

ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE LAS PARTES VERDES Y NO VERDES DE LA CAÑA DE AZÚCAR

M. Paneque, Alina González, Maritza Martínez, L. Iglesias y R. Domech

ABSTRACT. Nitrate reductase activity was estimated according to its time of reaction in leaf lamina, sheath, rind, bagasse and juice from three stalk portions of sugarcane cultivar Ja.60-5. The enzymatic activity of leaf lamina and sheath was greater than in the other tissues and juice, as a whole. Concerning all tissues and juice, nitrate reductase activity was evident 14 hours after reaction, it generally decreasing for later increasing at 24 hours, however, not surpassing the initial values in any case. Such a 24-hour increment can be related to an electron donor recycling promoted by the action of an extract-supplied hydrogen carrier.

Key words: sugarcane, nitrate reductase, enzyme

RESUMEN. Se cuantificó la actividad nitrato reductasa de acuerdo con el tiempo de reacción en lámina, vaina, corteza, bagazo y jugo de tres zonas del tallo de la variedad Ja.60-5 de caña de azúcar. La actividad enzimática en lámina y vaina fue mayor que en el resto de los tejidos y el jugo, en su conjunto. En todos los tejidos y el jugo, la actividad nitrato reductasa se manifestaba a las 14 horas de reacción, descendiendo generalmente para incrementarse a las 24 horas, aunque en ningún caso sobrepasa los valores iniciales. Este incremento a las 24 horas puede estar relacionado con un reciclaje del donador de electrones, promovido por la acción de un transportador de hidrógeno aportado por el extracto.

Palabras clave: caña de azúcar, nitrato reductasa, enzima

INTRODUCCION

El nitrógeno participa en el metabolismo en el estado de oxidación N(-3), por lo que previamente a su incorporación al mismo, el nitrato ha de ser reducido a amonio (Guardiolay García, 1990). La nitrato reductasa de plantas superiores es un complejo compuesto por una flavoproteína, un citocromo b557 y una molibdo proteína, los cuales transfieren electrones desde el NADH o NADPH al nitrato según la secuencia expresada (Legaz y Vicente, 1987).

La nitrato reductasa está presente en la mayor parte de los órganos de las plantas, como las hojas (González y Vicente, 1990), raíces (Finke, Harper y Hageman, 1982), cotiledones (Orihuel-Iranzo y Campbell, 1980) y yemas (Paneque y González, 1992). Su actividad depende de la especie, edad y órgano (Campbell y Samarrelli, 1986). También muestra ser inducida por la luz (Beevers y Hageman, 1972), así como nutricionalmente por el sustrato y fuertemente reprimida por el amonio (Timpo y Neyra, 1983).

La determinación de su actividad puede realizarse tanto en extractos vegetales *in vitro* (Paneque, González y Martínez, 1992) como en porciones del material

vegetal *in vivo* (Hageman y Reed, 1980). En caña de azúcar por el método *in vitro* se informan diferentes y prolongados tiempos óptimos de reacción. Rau y Vijayaradhy (1980) sugieren 17 horas para sus jugos, González, Ortega y Rivero (1984) 24 horas en láminas, mientras que Paneque, González y Martínez (1992) plantean como óptimo 18 horas para las yemas.

En este trabajo se determinó la actividad nitrato reductasa en caña de azúcar para las diferentes partes de la planta a distintos tiempos de reacción.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. Para el trabajo se usó caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), variedad Ja.60-5 de un primer retoño, con siete meses de edad.

Preparación de las muestras. En las primeras horas de la mañana se tomaron las muestras y se colocaron en bolsas de polietileno hasta procesarlas. En extractos de tejidos de lámina, vaina, corteza, bagazo y jugo de tres zonas del tallo (zona apical: hojas y entrenudos +2, +3 y +4; zona media: hojas y entrenudos +6, +7 y +8; zona basal: hojas y entrenudos +10, +11 y +12) y en las raíces, se determinó la actividad nitrato reductasa *in vitro*. Se consideró el verticilo central como hoja cero, enumerándose las hojas hacia abajo en forma ascendente (Clements y Ghoth, 1968).

Extracción de la enzima. El material vegetal fue triturado con arena reactivo hasta polvo fino; luego se maceró con tampón que contenía 100 mM KH_2PO_4 a pH 7.5, 4 mM EDTA-Na y 13 mM cisteína clorhídrica. El homo-

M. Paneque, Alina González y Maritza Martínez, recién graduados del departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana; L. Iglesias, investigador del departamento de Matemática Aplicada, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gavieta Postal No. 1, San José de las Lajas, La Habana; R. Domech, recién graduado del departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

genato se filtró por cuatro capas de tejido de nylon, al que se añadió polivinilpirrolidona y la suspensión se centrifugó 15 minutos a 17 000 rpm a 4°C. El precipitado se desechó y se tomó el sobrenadante para el ensayo *in vitro* de la nitrato reductasa (González y Vicente, 1990). El jugo se procesó según plantean Rau y Vijayasarahy (1980).

