

# EFFECTO DEL ALUMINIO EN LA PRODUCCIÓN DE MATERIA SECA Y EN LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE DOS VARIEDADES DE TRIGO, CRECIENDO EN SOLUCIONES NUTRITIVAS

Felipe Gallardo A.<sup>1</sup>, Mario Pino B<sup>1</sup>., Marysol Alvear Z<sup>1</sup> y Fernando Borie B<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera. Casilla 54-D. Temuco. Chile. Correspondencia: [gallardo@ufro.cl](mailto:gallardo@ufro.cl)

## Effect of aluminium on dry matter production and nitrate reductase activity of two wheat genotypes, growing in nutritive solutions

**Key words:** aluminum toxicity, wheat, nitrate reductase, nutrient solution.

### ABSTRACT

Two native wheat genotypes (Pitufo and Perquenco) with different Al tolerance were grown in nutrient solution under a growth chamber with and without the addition of Al and adjusted to pH 4.8. As control a nutrient solution adjusted to pH 6.0 without Al addition was considered. After 20 days, nitrate reductase activity of shoots was determined. Root length and dry matter of roots at high concentration of Al were also measured. Acidity decreased root length of both genotypes. Pitufo genotype was more tolerant to Al and low pH than Perquenco one. However, nitrate reductase activity of Perquenco genotype was significantly decreased by both Al and pH.

**Palabras claves:** Toxicidad de aluminio (Al), trigo, nitrato reductasa, solución nutritiva.

### RESUMEN

Los cultivares de trigo Pitufo y Perquenco se cultivaron en solución nutritiva, en cámara de crecimiento, tanto en presencia como en ausencia de aluminio, con pH ajustado a 4,8. Se consideró como control la solución nutritiva con pH 6,0, en ausencia de Al. Después de 20 días se determinó, en las plantas, la actividad nitrato reductasa. Se midió la longitud radical y la materia seca, tanto de la raíz como de la parte aérea y en altas concentraciones de Al. Se observó que el sistema radical de ambos cultivares fue afectado cuando se redujo de 6,0 a 4,8 el pH de la solución nutritiva, siendo el cultivar Perquenco el más sensible frente a la presencia de Al. El cultivar Pitufo resultó ser más tolerante frente al Al y a la disminución del pH. Sin embargo, la actividad nitrato reductasa en el cultivar Perquenco experimentó una disminución mayor que en el cultivar Pitufo, tanto por la presencia de Al como por la disminución de pH.

## INTRODUCCIÓN

La toxicidad de aluminio es el principal factor limitante del crecimiento de las plantas en los suelos ácidos (Dong et al., 2002; Mora et al., 2000; Rout et al., 2001). La IX Región de Chile posee una superficie aproximada de 1.530.000 há de uso potencial agropecuario, de los cuales 870.000 há corresponden a praderas y las restantes a cultivos anuales. Del total de la superficie sembrada en el país, la temporada 2004/2005, el trigo representa un 62,1 %, la avena un 14,3 %, la cebada un 4,4 %, el lupino un 9,1 % y el raps un 2,8% (ODEPA, 2005).

Actualmente se observa una disminución de la productividad de algunos suelos derivados de cenizas volcánicas en la IX y X Regiones de nuestro país. Ello podría ser una consecuencia de la acidez, toxicidad de aluminio y/o bajo contenido de Ca y Mg en el suelo. Por otra parte, el uso indiscriminado y/o inadecuado de fertilizantes amoniacales ha agudizado el problema de la acidificación de los suelos de esas regiones (Rodríguez, 1993; Suarez, 1994).

Los síntomas de fitotoxicidad de Al no siempre se correlacionan con una concentración crítica de Al en el medio de crecimiento (Cameron et al., 1986) Así, aunque la presencia de Al es claramente importante en la expresión de la respuesta al daño por parte de este elemento, otros factores del medio tales como, pH, formación de precipitados insolubles, efectos protectores de iones, fuerza iónica de la solución, presencia de ligantes quelantes, genotipo de la planta y especies vegetales, pueden también actuar en la modificación de la respuesta de la planta al aluminio (Gallardo et al., 1999). Algunos de estos factores químicos se pueden comprender, en mejor forma, si se consideran los efectos que tiene la especiación de Al, la que varía según el pH (Kinraide, 1991), ya que las especies tóxicas de Al son función del pH y afectan en distinto grado a especies vegetales y variedades dentro de una misma especie, siendo Al<sup>+3</sup> la especie más tóxica, la cual es conocida como Al lábil.

