

*Revista Electrónica Nova Scientia*

Compuestos nitrogenados indicadores de  
estrés en respuesta a las dosis tóxicas y  
deficientes de Nitrógeno en frijol ejotero  
Nitrogen compounds stress indicators in  
response to toxic doses of Nitrogen and  
deficient in green beans

**Esteban Sánchez<sup>1\*</sup>, Juan Manuel Ruiz<sup>2</sup> y Luis Romero<sup>2</sup>**

---

<sup>1</sup> Tecnología de Productos Hortofrutícolas y Lácteos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Delicias, Chihuahua.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España.

---

**México - España**

Esteban Sánchez [esteban@ciad.mx](mailto:esteban@ciad.mx)

## Resumen

**Introducción:** Un amplio rango de estreses ambientales, tales como baja temperatura, sequía, alcalinidad, salinidad, deficiencia y toxicidad de nutrientes son potencialmente dañinos para las plantas. El papel del nitrógeno como nutriente esencial y componente estructural de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes esenciales para el desarrollo ha sido ampliamente documentado en varias especies debido a la importancia en los procesos de crecimiento y producción agrícola. Sin embargo, en la actualidad, existe escasa literatura del efecto de la deficiencia y toxicidad de nitrógeno sobre los compuestos osmoreguladores como indicadores de estrés en plantas. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar los compuestos nitrogenados indicadores de estrés (prolina, glicinabetaina y colina) en respuesta a las dosis tóxicas y deficientes de N en frijol ejotero desarrollado en cámara de cultivo bajo condiciones controladas y sistema hidropónico.

**Método:** El nitrógeno fue aplicado a la solución nutritiva en la forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y en dosis crecientes: N1 = 1.5 mM, N2 = 3.0 mM, N3 = 6.0 mM, N4 = 12.0 mM, N5 = 18.0 mM y N6 = 24.0 mM de N. Los parámetros analizados fueron la acumulación de biomasa, la concentración de prolina, glicinabetaina y colina en hojas, raíces, semillas y vainas de frijol ejotero cv. Strike.

**Resultados:** La aplicación de dosis deficientes y tóxicas de N afectó la producción de biomasa en frijol, siendo las dosis tóxicas las que afectaron más este parámetro. Por otro lado, resaltar que los osmoreguladores prolina, glicinabetaina y colina solamente se acumularon bajo condiciones de toxicidad de N (N6), sin embargo, en condiciones de estrés provocado por la deficiencia de N (N1) no se produce la acumulación de estos compuestos.

**Discusión o Conclusión:** Los compuestos nitrogenados indicadores de estrés solamente se acumulan bajo condiciones de toxicidad de N (N6), sin embargo en condiciones de estrés provocadas por la deficiencia de N no se produce la acumulación de estos compuestos por lo que se podrían definir como bioindicadores solamente del estrés por toxicidad de N. Finalmente, la acumulación de prolina, glicinabetaina y colina pudieran actuar como una fuente de N en la célula bajo condiciones de estrés, donde la acumulación de estos compuestos nitrogenados pudieran ser utilizados como una forma de almacenar N.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris* L.; osmoreguladores; osmoprotectores

Recepción: 06-11-2015

Aceptación: 29-01-2016

## Abstract

**Introduction:** A wide range of environmental factors, such as lower temperature, drought, alkalinity, salinity, nutrient deficiency and toxicity stresses are potentially harmful to plants. The role of nitrogen as an essential nutrient and structural component of amino acids, proteins, nucleic acids and other essential components for the development has been widely documented in several species because of the importance in the processes of growth and agricultural production. However, at present, there is little literature the effect of nitrogen deficiency and toxicity on osmoregulators compounds as indicators of stress in plants. So the aim of this work was to study nitrogen compounds indicators of stress (proline, glycine betaine and choline) in response to toxic doses of N and deficient in green beans developed in a culture chamber under controlled conditions.

**Method:** The nitrogen was applied to the nutrient solution in the form of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and increasing doses: N1 = 1.5 mM, N2 = 3.0 mM, N3 = 6.0 mM, N4 = 12.0 mM, N5 = 18.0 mM and N6 = 24.0 mM of N. The parameters analyzed were biomass accumulation, the concentration of proline, glycine betaine and choline in leaves, roots, seeds and pods of green beans cv. Strike.

**Results:** The application of deficient and toxic doses of N affected the production of biomass in beans, toxic doses being the most affecting this parameter. Furthermore, note that the osmoregulators proline, glycine betaine and choline accumulated only under conditions of N toxicity (N6), however, under conditions of stress caused by a lack of N (N1) accumulation of these compounds does not occur.