Ensayo *in vitro* de la nitrato reductasa. La reducción de nitrato se determinó en un medio que contenía 100 mM KH_2PO_4 a pH 7.5, 100 mM KNO_3 , 2 mM NADH y 0.5 mL de extracto de material vegetal en un volumen final de 2 mL. La reacción transcurrió a 35°C durante un tiempo que varió entre 14 y 45 horas y fue detenida adicionando un volumen suficiente de 500 mM acetato de cinc y 0.015 mM metasulfato de fanazina. Se centrifugó diez minutos a 5 000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se utilizó para cuantificar el nitrito producido. El blanco no contenía sustrato o extracto de material vegetal (González y Vicente, 1990).

Determinación de NO_2^- . El nitrito producido fue determinado colorimétricamente adicionando una mezcla 1:1 de 1 % sulfanilamida en 3N HCl y 0.02 % N(1-naftilo) etilendiamina y el desarrollo del color se midió a 540 nm (Snell y Snell, 1949). Se utilizaron tres réplicas para cada muestra y todos los resultados fueron expresados en relación con el peso fresco del tejido.

Análisis estadístico. Los valores de la actividad nitrato reductasa en lámina, vaina, corteza, bagazo y jugo, se sometieron a un análisis de varianza según el modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \Gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijkl}$$

$$i = 1..5, j = 1..3, k = 1..14, l = 1..3,$$

donde:

μ = media general

α_i = efecto del *i*-ésimo nivel del primer factor (tipo de tejido)

β_j = efecto del *j*-ésimo nivel del segundo factor (zona)

Γ_k = efecto del *k*-ésimo nivel del tercer factor (tiempo de reacción).

Y_{ijkl} , e_{ijkl} : observación y error correspondientes al *i*-ésimo nivel de α , *J*-ésimo nivel de β , *k*-ésimo nivel de Γ y la repetición *l*.

Las restantes interacciones no se incluyeron en el modelo utilizado, por carecer de interés de acuerdo con los propósitos de este trabajo. Para el factor tipo de tejido se consideraron los niveles: lámina, vaina, corteza, bagazo y jugo; para las zonas: apical, media y basal; y 14 tiempos de reacción desde 14 a 45 horas. Para comparar las medias se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan. Además, se comprobó si los datos seguían una distribución normal según la prueba de Kolmogorov-Smirnov y si se cumplía la homogeneidad de varianzas según la prueba de Bartlett (Sigarroa, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se encontraron diferencias significativas para la interacción tipo de tejido x zona. De la comparación de las medias, según la prueba de Duncan (Tabla I), resultaron las diferencias que se explican a continuación.

Tabla I. Medias de la interacción tejido x zona, según la prueba de rango múltiple de Duncan al 5 %

Variante		Media
Tejido	Zona	
Lámina	Apical	8722.37 a
	Media	1558.83 ef
	Basal	4088.90 d
Vaina	Apical	3626.33 d
	Media	4806.76 c
	Basal	5655.63 b
Corteza	Apical	2008.16 e
	Media	1138.61 f
	Basal	1005.43 f
Bagazo	Apical	1022.47 f
	Media	1005.43 f
	Basal	1225.12 f
Jugo	Apical	335.87 g
	Media	302.12 g
	Basal	208.32 g

ES = 198.57*** G.L. = 902

Medias con letras comunes no difieren significativamente
*** Análisis de varianza significativo para $p < 0.01$

En láminas, los mayores valores de la actividad nitrato reductasa corresponden a la zona apical (Figura 1), mientras que la zona basal presenta mayor actividad enzimática que la media. Esta alta actividad nitrato reductasa en las láminas apicales puede deberse a la intensa actividad metabólica, que caracteriza a esta zona de crecimiento activo (Humbert, 1965), así como que son hojas totalmente expandidas expuestas a una gran intensidad luminosa que facilita el proceso fotosintético. Todo lo anterior conduce al suministro continuo del poder reductor necesario para reducir el nitrato a nitrito; sin embargo, la mayor actividad en las láminas basales que en las medias debe estar relacionada con el fenómeno de la senescencia, que puede implicar la descompartimentación celular y el posible acceso de esta enzima al "pool" de nitrógeno endógeno (Panaque, González y Martínez, 1982). En tanto, la actividad nitrato reductasa en las vainas de la zona apical es menor que en la media y basal (Figura 2). Probablemente, por una menor dimensión de las vainas en la zona apical, se facilite un suministro de nitrato a las demandas de las láminas, pues precisamente son las de la zona apical las que portan la mayor actividad enzimática y según Humbert (1965), las vainas son órganos de transporte y reserva. La máxima actividad nitrato reductasa presente en las vainas basales puede deberse al acceso de esta enzima al "pool" de nitrógeno endógeno (Panaque, González y Martínez, 1982).

