

Efectos de la nutrición fosforada en el metabolismo de nitrógeno de la soja no nodulada

Phosphorus nutrition on nitrogen metabolism of non-nodulated soybean

Brevedan¹ RE, MI Aveldaño², MN Fioretti¹, MA Varillas², SS Baioni¹, HR Mirassón³, IR Palomo¹

Resumen. Se realizaron dos experimentos en el invernáculo para estudiar la influencia de la deficiencia de P en la nutrición con nitrógeno de plantas de soja no nodulada. Hubo una reducción en el contenido de N y P en las plantas deficientes en P (P-) de casi el 50% y del 33% en la materia seca, luego de 50 días. La actividad de la nitrato reductasa y el contenido de nitratos en tallos fueron menores en plantas P- que en aquellas P+. Del total de nitratos en las plantas P-, 75% estuvo en las raíces. La acumulación de nitratos en las raíces sería debido a la menor actividad de la nitrato reductasa en las mismas, y a una disminución en el flujo de agua hacia el vástago. El incremento en la concentración de nitratos en la raíz causaría una retroalimentación negativa que reduciría su absorción por la planta.

Palabras clave: deficiencia de fósforo, nitrato reductasa, absorción de nitratos, movilización de nitratos, interacciones fósforo-nitrógeno.

Abstract. Two experiments were conducted under greenhouse conditions to study the influence of P deficiency on nitrogen nutrition of non-nodulated soybean. There was a reduction of N and P content in P deficient (P-) plants of almost 50% after 50 days. During this period, dry matter of these plants was reduced by 33%. Nitrate reductase activity and shoot nitrate content were lower in P- than in P+ plants. Seventy five percent of nitrates in P- plants were in the roots. Nitrate accumulation in roots would be due to the lower nitrate reductase activity in this organ and a reduced water flux to shoots. Root nitrate concentration increases would cause a negative feedback which would reduce plant nitrate uptake.

Key words: phosphorus deficiency, nitrate reductase, nitrate uptake, nitrate translocation, phosphorus-nitrogen interactions.

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de P es una limitante importante en la producción de un cultivo. Su disponibilidad es esencial para el crecimiento y supervivencia de la planta, siendo uno de los minerales más limitantes, debido a la baja concentración con que se encuentra en el suelo y a su baja solubilidad. Por ello las plantas han desarrollado mecanismos para maximizar su obtención, incluyendo cambios en la arquitectura radical y en su funcionalidad.

Un suministro insuficiente de P puede reflejarse en alteraciones a nivel de desarrollo y del metabolismo de la planta. La deficiencia de P puede causar que más materia seca se particione a las raíces que al vástago (Heuwinkel et al., 1992; Cakmak et al., 1994). Esto conduce a una relación más alta *raíz:vástago* de materia seca (Cakmak et al., 1994) y puede reflejar una modificación en el crecimiento y su partición que permitiría a las plantas deficientes en P a incrementar su nivel de P. Freeden et al. (1989) se-

¹ Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur y CERZOS, CONICET. 8000 Bahía Blanca, Argentina.

² Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. 8000 Bahía Blanca, Argentina.

³ Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa, 6300 Santa Rosa, Argentina.

Address Correspondence to: Dr. Roberto E Brevedan, ebreveda@criba.edu.ar

Recibido/Received 16.XII.2008. Aceptado/Accepted 5.I.2009.

ñalaron una reducción en el área foliar y el peso seco del vástago en plantas deficientes en P.

Los cultivos se enfrentan inevitablemente con disponibilidades muy variables de nutrientes en el suelo. El mantenimiento del balance de nutrientes se relaciona en parte con respuestas de interacción; cuando la absorción de un nutriente cambia, la absorción de otros nutrientes se ajusta de manera similar. El metabolismo del N y del P están vinculados en varios puntos, como por ejemplo en la asimilación (Rufy et al., 1990) y en el transporte de nitratos en el sistema radical (Rufy et al., 1990; Magalhães et al., 1998). En la soja las interacciones entre N y P son especialmente complejas porque el N puede obtenerlo por fijación simbiótica de N_2 ó por absorción de nitratos del suelo.

La nitrato reductasa es la enzima que media la conversión de NO_3^- en NO_2^- . Éste se considera que es el paso que limita la transformación de los nitratos en proteínas. Se ha señalado que el P es un activador de la nitrato reductasa de las hojas de cebada (Oji et al., 1987) y con una deficiencia de P se produce una declinación en la actividad de la nitrato reductasa.

