



NUEVAS FUNCIONES DE LA NUTRICIÓN DE CLORURO EN LA ASIMILACIÓN Y EFICIENCIA EN EL USO DE NITRÓGENO EN PLANTAS DE TABACO

TRABAJO FIN DE MÁSTER

TUTORES

MIGUEL ÁNGEL ROSALES VILLEGAS

MARÍA ROSARIO ÁLVAREZ MORALES

BLANCA BEAS SANTOS

SEPTIEMBRE 2020



ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. El cloruro (Cl^-) como micronutriente beneficioso para las plantas y su importancia en la naturaleza.....	2
1.2. El Cl^- como macronutriente beneficioso para las plantas	3
1.2.1. Interacción entre el Cl^- y el nitrato (NO_3^-) en plantas.....	5
1.2.1.1. Efectos del NO_3^- en la agricultura	5
1.2.1.2. El Cl^- en la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE) en plantas	5
1.2.1.3. Asimilación de NO_3^- en plantas.....	6
1.2.2. Interacción entre el Cl^- y el carbono (C) en plantas: efectos de la nutrición de Cl^- en la fotosíntesis	7
1.2.2.1. Asimilación de C en plantas.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. Diseño experimental	10
3.2. Determinación de parámetros hídricos y de crecimiento.....	12
3.2.1. Peso fresco (PF) y peso seco (PS).....	12
3.2.2. Eficiencia intrínseca del uso del agua (WUE).....	12
3.3. Determinación del contenido de nutrientes minerales	13
3.3.1. Determinación de Cl^- , fosfato (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-}).....	13
3.3.2. Determinación de las distintas formas de nitrógeno (N).....	13
3.4. Determinación de parámetros relacionados con el NUE	14
3.5. Determinación de actividades enzimáticas	14
3.5.1. Enzimas del metabolismo del N.....	14
3.5.1.1. Actividad <i>in vitro</i> de la nitrato reductasa (NR).....	14
3.5.1.2. Actividad <i>in vitro</i> de la nitrito reductasa (NiR).....	14
3.5.1.3. Actividad glutamato sintasa (GOGAT).....	15
3.5.1.4. Actividad glutamato deshidrogenasa (GDH).....	15
3.5.1.5. Actividad glutamina sintetasa (GS).....	15
3.5.2. Síntesis y degradación de azúcares.....	16
3.5.2.1. Actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6BPasa).....	16

3.5.2.2.	Actividad sacarosa fosfato sintasa (SPS).....	16
3.5.2.3.	Actividad sacarosa sintasa (SS).....	16
3.5.2.4.	Actividad invertasa ácida (IA) e invertasa neutra (IN).....	16
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1.	Efectos de la nutrición de Cl^- en el crecimiento y el desarrollo de las plantas	17
4.2.	Efectos de la nutrición de Cl^- en el contenido iónico y las diferentes formas de N en las plantas	19
4.3.	Efectos de la nutrición de Cl^- en las relaciones hídricas de las plantas	22
4.4.	Efectos de la nutrición de Cl^- en la absorción de NO_3^- y en el NUE en las plantas	24
4.5.	Efectos de la nutrición de Cl^- en la asimilación de C, y su interacción con el NO_3^- en las plantas	27
5.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	29
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

Tradicionalmente, el cloruro (Cl^-) se ha considerado un elemento perjudicial para la agricultura debido a los efectos tóxicos provocados en las plantas cuando éstas lo acumulan en grandes cantidades, y a la creencia de una interacción antagónica con el nitrato (NO_3^-), que perjudica su asimilación, reduciendo así el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, recientemente, se ha descubierto que el Cl^- actúa como macronutriente beneficioso, cuando éste es aplicado en plantas de tabaco en rango de milimolar (1-5 mM), mejorando su crecimiento y desarrollo, la eficiencia en el uso del agua, el rendimiento fotosintético y la eficiencia en el uso del nitrógeno. Esto podría facilitar la asimilación de NO_3^- , reduciendo su acumulación en las hojas, lo que podría aplicarse a otras plantas de interés agrícola, promoviendo así una agricultura más saludable y sostenible, ya que se minimizarían los efectos negativos causados por la fertilización excesiva de nitrógeno en el medioambiente. Por otro lado, la mejora en el rendimiento vegetal provocada por el Cl^- podría estar causada también por una posible interacción entre el metabolismo del nitrógeno y el carbono.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cloruro (Cl⁻) como micronutriente beneficioso para las plantas y su importancia en la naturaleza