En la corteza (Figura 3) la mayor actividad nitrato reductasa se encontró en la zona apical, mientras que las zonas media y basal presentan un comportamiento similar. La zona apical de la corteza se caracteriza por una elevada actividad respiratoria, así como una débil lignificación (Gola, Negri y Capelletti, 1969), lo cual garantiza un poder reductor, en tanto estas características

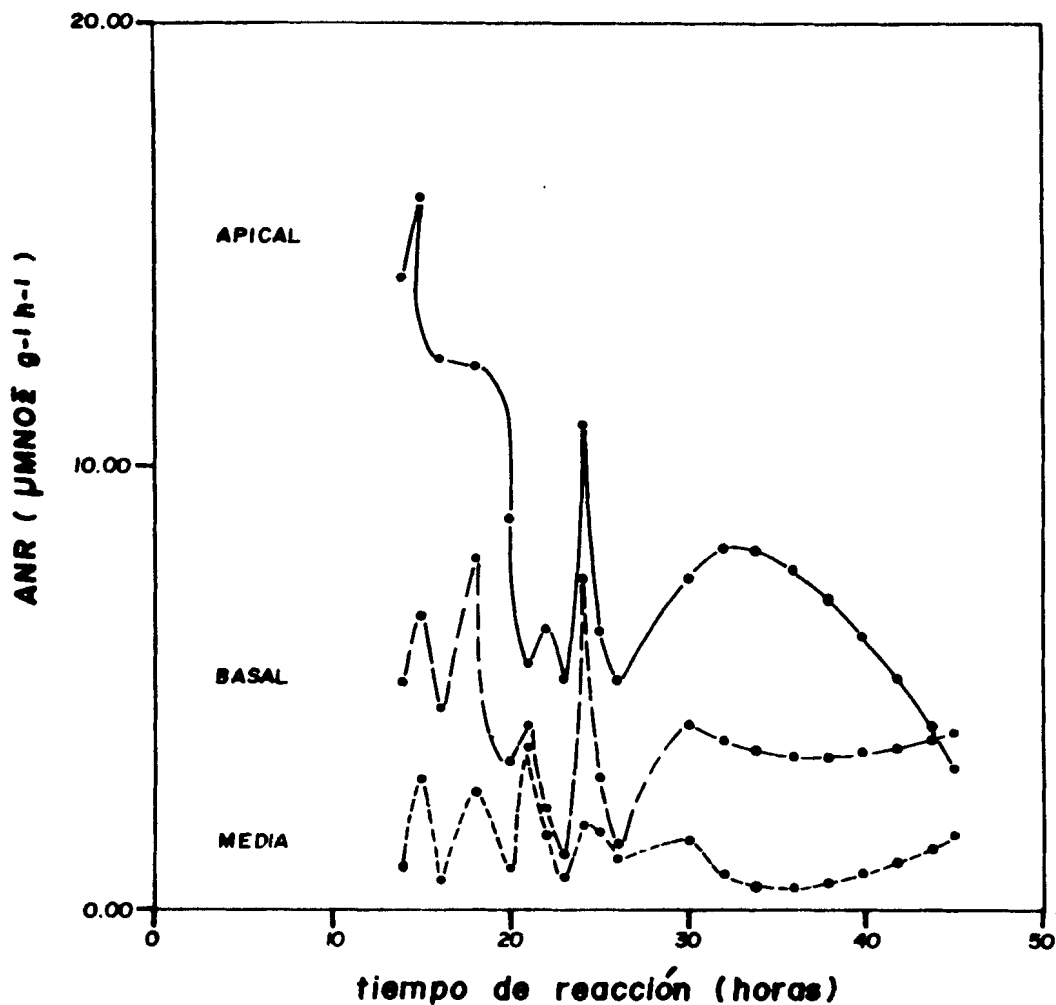


Figura 1. Variación de la actividad nitrato reductasa de las zonas apical, media y basal en láminas

se van perdiendo hacia la base, donde se encontró una corteza altamente lignificada con una considerable disminución de la actividad respiratoria (de Armas, Ortega y Rodes, 1988).

En los casos del jugo y el bagazo, no se encontraron diferencias significativas entre las tres zonas estudiadas. Sin embargo, en el jugo (Figura 4) la capacidad para reducir el nitrato muestra una tendencia a disminuir de la zona apical a la basal. Esta mayor actividad enzimática en la zona apical puede ser resultado de la presencia de abundante tejido meristemático, que como se ha planteado se caracteriza por presentar un activo metabolismo, todo lo cual disminuye hacia la base. En concordancia con estos resultados, la actividad nitrato reductasa en el bagazo (Figura 5) tiende a aumentar del ápice a la base, lo que puede ser resultado de su condición de parénquima reservante, por cuanto mientras más nitrógeno se extrae en el jugo y la corteza, menos queda asociado al residuo.