El transporte de nitrato está influido por la disponibilidad de P. Diferentes estudios han mostrado que la absorción y movilización de nitrato de la raíz al vástago aumenta con un mayor suministro de P (Schjørring, 1986; Rufy et al., 1993).

OBJETIVOS

Los objetivos fueron estudiar en plantas de soja no noduladas bajo deficiencia de P (1) el crecimiento, (2) las interacciones entre el N y el P, (3) la distribución de los nitratos y (4) la actividad de la nitrato reductasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dos estudios se llevaron a cabo en dependencias del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur. En el invernáculo se sembró en macetas de 12 L de capacidad el cv. DM 2000 RR de soja, colocando 12 semillas en cada uno de ellos. A los 10 días de la siembra se raleó a 3 plántulas por maceta.

El suelo empleado provino del horizonte superficial de un Haplustol, de textura franco arenosa y con un contenido de fósforo (Bray I) de 7 ppm.

Se aplicaron dos tratamientos: P- y P+. En P- se utilizó el suelo antes citado. En P+ se usó el mismo suelo pero fertilizado con un equivalente de 80 kg/ha de fosfato de potasio.

Se cosechó en tres oportunidades, a los 12, 25 y 50 días después del raleo, cuando se separaron las láminas foliares, peciolas, tallos y raíces. El suelo fue lavado cuidadosamente para obtener las raíces. Las muestras se secaron por 48 hs a 70°C y se pesaron.

La conductancia estomática se registró con un porómetro Delta-T AP4 sobre la última hoja totalmente desarrollada.

Se determinó el nitrógeno total por el procedimiento semimicroKjeldahl (Nelson y Sommers, 1973), el fósforo total (Murphy

y Riley, 1962) y nitratos (Cataldo et al., 1975). La actividad de la nitrato reductasa se midió de acuerdo a Jaworsky (1971).

Se hicieron 6 repeticiones por tratamiento y por fecha de muestreo.

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y los promedios comparados con la prueba SNK.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con bajos niveles de P se produjeron varios ajustes fisiológicos. Hubo una disminución del 33% en el crecimiento total de la planta deficiente en P a los 50 días (Tabla 1). La distribución de la materia seca a lo largo de las fechas de muestreo entre el vástago y las raíces no tuvo diferencias apreciables en los tratamientos con y sin deficiencia de P. Sin embargo, en las plantas P- el porcentaje de materia seca dirigido a las raíces fue mayor que en las plantas P+. Este incremento en la partición de la materia seca a la raíz también fue observada por Breeze et al. (1984), Fredeen et al. (1989), Aloni et al. (1991) y Cakmak et al. (1994). Las raíces fueron más competitivas que los vástagos por los fotosintatos. Esto lleva a una exportación más alta de carbohidratos a las raíces, con un consiguiente aumento en la relación de materia seca entre la raíz y el vástago (Rufy et al., 1993; Cakmak et al., 1994).

Tabla 1. Peso seco, N y P en los diferentes órganos de las plantas de soja bajo los tratamientos con (P-) y sin (P+) deficiencia de P.

Table 1. Dry weight, N and P in different soybean plant organs under treatments with (P-) and without (P+) P deficiency.

	Días	P+			P-		
		T+P ⁽¹⁾	Lf ⁽²⁾	R ⁽³⁾	T+P	Lf	R
Peso seco (g)	12	0,09 a*	0,12 a	0,06 a	0,06 b	0,10 a	0,05 a
	25	0,80 a	1,32 a	0,73 a	0,61 a	0,96 b	0,58 a
	50	2,64 a	3,76 a	2,39 a	1,72 b	2,31 b	1,81 b
P (%)	12	2,42 a	2,60 a	3,22 a	1,82 b	2,30 a	2,80 b
	25	2,20 a	2,54 a	2,94 a	1,65 a	1,89 b	2,35 b
	50	1,82 a	2,81 a	2,45 a	1,22 b	1,96 b	1,75 b
N (%)	12	2,20 a	4,83 a	2,82 a	1,94 a	4,30 a	2,64 a
	25	2,04 a	4,69 a	2,61 a	1,69 a	3,89 b	2,35 a
	50	1,89 a	4,46 a	2,37 a	1,45 b	3,42 b	2,01 b

⁽¹⁾Tallos + peciolas, ⁽²⁾Láminas foliares, ⁽³⁾Raíces.