El Cl⁻, anión del elemento halógeno cloro, se considera tradicionalmente como un micronutriente esencial para el crecimiento de las plantas, ya que se necesita en pequeñas cantidades (<50–100 μM) para el correcto desarrollo de éstas. Además, en condiciones de estrés salino, este ion se acumula de forma excesiva en los órganos sensibles vegetales, produciendo toxicidad en las plantas. Esto ha dado lugar a que, desde un punto de vista agrícola, el Cl⁻ se considere como un anión tóxico en lugar de un nutriente vegetal (Broyer et al., 1954).

El Cl⁻, como micronutriente, presenta varias funciones en las plantas y, debido a que es un anión móvil, la mayoría de éstas se relacionan con el equilibrio de carga eléctrica de cationes esenciales, como potasio (K⁺), calcio (Ca⁺) e hidrógeno (H⁺) en las células vegetales (Hänsch & Mendel, 2009). Por ello, el Cl⁻ está involucrado en la estabilización del potencial eléctrico de las membranas celulares, y en la regulación de los gradientes de pH (White & Broadley, 2001; Hänsch & Mendel, 2009).

En el cloroplasto, el Cl⁻ actúa como componente estructural del fotosistema II (PSII) (Kusunoki, 2007), participando así en su estabilización (Raven, 2017). Además, este ion también interviene en la regulación enzimática fotosintética, regulando enzimas como la asparagina sintasa (Rognes, 1980), la ATPasa de bombeo de protones en la vacuola (Churchill & Sze, 1984), y la α-amilasa (Metzler, 1979).

Además de las funciones descritas anteriormente, el Cl⁻ es un soluto osmóticamente activo en la vacuola, por lo que interviene en la regulación osmótica celular (Flowers, 1988). Esto se debe a que participa en la regulación de los procesos de turgencia celular, en la actividad de las células que controlan los movimientos násticos, y en el mecanismo de apertura y cierre estomático (White & Broadley, 2001; Broadley et al., 2012), mediados por flujos de Cl⁻, K⁺ y malato (Roelfsema & Hedrich, 2005). Por tanto, este ion se acumula en las células guarda, afectando indirectamente el crecimiento de las plantas mediante la regulación del movimiento de los estomas (Hänsch & Mendel, 2009).

El Cl⁻ se encuentra de forma abundante en los ecosistemas, por lo que su deficiencia en plantas resulta rara, ya que se deposita en los suelos a través del agua de lluvia, la aplicación de fertilizantes, las aguas de riego, el rocío marino, y el polvo y la contaminación del aire. Esto da

lugar a que las plantas puedan llegar a absorberlo en grandes cantidades, provocando así toxicidad (Xu et al., 2000; White & Broadley, 2001).

Las plantas absorben el Cl^- junto con el agua del suelo (Moya et al., 2003) y, una vez dentro de éstas, viaja vía simplástica hacia el xilema y, de ahí, hasta los órganos de la parte aérea (Kohler & Raschke, 2000; Gilliam & Tester, 2005). Esta absorción, en condiciones no salinas, se produce por la entrada activa de Cl^- en las células radicales por gradiente electroquímico (Sanders & Hansen, 1981; Geilfus, 2018), a través de proteínas que actúan como canales aniónicos de membrana, mediante un mecanismo simporte de $\text{Cl}^-/2\text{H}^+$. Por el contrario, en condiciones salinas (de toxicidad), el Cl^- entra pasivamente en las células radicales, lo que provoca un aumento de Cl^- citosólico (Geilfus, 2018). Como consecuencia, en la agricultura, la presencia de Cl^- en los fertilizantes se considera como un indicador negativo de calidad (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2019). Sin embargo, recientemente, se ha descubierto que el Cl^- se puede acumular en las hojas de las plantas de tabaco a nivel de macronutriente (40–110 mM en el extracto de hoja a granel, es decir, en concentraciones de 10-100 veces mayor de la requerida como micronutriente esencial), cuando se aplica en rango milimolar (1-5 mM), de forma insuficiente como para producir toxicidad en las plantas (Colmenero-Flores et al., 2019; Franco-Navarro et al., 2016). Cabe destacar que esta acumulación requiere un gasto considerable de energía para las células vegetales, por ello, se piensa que el Cl^- podría tener un papel biológico más amplio en el crecimiento y el desarrollo de las plantas, comportándose de manera beneficiosa, con nuevas funciones biológicas, además de las funciones que presenta como micronutriente (Franco-Navarro et al., 2016; Geilfus, 2018).