**Discussion and Conclusion:** The stress indicators nitrogen compounds accumulate only low toxicity conditions N (N6), however under conditions of stress caused by deficiency of N accumulation of these compounds does not occur so that could be defined as only the stress bioindicators toxicity of N. Finally, the accumulation of proline, glycine betaine and choline could act as a source of N in the cell under stress, where the accumulation of these nitrogen compounds could be used as a way of storing N.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris* L., osmoregulators, osmoprotectants

## Introducción

Un amplio rango de estreses ambientales, tales como baja temperatura, sequía, alcalinidad, salinidad, deficiencia y toxicidad de nutrientes son potencialmente dañinos para las plantas (Van Breusegem et al., 2001; Rivero et al., 2014). El papel del nitrógeno como nutriente esencial y componente estructural de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes esenciales para el desarrollo ha sido ampliamente documentado en varias especies debido a la importancia en los procesos de crecimiento y producción agrícola (Lattanzi et al., 2004; Colla et al., 2011). No obstante, el nitrógeno es uno de los factores de mayor estrés en las plantas cultivadas, ya sea por deficiencia o toxicidad. Se reconoce que el nitrógeno puede ser un factor limitante del crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos, especialmente, bajo condiciones de déficit de nitrógeno, las cuales tienden a disminuir el peso seco, el número de hojas y el área foliar (Ciompi et al., 1996; González-Dugo et al., 2010). En la actualidad, existe escasa literatura del efecto de la toxicidad de nitrógeno sobre los compuestos osmoreguladores como indicadores de estrés en plantas.

Por otro lado, el N es el fertilizante más usado en la agricultura actual debido a que es relativamente barato, pero puede contribuir a contaminar el agua superficial y subterránea a través de la lixiviación y la erosión del suelo (von Wirén et al., 1997; Britto y Kronzucker, 2013).

Un denominador común a los estreses ambientales es la generación de un estrés osmótico. La síntesis y acumulación de osmoprotectores (o solutos compatibles) es una de las vías que utilizan las plantas para hacer frente a dicho estrés osmótico generado. Éstas son moléculas pequeñas y eléctricamente neutras, no son tóxicas a concentraciones molares, y son capaces de estabilizar proteínas y membranas, en contra del efecto desnaturizante que poseen otros osmóticos y otros solutos perjudiciales, como son altas concentraciones de sal dentro de la célula (Yancey, 2005). La composición y contenido de los diferentes solutos en plantas estresadas puede variar considerablemente, dependiendo de la especie, así como de la intensidad y duración del estrés (Evers et al., 2010).

La acumulación de prolina representa una de las respuestas metabólicas comunes a la mayoría de las plantas superiores bajo condiciones de déficit hídrico, principalmente sequía y salinidad. Sin embargo, la prolina parece estar ampliamente distribuida como osmoprotector y es acumulado en condiciones de estrés en plantas (Kuznestov y Shevyakova, 1997; Lv et al., 2011). En plantas superiores, la prolina puede ser sintetizada a partir del glutamato o de la ornitina. En condiciones normales, la síntesis de prolina en plantas se realiza a partir de la

ornitina, mientras que en situación de estrés se utiliza principalmente glutamato como precursor (Delauney y Verma, 1993; Fozouni et al., 2012).

La glicinabetaína, (GB), es uno de los compuestos amonio cuaternario más importantes y de los más estudiados en la protección de las plantas frente al estrés debido a sus versátiles funciones (Ahmad et al., 2013). GB no sólo protege a las plantas frente a ciertos estreses, sino que también protege a ciertas enzimas implicadas en la protección frente al estrés, incluyendo la protección de la estructura cuaternaria de proteínas y otras macromoléculas en condiciones de estrés (Papageorgiou y Murata, 1995; Kalaji et al., 2011). La GB se sintetiza a partir de colina mediante dos pasos de oxidación, iniciada por la colina monooxigenasa seguida por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa, con betaína como molécula intermedia (Nuccio et al., 1998; Chen y Murata, 2011).

La colina es un precursor fundamental de fosfatidilcolina, un componente dominante de fosfolípidos en organismos eucariotas. De esta manera, una gran proporción de colina libre se libera en el citoplasma bajo estrés ambiental (Rathinasabapathi et al., 2000; Rivero et al. 2014).

En general, existe limitada literatura disponible sobre este tema, por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar los compuestos nitrogenados indicadores de estrés (prolina, glicinabetaína y colina) en respuesta a las dosis tóxicas y deficientes de N en frijol ejotero desarrollado en cámara de cultivo bajo condiciones controladas y sistema hidropónico.

