



Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área: Biología

Subárea: Biología celular y molecular

Tesis de Maestría

Incidencia de la radiación lumínica en el metabolismo del nitrógeno del Arroz

Lic. Pedro Silva

Laboratorio de Bioquímica
Departamento de Biología Vegetal
Facultad de Agronomía
Universidad de la República

Orientador: Dr. Omar Borsani

Montevideo, Uruguay

2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Omar Borsani por ser un excelente tutor y aportar significativamente a mi formación académica, siempre haciéndose un tiempo para discutir y corregir mi trabajo de maestría.

A Pedro Díaz por permitirme formar parte del proyecto que él escribió y por su gran disposición para enseñarme el trabajo dentro del laboratorio.

A Gastón Quero por enseñarme a medir parámetros fotosintéticos, diseñar experimentos y analizarlos estadísticamente.

A mis compañeros del laboratorio de bioquímica de facultad de agronomía, Jorge, Esteban, Mariana, Martita, Belén, Sofía, Carolina, Ornela y Fernando, con quienes compartí gran parte del tiempo de laboratorio y lo hicieron más agradable.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el financiamiento económico recibido.

ABREVIATURAS

AA	aminoácidos
AL	alta radiación lumínica
Asn	asparagina
Asp	aspartato
BL	baja radiación lumínica
BSA	seroalbúmina bovina
C	carbono
Chl	clorofila
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
Fd-GOGAT	glutamato sintasa ferredoxina dependiente
GABA	ácido γ -aminobutírico
Gln	glutamina
Glu	glutamato
GS	glutamina sintetasa
HPLC	cromatografía líquida de alta performance
MCA	metanol cloroformo agua
N	nitrógeno
NA	nitrógeno alto
NC	nitrógeno control
NH ₄ ⁺	amonio
NR	nitrito reductasa
NO ₃ ⁻	nitrito
OPA	o-ftaldialdehído
PA	parte aérea
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PMSF	fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PS	peso seco
PSI	fotosistema uno
PSII	fotosistema dos
RuBisCO	ribulosa-1,5-bifostato carboxilasa/oxigenasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
TBS	tris buffer salino
TBST	tampón buffer salino con detergente Tween
Tris	tris (hidroximetil) amino metano
TRITON	octilfenoxipoliétoxietanol
U	unidad enzimática

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL CULTIVO DE ARROZ	1
1.2. FOTOSÍNTESIS	2
1.2.1 Fotosíntesis y EUR	2
1.2.2 Fotoquímica	3
1.2.3 Fijación del carbono	5
1.3 METABOLISMO DEL NITRÓGENO	6
1.3.1 Nitrógeno y EUN	6
1.3.2 Absorción y transporte de nitrógeno	8
1.3.2.1 Transporte de nitrato	8
1.3.2.2 Transporte de amonio	9
1.3.3 Reducción de nitrato	10
1.3.3.1 Nitrato reductasa	10
1.3.3.2 Nitrito reductasa	12
1.3.4 Asimilación de amonio	12
1.3.4.1 Glutamina sintetasa	12
1.3.4.2 2-Oxoglutarato amidotransferasa	14
1.3.5 Aminoácidos	15
1.4 RELACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DEL CARBONO Y NITRÓGENO	17
1.4.1 Poder reductor y ATP para la asimilación de N	18
1.4.2 Esqueletos carbonados para la asimilación de N	19
II. OBJETIVOS	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 MATERIAL VEGETAL	22
3.2 CULTIVO DE PLANTAS	22
3.2.1 Germinación de semillas	22
3.2.2 Condiciones de cultivo	22

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	23
3.3.1 Diseño experimental	23
3.4 DETERMINACIONES FISIOLÓGICAS	24
3.4.1 Tasa de crecimiento	24
3.4.2 Isotopos estables	24
3.4.3. Rendimiento cuántico del fotosistema II	24
3.4.4 Tasa de asimilación de CO ₂	25
3.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	26
3.5.1 Proteínas	26
3.5.2 Clorofilas a, b y β-caroteno	26
3.5.3 Aminoácidos, compuestos nitrogenados, amonio y nitrato	27
3.6 DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS Y ANALÍTICAS	27
3.6.1 Actividad glutamina sintetasa	27
3.6.2 Actividad nitrato reductasa	28
3.6.3 Cuantificación de aminoácidos totales	28
3.6.4 Cuantificación de nitrato	29
3.6.5 Cuantificación de amonio	29
3.6.6 Cuantificación de proteínas solubles	29
3.6.7 Identificación y cuantificación de aminoácidos por HPLC	29
3.6.8 Cuantificación de clorofilas a, b y β-caroteno	31
3.7 INMUNODETECCIÓN DE GS Y FD-GOGAT	31
3.7.1 SDS-PAGE	31
3.7.2 Visualización de proteínas en geles	32
3.7.3 Transferencia de proteínas a membranas (Western blot)	32
3.7.4 Inmunodetección Fd-GOGAT y GS	33
3.8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	34
IV. RESULTADOS	35
4.1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA	35
4.1.1 Biomasa	35
4.1.2 Porcentaje de C y N	36
4.1.3 Relación C/N	37

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS	39
4.2.1. Fotosíntesis neta	39
4.2.2 Fluorescencia de clorofilas	39
4.2.3 Pigmentos Fotosintéticos	40
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES DE HOJA	42
4.3.1 RuBisCO	42
4.3.2 Cuantificación de proteínas en hojas	43
4.4 ASIMILACIÓN PRIMARIA DEL NITRÓGENO	44
4.4.1 Acumulación de NH_4^+ y NO_3^-	44
4.4.2 Actividad GS y NR	45
4.4.3 Discriminación isotópica de N	47
4.5 METABOLISMO AMINOACÍDICO	48
4.5.1 Aminoácidos totales	48
4.5.2 Relación de Aminoácidos de transporte	49
4.5.3 Otros aminoácidos de interés	52
4.5.4 GABA	53
4.5.5 Análisis del contenido de GS y Fd-GOGAT	54
V. DISCUSIÓN	56
VI. CONCLUSIONES	68
VII. RESUMEN	69
VIII. BIBLIOGRAFÍA	71

I. INTRODUCCIÓN

1.1 EL CULTIVO DE ARROZ

El arroz (*Oryza sativa*) con 741 millones de toneladas producidas en el 2016, es el segundo cereal con más volumen de producción, superado solamente por el maíz. Los principales productores de arroz se encuentran en la zona sudeste de Asia, China, India, Bangladesh, Indonesia y Vietnam en conjunto representan un 73 % de la producción total de arroz (UN Food and Agriculture Organization, 2017) . El arroz tuvo gran importancia en el desarrollo histórico de las sociedades del sudeste asiático. Desde su domesticación en esa zona hace 8000 años atrás, se mejoró su productividad y se extendió su cultivo al resto del mundo, llegando a ser en la actualidad la principal fuente de alimento para más de la mitad de la población del planeta (Callaway, 2014). Existen dos principales subespecies de arroz cultivado *O. sativa*, *japónica* e *indica*. Éstas están más relacionadas con especies salvajes que entre ellas, indicando dos regiones separadas de domesticación: China para *japónica* e India para *indica* (Gross & Zhao, 2014).

Si bien el rendimiento del arroz sigue creciendo, la proporción del crecimiento ha ido disminuyendo en las últimas décadas, 2.5 % anual desde 1962-1979 a 1.4 % anual 1980-2011 (Adjao & Staatz, 2015). En un escenario de creciente demanda, Uruguay se ubica dentro de los 10 primeros exportadores de arroz en el mundo, comercializando un 95% de su producción arrocería (Workman, 2018). En los últimos 20 años el Uruguay incrementó el rendimiento promedio en 154 kg.ha⁻¹.año⁻¹ llegándose a obtener 8500 kilogramos por hectárea en 2011/2012. Esto se debe a la incorporación de variedades de alto rendimiento en conjunto con la implementación de mejores prácticas en el manejo de suelo, una mejor irrigación, control temprano de hierbas, control de enfermedades y eficiencia en el uso de fertilizantes (Blanco, Roel,

Deambrosi, Bonilla, & Cantou, 2010). Si bien el rendimiento aumentó y llegó a estar por encima de 8 toneladas por hectárea, éste se encuentra por debajo del rendimiento estimado de 13500 kg.ha⁻¹ (Pérez de Vida & Macedo, 2013). El panorama actual refleja los desafíos que enfrenta el sector para lograr rendimientos más altos y satisfacer la demanda futura.

1.2 FOTOSÍNTESIS

1.2.1 Fotosíntesis y EUR

La fotosíntesis es el proceso biológico en el que se fija el CO₂ atmosférico y se libera O₂ a la atmosfera, utilizando la energía de la radiación lumínica proveniente del sol. La energía lumínica que llega a la superficie terrestre proveniente del sol es más de cien mil TeraWatts (TW). Los organismos evolucionaron maximizando la productividad del proceso fotosintético. En la actualidad, la fotosíntesis provee más de 150 TW de energía química, 10 veces más que la energía consumida por los humanos (Nelson & Junge, 2015). Las plantas superiores desarrollaron 3 tipos de metabolismos diferentes (C3, C4, CAM) para adaptar el proceso fotosintético a distintas condiciones ambientales. Esto se debe a que la fotosíntesis depende de una variedad de factores ambientales, como radiación, temperatura, disponibilidad de agua y estado nutricional de la planta (Villalobos & Fereres, 2016). La fotosíntesis se divide en dos fases que ocurren simultáneamente en diferentes regiones del cloroplasto. La fase fotoquímica que ocurre en los tilacoides, donde se transforma la energía lumínica en energía química y poder reductor en forma de ATP y NADPH, liberando O₂ en el proceso, y la fase biosintética o ciclo de Calvin-Benson, que ocurre en el estroma de los

cloroplastos sintetizando moléculas de glucosa a partir de CO₂ (Buchanan, Gruijssem, & Jones, 2015).

En el arroz el 90 % del grano es producto de la fotosíntesis realizada en las hojas (Xie et al., 2011), por lo que mejorar la eficiencia en el uso de la radiación (EUR) parece ser un camino para lograr un mayor rendimiento. La EUR a nivel agronómico se define como, la biomasa producida por unidad de radiación solar total o radiación fotosintéticamente activa (PAR) interceptada por la canopia (Stockle & Kemanian, 2009). Además, el índice de cosecha (HI) definido como, la relación del producto cosechado en función de la biomasa total del cultivo. Es una importante característica asociada al aumento del rendimiento de los cultivos. Seleccionar a favor de HI más altos, debería aumentar el rendimiento del grano en la mayoría de los casos. Sin embargo, el HI del arroz está llegando a su límite teórico, haciendo difícil incrementar el índice de cosecha solo manipulando la arquitectura de la planta (Mitchell & Sheehy, 2006). Comprender los procesos que ocurren en las dos fases de la fotosíntesis, tiene una gran importancia si se quiere mejorar el rendimiento del cultivo de arroz.

1.2.2 Fotoquímica

El proceso fotoquímico, transforma la energía de la luz en energía química (ATP) y poder reductor (NADPH). El fotosistema 1 (PSI) y fotosistema 2 (PSII) son los encargados de llevar a cabo este proceso. Los fotosistemas son complejos de multisubunidades pigmento-proteína embebidos en la membrana tilacoidal. Estos fotosistemas se componen de dos complejos: el centro de reacción que contiene todos los cofactores para el transporte en cadena de e⁻, y el complejo antena, que se encarga de captar la luz y transferirla al centro de reacción (Voet, Voet, & Pratt, 2016).

El complejo antena II asociado al PSII, coordina al menos 14 moléculas de clorofila, 8 de clorofila a (Chla) y 6 de clorofila b (Chlb). Este complejo tiene aproximadamente un 50 % de la clorofila en la biosfera y casi toda la clorofila b en las plantas. Sumado a estos dos pigmentos, hay moléculas de luteína importantes para la estructura, y otros pigmentos como carotenos, neoxantina y violaxantina, unidos al complejo (Drop et al., 2014).

Para que ocurra la transferencia de electrones en el PSII y el PSI, los centros antena deben transferir la energía de los fotones a determinada longitud de onda, 680 nm para el PSII y 700 nm para el PSI. Los complejos antena captan los fotones y transfieren la energía de una clorofila a otra. En esta transferencia de energía por resonancia de fluorescencia se produce una pérdida de energía. La energía del fotón resonará hasta el punto en que logre tener la energía necesaria para excitar a la clorofila en el centro de reacción (Nicholls & Ferguson, 2013).

Los complejos PSII y PSI con la luz absorbida comienzan la transferencia de e^- . La transferencia de e^- puede ser de dos modos, lineal (TEL) o cíclica (TEC). En la TEL, el PSII, el complejo citocromo b_6/f (Cyt b_6/f) y el PSI están involucrados en el transporte de e^- desde moléculas de agua hasta el aceptor final NADPH. En la TEC el único de los fotosistemas involucrado es el PSI, junto con el Cyt b_6/f generan solamente ATP sin la síntesis de NADPH. El control del tipo de transporte de e^- ajusta la relación de ATP/NADPH en respuesta a cambios metabólicos y ambientales (Yadav et al., 2017). El proceso de fijación de CO_2 será el que utilice la mayoría de ATP y NADPH generado por el proceso fotoquímico. Mejorar cualquiera de los puntos del proceso fotoquímico, ya sea la captación de la luz por los complejos antena, la eficiencia de los centros de reacción, la ATP sintasa, son caminos viables para mejorar la fotosíntesis (Cardona, Shao, & Nixon, 2018).

1.2.3 Fijación de Carbono

El ciclo de Calvin-Benson es el proceso en el que se fija el CO₂ atmosférico, utilizando el NADPH y el ATP generado en el proceso fotoquímico y se lleva a cabo en el estroma de los cloroplastos. Para la síntesis de una molécula de glucosa, son necesarias 6 moléculas de CO₂, 18 ATP y 12 NADPH. El ciclo contiene varios pasos hasta llegar a la síntesis de glucosa, pero la enzima limitante del proceso y más estudiada es la ribulosa-1,5-bisfosfato-carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO, EC 4.1.1.39) (Buchanan et al., 2015).

La RuBisCO cataliza la primera reacción dentro del ciclo, fijando una molécula de CO₂ a la ribulosa 1,5 bisfosfato, formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato. La RuBisCO posee una baja eficiencia de carboxilación, entre 1-5 ciclos por segundo lo que resulta limitante en la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas. Para compensar esta limitante, muchos organismos aumentan la cantidad de RuBisCO para satisfacer las necesidades metabólicas (Arnold & Georgiou, 2017). Por ejemplo, la RuBisCO puede llegar a ser más del 50 % de las proteínas solubles en hojas de arroz y trigo (Long, Marshall-Colon, & Zhu, 2015; Sharwood, Sonawane, Ghannoum, & Whitney, 2016).

La RuBisCO es una enzima bicatalítica, además de catalizar la carboxilación cataliza la oxigenación de la ribulosa 1,5 bisfosfato. Este proceso de oxigenación se conoce como fotorrespiración o ciclo C₂, genera un producto que no se puede utilizar en el ciclo Calvin-Benson (Buchanan et al., 2015). Si bien este ciclo es visto como una pérdida desde el punto de vista productivo, se le considera útil como mecanismo para remover metabolitos tóxicos, proteger de la fotoinhibición y ayudar en reacciones de defensa de la planta (Peterhansel et al., 2010).

La RuBisCO depende de la concentración de CO₂ interna para la actividad carboxilasa. Las plantas con metabolismo C₃ dependen de la concentración de CO₂ del ambiente para la actividad carboxilasa y no pueden disminuir la fotorrespiración. Sin embargo, las plantas con metabolismo C₄ evolucionaron y generaron mecanismos para disminuir la fotorrespiración. Células especializadas aumentan la concentración de CO₂ cerca de la RuBisCO haciendo que ésta tenga actividad carboxilasa únicamente (Liu & Sun, 2013). De esta manera las plantas C₄ tienen una capacidad productiva mayor que las plantas C₃, por ejemplo, se calcula que el maíz (C₄) en condiciones óptimas puede producir un 67 % más de rendimiento en grano en la misma área cultivada que el arroz (C₃) (Sheehy & Mitchell, 2011).

Mejorar la eficiencia de la carboxilación de la RuBisCO o disminuir la fotorrespiración, son dos caminos posibles para aumentar la eficiencia fotosintética y así el rendimiento de los cultivos. En este sentido, en 2006 se inició un proyecto para generar una variedad de arroz genéticamente modificado, que sea capaz de realizar fotosíntesis como una planta C₄ y así aumentar la productividad del arroz (Sheehy, Mitchell, & Hardy, 2007).

1.3 METABOLISMO DEL NITRÓGENO

1.3.1 Nitrógeno y EUN.

EL nitrógeno (N) es crucial para cualquier forma de vida en la Tierra. Es un componente de los aminoácidos, que formarán las proteínas, y se encuentra presente en las bases que componen los ácidos nucleicos como el ADN y ARN. En las plantas además mucho del N es utilizado en las moléculas de clorofilas que resultan esenciales para la fotosíntesis y posterior crecimiento (Basuchaudhuri, 2016). Las plantas

obtienen la mayoría del N del suelo en las formas de NO_3^- o en NH_4^+ . Debido a que en el suelo las plantas compiten por este recurso limitado con otros organismos, el N es uno de los nutrientes que más limitan la producción de los cultivos (Hopkins & Huner, 2008).

Los cereales tienen una eficiencia del uso del N baja y la principal razón de esta baja eficiencia es la pérdida de N. En el arroz particularmente la eficiencia de recuperación de N es menor a un tercio del N aportado. Esta baja eficiencia en la recuperación de N se debe a mecanismos de pérdida por lixiviación, desnitrificación, volatilización y erosión del suelo (Fageria, Moreira, & Coelho, 2011; Chauhan, Jabran, & Mahajan, 2017). El aumento importante en la utilización de N sintético en cultivos de arroz para lograr mayores rendimientos, sumado a la baja eficiencia en el uso de este N, acarrea importantes problemas a nivel ambiental. China es uno de los lugares donde el uso excesivo de N ha causado problemas ambientales, esta contaminación ha cambiado el enfoque de los estudios de aplicación del N. De un enfoque en el rendimiento económico-productivo, a un enfoque donde se trata de minimizar el impacto ambiental por la aplicación de N (Li, Chen, Wu, Tang & Ji, 2015).

Desde un punto de vista agronómico la eficiencia en el uso del nitrógeno (EUN), se puede definir como la capacidad de un cultivo de obtener un mismo rendimiento con un aporte menor de N (Pathak, Ahmad, Lochab & Raghuram, 2008). El mejoramiento convencional ha aumentado mucho el rendimiento de los cultivos en las últimas décadas, lo cual trajo aparejado una mejora en la EUN. Un ejemplo, es la comparación entre híbridos de maíz de los 70 y los 90. Los híbridos de los 90 tienen un mayor rendimiento en respuesta a un incremento en el agregado de N (O'Neill, Shanahan, Schepers, & Caldwell, 2004). Diferencias genéticas en la absorción de N y/o rendimiento de grano por unidad de N aplicado, se han reportado en otros cultivos. Sin

embargo, se tiene poco conocimiento molecular sobre la variación genética entre los cultivos y los híbridos para la EUN (Kant, Bi, & Rothstein, 2010). Además, la EUN es una característica compleja, que depende de factores internos y externos, como la disponibilidad de N en el suelo, el flujo de carbono-nitrógeno, el suministro de poder reductor de la fotosíntesis, por nombrar algunos (Pathak et al., 2008).

Para poder mejorar la EUN mediante mejoramiento molecular o ingeniería genética, es necesario tener un conocimiento que comprenda los mecanismos regulatorios del control del uso del N y así poder transferirlo a los cultivos.

1.3.2 Absorción y transporte de nitrógeno

1.3.2.1 Transporte de nitrato

El nitrato es una de las formas más abundantes de N en el suelo. La absorción, transporte y respuesta a este nutriente, han sido uno de los principales focos en la investigación en las plantas (Wang et al., 2004). Además de su rol como nutriente, el NO_3^- actúa como una molécula que modula la expresión de genes y una gran variedad de procesos incluyendo el crecimiento, la arquitectura del sistema radicular, el desarrollo de las hojas, la dormición de las semillas y el tiempo de floración (O'Brien et al., 2016).

Existe un flujo en la absorción de NO_3^- por la raíz que ha sido demostrado usando marcadores radiactivos. Este flujo es un balance entre la entrada y salida, probablemente mediado por diferentes proteínas transportadoras (Morgan, Volk, & Jackson, 1973). La cinética del flujo de la absorción de NO_3^- con concentraciones externas, es un comportamiento de dos fases. Una primera fase saturable en concentraciones bajas de NO_3^- y una segunda fase con comportamiento lineal en

concentraciones altas de NO_3^- . Estas observaciones sugirieron la existencia de dos tipos de transportadores, los que corresponden a sistemas de transportadores de alta afinidad (HATS) y los sistemas de transportadores de baja afinidad (LATS) (Crawford & Glass, 1998).

En la actualidad se conocen dos familias de transportadores de NO_3^- , los NPF por su sigla en inglés NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER (NRT1/PTR) family, y los NTR2 por NITRATE TRANSPORTER 2. La mayoría de los NPF son LATS sin embargo, hay algunas excepciones como OsNPF6.5 un transportador de arroz que tiene doble afinidad, los NTR2 son transportadores del tipo HATS (Wang, Cheng, Chen, & Tsay, 2018).

1.3.2.2 Transporte de amonio

El amonio es otra de las fuentes abundantes de N en el suelo, y si bien normalmente está en una concentración 50 veces menor que el NO_3^- , en suelos ácidos o inundados aumenta (Márquez & Monza, 2004). En el caso particular del cultivo de arroz el NH_4^+ es la fuente principal y preferencial de N, ya que se cultiva con aportes de urea que se transforma en amonio rápidamente en los suelos inundados (Wang, Siddiqi, Ruth, & Glass, 1993).

