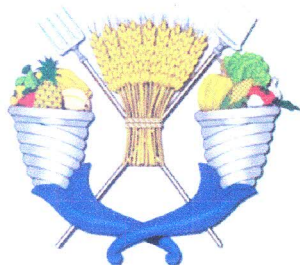


F
2588
C 2



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

APLICACIÓN FOLIAR DE ÁCIDO GLUTÁMICO EN PLANTAS DE JITOMATE

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA

JOSE REYNALDO SERNA RODRÍGUEZ



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



CHAPINGO, MÉXICO, DICIEMBRE 2007



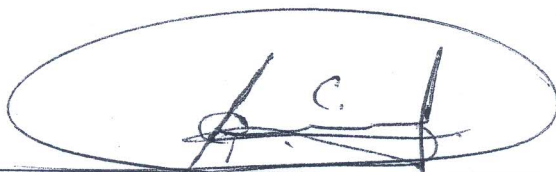
BIBLIOTECA

**APLICACIÓN FOLIAR DE ÁCIDO GLUTÁMICO EN PLANTAS DE
JITOMATE**

Tesis realizada por **José Reynaldo Serna Rodríguez** bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



DR. ROGELIO CASTRO BRINDIS

ASESOR:



Ph D. MARIA TERESA COLINAS LEÓN

ASESOR:



Ph D. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

ASESOR:



DR. MARIO PÉREZ GRAJALES

Dedico esta tesis a mi esposa
América Guadalupe Franco Alva

y a mis hijos

Paula Élida

Isis América

José Reynaldo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo

Por darme la oportunidad de aumentar mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Por el apoyo económico brindado para la culminación de mis estudios.

Al Lic. Eduardo Rodríguez Cantú.

Por su patrocinio y confianza para obtener el grado de maestro en ciencias.

Al Dr. Enrique Rodríguez Pérez.

Por el asesoramiento y apoyo recibido.

Al Comité Asesor del presente trabajo.

Por sus críticas y recomendaciones hechos durante el desarrollo y revisión de la tesis.

Al Ing. Cecilio Bautista Bañuelos. Por su apoyo para el montaje de la técnica para la medición de la glutamina sintetasa.

A Jorge Luis Romero Sánchez y Jesús Miguel Gonzáles Romero. Por ayudarme durante el trabajo de campo y de laboratorio.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis realizó sus estudios de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo el título en Diciembre de 1998. Ejerció la profesión de Ingeniero Agrónomo en varias empresas de la Iniciativa Privada. En 2006 y 2007 realizó los estudios de maestría en la Universidad Autónoma Chapingo, dentro del posgrado en horticultura.

RESUMEN

APLICACIÓN FOLIAR DE ÁCIDO GLUTÁMICO EN PLANTAS DE JITOMATE

Serna-Rodríguez J. R.¹; Castro-Brindis R.²; Colinas-León M. T.²; Sahagún-Castellanos J.²; Pérez-Grajales M.²

El ácido glutámico es un aminoácido que participa en diversos procesos metabólicos vegetales. El objetivo fue determinar si la aplicación foliar de ácido glutámico produce un mejor desarrollo de la planta de jitomate y un incremento en la producción de frutos. El experimento fue desarrollado bajo condiciones de invernadero e hidroponía, las variables en las cuales hubo respuesta positiva a la aplicación de ácido glutámico fueron: contenido de clorofila b, peso de frutos frescos, peso de frutos secos y actividad de la enzima glutamina sintetasa.

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum*, absorción de nitrógeno, asimilación de nitrógeno.

¹Estudiante de Maestría. Posgrado de Horticultura. Departamento de Fitotecnia. UACH.

²Profesor-Investigador. Posgrado de Horticultura. Departamento de Fitotecnia. UACH.

ABSTRACT

FOLIAR APPLICATION OF GLUTAMIC ACID TO TOMATO PLANTS

Serna-Rodríguez J. R.¹; Castro-Brindis R.²; Colinas-León M. T.²; Sahagún-Castellanos J.²; Pérez-Grajales M.²

The glutamic acid is an amino acid that is involved in some plant metabolic processes. This study was conducted to determine if the foliar application of glutamic acid produces a better development of the tomato plant and an increment in fruit production. The experiment was developed under greenhouse and hydroponics conditions, the variables in which there was positive response to the application of glutamic acid were: chlorophyll b content, fresh weight of fruits, dry weight of fruits and activity of the enzyme glutamine synthetase.

Key Words: *Lycopersicon esculentum*, nitrogen absorption, nitrogen assimilation.

¹Student Master Science. Posgrado de Horticultura. Departamento de Fitotecnia. UACH.

²Professor-Investigator. Posgrado de Horticultura. Departamento de Fitotecnia. UACH.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Tomate.....	2
2.2 Producción en el invernadero.....	3
2.3 Fertilización foliar.....	4
2.4 Rutas y mecanismos de fertilización foliar.....	5
2.5 Aminoácidos.....	6
2.6 Absorción y asimilación del N.....	8
2.6.1 Absorción del Nitrato.....	9
2.6.2 Reducción de nitrato a amonio.....	11
2.6.3 Nitrato reductasa.....	12
2.6.4 Nitrito reductasa.....	13
2.6.5 Absorción de amonio.....	15
2.6.6 Glutamina sintetasa (GS).....	17
2.6.7 Glutamato sintasa (GOGAT).....	19
2.6.8 Otra ruta de asimilación de amonio. Ácido glutámico deshidrogenasa (GDH).	21
2.6.9 Transaminación.....	22
2.6.10 Síntesis de asparagina.....	23
2.6.11 Importancia del metabolismo del carbono en la asimilación de N.....	24
2.6.12 Conexión de Glutamato y Aspartato al Metabolismo.....	25

2.7 Transporte del N absorbido y asimilado.....	26
2.8. La solución nutritiva.....	27
2.9 Determinación del estado nutricional de la planta.	29
2.10 Clorofila.	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1 Diseño experimental.....	33
3.2 Variables estudiadas.	34
3.3 Manejo experimental.	38
3.3.1 Establecimiento del almácigo.....	38
3.3.2 Trasplante a bolsas.	38
3.3.3 Sistema de riego.....	39
3.3.4 Solución nutritiva.....	40
3.3.5 Aplicación de Tratamientos	42
3.4 Metodología para la medición de concentración de clorofila en hojas.	44
3.5 Metodología para la medición de la actividad de la glutamina sintetasa.	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1 Primer muestreo.....	52
4.2 Segundo Muestreo.....	55
5. CONCLUSIONES.....	61
6. LITERATURA CITADA	62

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Fuentes utilizadas y cantidad de cada ión para la preparación de la solución nutritiva.....	40
CUADRO 2. Cantidad de ácido glutámico hidroclorado utilizada en cada tratamiento	43
CUADRO 3. Cuadrados medios de las variables correspondientes al primer muestreo de plantas de jitomate asperjadas con diferentes dosis de ácido glutámico	53
CUADRO 4. Comparación de medias de las variables contenido de clorofila b (Cb) y actividad de la glutamina sintetasa (GS) correspondientes al primer muestreo de plantas de jitomate asperjadas con seis dosis de ácido glutámico.....	55
CUADRO 5. Cuadrados medios correspondientes a las variables medidas durante el segundo muestreo	57
CUADRO 6. Comparación de medias de las variables peso de frutos en fresco (PFF), peso de frutos en seco (PFS), peso total de la planta en seco (PTotS) y actividad de la glutamina sintetasa (GS) correspondientes al segundo muestreo de plantas de jitomate asperjadas con seis dosis de ácido glutámico.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas quirales de los aminoácidos.....	7
Figura 2. Configuración S de los aminoácidos.....	8
Figura 3. Resumen de los procesos involucrados en la asimilación mineral de nitrógeno.....	9
Figura 4. Sistemas de absorción de nitrato.....	10
Figura 5. Canal iónico y proteína permeasa para absorción de nitrato....	11
Figura 6. Modelo para el acoplamiento del flujo de electrones de fotosíntesis o de glicólisis a la reducción del nitrito vía la nitrito reductasa.....	14
Figura 7. Reacciones consecutivas en la reducción de nitrato a amonio.	15
Figura 8. Asimilación del amonio en glutamina, y su posible posterior conversión a glutamato.....	20
Figura 9. Asimilación del amonio con la ayuda de la glutamato deshidrogenasa.....	21
Figura 10. Ejemplo de transaminación.....	22
Figura 11. Síntesis de asparagina.....	23
Figura 12. Relación del ciclo de Krebs con glutamato y aspartato.....	25
Figura 13. Esquema de Z simplificado del transporte de electrones en la membrana del tilacoide.....	32
Figura 14. Efecto de la aplicación de ácido glutámico foliar sobre el contenido de clorofila b.....	58

1. INTRODUCCIÓN

El ácido glutámico es un aminoácido. Los aminoácidos exógenos pueden ser absorbidos e incorporados por las plantas tanto por la vía radical como por la foliar e integrarse así al metabolismo vegetal (Arjona *et al.*, 2004). El uso de los fertilizantes foliares en la agricultura comercial es una técnica que provee los nutrimentos que requiere el cultivo como suplemento a la fertilización del suelo (Trejo-Téllez *et al.*, 2007). El ácido glutámico no es un nutrimento, sin embargo, la aplicación foliar de este aminoácido puede ser positiva para las plantas ya que participa en procesos metabólicos importantes entre los que se encuentran la asimilación del amonio y procesos de transaminación.

El objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la aplicación foliar de ácido glutámico en el desarrollo y producción de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). La hipótesis es que la aplicación foliar de ácido glutámico provoca un mejor desarrollo en las plantas, ya que al entrar al metabolismo se produce un incremento en la producción de frutos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Tomate.

El tomate es la segunda hortaliza más cultivada en el mundo, la primera es la papa (*Solanum tuberosum* L.). El tomate pertenece al género *Lycopersicon*, especialmente *L. esculentum*, que es cultivado por su fruto comestible. El género *Lycopersicon* de la familia Solanaceae se cree que tiene su origen en la franja costera del Oeste de Sudamérica, desde el Ecuador hasta cerca de los 30° de latitud Sur. La especie es nativa de Sudamérica, particularmente de Perú y de las Islas Galápagos. Fue originalmente domesticada en México. A mediados del siglo XVI, el tomate fue introducido en Europa, principalmente presentado en herbarios. Fue cultivado por la belleza de su fruta, no fue consumido con regularidad, excepto en Italia y España. Se pensaba que la fruta era venenosa como su pariente la belladona (*Atropa belladonna* L.). A pesar de que era nativo del Nuevo Mundo, el tomate fue introducido de nueva cuenta en América desde Europa en el siglo XVIII (Jones, 1999).

El tomate es una hierba perenne, pero es usualmente cultivada de manera anual en regiones templadas, ya que muere a causa del frío. Originalmente tuvo un hábito de crecimiento indeterminado, produciendo tres nudos entre cada inflorescencia, pero las variedades determinadas tienen forma de arbusto, lo cual le permite a la planta producir brotes laterales que terminan

en grupos de frutas. Las variedades determinadas tienen menos de tres nudos entre las inflorescencias, los tallos finalizan en una inflorescencia, y producen frutos que son cosechados mecánicamente con facilidad y que se usan principalmente para su procesamiento (Jones, 1999).

2.2 Producción en el invernadero.

En el invernadero, la planta de tomate puede ser mantenida por períodos de 6 a 9 meses, o aún más, orientando la planta hacia arriba enroscándola en un soporte vertical, removiendo las hojas viejas cuando los racimos de frutos más bajos son cosechados, y bajando el tallo principal de la planta para mantenerla al alcance de los trabajadores. Este proceso puede ser mantenido mientras la planta tenga crecimiento activo, y se encuentre libre de enfermedades y otros estreses.

En el invernadero es posible controlar el ambiente y otros factores que afectan al buen desarrollo de la planta, y consecuentemente mantenerla productiva un largo período de tiempo (Jones, 1999).

Los factores que afectan en mayor medida la producción de tomate en invernadero son: intensidad y duración de la luz, nivel de dióxido de carbono (CO₂), temperatura y humedad, control de plagas y enfermedades, manejo nutrimental durante toda la vida de la planta, características varietales y habilidad en el manejo, requerida para producir plantas rendidoras y con buena calidad de frutos (Jones, 1999).

2.3 Fertilización foliar.

La fertilización foliar se ha convertido en una práctica común e importante para los productores, porque corrige las deficiencias nutrimentales de las plantas, favorece el buen desarrollo de los cultivos y mejora el rendimiento y la calidad del producto (Trinidad-Santos y Aguilar-Manjarrez, 2000).

En la actualidad se ha incrementado el uso de los fertilizantes foliares en la agricultura comercial, ya que proveen los nutrimentos que requiere el cultivo como suplemento a la fertilización del suelo (Trejo-Téllez et al., 2007). La fertilización foliar puede contribuir en la calidad y en el incremento de los rendimientos de las cosechas, y muchos problemas de fertilización al suelo se pueden resolver fácilmente mediante la fertilización foliar. La hoja tiene una función específica de ser una fábrica de carbohidratos, pero por sus características anatómicas presenta condiciones ventajosas para una incorporación inmediata de los nutrimentos a los fotosintatos y la translocación de éstos a los lugares de mayor demanda (Trinidad-Santos y Aguilar-Manjarrez, 2000).