## **Materiales y Métodos**

### **Manejo del cultivo y diseño experimental**

Las semillas del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike fueron germinadas en una cámara a 28°C durante 48 h. Posteriormente, las plantas de frijol ejotero fueron cultivadas en cámara de cultivo en Granada, España, bajo condiciones ambientales controladas: humedad relativa de 60-80%, temperatura 28/22°C (día/noche), fotoperiodo de 16/8 h (día/noche) e intensidad luminosa de 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las plantas crecieron en macetas individuales (25 cm de diámetro superior y 25 cm de altura) de 8 L, rellenas completamente con vermiculita. Durante 30 días a partir del trasplante y antes de la aplicación de los tratamientos experimentales, las plantas recibieron una solución nutritiva completa de Hoagland (pH 6.0-6.1 y C.E. de 1 dS  $\text{m}^{-1}$ ), la cual fue renovada cada 3 días y estuvo compuesta de: 6 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.6 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.4 mM de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 4.0 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.4 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 5  $\mu\text{M}$  de Fe-EDDHA, 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.0  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.3  $\mu\text{M}$  de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 0.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  preparada con agua destilada (Sánchez et al.,

2004). Posteriormente, 30 días después de la germinación, durante 30 días se aplicaron los siguientes tratamientos de N en la forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ : N1 = 1.5 mM, N2 = 3.0 mM, N3 = 6.0 mM, N4 = 12 mM, N5 = 18 mM y N6 = 24 mM, y se consideró la dosis N3 como la óptima, según Sánchez et al. (2004). El diseño experimental consistió en la distribución al azar de los distintos tratamientos y de sus repeticiones. Cada tratamiento tuvo seis repeticiones con cuatro plantas tratadas por repetición.

### **Muestreo vegetal**

Las plantas completas fueron muestreadas a los 60 días después de germinadas, en la fase fenológica de desarrollo completo y madurez del fruto. Las raíces y hojas fueron lavadas tres veces con agua destilada y detergente no iónico al 1% (Wolf, 1982). A continuación, las muestras de raíces y hojas se introdujeron en una estufa con corriente de aire a una temperatura de 70°C y hasta su total desecación (24 h), para posteriormente proceder a pesar los dos órganos (peso seco). Este material seco fue utilizado para la cuantificación de la biomasa, determinación de prolina, glicinabetaina y colina. La producción de biomasa radical y foliar se obtuvo como un promedio de cada órgano estudiado, con base en materia seca. Para cada variable analizada se utilizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

### **Análisis Vegetal**

**Extracción y cuantificación de glicinabetaina y colina.** Se utilizó el método propuesto por Jolivet et al. (1982) y Grive y Gratton (1983), para lo cual se pesaron entre 0.1 y 0.2 g de material vegetal molido y seco. El material vegetal se introdujo en tubos de ensayo, que tenían tapón de rosca, y se le adicionó 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada. Las diferentes muestras fueron sometidas a un proceso de agitación vuelta-vuelta durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo se procedió a su filtrado con papel Whatman No. 4. A 1 ml del extracto obtenido se le añadió 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N. Seguidamente, se puso 0.5 ml de la dilución anterior en tubos de tapa de centrifuga y se le añadieron 0.2 ml de la mezcla de reacción. Se agitaron vigorosamente y se dejó reposar durante 16 horas a 4°C en oscuridad. Posteriormente se procedió a centrifugar a 12360 g durante 15 minutos y a 0°C. Finalizada la centrifugación se procedió a eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, quedando en el fondo unos pequeños cristales de color parduzco y con este residuo se prosiguió el proceso. Al residuo se le adicionaron 9 ml de 1,2-Dicloroetano. A continuación se taparon los tubos y se agitaron hasta lograr la resuspensión del residuo. Finalmente, se dejó reposar y pasado 2 h y 30 min se

procedió a su lectura ( $\lambda = 365$  nm) frente a una curva de trabajo de betaina que se sometió a las mismas condiciones que las muestras problema.

Con el extracto obtenido para glicinabetaina, se realizó una dilución (1:1) con un tampón fosfato potásico (0.2 M, pH 6.8). Los diferentes pasos realizados fueron similares que para la cuantificación de glicinabetaina. Pasado 2 h y 30 min se procedió a su lectura ( $\lambda = 365$  nm) frente a una curva de trabajo de colina y que fue sometida a las mismas condiciones que las muestras problema.

La concentración de glicinabetaina se expresó como  $\mu\text{g}$  de betaina por g de peso seco y la colina como  $\mu\text{g}$  de colina por g de peso seco.