De forma general, las variaciones de la actividad nitrato reductasa entre los diferentes tejidos y el jugo (Figura 6 y Tabla I) mostraron diferencias significativas. En tanto, la actividad enzimática en láminas y vainas representó el 74 % del total, siendo considerablemente mayor que el resto de los tejidos y el jugo, que en su conjunto solo representaron el 26 %. Esto se debe posiblemente a que por ser tejidos fotosintéticos, pueden poner a disposición de la enzima una gran cantidad de agentes reductores que se forman en este proceso. Sin embargo, el resto de los tejidos y el jugo parecen responder a lo planteado por Lee (1980), respecto a los tejidos no fotosintéticos, en los cuales la fuente de agentes reductores proviene del metabolismo mitocondrial, por lo cual cuanto mayor sea la actividad respiratoria, más alta será la capacidad potencial de la actividad nitrato reductasa. Este es el caso de la raíz, que alcanza valores ligeramente inferiores a la corteza y mayores que el bagazo y el jugo, donde se observan

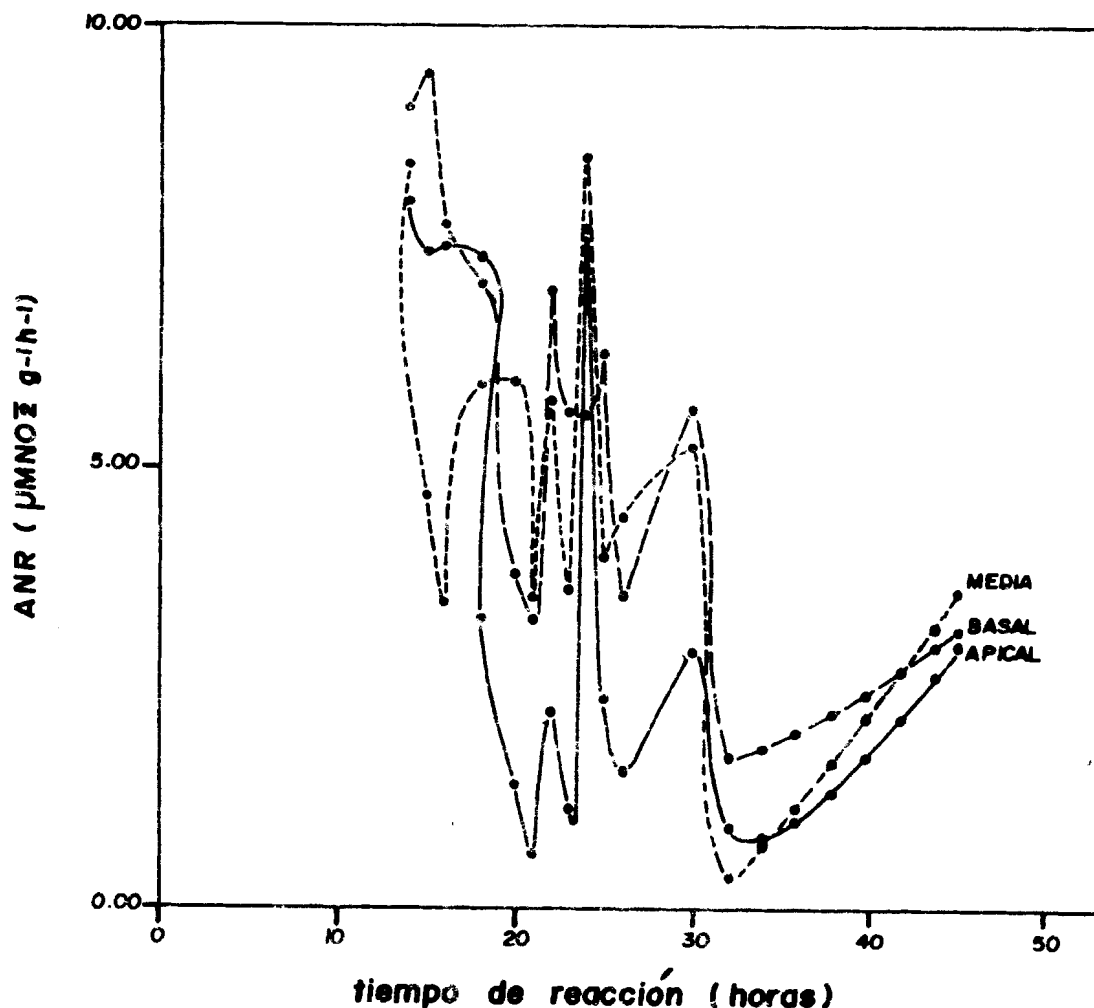


Figura 2. Variación de la actividad nitrato reductasa de las zonas apical, media y basal en vainas

valores varias veces menores que en el resto de los tejidos.

González, Ortega y Rivero (1984), trabajando en láminas de caña de azúcar, obtuvieron que la actividad enzimática se comenzaba a manifestar a las 16 horas y el máximo se obtenía a las 24 horas de reacción. No obstante, en el presente estudio, la actividad nitrato reductasa en todos los tejidos y el jugo, ya se manifestaba a las 14 horas de reacción, descendiendo generalmente para incrementarse a las 24 horas, aunque en ningún caso sobrepasa los valores iniciales (Figura 6).