Para el buen éxito de la fertilización foliar es necesario tomar en cuenta tres factores, la planta, el ambiente y la formulación foliar. En relación a la formulación foliar es importante la concentración de la sal portadora del nutrimento, el pH de la solución, la adición de coadyuvantes y el tamaño de la gota del fertilizante líquido. Del ambiente se debe de considerar la temperatura del aire, el viento, la luz, humedad relativa y la hora de aplicación. De la planta se ha de tomar en cuenta la especie del cultivo, estado nutricional, etapa de

desarrollo de la planta y edad de las hojas (Trinidad-Santos y Aguilar-Manjarrez, 2000).

2.4 Rutas y mecanismos de fertilización foliar.

Penetración a través de cutícula. En la fertilización foliar la cutícula es la estructura que primero entra en contacto con la solución fertilizante; es decir, es la primer barrera para el proceso de penetración foliar. El modelo conceptual más simple que explica la penetración vía cutícula por una molécula no cargada es el de la membrana sorción-difusión. Las moléculas permeadas son sorbidas en un lado de la membrana (exterior), difunden a través de la membrana y son desorbidas en el otro lado (interior). Este modelo explica perfectamente la permeabilidad de la cutícula a sustancias orgánicas no electrolíticas (no cargadas).

La penetración a nivel de la cutícula la determinan factores como gradientes de polaridad, de carga, y químicos, la presencia de espacios interreticulares y espacios libres. La penetración de iones orgánicos o inorgánicos depende de la carga del ión. -la penetración de cationes es más fácil-. La adsorbilidad es una función de la valencia y del radio iónico. A mayor valencia y mayor radio iónico, mayor adsorción.

Penetración a través de ectodesmos. Los ectodesmos son estructuras finas en las paredes exteriores de las células epidérmicas, las cuales se extienden desde la cutícula y hasta la pared celular, por lo que



representan una conexión casi directa del protoplasto con el medio exterior, por lo tanto estas estructuras se han involucrado en la penetración foliar.

Los ectodesmos abundan en el estoma, alrededor de las células guarda, sobre las paredes anticlinales de las células epidérmicas y alrededor de los tricomas glandulares localizados exactamente arriba de las nervaduras (Trejo-Téllez et al., 2007)

Los estudios han demostrado que los nutrientes en solución si son absorbidos aunque no en toda la superficie de la cutícula foliar, pero sí, en áreas puntiformes las que coinciden con la posición de los ectodesmos que se proyectan radialmente en la pared celular (Trinidad-Santos y Aguilar-Manjarrez, 2000).

2.5 Aminoácidos.

Los aminoácidos son los precursores moleculares de las proteínas (Berg *et al.*, 2002). Según la posición del grupo NH_2 , se distingue entre α -aminoácidos, β -aminoácidos, γ -aminoácidos, etc. Los de mayor importancia son los α -aminoácidos, componentes fundamentales de las proteínas (Beyer y Walter, 1987).

Un α -aminoácido consta de un átomo de carbono central, llamado carbono α , unido a un grupo amino, un grupo ácido carboxílico, un átomo de hidrógeno y un grupo R característico. El grupo R se denomina habitualmente cadena lateral. Con cuatro grupos diferentes conectados al átomo de carbono

α , los α -aminoácidos son quirales, las dos formas especulares (Figura 1) se llaman isómero L e isómero D (Berg *et al.*, 2002).

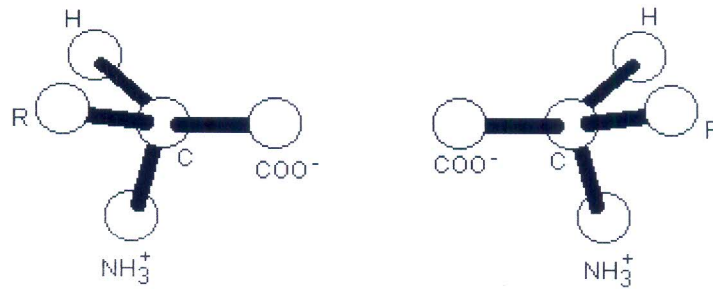


Figura 1. Formas quirales de los aminoácidos, a la izquierda isómero L, a la derecha isómero D.

Solamente los aminoácidos L son constituyentes de las proteínas. Aunque se ha empleado un enorme esfuerzo para entender por qué los aminoácidos de las proteínas tienen esta configuración absoluta, todavía no se ha llegado a una explicación satisfactoria. Parece probable que la selección de L sobre D fuese arbitraria pero, una vez realizada, se fijó en la historia evolutiva temprana (Berg *et al.*, 2002)

Para casi todos los aminoácidos el isómero L tiene una configuración S (en vez de R). La dirección contraria a las agujas del reloj de los sustituyentes de mayor a menor prioridad (Figura 2) indica que el centro quiral es de configuración S (Berg *et al.*, 2002).

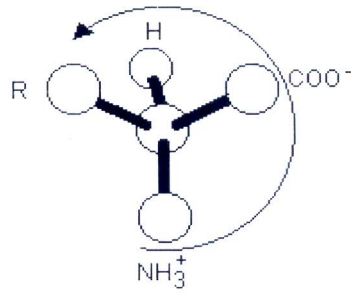


Figura 2. Configuración S de los aminoácidos.

2.6 Absorción y asimilación del N.

Los dos procesos biológicos por los que el nitrógeno inorgánico es convertido en nitrógeno orgánico, son la fijación del nitrógeno molecular (N_2) y la asimilación del nitrato (NO_3^-). La asimilación del nitrato consta de tres etapas: 1) absorción; 2) reducción de nitrato a amonio; y 3) incorporación del amonio a esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos, proceso que recibe el nombre específico de asimilación del amonio (Maldonado *et al*, 2000).

En la asimilación del nitrato (NO_3^-), éste es convertido a una forma de alta energía (NO_2^-), entonces toma una forma de mayor energía (NH_4^+), y finalmente se convierte en el nitrógeno del grupo amida de la glutamina. Este proceso consume el equivalente a 12 ATP por nitrógeno. Figura 3 (Taiz y Zeiger, 2003).

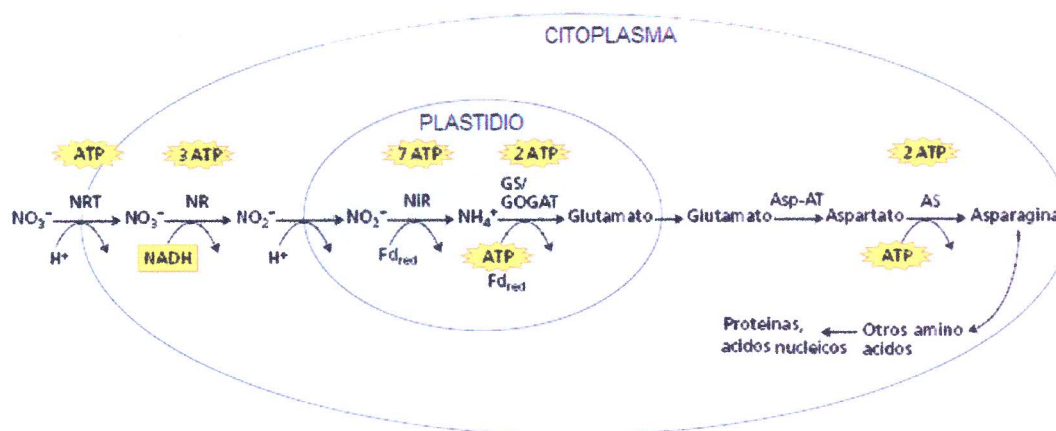


Figura 3. Resumen de los procesos involucrados en la asimilación mineral de nitrógeno (Tomado de Taiz y Zeiger, 2003).

Las plantas como las leguminosas forman relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno para convertir el nitrógeno molecular (N_2) en amoníaco (NH_3). El amoníaco es el primer producto estable de la fijación del N, en el pH fisiológico el amoníaco es protonado y convertido a ión amonio (NH_4^+). El proceso de la fijación biológica del N, junto a la subsecuente asimilación del NH_3 en aminoácidos, consume cerca de 16 ATP (Taiz y Zeiger, 2003).

2.6.1 Absorción del Nitrato.

La absorción del nitrato por la planta disminuye a bajas temperaturas, en anaerobiosis y en presencia de inhibidores de la respiración, lo que demuestra que es un proceso dependiente de energía metabólica.

Muchas especies vegetales muestran dos sistemas de absorción de nitrato. El primero de ellos, inducible por nitrato, tiene una alta afinidad por ese

anión ($K_m < 100\mu\text{M}$) y se satura a concentraciones externas inferiores a 1mM. El segundo, que es especialmente operativo a concentraciones externas de nitrato superiores a 1mM, no muestra cinética de saturación (Figura 4) (Maldonado *et al*, 2000).

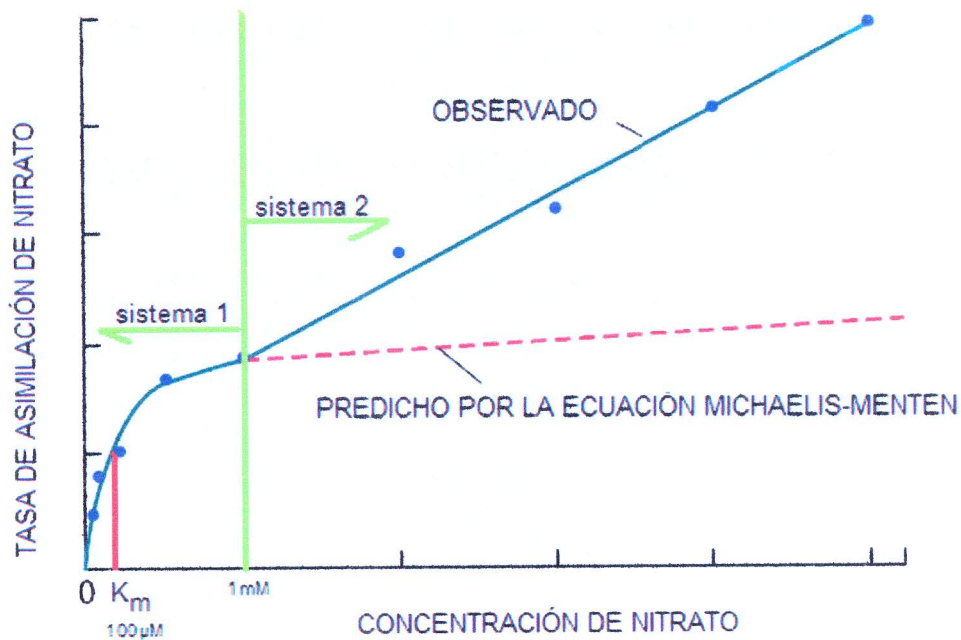


Figura 4. Sistemas de absorción de nitrato. En el primero de ellos se observa una clara actividad tipo enzima, en el segundo no se muestra cinética de saturación (Tomado de Taiz y Zeiger, 2003).

Todo ello sugiere que el primer sistema está constituido por permeasas y el segundo por canales iónicos (Figura 5). Las medidas de los cambios que experimenta el potencial de membrana de las células de la raíz durante la absorción del nitrato, y su dependencia del pH externo, han permitido proponer que el nitrato es transportado al interior celular mediante un mecanismo

simporte $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$. El gradiente de potencial electroquímico de H^+ a través del plasmalema es mantenido por una H^+ -ATPasa que transporta unidireccionalmente H^+ al exterior con la energía del ATP proveniente de la respiración de células de raíz (Maldonado *et al*, 2000).

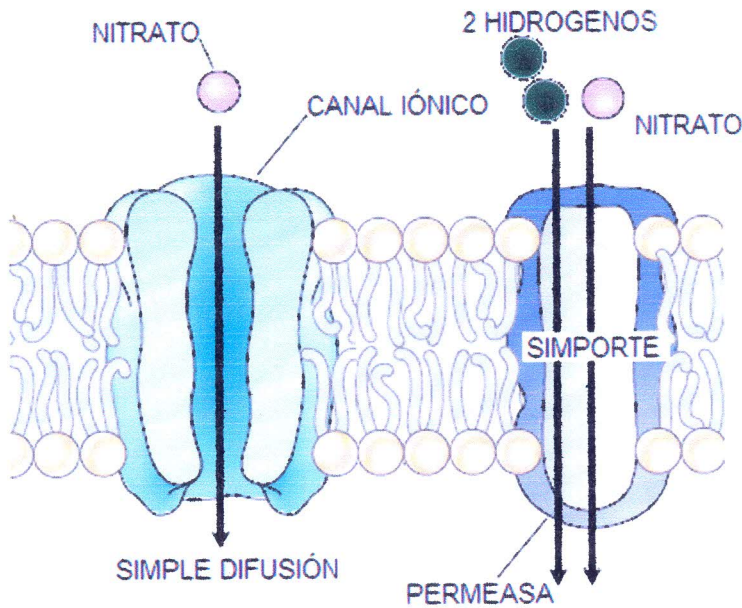


Figura 5. Canal iónico y proteína permeasa, ambas útiles en la absorción de nitrato (Tomado de Taiz y Zeiger, 2003).