* Promedios para un mismo parámetro, órgano y fecha seguidos por la misma letra no difieren significativamente con la prueba de SNK al 5%.

⁽¹⁾Stems and petioles, ⁽²⁾Leaf blades, ⁽³⁾Roots.

* Averages for the same parameter, organ and date followed by the same letter are not significantly different with the SNK test (at the 5% level).

Fredeen et al. (1989) señalaron que plantas de soja deficientes en P contienen una concentración de almidón varias veces más altas en las hojas en expansión y en las raíces que las plantas no deficientes. Esto indica que el proceso de crecimiento está más restringido que la capacidad de fotosintetizar.

El contenido total de P en las plantas deficientes en P disminuyó progresivamente desde el 71 al 51% con respecto a las plantas P+ (Tabla 1). La caída del contenido de P en los órganos de las plantas P- respecto a las P+ fue ligeramente mayor en las raíces que en las láminas foliares. La proporción de P en las raíces varió entre el 21 al 26% del total de la planta en los diferentes tratamientos.

Se observó una disminución en el contenido total de N en las plantas con deficiencia de P respecto a las P+ que varió entre el 75 y 51% a los 12 y 50 días, respectivamente (Tabla 1). La relación del contenido de N en raíz:vástago aumentó a medida que se extendió el período de la cosecha y fue mayor en las plantas P- que en las P+.

Como nutrientes muy importantes, el N y el P están íntimamente involucrados en el metabolismo y crecimiento de las plantas y existen numerosos puntos de interacción entre los procesos dependientes de ambos nutrientes. Por tanto se podría esperar que en plantas que no tienen un buen suministro de P la asimilación del N podría estar afectada significativamente (Jeschke et al., 1996).

La relación N:P en los diferentes tratamientos varió de 14,4 a 15,3 con un promedio de 15,0. Los resultados obtenidos sugieren que hay una estrecha relación en la acumulación de N y P en la soja. Se estableció una buena correlación entre el P de la planta con el N de la misma ($r=0,82$). Esto apoyaría el concepto que hay mecanismos fisiológicos que regulan una acumulación proporcional del N y el P en la soja.

La deficiencia de P provoca un deterioro en el metabolismo del nitrógeno, principalmente por una marcada disminución de la actividad de la nitrato reductasa. El mejoramiento en la nutrición fosforada aumentó la actividad de la nitrato reductasa (Tabla 2), como fuera observado en trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) (Oliver et al., 1983) y en *Vigna radiata* (Sekhon et al., 1990).

La actividad de la nitrato reductasa fue más alta en la primera cosecha, seguida por una actividad mucho menor en las cosechas siguientes (Tabla 2). De los órganos de la planta, el que tuvo la mayor disminución en la actividad de la nitrato reductasa en plantas deficientes en P respecto a las P+, fue la raíz. El órgano que tuvo la mayor disminución en la actividad a lo largo del tiempo fue la lámina foliar tanto en plantas P- como en las P+.

En las plantas P- hubo un menor contenido de nitrato lo que estuvo acompañado por una alteración en el transporte de los mismos de la raíz al vástago (Tabla 2). En las plantas P+ hubo más nitrato en el vástago, alrededor del 50% del total de la planta, mientras que en las plantas con deficiencia de P hubo hasta un 75% de los nitratos en la raíz (Tabla 2). Estos resultados indicarían un menor movimiento de los nitratos hacia la parte aérea de la planta. Radin y Matthews (1989) señalaron que las plantas con deficiencia de P y una menor tasa transpiratoria tenían una expansión foliar limitada por una reducción del flujo de agua al vástago, lo que fue consistente con la reducción observada en la conductancia estomática de las plantas deficientes en P (Tabla 3).

Tabla 2. Nitrato reductasa y nitratos en los diferentes órganos de las plantas de soja bajo los tratamientos con (P-) y sin (P+) deficiencia de P.

Table 2. Nitrate reductase and nitrates in different soybean plant organs under treatments with (P-) and without (P+) P deficiency.

	Días	P+			P-		
		T+P ⁽¹⁾	Lf ⁽²⁾	R ⁽³⁾	T+P	Lf	R
Nitrato reductasa ($\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g peso fresco / h}$)	12	1,81 a*	8,12 a	2,14 a	1,59 a	6,90 b	1,45 b
	25	1,56 a	5,27 a	1,95 a	1,22 a	3,89 b	1,17 b
	50	1,34 a	4,15 a	1,79 a	0,91 b	2,82 b	0,98 b
Nitratos ($\mu\text{mol/g}$)	12	527 a	187 a	724 a	365 b	127 a	602 a
	25	502 a	132 a	678 a	342 a	104 a	846 a
	50	325 a	71 a	477 a	196 b	65 a	813 a

⁽¹⁾Tallos + pecíolos, ⁽²⁾Láminas foliares, ⁽³⁾Raíces.