El transporte de NH_4^+ tiene el mismo comportamiento cinético que el NO_3^- , con dos fases, una saturable en concentraciones bajas y otra fase lineal a concentraciones altas (Wang et al., 1993; Kronzucker, Siddiqi, & Glass, 1996). Al igual que en el NO_3^- esto hace suponer la existencia de transportadores HATS y transportadores LATS.

Los transportadores de tipo LATS son los principales responsables de la absorción de amonio del suelo en concentraciones elevadas de NH_4^+ . Distintos mecanismos son probablemente los involucrados en este proceso. Miembros de la súper familia de las

acuaporinas son fuertemente expresados en la raíz y facilitan el transporte de NH_3 sumado al transporte de agua (Jahn et al., 2004). El ion NH_4^+ puede ser transportado por transporte no específico de canales no selectivos de cationes (Demidchik, Davenport, & Tester, 2002) o por canales de potasio (Hoopen et al., 2010).

En las plantas superiores existen dos familias de transportadores de NH_4^+ de tipo HATS, AMT1 y AMT2. Ambas familias poseen gran afinidad por el NH_4^+ (en el rango micromolar), pero los transportadores AMT2 son incapaces de transportar el análogo de amonio, el metilamonio (Pantoja, 2012).

1.3.3 Reducción de nitrato

Una vez que el nitrato ingresa a la planta puede ser transportado y almacenado en la vacuola de las hojas (Dechorgnat et al., 2011), o ser reducido en las raíces a NH_4^+ y asimilado por el ciclo GS-GOGAT para formar aminoácidos. El transporte dentro de la planta, mediante transportadores, puede ser por el xilema o floema (Tischner, 2000). La acumulación de NO_3^- en las hojas de algunos vegetales puede llegar hasta concentraciones de 4500 mg por kg de hoja (Bosnir et al., 2017). La acumulación de NO_3^- en los cultivos ha aumentado con el uso de fertilizantes, lo cual puede representar un riesgo para la salud de las personas y el ganado (Qiu, Wang, Huang, Chen, & Yang, 2014).

1.3.3.1 Nitrato Reductasa

Dentro de la célula, la enzima citosólica nitrato reductasa (NR) es la encargada del primer paso en la reducción del NO_3^- . Además, esta enzima parece ser el paso limitante en la asimilación de NO_3^- (Chamizo-Ampudia, Sanz-Luque, Llamas, Galvan, & Fernandez, 2017).

Las NAD(P)H:NR son una familia de proteínas muy relacionada de enzimas que contienen molibdeno, están ampliamente distribuidas entre plantas, hongos y algas. Las NR catalizan la reducción irreversible de NO_3^- en nitrito (NO_2^-). Los donadores de electrones pueden ser NADH, NADPH o ambos, dependiendo de la isoforma de la NR (Campbell, 1999). La NR es una enzima compuesta por un polipéptido de 100 kDa que une 1 equivalente de molibdeno-molibdopterina (Mo-MPT), hemo-Fe y flavín adenín dinucleótido (FAD). Para que la NR sea activa se requiere la dimerización, siendo la NR nativa un homodímero. La NR tiene dos sitios activos, el FAD en el primer sitio activo recibe los electrones donados por el NADH o el NADPH, que mediante el hemo-Fe se transportan al Mo-MPT unido al segundo sitio activo. En el segundo sitio activo el molibdeno reducido transfiere los electrones al NO_3^- y lo reduce en NO_2^- e hidróxido (Campbell, 2001).

Una vez formado el NO_2^- es transportado al cloroplasto y ahí reducido a NH_4^+ . Este proceso se da de manera rápida de forma que no se acumule NO_2^- , evitando que se transforme en ácido nitroso, una molécula sumamente tóxica. En las plantas superiores se sabe poco sobre el sistema de transporte del NO_2^- (Foyer & Graham, 2004). Se observó que el NO_2^- inhibe el transporte de NO_3^- de forma competitiva. Esto hace pensar que comparten algunos de los transportadores (Glass, Shaff, & Kochian, 1992; Sugiura, Georgescu, & Takahashi, 2007). Un estudio más reciente identificó proteínas de la familia HPP presente en ciano bacterias y los cloroplastos, capaces de transportar NO_2^- (Maeda, Konishi, Yanagisawa, & Omata, 2014).

1.3.3.2 Nitrito Reductasa

En los plastos la enzima que cataliza la reducción del NO_2^- a NH_4^+ , es la nitrito reductasa (Fd-NiR, EC 1.7.7.1). Para reducir el NO_2^- son necesarios 6 e^- . Tanto en los cloroplastos como en los plástidos de órganos no fotosintéticos, los donadores de e^- son ferredoxinas (Fd) reducidas. En los cloroplastos el PSI es el que provee la Fd reducida, en los plastos no fotosintéticos se obtiene por la oxidación de glucosa-6P en la vía de las pentosas fosfato (Yoneyama, Fujimori, Yanagisawa, Hase, & Suzuki, 2015).

Las Fd-NiR son enzimas monoméricas de unos 63 kDa aproximadamente, poseen dos grupos prostéticos, un centro [4Fe-4S] y un grupo sirohemo. El NO_2^- se une a la proteína y el sirohemo transfiere los seis e^- aportados por las Fd (Hase, Schürmann, & Knaff, 2007). La transcripción de la Fd-NiR parece estar co-regulada junto con la de la NR, probablemente para evitar la acumulación de NO_2^- (Márquez & Monza, 2004). Además, las enzimas de la asimilación del NO_3^- están reguladas a nivel transcripcional y post-transcripcional por varios factores endógenos y exógenos como NO_3^- , luz, hormonas, metabolitos del C y del N (Basuchaudhuri, 2016).

1.3.4 Asimilación de amonio

1.3.4.1 Glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa (GS) cataliza el primer paso en la asimilación del NH_4^+ , la condensación ATP dependiente del NH_4^+ con una molécula de glutamato, sintetizando una molécula de glutamina. El proceso de asimilación de NH_4^+ es el centro del metabolismo del nitrógeno, en esta etapa se une la asimilación primaria con la asimilación secundaria o reasimilación. La asimilación primaria, incorpora el NH_4^+

absorbido del suelo o el generado por la reducción de NO_3^- . Mientras que la asimilación secundaria, es el proceso en el que se incorpora el NH_4^+ producido en la fotorrespiración o el catabolismo de aminoácidos (Lea & Miñin, 2010).

La GS pertenece a una pequeña familia multigénica de entre 4 a 6 izoenzimas dependiendo de la especie, ubicadas tanto en el citosol (GS_1) como en los plastos (GS_2). De estos genes la mayoría codifican para isoformas de GS_1 , mientras que solo uno para GS_2 , a excepción de *Medicago truncatula* donde se encontraron dos isoformas de GS_2 (Bao et al., 2015). Estos genes presentan patrones de expresión órgano/tejido específico, donde los factores ambientales también influyen en la expresión de estos genes.

La GS_1 se encarga de la asimilación primaria de NH_4^+ en las raíces y hojas, también del NH_4^+ producido en diferentes procesos que se dan en el citosol, por ejemplo el catabolismo de aminoácidos (Bernard & Habash, 2009). La GS_2 se expresa principalmente en los tejidos fotosintéticos y tiene un rol fundamental en la reasimilación de NH_4^+ producido en la fotorrespiración y la asimilación de NH_4^+ derivado de la reducción de NO_3^- (Seabra & Carvalho, 2015).

Las subunidades de GS_1 tienen un tamaño de 38-40 kDa, mientras que las de GS_2 son más grandes entre 44-45 kDa. Esta diferencia en tamaño ha sido utilizada como herramienta en el estudio de estas enzimas (Lea & Miñin, 2010). La complejidad de la estructura nativa cuaternaria de la GS y la diferencia con las GS bacterianas, habían dificultado la elucidación de su estructura. En un principio se creía que las GS de plantas eran octámeros. Finalmente se logró conseguir una cristalografía de la GS_1 a estable de maíz, que develó una estructura decamérica de dos anillos pentaméricos superpuestos (Unno et al., 2006).

Debido a su rol central en el metabolismo del nitrógeno, la GS ha sido objetivo de numerosos estudios de sobreexpresión para mejorar la EUN. Sin embargo, la sobreexpresión de genes de GS₁ no resultó hasta ahora en un incremento de la EUN. Esto se puede deber a que la actividad GS esté regulada negativamente por diferentes mecanismos, fuertemente afectados por las condiciones ambientales y desbalances metabólicos. Se necesitan mejorar las estrategias de sobreexpresión de las GS, en conjunto con otros genes de enzimas relacionados con la asimilación del nitrógeno y así superar cuellos de botella metabólicos (Thomsen, Eriksson, Møller, & Schjoerring, 2014).

1.3.4.2 2-Oxoglutarato amidotransferasa

Una vez formada la molécula de glutamina, la segunda enzima en la asimilación de NH₄⁺ se involucra. La glutamina 2-oxoglutarato amidotransferasa (GOGAT), cataliza la transferencia del grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, generando dos glutamatos. Para que esta reacción se lleve a cabo es necesario un agente reductor. En las plantas existen dos formas distintas de GOGAT ambas ubicadas en los plastos. Una de las enzimas utiliza a la Fd reducida como donador de e⁻, la otra utiliza NADH (Feraud et al., 2005).

La Fd-GOGAT normalmente presenta actividades altas en los cloroplastos de tejidos fotosintéticos, donde puede utilizar la energía proveniente de la luz directamente como fuente del poder reductor. La NADH-GOGAT está ubicada principalmente en células no fotosintéticas, donde el poder reductor es suministrado por la vía de las pentosas fosfato (Nigro, Blanco, Anderson, & Gadaleta, 2014). La Fd-GOGAT y la NADH-GOGAT han sido bien caracterizadas como proteínas monoméricas, la NADH-

GOGAT es más grande presenta un tamaño de más de 200 kDa, mientras que la Fd-GOGAT tiene un tamaño de entre 130-180 kDa (Lea & Miflin, 2010).

Mutantes en Arabidopsis y Cebada que carecían de una Fd-GOGAT funcional, eran incapaces de crecer en concentraciones de CO₂ ambiente, sin embargo, podían crecer en concentraciones de CO₂ alto. Esto sugirió que la Fd-GOGAT está involucrada en proceso de reasimilación del NH₄⁺ formado en la fotorrespiración (Konishi et al., 2014).

En el caso de la NADH-GOGAT numerosos estudios llevados a cabo en arroz, mostraron diferentes patrones de expresión en sus dos NADH-GOGAT. La NADH-GOGAT₁ se expresa fuertemente en las células de la superficie de la raíz de las plantas. Mutantes que carecían de la actividad de esta enzima mostraron fenotipos iguales a plantas con deficiencia de nitrógeno. Esto sugiere que la NADH-GOGAT₁ tiene gran importancia en la asimilación primaria de NH₄⁺ en la raíz (Tabuchi, Abiko, & Yamaya, 2007).

La NADH-GOGAT₂ se expresa principalmente en hojas maduras de las plantas de arroz. Plantas carentes de la función de la NADH-GOGAT₂, mostraron una reducción en el número de espiguillas por panícula, característica asociada a un menor rendimiento. Esto sugiere que la NADH-GOGAT₂ juega un rol importante en la removilización del nitrógeno en hojas senescentes, asimilando el NH₄⁺ producido por el catabolismo de moléculas nitrogenadas (Yamaya & Kusano, 2014).

1.3.5 Aminoácidos

Los aminoácidos por principalmente constituir las proteínas, generalmente son pasados por alto en su rol central en la célula y fisiología vegetal. Los aminoácidos están involucrados en la mayoría de las vías metabólicas y procesos celulares. Además

de su rol como precursores de la síntesis de proteínas, son moléculas con roles muy diversos, son precursores de gran variedad de metabolitos secundarios, relacionados con funciones estructurales, de defensa frente a patógenos e incluso moléculas señal (Pratelli & Pilot, 2014).

Como se vio anteriormente todas las vías de asimilación del nitrógeno, terminan en la síntesis de glutamato (Bernard & Habash, 2009). Por esta razón la molécula de glutamato, ocupa un rol central en el metabolismo de los demás aminoácidos en las plantas superiores. El grupo α -amino del glutamato puede ser transferido a cetoácidos y así generar un nuevo aminoácido. Las enzimas encargadas de esto son las aminotransferasas o transaminasas, y exhiben una amplia preferencia de sustratos (Forde & Lea, 2007).

Además de su rol como metabolitos centrales, los aminoácidos son las moléculas nitrogenadas más abundantes en los sistemas de transporte de larga distancia en las plantas y son considerados como los principales transportadores de N en éstas. El proceso de transporte y redistribución del N es muy importante en el desarrollo de las plantas. Las raíces asimilan el N en aminoácidos y éstos se transportan a los órganos sumidero (Okumoto & Pilot, 2011).

El glutamato, glutamina, aspartato y asparagina son los principales transportadores de N intra e intercelular en los haces vasculares en las plantas (Gaufichon, Rothstein, & Suzuki, 2016). La asparagina resulta una forma ideal para el transporte y almacenado del nitrógeno. Esto se debe a la alta relación de N:C, a que tiene una pequeña carga neta en condiciones fisiológicas y en su forma soluble es sustrato de pocas reacciones enzimáticas (Lea, Sodek, Parry, Shewry, & Halford, 2007).

El aspartato es el precursor de varios aminoácidos como arginina, aminoácidos aromáticos y asparagina. La síntesis del aspartato es mediada por la enzima aspartato

aminotransferasa (AAT), que cataliza la transaminación reversible entre el glutamato y el oxalacetato generando aspartato y 2-oxoglutarato (McAllister, Wolansky, & Good, 2016).

En las plantas la asparagina se sintetiza a partir del aspartato, la asparagina sintetasa (AS-B EC 6.3.5.4) cataliza la transferencia ATP dependiente del grupo amida de la glutamina al aspartato, generando asparagina y glutamato. La AS-B también puede utilizar el NH_4^+ como donante del grupo amida para sintetizar la asparagina (Gaufichon, Reisdorf-Cren, Rothstein, Chardon, & Suzuki, 2010). En *Arabidopsis* se ha reportado la existencia de tres genes que codifican para AS, *ASN1*, *ASN2* y *ASN3*. Las enzimas AS2 y AS3 comparten un 92 % de la cadena peptídica, mientras que la AS1 comparte un 88 % con AS2 y un 87 % con AS3 (Gaufichon et al., 2016). Líneas knockdown de *ASN2* generaron plantas con problemas en su crecimiento, hojas sin asparagina y acumulación de NH_4^+ . Estos resultados indican que el rol fisiológico de la AS2 está relacionado a la asimilación primaria de NH_4^+ , para el almacenamiento y movilización del N en la planta (Gaufichon et al., 2013).

La relación de los aminoácidos con el transporte del N en la planta, ha sido tratada como posible mecanismo para aumentar la EUN en las plantas con éxito variable. En el caso de la alanina aminotransferasa (AlaAT, E.C.2.6.1.2), la sobreexpresión de esta enzima en plantas de canola y arroz consiguió una mejora en el rendimiento y en la biomasa de las plantas (Good et al., 2007; Shrawat, Carroll, DePauw, Taylor, & Good, 2008). En el caso de la AAT, la sobreexpresión de esta enzima en canola no trajo el resultado esperado de aumentar la EUN como había ocurrido con la AlaAT (McAllister et al., 2016).

1.4 RELACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DE CARBONO Y NITRÓGENO

La importancia del C y del N como nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal, ha sido discutida hasta ahora de forma independiente. Sin embargo, la asimilación de C y N están muy relacionadas. Esto se debe a la necesidad de N asimilado para la síntesis de pigmentos fotosintéticos y enzimas, que se utilizan en las hojas para la fotosíntesis. También la reducción y asimilación de N necesita del poder reductor y los esqueletos carbonados generados en la fotosíntesis (Foyer, Ferrario-Méry, & Noctor, 2001).

Un ejemplo de esta relación entre los metabolismos es la disminución de la tasa fotosintética en hojas de una planta sometida un déficit de N. Por el contrario, existe una correlación positiva entre un aumento en el N y la capacidad fotosintética de las plantas (Jin, Yang, Tan, & Zhao, 2015). En el caso del metabolismo del N, plantas de *Arabidopsis* deficientes en azúcares mostraron una inducción en genes que codifican para transportadores de NO_3^- , NR y GS en respuesta al agregado exógeno de azúcares (Goel, Bhuria, Kaushal, & Singh, 2016).

1.4.1 Poder reductor y ATP para la asimilación de N

En los tejidos fotosintéticos las enzimas que reducen o asimilan el N, se abastecen del poder reductor y la energía que brinda la fotosíntesis. Sin embargo, gran parte de la asimilación del N ocurre en la raíz tejido, no fotosintético. Dependiendo de la fuente de nutrición nitrogenada las plantas, pueden preferir asimilar en la raíz (NH_4^+) o reducir y asimilar en las hojas (NO_3^-). Se estima que cerca de un 15 % del catabolismo del C es utilizado en la asimilación de NH_4^+ bajo una nutrición con NH_4^+ , mientras

que en una nutrición con NO_3^- es un 5 % lo utilizado del metabolismo del C (Foyer, Noctor, & Hodges, 2011).

En la raíz y otros tejidos no fotosintéticos, el poder reductor necesario para la asimilación de N es aportado por la vía oxidativa de las pentosa fosfato (Esposito, Massaro, Vona, Rigano, & Carfagna, 2003). El primer paso de esta vía es catalizado por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que es considerado el mayor punto de control de la vía. La G6PDH junto con la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) convierten la glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato con la producción de dos moléculas de NADPH. De 6 genes que codifican para G6PDH en *Arabidopsis thaliana*, se predice que cuatro se ubican en el interior de los plastos (Wakao & Benning, 2004).

A nivel de raíz la oxidación de la glucosa 6-fosfato limita la asimilación de N, más que las actividades de las enzimas de asimilación de N. Si los requisitos de asimilación primaria de N se combinan con los requisitos de poder reductor de otras vías en plastos no fotosintéticos, es probable que la tasa de oxidación de carbohidratos por la actividad vía oxidativa de las pentosas fosfato sea una limitante (Wakao, Andre, & Benning, 2007).

1.4.2 Esqueletos carbonados para la asimilación de N

El proceso de asimilación de NH_4^+ mediante el ciclo GS/GOGAT además de requerir poder reductor en forma de Fd-reducida o NADH, necesita un esqueleto carbonado al que cederle el NH_4^+ . El 2-oxoglutarato (2-OG), es el principal esqueleto carbonado en la asimilación de NH_4^+ . Éste se sintetiza a partir del isocitrato generado en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CATC) (Foyer et al., 2001). La isocitrato deshidrogenasa (IDH), es la enzima que cataliza la descarboxilación del isocitrato para formar 2-OG.

Esta reacción requiere de cofactores que pueden ser NAD o NADP. En las plantas hay IDH dependientes de NAD y IDH dependientes de NADP. Las NAD-IDH se encuentra localizada solamente en la mitocondria y forma parte del CATC. Por el contrario, la NADP-IDH se encuentra en el citoplasma, plastos, mitocondrias y peroxisomas, y todavía se debaten sus funciones fisiológicas (Foyer et al., 2011). Debido a que en la asimilación de NH_4^+ se consume el 2-OG para sintetizar Glu, se necesita generar precursores del CATC. Además, el CATC alimenta de esqueletos carbonados para la síntesis de otros aminoácidos, como el oxalacetato (OAA) para sintetizar Asp (Márquez & Monza, 2004).

La principal forma anaplerótica de reponer los esqueletos carbonados en el CATC es mediante la síntesis de OAA. En la mayoría de los tejidos no fotosintéticos y en las hojas de plantas C3, la enzima que sintetiza el OAA es la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) (Masumoto et al., 2010). La PEPC cataliza la β -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de HCO_3^- produciendo OAA y fosfato inorgánico. Además, la PEPC en plantas C4 y CAM cataliza el primer paso en la fijación de CO_2 (Izui, Matsumura, Furumoto, & Kai, 2004).

La mayoría de las PEPC son enzimas alostéricas reguladas por una variedad de factores. La actividad de la PEPC en plantas vasculares es regulada positivamente mediante la fosforilación reversible de un residuo de serina cerca del N terminal. Al ser fosforilada la PEPC se vuelve menos sensible al malato su regulador negativo y más sensible a la G6P su activador de esta forma se logra una mayor actividad (Masumoto et al., 2010).

Debido a la estrecha relación entre la asimilación de C y la asimilación de N, es necesario pensar en ambos metabolismos colaborando a la hora de mejorar la EUN.

II. OBJETIVOS

Hipótesis: Es posible conocer el impacto de la radiación lumínica sobre el metabolismo del nitrógeno a través del análisis de parámetros bioquímicos y/o fisiológicos asociados al uso de ese nitrógeno.

Objetivo general: Analizar en el arroz los cambios en el metabolismo del nitrógeno en respuesta a la radiación incidente.

Objetivos específicos:

1. Evaluar si el patrón de acumulación de moléculas de transporte nitrogenadas cambia en ambientes de radiación y dosis de nitrógeno contrastantes.
2. Determinar los cambios en las enzimas del metabolismo primario del nitrógeno en respuesta a la radiación y el nivel de nitrógeno.
3. Identificar parámetros bioquímico-fisiológicos que responden a la interacción entre intensidad de radiación y nivel de nitrógeno.

III. Materiales y Métodos

3.1 MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal se utilizaron cuatro cultivares de arroz (*Oryza sativa*), dos cultivares de tipo *indica* (El Paso 144 e INIA Olimar) y dos cultivares de tipo *japónica* (INIA Tacuarí e INIA Parao). Los materiales fueron suministrados por el Ing. Agr. Jesus Castillo, INIA Treinta y Tres, Uruguay.

3.2 CULTIVO DE PLANTAS

3.2.1 Germinación de semillas

Las semillas fueron germinadas durante 5 días, en placas de Petri cubiertas parcialmente por H₂O destilada en oscuridad a 28°C.