2.6.2 Reducción de nitrato a amonio.

Nitrato y amonio son las principales fuentes de N para las plantas. Bajo condiciones normales, aireadas, el nitrato es la principal fuente de N. El nitrato es rápidamente móvil en las plantas, y puede ser almacenado en vacuolas, pero para que el nitrato pueda ser usado en la síntesis de proteínas y otros

compuestos orgánicos debe ser reducido a amonio. La nitrato reductasa convierte el nitrato en nitrito en el citoplasma. Todas las células vegetales vivientes tienen la capacidad de reducir el nitrato a nitrito, usando la energía de la fotosíntesis y la respiración (NADPH y NADH) en los tejidos verdes, y de la respiración en los tejidos radicales y tejidos no verdes. La nitrito reductasa, la cual se localiza en cloroplastos, reduce el nitrito en amonio, usando la energía y reductantes de fotosíntesis (ferredoxina reducida) (Barker y Pilbeam, 2007).

2.6.3 Nitrato reductasa.

El primer paso de la reducción de nitrato a nitrito ocurre en el citoplasma.



El nicotínamida nucleótido reducido (NADH o NADPH) funciona como fuente de electrones para la reducción (Conn *et al.*, 2006).

La reducción del nitrato requiere molibdeno como cofactor. Dos electrones se transfieren al nitrato (Estado de oxidación +5) y lo convierten en nitrito (Estado de oxidación +3). La respiración es la fuente de piridín nucleótidos en las raíces, y también, junto con la fotosíntesis pueden ser fuente en tallos (Barker y Pilbeam, 2007).

2.6.4 Nitrito reductasa.

La nitrito reductasa cataliza la reducción de nitrito a amonio en una reacción de 6 electrones que son suministrados por la ferredoxina reducida. Se encuentra en hojas y raíces. Localizándose exclusivamente en cloroplastos y plastidios (Maldonado *et al.*, 2000).



En las hojas, la reducción del nitrito a amonio implica la transferencia de 6 electrones. Los intermediarios como el ácido hiponitroso ($\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$) o la hidroxilamina (HONH_2), no son liberados, y la reducción toma lugar en una sola transferencia. La gran transferencia de energía y el poder de reducción requeridos para esta reacción se facilita debido a procesos localizados en los cloroplastos. En las raíces, una ferredoxina (proteínica) puede funcionar, y la energía para la reducción es proveída por la glicólisis (respiración). Figura 6. También es posible que la energía reductora provenga de NADPH (Conn *et al.*, 2006).

En las plantas, las raíces y tallos son capaces de metabolizar nitrato, y la proporción de nitrato reducido en las raíces depende de la especie, edad, cantidad de N, temperatura, y otros factores ambientales (Barker y Pilbeam, 2007).

La asimilación de nitrato es un proceso que consume energía. Se usa el equivalente de 15 moles de ATP por cada mol de nitrato reducido. La

asimilación de amonio requiere 5 ATP adicionales por mol (Barker y Pilbeam, 2007). Taiz y Zeiger (2003) mencionan que se consumen 12 a 17 ATP por nitrógeno asimilado. Es probable que se consideren distintas situaciones en las reacciones propias del metabolismo vegetal.

En las raíces, hasta el 23% de la energía de la respiración puede ser usada en la asimilación de nitrato, comparado con 14% en la asimilación del amonio. Sin embargo, el nitrato puede ser almacenado en las células sin producir efectos tóxicos, pero el amonio es tóxico aún a bajas concentraciones y debe ser metabolizado en combinaciones orgánicas. Consecuentemente, el metabolismo del amonio para detoxificación puede mermar más reservas de carbono que una acumulación de nitrato (Barker y Pilbeam, 2007).

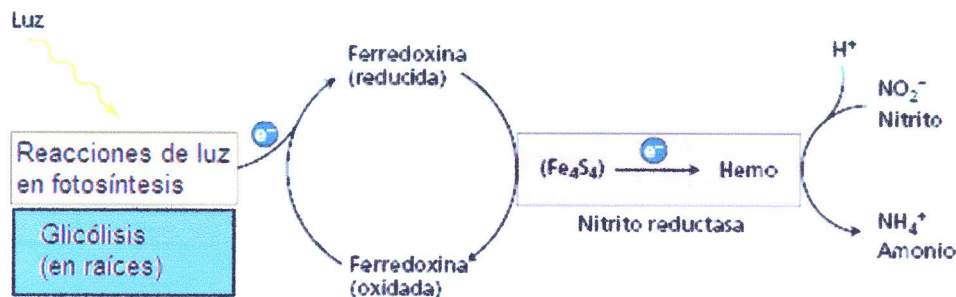


Figura 6. Modelo para el acoplamiento del flujo de electrones de fotosíntesis o de glicólisis a la reducción del nitrito vía la nitrito reductasa (Tomado de Taiz y Zeiger, 2003).

La nitrito reductasa posee una proteína de hierro (hemo), que interviene en el proceso de reducción (Conn *et al.*, 2006).

En resumen: la reducción de nitrato a amonio tiene lugar mediante dos reacciones consecutivas (Figura 7), primero el nitrato es reducido a nitrito por la enzima nitrito reductasa (NR). Dicha reacción consume 2 electrones suministrados por NADH_2 . Seguidamente, el nitrito es reducido a amonio por la nitrito reductasa (NiR) en una reacción que requiere seis electrones donados por la ferredoxina (Fd) reducida (Maldonado *et al.*, 2000).

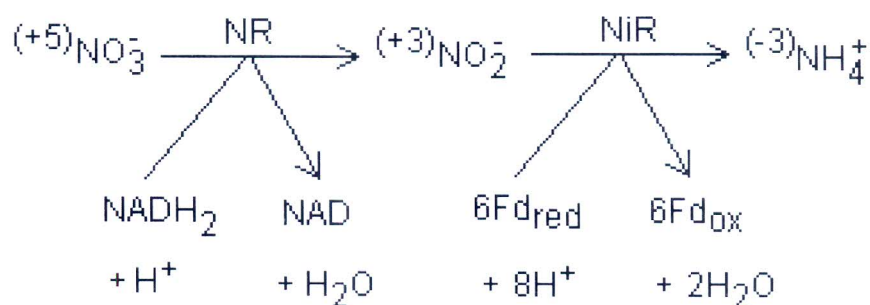


Figura 7. Reacciones consecutivas en la reducción de nitrato a amonio.

2.6.5 Absorción de amonio.

Aunque el proceso de absorción de amonio no es completamente comprendido, es claro que el transporte activo y pasivo puede ocurrir por diferentes mecanismos.

Para la absorción activa, el amonio puede ser absorbido a través de un mecanismo uniporte. Por el contrario, dado que la permeabilidad de la membrana al NH_3 es mayor que al NH_4 , una asimilación pasiva puede ocurrir por difusión del gas NH_3 . En la solución del suelo la distribución de la relación



de NH_4 y NH_3 está afectada por pH. A pH neutral o ácido, más del 99% del nitrógeno amoniacal está protonado, es decir en forma de NH_4 . La mayor parte del nitrógeno amoniacal absorbido por las plantas es probablemente el resultado de la absorción activa. El mecanismo de la absorción activa de NH_4 , que no está claramente establecido, aparenta ser un acarreador regulado, como indica la cinética de saturación y la depresión de la absorción que limitan la energía metabólica (Below, 2001).

2.6.5.1 Incorporación del amonio a esqueletos carbonatados

El metabolismo del amonio en aminoácidos y amidas es el principal mecanismo de asimilación y detoxificación del amonio. La formación de ácido glutámico es el puerto de entrada del N a compuestos orgánicos, y ocurre en los cloroplastos o mitocondrias. Una enzima involucrada en la asimilación de amonio en la mitocondria es la glutamato deshidrogenasa. La asimilación de amonio en los cloroplastos usa amonio que es formado de la reducción de nitrato a nitrito por la nitrato reductasa y aquel que es liberado en la fotorrespiración. Dos enzimas están involucradas en los cloroplastos, glutamina sintetasa y glutamato sintasa. La glutamina sintetasa forma glutamina desde amonio y glutamato. La glutamato sintasa forma glutamato de glutamina y cetoglutarato. Estas enzimas también son activas en raíces y nódulos (fijación de N_2). Y asimilan la mayor parte del amonio derivado de la absorción de soluciones diluidas, reducción de nitrato, fijación de N_2 , o fotorrespiración (Barker y Pilbeam, 2007).

Cuando el amonio entra en la raíz, éste debe ser asimilado dentro de moléculas orgánicas debido a que pequeños incrementos en su concentración pueden fácilmente provocar desórdenes fisiológicos y metabólicos. En las plantas superiores así como también en otros organismos procariotas o eucariotas, el amonio es asimilado principalmente a través de la acción del ciclo GS/GOGAT (ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa) (Vezina y Margolis, 1990).

La glutamina sintetasa es crucial en el proceso asimilatorio del amonio ya que cataliza el primer paso en la conversión de nitrógeno inorgánico (amonio) hacia una forma orgánica (glutamina) (Gonnet y Diaz, 2000).

2.6.6 Glutamina sintetasa (GS)

Una de las dos reacciones clave en la asimilación del NH_3 es la catalizada por la glutamina sintetasa E.C. 6.3.1.2 (O'Neal y Joy, 1973), una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza (Conn *et al.*, 2000).



Esta reacción (Figura 8) requiere la hidrólisis de un ATP e involucra un catión divalente tal como Mg^{2+} , Mn^{2+} , o Co^{2+} como cofactor. Las plantas tienen dos tipos de glutamina sintetasa (GS), una en el citoplasma y la otra en los plastidios de raíces o cloroplastos de tallos verdes y hojas. La forma citoplasmática se expresa en la germinación de las semillas o en los haces

vasculares de raíces y tallos y producen glutamina para el transporte de nitrógeno intracelular. La GS en los plastidios de las raíces genera nitrógeno en forma de amida para el consumo local, la GS en cloroplastos de brotes reasimila la fotorrespiración de NH_4 (Taiz y Zeiger, 2003).

Cuando hay suministro de N-NH_4^+ , y con la participación de α -oxoglutarato, el N es asimilado directamente en los cloroplastos para formar glutamato mediante la actividad de la glutamina sintetasa, que se ha localizado tanto en raíces y nódulos, como en tallos, hojas y frutos (Cruz-Flores, *et al.*, 2005).

2.6.6.1 Aspectos de interés de la glutamina.

La glutamina se aisló por primera vez de una fuente natural (jugo de remolacha, *Beta vulgaris* L.) en 1883 por Schulze y Bosshard. Su presencia en las proteínas había sido considerada 10 años antes por Hlasiwetz y Habberman quienes sugirieron que el amonio presente en los productos de hidrólisis ácida de proteínas fue causado por la hidrólisis de amidas de ácido glutámico y ácido aspártico. Sin embargo, no fue sino hasta 1932 que Damodaran logró el aislamiento de glutamina. Estudios posteriores mostraron que la glutamina está ampliamente distribuida en la naturaleza, ya sea como aminoácido libre o presente en péptidos, además la glutamina participa en varias rutas metabólicas, por ejemplo: síntesis de purinas, glucosamina, histidina, ácido p-aminobenzoico, asparagina, ácido antranílico, fenilacetilglutamina, difosfopiridín nucleótido, y guanosina 5'-fosfato. La glutamina tiene una función significativa

en el almacenamiento del amonio, y su síntesis desde ácido glutámico y amonio es una de las varias reacciones enzimáticas conocidas en la cual el amonio es utilizado. La glutamina puede producir amonio directamente por hidrólisis enzimática de su grupo amida, o indirectamente por transaminación con el ácido α -cetoglutarámico; el correspondiente α -ceto ácido (Meister, 1962).

2.6.7 Glutamato sintasa (GOGAT)

Niveles elevados de glutamina en plastidios estimulan la actividad de la glutamato sintasa. Esta enzima transfiere el grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, produciendo 2 moléculas de glutamato. Las plantas contienen 2 tipos de GOGAT: Una acepta electrones del NADH, y otra acepta electrones de ferredoxina (Fd) (Figura 8).



El tipo de enzima NADH-GOGAT está localizado en plastidios de tejidos no fotosintéticos tales como raíces o haces vasculares de hojas en desarrollo. En las raíces el NADH-GOGAT está involucrado en la asimilación de NH_4^+ absorbido de la rizósfera; en los haces vasculares de las hojas en desarrollo, la NADH-GOGAT asimila glutamina traslocada de raíces o de hojas senescentes. El tipo de glutamato sintasa dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT) se

encuentra en cloroplastos y sirve en el metabolismo del nitrógeno proveniente de fotorrespiración. Las raíces, particularmente bajo nutrición con nitrato, tienen Fd-GOGAT en plastidios. Se cree que la Fd-GOGAT en las raíces tiene funciones de incorporar glutamina generada durante la asimilación de nitrato (Taiz y Zeiger, 2003).