Este incremento a las 24 horas puede estar relacionado con un reciclaje de NADH, es decir, que por la acción de una deshidrogenasa se esté produciendo una reacción inversa del NAD que ha sido oxidado en el proceso, o incluso una reducción del NADP mediante una transhidrogenasa, ambos aportados por el extracto. La disminución sucesiva que se va produciendo en la actividad nitrato reductasa a lo largo del tiempo de reacción, puede ser causada por el consumo del nitrato.

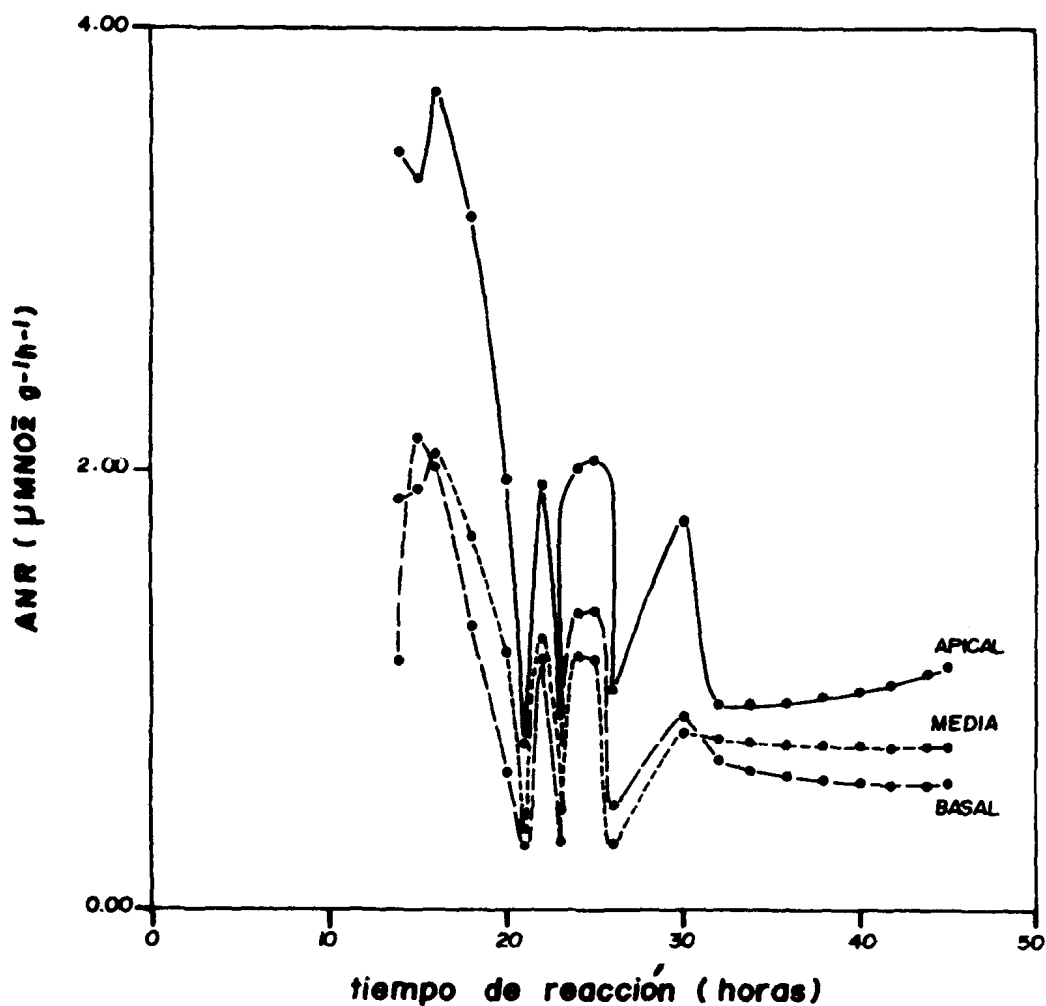


Figura 3. Variación de la actividad nitrato reductasa de las zonas apical, media y basal en corteza

BIBLIOGRAFIA

Armas, R. de. *Fisiología Vegetal*. / R. de Armas, E. Ortega, R. Rodes.- 1 ed.- La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1968.- 325 p.
 Beever, L. The Role of Light in Nitrate Metabolism of Higher Plants /L. Beever, R. A. Hageman.- En: *Current Topics in Photobiology and Photochemistry*.- New York: Academic Press, 1972.- p. 85-109.

Campbell, W. H. Nitrate Reductase: Biochemistry and Regulation / W. H. Campbell, J. Samarrelli.- En: *Biochemical Basis of Plant Breeding*.- Boca Ratón: CRC Press, 1966.- t. 2, p. 1-40.

Clements, H. F. The Numbering of Leaves and The Internodes for Sugarcane Nutrition Studies / H. F. Clements, A. Ghoth.- En: *Proceedings Congress, 13, ISSCT, Taiwan, 1968*.- p. 569-584.