El principal efecto de la toxicidad de Al es la restricción del desarrollo radical, por lo cual la planta reduce el volumen de suelo que puede explorar, disminuyendo de este modo la absorción de nutrientes, de agua y reduciendo la producción de materia seca total.

El metabolismo nitrogenado es afectado por la presencia de Al, reduciendo principalmente la actividad de la nitrato reductasa (Sharma and Dubey, 2005), enzima que participa en la conversión de nitrato a nitrito en plantas en presencia de un cofactor que actúa como donador fisiológico de electrones para la realización de esta reducción en eucariontes (Hoff et al., 1992).

Dos tipos de nitrato reductasa (NR) han sido reconocidas en organismos eucarióticos. La mayoría de las NR son específicas para el cofactor nicotinamida adeninucleótido reducido (NADH), y sólo unas pocas son dependientes de nicotinamida adeninucleótido fosfato reducido (NADPH) (Hoff et al., 1992).

La NR contiene varios grupos prostéticos, incluyendo Flavina adeninucleótido (FAD), citocromo y molibdeno. En cuanto a la localización de la reducción de nitrato dentro de la planta, ésta puede ser específica, dependiendo de la especie vegetal (Smirnov and Stewart, 1985). En la mayoría de las especies la reducción de nitrato se observa a nivel de las raíces y de los brotes. La proporción de reducción en cada localización depende de varios factores, entre otros, del nivel de nitrato suministrado, la especie y la edad de la planta.

La mayoría de las enzimas nitrato reductasa de plantas superiores son nitrato inducibles. Esto implica que la actividad de la NR, las proteínas de NR y el ácido ribonucleico mensajero (RNA mensajero) de la NR, se incrementan en respuesta al nitrato. Las NR están en bajos niveles en plantas que no han recibido nitrato (Timpo and Neira, 1983), pero ellas pueden ser inducidas en pocas horas por la adición de nitrato (Zhu et al., 2005).

La absorción preferencial de  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  está involucrada en el comportamiento diferencial de genotipos con relación a la tolerancia a Al. Que ocurra una disminución en la absorción de  $\text{NO}_3^-$  por efecto de la presencia de Al es evidencia de la inhibición inducida por el Al en la absorción de aniones (Foy, 1988; Galvez et al., 1991).

Por último, resulta interesante mencionar que la luz visible por largo tiempo ha sido reconocida por tener un efecto estimulador sobre la actividad de la NR en plantas verdes. Tanto la intensidad como la duración de la luz afectan el nivel de la enzima (Keltjens and Nijënstein, 1987; Munzarova et al., 2006).

El objetivo de este estudio fue comparar el efecto de diferentes niveles de Al en la producción de materia seca y en la longitud radicular de dos variedades de trigo y en la actividad nitrato reductasa presente en las hojas del vegetal, en soluciones nutritivas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Dos cultivares de trigo (*Triticum Aestivum L.*) fueron utilizados en este experimento, Pitufo (Baer) y Perquenco (INIA). Semillas de ambos cultivares fueron esterilizadas utilizando  $\text{HgCl}_2$  y germinadas en bandejas con arena lavada. Después de 5 días se seleccionaron 6 plántulas de similar crecimiento y se colocaron en macetas de 1 litro de capacidad, conteniendo solución nutritiva con los siguientes iones: 0,75 K; 1,27 Ca; 0,27 Mg; 0,12 S- $\text{SO}_4$ ; 0,10 P- $\text{HPO}_4$ ; 3,75 N- $\text{NO}_3$ ; 0,31 N- $\text{NH}_4$  en mM y 58,5 Cl; 53,9 Na; 17,9 Fe; 6,6 B, 2,4 Mn; 0,6 Zn, 0,2 Cu y 0,1 Mo en  $\mu\text{M}$  (Taylor and Foy, 1985).

Se adicionó Al en la forma de  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  considerando como tratamiento 0, 100, 150 y 200,  $\mu\text{M}$ . El pH de la solución nutritiva se ajustó a 4,8 y 6,0 (0, 1 unidades, respectivamente).

El experimento se realizó en una cámara de crecimiento con una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y un fotoperíodo de 16 horas, ajustando el pH cada dos días y cambiando la solución nutritiva cada 7 días según dis-

minución del macronutriente limitante (P). Después de 20 días se puso término al experimento, se determinó la actividad de la enzima nitrato reductasa en las hojas de las plantas. Además, las plantas fueron divididas en parte aérea y raíz, determinándose el largo radical. Luego, las plantas se colocaron en estufa a 65°C por un período de 48 horas, determinándose el peso seco tanto de la raíz como de la parte aérea.

