las soluciones nutritivas de alto S como las de bajo S, empleadas en ambos ensayos, muestran una cantidad de S mayor a la teórica. Esto se puede deber en parte al aporte de trazas de S presentes en las preparaciones comerciales de los distintos nutrientes. Por otro lado, el contenido de S en el agua destilada resultó ser de 0,15 mM. Sin embargo, debido a que el valor de absorbancia fue $\leq 0,05$, no podemos descartar que parte de esta concentración determinada sea debido a la presencia de algún tipo de interferencia que dificulta la lectura.

En cuanto al agua de red, ésta contiene 0,26 mM de S y, dado que este agua fue utilizada para regar las plantas del invernáculo a demanda, no se puede saber con exactitud la cantidad de S contaminante que se le suplementó a cada muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson J. W.**, 2005. Regulation of sulfur distribution and redistribution in grain plants. In: Saito K., De Kok L.J., Stulen I., Hawkesford M.J., Schnug E., Sirko A., Rennenberg H., eds. Sulfur transport and assimilation in plants in the post genomic era. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 23–31.
- Arnon D. I.**, 1949. Cooper enzymes in chloroplasts. Polyphenoloxydases in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiology* 24:1–15.
- Barneix A. J., James D. M., Watson E. F., Hewitt E. J.**, 1984. Some effects of nitrate abundance and starvation on metabolism and accumulation of nitrogen in barley (*Hordeum vulgare* cv. Sonja). *Planta* 162: 465-476.
- Barneix A. J., Arnozis P. A., Guitman M. R.**, 1992. The Regulation of Nitrogen Accumulation in the Grain of Wheat Plants (*Triticum aestivum* L.). *Physiologia Plantarum* 86: 609-615.
- Benavides A.**, 1998. El azufre en las plantas. Departamento de Horticultura, UAAAN, Saltillo 25315 México
- Bishop L. R.**, 1930. The Institute of Brewing Research Scheme. I. The prediction of extract. *J. Inst. Brew.* 36:421-434.
- Bourgis F., Roje S. & Nuccio M. L.**, 1999. S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell* 11, 1485–1497.
- Bradford M. M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brennan C. S., Smith D. B., Harris N. & Shewry P. R.**, 1998. The production and characterisation of Hor 3 null lines of barley provides new information on the relationship of D hordein to malting performance. *J. Cereal Sci.* 28:291-299.
- Briggs D. E., Boulton C. A., Brookes P. A. & Stevens R.**, 2004. Brewing. Science and practice. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England & CRC Press. Boca Raton. U.S.A.
- Caputo C. & Barneix A. J.**, 1997. Export of amino acids to the phloem in relation to N supply in wheat. *Physiologia Plantarum* 101: 853-860.
- Caputo C.**, 2001. Tesis doctoral: Regulación de la exportación de aminoácidos al floema en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y su impacto en la concentración final de proteínas en el grano.
- Criado V.**, 2009. Tesis doctoral: La Participación de las Citocininas en la Regulación de la Removilización de Nitrógeno en Plantas de Trigo (*Triticum aestivum* L.).
- Curtis H. & Barnes S. N.**, Biología, 6° edición, 2000. Editorial médica Panamericana.
- Dalling M. J.**, 1985. The physiological basis of nitrogen redistribution during grain filling in cereals. In: Exploitation of physiological and genetic variability to enhance crop productivity. J. D. Harper, L. E. Schrader and R. W. Howell (Eds.) New York: *American Society of Plant Physiology*, pp 55-69.
- Darral N. M. & Wareing P. F.**, 1981. The effect of nitrogen nutrition on cytokinin activity and free amino acids in *Betula pendula* Roth, and *Acer pseudoplatanus* L. *Journal of Experimental Botany* 32:369–379.
- Duarte C. M. (coord.), Alonso S., Benito G., Dacha J., Montes C., Pardo M., Ríos A. F., Simó R. & Valladares F.**, 2006. Cambio global. Impacto de la actividad humana sobre el sistema Tierra. Consejo Superior De Investigaciones Científicas. Madrid, España.
- Dubousset L., Abdallah M., Desfeux A. S., Etienne P., Meuriot F., Hawkesford M. J., Gombert J., Segura R., Bataille M-P., Reze S., Bonnefoy J., Ameline A. F., Ourry A., Le Dily F. & Avicé J. C.**, 2009.

Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 11, pp. 3239–3253.

Eagles H. A., Bedgood A. G., Panozzo J. F. & Martin P. J., 1995. Cultivar and environmental effects on malting quality in barley. *Aust J Agric Res* 46: 831-844

Eriksen J., Nielsen M., Mortensen J. V. & Schjorring J. K., 2001. Redistribution of sulphur during generative growth of barley plants with different sulphur and nitrogen status. *Plant Soil* 230: 239-246.

FAOSTAT 2006; <http://faostat.fao.org/site/370/default.aspx>

Ferraris G., 2007. Nitrógeno y azufre en trigo. Un caso particular de interacción entre nutrientes. INTA. Información técnica de trigo y otros cultivos de invierno, campaña 2007. Publicación miscelánea N° 107.

Fitzgerald M. A., Ugalde T. D. & Anderson J. W., 2001. Sulphur nutrition affects delivery and metabolism of S in developing endosperms of wheat. *Journal of Experimental Botany* 52, 1519–1526

Forster B. P., Ellis R. P., Thomas W. T. B., Newton A. C., Tuberosa R., This D., El-Enein R.A., Bahri M.H., Ben Salem M., 2000. The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. *Journal of Experimental Botany* 51, 19-27.

Gan S. & Amasino R. M., 1997. Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* 113: 313-319.

García del Moral L. F., Sopena A., Montoya J.L., Polo P., Voltas J., Codesal P., Ramos J. M. & Molina-Cano J. L., 1998. Image analysis of grain and chemical composition of the barley plant as predictors of malting quality in mediterranean environments. *Cereal Chem.* 75: 755-761.

Gelso M. A., 2009. Tesis de licenciatura: Estudio del comportamiento de las distintas isoformas de la glutamina sintetasa en hojas de plantas jóvenes de trigo (*Triticum aestivum* L.) en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno.

Gilbert S., Clarkson D., Cambridge M., Lambers H. & Hawkesford M., 1997. SO₂- Deprivation Has an Early Effect on the Content of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and Photosynthesis in Young Leaves of Wheat. *Plant Physiol.* 115:1231-1239.

Giménez F. & Tomaso J. C., 2008. Evaluación de cultivares de cebada cervecera en Balcarce. Revista Visión Rural. Mejoramiento Genético de Cebada Cervecera INTA EEA Bordenave.

González A., 2008. Técnicas de interés en la mejora de cebadas tolerantes a la sequía y temperaturas elevadas. II. Movilización de fotoasimilados. *Agroecología* 3: 61-65.

Hawkesford M. J. & De Kok L. J., 2006. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment* 29, 382–395.

Haynes R. J., 1986. Mineral nitrogen in the plant-soil system. Academic Press, Orlando (USA). Pp 483.

Heilmeier H., Monson R. K., 1994. Carbon and nitrogen storage in herbaceous plants. In: A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions. J. Roy and E. Garnier (Eds.) SPB Academic Pub. pp. 149-171.

Hesse H., Nikiforova V., Gakière B. & Hoefgen R., 2004. Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, No. 401, pp. 1283-1292.

Hirel B., Le Gouis J., Ney B. & Gallais A., 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58: 2369-2387.

Hoagland D. R. & Arnon D. I., 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station Circular* 347: 1-39.

Howard K. A., Gayler K. R., Eagles H. A. & Halloran G. M., 1996. The relationship between D Hordein and malting quality in barley. *J. of Cereal Sci.* 24, 47-53.

Howarth J., Parmar S., Jones J., Shepherd C. E., Corol D. I., Galster A. M., Hawkins N.D., Miller S.J., Baker J. M., Verrier P. J., Ward J. L., Beale M. H., Barraclough P. V. & Hawkesford M. J., 2008. Co-ordinated expression of amino acid metabolism in response to N and S deficiency during wheat grain filling. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59, No. 13, pp. 3675–3689.