**Extracción y cuantificación de prolina.** Se utilizó el método propuesto por Irigoyen et al. (1992), para lo cual una cantidad aproximada de 0.5 g de material vegetal fue homogeneizada inicialmente con 5 ml de etanol al 96% y posteriormente dos veces con 5 ml de etanol al 70%. El homogeneizado fue centrifugado a 3740 g durante 10 min y el sobrenadante resultante se utilizó para la determinación de prolina. Del extracto resultante se tomó un volumen de 2 ml y se depositó en un tubo de ensayo. A continuación se procedió a adicionar los siguientes reactivos: 2.5 ml de reactivo de ninhidrina, 2.5 ml de ácido acético glacial del 99% y 4 ml de agua desionizada. Se agitó enérgicamente. La mezcla resultante se introdujo en un baño de agua a 100°C durante 45 min. Para posteriormente añadir 5 ml de benceno al 99%. Pasados 15 min se procedió a la lectura de las muestras ( $\lambda = 515$  nm) frente a una curva patrón de prolina. La concentración de prolina se expresó como  $\mu\text{g}$  por g de peso fresco (Irigoyen et al., 1992).

### **Análisis estadístico**

Todos los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Para la diferencia entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de LSD a 95% (SAS, 1987).

### **Resultados y Discusión**

#### **Producción de biomasa**

En previos trabajos, se ha visto que la acumulación de biomasa es uno de los parámetros esenciales en la investigación sobre eficiencia de nutrientes (Moran et al., 2002; Szarka et al., 2012). En plantas, el estrés afecta negativamente el crecimiento y desarrollo, y también genera especies de oxígeno reactivo, los cuales dañan numerosas macromoléculas y estructuras celulares. Consecuentemente, bajo condiciones adversas, uno de los más confiables y ampliamente usados indicadores del estrés en las plantas es la biomasa (Blasco et

al., 2008). En el presente experimento, el tratamiento N3 mostró la máxima producción de biomasa foliar, con un incremento de 43%, en relación a N6 que presentó el valor mínimo (Figura 1,  $P < 0.01$ ). El tratamiento N1 presentó la mayor biomasa radicular con un incremento de 51% en relación a N6, que mostró la biomasa radicular más baja.

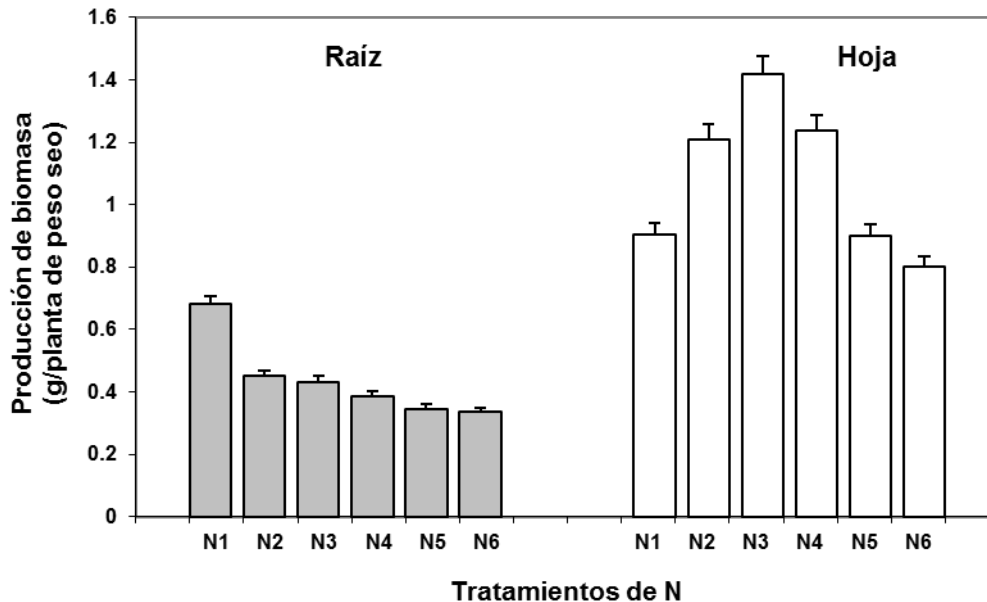


Figura 1. Efecto de los tratamientos de N (N1 = 1.5 mM, N2 = 3.0 mM, N3 = 6.0 mM, N4 = 12.0 mM, N5 = 18.0 mM y N6 = 24.0 mM de N) sobre la producción de biomasa radicular y foliar expresada en g de peso seco en plantas de frijol ejotero. Los datos son medias  $\pm$  error estándar (n=6).