Del extremo terminal de cada hoja de trigo se cortaron pequeños trozos para obtener masa del orden de 0,250 g. El material vegetal se colocó en matraces erlenmeyer de 25 mL que contenían 5,0 mL de medio de incubación consistente en tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0, n-propanol 5,0 % y  $\text{KNO}_3$  50 mM (Jaworsky, 1971).

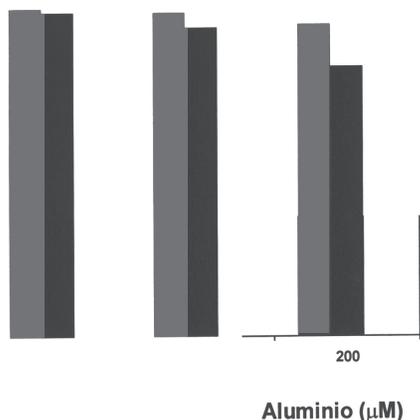
Cada erlenmeyer se colocó en un desecador de vidrio en el cual se sometió a un vacío de 50 cm de Hg durante 1 min. Se interrumpió el vacío por 1 min y se repitió la operación de vacío por 1 min adicional (Harper and Hageman, 1972). Posteriormente, cada matraz se incubó en un baño termostático a 30 °C, en oscuridad, durante 40 min. La elección del tiempo de incubación se hizo en base a ensayos previos (datos no mostrados), en los que se analizó la liberación de nitritos al medio en función del tiempo de incubación, resultando ser máxima a los 40 min. Finalizada la incubación, la reacción fue detenida colocando una alícuota de la solución incubada en un tubo de ensayo que contenía 1,0 mL de sulfanilamida al 1,0 % y 1,0 mL de diclorato de N-1-naftil-etilendiamina al 0,02 %. La mezcla se completó con agua destilada hasta un volumen de 5,0 mL y después de agitar vigorosamente se dejó desarrollar color durante 15 min, a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV - 150-02. Para la cuantificación del nitrito formado se utilizó una curva patrón preparada con una solución estándar de  $\text{KNO}_2$  en tampón fosfato de potasio. La actividad de la nitrato reductasa se expresó en (moles de nitrito formado por  $\text{g}^{-1}$  por hora<sup>-1</sup>).

El diseño experimental correspondió al arreglo factorial de dos cultivares de trigo, dos niveles de pH y cuatro niveles de aluminio, en un diseño enteramente al azar con tres repeticiones. Se analizaron los datos considerando las medias de: longitud radical, materia seca de parte aérea y raíz y actividad nitrato reductasa de las planta crecida en cada maceta, según el test de Duncan.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

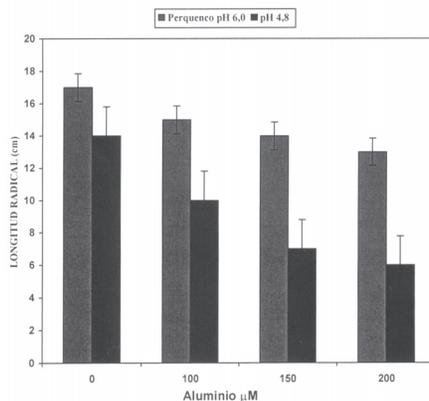
Las dos variedades de trigo cultivadas en solución nutritiva a pH 4,8 en ausencia de Al, presentaron un sistema radical reducido. Los distintos niveles de Al no afectaron significativamente la longitud radical de el cultivar Pitufo, contrariamente a el cultivar Perquenco la que redujo significativamente su sistema radical frente a la más alta concentración de Al ensayada (Figuras 1 y 2).

La respuesta diferencial a Al de una de las variedades de trigo concuerda con lo publicado en investigaciones previas (Gallardo et al., 1999; Rout et al., 2001).



**Figura 1.** Longitud Radical de trigo cultivar Pitufo en función de 2 niveles de pH y 4 niveles de Al, creciendo en soluciones nutritivas ( $p < 0,05$ ).

**Figure 1.** Root length of Pitufo wheat genotype in relation to pH and 4 levels of Al, growing in nutritive solutions ( $p < 0.05$ ).