3.2.2 Condiciones de cultivo

Las plantas germinadas se transfirieron a los soportes de crecimiento, que consistieron en tubos de PVC con un volumen de 850 cm³ conteniendo sustrato arena vermiculita 1:1 (v/v). Las plantas crecieron en estos soportes durante 40 días en cámaras de crecimiento con las siguientes condiciones: fotoperiodo fue 12/12h (luz/oscuridad), temperatura 26-30 °C y una humedad relativa de 60-80 %. Las condiciones de iluminación definidas fueron: Alta intensidad lumínica (AL) de 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ o Baja intensidad lumínica (BL) 850 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$. Las luminarias LED contenían todo el espectro lumínico entre 400-700 nm. La parte luminosa del fotoperiodo consiste en 6 horas donde la radiación se incrementa hasta lograr el máximo y luego 6 horas donde disminuye hasta oscuridad. Este fotoperiodo simula un día soleado de octubre en una

zona geográfica de cultivo de arroz en Uruguay (33°13'51"S 54°22'56"W). La radiación baja representa la mitad del día soleado simulado. Tanto las condiciones lumínicas como la luminaria utilizada para el crecimiento de las plantas, forman parte de la tesis doctoral del M.Sc. Gastón Quero (Facultad de Agronomía, Universidad de la República).

Como solución nutritiva se utilizó medio Yoshida (Yoshida, Forno, Cock, & Gomez, 1976) modificada que contenía, en mM: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.6; $CaCl_2$, 1.0; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0.32; K_2SO_4 , 0.5 y en μM : Ácido cítrico monohidratado, 70.8; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 35.4; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 9.5; H_3BO_3 , 19.0; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.15; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15; $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0.07. El pH de la solución nutritiva se ajustó a 5.2. La fuente de nitrógeno fue NH_4NO_3 : 1.5 mM para las plantas que se cultivaron en dosis control de nitrógeno (NC), 4.5 mM para las plantas cultivadas con alta dosis de nitrógeno (AN). Las plantas se regaron con 100 ml de la correspondiente solución nutritiva por semana, además se regaron con agua para satisfacer los requerimientos hídricos individuales.

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Diseño experimental.

Todos los ensayos fueron diseños completamente al azar (DCA), se aleatorizaron mediante el programa Microsoft Excel. El experimento conto con 3 factores: genotipo, radiación lumínica y dosis de nitrógeno. El factor genotipo tuvo 4 niveles, mientras que para la radiación y el nitrógeno fueron 2 niveles. Estos factores resultaron en un total de 16 tratamientos posibles definidos por la multiplicación de los niveles de cada factor. La unidad experimental se definió como una maceta con una planta, se

realizaron 3 réplicas biológicas por tratamiento. Las macetas tuvieron la misma cantidad de sustrato y se regaron con la misma cantidad de solución nutritiva.

Los análisis de tasa de asimilación de CO₂ y fluorescencia de clorofilas fueron realizados en la hoja expandida más nueva. Los demás análisis fueron realizados en toda la parte aérea molida y homogeneizada.

3.4 DETERMINACIONES FISIOLÓGICAS

3.4.1 Tasa de crecimiento

Para la tasa de crecimiento se utilizó la masa seca de la parte aérea a los 40 días de crecimiento. Las plantas se cosecharon y se secaron a 50 °C hasta obtener un peso constante. En este momento se registró la masa y se molió el material vegetal.

3.4.2 Isotopos estables

Las muestras secas y molidas se pasaron por un mortero de ágata hasta llegar a un tamaño de partícula de consistencia de talco. Estas muestras se enviaron al Centro de Aplicaciones de Tecnología Nuclear en Agricultura Sostenible (Facultad de Agronomía, Universidad de la República), donde se les midió el contenido total de Carbono y Nitrógeno, así como la relación isotópica $\delta N15$.

3.4.3 Rendimiento cuántico del fotosistema II

El análisis de la fluorescencia de clorofilas se midió con un monitor de fluorescencia de amplitud modulada (FMS1, Hansatech®). Las plantas se midieron luego de 1h de adaptación en oscuridad, primero se realizó un análisis del quenching de fluorescencia seguido de un análisis de relajamiento como se presenta en la figura1, este análisis fue

diseñado para arroz por el M.Sc. Gastón Quero (Facultad de Agronomía, Universidad de la República). El rendimiento cuántico del fotosistema II (ϕ .PSII), el quenching no fotoquímico (ϕ .NPQ) y el resto de pérdidas no fotoquímicas (ϕ .NO) fueron calculados según Baker (2008).

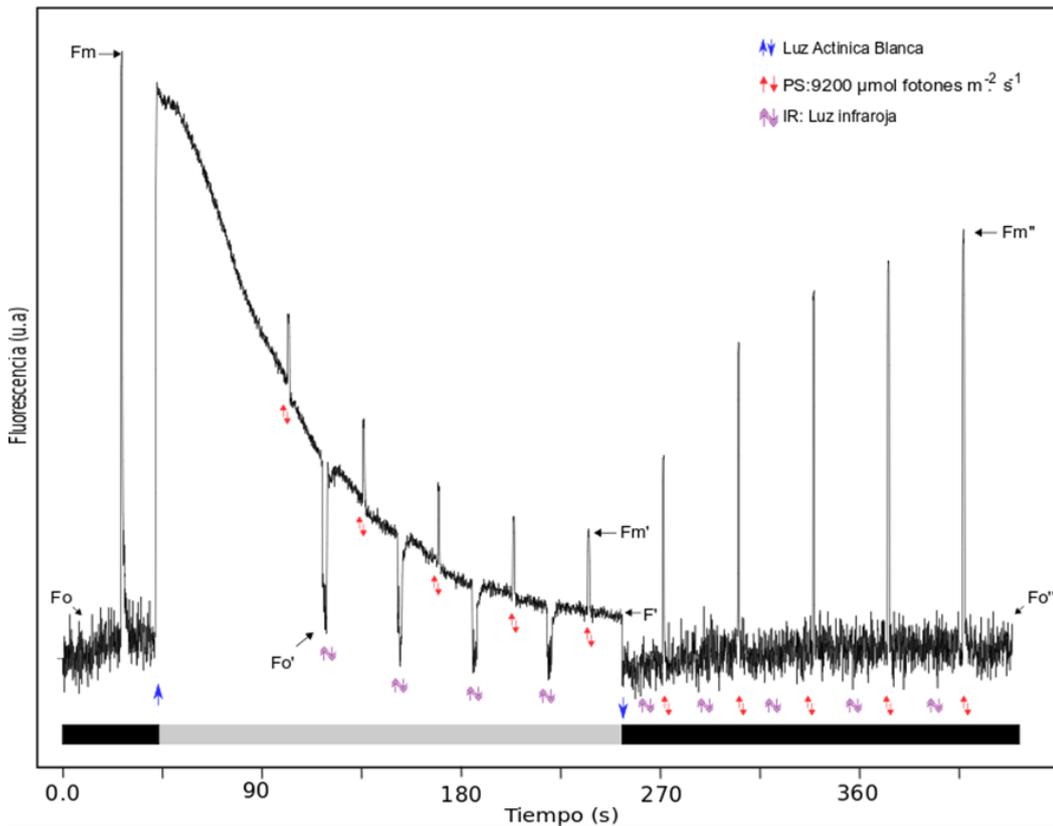


Figura 1. La fluorescencia medida en unidades arbitrarias (u.a) de una hoja adaptada a la oscuridad expuesta a luz actínica blanca de $778 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las flechas azules hacia abajo y arriba indican el prendido y apagado de la misma. Las flechas rojas indican la posición de pulsos saturantes (PS). Las flechas dobles indican pulsos de luz infra roja (IR). F_o , F_o' y F_o'' son los mínimos de fluorescencia en oscuridad, luz y fase recuperación respectivamente, F_m , F_m' y F_m'' son los máximos de fluorescencia en oscuridad, luz y fase recuperación respectivamente.

3.4.4 Tasa de asimilación de CO_2 (Fotosíntesis neta)

La asimilación de CO_2 se midió con un sistema portable de fotosíntesis (LI-6400, LI-COR®). Las medidas de fotosíntesis se realizaron con las plantas luego de 3h de exposición a luz. La concentración de CO_2 fue de $395 \pm 5 \text{ ppm}$, la humedad 60 % y la

temperatura fue 25 °C. La concentración intracelular de CO₂, la tasa transpiratoria, la conductancia estomática y la fotosíntesis neta, fueron medidas con un flujo de fotones incidente igual al de las condiciones en que crecieron las plantas, 1500 μmol.m⁻².s⁻¹ o 850 μmol.m⁻².seg⁻¹ para alta y baja radiación respectivamente.

3.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

3.5.1 Proteínas

Las proteínas se extrajeron según Li et al. (2011). Se maceraron 0.1 g de hojas previamente molidas con nitrógeno líquido, con 0.5 ml de tampón TRIS-HCl 62.5 mM pH 7.4; EDTA 2 mM ;2-mercaptoetanol 2 %(v/v); fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1.0 Mm; dodecilsulfato sódico (SDS) 0.1 %; Glicerol 10 %. El homogenado se centrifugó a 15000 x g 15 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó como extracto crudo para la cuantificación de las proteínas solubles y para los ensayos de inmunodetección.

Las extracciones para los ensayos de actividades enzimáticas, se realizaron cambiando el tampón de extracción por TRIS-HCl 100 mM pH 7.5; MgCl₂ 10 mM; ditiotreititol 1.0 mM; PMSF 1.0 Mm; Triton x-100 0.1 %(v/v). El resto de la extracción fue igual a la realizada para los ensayos de inmunodetección.

3.5.2 Clorofilas a, b y β-caroteno

La extracción de los pigmentos se realizó según Küpper, Seibert y Parameswaran (2007). A 100 mg de muestra previamente molida se le agrego 1 ml de acetona ppa, se agitó durante 4 min a 2500 rpm y se lo dejó por 48 h a -22 °C. Pasadas las 48 h se

centrifugó a 13000 x g 10 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -22 °C para la posterior cuantificación.

3.5.3 Aminoácidos, compuestos nitrogenados, amonio y nitrato

Los aminoácidos, amonio y nitrato se extrajeron según Izaguirre-Mayoral et al. (1992). Se maceró 0.2 g de tejido en 0.5 mL de tampón fosfato potásico 10.0 mM pH 7.2 /etanol 96 °GL (1/1). El macerado se centrifugó a 1300 x g 10 min a 4 °C. El sobrenadante se usó para la cuantificación de amonio, nitrato, aminoácidos totales y para el análisis de aminoácidos y compuestos nitrogenados por HPLC.

3.6 DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS Y ANALÍTICAS

3.6.1 Actividad glutamina sintetasa

La actividad de la Glutamina Sintetasa (GS) se determinó según el ensayo biosintético, determinando el Pi generado en la reacción (Clemente & Márquez, 1999). La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 0.1 ml de tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.5; L-Glutamato 100.0 mM; MgCl₂ 50.0 mM; NH₄Cl 50.0 mM; ATP 4.0 mM y 4 µL de extracto enzimático (1:10), la reacción se incubó a 37 °C durante 15 min. Los blancos de las muestras consistieron en la misma mezcla de reacción sin la adición de L-Glutamato. Para determinar el fosfato inorgánico (Pi) producido, pasado el tiempo de incubación se agregó 800 µl de la solución de verde malaquita 253 mg.l⁻¹; (NH₄)₆·MO₇O₂₄·4H₂O 10.5 g.l⁻¹; luego de 1 minuto la reacción se detuvo con el agregado de 100 µl de citrato trisodico (.2H₂O) 34 % (p/v). Luego de 15 minutos se midió la absorbancia de las reacciones a 660nm, se calculó el Pi formado por la GS mediante la diferencia de absorbancia de la muestra con respecto al blanco, este

resultado se multiplicó por el coeficiente de extinción molar del Pi ($\epsilon_{660} = 50 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de formar 1.0 μmol de Pi por min y la actividad se expresó en U por mg de proteína ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$).

3.6.2 Actividad nitrato reductasa

La actividad de la Nitrato Reductasa (NR) se determinó según el ensayo descrito en Yousfi (et al. 2012) con modificaciones. La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 0.5 ml de tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.5; KNO_3 100.0 mM; NADH 0.4 mM; Flavín adenín dinucleótido (FAD) 50.5 μM y 30 μL de extracto enzimático, la reacción se incubó a 30 °C durante 30 min. Para determinar el nitrito (Ni) producido, pasado el tiempo de incubación se agregó 500 μl de la solución de Sulfanidamida 1.5 % v/v en 2.5M de HCl y 500 μl de la solución N-(1-Naftil)etilendiamina diclorhidrato 0.02 % p/v en H_2O . Luego de desarrollado el color se midió la absorbancia de las reacciones a 540nm, se calculó el Ni formado por la NR multiplicado la absorbancia por el coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{540} = 46 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de formar 1.0 μmol de Ni por min y la actividad se expresó en U por mg de proteína ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$).

3.6.3 Cuantificación de aminoácidos totales

Los aminoácidos totales, se determinaron según Moore y Stein (1948) A 0.1 mL de muestra se le adicionaron 0.5 mL de tampón citrato-NaOH 0.9 M pH 5.0; 0.5 mL ninhidrina 53.8 mM disuelta en 2-etoxietanol (FlukaTM) y ácido ascórbico 2.0 mM. Las muestras se calentaron en baño de agua a 100°C durante 25 min, se dejaron enfriar y se agregaron 3.0 mL de etanol 60 °GL. La absorbancia se midió a 570 nm y como estándar se utilizó glutamato de sodio.

3.6.4 Cuantificación de nitrato

El nitrato se cuantificó según Cataldo et al. (1975) con modificaciones. A 0.1 mL de muestra se le adicionaron 0.4 mL de ácido salicílico 0.36 M en ácido sulfúrico 18.4 M y se agitó. Luego de 20 min se adicionaron 5.0 mL de NaOH 3.8 M. La absorbancia se midió a 410 nm y como estándar se utilizó KNO₃.

3.6.5 Cuantificación de amonio

El amonio se cuantificó según Solorzano (1969). A muestras de 1.0 mL, diluidas hasta una concentración adecuada, se le agregó 0.2 mL de fenol 1.1 M en etanol; 0.2 mL de nitroprusiato de sodio 16.8 mM; 0.4 mL de citrato de sodio 0.7M – NaOH 0.3 M y 0.1 mL de NaClO 1.3 M. Entre el agregado de cada reactivo se agitó y después se incubó en oscuridad durante 2 h. La absorbancia se midió a 640 nm y como estándar se utilizó NH₄OH.

3.6.6 Cuantificación de proteínas solubles

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976) A 20 µL de muestra se le agregó 980 µL de reactivo consistente en Azul de Coomassie G250 (Sigma) 0.1 mM; etanol 0.8 M y ácido fosfórico 1.5 M. La absorbancia se midió a 595 nm después de 2 min, para la curva estándar se utilizaron concentraciones conocidas de Lisozima.

3.6.7 Identificación y cuantificación de aminoácidos por HPLC

Los aminoácidos se identificaron y cuantificaron previa derivatización con o-ftaldialdehído (OPA, Sigma-Aldrich) de acuerdo a Hunkapiller, Strickler y Wilson (1984) con modificaciones. A 20.0 µL de extracto se le adicionaron 40.0 µL de tampón borato-NaOH 0.4 M pH 10.0; 2-mercaptoetanol 0.7 M y OPA 86.0 µM en metanol-

agua (1/1). Las muestras se agitaron durante 4 min a 2500 rpm y posteriormente se centrifugaron a 12000 x g durante 2 min y se inyectaron en un HPLC provisto de un *loop* de 20.0 μ L. La elución y separación de los aminoácidos se realizó empleando una columna C18 como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron dos solventes. El primer solvente fue tampón acetato 20.0 mM pH 5.5 (solvente A) y el segundo fue metanol (solvente B). Las condiciones de elución en gradiente, a un flujo de 1.0 mL/min y 25°C se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. *Condiciones de elución en gradiente de las muestras aminoácidos-OPA*

Tiempo (min)	% A	% B
0	80	20
45	20	80
46	80	20
65	80	20

Los conjugados aminoácidos-OPA separados por la columna fueron detectados por absorbancia a 337 nm con un detector de arreglo de fotodiodo. Los picos de los diferentes aminoácidos-OPA se identificaron por comparación con los tiempos de elución de cada aminoácido-OPA inyectado solo, y posteriormente en mezclas con otros aminoácidos igualmente derivatizados. Las concentraciones de los aminoácidos de las muestras se determinaron previa realización de curvas de calibración de los aminoácidos - OPA de concentraciones conocidas (entre 2 y 30 nmoles, inyectados por duplicado). Así se determinó para cada aminoácido-OPA una curva de calibración cuyas variables y parámetros se presentan en la tabla 2. Estas variables y parámetros son significativos, al menos, al 5 % (prueba F).

Tabla 2. Ecuaciones de las curvas de calibración de los OPA-aminoácidos ($y = \text{área}$, en unidades arbitrarias y $x = \text{cantidad}$, nmol).

aminoácido	ecuación	r^2
aspartato	$y = 111748x + 4851$	0.958
glutamato	$y = 174985x + 4477$	0.920
asparagina	$y = 148031x + 8483$	0.964
serina	$y = 141689x + 7546$	0.995
glutamina	$y = 235357x + 3402$	0.977
arginina	$y = 218144x + 13024$	0.959
glicina	$y = 134138x + 9439$	0.959
alanina	$y = 154088x + 10715$	0.980
GABA	$y = 245985x + 2780$	0.953

3.6.8 Cuantificación de clorofilas a, b y β -caroteno

Las clorofilas se determinaron según Küpper, Seibert y Parameswaran (2007). Los pigmentos extraídos con de 1.0 mL de acetona, diluidos en acetona hasta lograr una concentración de un máximo de densidad óptica entre 1 y 0.5 unidades de absorbancia, se corrió el espectro de absorción entre 750-350 nm. Para calcular la concentración de las clorofilas y carotenos se utilizó la ecuación aportada en el material suplementario de Küpper, Seibert y Parameswaran (2007) para una planta sin estresar.

3.7 INMUNODETECCIÓN DE GS Y FD-GOGAT

3.7.1 SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas totales en condiciones desnaturizantes se realizó en geles de poliacrilamida-SDS. Para la preparación del gel y el tampón se siguió el protocolo propuesto por (Sambrook & Russel, 2000). La concentración de poliacrilamida de los geles concentradores fue 5 %, los geles separadores fueron 10 %

para la GOGAT y 12 % para la GS. El tampón de corrida consistió en Tris 25.0 mM y glicina 192.0 mM pH 8.3, SDS 0.15 % (p/v).

Los extractos, obtenidos según se indican, se mezclaron en una proporción 5/1 con tampón de carga consistente en Tris-HCl 0.192 M pH 6.8; azul de bromofenol 0.002 % (p/v); SDS 2 % (p/v); 2-mercaptoetanol 5 % (v/v) y glicerol 10 % (v/v). Las muestras se prepararon como un pool de la misma cantidad proteínas de las 3 plantas del mismo tratamiento, se diluyeron hasta una concentración de 3 mg.ml⁻¹. Las muestras se calentaron por 15 min a 90 °C y los pocillos se cargaron con 60 µg de proteína. La electroforesis, que se realizó en una cuba Bio-Rad® (MiniProtean® II), se inició a 15 mA hasta que la muestra salió del gel concentrador y se continuó a 25 mA hasta la salida del frente de bromofenol del gel.

3.7.2 Visualización de proteínas en geles

Los geles se incubaron durante 1 h en solución de fijación y coloración consistente en reactivo de Coomassie R25 0.1 % (p/v); ácido acético 10 % (v/v) y metanol 45 % (v/v) en agua destilada. La decoloración se realizó con una solución de ácido acético 15 % (v/v) y metanol 5 % (v/v) en agua destilada durante 3 h, en agitación a 30 rpm.

3.7.3 Transferencia de proteínas a membranas (*Western blot*)

Para la transferencia de proteínas los geles se equilibraron durante 10 min en tampón de transferencia: Tris 25.0 mM y glicina 192.0 mM pH 8.3, metanol 20 %. Previamente se saturaron en el mismo tampón las membranas de nitrocelulosa, cortadas 0.5 cm más grande que el gel, y hojas de papel Whatman 1, cortadas del mismo tamaño que las esponjas y rejillas del dispositivo de electrotransferencia, que se montó según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad®). La electrotransferencia se realizó a 31 mA a 4°C durante 3 h. La transferencia de proteínas a la membrana se comprobó por tinción

con Rojo Ponceau 0.5 % (p/v) y ácido acético 1 % (v/v) hasta la aparición de las bandas, finalmente las membranas se lavaron 2 veces con agua bidestilada.

3.7.4 Inmunodetección Fd-GOGAT y GS

Para la inmunodetección de las proteínas Fd-GOGAT y GS se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-Fd-GOGAT (Agrisera, número de catálogo #AS07 242) y anti GS de cebada cedidos por el Prof. M. Betti (Facultad de Química, Universidad de Sevilla).

Las membranas se incubaron en tampón Tris-HCl 20.0 mM pH 7.5 y NaCl 500.0 mM (TBS) en agitación a 30 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Como solución de bloqueo se usó leche en polvo libre de grasa 5 % en TBS-Tween-20 0.1 % (TBST). Las membranas se incubaron en agitación a 30 rpm durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con TBST durante 5 min. Se incubaron 1h a temperatura ambiente en tampón TBST con leche en polvo libre de grasa al 1 % y solución de anticuerpo primario anti-Fd-GOGAT o anti GS (dilución 1/1000) en agitación a 30 rpm.