La glutamina sintetasa tiene alta afinidad por el amonio y por eso puede assimilar amonio a bajas concentraciones, tales como aquellas que ocurren de la reducción del nitrato. Si la enzima es inhibida, sin embargo, el amonio puede acumularse en niveles fitotóxicos. La acumulación de amonio a niveles tóxicos inhibiendo la glutamina sintetasa es el modo de acción del herbicida glufosinato (Barker y Pilbeam, 2007).

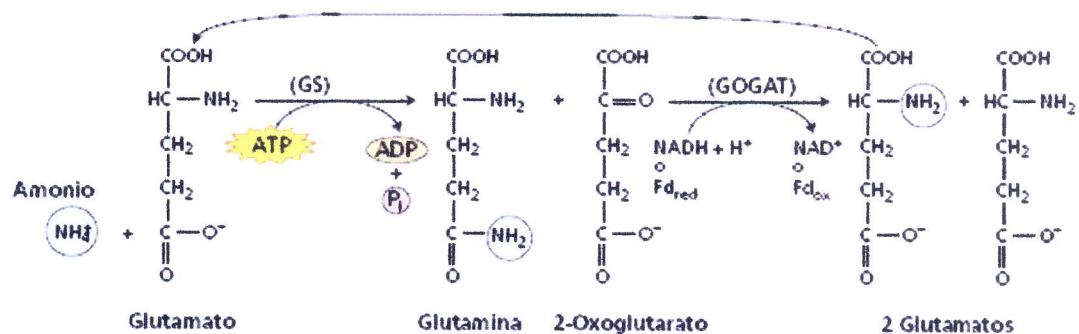
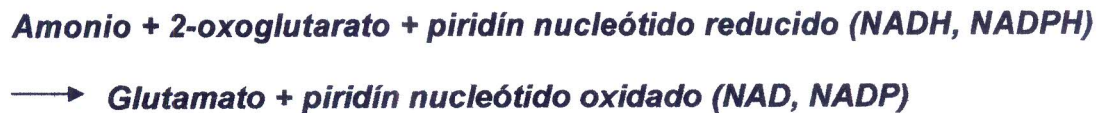


Figura 8. Asimilación del amonio en glutamina, y su posible posterior conversión a glutamato (Tomado de Taiz y Zeiger, 2003).

2.6.8 Otra ruta de asimilación de amonio. Ácido glutámico deshidrogenasa (GDH).

La glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza una reacción que sintetiza glutamato (Taiz y Zeiger, 2003).



Otra ruta metabólica para la asimilación del amonio en compuestos orgánicos es por ácido glutámico deshidrogenasa, la cual es localizada en la mitocondria. La ácido glutámico deshidrogenasa; tiene una baja afinidad por el amonio y llega a ser importante en la asimilación de amonio a altas concentraciones y en un bajo pH en el medio de crecimiento (Figura 9) (Barker y Pilbeam, 2007).

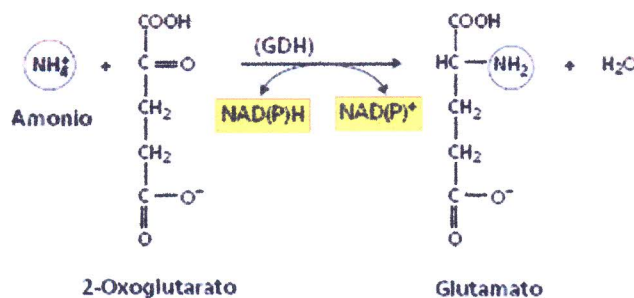


Figura 9. Asimilación del amonio con la ayuda de la glutamato deshidrogenasa (Tomado de Taiz y Zeiger, 2003).

2.6.9 Transaminación.

El amonio puede ser transferidos a un apropiado α -oxácido (α -cetoácido) para formar un α -aminoácido.



La transferencia puede ser también de otros ceto-grupos en las cadenas de carbono, por ejemplo γ -aminoácido o δ -aminoácido. Los cetoácidos para la síntesis de aminoácidos son derivados de fotosíntesis, glicólisis, y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, entre otros procesos (Barker y Pilbeam, 2007). Las enzimas que catalizan estas reacciones son conocidas como aminotransferasas. Un ejemplo es la aspartato aminotransferasa (Asp-AT) (Figura 10) (Taiz y Zeiger, 2003).

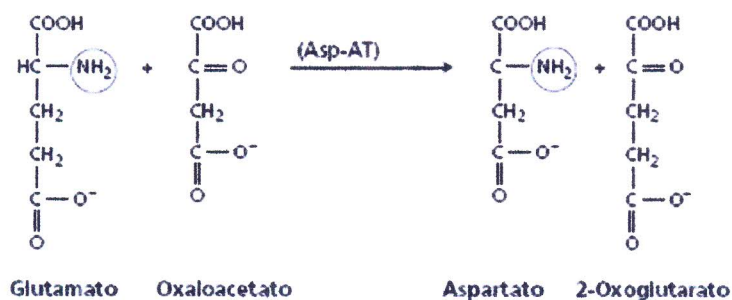


Figura 10. Ejemplo de transaminación (Tomado de Taiz y Zeiger, 2003).

2.6.10 Síntesis de asparagina.

La asparagina, aislada del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en 1806, fue la primera amida identificada. Esta sirve no solo como un precursor de proteínas, sino que es un compuesto clave en el almacenamiento y transporte de N a causa de su estabilidad y su alta relación nitrógeno – carbono (2 N a 4 C para asparagina, contra 2 N a 5 C para glutamina ó 1 N a 5 C para glutamato (Taiz y Zeiger, 2003)

La principal ruta metabólica para la síntesis de asparagina involucra la transferencia del nitrógeno amida de la glutamina a la asparagina (Figura 11).

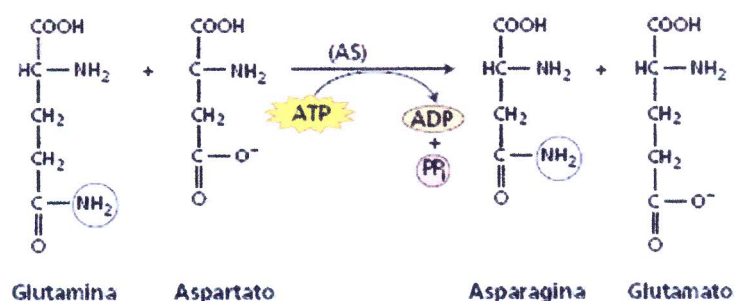


Figura 11. Síntesis de asparagina (Tomado de Taiz y Zeiger, 2003).

La asparagina sintetasa (AS) es la enzima que cataliza esta reacción, se encuentra en el citoplasma de las hojas y raíces y en los nódulos fijadores de N. En raíces de maíz (*Zea mays* L), particularmente aquellas bajo niveles potencialmente tóxicos de amoníaco, el amonio puede reemplazar a la glutamina como la fuente del grupo amida (Taiz y Zeiger, 2003).

2.6.11 Importancia del metabolismo del carbono en la asimilación de N.

La asimilación del nitrógeno por las plantas es la conversión de nitrógeno inorgánico (nitrato o amonio) en nitrógeno orgánico (glutamato, glutamina o asparagina), proceso que requiere poder reductor, ATP y esqueletos carbonados. El poder reductor y el ATP pueden ser suministrados por las reacciones lumínicas de la fotosíntesis o por la glucólisis y respiración. Asimismo, los esqueletos carbonados son proporcionados por la oxidación de carbohidratos que, en último término, son formados por la reducción fotosintética del carbono. La asimilación del nitrógeno es por tanto, un proceso íntimamente conectado al metabolismo del carbono.

La síntesis neta de una molécula de glutamina o de asparagina requiere la reducción y asimilación de dos moléculas de nitrato y el aporte de una molécula de 2-oxoglutarato o de oxalacetato, respectivamente como esqueletos carbonados. Dichos oxoácidos, o precursores de los mismos, provienen del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

La asimilación de amonio origina, pues, un flujo de carbono desde carbohidratos hasta aminoácidos. En ausencia de fotosíntesis el almidón o la sacarosa pueden suministrar dicho carbono. En la luz, los azúcares que se sintetizan en el ciclo reductor de las pentosas fosfato constituyen la fuente última de esqueletos carbonados para sustentar la síntesis de aminoácidos. Así pues, en los tejidos fotosintéticos, el carbono asimilado se reparte entre la formación de carbohidratos y la síntesis de aminoácidos. El flujo de carbono orgánico hacia una u otra vía se modula a través de la regulación de enzimas

claves de ambas rutas en respuesta, principalmente a la luz y a la disponibilidad de carbono y nitrógeno (Maldonado *et al.*, 2000).

2.6.12 Conexión de Glutamato y Aspartato al Metabolismo.

El ciclo de Krebs cumple dos funciones elementales: la síntesis de NADH y la formación de precursores de la síntesis de aminoácidos (Figura 12) (Ribas-Carbó y González-Meler, 2000).

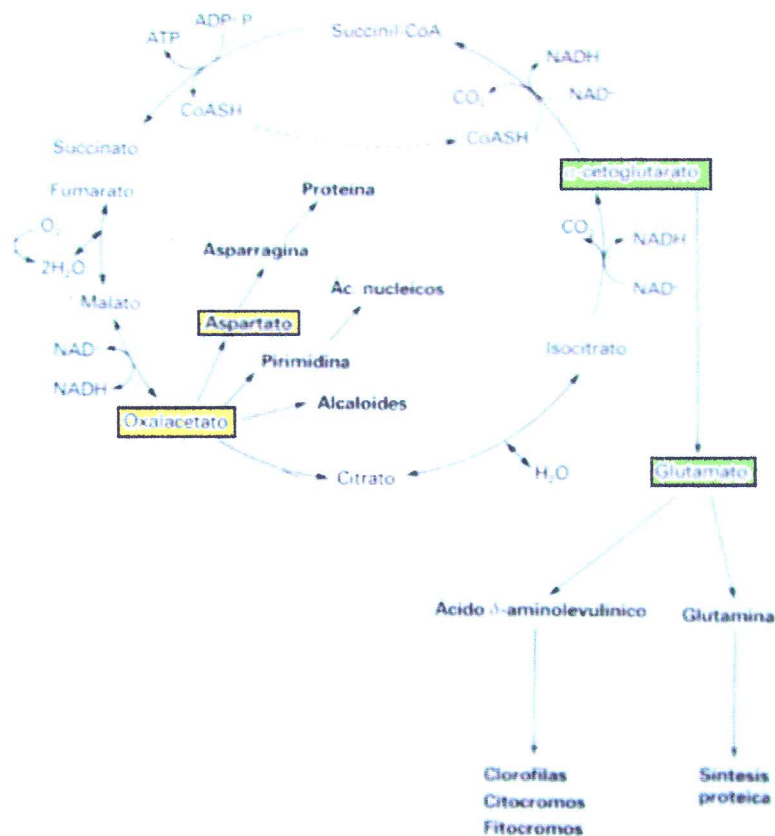


Figura 12. Relación del ciclo de Krebs con glutamato y aspartato (Tomado de Ribas-Carbó y González-Meler, 2000)

El glutamato está a un solo paso metabólico para la formación de α -cetoglutarato, o la formación de aspartato. El α -cetoglutarato es una molécula que participa directamente en el ciclo de Krebs, mientras que el aspartato puede convertirse en oxalacetato, otra molécula participante del ciclo de Krebs.

Por otro lado, el glutamato puede dar lugar a la formación de glutamina o de proteínas, y también es posible que entre en la ruta metabólica de la formación de la molécula de clorofila.

2.7 Transporte del N absorbido y asimilado.

El nitrato absorbido por la raíz puede ser reducido y asimilado en la misma raíz o ser transportado a la parte aérea de la planta, en donde es asimilado. Cuando en el suelo exista amonio, éste puede ser también absorbido; no obstante, al ser bastante tóxico, la mayoría de las plantas evita su acumulación incorporándolo rápidamente en aminoácidos. Parte del nitrógeno asimilado en la raíz es exportado a la parte aérea, principalmente en forma de glutamina y asparagina.

Del total del nitrato absorbido del suelo por la planta, las proporciones que se asimilan en la raíz o en las hojas dependen tanto de factores externos como de factores intrínsecos de la misma planta. Así, si existe una baja concentración de nitrato en el suelo, una elevada proporción es reducida en la raíz, mientras que, si hay suficiente nitrato disponible, la mayor parte es transportada al vástago, en donde puede acumularse tanto en el tallo como en

las hojas. Las vacuolas constituyen el principal sitio de almacenamiento de nitrato.

Otro factor que modifica la distribución interna de la asimilación del nitrato es la edad de la planta. En las primeras etapas de crecimiento, la contribución de la raíz es significativa; sin embargo, a medida que la planta se desarrolla, la reducción de nitrato desciende en la raíz y aumenta en las hojas.

Cuando la planta entra en su fase reproductora, surgen nuevos requerimientos de nitrógeno. En efecto, los frutos y las semillas en desarrollo demandan gran cantidad de nitrógeno orgánico. En cereales, la mayor cantidad (70-80% del total) del nitrógeno orgánico para el llenado del grano proviene de la degradación de proteínas de los órganos vegetativos, principalmente de la hoja bandera. La movilización del nitrógeno orgánico desde las hojas senescentes hacia las semillas constituye, pues, un proceso muy importante en la economía del nitrógeno de las plantas (Maldonado *et al.*, 2000).