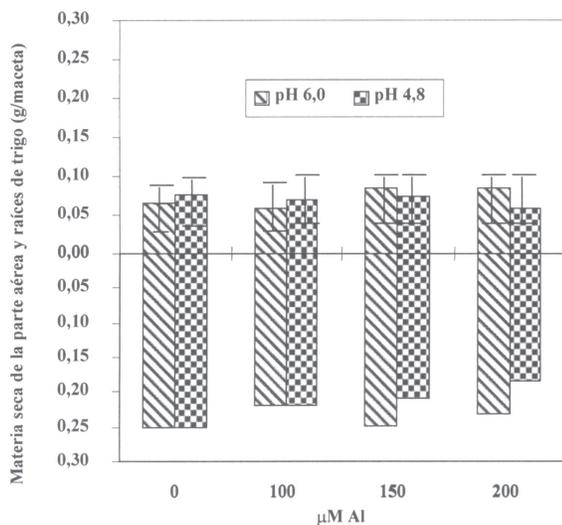
**Figura 2.** Longitud Radical de trigo cultivar Perquenco en función de 2 niveles de pH y 4 niveles de Al, creciendo en soluciones nutritivas ( $p < 0,05$ ).

**Figure 2.** Root length of Perquenco wheat genotype in relation to pH and 4 levels of Al, growing in nutritive solutions ( $p < 0.05$ ).

Es conocido que el efecto fitotóxico se manifiesta principalmente en el sistema radical de las plantas, sin embargo; también puede verse afectada la parte aérea, considerando que la planta sufre una reducción en la disponibilidad de nutrientes y por lo tanto, una reducción en el desarrollo vegetal total.

Existe una marcada reducción del peso de materia seca de la parte aérea, principalmente de el cultivar Perquenco (Fig. 3), cuando las plantas fueron cultivadas en solución nutritiva conteniendo 200 µM de Al. Los niveles 100 y 150 µM de Al, también afectaron el crecimiento de las plantas aunque su efecto fue menor.

El cultivar Perquenco mostró una reducción significativa de su sistema radical en presencia de 200 µM de Al, no presentando respuestas a niveles inferiores de Al (100 µM de Al), como se aprecia en la Fig. 4.

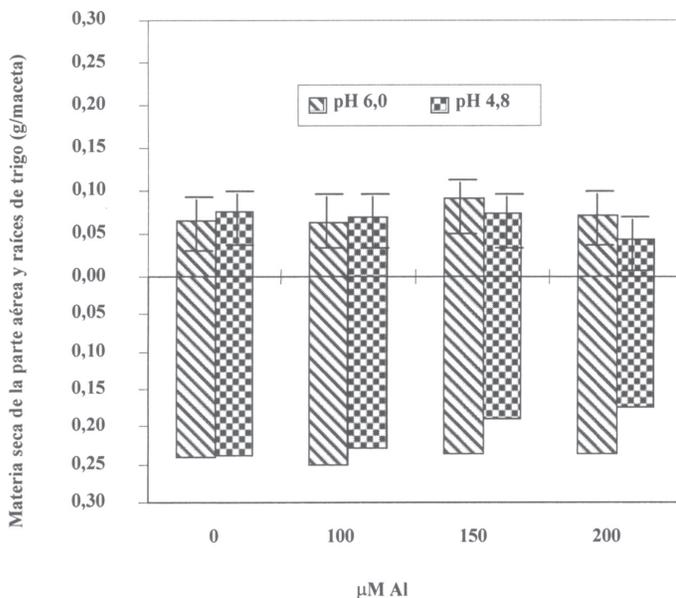


**Figura 3.** Materia Seca de la parte aérea y raíz total en función de pH y 4 niveles de Al en la variedad de trigo Pitufo, creciendo en soluciones nutritivas ( $p < 0,05$ ).

**Figure 3.** Shoot and root dry matter of Pitufo wheat genotype as a pH function and 4 levels of Al, growing in nutritive solutions ( $p < 0.05$ ).