Debido a todo lo mencionado anteriormente, el Cl^- se ha definido como un macronutriente beneficioso, ya que estimula el crecimiento de las plantas cuando se acumula en un rango de concentración de 1-5 mM y, además, es un micronutriente esencial (Franco-Navarro et al., 2016, 2019; Colmenero-Flores et al., 2019).

1.2. El Cl^- como macronutriente beneficioso para las plantas

Recientemente, se ha observado que el Cl^- , cuando es suministrado a una concentración propia de macronutriente (5 mM), provoca alteraciones en los parámetros anatómicos y celulares en plantas de tabaco (Figura 1). Por ejemplo, aumenta el área foliar y la expansión de los brotes, lo que ayuda a una mejor intercepción de la luz; estimula el crecimiento de las células

epidérmicas, mesofílicas, protectoras y tricomas de las hojas; y aumenta la turgencia celular (Franco-Navarro et al., 2016), debido a que estimula específicamente la ATPasa del tonoplasto, lo que ayuda a la compartimentalización del Cl^- en la vacuola haciendo que el potencial osmótico de las células vegetales sea más negativo (Churchill & Sze, 1984). Además de estas alteraciones, hay que añadir que el Cl^- altera la disposición de los cloroplastos en los espacios aéreos intercelulares, e incrementa el tamaño y disminuye la densidad de los estomas, aumentando la superficie del poro estomático, lo que provoca en las plantas una menor apertura de los estomas (Franco-Navarro et al., 2019). En resumen, este ion provoca una mayor proporción de cloroplastos que cubren la superficie celular del mesófilo, debido a una mayor superficie de cloroplastos expuestos al espacio aéreo intercelular de éstas en las hojas. Estos cloroplastos se ha observado que son más numerosos y pequeños, y contienen más gránulos de almidón, lo que supone una conexión entre la nutrición de Cl^- y la asimilación de carbono (C). Además, las células del mesófilo en empalizada son más grandes en comparación con plantas cultivadas con tratamientos SP (mezcla de sales de sulfato (SO_4^{2-}) y fosfato (PO_4^{3-})) (5 mM) y tratamientos N (sales de NO_3^-) (5 mM) (Franco-Navarro et al., 2019).

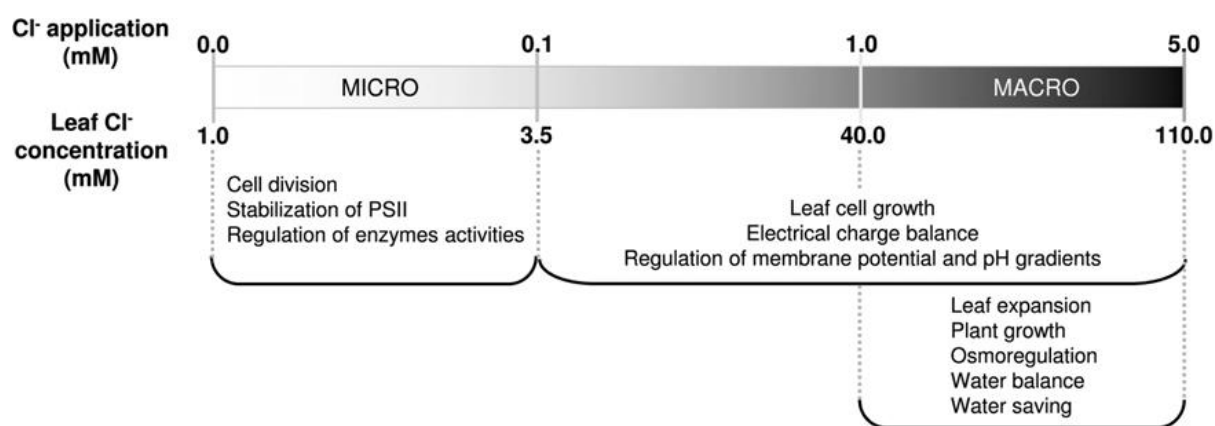


Figura 1. Representación esquemática de los efectos del Cl^- en plantas cuando se encuentra disponible en concentraciones de micro y macronutrientes, mostradas cuando se aplica de forma externa (0-5 mM Cl^-) y como concentración foliar (1-110 mM Cl^-) (Tomada de: Franco-Navarro et al., 2016).