* Promedios para un mismo parámetro, órgano y fecha seguidos por la misma letra no difieren significativamente con la prueba de SNK al 5%.

⁽¹⁾Stems and petioles, ⁽²⁾Leaf blades, ⁽³⁾Roots.

* Averages for the same parameter, organ and date followed by the same letter are not significantly different with the SNK test (at the 5% level).

Tabla 3. Conductancia estomática (cm/s) de plantas de soja bajo los tratamientos con (P-) y sin (P+) deficiencia de P.

Table 3. Stomatal conductance (cm/s) of soybean plants under treatments with (P-) and without (P+) P deficiency.

	Tiempo (días)				
	10	20	30	40	50
P+	0,82 a*	0,78 a	0,62 a	0,59 a	0,60 a
P-	0,69 b	0,66 b	0,60 a	0,56 a	0,55 b

* Promedios para una columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente con la prueba de SNK al 5%.

* Averages within a column followed by the same letter are not significantly different with the SNK test (at the 5% level).

La absorción y movilización de nitratos fueron inhibidas en plantas de cebada con deficiencia de P (Rufy et al., 1990). La inhibición varió entre 38 y 65%. La disminución del flujo de nitratos en las plantas de cebada no se debió a una declinación en el metabolismo radical y precedió a cambios detectables en el crecimiento. Hubo una asociación entre la respuesta del flujo de NO_3^- y la caída en la concentración de P de la raíz, lo que sugiere una conexión regulatoria (Rufy et al., 1991).

Una disminución en la absorción de NO_3^- bajo una deficiencia de P ha sido señalada por varios autores (Lee, 1982; Schjørring, 1986; Rufy et al., 1991; Gniazdowska et al., 1999). Se piensa que esta respuesta se origina en una variedad de disturbios metabólicos que involucran no sólo reacciones energéticas, bajos niveles de ATP que restringen el transporte activo de nitratos o limitan la síntesis de transportadores del nitrato (Rufy et al., 1993) sino también debido a reacciones regulatorias acopladas.

Lee (1982) señaló que los productos de la asimilación del N, antes que los sustratos, gobiernan la tasa de absorción del N. De tal manera, la acumulación de nitratos bajo una defi-

ciencia de P puede restringir una absorción adicional de nitratos (Rufty et al., 1993). La posibilidad de una retroalimentación negativa en la absorción de nitratos también fue señalada por Schjørring (1986). La excesiva acumulación de NO_3^- en la raíz (Tabla 2) parece ser el estímulo primario de una retroalimentación negativa y una regulación depresiva del proceso de absorción de los nitratos (Siddiqi et al., 1989).

Los efectos regulatorios del P en el proceso de absorción de los nitratos tuvieron un impacto en el contenido de N en la planta puesto que la concentración de N_{total} y nitratos en la raíz fueron significativamente menores a los del control con un mayor nivel de P (Tablas 1 y 2).

Entre los efectos que la deficiencia de P ejerce en la economía de los nitratos de la planta se incluyen (Jeschke et al., 1997): (1) la absorción de nitratos por las raíces disminuye. Hay una menor absorción por unidad de área superficial o masa de las raíces (Schjørring, 1986; Rufty et al., 1990); (2) una depresión de la reducción del nitrato en la raíz (Tabla 2), y (3) la movilización de los nitratos de la raíz al vástago disminuye, lo que conduce a un aumento en la concentración de nitratos en las raíces con una baja disponibilidad de P (Tabla 2).

CONCLUSIONES

Bajo la deficiencia de P se produjo una reducción en la actividad de la nitrato reductasa y un aumento en la resistencia estomática, que con la menor concentración de nitratos en el vástago sugieren una menor movilización de los nitratos hacia la parte aérea de la planta, lo que originaría una acumulación de nitratos en las raíces. Este incremento en la concentración de los nitratos causaría una retroalimentación negativa que reduciría la absorción de más nitratos por la planta.

Se observó una buena correlación entre los contenidos de P y N de las plantas, lo que indica una acumulación proporcional de ambos elementos en la planta.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado con un subsidio otorgado por la Universidad Nacional del Sur.