Existen diferencias en los trabajos publicados en relación con la actividad del aluminio tóxico; de ahí que algunos autores han obtenido respuesta con niveles de 30 a

50  $\mu\text{M}$ , en cambio otros, (Cameron et al., 1986) obtienen respuestas con niveles de 3000  $\mu\text{M}$ . Sin duda que esta variación en los niveles críticos de Al tiene como uno de los

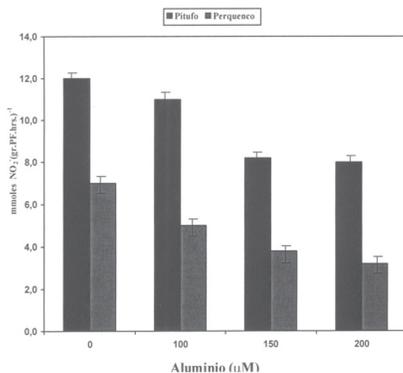


**Figura 4.** Materia Seca de la parte aérea y raíz total en función de pH y 4 niveles de Al en la variedad de trigo Perquenco, creciendo en soluciones nutritivas ( $p < 0,05$ ).

**Figure 4.** Shoot and root dry matter of Perquenco wheat genotype as a pH function and 4 levels of Al, growing in nutritive solutions ( $p < 0.05$ ).

factores principales la presencia y concentración de iones en la solución nutritiva. De hecho, bajo las mismas condiciones de cultivo de estas variedades, utilizando niveles inferiores de Al (0-50  $\mu\text{M}$ ), las plantas no presentaron respuesta a Al (Gallardo et al., 1999).

En la Fig. 4 se observa que la actividad NR en el cultivar Pitufu presenta los mayores valores cuando el medio de cultivo carece de Al y que la actividad enzimática tiende a disminuir a medida que se produce un aumento de la concentración de Al. Por su parte, en la misma figura se observa que la actividad NR en el cultivar Perquenco es afectada significativamente al reducir el pH de la solución nutritiva, tanto en ausencia como en presencia de Al. Estos mismos resultados se han obtenido anteriormente con otra variedad sensible de trigo, el cultivar Antilhue. Estudios realizados por Sharma and Dubey (2005), evidencian lo anteriormente señalado, donde con altos niveles de  $\text{Al}^{3+}$  (160  $\mu\text{M}$ ), decrece la actividad NR y el estado de activación de la NR.



**Figura 5.** Actividad Nitrato Reductasa en dos variedades de trigo y 4 niveles de Al, a pH 4,8 creciendo en soluciones nutritivas ( $p < 0,05$ ).

**Figure 5.** Nitrate reductase activity of two wheat genotypes growing in nutritive solutions ( $p < 0.05$ ) at 4 levels of Al and pH 4.8.

De las figuras también se desprende, que la actividad enzimática tendió a disminuir a medida que se produjo un aumento de la concentración de Al. Estas observaciones y/o resultados concuerdan con los reporta-

dos por Foy, (1988), los cuales señalan que la actividad NR de dos cultivares de trigo, descienden al aumentar la concentración de Al en la solución nutritiva. Este descenso en la actividad NR, frente a dosis crecientes de Al, también ha sido reportada en otros cultivares como el sorgo (Keltjens and Nijënstein, 1987). Por su parte, Rout et al., (2001) y, Vouillot et al., (1996), llegaron a la conclusión que las diferencias en las actividades enzimáticas observadas en los dos genotipos de trigo sometidos a estudio, están asociadas con una tolerancia diferencial en relación al aluminio. De igual modo, una mayor tolerancia frente a aluminio en algunos genotipos de trigo está bien caracterizada por la habilidad para usar nitrato en la presencia de amonio y por incrementar el pH del medio de cultivo. Estas evidencias sugieren que el metabolismo del nitrógeno estaría involucrado en la tolerancia diferencial frente a Al. De esta forma Zhu et al., (2005), menciona que la reducción de nitrato y nitrito en la actividad reductasa son causantes de la inhibición de asimilación de nitrógeno, lo cual podría ser una razón importante de la inhibición en el crecimiento de la raíz.

## CONCLUSIONES

Los cultivares Pitufu y Perquenco mostraron su sistema radical afectado cuando se redujo el pH de la solución nutritiva de 6,0 a 4,8 y cuando se elevó la concentración de aluminio de 0 a 200  $\mu\text{M}$ .

El cultivar Perquenco fue sensible a los distintos niveles de Al, no así el cultivar Pitufu. La producción de materia seca de la parte aérea de ambos cultivares no presentó respuesta significativa a la presencia de Al, excepto a altas concentraciones de aluminio.

La actividad de la enzima nitrato reductasa presente en los diferentes cultivares de trigo sometidos a estudio, presentó una disminución significativa a medida que en el medio de cultivo aumentaron los niveles de aluminio.