La aplicación de 6 mM de N (N3) resultó ser el mejor tratamiento para minimizar la producción de biomasa foliar y radical en plantas de frijol ejotero. Así, los tratamientos por debajo de N3 (N1 y N2) poder ser considerados como deficientes en N, y se caracterizaron por aumentar el crecimiento radical y reducir el crecimiento de la parte aérea y, por tanto, incrementan el cociente raíz/parte aérea. Y esto que significa o implica Por otro lado, las dosis por encima del óptimo, es decir N4, N5 y N6, se podrían considerar como de elevadas a tóxicas por la disminución que provocaron en el crecimiento radical y, sobre todo de la parte aérea.

### Compuestos nitrogenados indicadores de estrés

#### Acumulación de prolina en raíces y hojas

Es conocido que la prolina se acumula en plantas durante la adaptación a diferentes tipos de estrés ambientales tales como sequía, salinidad, elevadas y bajas temperaturas, deficiencias de nutrientes, exposición a metales pesados y pH elevados (Delauney y Verma, 1993; Zafnejad et



al., 1997; Hare et al., 1999; Fozouni et al., 2012). En nuestro estudio, los niveles de prolina en raíces y hojas (Tabla 1,  $P < 0.01$ ) presentaron las más elevadas concentraciones en ambos órganos en el tratamiento N6. Nuestros resultados indican que la acumulación de prolina en raíces y hojas son debido a las dosis elevadas de N, es mediado principalmente por la ruta de la ornitina, tal y como lo indican Rhodes et al. (1986), Delauney y Verna (1993) y Rivero et al. (2014).

**Tabla 1.** Efecto de los tratamientos de N sobre la concentración de prolina, colina y glicinabetaina en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero.

Tratamiento	Prolina	Colina	Glicinabetaina
Raíces			
N1	35,90 f	2,71 f	9,57 f
N2	42,80 e	3,30 e	11,81 e
N3	54,40 d	3,52 d	12,55 d
N4	63,20 c	3,97 c	13,25 c
N5	71,25 b	4,30 b	14,83 b
N6	84,45 a	4,68 a	16,14 a
LSD	0.9891	0.2218	0.3689
Hojas			
N1	173,20 d	3,93 f	13,88 e
N2	234,50 c	4,69 e	16,75 d
N3	247,21 c	5,42 d	18,40 cd
N4	360,30 b	5,75 c	19,19 c
N5	365,50 b	6,46 b	22,29 b
N6	588,00 a	7,20 a	24,86 a
LSD	13.105	0.2934	1.7158

Prolina expresada en  $\mu\text{g g}^{-1}$  p.f.; Glicinabetaina y Colina expresados en  $\mu\text{g g}^{-1}$  p.s. Las líneas verticales en cada barra corresponden a la desviación estándar. Promedios con letras iguales en cada barra no son estadísticamente diferentes (LSD, 0.05). LSD = Diferencia mínima significativa.

Uno de los factores que pueden ser determinantes en la regulación de los procesos de síntesis de prolina es la disponibilidad y la concentración de las formas de nitrógeno inorgánico ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ) en las plantas (Delauney et al., 1993; Britto y Kronzucker, 2013). En plantas superiores, el papel fisiológico de la acumulación de prolina aún no sido completamente determinado. A parte de actuar como un “osmoregulador”, la acumulación de prolina tiene otras funciones celulares importantes. La prolina puede actuar como una fuente de N en la célula bajo condiciones de estrés, donde la acumulación de este compuesto nitrogenado pudiera ser utilizada como una forma de N almacenado (Dandekar y Uratsu, 1988; Colla et al., 2011).

En nuestro estudio, la deficiencia de N (N1 y N2) es caracterizada por una disminución en la acumulación de prolina en raíces y hojas. Por el contrario, bajo condiciones adecuadas de N (6.0 mM de N) en plantas de frijol ejotero, la planta pudiera no necesitar degradar prolina para la

síntesis de otros compuestos nitrogenados. Por otro lado, la aplicación de elevadas dosis de N en *Phaseolus vulgaris* L. es caracterizada por la acumulación de prolina en raíces y hojas. Finalmente, bajo nuestras condiciones experimentales, la prolina puede ser definida como un buen indicador del estado nutricional de N en plantas de frijol ejotero. Considero que es necesario la separación de medias p en su defecto la diferencia mínima significativa