2.8. La solución nutritiva.

La composición química de una solución nutritiva está determinada por

- i) una relación catiónica mutua
- ii) una relación aniónica mutua
- iii) la concentración iónica total
- iv) pH (Juárez-Hernández *et al.*, 2006).

El concepto de relación mutua entre los aniones NO_3^- , H_2PO_4^- y SO_4^{2-} , y entre los cationes K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} se basó en que una solución nutritiva debe estar regulada en sus macronutrientes contenidos en los iones mencionados (i.e., N, P, K, Ca, etc.). La regulación nutritiva consiste no sólo en la cantidad absoluta de cada elemento aportado sino, además, en la relación cuantitativa que se establece entre los aniones por una parte y los cationes por otra. Además, cuando se aplica la solución nutritiva en forma continua, las plantas pueden absorber iones a muy bajas concentraciones. Sin embargo, es probable que a una concentración demasiado baja, la demanda mínima de determinados nutrientes no sea cubierta. En el otro extremo de concentración, el consumo excesivo puede conducir a efectos tóxicos (Juárez-Hernández *et al.*, 2006)

En una verdadera solución nutritiva se tienen todos los iones en forma libre y activa; por lo que el pH es importante para determinar la disponibilidad de algunos iones; así por ejemplo, en un pH alto no es posible tener un contenido alto de iones Ca y PO_4 , debido a la posible precipitación de ambos compuestos poco solubles del tipo CaHPO_4 . El pH es importante para favorecer la presencia de la forma química H_2PO_4^- , que es la forma de fósforo más fácilmente absorbida por las plantas. A pH 5.0 el 100% del P está en la forma H_2PO_4^- y al aumentar el pH dicha forma pasa a HPO_4^{2-} ($\text{pK}_{a2}=7.3$) alcanzando el 100% a pH 10. El intervalo de pH en el que predomina el ion H_2PO_4^- sobre el HPO_4^{2-} está entre 5 y 6. Precisamente entre estos límites se tiene la mejor difusión de H_2PO_4^- en el espacio libre aparente radical y aumenta si absorción por parte de las plantas desarrolladas en hidroponía (Juárez-Hernández *et al.*, 2006).

El pH apropiado de una solución para el desarrollo de un cultivo en hidroponía varía entre 5 y 6. Sin embargo, el pH de una solución nutritiva no es estático sino que varía en función de la diferencia en la magnitud de absorción de nutrientes por las plantas, en términos del balance de aniones respecto a los cationes. Cuando los aniones son absorbidos en mayor magnitud, por ejemplo cuando la fuente de N en la solución nutritiva es únicamente NO_3^- , la planta excreta aniones OH^- y HCO_3^- , para contrarrestar las cargas en su interior, lo que genera un pH alcalino. A este proceso se le llama alcalinidad fisiológica (Juárez-Hernández *et al.*, 2006).

2.9 Determinación del estado nutrimental de la planta.

La técnica más ampliamente usada para la determinación cuantitativa del nitrógeno total es la de kjeldahl, no obstante tiene el inconveniente de requerir equipo especializado, y cuando se tiene un gran número de muestras para analizar, el gasto de reactivos es excesivo. Otro inconveniente es el tiempo invertido desde la toma de muestras hasta su preparación y análisis.

La determinación de clorofila en tejidos vegetales con acetona es un método utilizado para estimar el estado nutrimental del cultivo en lo que se refiere al nitrógeno, magnesio y fierro principalmente y conlleva los mismos inconvenientes y costo que la técnica de kjeldhal.

Se ha reportado que la cantidad de clorofila y de nitrógeno total determinados por los métodos tradicionales en leguminosas, gramíneas, frutales y hortalizas presenta una alta correlación con las unidades SPAD

medidas con el detector de clorofila Minolta SPAD-501. Existe un modelo reciente: el SPAD-502 en el cual también se ha demostrado correlación con el contenido de nitrógeno en arroz (*Oryza sativa* L.), y el cual ha sido calibrado para maíz (*Zea mays* L.), pasto festuca (*Festuca* sp.) y algodón (*Gossypium* sp.) (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 1998).

Los valores SPAD se basan en el principio de que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y el resto que se refleja entra en contacto con la celda detectora del SPAD-502 y es convertida en una señal eléctrica. La cantidad de luz captada por la celda es inversamente proporcional a la cantidad de luz utilizada por la clorofila, la señal es procesada, y la absorbancia es cuantificada en valores dimensionales que van de 0 a 199, por lo que las Unidades SPAD siempre serán las mismas de acuerdo con el tono verde de las hojas (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 1998).

2.10 Clorofila.

La radiación luminosa proveniente del sol que llega a la Tierra es fuente de energía primaria para la biosfera mediante el proceso fisiológico llamado fotosíntesis. Los vegetales son los principales organismos fotosintéticos. En el proceso de la fotosíntesis se distinguen dos fases: una de absorción y conversión de energía luminosa en energía electroquímica redox, y otra de asimilación de elementos químicos esenciales para la síntesis biomolecular (De las Rivas, 2000a).

Las clorofilas participan en la primer fase. Hay dos tipos de clorofila la *a* y la *b*. Son casi idénticas salvo por que en el radical R_2 del anillo porfirínico la clorofila *a* tiene un radical $-CH_3$, mientras que la clorofila *b* tiene un $-CHO$ (De las Rivas, 2000a). La clorofila es parte importante de los fotosistemas. Un fotosistema está constituido por una antena asociada a un centro de reacción. En las antenas y en los centros de reacción hay clorofilas (De las Rivas, 2000b). Existen 2 tipos de fotosistemas el I (o 700) y el II (o 680). En el Fotosistema II hay clorofilas *a* y *b*, en el Fotosistema I casi no hay clorofila *b*. Los dos fotosistemas actúan en conjunto. El esquema Z (Figura 13) muestra el camino de la transferencia del electrón desde el H_2O hasta el $NADP^+$ de acuerdo a la ecuación $2H_2O + 2 NADP + 8 \text{ protones} \rightarrow O_2 + NADPH + 2H^+$. Para aumentar la energía de los electrones provenientes la fotólisis del H_2O a un nivel requerido para reducir $NADP$ a $NADPH$, cada electrón debe ser “levantado” dos veces por los fotones absorbidos por los fotosistemas I y II. Por cada electrón un fotón es requerido en cada fotosistema. Después de la excitación los electrones fluyen a través de una cadena de transportadores de electrones. Los protones se mueven cruzando la membrana del tilacoide produciendo un gradiente de protones importante para la formación de ATP. Los electrones son acarreados entre los fotosistemas por la proteína plastocianina. Para reemplazar los electrones que se mueven del Fotosistema II al I las plantas oxidan agua, produciendo O_2 (Nelson y Cox, 2005).

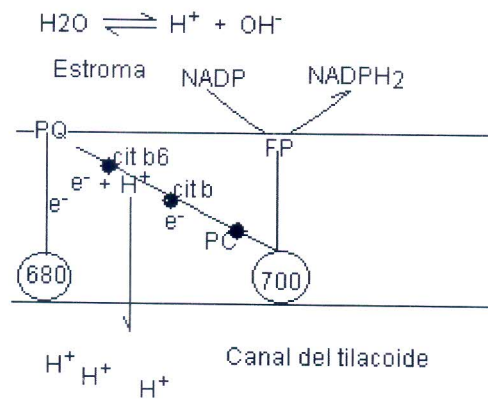


Figura 13. Esquema de Z simplificado del transporte de electrones en la membrana del tilacoide. Los fotones inciden sobre los fotosistemas 680 o 700, aumentando el nivel de energía del electrón. 680: Fotosistema II; PQ: Plastoquinona; cit b6: citocromo b6; cit b: citocromo b; PC: Plastocianina; 700: Fotosistema I; FP: Flavoproteína.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en un invernadero ubicado en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, de febrero a agosto de 2007.

Los tratamientos consistieron en aplicaciones foliares de ácido glutámico en dosis de 0.00, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 y 20.00 gL⁻¹. Se realizaron cinco aplicaciones, el intervalo entre aplicaciones fue de tres semanas, la primer aplicación se realizó cuatro semanas después del transplante. Se utilizó la variedad de jitomate híbrido "Reserva", el cual es de de crecimiento indeterminado; su fruto es tipo saladette.

3.1 Diseño experimental.

El experimento se llevó a cabo en un diseño Bloques Completos al azar con 6 tratamientos y 4 repeticiones, dando un total de 24 unidades experimentales. Cada unidad experimental constó de 6 bolsas (macetas) de plástico con una planta en cada bolsa.

Los tratamientos fueron aleatorizados en las 6 unidades experimentales de cada bloque, 3 en la línea de la derecha y 3 en la línea de la izquierda respecto del pasillo central; de acuerdo con el siguiente croquis:

Bloque I			Bloque II			Bloque III			Bloque IV		
3	5	2	5	3	2	4	3	2	1	2	3
			Pasillo								
1	6	4	4	1	6	1	6	5	5	6	4

Entre las unidades experimentales se dejaron 2 bolsas de protección, y en el inicio y el final de las líneas se dejaron 3 bolsas.

Para los análisis estadísticos de las variables bajo estudio se utilizaron los valores obtenidos de la unidad de muestreo por unidad experimental, los que fueron objeto de un análisis de varianza (ANVA). En los casos en que se obtuvo significancia estadística entre tratamientos, se aplicó la prueba de comparación de medias de DMS a un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0.05$).

3.2 Variables estudiadas.

En todas las variables se realizaron dos muestreos: el primero a los cuatro días después de la tercera aplicación de los tratamientos, y el segundo a los cuatro días después de la quinta aplicación. En el primer muestreo se tomó una planta entre las seis plantas de la unidad experimental, y en el segundo muestreo se tomó una planta entre las cinco plantas restantes de la unidad experimental.

Altura de planta (cm). La medición fue tomada con la ayuda de un flexómetro, midiendo desde el cuello de la planta, hasta el meristemo apical de la misma.

Absorbancia (Unidades SPAD). El equipo utilizado fue el SPAD-502. La medición fue realizada en los folíolos intermedios de las hojas de reciente madurez.

En las mediciones se tomaron dos folíolos por planta, en cada folíolo se tomaron 2 mediciones. Con lo que se obtuvieron 4 datos por planta. El valor promedio de estos cuatro datos fue utilizado en el análisis estadístico.

Volumen de tallo (cm³). El diámetro de tallo se midió con la ayuda de un vernier en tres lugares de la planta: 1) a la altura de donde estuvieron los cotiledones, 2) a la altura de la mitad visual de la planta, y 3) a la altura de la hoja de reciente madurez. En todos los casos el diámetro se tomó de forma perpendicular a la dirección del pecíolo de la hoja más cercana. De estos tres datos se obtuvo un diámetro promedio. Se consideró que el tallo tiene una forma cilíndrica. El diámetro promedio fue utilizado para calcular el área de la base del cilindro (tallo). Multiplicando el área por la altura, se obtuvo el volumen del tallo.

Número de frutos. Se contó el número total de frutos. Se contaron frutos de cualquier tamaño, desde los totalmente formados, hasta los que apenas iniciaban su formación, las flores fueron excluidas del conteo. Los frutos que ya habían sido cosechados antes del momento de la destrucción de la planta también fueron contabilizados.

Área foliar (cm²). El equipo utilizado fue el Integrador de Área Foliar LICOR LI-300. Para medir esta variable se tomaron todas las hojas de la planta. Durante el desarrollo del experimento se realizó una práctica llamada “deshoje”, para eliminar las hojas más viejas de las plantas, con la finalidad de evitar que los fotosintatos vayan hacia ellas y se dirijan a los frutos y hojas en formación; además de evitar enfermedades fungosas.

El deshoje no afectó a las plantas evaluadas durante el primer muestreo, pero las plantas del segundo muestreo si se vieron afectadas, ya que el deshoje se realizó antes del segundo muestreo. Para poder medir el área foliar, las hojas que se eliminaron en el deshoje fueron evaluadas y el área foliar obtenida fue sumada al área foliar proveniente de las plantas evaluadas en el segundo muestreo. Así, el área foliar evaluada en los análisis estadísticos es el área foliar total, aunque parte de las hojas ya no estaban durante el segundo muestreo.

Peso de frutos frescos (g). Se pesaron frutos de cualquier tamaño, desde los totalmente formados, hasta los que apenas iniciaban su formación.

Peso de hojas secas (g). Las hojas fueron colocadas en una bolsa de papel y ésta a su vez en una estufa de secado a 60°C durante 2 días. Ya secas, se pesaron en una balanza con capacidad de medir hasta décima de gramo.

Peso de tallos secos (g). Los tallos –y los racimos sin frutos- fueron cortados en pedazos los cuales fueron colocados en una bolsa de papel y ésta a su vez en una estufa de secado a 60°C durante 2 días.

Cuando los tallos estuvieron secos; éstos fueron pesados en una balanza con capacidad de medir hasta décima de gramo.