Las membranas se lavaron tres veces con TBST durante 5 min cada vez y se incubaron 1 h en solución TBST con leche en polvo libre de grasa 1% y el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo (Agrisera, número de catálogo #AS09 602), conjugado con HRP (1/10000). Las membranas se lavaron con TBST tres veces durante 5 min cada vez y se incubaron durante 5 min en 5 ml de solución con sustrato Clarity™, según las instrucciones del fabricante Bio-Rad®. Pasado ese tiempo se removió el líquido sobrante, las membranas se revelaron en un visualizador C-Digit®.

3.8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Las interacciones y diferencias entre los tratamientos fueron probadas utilizando un análisis de la varianza de tres vías (ANOVA).

Las diferencias entre las medias ajustadas fueron probadas mediante métodos de contraste ($P < 0.05$). Todo el análisis estadístico fue hecho en R utilizando el paquete estadístico (R Core Team, 2017). Los análisis de contraste fueron realizados utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2018).

VI. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

4.1.1 Biomasa

Las condiciones de crecimiento seleccionadas, fueron capaces de generar ambientes contrastantes en la disponibilidad de luz y N. Con el fin de determinar si los distintos tratamientos planteados afectaban diferencialmente el crecimiento de las plantas, se midió la acumulación de biomasa en la parte aérea de las mismas. La biomasa se determinó como el peso seco de las hojas a tiempo final (40 días), de esta forma se evitó la interferencia que puede generar el contenido de agua, que podrían haberse acumulado diferencialmente por efecto de los niveles de radiación. Esta precaución de expresar los valores por peso seco de material, se llevó a cabo en el resto de las mediciones.

Los cuatro cultivares, El Paso 144, Olimar, Parao y Tacuari, presentaron una mayor acumulación de biomasa en la parte aérea cuando se crecieron en una alta radiación lumínica y dosis de N alta (AL_NA) (Figura 2). Estas diferencias, fueron significativas en comparación al resto de los tratamientos establecidos para El Paso 144, Olimar y Tacuari. Para Parao la diferencia de biomasa del tratamiento AL_NA con los tratamientos de baja radiación y dosis alta de N (BL_NA) y alta radiación y dosis de N control (AL_NC), no llegó a ser estadísticamente significativa (Figura 2).

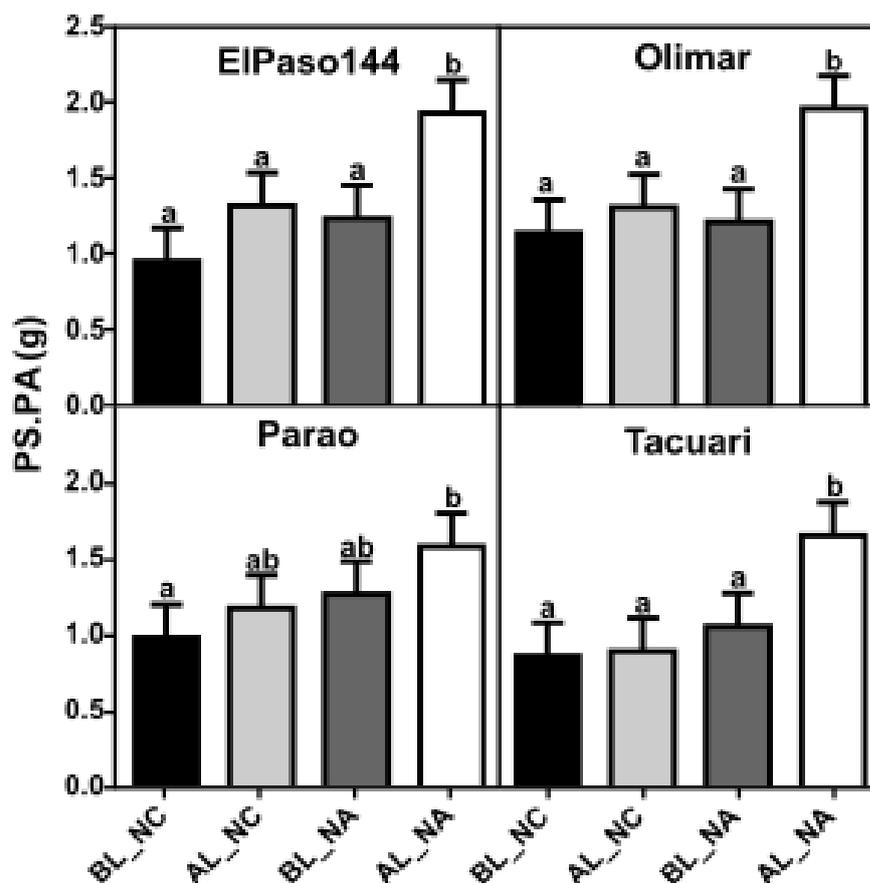


Figura 2. Biomasa expresada como el peso seco de la parte aérea en g (PS.PA (g)) para los cuatro cultivares en los tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.1.2 Porcentaje de C y N

Las condiciones contrastantes en la disponibilidad de N y radiación permiten analizar el impacto de los tratamientos sobre ambos elementos. En este sentido con el fin de determinar si los distintos tratamientos afectaban a la cantidad relativa de estos elementos, se midió el porcentaje de N y C por peso en la parte aérea de las plantas. El análisis de la composición de C y N de la parte aérea de las plantas se muestra en la Tabla 3. El N % que contenían las plantas fue dependiente de la dosis de N en que se cultivaron. Las plantas cultivadas en dosis altas de N (NA), tuvieron significativamente más N % que las crecidas en dosis control de N (NC). La radiación influyó en forma similar a la dosis de N en la acumulación de este elemento. Cuando

la radiación fue alta (AL) las plantas acumulan más N en comparación a las cultivadas en baja radiación (BL) (Tabla 3).

Cuando se analizó el C % se encontró que existe una respuesta similar en los cuatro cultivares al tratamiento de baja luz y nitrógeno alto (BL_NA). En este tratamiento las plantas acumularon más C en comparación al resto de los tratamientos. El C % en este tratamiento, fue significativamente mayor en los cultivares El Paso 144, Olimar y Tacuri (Tabla 3). En el caso de Parao, no se observaron diferencias en el C % entre los tratamientos.

Tabla 3. *Porcentaje de nitrógeno (N %) y carbono (C %) en la parte aérea de plantas de los cuatro cultivares en los cuatro tratamientos.*

	Tratamiento	El Paso 144	Olimar	Parao	Tacuari
N %	BL_NC	2.1 a	1.7 a	2.4 a	2.0 a
	AL_NC	2.8 b	2.6 b	2.8 a	3.2 b
	BL_NA	3.4 c	3.4 c	3.5 b	4.0 c
	AL_NA	4.2 d	3.7 c	4.5 c	4.4 c
C %	BL_NC	37.7 ab	37.1 ab	37.6 a	37.0 ab
	AL_NC	36.4 a	36.4 a	37.1 a	36.3 a
	BL_NA	38.5 b	39.4 c	38.4 a	38.8 b
	AL_NA	37.3 ab	38.4 bc	37.9 a	36.9 a

4.1.3 Relación C/N

La relación C/N es otra forma de analizar la relación entre la radiación y la dosis de N. Los resultados mostrados en la Tabla 3, muestran claramente el efecto de los tratamientos en la acumulación de C y N.

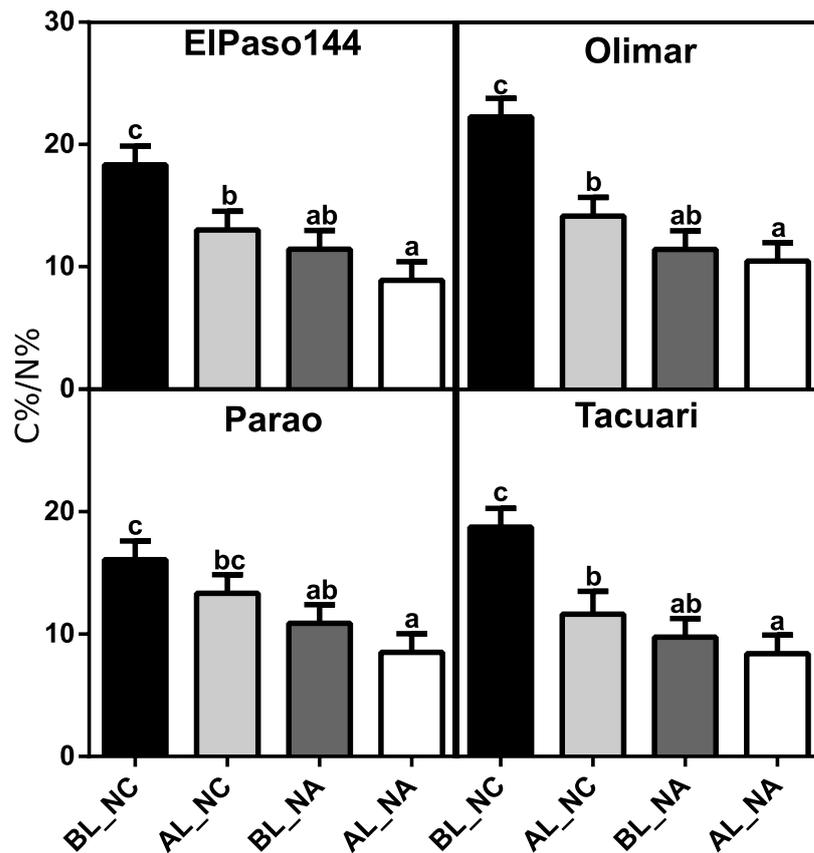


Figura 3. Relación de los porcentajes de C y N de los cuatro cultivares en los distintos tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

En la figura 3 se observa que una dosis alta de N (NA) provocó una disminución de la relación C/N en los 4 cultivares independientemente del nivel de radiación a la cual crecieron. Sin embargo, puede observarse también que la radiación afectó la relación C/N ya que si comparamos las plantas cultivadas en una misma dosis de N (tratamientos NC o NA), vemos que, al aumentar la radiación (tratamiento AL), disminuye la relación C/N.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS

4.2.1 Fotosíntesis neta

Con el objetivo de comprender el origen de la diferencia en biomasa observada previamente, se analizó la fotosíntesis neta de las plantas. En este sentido una mayor tasa de fijación de carbono significaría más poder reductor y esqueletos carbonados para asimilar N. El análisis de la tasa de fijación de CO₂, mostró que la radiación fue fundamental para un aumento en este proceso. Los 4 cultivares mostraron una mayor fotosíntesis en los tratamientos de alta radiación (AL) (Tabla 4). Por otro lado, la dosis de N en la que crecieron las plantas también afectó la tasa de fijación. Esto se observa al comparar las plantas crecidas en la misma radiación con diferente dosis de N, así las plantas que crecieron en una dosis alta de N (NA) siempre tuvieron una mayor tasa fotosintética (Tabla 4).

Tabla 4. *Fotosíntesis neta*

	Tratamiento	El Paso 144	Olimar	Parao	Tacuari
Fotosíntesis	BL_NC	9.3 a	7.7 a	6.2 a	6.2 a
Neta	BL_NA	10.4 ab	9.6 a	11.9 ab	11.5 ab
($\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	AL_NC	14.4 ab	10.5 a	14.6 b	16.1 bc
	AL_NA	16.1 b	19.8 b	18.3 b	20.2 c

Fotosíntesis neta expresada en μmoles de CO₂ consumidos por área de hoja (m^{-2}) por segundo (s^{-1}), para los cuatro cultivares en los tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.2.2 Fluorescencia de clorofilas

Simultáneamente al análisis de la fijación de CO₂, se determinaron los parámetros relacionados al funcionamiento del Fotosistema II. Esto nos permitió evaluar la fase fotoquímica de la fotosíntesis y ver si ésta era afectada por alguno de los tratamientos.

La comparación de los parámetros medidos en los 4 tratamientos, mostró que ninguno

de los 4 cultivares presentó diferencias significativas. Sin embargo, es posible una tendencia (no estadísticamente significativo) sobre el rendimiento del Fotosistema II (ϕ .PSII). La mayoría de los cultivares tuvieron un mayor ϕ .PSII en el tratamiento de alta luz y alto nitrógeno (AL_NA) (Tabla 5). Lo contrario se observa en el quenching no fotoquímico (ϕ .NPQ), siendo menor la disipación de energía en el tratamiento AL_NA (Tabla 5).

Tabla 5. *Parámetros relacionados al funcionamiento del Fotosistema II*

	Tratamiento	El Paso 144	Olimar	Parao	Tacuari
ϕ .PSII	BL_NC	0.35 a	0.35 a	0.32 a	0.28 a
	BL_NA	0.24 a	0.24 a	0.31 a	0.35 a
	AL_NC	0.29 a	0.32 a	0.34 a	0.37 a
	AL_NA	0.36 a	0.34 a	0.37 a	0.38 a
ϕ .NPQ	BL_NC	0.46 a	0.47 a	0.53 a	0.49 a
	BL_NA	0.48 a	0.49 a	0.49 a	0.47 a
	AL_NC	0.49 a	0.50 a	0.46 a	0.42 a
	AL_NA	0.37 a	0.44 a	0.42 a	0.40 a
ϕ .NO	BL_NC	0.19 a	0.18 a	0.14 a	0.22 a
	BL_NA	0.27 a	0.27 a	0.20 a	0.18 a
	AL_NC	0.22 a	0.21 a	0.19 a	0.21 a
	AL_NA	0.27 a	0.22 a	0.21 a	0.21 a

Los parámetros del fotosistema II son expresados en unidades arbitrarias. ϕ .PSII es el rendimiento del Fotosistema II, ϕ .NPQ es el rendimiento del quenching no fotoquímico y ϕ .NO es el rendimiento de otras pérdidas no fotoquímicas. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.2.3 Pigmentos Fotosintéticos

Otra forma de evaluar la estructura y rendimiento potencial del aparato fotosintético, es mediante la cuantificación de clorofilas y otros pigmentos fotosintéticos. Las clorofilas forman parte de los complejos antena y centros de reacción en los fotosistemas. Cambios en el contenido de clorofilas se traducen en modificaciones en

el aparato fotosintético, más pigmentos significan más captación de energía lumínica y esta captación más poder reductor y energía.

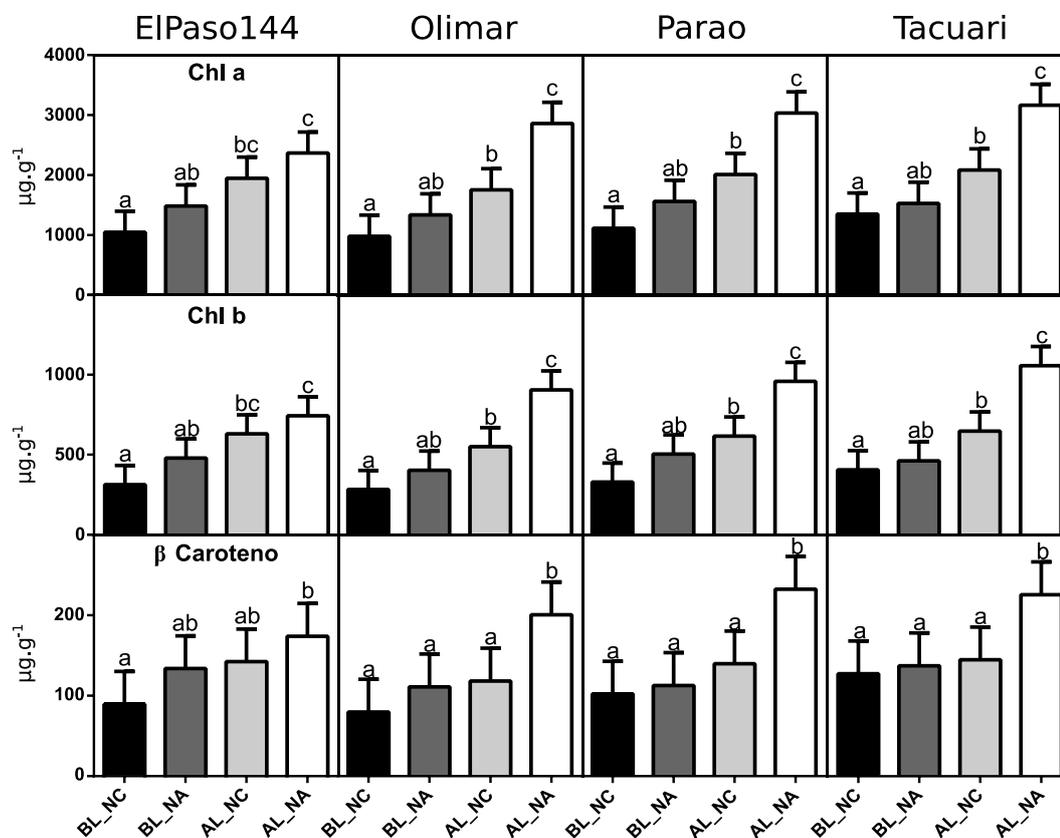


Figura 4. Pigmentos fotosintéticos clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y β-Caroteno expresados como microgramos de pigmento por peso seco de parte aérea (μg.g⁻¹). Para los cuatro cultivares en los tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

Este análisis mostró que la radiación es el principal factor en aumentar el contenido de los pigmentos fotosintéticos. En la figura 4 se observa como las plantas crecidas en alta radiación, tuvieron una mayor cantidad de clorofilas a, b y β-Caroteno.

Además, la dosis de N en la que crecieron las plantas también incide en la cantidad de estos pigmentos, siendo significativamente mayor la concentración de estos tres pigmentos en el tratamiento de alta radiación y alta dosis de nitrógeno (AL_NA) (figura 4).

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES DE HOJA

4.3.1 RuBisCO

Con el fin de analizar si existían diferencias en las proteínas acumuladas por las plantas crecidas en los diferentes ambientes, se extrajeron las proteínas solubles de las hojas de las plantas y se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Los perfiles de proteínas que se observan en la figura 5 no parecen tener diferencias entre ellos, salvo en la región cercana a los 55 kDa. Por la cantidad de proteína que se observa en esa banda y el peso de esta, se pudo inferir que la misma corresponde a la subunidad mayor de la RuBisCO. Los cuatro cultivares presentaron perfiles de proteínas similares cuando se compararon dentro de los mismos tratamientos. El grosor e intensidad de las bandas de 55 kDa (correspondiente a la RuBisCO) en los perfiles de plantas crecidas en dosis altas de N (NA), fue mayor que el de plantas crecidas en dosis control de N (NC). Sin embargo, la radiación como factor ambiental no modificó la cantidad de RubisCO. No se visualizaron cambios evidentes en esta banda en los 4 cultivares, cuando se comparó una misma dosis de N en plantas crecidas en radiaciones contrastantes (Figura 5).

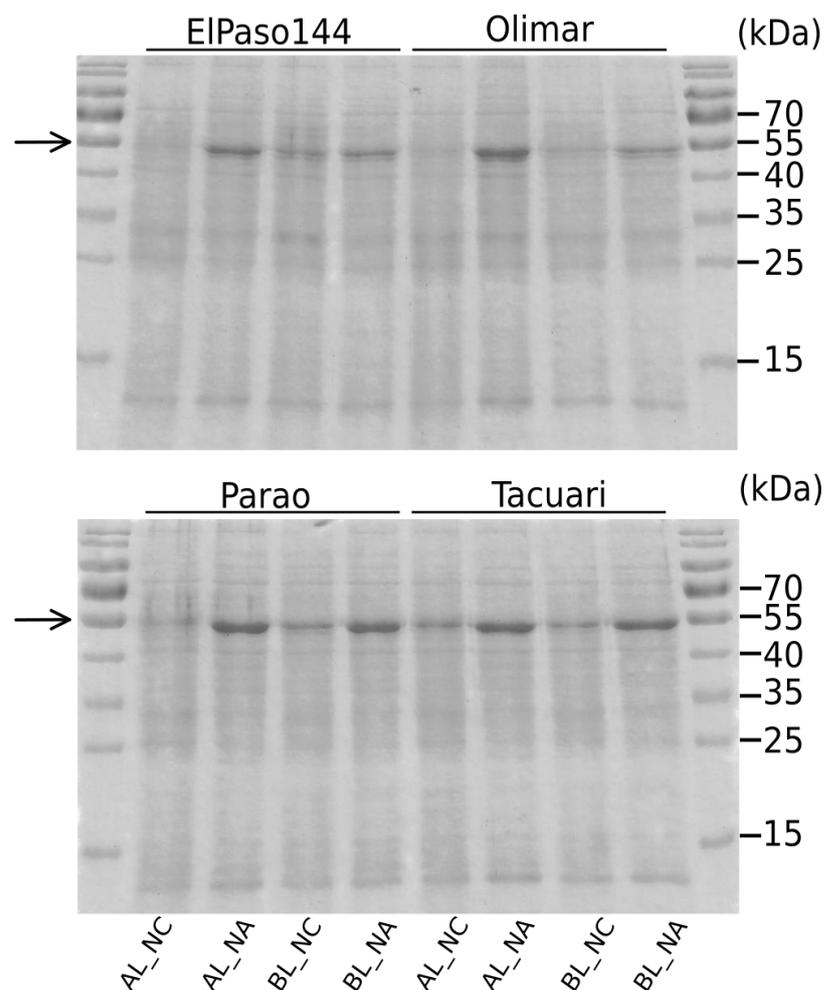


Figura 5. Perfil de proteínas solubles. Geles de poliacrilamida al 12 % donde cada carril es un perfil de proteínas, teñidas con azul de Coomassie de cada cultivar en cada tratamiento. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA).

4.3.2 Cuantificación de proteínas en hojas

Los extractos utilizados para los perfiles de proteínas, fueron cuantificados en relación al peso seco de la muestra de donde se extrajeron. Las proteínas son uno de los principales destinos del N asimilado, debido a esto se analizó su concentración en respuesta a los tratamientos. La concentración de proteínas de los cuatro cultivares cambió en respuesta a la dosis de N con que crecieron las plantas. Las plantas crecidas en dosis altas de N (NA) acumularon significativamente más proteína que las crecidas en dosis control de N (NC) (Figura 6). A diferencia de la dosis de N, la radiación no afectó significativamente la concentración de proteínas en las hojas de las plantas.