### **Acumulación de prolina en vainas y semillas**

En nuestro estudio, la acumulación de prolina en vainas y semillas se presentan en la Tabla 1, las máximas concentraciones en ambos órganos aparecieron bajo los tratamientos N6. Nosotros sugerimos que la biosíntesis y acumulación de prolina en vainas y semillas, en nuestro experimento, debido quizás a las elevadas dosis de N, favoreció la ruta de la ornitina. Nuestros resultados de la acumulación de prolina en vainas y semillas de *Phaseolus vulgaris* tratadas con las elevadas dosis de N pudieran ser explicados por los efectos negativos causados por la toxicidad de este nutriente. Como se ha indicado en diversos estudios, una de las características por la cual la toxicidad de N es definida, es la restricción del crecimiento radical, la desorganización del tejido vascular, lo que finalmente se traduce en una restricción en la absorción de agua (Benton Jones, 1997; Haghghi et al., 2012), este último síntoma es similar a los causados por la sequía y salinidad (Delauney y Verma, 1993; Rivero et al., 2014). Normalmente, las plantas responden a un estrés hídrico activando la biosíntesis de prolina, estos resultados son similares a los encontrados en nuestro experimento.

La respuesta metabólica de prolina bajo condiciones de toxicidad de N es reflejada principalmente en las semillas, en las cuales la acumulación de prolina es más elevada que la encontrada en las vainas. Estos resultados definen a la acumulación de prolina como un bioindicador de la toxicidad de N en las semillas de las plantas de frijol ejotero.

En nuestro experimento, la deficiencia de N fue caracterizada por una disminución en la acumulación de prolina en vainas y semillas. Estos resultados son consistentes con otros resultados, los cuales indican que bajo condiciones de deficiencia de N, la degradación de prolina produce glutamato, el cual es utilizado como una fuente de nitrógeno para la síntesis de otros aminoácidos (Dandekar y Uratsu, 1988; Brill et al., 2011). Contrariamente, bajo condiciones óptimas de N, la planta pudiera no necesitar degradar prolina para la síntesis de otros compuestos nitrogenados.

En resumen, bajo nuestras condiciones experimentales, el contenido de prolina pudiera ser definido como un bioindicador de la deficiencia de N, particularmente en semillas, puesto que las

diferencias en concentraciones de este aminoácido en semillas tratadas fueron más elevadas que las encontradas en vainas. Por otro lado, las dosis altas de N favoreció la acumulación de prolina en ambos órganos. Finalmente, la acumulación de prolina en ambos órganos es considerado un bioindicador de la toxicidad de N en frutos de plantas de frijol ejotero.

### **Acumulación de glicinabetaina y colina en raíces y hojas**

Distintos estreses abióticos como los provocados por la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas, el encharcamiento (hipoxia), así como la toxicidad iónica provocan la reducción del potencial hídrico de los tejidos. Las plantas responden a este cambio sintetizando una amplia gama de compuestos denominados “osmoprotectores”, que actúan bien como osmolitos facilitando la retención de agua por el citoplasma y reajustando así el potencial hídrico intracelular, o bien como verdaderos compuestos protectores que estabilizan la estructura de las membranas y de las macromoléculas (Sairam y Tyagi, 2004; Ashraf y Foolad, 2007). Los osmoprotectores son, pues, solutos compatibles con el funcionamiento celular en condiciones de estrés osmótico. Los compuestos nitrogenados orgánicos de bajo peso molecular son por lo tanto importantes para la adaptación de las plantas a los substratos salinos. Entre los osmoprotectores encontramos compuestos nitrogenados siendo los más estudiados por su importancia la prolina y los compuestos amonios cuaternarios, tales como glicinabetaina y colina (Katschnig et al., 2013). En nuestro estudio, la aplicación de N, incremento significativo de la concentración de prolina, colina y glicinabetaina tanto en raíces como en hojas, presentándose las máximas concentraciones en N6 (Tabla 2,  $P < 0.01$ ). La acumulación de estos compuestos se ha observado principalmente cuando existen condiciones de estrés. En nuestro experimento, observamos que solamente se acumulan bajo condiciones de toxicidad de N (N6), sin embargo en condiciones de estrés provocadas por la deficiencia de N no se produce la acumulación de estos compuestos por lo que se podrían definir como bioindicadores solamente del estrés por toxicidad de N.

Nuestros resultados son lógicos ya que por un lado bajo deficiencia de N las plantas como mecanismo de supervivencia removilizan todos los compuestos nitrogenados con el fin de transportar los aminoácidos a las zonas de crecimiento. En condiciones de toxicidad la acumulación de compuestos osmoprotectores se debe por un lado a su función de protección y por otro lado estos compuestos actúan como una fuente de almacenamiento de N.