Huxtable, R. J., 1986. Biochemistry of Sulfur. *Plenum Press*, New York.

Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A. J. M., 1997. Genetic approaches in plant physiology. *New Phytologist* 137, 1-8.

Kopriva S. & Rennenberg H., 2004. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55, 1831–1842.

Lapitan N. L. V., Hess A., Cooper B., Botha A. M., Badillo D., Iyer H., Menert J., Close T., Wright L., Hanning G., Tahir M., Lawrence C., 2009. Differentially expressed genes during malting and correlation with malting quality phenotypes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 118: 937-952.

Lawlor D. W., 2002. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*.53: 773-787.

Lexa M. & Cheeseman J. M., 1999. Genetic manipulation of the location of nitrate reduction and its effect on plant growth. In Plant Nutrition - Molecular Biology and Genetics. G. Gissel-Nielsen and A. Jensen (Eds). *Kluwer Academic Publishers*. Netherlands. pp 59-63.

Lunde C., Zygadio A., Toft S. H., Lassen N. P., Blennow A. & Haldrup A., 2008. Sulfure starvation in rice: the effect on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and oxidative stress protective pathways. *Physiologia Plantarum* 134: 508-521.

Luo C., Branlard G., Griffin W. B. & McNeil D. L., 2000. The effect of Nitrogen and Sulphur Fertilisation and their Interaction with Genotype on Wheat Glutenins and Quality Parameters. *Journal of Cereal Science* 31: 185-194.

Marinissen A., Lauric A., Torres Carbonell C., 2009. Hoja informativa de cebada cervecera julio 2009. Agencias de Extensión INTA Bahía Blanca y Coronel Rosales. INTA EEA Bordenave

Marschner H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press, London, 889 pp

Millard P., 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant, Cell and Environment* 11: 1-8.

Molina-Cano J. L., Polo J. P., Sopena A., Voltas J., Pérez-Vendrell A. M. & Romagosa I., 2000. Mechanisms of malt extract development in barleys from different european regions: II. Effect of barley hordein fractions on malt extract yield. *J. Inst. Brew.* 106: 117–123.

Molina-Cano J. L., Romera E., Aikasalo R., Pérez-Vendrell A. M., Larsen J. & Rubió A., 2002. A reappraisal of the differences between scandinavian and spanish barleys: effect of b-glucan content and degradation on malt extract yield in the cv. Scarlett. *J Inst Brew* 108: 221-226.

Monaghan J. M., Scrimgeour C. M., Stein W. M., Zhao F. J. & Evans E. J., 1999. Sulphur accumulation and redistribution in wheat (*Triticum aestivum*): a study using stable sulphur isotope ratios as a tracer system. *Plant Cell Environ.* 22: 831-839.

Monteith J. L., 1977. Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 281: 277-294

Nabors Murray W. Introducción a la botánica. Pearson educación, S. A., Madrid, 2006.

Nikiforova V., Gakie`re B., Kempa S., Adamik M., Willmitzer L., Hesse H., Hoefgen R., 2004. Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulfur metabolism. *J Exp Bot* 55: 1861–1870

Nikiforova V., Kopka J., Tolstikov V., Fiehn O., Hopkins L., Hawkesford M., Hesse H. & Hoefgen R., 2005. Systems Rebalancing of Metabolism in Response to Sulfur Deprivation, as Revealed by Metabolome Analysis of Arabidopsis Plants. *Plant Physiology*. Vol. 138, pp. 304–318.

Paul E. A., Clark F. E., 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Inc. San Diego.

Peltonen J., Rita H., Aikasalo R., & Home S., 1994. Hordein and malting quality in Northern barleys. *Hereditas* 120: 231–239.

Pomeranz Y., Standridge N. N., Hocket E. A., Wesenberg D. M. & Booth G. D., 1976. Effects of nitrogen fertilizer on malting quality of widely varying barley cultivars. *Cereal Chem* 53: 574-585.

Peton A., Prystupa P., Gutiérrez Boem F., Pagano E. A., 2010. Efecto de la deficiencia de azufre y nitrógeno sobre la composición de hordeínas de cebada cervecera. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. La Plata, Septiembre de 2010.