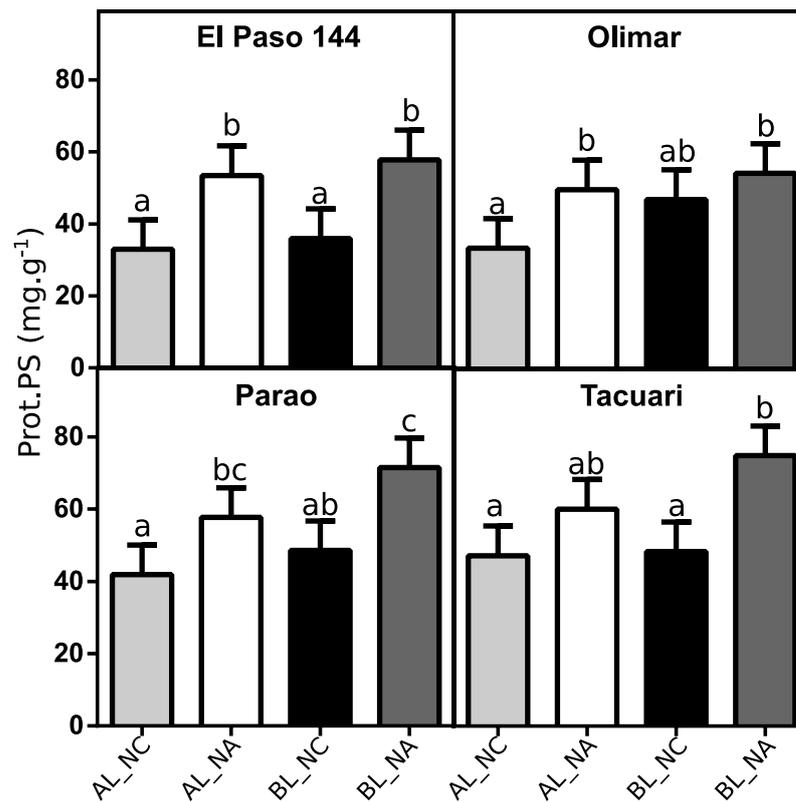


Figura 6. Proteínas solubles de los cuatro cultivares en los tratamientos, expresadas como mg de proteína por g de pesos seco de hoja. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.4 ASIMILACIÓN PRIMARIA DEL NITRÓGENO

4.4.1 Acumulación de NH₄⁺ y NO₃⁻

Para analizar si los distintos tratamientos afectan la absorción de N, se cuantificó el contenido de NO₃⁻ y NH₄⁺ en las hojas de las plantas. En el caso del NH₄⁺, la concentración no fue detectable por el método utilizado en ninguna de las muestras.

El límite de detección del método es 2 μM , por lo que se estima que las hojas tuvieron concentraciones menores a límite en todos los tratamientos y cultivares.

El NO_3^- cuantificado sí fue detectable y se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento de alta radiación y alta dosis de N (AL_NA), provocó que todos los cultivares acumularan significativamente más NO_3^- (Figura 7).

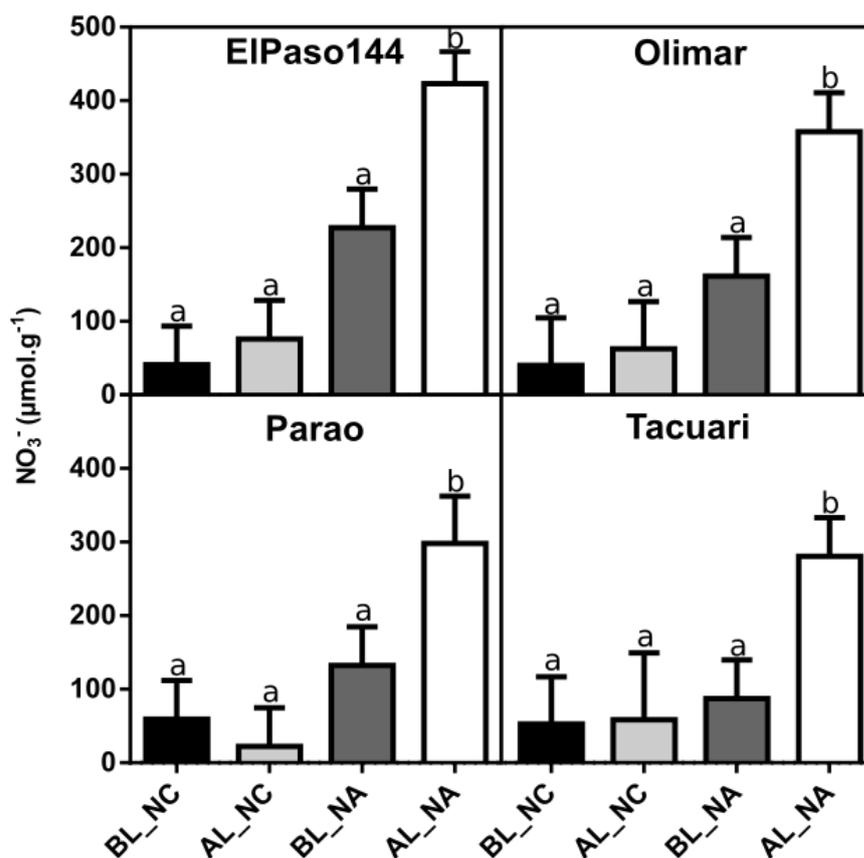


Figura 7. Nitrato almacenado en las hojas de los cuatro cultivares en los cuatro tratamientos, expresado como μmol por g de pesos seco. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.4.2 Actividad GS y NR

La actividad de las enzimas encargadas de la asimilación del N se determinó en las hojas de las plantas. Para ellos, se midió la actividad de la glutamina sintetasa (GS),

enzima encargada de la asimilación primaria y secundaria del NH_4^+ . Luego, en los mismos extractos se midió la actividad nitrato reductasa (NR), enzima encargada de la asimilación de NO_3^- . La actividad de la GS no se modificó por la radiación o dosis de N en la que crecieron las plantas. Ninguno de los cultivares presentó diferencias significativas en la actividad de la GS entre los distintos tratamientos (Tabla 6). En el caso de la actividad de la NR, el tratamiento de baja radiación y dosis de nitrógeno control (BL_NC) aumentó la actividad para 2 cultivares. La actividad en este tratamiento fue significativamente mayor en los cultivares El Paso 144 y Olimar (Tabla 6).

Tabla 6. *Actividades enzimáticas de GS y NR*

	Tratamiento	El Paso 144	Olimar	Parao	Tacuari
GS	BL_NC	106 a	65 a	117 a	68 a
	AL_NC	145 a	47 a	151 a	54 a
	BL_NA	81 a	36 a	127 a	31 a
	AL_NA	101 a	35 a	93 a	49 a
			0.036		
NR	BL_NC	0.048 b	b	0.005 a	0.013 a
	AL_NC	0.025 a	0.019 a	0.008 a	0.011 a
	BL_NA	0.035 a	0.022 a	0.010 a	0.014 a
	AL_NA	0.031 a	0.023 a	0.011 a	0.022 a

Actividad de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y nitrato reductasa (NR) de las hojas de las plantas, expresada como unidades de actividad por mg de proteína ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.4.3 Discriminación isotópica de N

En condiciones de nutrición nitrogenada controlada, la discriminación isotópica brinda información sobre la asimilación y flujo de N en las plantas. El análisis de los isótopos de N, se basa en el principio que algunas enzimas prefieren utilizar el isótopo más liviano de N (^{14}N) (Kalcsits & Guy, 2013). En las plantas se identificaron a la GS y la

NR como principales responsables en discriminar a favor del isótopo ^{14}N , aunque se supone que existen otros pasos en los que se da la discriminación a favor de este isótopo (Kalcsits, Buschhaus, & Guy, 2014). La forma de expresar los datos de la discriminación isotópica es basada en el valor $\delta^{15}\text{N}$, así si este valor es mayor a 0 significa que se tiene una cantidad mayor que el estándar (contenido de ^{15}N en el aire) de ^{15}N . Contrariamente si se tienen valores menores a 0, la cantidad de ^{15}N en la muestra es menor que la cantidad de ^{15}N del aire (Kalcsits & Guy, 2013). Una mayor cantidad de ^{15}N en plantas crecidas con la misma fuente y dosis de N, significa que estas necesitaron más N y discriminaron menos.

Debido a que las plantas asimilan el N mayoritariamente en la raíz y gran parte del N asimilado termina en las hojas, se decidió medir la discriminación isotópica en las hojas de las plantas en los distintos tratamientos. Los 4 cultivares tuvieron un $\delta^{15}\text{N}$ significativamente mayor en las plantas crecidas en radiación alta y dosis control de N (AL_NC), en comparación a las plantas crecidas en baja radiación (BL) (Figura 8). En el caso del tratamiento de alta radiación y alta dosis de N (AL_NA), los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de Parao y Tacuarí fueron significativamente menores en comparación al tratamiento AL_NC (Figura 8). Además, en el cultivar Tacuari existieron diferencias significativas en el valor $\delta^{15}\text{N}$ entre los tratamientos de BL, siendo menor en las plantas crecidas en dosis altas de N (BL_NA) (Figura 8).

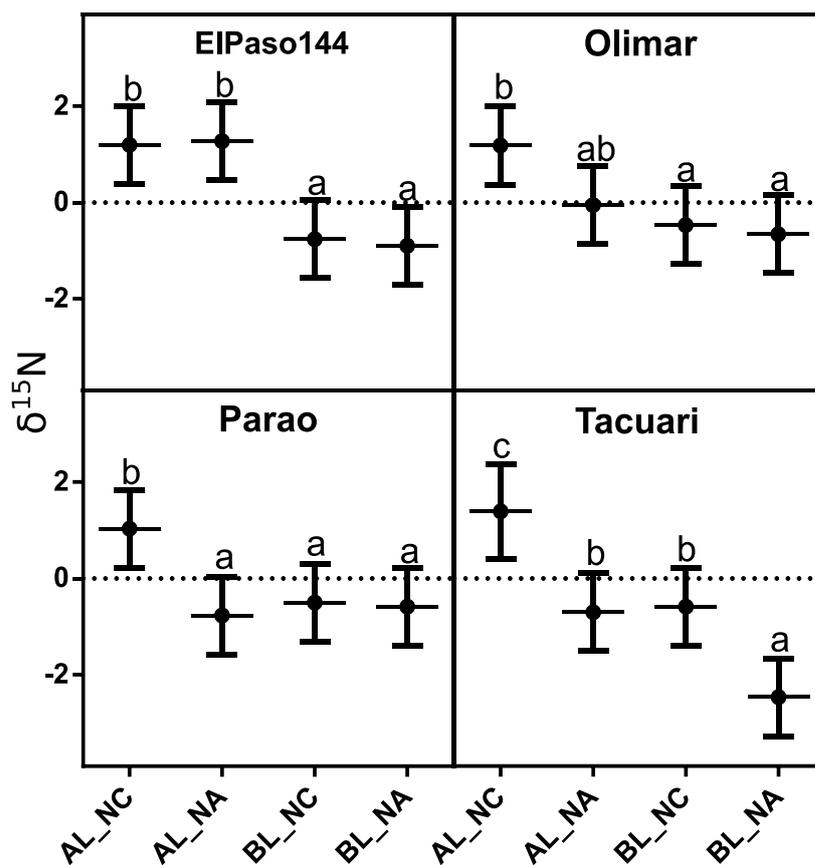


Figura 8. Relación isotópica del ^{15}N por ^{14}N de las hojas de los cuatro cultivares en los tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.5 METABOLISMO AMINOACÍDICO

4.5.1 Aminoácidos totales

Los aminoácidos funcionan como el medio de transporte del N asimilado en las raíces hacia las hojas. Además de su función de transporte, los aminoácidos tienen como principal destino las biomoléculas a las que se destina la mayor parte del N asimilado: las proteínas.

Se midió el contenido total de los aminoácidos en las hojas de las plantas crecidas en los distintos tratamientos, con el objetivo de analizar la disponibilidad de estos para la síntesis de proteínas.

La concentración de aminoácidos en las hojas, depende principalmente de la radiación lumínica en la que crecen las plantas. Las plantas crecidas en baja radiación (BL) son la que presentaron significativamente una mayor cantidad de aminoácidos (Tabla 6). En el caso de las plantas crecidas en alta radiación (AL), el N resulta un factor que determina la cantidad de aminoácidos en las hojas. Los cultivares: El Paso 144, Olimar y Tacuari presentaron significativamente más cantidad de aminoácidos, en la condición de alta dosis de N (NA) en comparación a las plantas crecidas en dosis control de N (NC) (Tabla6).

Tabla 7. *Aminoácidos totales solubles*

	Tratamiento	El Paso 144	Olimar	Parao	Tacuari
AA.PS	AL_NC	93 a	87 a	76 a	85 a
	AL_NA	141 b	122 b	105 a	130 b
	BL_NC	177 c	145 bc	131 bc	141 b
	BL_NA	178 c	163 c	142 c	160 b

Aminoácidos solubles expresados como micromoles por gramo de peso seco de las hojas, para los cuatro cultivares en los tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.5.2 Relación de Aminoácidos de transporte

Se realizó un análisis de la composición de los aminoácidos previamente extraídos y cuantificados, para conocer si los tratamientos modifican las cantidades relativas de determinados aminoácidos. Diferencias en las cantidades relativas de algún aminoácido, puede sugerir que la vía de síntesis de ese aminoácido esta favorecida por alguna de las condiciones de crecimiento. Este análisis se enfocó en cuantificar los principales aminoácidos sintetizados en la asimilación y aminoácidos de transporte. La diferencia entre los aminoácidos soluble totales de los tratamientos de alta y baja radiación, determinó que las comparaciones de aminoácidos por peso seco tuvieran la misma diferencia que para los aminoácidos totales. Debido a que esto dificulta el

análisis del comportamiento particular de algunos aminoácidos, se decidió entonces medir la cantidad de asparagina (Asn) y glutamina (Gln) con respecto a la cantidad de los aminoácidos precursores, aspartato (Asp) y glutamato (Glu) respectivamente.

En el caso de la relación Gln/Glu, existió la misma respuesta a la radiación y dosis de N en la que crecieron las plantas en los 4 cultivares. Los cultivares presentaron una relación Gln/Glu significativamente mayor en el tratamiento de baja radiación y dosis control de N (BL_NC) (Figura 9). En las restantes condiciones de crecimiento, no existieron diferencia en la relación Gln/Glu (Figura 9).

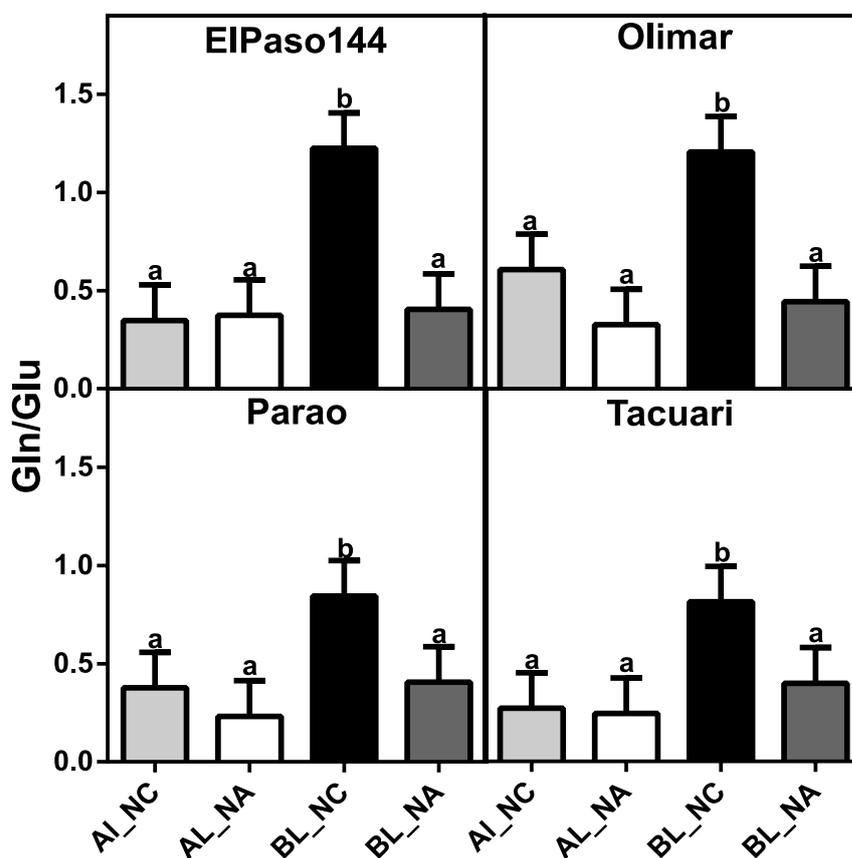


Figura 9. Relación entre la cantidad de glutamina (Gln) y glutamato (Glu) en las hojas de los cuatro cultivares en los tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

La relación Asn/Asp mostró diferencias en las respuestas de los cultivares a los tratamientos. Para El paso 144 y Olimar, la radiación y la dosis de N en la que crecieron las plantas determinó la cantidad de Asn con respecto al Asp. Los tratamientos de baja (BL) y alta radiación con alta dosis de N (AL_NA) provocaron un aumento significativo de la relación Asn/Asp en comparación con el tratamiento de alta radiación y dosis control de N (BL_NC) (Figura 10).

En el caso de Parao solo el tratamiento BL_NC generó diferencias significativas en la relación Asn/Asp, en el caso de Tacuari ninguno de los tratamientos afectó la relación Asn/Asp (Figura 10).

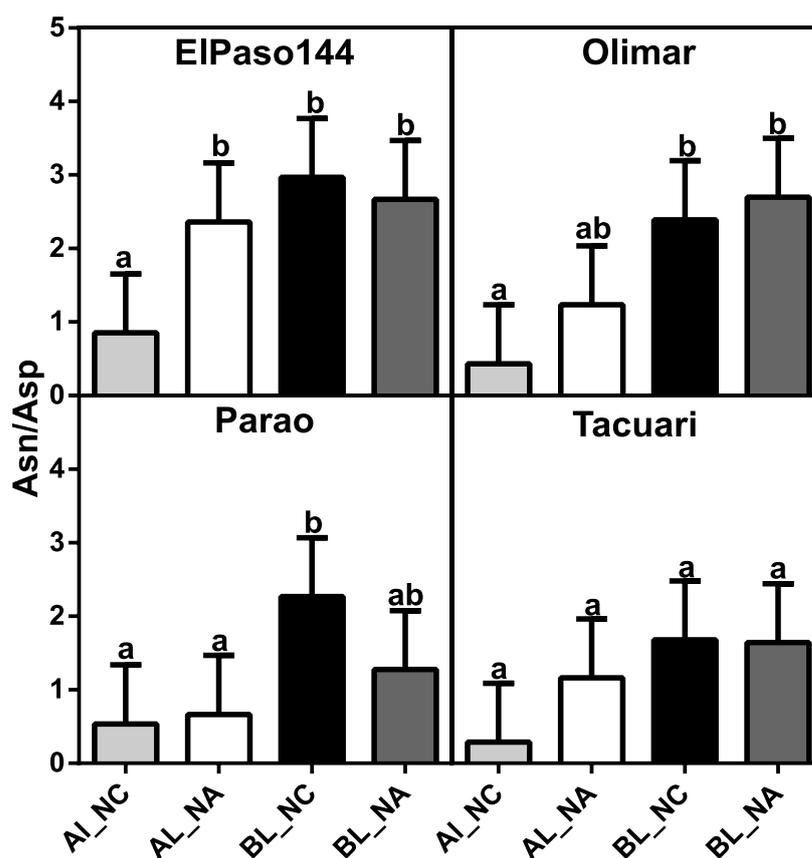


Figura 10. Relación entre la cantidad de asparagina (Asn) y aspartato (Asp) en las hojas de los cuatro cultivares en los tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.5.3 Otros aminoácidos de interés

Además de los aminoácidos relacionados con el transporte de N, se analizaron otros aminoácidos que podrían ser sintetizados y acumulados diferencialmente por las plantas crecidas en los distintos ambientes.

Los aminoácidos alanina (Ala) y arginina (Arg), fueron elegidos por ser posible moléculas de almacenamiento de N. La Arg es un aminoácido que posee 4 grupos amino, esto lo hace un buen candidato como molécula para almacenar el N asimilado. En cuanto a la Ala, se ha visto asociada la sobre expresión de la enzima que lo sintetiza y la EUN en arroz (Shrawat et al., 2008).

La serina (Ser) y la glicina (Gly) son aminoácidos que se sintetizan en condiciones de alta fotorrespiración (Busch, Sage, & Farquhar, 2018). Dado que la radiación es un factor ambiental que puede modificar este proceso se decidió analizar también el contenido de estos dos aminoácidos.

Tabla 8. Otros *aminoácidos de interés*

	Tratamiento	El Paso 144	Olimar	Parao	Tacuari
Arginina	BL_NC	4.5 a	2.6 a	2.0 a	5.3 a
	BL_NA	5.5 a	2.1 a	2.1 a	4.0 a
	AL_NC	10.0 b	2.1 a	2.2 a	7.8 b
	AL_NA	5.0 a	1.6 a	1.9 a	4.7 a
Glicina	BL_NC	9.4 ab	4.7 a	9.1 a	15.1 c
	BL_NA	8.3 a	5.2 a	9.8 a	10.6 b
	AL_NC	12.9 b	9.2 b	9.1 a	6.5 a
	AL_NA	6.8 a	7.9 ab	6.8 a	6.1 a
Serina	BL_NC	10.6 a	7.8 a	9.1 a	9.1 a
	BL_NA	8.5 a	6.6 a	9.8 a	8.7 a
	AL_NC	14.8 b	6.1 a	9.3 a	21.6 b
	AL_NA	9.4 a	5.0 a	8.3 a	10.2 a

Aminoácidos expresados como porcentaje de los aminoácidos totales en las hojas de los cuatro cultivares en los tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

En la tabla 7 se muestran los resultados de la Arg, Gly y Ser. Para la Arg solamente El Paso 144 y Tacuari, mostraron un aumento significativo en su cantidad en respuesta al tratamiento alta radiación y dosis control de N (AL_NC). En el caso de la Gly los resultados fueron dependientes del cultivar, para El Paso 144 y Olimar se registró un aumento significativo en el tratamiento AL_NC. En el caso de Tacuri, los tratamientos de baja radiación (BL) mostraron una mayor acumulación de Gly. Para la Ser los cultivares El Paso 144 y Tacuari acumularon significativamente más en el tratamiento AL_NC.