### Acumulación de glicinabetaina y colina en vainas y semillas

Como podemos comprobar, y al igual que ocurría en raíces y hojas, la prolina, colina y glicinabetaina (Tabla 2,  $P < 0.01$ ), fueron influenciadas por las dosis crecientes de N, presentando el tratamiento N6 las máximas concentraciones, en relación a las mínimas de N1. La acumulación de estos compuestos en frutos se podría explicar también como un mecanismo de detoxificación de los  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  en el tratamiento N6. La asimilación y acumulación fundamentalmente de prolina en las semillas podría actuar como un proceso de utilización de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  con el fin de evitar una mayor acumulación de estas formas inorgánicas de N en la planta.

**Tabla 2.** Efecto de los tratamientos de N sobre la concentración de prolina, colina y glicinabetaina en vainas y semillas de plantas de frijol ejotero.

Tratamiento	Prolina	Colina	Glicinabetaina
Vainas			
N1	85,60 d	2,93 c	11,75 d
N2	90,10 d	3,09 c	12,37 d
N3	104,25 c	3,50 bc	14,01 c
N4	108,00 c	3,90 b	15,62 b
N5	192,10 b	4,00 b	16,03 b
N6	290,50 a	4,68 a	18,75 a
LSD	6.2196	0.5804	1.4318
Semillas			
N1	140,40 f	3,21 d	12,84 d
N2	175,10 e	3,54 cd	14,16 d
N3	240,60 d	4,20 bc	16,82 c
N4	328,60 c	4,86 b	19,45 b
N5	422,70 b	5,44 a	21,76 ab
N6	485,90 a	5,83 a	23,34 a
LSD	5.8117	0.746	2.3542

Prolina expresada en  $\mu\text{g g}^{-1}$  p.f.; Glicinabetaina y Colina expresados en  $\mu\text{g g}^{-1}$  p.s. Las líneas verticales en cada barra corresponden a la desviación estándar. Promedios con letras iguales en cada barra no son estadísticamente diferentes (LSD, 0.05). LSD = Diferencia mínima significativa.

En resumen, bajo nuestras condiciones experimentales, el contenido de glicinabetaina y colina en ambos órganos pudiera ser definido como un bioindicador de la toxicidad de N en frutos de plantas de frijol ejotero, particularmente en semillas, puesto que las diferencias en concentraciones de estos compuestos nitrogenados en semillas tratadas fueron más elevadas que las encontradas en las vainas. Las elevadas dosis de N aplicadas pudieran explicar la gran acumulación de glicinabetaina y colina encontrada en nuestras semillas estudiadas. Finalmente, la acumulación de glicinabetaina y colina puede actuar como una fuente de N en

la célula bajo condiciones de estrés, donde la acumulación de estos compuestos nitrogenados pudiera ser utilizada como una forma de almacenar N.

### **Conclusiones**

La aplicación de dosis deficientes y tóxicas de N afectó la producción de biomasa en frijol, siendo las dosis tóxicas las que afectaron más este parámetro. Por otro lado, resaltar que los osmoreguladores prolina, glicinabetaina y colina solamente se acumularon bajo condiciones de toxicidad de N (N6), sin embargo, en condiciones de estrés provocada por la deficiencia de N (N1) no se produce la acumulación de estos compuestos, por lo que se podría definir como un bioindicador solamente del estrés por toxicidad de N. Finalmente, la acumulación de prolina, glicinabetaina y colina pudieran actuar como una fuente de N en la célula bajo condiciones de estrés, donde la acumulación de estos compuestos nitrogenados pudieran ser utilizados como una forma de almacenar N.

### **Referencias**

Ahmad R, Lim C, Kwon SY. (2013). Glycine betaine: A versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. *Plant Biotechnology Reports* 7: 49-57.

Ashraf M, Foolad M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59(2): 206-216.

Benton Jones JJr. (1997). The essential elements. In: *Hydroponics: A practical guide for the soilless grower*. Benton Jones J Jr (ed.) St. Lucie Press, Boca Raton, Florida, pp: 30-32.

Blasco B, Rios JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L. (2008). Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology* 152: 289-299.

Brill J, Hoffmann T, Bleisteiner M, Bremer E. (2011). Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *Journal of Bacteriology* 193(19): 5335-5346.

Britto DT, Kronzucker HJ. (2013). Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. *Annals of Botany* 112(6): 957-963.

Chen TH, Murata N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, cell & environment* 34(1): 1-20.

Ciampi S, Gentili E, Guidi L, Soldatini GF. (1996). The effect of nitrogen deficiency on leaf gas Exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. *Plant Science*. 118: 177-184.

Colla G, Roupael Y, Mirabelli C, Cardarelli M. (2011). Nitrogen-use efficiency traits of mini-watermelon in response to grafting and nitrogen-fertilization doses. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174(6), 933-941.

Dandekar AM, Uratsu SL. (1988). A simple base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. *Journal of Bacteriology* 170: 5943-5945.