Peso de frutos secos (g). Los frutos fueron cortados en pedazos los cuales fueron expuestos al sol para secarlos. Para quitarles la humedad restante fueron colocados en una bolsa de papel y ésta a su vez en una estufa de secado a 60°C durante 2 días.

Cuando los frutos estuvieron secos, se pesaron en una balanza con capacidad de medir hasta décima de gramo. Los frutos finalmente pesados fueron los mismos cuyo peso fresco de frutos ya se había determinado.

Algunos frutos fueron cosechados antes del segundo muestreo. Éstos no fueron secados en la estufa, sin embargo su peso seco fue estimado a partir del peso fresco, al cual se le descontó el 95.32% de humedad (valor promedio de los frutos cosechados en el segundo muestreo destructivo).

Contenido de clorofila en hojas (mg g⁻¹). Se utilizaron los folíolos centrales de las hojas de reciente madurez. Para el caso del segundo muestreo se utilizaron los mismos folíolos usados para medir absorbancia (Unidades SPAD). Los folíolos fueron colocados en bolsas de plástico negro para evitar que siguieran fotosintetizando, y en hielo para bajar la temperatura y por consiguiente toda actividad metabólica.

Los folíolos fueron inmediatamente trasladados al laboratorio en donde fueron almacenados a -20°C, hasta su posterior análisis.

Se analizaron dos folíolos de cada planta, a cada folíolo se le tomaron dos muestras. En total cada planta tuvo cuatro datos de contenido de clorofila. El análisis se realizó utilizando la metodología presentada más adelante.

Actividad de la glutamina sintetasa (µM de γ-GHM g⁻¹h⁻¹). Se utilizó la metodología de análisis enzimático propuesta por Alcántar-González y

Sandoval-Villa (1999), con algunas modificaciones, la metodología se desarrolla más adelante.

3.3 Manejo experimental.

3.3.1 Establecimiento del almácigo.

Se utilizaron semillas de jitomate del híbrido “Reserva”, charolas de propagación de 200 cavidades, y peat moss como medio de germinación. Se colocó una semilla por cavidad.

El almácigo se regó manualmente todos los días, evitando la humedad excesiva y la falta de humedad.

El almácigo se sembró el 17 de febrero de 2007. Las charolas estuvieron dentro de un invernadero hasta el momento del trasplante.

Se utilizó el fungicida Daconil[®] para prevenir enfermedades fungosas; y el insecticida Confidor[®] para el control de mosquita blanca *Bemisia tabaci* y/o *Trialeurodes vaporariorum*.

3.3.2 Trasplante a bolsas.

El experimento fue realizado dentro de un invernadero de tipo Full Vent, de 1000 m². El trasplante a bolsas se realizó el día 31 de marzo de 2007, 42 días después de la siembra. Las bolsas fueron de 35 cm altura, 21 cm de largo y 18 cm de ancho las cuales fueron llenadas con tezontle. Se acomodaron en

cuatro líneas de 99 bolsas al centro del invernadero. Las líneas de bolsas se acomodaron de manera que quedó un pasillo central de 60 cm, y dos líneas juntas a los lados de este pasillo. Con una distancia entre bolsas de 50 cm.

Se colocó una planta por bolsa, con el cuello de la planta al nivel del tezontle. Se utilizó el fungicida Daconil® para prevenir enfermedades fungosas; y el insecticida Confidor® para el control de mosquita blanca *Bemisia tabaci* y/o *Trialeurodes vaporariorum*.

3.3.3 Sistema de riego.

El sistema de riego se fabricó antes de montar el experimento, éste consistió de un tinaco de 1100 litros marca Cerplastik®, una bomba marca MILWAKEE® modelo MIL-0B60 de 1/2 HP, un switch marca IGESA® de 50 A Max 60Hz 120V, manguera de 3/8 de pulgada y goteros marca REX-NETAFIM® 4 L/H.

La manguera fue cortada en trozos de 50 cm, y los trozos fueron unidos con goteros, quedando una manguera de goteros de 48 metros de largo. Se hicieron 4 mangueras, una para cada línea de plantas.

Para conectar el tinaco con la tubería de goteros se utilizó tubería de PVC de 1 pulgada.

3.3.4 Solución nutritiva.

La solución nutritiva se compuso de 20 meq de cationes y 20 meq de aniones. Las fuentes y los meq necesarios de las fuentes de macronutrientes se presentan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Fuentes utilizadas y cantidad de cada ión para la preparación de la solución nutritiva.

Fuente	NO_3^-	H_2PO_4	SO_4^{2-}	NH_4^+	Ca^{++}	Mg^{++}	K^+
	----- (me L ⁻¹) -----						
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			3.6	3.6			
KH_2PO_4		1.45					1.45
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			3.28			3.28	
K_2SO_4			3.27				3.27
KNO_3	1.02						1.02
$\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7.38				7.38		
Total	8.4	1.45	10.15	3.6	7.38	3.28	5.74

Las fuentes y las cantidades requeridas para 1100 litros de los micronutrientes fueron:

Sulfato ferroso 55.0g
Sulfato de manganeso 5.5g

Sulfato de zinc	2.2g
Sulfato de cobre	2.2g
Bórax	11g

Las cantidades requeridas para 1100 litros de cada una de las fuentes de macronutrientes fueron:

Sulfato de amonio	261.36g
Fosfato de potasio	216.92g
Sulfato de magnesio	443.78g
Sulfato de potasio	312.93g
Nitrato de potasio	113.32g
Nitrato de calcio	957.92g

El procedimiento para la preparación de la solución nutritiva fue el siguiente:

- 1) Colocar agua hasta 80% volumen total del tinaco
- 2) Acidificar a pH 5.0 con H_2SO_4 al 10%
- 3) Disolver las fuentes (una por una)
 - a. Primero sulfatos
 - b. Luego nitratos
 - c. Fosfatos
 - d. Micronutrientes
- 4) Aforar al 100%
- 5) Verificar pH 5.0-5.5

El pH se midió utilizando un pH metro marca Hanna® modelo HI-98130.

Las plantas fueron regadas con esta solución nutritiva tres veces durante el día a las 9:00 A.M., a las 2:00 P.M. y a las 5:00 P.M. Cada riego fue de 5 minutos, y se aplicaron aproximadamente 450 ml de solución nutritiva.

3.3.5 Aplicación de Tratamientos

Se realizaron cinco aplicaciones de ácido glutámico hidrociorado ($C_5H_9NO_4 \cdot HCl$) al 99.5% de concentración, el intervalo entre aplicaciones fue de 3 semanas, la primer aplicación se realizó cuatro semanas después del transplante.

Antes de la aplicación de los tratamientos se realizó una “prueba en blanco” para determinar la cantidad de solución que debe ser asperjada en las plantas.

Para la primer aplicación se utilizó un litro de solución para asperjar todas las plantas de cada tratamiento, en la segunda aplicación se utilizaron dos litros, y en las tres aplicaciones restantes fueron usados tres litros.

Los cálculos y consideraciones para determinar la cantidad de $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$ a aplicar para cada tratamiento fueron: a) el producto se encuentra al 99.5%. b) 100.5025 g de producto contienen 100 gramos de $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$. El peso molecular del $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$ es 182.5. El peso molecular

del $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ (sin considerar el HCl) es 147.0. Por lo tanto, en 100.5025 g de producto hay 80.55 g de $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$.

Para aplicar el primer tratamiento: 1.25 gL^{-1} de ácido glutámico, fueron necesarios 1.56 gramos de producto por cada litro de solución preparada. En el Cuadro 2 se presenta la cantidad de producto necesaria por litro para la aplicación de los 6 tratamientos.

CUADRO 2. Cantidad de ácido glutámico hidrociorado utilizada en cada tratamiento.

Tratamiento	Descripción	Cantidad de fuente (gL^{-1})
T1	Testigo	0.00
T2	Ácido glutámico (1.25 gL^{-1})	1.56
T3	Ácido glutámico (2.50 gL^{-1})	3.12
T4	Ácido glutámico (5.00 gL^{-1})	6.24
T5	Ácido glutámico (10.0 gL^{-1})	12.47
T6	Ácido glutámico (20.0 gL^{-1})	24.95

Para lograr una adherencia adecuada del producto al follaje de las plantas de jitomate fue utilizado el coadyuvante INEX-A[®] en dosis de 1 ml por cada litro de solución preparada. El equipo de aplicación utilizado fue la aspersora manual GIBER H-5 con capacidad de 5 litros.

3.4 Metodología para la medición de concentración de clorofila en hojas.

Se utilizó la metodología descrita por Whitham *et al.* (1971), con algunas modificaciones, la metodología se describe a continuación.

a) Reactivos empleados

- Folíolos de hojas de jitomate de reciente madurez.
- Acetona al 98%.

b) Procedimiento

- Se pesó aproximadamente 0.1 g de material en una balanza con capacidad de medir hasta diezmilésima de gramo. El valor exacto fue registrado ya que es importante para los cálculos.
- El material vegetal fue colocado en un tubo de ensayo de fondo plano de 30 ml.
- Al tubo de ensayo se le añadieron 5 ml acetona al 98%.
- El material en el tubo fue mezclado con la acetona con la ayuda de un homogenizador IKA Labortechnik T25 Basic. Esto permitió que todo el tejido estuviera en contacto con la acetona.
- La muestra fue centrifugada a 15000g y 10°C durante 30 minutos en una centrifugadora modelo Sorvall RC-58. Esto se hizo para separar el tejido vegetal de la clorofila.
- Después de centrifugar, se separó la fase sólida de la líquida mediante decantación.

- A los 5 ml de acetona y clorofila – ya sin tejido vegetal sólido- se les añadieron 25 ml de acetona al 98% para completar un volumen de 30 ml.
- De estos 30 ml se tomó una muestra a la cual se le midió absorbancia con el espectrómetro Genesys 10uv. Las lecturas se tomaron a 645 y 663nm.

La cantidad de clorofila *a*, *b* y *total* presente en el extracto (en mg de clorofila por g de tejido) se calculó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\frac{mg \text{ clorofila } a}{g \text{ tejido}} = \frac{[12.7(D_{663}) - 2.69(D_{645})] \times V}{1000 \times W}$$

$$\frac{mg \text{ clorofila } b}{g \text{ tejido}} = \frac{[22.9(D_{645}) - 4.68(D_{663})] \times V}{1000 \times W}$$

$$\frac{mg \text{ clorofila total}}{g \text{ tejido}} = \frac{[20.2(D_{645})] + [8.02(D_{663})] \times V}{100 \times W}$$

Donde:

D = absorbancia o densidad óptica

V = volumen

W = cantidad de tejido fresco.

3.5 Metodología para la medición de la actividad de la glutamina sintetasa.

Se utilizó la metodología de análisis enzimático propuesta por Alcántar-González y Sandoval-Villa (1999), con algunas modificaciones. La metodología fue la siguiente.

a) Reactivos

- Raíces de plantas de jitomate.
- Nitrógeno líquido.
- TRIS·(2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol).
- 2- mercaptoetanol.
- Polivinilpirrolidona (PVP).
- L-acido glutámico.
- Clorhidrato de hidroxilamina (NH_2OH).
- ATP.
- Sulfato de magnesio (MgSO_4).
- Cloruro férrico (FeCl_3).
- Ácido tricloroacético (TCA).
- Ácido clorhídrico (HCl).
- Hidróxido de Potasio (KOH).

b) Procedimiento

Preparación de TRIS·HCl pH 7.8 (1 L).

Se preparó medio litro de TRIS 0.1M, y por otra parte, se preparó medio litro de HCl 0.01M. Al TRIS 0.1M se le añadió poco a poco HCl 0.01M hasta que se llegó al pH de 7.8. Después se aforó a 1 litro.

Preparación de soluciones para el medio de incubación.

Debido a que el ácido glutámico es poco soluble, es necesario añadir hidróxido de potasio. Para la preparación de L-glutamato 0.6M se colocó el ácido glutámico en agua destilada y se agregó poco a poco KOH grado reactivo hasta lograr la disolución.

El clorhidrato de hidroxilamina 0.045M, sulfato de magnesio 0.45M y el ATP 0.6M no tienen problemas de disolución.

Preparación del bloqueador de reacción.

En un vaso de precipitado con agua destilada se colocaron los reactivos en el siguiente orden: ácido tricloroacético 0.2M, cloruro férrico 0.3M y ácido clorhídrico 0.67M. Se mezclaron perfectamente, después el líquido fue filtrado a través de papel filtro Whatman No 1.

Manejo de la muestra.

Las raíces de las plantas de jitomate fueron lavadas y colocadas dentro de bolsas previamente identificadas, las bolsas con las raíces fueron colocadas en hielo para su transporte del invernadero al laboratorio. Después las raíces fueron colocadas en un congelador a -20°C , hasta su análisis.

Las partes de la raíz medidas fueron las raíces primarias y secundarias de entre 0.3 a 0.7 cm de diámetro. Se procuró que durante el manejo de las raíces, éstas siempre estuvieran a 4°C o menos.