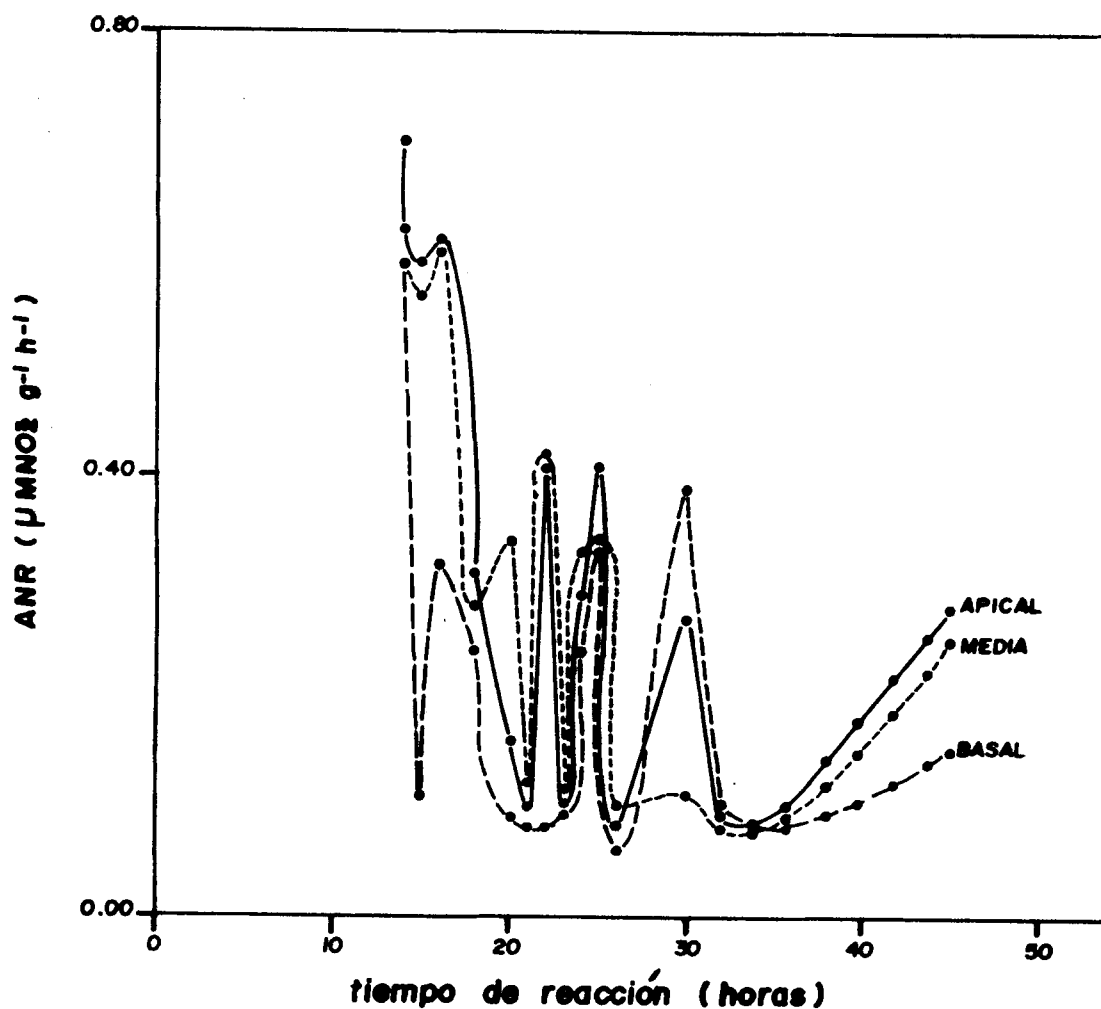


Figura 4. Variación de la actividad nitrato reductasa de las zonas apical, media y basal en jugo

Finke, R. L., J. E. Harper y R. H. Hageman. Efficiency of Nitrogen Assimilation by N₂-fixing and Nitrate-Grown Soybean (*Glycine max*(L) Merr.). *Plant Physiology* (Rockville) 70:1178-1188, 1982.
 Gola, G. Tratado de Botánica. / G. Gola, G. Negri, C. Capelletti. - La Habana: Ediciones Revolucionarias, 1989. - 1190 p.

González, M. A., E. Ortega e I. Rivero. Algunas características de la determinación *in vitro* de la nitrato reductasa en caña de azúcar. *Ciencias de la Agricultura* (La Habana) 20:17-21, 1984.