Es importante recalcar que la Ala representó cantidades menores a un 0.5% de los aminoácidos totales en los extractos realizados (resultados no mostrados).

4.5.4 GABA

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido no proteico, que en animales tiene la función de neurotransmisor, entre otras. En las plantas se descubrió hace más de cien años, pero siempre fue considerado un metabolito más que aumentaba su concentración en ciertas condiciones de estrés. En el último tiempo se ha visto que puede tener actividad como una molécula señal relacionada con el balance entre el C y el N (Ramesh, Tyerman, Gilliam, & Xu, 2017). El análisis del GABA se realizó por diferencias entre los cromatogramas, de los distintos tratamientos al tiempo 29.8 minutos. El pico en ese tiempo correspondió al tiempo de retención del estándar de GABA, en la figura 11 se muestra cuanto representa el GABA en los aminoácidos totales.

Los cuatro cultivares presentaron una acumulación significativamente mayor de GABA en relación a los aminoácidos totales, en el tratamiento de alta radiación y dosis

de N control (AL_NC). Además, los cultivares Parao y Tacuari, acumularon significativamente menos GABA en relación a los aminoácidos totales en el tratamiento de alta radiación y alta dosis de N (AL_NA) (Figura 11).

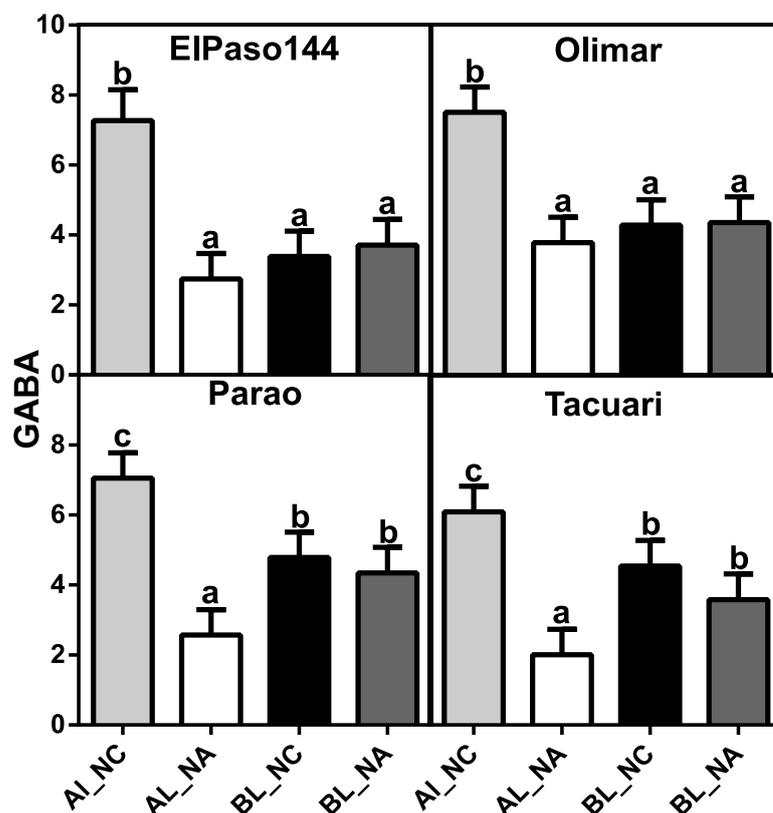


Figura 11. Porcentaje de ácido γ -aminobutírico (GABA) presente en los aminoácidos totales, en las hojas de los cuatro cultivares en los tratamientos. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA). Las comparaciones estadísticas son dentro de cada cultivar.

4.5.5 Análisis del contenido de GS y Fd-GOGAT

El ciclo GS-GOGAT es la vía de asimilación primaria de N, factores como la dosis de N y radiación en la que crecen las plantas podrían regular esta vía. Además, los resultados obtenidos en la relación Gln/Glu obtenidos previamente, hicieron suponer que alguna de las enzimas involucradas en la síntesis de estos aminoácidos estuviera en mayor cantidad. En este sentido, se realizaron análisis de *Western blots* para

determinar si existían diferencias, en la cantidad de GS y Fd-GOGAT en respuesta a los tratamientos.

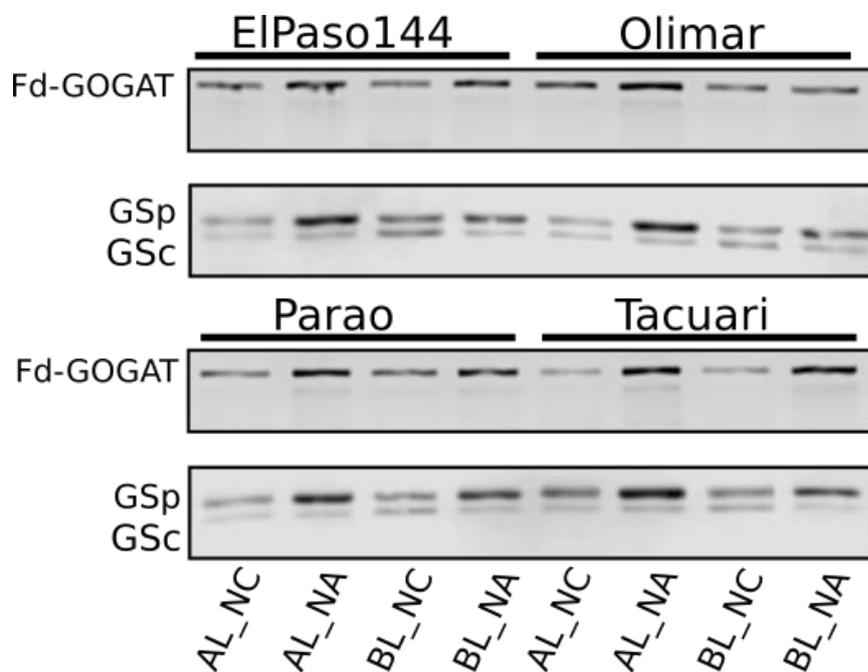


Figura 12. Western blots de Ferredoxin-GOGAT (Fd-GOGAT), GS plastídica (GSp) y GS citosólica (GSc) de los cultivares El Paso 144, Olimar, Parao y Tacuarí en los distintos tratamientos de intensidad de luz y concentración de nitrógeno. Alta Luz Nitrógeno Control (AL_NC), Alta Luz Nitrógeno Alto (AL_NA), Baja Luz Nitrógeno Control (BL_NC), Baja Luz Nitrógeno Alto (BL_NA).

La cantidad de Fd-GOGAT se vio afectada por la dosis de N en la que crecen las plantas. Las plantas crecidas en las dosis altas de N (NA), presentaron una mayor cantidad de Fd-GOGAT independientemente del cultivar (Figura 12).

Los *Western blot* de GS permitieron identificar las dos isoformas de esta enzima, la plastídica (GSp) y la citosólica (GSc). Los tratamientos con dosis altas de N (NA) provocaron un aumento de la cantidad de GSp en comparación a la GSc. Además, el tratamiento de alta radiación y alto N (AL_NA) parece generar más cantidad de GSp en comparación al tratamiento de baja radiación (BL_NA) (Figura 12).

V. DISCUSIÓN

Los cultivares utilizados en los ensayos, El Paso 144, Olimar, y Tacuari, fueron seleccionados, en base a su importancia productiva y considerado las dos subespecie (Ministerio de Ganadería, 2016). Indica y japónica son las subespecies principales del arroz cultivado, varios estudios han reportado diferencias entre estas subespecies en diferentes etapas del desarrollo, rendimientos y respuestas a diferentes condiciones (Otoo & Osada, 1984; Weng & Chen, 1987; Yang, Zhu, Xia, Chen, & Chen, 2014; Chatterjee, Huma, Shaw, & Kundu, 2017). En base a los antecedentes se esperaban diferencias en la biomasa acumulada, entre las subespecies japónica (Parao y Tacuari) e indica (El Paso 144 y Olimar) (Quero et al., 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos (Figura 2) mostraron que, en las condiciones experimentales planteadas, no existen diferencias entre los cultivares en la biomasa acumulada. Este resultado puede deberse al diseño experimental, debido a que se utilizó el menor número posible de repeticiones para un análisis completamente al azar ($n = 3$). Otra explicación puede ser el tiempo de crecimiento elegido, quizás un tiempo final mayor permita lograr diferencias significativas en la biomasa que acumulan los cultivares.

La información de la acumulación de biomasa (Figura 2) en los cuatro cultivares mostró una respuesta similar a todas las condiciones de crecimiento planteadas. El tratamiento de alta radiación y dosis de N alta (AL_NA) llevó a un aumento significativo de la biomasa acumulada en los cuatro cultivares en comparación a los otros tratamientos. Este resultado evidencia la interacción positiva que existe entre la dosis de N y la radiación en las condiciones experimentales de crecimiento, confirmado la hipótesis planteada previamente. Esta interacción sinérgica entre la

radiación alta y fertilización nitrogenada, también ha sido observada para el arroz salvaje (Sims, Pastor, Lee, & Dewey, 2012).

La mayor biomasa acumulada por las plantas en el tratamiento AL_NA estuvo acompañada por una disminución en la relación C%/N% (Figura 3), para los 4 cultivares. Esta disminución en la relación C%/N% se explica por un aumento significativo en el N% para las plantas que crecieron en dosis altas de N (NA) (Tabla 3). La dosis de N en la que crecen las plantas es el principal factor que determina el N %, en este sentido las plantas que crecieron en NA presentaron significativamente un mayor N % en comparación con las crecidas en dosis de N control (NC).

La correlación entre una mayor fertilización de N y un aumento en el N % en las hojas de arroz, fue observada a campo por Lee, Yang, Chang, & Shen (2011), donde el N % presente en la parte aérea de las plantas aumentó de forma lineal con el aumento de la dosis de N.

Por otro lado, las plantas crecidas en la condición AL_NA que acumularon mayor biomasa y tuvieron una mayor acumulación de N %, y fueron las que presentaron una mayor tasa de fijación de CO₂ en comparación con los otros tratamientos (Tabla 4). Experimentos en altas concentraciones de CO₂, han demostrado un aumento en la fotosíntesis de plantas con metabolismo C₃ en condiciones de alto N, lo que genera un aumento en la biomasa de las plantas bajo condiciones nutricionales no limitantes (Kirschbaum, 2011). Este resultado era esperable ya que la radiación a la que se evaluó la fijación de CO₂ de estas plantas fue mayor (1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$) a la de las plantas crecidas en baja radiación lumínica (850 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$). La intensidad de la luz que incide en la planta y la fotosíntesis tienen correlación positiva, un aumento en la intensidad de la luz genera un aumento de la fijación de CO₂ en plantas de arroz (Ambavaram et al., 2014).

Además del efecto radiación sobre la fotosíntesis, existe una influencia del N en las plantas, ya que ante una misma radiación las plantas que crecieron en dosis altas de nitrógeno tuvieron una mayor tasa de fijación de CO₂ (Tabla 4). La fotosíntesis y el N presente en las hojas en las plantas tienen una alta correlación positiva, debido a que el N presente en las hojas es destinado mayoritariamente a los cloroplastos. Esta relación muestra que un aumento en el contenido N en las hojas genera un aumento en la capacidad fotosintética (Makino, 2003). Esto se corresponde con los resultados obtenidos, ya que las plantas crecidas en dosis altas de N (NA) mostraron un mayor contenido de N de la parte aérea (Tabla 3).

Al evaluar el proceso fotoquímico de la fotosíntesis mediante la fluorescencia de clorofilas, reflejo de la maquinaria proteica de los fotosistemas, no se obtuvieron resultados concluyentes. Esto puede deberse a un bajo número de repeticiones como ya se mencionó para los resultados de biomasa. Otro inconveniente puede ser el diseño del *script* utilizado, que contenía como la luz actínica una intensidad de 778 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$. Quizás en las plantas que crecieron en una alta intensidad lumínica (AL), se haya subestimado la capacidad de transferencia de e⁻ en esas plantas. Para confirmar esto se tendría que medir con una luz actínica con intensidad similar a la intensidad lumínica en la que crecieron las plantas (1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$).

Al analizar el contenido de los pigmentos fotosintéticos (Figura 4), los tres pigmentos cuantificados muestran una concentración significativamente mayor en el tratamiento de AL_NA para los cuatro cultivares. Como se mencionó previamente, en este tratamiento es donde los cuatro cultivares registraron una mayor tasa fotosintética.

La clorofila a y b son componentes principales del aparato fotosintético. La clorofila a es indispensable en el proceso fotoquímico, mientras que la clorofila b es necesaria para estabilizar los complejos antena (Tanaka & Tanaka, 2011). Desde hace mucho

tiempo se sabe que las clorofilas son un factor interno que incide en la tasa fotosintética, un aumento en las clorofilas resulta en un aumento en la tasa de fijación de CO₂ (Emerson, 1929)

En arroz la relación entre un aumento en la cantidad de pigmentos fotosintéticos y un aumento en la tasa fotosintética ha sido demostrada tanto para cultivares del tipo japónicas como indicas. Además, en este mismo trabajo se observó que el aumento de pigmentos fotosintéticos aumenta el rendimiento cuántico máximo del PSII (Kumagai, Araki, & Kubota, 2009)

Sin embargo, algunos estudios recientes en un mutante de arroz de hojas verde claro pálido muestran que la relación entre los pigmentos y la fotosíntesis no es tan clara. El mutante tiene una cantidad de pigmentos menor que el control, pero tiene una mayor tasa de fijación de CO₂ (Gu et al., 2017 a; Gu et al., 2017 b). Otro experimento mostró lo contrario en un mutante con un fenotipo de hoja amarilla-verde claro, en este mutante la concentración de pigmentos era menor resultando en un menor rendimiento cuántico del PSII y una menor tasa fotosintética (Wang, Huang, & Quan, 2017).

El otro componente del proceso fotosintético que se analizó fue la cantidad de RuBisCO. Este análisis mostró cantidades mayores de la subunidad mayor en los tratamientos de las plantas crecidas en dosis de N altas (NA) para los cuatro cultivares (Figura 5). El contenido de RuBisCO y el contenido de N presente en las hojas presentó una correlación positiva, un aumento en el contenido de N en las hojas dio como resultado un aumento en la RuBisCO en arroz. El hecho que aumentos en el contenido de N en las hojas de arroz, son acompañados por aumentos en la cantidad de RuBisCO ya ha sido comunicado por varios investigadores (Makino, Mae, & Ohira, 1984 a; Makino, Mae, & Ohira, 1984 b; Makino, 2003). Las plantas que crecieron en dosis altas de N (NA) fueron las que acumularon un N % significativamente mayor con

respecto a las plantas crecidas en dosis control de N (NC) independientemente del cultivar (Tabla3). Esto evidencia la relación reportada en otros trabajos entre el aumento en el contenido de N en las hojas y el aumento en la RuBisCO, lo que lleva a una correlación entre el contenido de N en las hojas y la tasa de fijación de CO₂.

La diferencia observada en la tasa fotosintética (Tabla 4) entre las plantas crecidas en baja radiación lumínica y dosis alta de N (BL_NA) y las crecidas en alta radiación lumínica y dosis altas de N (AL_NA), parece deberse a diferencias en la radiación en la que crecieron y evaluaron las plantas, ya que ambos tratamientos tuvieron una cantidad de RuBisCO similar. La actividad *in vivo* de la RuBisCO está regulada por carbamilación y/o por unión de inhibidores (Carmo-Silva, Scales, Madgwick, & Parry, 2015). El estado de activación de la RuBisCO responde a cambios mediados por la luz en el estado redox del estroma del cloroplasto y el potencial de fosforilación determinado por la relación ATP/ADP del estroma vía la regulación de la actividad ATPasa de la RuBisCO activasa (Rca) (Portis, Li, Wang, & Salvucci, 2007). Probablemente las plantas crecidas en alta radiación lumínica tengan una relación ATP/ADP más alta, dando como resultado una actividad de la Rca mayor, una mayor cantidad de RuBisCO activada generaría una tasa de fijación de CO₂ mayor en plantas con cantidades de RuBisCO similares.

Para los cuatro cultivares las plantas crecidas en dosis altas de N (NA) son las que presentaron una concentración de proteínas significativamente mayor en comparación con las crecidas en dosis control de N (NC) (Figura 6). Al comparar la concentración de proteína con la cantidad de RuBisCO (Figura 5) se observa una relación entre estos dos parámetros. Las plantas con mayor cantidad de RuBisCO siempre presentaron una mayor concentración de proteínas por g de peso seco. La relación lineal entre un aumento en la cantidad de proteínas solubles y un aumento en la cantidad de RuBisCO

ha sido observada en arroz en condiciones de campo. Además, el aumento en las proteínas solubles y el contenido de RuBisCO, se relacionó con el aumento en el contenido de N en hoja (Chen et al., 2014).

Las plantas almacenan proteínas en el tejido vegetativo que proveen C y N para el crecimiento y desarrollo posterior (Herman, 1999). En arroz se ha demostrado que un aumento de la dosis de N, aumenta la cantidad de proteínas en los tejidos de las plantas (Zhang et al., 2017).

La removilización del N en las plantas, deriva principalmente de proteínas rápidamente degradadas en el citosol de las células a través de sistemas intracelulares altamente regulados, como el proteosoma (Yanagawa et al., 1999; Nelson, Li, & Millar, 2014), que es complementada por grupos de proteínas localizadas en los orgánulos foliares, como RuBisCO en los cloroplastos, a través de la ruta de autofagia (Nelson et al., 2014; Wada et al., 2015), así como de proteínas estructurales de membrana y proteínas de almacenamiento del tallo. En el arroz hasta un 80 % del N de los granos proviene de la degradación de proteínas en órganos maduros como hojas y tallos (Yoneyama, Tanno, Tatsumi, & Mae, 2016).

Los resultados obtenidos de la cantidad de proteínas y RuBisCO, muestran que el aumento de las proteínas solubles en los tratamientos en dosis de N alto, probablemente se deba en gran parte a una acumulación de proteínas de reserva (ej. RuBisCO).

El análisis de la acumulación de NH_4^+ en las hojas, no mostró una acumulación apreciable de este ion en las mismas. Esto puede deberse a que gran parte del NH_4^+ es asimilado a nivel de raíz y no llegue a las hojas.

En cuanto a la acumulación de NO_3^- , los resultados muestran que en la condición de alta radiación lumínica y dosis alta de N (AL_NA) las plantas acumularon significativamente más NO_3^- en comparación a los otros tratamientos.

El contenido de nitrato de las plantas es visto comúnmente como resultado de un desbalance entre la absorción neta y la asimilación. Es aceptado ampliamente que la intensidad lumínica alta reduce el contenido de NO_3^- (Cárdenas-Navarro, Adamowicz, & Robin, 1999). Los efectos de la intensidad de la luz diaria pueden afectar los patrones de acumulación. La variación de los efectos de la intensidad lumínica pueden mantenerse bajos, seleccionado tiempos de cosecha adecuados (Anjana, Umar, & Iqbal, 2009).

En este trabajo la nutrición nitrogenada del arroz fue con NH_4NO_3 , en arroz se ha demostrado la interacción sinérgica entre estos dos iones en potenciar el crecimiento. La presencia de NO_3^- en el medio potencia la absorción, acumulación y metabolismo del NH_4^+ en la raíz. Además, la presencia de NH_4^+ disminuye el metabolismo del NO_3^- (Kronzucker, Siddiqi, Glass, & Kirk, 1999).

Los resultados de la acumulación de NO_3^- observados en el tratamiento de AL_NA, podrían explicarse por un tiempo de cosecha equivocado. Otra explicación puede ser que el arroz preferentemente asimila NH_4^+ en vez de NO_3^- , en medios con ambos iones disponibles.

Al analizar las actividades de la GS y NR, principales enzimas encargadas de la asimilación primaria del N, los resultados no mostraron diferencias entre los tratamientos (Tabla 6). La NR es una enzima que se encuentra regulada por la luz y la concentración de su sustrato (NO_3^-) a varios niveles, desde la expresión de los genes a regulación post traduccional. Aumentos en la cantidad de luz o NO_3^- , inducen la expresión y la cantidad de enzima activada (Lillo & Appenroth, 2001).

En el caso de las isoformas de la GS también se encuentran reguladas en su expresión a nivel post traduccional, por la luz, sustratos (NH_4^+ y Glu) y metabolitos del N (Cren & Hirel, 1999; Bernard & Habash, 2009).

La falta de diferencias en las actividades medidas *in vitro* puede no estar reflejando las diferencias en la disponibilidad de poder reductor disponible en las hojas crecidas en alta radiación. Otra razón que explique la ausencia de diferencias en las actividades de estas dos enzimas, puede ser que en el arroz la mayoría de la asimilación primaria ocurre a nivel de la raíz (Yamaya & Kusano, 2014). Quizás la diferencia de poder reductor y disponibilidad de sustrato generada por los tratamientos, lleve a diferencias en la cantidad y actividad de la NR y GS en las raíces.