REFERENCIAS

- Aloni, B., T. Pashkar y L. Karnia (1991). Nitrogen supply influences carbohydrate partitioning of pepper seedlings and transplant development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 995-999.
- Breeze, V.G., A. Wild, M.J. Hopper y L.H.P. Jones (1984). The uptake of phosphate by plants from flowing nutrient solution. II. Growth of *Lolium perenne* L. at constant phosphate concentrations. *Journal of Experimental Botany* 35: 1210-1221.
- Cakmak, I., C. Hengeler y H. Marschner (1994). Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. *Journal of Experimental Botany* 45:1245-1250.
- Cataldo, D.A., M. Haroon, L.E. Schrader y V.L. Youngs (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80.
- Fredeen, A.L., I.M. Rao y N. Terry (1989). Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. *Plant Physiology* 89: 225-230.
- Gniazdowska, A., A. Krawczak, M. Mikulska y A.M. Rychter (1999). Low phosphate nutrition alters bean plants ability to assimilate and translocate nitrate. *Journal of Plant Nutrition* 22: 551-563.
- Heuwinckel, H., E.A. Kirkby, J. LeBot y H. Marschner (1992). Phosphorus deficiency enhances molybdenum uptake by tomato plants. *Journal of Plant Nutrition* 15: 549-568.
- Jaworski, E.G. (1971). Nitrate reductase assay in intact plant tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43: 1274-1279.
- Jeschke, W.D., A.D. Peuke, E.A. Kirkby, J.S. Pate y W. Hartung (1996). Effects of P deficiency on the uptake, flows and utilization of C, N and H_2O within intact plants of *Ricinus communis* L. *Journal of Experimental Botany* 47: 1737-1754.
- Jeschke, W.D., E.A. Kirkby, A.D. Peuke, J.S. Pate y W. Hartung (1997). Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Journal of Experimental Botany* 48: 75-91.
- Lee, R.B. (1982). Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. *Annals of Botany* 50:429-449.
- Magalhães, J.V. de, V.M.C. Alves, R.F. de Novais, P.R. Mosquim, J.R. Magalhães, A.F.C. Bahia Filho y D.M. Huber (1998). Nitrate uptake by corn under increasing periods of phosphorus starvation. *Journal of Plant Nutrition* 21: 1753-1763.
- Murphy, J. y J.P. Riley (1962). A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.
- Nelson, D.W. y L.E. Sommers (1973). Determination of total nitrogen in plant material. *Agronomy Journal* 65: 109-112.
- Oji, Y., Y. Ryoma, N. Warkuchi y S. Okamoto (1987). Effect of inorganic orthophosphate on *in vitro* activity of NADH nitrate reductase isolated from 2-row barley leaves. *Plant Physiology* 83: 472-474.
- Oliver, A.J., S.E. Smith, D.J.D. Nicholas, W. Wallace y F.A. Smith (1983). Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum*: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytologist* 94: 63-79.
- Radin, J.W. y M.A. Matthews (1989). Water transport properties of cortical cells in roots of nitrogen- and phosphorus-deficient cotton seedlings. *Plant Physiology* 89: 264-268.
- Rufty, Jr., T.W., C.T. MacKown y D.W. Israel (1990). Phosphorus stress effects on assimilation of nitrate. *Plant Physiology* 94: 328-333.
- Rufty, Jr., T.W., D.W. Israel, R.J. Volk, J. Qiu y S.A. Tongmin (1993). Phosphate regulation of nitrate assimilation in soybean. *Journal of Experimental Botany* 44:879-891.
- Rufty, Jr., T.W., M.Y. Siddiqi, A.D.M. Glass y T.J. Ruth (1991). Altered $^{15}\text{NO}_3^-$ influx in phosphorus limited plants. *Plant Science* 76: 43-48.
- Schjørring, J.K. (1986). Nitrate and ammonium absorption by plants growing at sufficient or insufficient level of phosphorus in nutrient solutions. *Plant and Soil* 91: 313-318.
- Sekhon, B.S., S. Thapar, A. Atwal y R. Singh (1990). Effect of foliar application of urea on the enzymes and metabolites of nitrogen metabolism in mycorrhizal moong plants under different phosphorus levels. *Plant Physiology and Biochemistry* 28: 393-397.
- Siddiqi, M.Y., A.D.M. Glass, T.J. Ruth y M. Fernando (1989). Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using $^{15}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiology* 93: 1426-1432.