Delauney AJ, Hu CAA, Kavi Kishor PB, Verma DPS. (1993). Cloning of ornithine- $\delta$ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 268: 18673-18678.

Delauney AJ, Verma DPS. (1993). Proline biosynthesis and osmo-regulation in plants. *The Plant Journal*. 4: 215-223.

Evers D, Lefevre I, Legay S, Lamoureux D, Hausman, JF, Rosales RO, Marca LR, Hoffmann L, Bonierbale M, Schafleitner R. (2010). Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *Journal of Experimental Botany* 61: 2327-2343.

Fozouni M, Abbaspour N, Doulati Baneh H. (2012). Leaf water potential, photosynthetic pigments and compatible solutes alterations in four grape cultivars under salinity. *Vitis* 51(4): 147-152.

Gonzalez-Dugo V, Durand JL, Gastal F. (2010). Water deficit and nitrogen nutrition of crops. A review. *Agronomy for sustainable development* 30(3): 529-544.

Grive CM, Gratton R. (1983). Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil* 70: 303-307.

Haghighi M, Kafi M, Fang P. (2012). Photosynthetic activity and N metabolism of lettuce as affected by humic acid. *International Journal of Vegetable Science* 18(2): 182-189.

Hare PD, Cress WA, Van Staden J. (1999). Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* 50: 413-434.

Irigoyen JJ, Emerich EW, Sánchez-Díaz M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia. Plantarum*. 84: 55-60.

Jolivet Y, Larher F, Hamelin J. (1982). Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effect of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Science Letter*. 25: 193-201.

Kalaji H.M, Bosa K, Kościelniak J, Żuk-Gołaszewska K. (2011). Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany* 73: 64-72.

Katschnig D, Broekman R, Rozema J. (2013). Salt tolerance in the halophyte *Salicornia dolichostachya* Moss: growth, morphology and physiology. *Environmental and Experimental Botany* 92: 32-42.

Kuznestov VV, Shevyakova NI. (1997). Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiologia Plantarum* 100: 320-326.

Lattanzi FA, Schnyder H, Thornton B. (2004). Defoliation effects on carbon and nitrogen substrate import and tissue-bound efflux in leaf growth zones of grasses. *Plant, Cell & Environment*. 27(3): 347-356.

Lv WT, Lin B, Zhang M, Hua XJ. (2011). Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seedlings during heat stress. *Plant Physiology* 156(4): 1921-1933.

Moran JF, Becana M, Iturbide-Ormaetxe I, Frechillas S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P. (2002). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352.

Nuccio ML, Russell BL, Nolte KD, Rathinasabapathi B, Gage DA, Hanson AD. (1998). The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant Journal* 16: 487-496.

Papageorgiou GC, Morata N. (1995). The usually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function in the oxygen evolving photosystem-II complex. *Photosynthesis Research* 44: 243-252.

Rathinasabapathi B, Sigua C, Ho J, Gage DA. (2000). Osmoprotectant  $\beta$ -alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae: S-adenosyl-l-methionine dependent N-methylation of  $\beta$ -alanine to its betaine is via N-methyl and N, N-dimethyl  $\beta$ -alanines. *Physiologia Plantarum* 109(3): 225-231.

Rhodes D, Handa S, Bressan RA. (1986). Metabolic changes associated with adaptation of plant cells. In: *Biochemical and Physiological Mechanisms Associated with Environmental stress tolerance*. Cherry JH (ed.), Berlin: Springer-Verlag, pp: 41-62.

Rivero RM, Mestre TC, Mittler RON, Rubio F, García Sánchez F, Martínez V. (2014). The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell & Environment* 37(5): 1059-1073.

Sairam RK, Tyagi A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science-Bangalore* 86(3): 407-421.



Sánchez E, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L. (2004). Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  application rates. *Scientia Horticulturae* 99: 237-248.

SAS. (1987). SAS/STAT Guide for Personal Computers. Version 6; Statistical Analysis System Institute, Inc.: Cary NC. P. 1028-1056.

Szarka A, Tomasskovics B, Bánhegyi G. (2012). The ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol triad in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4): 4458-4483.

Van Breusegem F, Vranová E, Dat JF, Inzé D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161(3): 405-414.

Von Wirén N, Gazzarrini S, Frommer WB. (1997). Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil*. 196: 191-199.

Wolf B. (1982). A comprehensive system of leaf analyses and its use for diagnosing crop nutrient status. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 13(12): 1035-1059.

Yancey P. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* 208: 2819-2830.

Zaifnejad M, Clark RB, Sullivan CY. (1997). Aluminum and water stress effects on growth and proline of sorghum. *Journal of Plant Physiology*, 150(3): 338-344.