Los resultados de la discriminación isotópica del $\delta^{15}\text{N}$ (Figura 8), muestran que las plantas crecidas en AL_NC tienen valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ mayores en los cuatro cultivares. En trigo se observaron resultados similares, plantas sometidas a una alta intensidad lumínica presentaron $\delta^{15}\text{N}$ mayores en comparación a las plantas crecidas en baja intensidad lumínica. Además, las plantas crecidas en una alta radiación incrementaron la asimilación de N (Setién et al., 2013).

La diferencia en la discriminación de ^{15}N entre las plantas crecidas en AL_NC y AL_NA, puede deberse probablemente a la disponibilidad de N. Las plantas crecidas en AL_NA al tener una dosis mayor de N, pudieron satisfacer su demanda de N discriminando a favor del ^{14}N . Esto muestra que la intensidad lumínica genera una mayor demanda de asimilación de N en las plantas y una mayor dosis de N es la forma de satisfacer la demanda, que luego se traduce en una mayor biomasa.

Los aminoácidos (AA) son un punto central en el metabolismo del N, en este punto confluyen la asimilación primaria del N en forma de AA sintetizados *de novo*, así como AA que provienen de la degradación de proteínas (Yoneyama et al., 2016).

Al analizar los datos obtenidos para los aminoácidos solubles totales (Tabla 7), se observa que la luz tiene un efecto sobre el contenido de éstos. Las plantas que crecieron en una radiación lumínica baja (BL), no tuvieron diferencias significativas en la cantidad de AA entre las dosis de N. Sin embargo, las plantas crecidas en alta radiación lumínica presentaron diferencias significativas en la cantidad de AA entre las dosis de N para 3 de los 4 cultivares. Las plantas crecidas en AL_NA tuvieron más AA totales solubles en comparación a las crecidas en AL_NC. Este resultado muestra que la interacción entre la radiación y el N afecta al metabolismo primario y secundario del nitrógeno. En este sentido, las plantas crecidas en AL_NC presentaron síntomas similares a haber crecido en una dosis menor de N. Un estudio mostró que al crecer plantas de arroz bajo diferentes dosis de N, las plantas con mayor cantidad de AA totales en las plantas son las que crecen en dosis mayores de N (Chen et al., 2013; Zhang et al., 2017).

Esto se relaciona con los datos obtenidos para el $\delta^{15}\text{N}$, donde las plantas crecidas en BL parecen tener la demanda de N satisfecha, en contraste con las plantas crecidas en AL. El contenido de AA en las hojas parece estar relacionado con la demanda de N, ya que las plantas con menor cantidad de AA tienen una mayor demanda de N. Esto probablemente se deba a la necesidad de AA para la síntesis de proteínas y otros compuestos nitrogenados destinados al crecimiento de las plantas.

El análisis de las relaciones de los aminoácidos de transporte, muestra que solo la condición de crecimiento de BL_NC llevó a un aumento significativo en la relación Gln/Glu en comparación con los otros tratamientos. Se ha propuesto que en plantas al igual que en algunas bacterias, la Gln generada por la asimilación de NH_4^+ mediante el ciclo GS-GOGAT funcione como una molécula señal que regule el metabolismo, crecimiento, y desarrollo (Yang et al., 2017).

El análisis de los resultados de los contenidos de las enzimas GS y Fd-GOGAT en las hojas de las plantas (Figura 12), mostró diferencias entre los tratamientos en la cantidad de estas enzimas que podrían explicar la diferencia en la relación Gln/Glu. En los tratamientos de dosis altas de N (NA) los cuatro cultivares presentaron una mayor cantidad de Fd-GOGAT, esta enzima responsable de la síntesis de Glu a partir de Gln, es la isoforma más abundante en las hojas (Somerville & Ogren, 1980; Suzuki & Rothstein, 1997). La mayor cantidad de Fd-GOGAT podría estar disminuyendo la cantidad de Gln y aumentando la de Glu.

En los resultados de cuantificación de la GS, se observan diferencias en las cantidades de isoformas de la GS. Los tratamientos con dosis altas de N (NA) presentaron una mayor cantidad de GS plastídica (GSp) con respecto a la GS citosólica (GSc), en comparación a las plantas crecidas en dosis de N control (NC) en los cuatro cultivares (Figura 12). Esto podría estar vinculado al contenido de NH_4^+ ya que en el arroz se ha demostrado el efecto del NH_4^+ como inductor de genes de la GSp (Kozaki, Sakamoto, & Takeba, 1992).

El recambio de proteínas es uno de los factores, junto a la asimilación primaria de N, claves en el aporte al total de AA solubles en las hojas. Estos AA se movilizan desde las hojas maduras a las hojas nuevas (Yoneyama et al., 2016). La degradación de los cloroplastos de hojas senescentes es una de las fuentes principales de AA para el crecimiento de hojas nuevas, ya que en las plantas C3 entre 75-80 % del N de las hojas se encuentra en los cloroplastos en forma de proteínas fotosintéticas (Makino & Osmond, 1991; Makino, Sakuma, Sudo, & Mae, 2003).

Hay evidencia que demuestra la participación de vacuolas asociadas a senescencia en el mecanismo de degradación de la RuBisCO. En estas vacuolas se encontró también gran cantidad de GSp (Martínez, Costa, Gomez, Otegui, & Guiamet, 2008). Esto

convierte a la GSp, en una posible proteína de reserva que se removilizaría en condiciones de déficit de N.

Los resultados observados en la cantidad de proteínas solubles, RuBisCO, GSp y aminoácidos solubles, sugieren un recambio de proteínas más alto en las plantas con dosis control de N (NC). Además, las plantas crecidas en AL_NC parecen tener un recambio de proteínas inclusive mayor a la crecida en BL_NC. Esto puede deberse a la demanda generada por una radiación lumínica alta en el crecimiento de hojas nuevas. En esta línea las plantas en AL_NC son las que tuvieron menor cantidad de aminoácidos solubles, proteínas solubles, RuBisCO y GSp.

Por último, se analizó la acumulación de un aminoácido no proteico de importancia en plantas. La acumulación de GABA fue significativamente mayor en las hojas de las plantas crecidas en alta radiación y dosis control de N (AL_NC), en comparación con los otros tratamientos (Figura 11). El GABA se acumula en las plantas en situaciones de estrés abiótico y biótico (Bown & Shelp, 2016). En *Arabidopsis thaliana* se observó que mutantes deficientes en la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), principal enzima que cataliza la síntesis de GABA, eran más sensibles a las sequía que las plantas salvajes (Mekonnen, Flügge, & Ludewig, 2016). Un aumento en la acumulación de GABA en hojas sometidas a daño mecánico y daño generado por insectos, también se observó en *Arabidopsis thaliana* (Scholz, Reichelt, Mekonnen, Ludewig, & Mithöfer, 2015).

En arroz se observó un aumento en la acumulación de GABA cuando las plantas se sometieron a estrés salino (Kim et al., 2007). También se observó un efecto protector del GABA al daño por estrés térmico, plantas de arroz con agregados exógenos de GABA tuvieron una sobrevivencia mayor al estrés térmico que las plantas sin agregados de GABA. Esta tolerancia al estrés térmico, puede deberse a un aumento en la

acumulación de osmolitos y compuestos antioxidantes en las plantas con agregados de exógenos de GABA (Nayyar, Kaur, Kaur, & Singh, 2014).

A partir de los antecedentes se puede inferir que la mayor acumulación de GABA de las plantas crecidas en el tratamiento AL_NC, puede deberse a que la radiación alta y esa dosis de nitrógeno generaron un estrés nutricional en esas plantas.

VI. CONCLUSIONES

- a. En este trabajo se demostró la interacción sinérgica entre la radiación lumínica y la dosis de nitrógeno en la que crecen las plantas de arroz.
- b. La fotosíntesis en las plantas arroz es afectada por la interacción entre la radiación lumínica y la disponibilidad de nitrógeno. La respuesta a esta interacción se visualizó en un aumento en la fijación de CO₂ provocada por un incremento de la maquinaria fotosintética.
- c. Se demostró un impacto significativo de la radiación lumínica sobre el estado nitrogenado de las plantas. El aumento de la radiación lumínica modificó la disponibilidad de aminoácidos solubles, aumentando la asimilación y la removilización de proteínas.
- d. Una alta radiación lumínica estimula la demanda de nitrógeno de las plantas de arroz, si esta demanda no es satisfecha, resulta en un estado de aparente estrés nutricional en las plantas.

VII. RESUMEN

El arroz es la principal fuente de alimento para más de la mitad de la población del planeta, el aumento de la población mundial genera la necesidad de aumentar el rendimiento del cultivo para satisfacer esa demanda. Si bien el rendimiento del arroz sigue creciendo, la proporción del crecimiento ha disminuido en las últimas décadas, 2.5 % anual desde 1962-1979 a 1.4 % anual 1980-2011. En este sentido el Uruguay destinando un 1% de su superficie al cultivo de arroz, logra ubicarse dentro de los 10 exportadores a nivel mundial gracias a los altos rendimientos obtenidos en este cultivo. Sin embargo, los rendimientos logrados aún están alejados de los rendimientos potenciales calculados.

Este trabajo está enmarcado dentro de un proyecto del fondo María Viñas titulado “Incidencia de la radiación lumínica en la mejora de la eficiencia del uso del nitrógeno en arroz”. El objetivo del proyecto es contribuir a identificar componentes bioquímicos-fisiológicos de la eficiencia del uso de nitrógeno en diferentes niveles de radiación. Para lograr ese objetivo, se utilizaron cultivares de arroz ampliamente utilizados por los productores uruguayos. Estos cultivares se crecieron en condiciones de radiación y dosis de nitrógeno contrastantes, para evaluar distintos parámetros del metabolismo del nitrógeno y el carbono.

Los resultados obtenidos evidenciaron la interacción que existe entre la dosis de nitrógeno y la radiación en la que crecen las plantas de arroz. Obteniéndose plantas que acumularon mayor biomasa de la parte aérea en una radiación alta y una dosis de nitrógeno alta en comparación a los otros tratamientos.

La fotosíntesis en las plantas arroz también fue afectada por la interacción entre la radiación lumínica y la disponibilidad de nitrógeno. La respuesta a esta interacción se visualizó en un aumento en la fijación de CO₂ en las plantas crecidas en alta radiación

y dosis de nitrógeno altas. El aumento en la fijación de CO₂ fue acompañado de un aumento del porcentaje de nitrógeno en las hojas. Este aumento en la cantidad de nitrógeno en las hojas se debió principalmente un aumento de la RuBisCO en las hojas y pigmentos fotosintéticos.

En segundo lugar, el estudio de componentes del metabolismo primario del nitrógeno, mostraron respuesta a la dosis de nitrógeno y a la radiación en la que crecieron las plantas de arroz. La alta radiación y dosis de nitrógeno control generaron en las hojas de las plantas un aumento del GABA y una disminución en las proteínas de reserva y aminoácidos solubles. Además, las plantas crecidas en estas condiciones presentaron un aumento del isotopo ¹⁵N, lo que puede pensarse como un aumento en la demanda de nitrógeno del suelo por esas plantas. Los cambios en el metabolismo del nitrógeno generados por una mayor radiación en las plantas, pueden dar como resultado un mayor crecimiento, pero solamente si son acompañados por un aumento en la dosis de nitrógeno. Los resultados obtenidos podrán contribuir en el futuro a la identificación de parámetros que puedan ser utilizados para la selección de genotipos de arroz con mayor eficiencia en el uso de la radiación y el nitrógeno.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adjao, R. T., & Staatz, J. M. (2015). Asian rice economy changes and implications for sub-Saharan Africa. *Global Food Security*, 5, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2014.11.002>
- Ambavaram, M. M. R., Basu, S., Krishnan, A., Ramegowda, V., Batlang, U., Rahman, L., ... Pereira, A. (2014). Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. *Nature Communications*, 5, 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms6302>
- Anjana, Umar, S., & Iqbal, M. (2009). Factors Responsible for Nitrate Accumulation: A Review. In *Sustainable Agriculture* (Vol. 3, pp. 533–549). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_33
- Arnold, F. H., & Georgiou, G. (2017). *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications*. (M. Alcalde, Ed.) (Vol. 230). Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50413-1>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu. Rev. Plant Biol*, 59, 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Bao, A., Zhao, Z., Ding, G., Shi, L., Xu, F., & Cai, H. (2015). The Stable Level of Glutamine synthetase 2 Plays an Important Role in Rice Growth and in Carbon-Nitrogen Metabolic Balance. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 12713–12736. <https://doi.org/10.3390/ijms160612713>
- Basuchaudhuri, P. (2016). *Nitrogen Metabolism in Rice*. Taylor & Francis Group.
- Bernard, S. M., & Habash, D. Z. (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist*, 182(3), 608–620. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02823.x>
- Blanco, P., Roel, Á., Deambrosi, E., Bonilla, C., & Cantou, G. (2010). Closing the yield gap in rice production in Uruguay : impact of technological changes (pp. 1–4). In: International Rice Research Conference (28°, 2010, Hanoi, Vietnam). CGIAR, IRRI, Session: OP02, Closing the yield gap. Retrieved from <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3516/1/Congreso-Blanco-2010-1.pdf>
- Bosnir, D. B. J., Bevardi, M., Boskovic, A. G., Lasic, S. M. D., Krivohlavek, A., Racs, A., ... Trstenjak, N. U. (2017). Nitrate in Leafy Green Vegetables and Estimated Intake. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(3), 31–41. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i3.4>
- Bown, A. W., & Shelp, B. J. (2016). Plant GABA: Not Just a Metabolite. *Trends in Plant Science*, 21(10), 811–813. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.001>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/0003->

- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, and R. L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Journal of Chemical Information and Modeling* (Second). John Wiley & Sons, Ltd Registered.
- Busch, F. A., Sage, R. F., & Farquhar, G. D. (2018). Plants increase CO₂ uptake by assimilating nitrogen via the photorespiratory pathway. *Nature Plants*, 4(1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0065-x>
- Callaway, E. (2014). Domestication: The birth of rice. *Nature*, 514(7524), S58–S59. <https://doi.org/10.1038/514S58a>
- Campbell, W. H. (1999). NITRATE REDUCTASE STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 277–303. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.277>
- Campbell, W. H. (2001). Structure and function of eukaryotic NAD(P)H:nitrate reductase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(2), 194–204. <https://doi.org/10.1007/PL00000847>
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., & Robin, P. (1999). Nitrate accumulation in plants: A role for water. *Journal of Experimental Botany*, 50(334), 613–624. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.334.613>
- Cardona, T., Shao, S., & Nixon, P. J. (2018). Enhancing photosynthesis in plants: the light reactions. *Essays in Biochemistry*, 0(March), EBC20170015. <https://doi.org/10.1042/EBC20170015>
- Carmo-Silva, E., Scales, J. C., Madgwick, P. J., & Parry, M. A. J. (2015). Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource use efficiency. *Plant, Cell and Environment*, 38(9), 1817–1832. <https://doi.org/10.1111/pce.12425>
- Cataldo, D., Maroon, M., Schrader, L., & L. Youngs, V. (1975). *Rapid Colorimetric Determination of Nitrate in Plant-Tissue by Nitration of Salicylic-Acid. Communications in Soil Science and Plant Analysis* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2017). Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. *Trends in Plant Science*, 22(2), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001>
- Chatterjee, A., Huma, B., Shaw, R., & Kundu, S. (2017). Reconstruction of *Oryza sativa indica* Genome Scale Metabolic Model and Its Responses to Varying RuBisCO Activity, Light Intensity, and Enzymatic Cost Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8(November). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02060>
- Chauhan, B. S., Jabran, K., & Mahajan, G. (2017). *Rice Production Worldwide*. (B. S. Chauhan, K. Jabran, & G. Mahajan, Eds.), *Rice Production Worldwide*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47516-5>
- Chen, C. P., Sakai, H., Tokida, T., Usui, Y., Nakamura, H., & Hasegawa, T. (2014). Do the Rich Always Become Richer? Characterizing the Leaf Physiological Response of the High-Yielding Rice Cultivar Takanari to Free-Air CO₂

- Enrichment. *Plant and Cell Physiology*, 55(2), 381–391.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcu009>
- Chen, S., Zhang, X., Zhao, X., Wang, D., Xu, C., Ji, C., & Zhang, X. (2013). Response of Rice Nitrogen Physiology to High Nighttime Temperature during Vegetative Stage. *The Scientific World Journal*, 2013(December), 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2013/649326>
- Clemente, M. T., & Márquez, A. J. (1999). Functional importance of Asp56 from the α -polypeptide of Phaseolus vulgaris glutamine synthetase. An essential residue for transferase but not for biosynthetic enzyme activity. *European Journal of Biochemistry*, 264(2), 453–460. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00636.x>
- Crawford, N. M., & Glass, A. D. M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3(10), 389–395.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01311-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01311-9)
- Cren, M., & Hirel, B. (1999). Glutamine Synthetase in Higher Plants Regulation of Gene and Protein Expression from the Organ to the Cell. *Plant and Cell Physiology*, 40(12), 1187–1193.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029506>
- Daniel Workman. (2018). Rice Exports by Country. Retrieved May 18, 2018, from <http://www.worldstopexports.com/rice-exports-country/>
- Dechorgnat, J., Nguyen, C. T., Armengaud, P., Jossier, M., Diatloff, E., Filleur, S., & Daniel-Vedele, F. (2011). From the soil to the seeds: The long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1349–1359.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erq409>
- Demidchik, V., Davenport, R. J., & Tester, M. (2002). NONSELECTIVE CATION CHANNELS IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 67–107.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091901.161540>
- Drop, B., Webber-Birungi, M., Yadav, S. K. N., Filipowicz-Szymanska, A., Fusetti, F., Boekema, E. J., & Croce, R. (2014). Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in Chlamydomonas reinhardtii. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(1), 63–72.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.07.012>
- Emerson, R. (1929). CHLOROPHYLL CONTENT AND RATE OF PHOTOSYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 15(3), 281–284. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16577182>
- Esposito, S., Massaro, G., Vona, V., Rigano, V. D., & Carfagna, S. (2003). Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta*, 216(4), 639–647.
<https://doi.org/10.1007/s00425-002-0892-4>
- Fageria, N. K., Moreira, A., & Coelho, A. M. (2011). Yield and yield components of upland rice as influenced by nitrogen sources. *Journal of Plant Nutrition*, 34(3), 361–370. <https://doi.org/10.1080/01904167.2011.536878>

- Feraud, M., Masclaux-Daubresse, C., Ferrario-Méry, S., Pageau, K., Lelandais, M., Ziegler, C., ... Suzuki, A. (2005). Expression of a ferredoxin-dependent glutamate synthase gene in mesophyll and vascular cells and functions of the enzyme in ammonium assimilation in *Nicotiana tabacum* (L.). *Planta*, 222(4), 667–677. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0013-2>
- Forde, B. G., & Lea, P. J. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2339–2358. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm121>
- Foyer, C. H., Ferrario-Méry, S., & Noctor, G. (2001). Interactions Between Carbon and Nitrogen Metabolism. *Plant Nitrogen*, 237–254. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04064-5_9
- Foyer, C. H., & Graham, N. (2004). *Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism*. (C. H. Foyer & G. Noctor, Eds.), *Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism* (Vol. 12). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/0-306-48138-3>
- Foyer, C. H., Noctor, G., & Hodges, M. (2011). Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1467–1482. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq453>
- Gaufichon, L., Masclaux-Daubresse, C., Tcherkez, G., Reisdorf-Cren, M., Sakakibara, Y., Hase, T., ... Suzuki, A. (2013). Arabidopsis thaliana ASN2 encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. *Plant, Cell & Environment*, 36(2), 328–342. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02576.x>
- Gaufichon, L., Reisdorf-Cren, M., Rothstein, S. J., Chardon, F., & Suzuki, A. (2010). Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science*, 179(3), 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.010>
- Gaufichon, L., Rothstein, S. J., & Suzuki, A. (2016). Asparagine Metabolic Pathways in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 57(4), 675–689. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv184>
- Glass, A. D. M., Shaff, J. E., & Kochian, L. V. (1992). Studies of the Uptake of Nitrate in Barley. *PLANT PHYSIOLOGY*, 99(2), 456–463. <https://doi.org/10.1104/pp.99.2.456>
- Goel, P., Bhuria, M., Kaushal, M., & Singh, A. K. (2016). Carbon: Nitrogen interaction regulates expression of genes involved in N-Uptake and assimilation in brassica juncea L. *PLoS ONE*, 11(9), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163061>
- Good, A. G., Johnson, S. J., De Pauw, M., Carroll, R. T., Savidov, N., Vidmar, J., ... Strocher, V. (2007). Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Canadian Journal of Botany*, 85(3), 252–262. <https://doi.org/10.1139/B07-019>
- Gross, B. L., & Zhao, Z. (2014). Archaeological and genetic insights into the origins of domesticated rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

111(17), 6190–6197. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308942110>