Powlson D. S., 1993. Understanding the soil nitrogen cycle. *Soil use and Management* 9: 86-93.

Raymond E. T. & Hanson A. D., 1979. Amino Acids Translocated from Turgid and Water-stressed Barley Leaves. *Plant Physiology* 64:460-466

Rennenberg H., Schmitz K. & Bergmann L., 1979. Long-distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. *Planta* 147, 57–62.

Rennenberg H., 1984. The fate of excess sulfur in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:121-153.

Rendig V. V., Oputa C. & McComb E .A., 1976. Effects of sulfur deficiency on non-protein nitrogen, soluble sugars, and N/S ratios in young corn (*Zea mays* L.) plants. *Plant Soil* 44:423-437.

Reuveny Z., Dougall D. K. & Trinity P. M., 1980. Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6670-6672.

Rimski-Korsakov H., Rubio G., Lavado R. S., 2004. Potential losses of nitrate by leaching in soils of the Pampas Argentina. *Agricultural Water Management* 65: 83-94.

San Martín N., Navarro C. & Echeverría H., 1987. Determinación de azufre total en material vegetal. *IDIA* 457-462: 40-45.

Savin R., Prystupa P. & Araus J. L., 2006. Hordein composition as affected by post-anthesis source–sink ratio under different nitrogen availabilities. *Journal of Cereal Science* 44: 113–116

Schnug E. & Haneklaus S., 1998. Diagnosis of sulphur nutrition. In *Sulphur in agriculture*, ed. E. Schnug, 1-38. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Schnyder H., 1993. The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain fillin – a review. *New Phytol.* 123: 233-245.

Scott T. & Eagleson M., 1988. *Concise Encyclopedia of Biochemistry*. Walter de Gruyter & Co., Berlin.

Shewry P. R. & Tatham A. S., 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochemical Journal* 267:1-12.

Simic G., Sudar R., Lalic A., Jurkovic Z., Horvat D. & Babic D., 2007. Relationship between hordein proteins and malt quality in barley cultivars grown in Croatia. *Cer. Res. Com.* 35: 1487-1496.

Slack P. T., Baxter E. D. & Wainwright T., 1979. Inhibition by hordein of starch degradation. *J. Inst. Brew.* 85:112-114

Sunarpi & Anderson J. W., 1997. Effect of nitrogen nutrition on remobilization of protein sulphur in the leaves of vegetative soybean and associated changes in soluble sulphur metabolites. *Plant Physiology* 115, 1671–1680.

Taiz & Zeiger., 1998. En: *Plant Physiology*. Ed. Sinauer Associated, Inc. Second Edition. Sunderland, Massachusetts.

Tisdale S. L., Nelson W. L. & Beaton J. D., 1990. *Soil Fertility and Fertilizers*. Macmillan Publishing Company, New York.

Tofiño A., Romero H. M., Ceballos H., 2007. Efectos del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación de almidón. Una revisión. *Agron. Colomb.* Vol.25 no.2.

Varin S., Cliquet J. B., Personeni E., Avice J. C. & Lemauviel-Lavenant S., 2010. How does sulphur availability modify N acquisition of White clover (*Trifolium repens* L.)?. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 1, pp. 225-234.

Vitousek P. M., Aber J. D., Howarth R. W., Likens G. E., Matson P. A., Schindler D. W., Schlesinger W. H. & Tilman D. G., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* 7: 737-750.

Wainwright M., 1984. Sulfur oxidation in soils. *Adv. Agron.* 37:349-396.

Yemm E. W. & Willis A. J., 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *The Biochemical Journal* 57: 508-514.

Yemm E. W. & Cocking E. C., 1955. The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst* 80: 209-213.

Zhao F. J., Hawkesford M. J. & McGrath S. P., 1999. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science.* 30, 1-17.

Zhao F. J., Fortune S., Barbosa V. L., McGrath S. P., Stobart R., Bilsborrow P. E., Booth E. J., Brown A. & Robson P., 2006. Effects of sulphur on yield and malting quality of barley. *Journal of Cereal Science* 43:369-377.