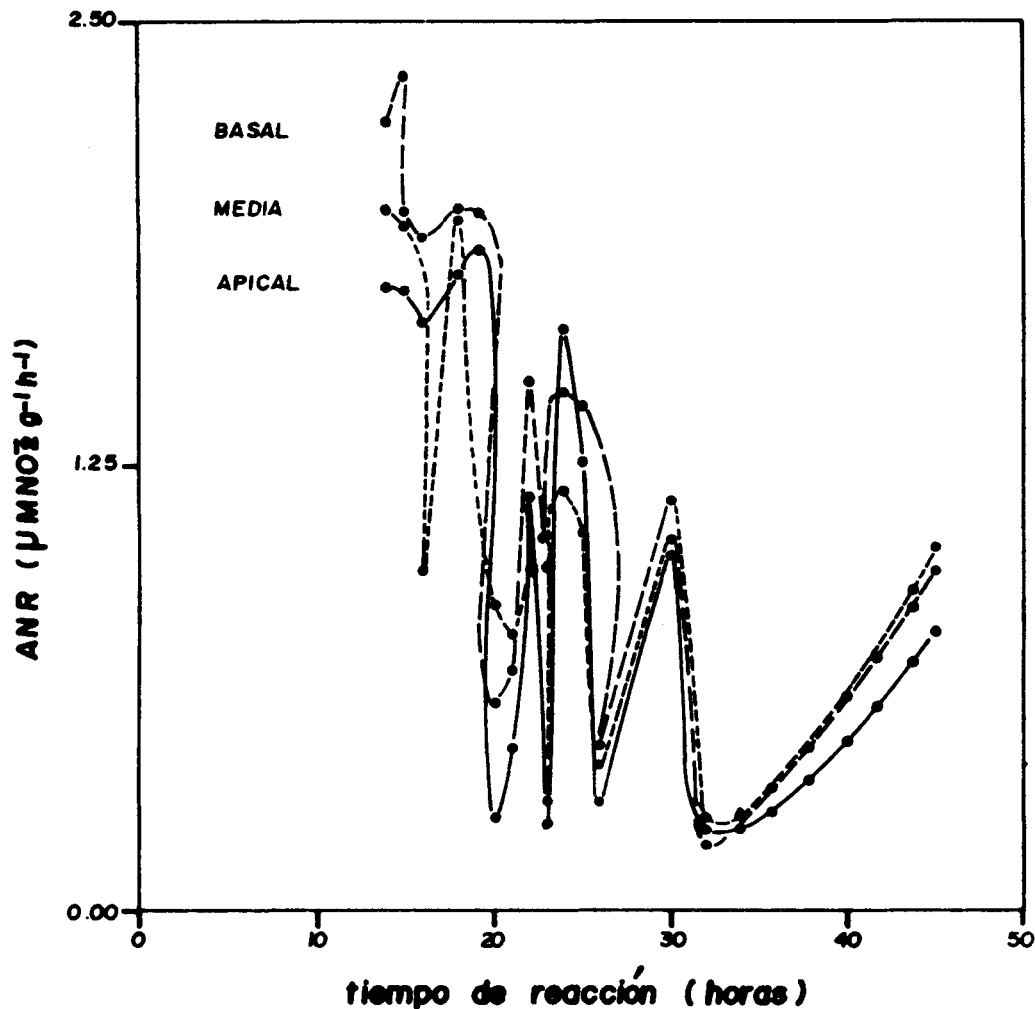


Figura 5. Variación de la actividad nitrato reductasa de las zonas apical, media y basal en bagazo

González, M. A. y C. C. Vicente. Evidencias acerca de un mecanismo de regulación transcripcional de la nitrato reductasa en hojas de caña de azúcar. *Ciencias de la Agricultura (La Habana)*39:73-78, 1990.

Guardiola, J. L. *Fisiología Vegetal I: Nutrición y transporte.* / J. L. Guardiola, A. L. García. - 1 ed.- Madrid: Editorial Síntesis, 1990.- 439 p.

Hageman, R. H. y A. J. Reed. *Nitrate Reductase From Higher Plants.* - En: *Methods of Enzymology.* - Vol. 69.- New York: Academic Press, 1980.- p. 270-290.

Humbert, R. P. *El cultivo de la caña de azúcar.* - La Habana: Editorial Universitaria, 1965.- 767 p.

Lee, R. B. Sources of Reductant for Nitrate Assimilation in Non-Photosynthetic Tissue: A Review. *Plant Cell Environment (Oxford)*3:65-90, 1980.

Legaz, M. E. 123 *Problemas de Fisiología Vegetal.* / M. E. Legaz, C. C. Vicente.- 1 ed.- Madrid: Editorial Síntesis, 1987.- 175 p.

Orihuel-Iranzo, B. y W. H. Campbell. Development of NAD (P)H and NADH: Nitrate Reductase Activities in Soybean Cotyledons. *Plant Physiol (Rockville)*65:595-605, 1980.

Paneque, M. y M. A. González. Variación de la actividad nitrato reductasa y el contenido de proteínas en los primeros estadios de la germinación de frijol y caña de azúcar. *Ciencia y Técnica de la Agricultura (La Habana)*11 (3):25-34, 1992.

Paneque, M. Evidencias de mecanismo de regulación de la nitrato reductasa en caña de azúcar. / M. Paneque, A. González, M. Martínez.- En: *Etnobotánica 92: Resúmenes,* Córdoba, 1992.