Para cada planta muestreada (raíz muestreada) se pesaron aproximadamente 3.5 gramos de material fresco. El valor exacto fue registrado ya que es importante para los cálculos posteriores. Se tomaron trozos de

diversos lugares de la raíz. Los trozos de raíz fueron cortados en trozos más pequeños de aproximadamente 2 mm de largo, y éstos fueron macerados en un mortero con la ayuda de N₂ líquido. La raíz es un tejido duro por lo que fue necesario añadir más N₂ líquido cuando éste se evaporaba.

A los 3.5 gramos de raíces molidas se añadieron 35 ml de TRIS·HCl preparado con 12.5 mM de 2-mercaptoetanol y 1% de polivinilpirrolidona.

La mezcla de raíces y TRIS-HCl con 2-mercaptoetanol y PVP, fue mezclada perfectamente en el homogeneizador IKA Labortechnik T25 Basic.

Después el fluido resultante fue colocado en un tubo de centrifuga y fue centrifugado durante 30 minutos a 13,000g y a 4°C en la centrifugadora Sorvall RC-58.

El sobrenadante fue extraído del tubo de centrifuga por decantación y colocado en un vaso de precipitado que se mantuvo en frío a menos de 4°C hasta su uso.

Incubación.

Se prepararon 10 tubos, 5 para la muestra y 5 para el blanco.

Los tubos muestra contenían:

- 0.2 ml de L-glutamato 0.6M
- 0.2 ml de clorhidrato de hidroxilamina 0.045M
- 0.2 ml de MgSO₄ 0.45M
- 0.2 ml de ATP 0.06M
- 0.4 ml de extracto vegetal

- 0.3 ml de regulador TRIS-HCl.

Los tubos blanco contenían:

- 0.2 ml de L-glutamato 0.6M
- 0.2 ml de clorhidrato de hidroxilamina 0.045M
- 0.2 ml de MgSO_4 0.45M
- 0.4 ml de extracto vegetal
- 0.7 ml de regulador TRIS-HCl.

Dado que el pH es importante para la actividad enzimática; para la preparación de medio de incubación de 5 tubos muestra se siguió el siguiente procedimiento: en un vaso de precipitado de 10 ml se colocaron los reactivos en el siguiente orden:

- 1.0 ml de L- glutamato 0.6M.
- 1.0 ml de Clorhidrato de hidroxilamina 0.045M
- 1.0 ml de Sulfato de magnesio 0.45M
- 1.0 ml de ATP 0.06M
- 1.5 ml de Tris HCl pH 7.8.
- Se ajustó pH a 7.8 con KOH 0.5N

Para la preparación de los 5 tubos blanco se siguió el mismo orden a excepción de que no se agregó ATP, y se añadieron 2.5 ml de Tris HCl pH 7.8.

Entonces se obtuvieron dos soluciones de incubación: una solución muestra y una solución blanco.

Se agregaron 1.1ml de la solución correspondiente a los 10 tubos (5 para la muestra y 5 para el testigo).

A cada uno de los tubos se les agregó 0.4 ml del extracto vegetal y se incubaron en baño maría a 30°C durante 10 minutos. En cada tubo el volumen fue de 1.5 ml.

Al concluir los 10 minutos se añadió a cada tubo 1.5 ml del bloqueador de reacción $\text{FeCl}_3 + \text{TCA} + \text{HCl}$.

Toma de datos.

En cada tubo se midió la absorbancia a 540nm en el espectrómetro Genesys 10uv.

Cálculos.

La metodología mide la cantidad de γ -glutamil hidroxamato (γ -GHM) formada. La reacción catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS) para efectos de esta metodología es la siguiente:



(Alcántar-González y Sandoval Villa, 1999)

Se tomó el promedio de los 5 tubos muestra, al cual se le restó el promedio de los 5 tubos blanco (valor de absorbancia promedio para esa raíz en particular).

El coeficiente de extinción molar del γ -GHM es:

$$0.1 \text{ Abs}_{540\text{nm}} = 0.66 \text{ } \mu\text{mol } \gamma\text{-GHM}.$$

(Alcántar-González y Sandoval Villa, 1999)

Es decir, si la diferencia promedio entre los tubos muestra y los tubos blanco fuera de 0.1, se habrían formado 0.66 micromoles de γ -GHM.

Ejemplo.

Valores de absorbancia obtenidos en los tubos muestra: 0.042, 0.043, 0.043, 0.042 y 0.045. Promedio: 0.043. Valores de absorbancia obtenidos en los tubos blanco: 0.039, 0.041, 0.042, 0.039 y 0.041. Promedio: 0.0404. Diferencia entre absorbancias promedio: 0.0026.

Si una absorbancia de 0.1 representa 0.66 μM de γ -GHM, una absorbancia de 0.0026 representa 0.01716 μM de γ -GHM. Estos 0.01716 μM de γ -GHM se formaron usando 0.4 ml de extracto vegetal, a los 35 ml de de extracto total preparado corresponden 1.5015 μM de γ -GHM. Sin embargo, estos 35 ml fueron obtenidos de una muestra que pesó 3.4972g de tejido fresco. Por lo tanto 1.5015 μM de γ -GHM corresponden a 3.4972g. Y a un gramo le corresponden 0.4293 μM de γ -GHM. Ahora, si se obtuvieron 0.4293 μM de γ -GHM en 10 minutos, en una hora se obtendrán 2.5760 μM de γ -GHM.

Por lo que una diferencia de absorbancias de 0.0026 significa que se produjeron 2.5760 μM de γ -glutamil hidroxamato g^{-1} (materia fresca) h^{-1} .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Primer muestreo.

Los resultados del análisis de varianza mostraron efecto estadísticamente significativo ($\alpha \leq 0.05$) sólo para contenido de clorofila b (Cb) y actividad de la glutamina sintetasa (GS) (Cuadro 3). Lo cual indica que las tres aplicaciones de ácido glutámico realizadas hasta el momento del primer muestreo no fueron suficientes para provocar cambios en la mayoría de las variables evaluadas ó que estas variables no se ven afectadas por la aplicación.

De acuerdo con las comparaciones de medias (Cuadro 4). Las mayores cantidades de Clorofila b fueron las producidas por las dosis de 1.25, 2.50 y 10.00g L⁻¹. Lo anterior hace suponer que hasta el momento del primer muestreo el ácido glutámico aplicado foliarmente se encuentre involucrado en la ruta metabólica de la clorofila b.

El glutamato es una de las moléculas que inician la ruta metabólica para la formación de la clorofila (De las Rivas, 2000a). La clorofila a es la más abundante. Sin embargo, la clorofila b actúa como antena, conduciendo la energía que absorbe hacia el centro de reacción. No está directamente involucrada en la transferencia de energía fotosintética, pero sirve para captar más luz que puede ser usada en la fotosíntesis (De las Rivas, 2000b). Por lo

tanto la aplicación de ácido glutámico provoca mayor captación de energía solar debido a la presencia de más clorofila b.

CUADRO 3. Cuadrados medios de las variables correspondientes al primer muestreo de plantas de jitomate asperjadas con diferentes dosis de ácido glutámico.

	Tratamientos	Bloques	Error	Total	CV
GL	5	3	15	23	
AP	92.0666	56.1666	108.7333		7.21
VT	1752.2552	207.1105	967.2216		19.58
NF	15.4416	11.7083	44.0416		26.85
US	18.2476	2.8055	13.0264		6.52
AF	5685098.14	2937146.48	3390636.63		16.69
PFF	106104.1667	7101.3889	81601.389		35.14
PHS	147.5158	104.6280	133.8635		14.80
PTS	5.3114	2.9597	10.3516		13.95
PFS	305.7210	87.5219	204.6272		32.42
PTotS	764.1405	117.4409	335.2483		12.60
CT	0.1908	0.1446	0.0703		10.69
Ca	0.0875	0.0816	0.0410		10.82
Cb	0.0233**	0.0097	0.0043		10.71
GS	1.3060*	0.4331	0.4119		33.80

*: Significativo ($p \leq 0.05$); **: Altamente significativo ($p \leq 0.05$); CV: Coeficiente de variación; GL: Grados de libertad; AP: Altura de planta; VT: Volumen de tallo; NF: Número de frutos; US: Absorbancia; AF: Área foliar; PFF: Peso de frutos en fresco; PHS: Peso de hojas secas; PTS: Peso de tallos secos; PFS: Peso de frutos secos; PTotS: Peso Total de la planta en seco; CT: Clorofila Total; Ca: Clorofila a; Cb: Clorofila b; GS: Actividad de la glutamina sintetasa.

Por otra parte, la actividad de la glutamina sintetasa (Cuadro 4) es mayor en el tratamiento testigo (0.00 gL^{-1}) que en las dosis de 1.25 y 2.50 gL^{-1} , que a su vez presentaron mayor contenido de clorofila b. Lo que puede indicar que las plantas que no recibieron ácido glutámico estén trabajando para obtener la cantidad de nitrógeno necesario e incorporarlo a las diferentes rutas metabólicas, entre ellas la de la formación de la clorofila b.

Trejo-Téllez *et al.* (2005) mencionan que las plantas pueden utilizar el nitrógeno en varias formas: amoniacal (NH_3), inorgánica (NH_4^+ , NO_3^-), orgánica (aminoácidos, péptidos, ureica). En su estudio aplicando urea vía foliar realizado en espinaca (*Spinacia oleracea* L.) encontró una respuesta positiva en las plantas, ya que el nitrógeno presente en la urea se mueve hacia compuestos nitrogenados como: aminoácidos, proteínas y clorofila.

Para que el nitrógeno ureico se mueva hacia clorofila primero necesita convertirse en aminoácidos, entre los cuales está el ácido glutámico. Y el ácido glutámico inicia la ruta hacia clorofila.

En cuanto a las dosis de 5 , 10 y 20 gL^{-1} , se observa que presentaron la misma actividad que el testigo, por lo que la dosis ideal para la formación de clorofila b en este momento del desarrollo de la planta es de 2.50 gL^{-1} .

CUADRO 4. Comparación de medias de las variables contenido de clorofila b (Cb) y actividad de la glutamina sintetasa (GS) correspondientes al primer muestreo de plantas de jitomate asperjadas con seis dosis de ácido glutámico.

Tratamiento	Cb (mg g ⁻¹)	GS (μm γ-GHM g ⁻¹ h ⁻¹)
0.00 gL ⁻¹	0.5170 c ^z	2.6075 a
1.25 gL ⁻¹	0.7148 a	1.4175 b c
2.50 gL ⁻¹	0.6793 a	1.1225 c
5.00 gL ⁻¹	0.5568 b c	2.3050 a b
10.00 gL ⁻¹	0.6195 a b	1.7225 a b c
20.00 gL ⁻¹	0.5675 b c	2.2150 a b
Media	0.6091	1.8983
DMS	0.0984	0.9673

^zMedias con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de DMS (p≤0.05); DMS: Diferencia Mínima Significativa; Cb: Contenido de clorofila b; mg g⁻¹: miligramos por gramo de tejido fresco; GS: Actividad de la glutamina sintetasa; μm γ-GHM g⁻¹ h⁻¹: micromoles de gamma glutamil hidroxamato por gramo de tejido fresco por hora.

4.2 Segundo Muestreo.

Los análisis de varianza mostraron efecto significativo sólo para peso de frutos en fresco (PFF), peso de frutos en seco (PST), peso total de la planta en seco (PTotS) y actividad de la glutamina sintetasa (GS) (Cuadro 5). Esto indica que las cinco aplicaciones de ácido glutámico provocan un efecto acumulativo que se ve reflejado en variables evaluadas relacionadas con el rendimiento.

En esta ocasión la variable clorofila ya no se vio afectada por los tratamientos probablemente debido a que al momento del segundo muestreo la planta presentaba suficiente cantidad de clorofilas *a* y *b*. Es posible que la planta se encontrara en un momento de velocidad de crecimiento foliar menor que durante el primer muestreo, y así, la solución nutritiva era suficiente para tener las cantidades adecuadas de clorofilas *a* y *b*. De hecho, al hacer la comparación visual de las medias de los tratamientos (Figura 14) se observa que la cantidad de clorofila *b* presente entre los tratamientos durante el segundo muestreo es muy similar.

Las variables de producción de fruto (PFF y PFS) y la variable actividad de la glutamina sintetasa (GS) fueron positivamente afectadas en la dosis de 5 gL⁻¹ (Cuadro 6). El nitrógeno se encuentra presente en aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, vitaminas, etc. El fruto de jitomate contiene compuestos nitrogenados entre los cuales se encuentran proteínas, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B₆ (Jones, 1999). Es probable que parte del glutamato aplicado a las hojas se haya trasladado hacia la raíz, y allí, la enzima glutamina sintetasa asimilara más nitrógeno amoniacal el cual sirvió para la síntesis de estos compuestos en el fruto.

CUADRO 5. Cuadrados medios correspondientes a las variables medidas durante el segundo muestreo.