- Gu, J., Zhou, Z., Li, Z., Chen, Y., Wang, Z., & Zhang, H. (2017). Rice (*Oryza sativa* L.) with reduced chlorophyll content exhibit higher photosynthetic rate and efficiency, improved canopy light distribution, and greater yields than normally pigmented plants. *Field Crops Research*, 200, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.10.008>
- Gu, J., Zhou, Z., Li, Z., Chen, Y., Wang, Z., Zhang, H., & Yang, J. (2017). Photosynthetic Properties and Potentials for Improvement of Photosynthesis in Pale Green Leaf Rice under High Light Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01082>
- Hase, T., Schürmann, P., & Knaff, D. B. (2007). The Interaction of Ferredoxin with Ferredoxin-Dependent Enzymes. In *Photosystem I* (pp. 477–498). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4256-0_28
- Herman, E. M. (1999). Protein Storage Bodies and Vacuoles. *THE PLANT CELL ONLINE*, 11(4), 601–614. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.601>
- Hoopen, F. Ten, Cuin, T. A., Pedas, P., Hegelund, J. N., Shabala, S., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2010). Competition between uptake of ammonium and potassium in barley and arabidopsis roots: Molecular mechanisms and physiological consequences. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2303–2315. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq057>
- Hopkins, H., & Huner, N. (2008). *Introduction to Plant Physiology. The University of Western Ontario* (4th ed., Vol. 43). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.2134/agronj1951.00021962004300010013x>
- Hunkapiller, M. W., Strickler, J. E., & Wilson, K. J. (1984). Contemporary methodology for protein structure determination. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4672), 304–311. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6385254>
- Izaguirre-Mayoral, M. L., Carballo, O., Flores, S., Mallorca, M. S. de., & Oropeza, T. (1992). Quantitative analysis of the symbiotic N₂-fixation, non-structural carbohydrates and chlorophyll content in sixteen native legume species collected in different savanna sites. *Symbiosis*.
- Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T., & Kai, Y. (2004). PHOSPHO ENOL PYRUVATE CARBOXYLASE: A New Era of Structural Biology. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 69–84. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141619>
- Jahn, T. P., Møller, A. L. B., Zeuthen, T., Holm, L. M., Klærke, D. A., Mohsin, B., ... Schjoerring, J. K. (2004). Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Letters*, 574(1–3), 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.004>
- Jin, X., Yang, G., Tan, C., & Zhao, C. (2015). Effects of nitrogen stress on the photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and sugar-nitrogen ratio in corn. *Scientific Reports*, 5(1), 9311. <https://doi.org/10.1038/srep09311>
- Kalcsits, L. A., Buschhaus, H. A., & Guy, R. D. (2014). Nitrogen isotope

- discrimination as an integrated measure of nitrogen fluxes, assimilation and allocation in plants. *Physiologia Plantarum*, *151*(3), 293–304. <https://doi.org/10.1111/ppl.12167>
- Kalcsits, L. A., & Guy, R. D. (2013). Whole-plant and organ-level nitrogen isotope discrimination indicates modification of partitioning of assimilation, fluxes and allocation of nitrogen in knockout lines of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, *149*(2), 249–259. <https://doi.org/10.1111/ppl.12038>
- Kant, S., Bi, Y. M., & Rothstein, S. J. (2010). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, *62*(4), 1499–1509. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq297>
- Kim, D.-W., Shibato, J., Agrawal, G. K., Fujihara, S., Iwahashi, H., Kim, D. H., ... Rakwal, R. (2007). Gene transcription in the leaves of rice undergoing salt-induced morphological changes (*Oryza sativa* L.). *Molecules and Cells*, *24*(1), 45–59. <https://doi.org/1102> [pii]
- Kirschbaum, M. U. F. (2011). Does Enhanced Photosynthesis Enhance Growth? Lessons Learned from CO₂ Enrichment Studies. *Plant Physiology*, *155*(1), 117–124. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166819>
- Konishi, N., Ishiyama, K., Matsuoka, K., Maru, I., Hayakawa, T., Yamaya, T., & Kojima, S. (2014). NADH-dependent glutamate synthase plays a crucial role in assimilating ammonium in the *Arabidopsis* root. *Physiologia Plantarum*, *152*(1), 138–151. <https://doi.org/10.1111/ppl.12177>
- Kozaki, A., Sakamoto, A., & Takeba, G. (1992). The Promoter of the Gene for Plastidic Glutamine Synthetase (GS2) from Rice Is Developmentally Regulated and Exhibits Substrate-Induced Expression in Transgenic Tobacco Plants. *Plant and Cell Physiology*, *33*(3), 233–238. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078245>
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., & Glass, A. (1996). Kinetics of NH₄⁺ Influx in Spruce. *Plant Physiology*, *110*(3), 773–779. <https://doi.org/110/3/773> [pii]
- Kronzucker, H., Siddiqi, M., Glass, A., & Kirk, G. (1999). Nitrate-ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. *Plant Physiology*, *119*(3), 1041–1046. <https://doi.org/10.1104/pp.119.3.1041>
- Kumagai, E., Araki, A., & Kubota, F. (2009). Correlation of Chlorophyll Meter Readings with Gas exchange and Chlorophyll Fluorescence in Flag Leaves of Rice (*Oryza sativa* L.) Plants. *Plant Production Science*, *12*(1), 50–53. <https://doi.org/10.1626/pps.12.50>
- Küpper, H., Seibert, S., & Parameswaran, A. (2007). Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: Quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Analytical Chemistry*, *79*(20), 7611–7627. <https://doi.org/10.1021/ac070236m>
- Lea, P. J., & Mifflin, B. J. (2010). Nitrogen Assimilation and its Relevance to Crop Improvement. In *Annual Plant Reviews Volume 42* (Vol. 42, pp. 1–40). Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444328608.ch1>
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A. J., Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2007).

- Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150(1), 1–26.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00104.x>
- Lee, Y., Yang, C., Chang, K., & Shen, Y. (2011). Effects of nitrogen status on leaf anatomy, chlorophyll content and canopy reflectance of paddy rice. *Botanical Studies*, 52, 295–303.
- Lenth, R. (2018). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=emmeans>
- Li, X., Bai, H., Wang, X., Li, L., Cao, Y., Wei, J., ... Liu, G. (2011). Identification and validation of rice reference proteins for western blotting. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4763–4772. <https://doi.org/10.1093/jxb/err084>
- Li, Y., Chen, Y., Wu, C. Y., Tang, X., & Ji, X. J. (2015). Determination of optimum nitrogen application rates in Zhejiang Province, China, based on rice yields and ecological security. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(12), 2426–2433. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61168-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61168-6)
- Lillo, C., & Appenroth, K.-J. (2001). Light Regulation of Nitrate Reductase in Higher Plants: Which Photoreceptors are Involved? *Plant Biology*, 3(5), 455–465. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17732>
- Liu, Z., & Sun, N. (2013). Enhancing photosynthetic CO₂ use efficiency in rice: Approaches and challenges. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(4), 1001–1009. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1171-z>
- Long, S. P., Marshall-Colon, A., & Zhu, X. G. (2015). Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell*, 161(1), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.019>
- Maeda, S. I., Konishi, M., Yanagisawa, S., & Omata, T. (2014). Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 55(7), 1311–1324. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu075>
- Makino, A. (2003). Rubisco and nitrogen relationships in rice: Leaf photosynthesis and plant growth. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(3), 319–327. <https://doi.org/10.1080/00380768.2003.10410016>
- Makino, A., Mae, T., & Ohira, K. (1984). Effect of nitrogen, phosphorus or potassium on the photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase content in rice leaves during expansion. *Soil Science and Plant Nutrition*, 30(1), 63–70. <https://doi.org/10.1080/00380768.1984.10434668>
- Makino, A., Mae, T., & Ohira, K. (1984). Relation between Nitrogen and Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase in Rice Leaves from Emergence through Senescence. *Plant and Cell Physiology*, 25(3), 429–437. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076730>
- Makino, A., & Osmond, B. (1991). Effects of Nitrogen Nutrition on Nitrogen Partitioning between Chloroplasts and Mitochondria in Pea and Wheat. *PLANT PHYSIOLOGY*, 96(2), 355–362. <https://doi.org/10.1104/pp.96.2.355>
- Makino, A., Sakuma, H., Sudo, E., & Mae, T. (2003). Differences between Maize and Rice in N-use Efficiency for Photosynthesis and Protein Allocation. *Plant*

- and *Cell Physiology*, 44(9), 952–956. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg113>
- Márquez, A. J., & Monza, J. (2004). *El METABOLISMO del NITRÓGENO en las plantas* (first). ALMUZARA.
- Martínez, D. E., Costa, M. L., Gomez, F. M., Otegui, M. S., & Guiamet, J. J. (2008). ‘Senescence-associated vacuoles’ are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *The Plant Journal*, 56(2), 196–206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03585.x>
- Masumoto, C., Miyazawa, S.-I., Ohkawa, H., Fukuda, T., Taniguchi, Y., Murayama, S., ... Miyao, M. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), 5226–5231. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913127107>
- McAllister, C. H., Wolansky, M., & Good, A. G. (2016). The impact on nitrogen-efficient phenotypes when aspartate aminotransferase is expressed tissue-specifically in *Brassica napus*. *New Negatives in Plant Science*, 3–4, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neps.2016.03.001>
- Mekonnen, D. W., Flügge, U.-I., & Ludewig, F. (2016). Gamma-aminobutyric acid depletion affects stomata closure and drought tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 245, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.01.005>
- Ministerio de Ganaderia, A. y P. (2016). (DIEA) Estadísticas Agropecuarias - Encuesta de arroz. *ENCUESTA DE ARROZ Zafra 2015/16*, 32.
- Mitchell, P. L., & Sheehy, J. E. (2006). Supercharging rice photosynthesis to increase yield Rice. *New Phytologist*, 171(4), 688–698. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01856.x>
- Moore, S., & Stein, W. H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids (Reprinted from *J. Biol. Chem.*, vol 176, pg 367-388, 1948). *Journal of Biological Chemistry*, 176, 367–388. <https://doi.org/Artn E6>
- Morgan, M. a, Volk, R. J., & Jackson, W. a. (1973). Simultaneous Influx and Efflux of Nitrate during Uptake by Perennial Ryegrass. *Plant Physiology*, 51(2), 267–272. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=366248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nayyar, H., Kaur, R., Kaur, S., & Singh, R. (2014). γ -Aminobutyric Acid (GABA) Imparts Partial Protection from Heat Stress Injury to Rice Seedlings by Improving Leaf Turgor and Upregulating Osmoprotectants and Antioxidants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), 408–419. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9389-6>
- Nelson, C. J., Li, L., & Millar, A. H. (2014). Quantitative analysis of protein turnover in plants. *PROTEOMICS*, 14(4–5), 579–592. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300240>
- Nelson, N., & Junge, W. (2015). Structure and Energy Transfer in Photosystems of Oxygenic Photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 659–683.

<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-092914-041942>

- Nicholls, D. G., & Ferguson, S. J. (2013). *Photosynthetic Generators of Protonmotive Force. Bioenergetics*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388425-1.00006-3>
- Nigro, D., Blanco, A., Anderson, O. D., & Gadaleta, A. (2014). Characterization of Ferredoxin-Dependent Glutamine-Oxoglutarate Amidotransferase (Fd-GOGAT) genes and their relationship with grain protein content QTL in wheat. *PLoS ONE*, *9*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103869>
- O'Brien, J. A. A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., & Gutiérrez, R. A. A. (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Molecular Plant*, *9*(6), 837–856. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.05.004>
- O'Neill, P. M., Shanahan, J. F., Schepers, J. S., & Caldwell, B. (2004). Agronomic Responses of Corn Hybrids from Different Eras to Deficit and Adequate Levels of Water and Nitrogen. *Agronomy Journal*, *96*(6), 1660. <https://doi.org/10.2134/agronj2004.1660>
- Okumoto, S., & Pilot, G. (2011). Amino Acid Export in Plants: A Missing Link in Nitrogen Cycling. *Molecular Plant*, *4*(3), 453–463. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr003>
- Otoo, E., & Osada, A. (1984). Different Response between Indica and Japonica Rice Varieties to Nitrogen Fertilizer as Expressed by Physiological and Morphological Characters. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, *28*(1), 13–24.
- Pantoja, O. (2012). High Affinity Ammonium Transporters: Molecular Mechanism of Action. *Frontiers in Plant Science*, *3*(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00034>
- Pathak, R. R., Ahmad, A., Lochab, S., & Raghuram, N. (2008). Molecular physiology of plant nitrogen use efficiency and biotechnological options for its enhancement. *Current Science*, *94*(11), 1394–1403.
- Pérez de Vida, F. B., & Macedo, I. (2013). Estimación de brecha y reserva tecnológica en arroz (pp. 7–9). Actividades de Difusión 713. INIA Treinta y Tres.
- Peterhansel, C., Horst, I., Niessen, M., Blume, C., Kebeish, R., Kürkcüoğlu, S., & Kreuzaler, F. (2010). Photorespiration. *The Arabidopsis Book*, *8*, e0130. <https://doi.org/10.1199/tab.0130>
- Portis, A. R., Li, C., Wang, D., & Salvucci, M. E. (2007). Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *Journal of Experimental Botany*, *59*(7), 1597–1604. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm240>
- Pratelli, R., & Pilot, G. (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, *65*(19), 5535–5556. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru320>
- Qiu, W., Wang, Z., Huang, C., Chen, B., & Yang, R. (2014). Nitrate accumulation in leafy vegetables and its relationship with water. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *14*(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0718->

95162014005000061

- Quero, G., Gutiérrez, L., Monteverde, E., Blanco, P., Pérez de Vida, F., Rosas, J., ... Bonnacarrère, V. (2018). Genome-Wide Association Study Using Historical Breeding Populations Discovers Genomic Regions Involved in High-Quality Rice. *The Plant Genome*, *0*(0), 0. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.08.0076>
- R Core Team. (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Gilliham, M., & Xu, B. (2017). γ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(9), 1577–1603. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2415-7>
- Sambrook, J., & Russel, D. W. (2000). Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual. *Cold Spring Harboc Laboratory Press*. <https://doi.org/10.1002/abio.370050118>
- Scholz, S. S., Reichelt, M., Mekonnen, D. W., Ludewig, F., & Mithöfer, A. (2015). Insect Herbivory-Elicited GABA Accumulation in Plants is a Wound-Induced, Direct, Systemic, and Jasmonate-Independent Defense Response. *Frontiers in Plant Science*, *6*(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01128>
- Seabra, A. R., & Carvalho, H. G. (2015). Glutamine synthetase in *Medicago truncatula*, unveiling new secrets of a very old enzyme. *Frontiers in Plant Science*, *6*(July), 578. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00578>
- Setién, I., Fuertes-Mendizabal, T., González, A., Aparicio-Tejo, P. M., González-Murua, C., González-Moro, M. B., & Estavillo, J. M. (2013). High irradiance improves ammonium tolerance in wheat plants by increasing N assimilation. *Journal of Plant Physiology*, *170*(8), 758–771. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.12.015>
- Sharwood, R. E., Sonawane, B. V., Ghannoum, O., & Whitney, S. M. (2016). Improved analysis of C 4 and C 3 photosynthesis via refined in vitro assays of their carbon fixation biochemistry. *Journal of Experimental Botany*, *67*(10), 3137–3148. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw154>
- Sheehy, J. E., Mitchell, P. L., & Hardy, B. (2007). *Charting New Pathways to C4 Rice*. Manila: International Rice Research Institute.
- Sheehy, J., & Mitchell, P. (2011). Rice and global food security: the race between scientific discovery and catastrophe. *Access Not Excess - The Search for Better Nutrition*, 81–90.
- Shrawat, A. K., Carroll, R. T., DePauw, M., Taylor, G. J., & Good, A. G. (2008). Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotechnology Journal*, *6*(7), 722–732. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00351.x>
- Sims, L., Pastor, J., Lee, T., & Dewey, B. (2012). Nitrogen, phosphorus and light effects on growth and allocation of biomass and nutrients in wild rice. *Oecologia*, *170*(1), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2296-x>

- Solorzano, I. (1969). Determination of ammonia in natural seawater by the phenol-hypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 14(5), 799–801. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.5.0799>
- Somerville, C. R., & Ogren, W. L. (1980). Inhibition of photosynthesis in Arabidopsis mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature*, 286(5770), 257–259. <https://doi.org/10.1038/286257a0>
- Stockle, C., & Kemanian, A. R. (2009). *Crop radiation capture and use efficiency: a framework for crop growth analysis. Crop Physiology: Applications for Genetic Improvement and Agronomy*.
- Sugiura, M., Georgescu, M. N., & Takahashi, M. (2007). A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 48(7), 1022–1035. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm073>
- Suzuki, A., & Rothstein, S. (1997). Structure and Regulation of Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase from Arabidopsis Thaliana. Cloning of cDNA, Expression in Different Tissues of Wild-Type and gltS Mutant Strains, and Light Induction. *European Journal of Biochemistry*, 243(3), 708–718. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00708.x>
- Tabuchi, M., Abiko, T., & Yamaya, T. (2007). Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2319–2327. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm016>
- Tanaka, R., & Tanaka, A. (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(8), 968–976. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.01.002>
- Thomsen, H. C., Eriksson, D., Møller, I. S., & Schjoerring, J. K. (2014). Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency? *Trends in Plant Science*, 19(10), 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.002>
- Tischner, R. (2000). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment*, 23(10), 1005–1024. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00595.x>
- UN Food and Agriculture Organization. (2017). Crops/Regions/World list/Production Quantity (pick lists), Rice (paddy), 2016. Retrieved May 17, 2018, from <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Unno, H., Uchida, T., Sugawara, H., Kurisu, G., Sugiyama, T., Yamaya, T., ... Kusunoki, M. (2006). Atomic Structure of Plant Glutamine Synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 29287–29296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601497200>
- Villalobos, F. J., & Fereres, E. (2016). *Principles of Agronomy for Sustainable Agriculture*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46116-8>
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level* (5th Editio). John Wiley & Sons, Ltd.
- Wada, S., Hayashida, Y., Izumi, M., Kurusu, T., Hanamata, S., Kanno, K., ... Ishida, H. (2015). Autophagy Supports Biomass Production and Nitrogen Use

- Efficiency at the Vegetative Stage in Rice. *Plant Physiology*, 168(1), 60–73.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00242>
- Wakao, S., Andre, C., & Benning, C. (2007). Functional Analyses of Cytosolic Glucose-6-Phosphate Dehydrogenases and Their Contribution to Seed Oil Accumulation in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 146(1), 277–288.
<https://doi.org/10.1104/pp.107.108423>
- Wakao, S., & Benning, C. (2004). Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 41(2), 243–256.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02293.x>
- Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., & Glass, A. D. M. (1993). Ammonium Uptake by Rice Roots (II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ Influx across the Plasmalemma). *Plant Physiology*, 103(4), 1259–1267. <https://doi.org/citeulike-article-id:9455347>
- Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R. a, Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., ... Crawford, N. M. (2004). Genomic Analysis of the Nitrate Response Using a Nitrate Reductase-Null Mutant of Arabidopsis Linked references are available on JSTOR for this article : Genomic Analysis of the Nitrate Response Using a Nitrate Reductase-Null Mutant of Arabidopsis [wI. *Plant Physiology*, 136(1), 2512–2522. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044610>.that
- Wang, X., Huang, R., & Quan, R. (2017). Mutation in Mg-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester Cyclase Decreases Photosynthesis Capacity in Rice. *PLOS ONE*, 12(1), e0171118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171118>
- Wang, Y., Cheng, Y., Chen, K., & Tsay, Y. (2018). Nitrate Transport, Signaling, and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), annurev-arplant-042817-040056. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040056>
- Weng, J.-H., & Chen, C.-Y. (1987). Differences between Indica and Japonica rice varieties in CO₂ exchange rates in response to leaf nitrogen and temperature. *Photosynthesis Research*, 14(2), 171–178. <https://doi.org/10.1007/BF00032321>
- Xie, X. J., Shen, S. H. H., Li, Y. X., Zhao, X. Y., Li, B. B., & Xu, D. F. (2011). Effect of photosynthetic characteristic and dry matter accumulation of rice under high temperature at heading stage. *African Journal of Agricultural Research*, 6(7), 1931–1940. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.087>
- Yadav, K. N. S., Semchonok, D. A., Nosek, L., Kouřil, R., Fucile, G., Boekema, E. J., & Eichacker, L. A. (2017). Supercomplexes of plant photosystem I with cytochrome b6f, light-harvesting complex II and NDH. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1858(1), 12–20.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.10.006>
- Yamaya, T., & Kusano, M. (2014). Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5519–5525.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru103>
- Yanagawa, Y., Ohhashi, A., Murakami, Y., Saeki, Y., Yokosawa, H., Tanaka, K., ... Nakagawa, H. (1999). Purification and characterization of the 26S proteasome from cultured rice (*Oryza sativa*) cells. *Plant Science*, 149(1), 33–41.

[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00140-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00140-5)

- Yang, H. C., Kan, C. C., Hung, T. H., Hsieh, P. H., Wang, S. Y., Hsieh, W. Y., & Hsieh, M. H. (2017). Identification of early ammonium nitrate-responsive genes in rice roots. *Scientific Reports*, 7(1), 16885. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17173-9>
- Yang, Y., Zhu, K., Xia, H., Chen, L., & Chen, K. (2014). Comparative proteomic analysis of indica and japonica rice varieties. *Genetics and Molecular Biology*, 37(4), 652–661. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014005000015>
- Yoneyama, T., Fujimori, T., Yanagisawa, S., Hase, T., & Suzuki, A. (2015). 15N Tracing Studies on In Vitro Reactions of Ferredoxin-Dependent Nitrite Reductase and Glutamate Synthase Using Reconstituted Electron Donation Systems. *Plant and Cell Physiology*, 56(6), 1154–1161. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv039>
- Yoneyama, T., Tanno, F., Tatsumi, J., & Mae, T. (2016). Whole-Plant Dynamic System of Nitrogen Use for Vegetative Growth and Grain Filling in Rice Plants (*Oryza sativa* L.) as Revealed through the Production of 350 Grains from a Germinated Seed Over 150 Days: A Review and Synthesis. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01151>
- Yoshida, S., Forno, D. A., Cock, J. H., & Gomez, K. A. (1976). *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. International Rice Research Institute, Philippines. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22067-8_9
- Yousfi, S., Serret, M. D., Márquez, A. J., Voltas, J., & Araus, J. L. (2012). Combined use of ^{13}C , ^{18}O and ^{15}N tracks nitrogen metabolism and genotypic adaptation of durum wheat to salinity and water deficit. *New Phytologist*, 194(1), 230–244. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04036.x>
- Zhang, X., Lei, J., Zheng, D., Liu, Z., Li, G., Wang, S., & Ding, Y. (2017). Amino acid composition of leaf, grain and bracts of japonica rice (*Oryza Sativa* ssp. japonica) and its response to nitrogen fertilization. *Plant Growth Regulation*, 82(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0232-5>