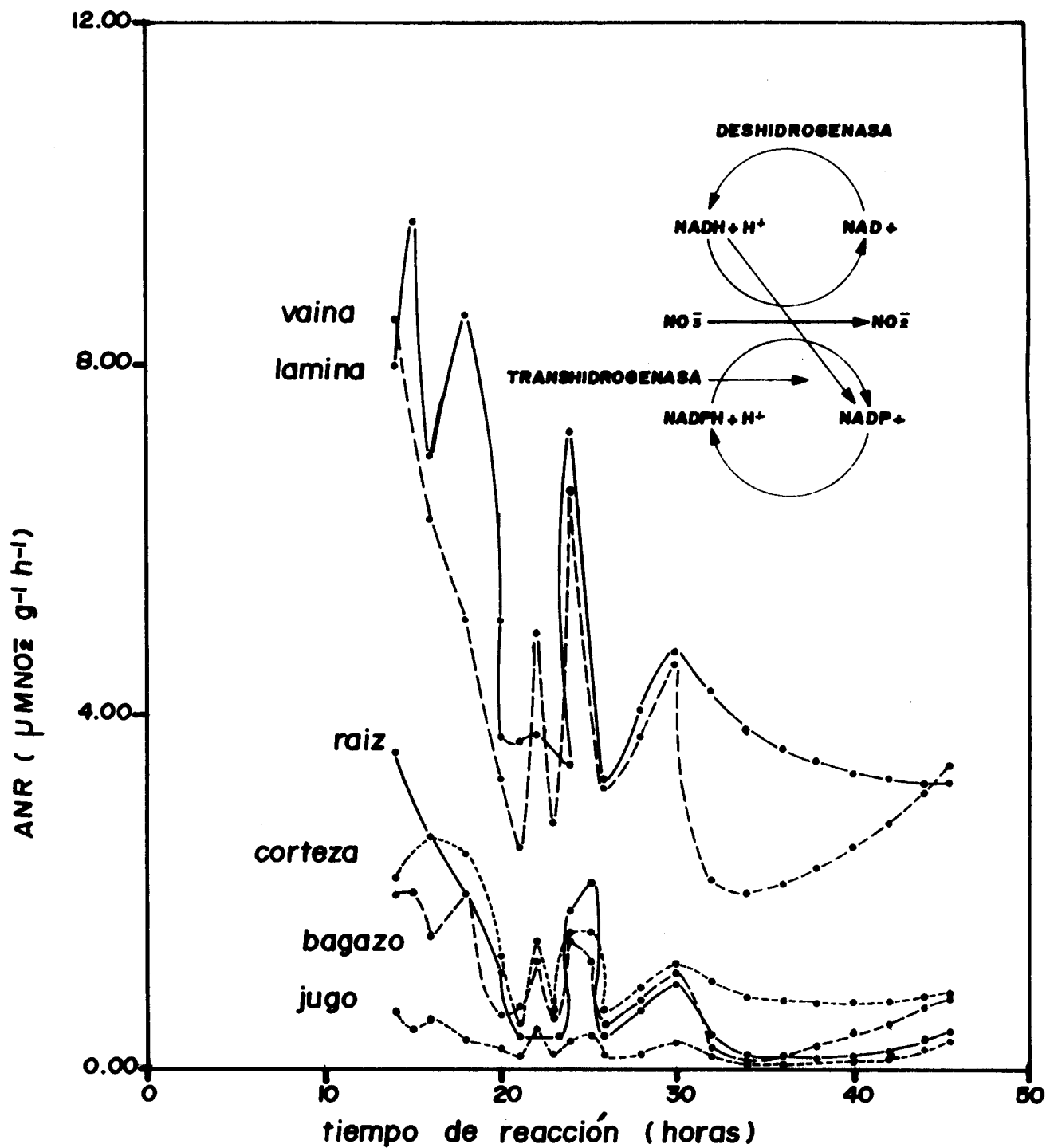


Figura 6. Variación de la actividad nitrato reductasa en los distintos tejidos y el jugo de acuerdo con el tiempo de reacción. Posible mecanismo de reciclaje del donador de electrones a las 24 horas de reacción

Rau, C. K. Nitrate Reductase Activity at Vegetative and Reproductive Conditions in *Saccharum Cultivar Co.285* / C. K. Rau, M. Vijaya-saradhy. - En: Proceedings Congress ISSCT, 17, Philippines, 1980. p. 432,437

Sigarroa, A. Biometría y Diseño Experimental. / A. Sigarroa. - La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1985. - 438 p.

Snell, F. D. Colorimetric Methods of Analysis. / F. D. Snell, C. T. Snell. - 3 ed. - New York: D. Van Nostrand, 1949. - 950 p.

Tímpo, E. E. y C. A. Neyra. Expression of Nitrate and Nitrite Reductase Activities under Various Forms of Nitrogen Nutrition in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* (Rockville) 72:71-76, 1983.

Recibido: 17 de marzo de 1994
Aceptado: 18 de marzo de 1994