	Tratamientos	Bloques	Error	Total	CV
GL	5	3	15	23	
AP	337.1750	92.3750	142.6416		5.12
VT	1874.0228	787.2407	2176.2379		22.41
NF	87.6000	86.1111	76.3777		13.14
US	6.5501	44.2346	11.0566		6.98
AF	10097772.90	4278575.01	6588944.00		14.23
PHS	233.4394	502.7593	223.6343		17.09
CT	0.0174	0.0378	0.0751		9.32
Ca	0.0119	0.0222	0.0378		9.28
Cb	0.0009	0.0024	0.0053		9.67
GS	0.6475*	0.2201	0.1933		20.73
GL⁺	5	3	14	22	
PFF	577227.402*	94814.348	188903.152		12.50
PFS	1498.3099*	874.7504	348.8098		11.49
GL⁺	5	3	13	21	
PTS	58.5533	70.7495	25.5715		12.65
PTotS	2937.2688*	2381.7778	680.4057		9.12

*: Significativo ($p \leq 0.05$); **: Altamente significativo ($p \leq 0.05$); CV: Coeficiente de variación; GL: Grados de libertad; AP: Altura de planta; VT: Volumen de tallo; NF: Número de frutos; US: Absorbancia; AF: Área foliar; PFF: Peso de frutos en fresco; PHS: Peso de hojas secas; PTS: Peso de tallos secos; PFS: Peso de frutos secos; PTotS: Peso Total de la planta en seco; CT: Clorofila Total; Ca: Clorofila a; Cb: Clorofila b; GS: Actividad de la glutamina sintetasa. ⁺Los GL para algunas variables son diferentes debido a datos perdidos.

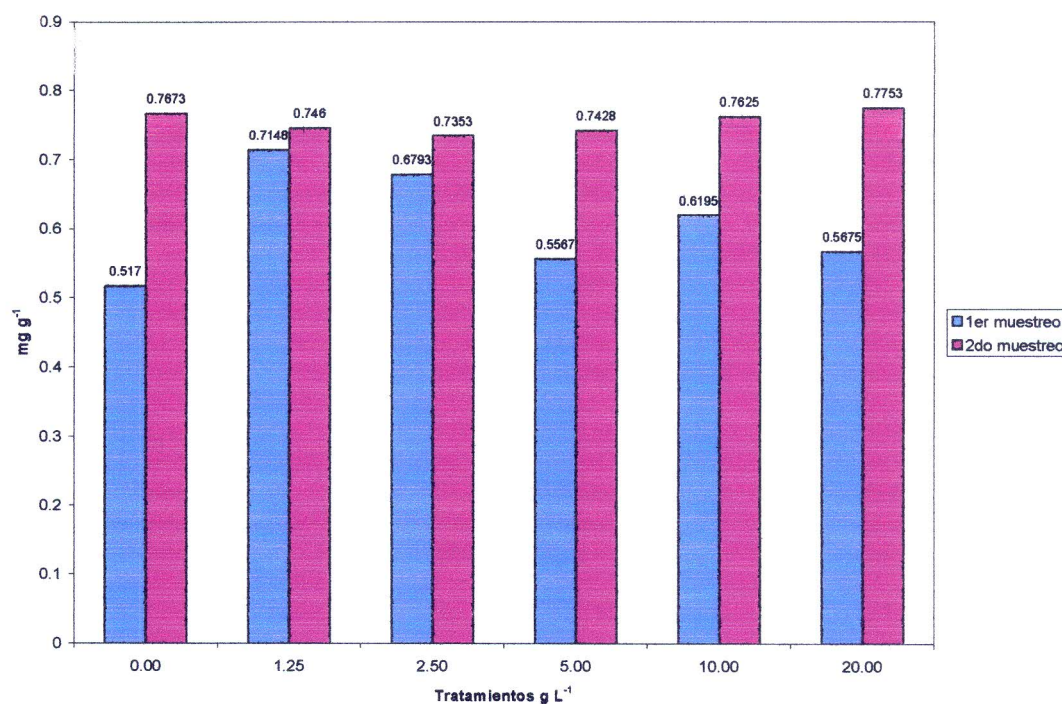


Figura 14. Efecto de la aplicación de ácido glutámico foliar sobre el contenido de clorofila b.

El crecimiento del fruto de jitomate depende del agua, asimilados y minerales. El principal asimilado del jitomate es la sacarosa (Ho, 1996), el cual es un carbohidrato que se compone de fructosa y glucosa. Éstos carbohidratos son producidos en fotosíntesis, y aunque todos los tratamientos estuvieran produciendo la misma cantidad de carbohidratos; –debido a que no requieren mayor cantidad de clorofilas *a* y *b*– hay que considerar que la formación de glutamato requiere energía (Taiz y Zeiger, 2003), lo que significa consumo de carbohidratos. Además el glutamato tiene varias funciones dentro de la planta, una es la asimilación del amonio (Gonnet y Díaz, 2000), pero también puede servir para la formación de α -cetoglutarato, un intermediario de ciclo de Krebs

(Ribas-Carbó y González-Meler, 2000); y es posible que la planta al tener más glutamato disponible (el que fue aplicado foliarmente) enviara los carbohidratos no gastados en la producción de glutamato hacia el fruto, y por lo tanto se produjeron frutos con mayor peso.

CUADRO 6. Comparación de medias de las variables peso de frutos en fresco (PFF), peso de frutos en seco (PFS), peso total de la planta en seco (PTotS) y actividad de la glutamina sintetasa (GS) correspondientes al segundo muestreo de plantas de jitomate asperjadas con seis dosis de ácido glutámico.

Tratamiento	PFF (g)	PFS (g)	PTotS (g)	GS($\mu\text{m}\gamma\text{-GHMg}^{-1}\text{h}^{-1}$)
0.00 gL ⁻¹	3306.5 b ^z	156.73 b c	277.81 a b	1.6175 b
1.25 gL ⁻¹	3683.0 a b	173.27 a b	314.82 a	2.1150 b
2.50 gL ⁻¹	3687.8 a b	172.72 a b	292.73 a	1.9700 b
5.00 gL ⁻¹	4055.7 a	189.18 a	317.44 a	2.8100 a
10.00 gL ⁻¹	3346.8 b c	156.77 b c	275.90 a b	2.2375 b
20.00 gL ⁻¹	2914.0 c	132.58 c	245.98 b	1.9075 b
Media	3474.7	162.42	285.84	2.1095
DMS	917.0	29.10	42.00	0.6593

^zMedias con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de DMS ($p \leq 0.05$); DMS: Diferencia Mínima Significativa; PFF: Peso de frutos en fresco; PFS: Peso de frutos secos; PTotS: Peso Total de la planta en seco; GS: Actividad de la glutamina sintetasa; $\mu\text{m}\gamma\text{-GHM g}^{-1}\text{h}^{-1}$: micromoles de gamma glutamil hidroxamato por gramo de tejido fresco por hora.

La variable peso total en seco (PTotS) no mostró diferencias entre las dosis aplicadas de ácido glutámico y el tratamiento testigo (Cuadro 6).

Los valores reportados para la actividad de la glutamina sintetasa en raíces de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) son similares a los valores obtenidos por Cruz *et al.* (2005), quien trabajó con raíces de trigo (*Triticum aestivum* L.), triticale (X *Triticosecale* Wittmack) y maíz (*Zea mayz* L.).

El resto de las variables evaluadas no mostraron efecto, por lo que significa que la variable no es afectada por la aplicación de ácido glutámico, o que el efecto no se mostró debido a que la planta se mantuvo en condiciones de invernadero, evitando cualquier tipo de estrés. Los aminoácidos intervienen en el crecimiento y desarrollo vegetal, particularmente cuando las plantas están sometidas a algún tipo de estrés (Arjona *et al.*, 2004).

5. CONCLUSIONES

La aplicación foliar de ácido glutámico favorece la formación de clorofila b.

El efecto acumulado de la aplicación de ácido glutámico provoca un incremento en la actividad de la glutamina sintetasa que se refleja en mayor producción de frutos.

6. LITERATURA CITADA

- Alcántar-González G.; Sandoval-Villa M. 1999.** Manual de análisis químico de Tejido Vegetal. Publicación Especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, México.
- Alcántar-González G.; Trejo-Téllez L.; Fernández-Pavia L.; M. N. Rodríguez-Mendoza. 2007.** Elementos esenciales pp. 7-47. *In.* Nutrición de Cultivos. Alcántar-González G. y L. Trejo-Téllez (eds.). MundiPrensa. México. 454p.
- Arjona H. D.; Herrera J. E.; Gómez J. A.; J. Ospina. 2004.** Evaluation of the application of urea, molasses and amino acids on growth and yield of onion plants (*Allium cepa* L. Group *cepa*) in the Bogotá Savanna. *Agronomía Colombiana.* 22 (2): 177-184.
- Barker A. V.; D. J. Pilbeam. 2007.** Handbook of Plant nutrition. CRC Press. Boca Ratón, USA. 613p.
- Below F. 2001.** Nitrogen Methabolism and Crop Productivity. pp 385-406. *In.* Handbook of Plant and Crop Physiology. E. Pessarki (ed.). Marcel Dekker. USA..
- Berg, J.M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. 2002.** Bioquímica. 5ta Ed. Reverté. Barcelona. p 43.
- Beyer, H.; Walter, W. 1987.** Manual de química orgánica. 19 Ed. Reverté. 1084p.
- Bonilla, I. 2000.** Introducción a la Nutrición Mineral de las Plantas. Los elementos minerales. pp. 83-97. *In:* Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto y Talón (eds.). McGraw Hill. México.

- Conn, E.; Stumpf, P.; Bruening, G.; R. Doi. 2006.** Bioquímica Fundamental. 4ta Ed. Limusa. México. 736p.
- Cruz-Flores G.; Flores-Román D.; Alcántar-González G.; Trinidad-Santos A. 2005.** Fosfatasa ácida, nitrato reductasa, glutamina sintetasa y eficiencia de uso de fósforo y nitrógeno en cereales. *Terra Latinoamericana* 23 4:457-468.
- De las Rivas, J. 2000a.** La luz y el aparato fotosintético. pp. 131-153.. *In:* Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto y Talón (eds.). McGraw Hill. México.
- De las Rivas, J. 2000b.** Utilización de la energía luminosa en la fotosíntesis. pp. 155-172. *In:* Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto y Talón (eds.). McGraw Hill. México.
- Gonnet S., Díaz P. 2000.** Glutamine synthetase and glutamate synthase activities in relation to nitrogen fixation in *Lotus* spp. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 12(3):195-202.
- Ho L. C.1996.** Tomato. pp 709-728. *In:* Photoassimilate distribution in plants and Crops. Zamski E.; Shaffer A.A. (eds.). Marcel Dekker, Inc. USA.
- Jones, J. B. Jr. 1999.** Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden. CRC Press. 199p.
- Juárez-Hernández M. J.; Baca-Castillo G. A.; Aceves-Navarro L. A.; Sánchez-García P.; Tirado-Torres J. L.; Sahagún-Castellanos J.; Colinas-León M. T. 2006.** Propuesta para la formulación de soluciones nutritivas en estudios de nutrición vegetal. *Interciencia* 31: 246-253.
- Maldonado J. M.; Agüera E.; R. Pérez-Vicente. 2000.** Asimilación del Nitrógeno y del Azufre. pp. 235-246. *In:* Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto y Talón (eds.). McGraw Hill. México.

- Meister A. 1962.** Glutamine Synthesis. pp 443-469 In. The enzymes. Boyer P. D., Lardy H. and K. Myrbäck (eds). Academic Press. New York.
- Nelson D. L.; Cox M. M. 2005.** Lehninger Principles of biochemistry. Freeman and Co. USA. 1119p.
- O'Neal D.; Joy K. W. 1973.** Glutamine Synthetase of Pea Leaves. I. Purification, Stabilization, and pH Optima. Arch. Biochem. Biophys. 159: 113:122.
- Ribas-Carbó M.; M. A. González-Meler. 2000.** Fisiología de la respiración de las plantas. pp. 217-233. In: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto y Talón (eds.). McGraw Hill. México.
- Rodríguez-Mendoza M. N.; Alcántar-González G.; Aguilar-Santelises A.; Etchevers-Barra J. D.; Santizo-Rincón J. A. 1998.** Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. Terra 16 2: 135-141.
- Taiz L.; E. Zeiger. 2003.** Plant Physiology. 3ra ed. Sinauer Associates Publisher. USA. 623p
- Trejo-Téllez L.; Gómez-Merino F. C.; Rodríguez-Mendoza M. N.; Alcántar-González G. 2005.** Fertilización foliar con urea en la partición de nitrógeno en espinaca. Terra 23:495-503.
- Trejo-Téllez L.; Rodríguez-Mendoza M.; G. Alcántar-González. 2007.** Fertilización Foliar. pp. 325-371. In. Nutrición de Cultivos. Alcántar-González G. y L. Trejo-Téllez L. (eds.). Mundi-Prensa. México.
- Trinidad Santos A.; D. Aguilar Manjares. 2000.** Fertilización foliar, un respaldo importante en el rendimiento de los cultivos. Terra 17(1):247-255.

Vezina P. L.; Margolis H. A. 1990. Purification and properties of glutamine synthetase in leaves and roots of *Pinus banksiana* Lamb. *Plant Physiol* 94:657-664.

Whitham F. H.; Blaydes D. F.; Devlin R. M., 1971. Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Company. New York. pp 55-58.