El nivel de actividad de la enzima nitrato reductasa en los diferentes cultivares de trigo, permitió discriminar su tolerancia diferencial frente a la acidez causada por el aluminio.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda financiera otorgada a través del proyecto FONDECYT 1040854.

## BIBLIOGRAFÍA

- CAMERON, R.S., RITCHIE, G.S.P., ROBSON, A.D. 1986. Relative toxicities of inorganic aluminum complexes to barley. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50:1231-1237.
- DONG, B., SANG, W.L., JIANG, X., ZHOU, J.M., KONG, F.X., HU WANG, L.S. 2002. Effects of aluminum on physiological metabolism and antioxidant system of wheat (*Triticum aestivum* L.): *Chemosphere* (47/1): 87-92.
- FOY, C.D. 1988: Plant adaption to acid, aluminium-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 19, 959-987.
- GALLARDO, F., BORIE, F., ALVEAR, M. von BAER, E. 1999. Evaluation of aluminium tolerance of three cultivars by two short-term screening methods and field experiments. *Soil Sci. Plant Nut.* 45(3): 713-719.
- GALVEZ, L., CLARK, R.B., KLEPPER, L.A., L. HANSEN. 1991. Organic acid and free proline accumulation and nitrate reductase activity in sorghum (*Sorghum Bicolor*) genotypes differing in aluminum tolerance. *Plant Soil Interactions at low pH*: 859-867.
- HARPER, J.E. AND HAGEMAN, R.H.. 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine Max L. Merr*). *Plant Physiol.* 49:146-154.
- HOFF, T., STUMMANN, B.M., HENNINGSSEN, K. W. 1992. Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiologia Plantarum* 84:616-624.
- JAWORSKY, E.G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43(6): 1274-1279.
- KELTJENS, W.G. AND NIJENSTEIN, J.H. 1987. Diurnal variations in uptake, transport and assimilation of  $\text{NO}_3^-$  and efflux of  $\text{OH}^-$  in maize plants. *Plant Nutr.* 10(8):887-900.
- KINRAIDE, T.B. 1991. Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant and Soil* 134:167-178.
- MORA, M.L., GALLARDO, F., BORIE, F., DEMANET, R. (2000). Algunos avances en la relación suelo-planta en suelos ácidos de Chile. Simposio Proyecto Ley Protección de Suelo. *Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo*. Boletín N° 14, 163-168.
- MUNZAROVA, E., LORENZEN, B., BRIX, H., VOJTISKOVA, L., VOTRUBOVA, O. 2006. Effect of  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  availability on nitrate reductase activity and nitrogen accumulation in wetland helophytes Phragmites australis and *Glyceria maxima*. *Environmental and Experimental Botany* 55: 49-60
- ODEPA, 2005. Oficina de estudios y políticas agrarias. Estadísticas macrosectoriales y productivas, IX región. <http://www.odepa.cl>
- ROUT, G.R., SAMANTARAY, S., DAS, P. 2001. Aluminium toxicity in plants: a review. *Agronomie* 21: 3-21.
- RODRÍGUEZ, J. 1993. La fertilización de los cultivos: Un método racional. Colección Agricultura, Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. 291 p.
- SHARMA, P. AND DUBEY, R. 2005. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *Journal of Plant Physiology* 162 : 854-864.
- SMIRNOFF, N. AND STEWART, G.R. 1985. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. *Physiologia Plantarum* 64:133-140.
- SUAREZ, D. 1994. Comparación de fertilizantes nitrogenados en suelos con riesgo de acidificación. Panorama económico de la agricultura, Marzo-Abril.
- TAYLOR, G.J. AND FOY, C.D. 1985 Mechanisms of aluminum tolerance in *Triticum aestivum* L. (Wheat). I. Differential pH induced by winter cultivars in nutrient solutions. *Amer.J. Bot.* 72(5): 695-701.
- TIMPO, E.E. AND NEIRA, C. A. 1983. Expression of nitrate and nitrite reductase activities under various forms of nitrogen nutrition in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 50:649-654.
- VOUILLOT. M.O, MACHET. J.M., MEYNARD. J.M. 1996. Relationship between the amount of reduced nitrogen accumulated in winter wheat shoots and the activity of nitrate reductase measured «in situ». *European Journal of Agronomy*, 5(3-4): 227-236.
- ZHU, L., WANG, S., YANG, T., ZHANG, C. y XU, W. 2005. Vine growth and nitrogen metabolism of «Fujiminori» grapevines in response to root restriction. *Science Direct*. 107:143-149.