Estos efectos se han relacionado con el descubrimiento de que el Cl^- , como macronutriente, aumenta el crecimiento y desarrollo, mejora el estado hídrico y la actividad fotosintética (Franco-Navarro et al., 2016, 2019), y promueve un uso más eficiente del nitrógeno (NUE) en

plantas de tabaco (Rosales et al., 2020), pudiendo estar relacionado con el metabolismo del C en las plantas, lo que se explica, a continuación, con más detalle.

1.2.1. Interacción entre el Cl⁻ y el nitrato (NO₃⁻) en plantas

1.2.1.1. Efectos del NO₃⁻ en la agricultura

El nitrógeno (N) es el principal macronutriente limitante para el crecimiento adecuado de las plantas terrestres (Frink et al., 1999). En concreto, el NO₃⁻ representa la principal fuente de N asimilable por las plantas, ya que participa en el control de muchos procesos fisiológicos y de desarrollo, mejorando así el rendimiento de los cultivos (Frink et al., 1999; Wang et al., 2012; Krapp et al., 2014; Guan, 2017). Durante décadas, esto ha dado lugar a un uso excesivo de NO₃⁻ en la agricultura mediante la aplicación de fertilizantes nitrogenados, químicos y orgánicos, en los cultivos (Kant, 2011), lo que ha provocado impactos negativos sobre el medioambiente, como la acidificación de los suelos y los recursos hídricos, la eutrofización de las aguas, el aumento de gases de efecto invernadero y la contaminación atmosférica, además, de que son perjudiciales para la biodiversidad y la salud humana (Motavalli et al., 2008).

1.2.1.2. El Cl⁻ en la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE) en plantas

Según Rosales et al. (2020), el NUE puede definirse como “el rendimiento de biomasa vegetativa o reproductiva por unidad de N disponible en el suelo”, y se mide en g PS g⁻¹ N. Hasta ahora, el efecto de la nutrición del Cl⁻ sobre la absorción y acumulación de NO₃⁻ se consideraba negativo, ya que se piensa que el Cl⁻ reduce el NUE y limita la absorción y acumulación del NO₃⁻ en las plantas (Xu et al., 2000; Anjana & Iqbal, 2007; Wege et al., 2017). Sin embargo, al contrario que el NO₃⁻, el Cl⁻ no se metaboliza, y su acumulación en la vacuola requiere un costo menor de energía para las células vegetales que la acumulación de NO₃⁻ (Wege et al., 2017).

Tanto el Cl⁻ como el NO₃⁻ son los aniones inorgánicos más abundantes, y ambos presentan propiedades físicas y osmorreguladoras similares. Además, ambos comparten mecanismos de transporte (Colmenero-Flores et al., 2019), ya que se ha demostrado que la presencia de NO₃⁻ en el suelo inhibe la absorción radicular de Cl⁻, y, por el contrario, un alto contenido en Cl⁻ disminuye la acumulación de NO₃⁻, mostrando así fuertes interacciones dinámicas en las plantas (Wege et al., 2017). De hecho, recientemente, se ha descubierto que el Cl⁻, cuando actúa a nivel de macronutriente, aumenta el crecimiento y la biomasa vegetal, lo que indica que mejora el

NUE en las plantas cuando se usa NO_3^- como única fuente de N (Flowers, 1988; Colmenero-Flores et al., 2019).

El efecto beneficioso de la nutrición del Cl^- no solo se presenta en plantas de tabaco, sino que existe una interacción positiva generalizada entre éste y el NUE en otras plantas terrestres. En cultivos como tomate, lechuga, espinaca, olivo, acelga y mandarina, la fertilización con Cl^- reduce la acumulación de NO_3^- en las hojas. Esto indica que el efecto beneficioso del Cl^- , como macronutriente, en el crecimiento y desarrollo vegetal y en el NUE, podría generalizarse en la agricultura en otras plantas cultivadas. Así, se reducirían los riesgos que la acumulación de NO_3^- en las hojas genera en la salud humana, y se minimizaría el uso de fertilizantes nitrogenados, disminuyendo así la contaminación de que éstos generan en el ecosistema (Rosales et al., 2020).

1.2.1.3. Asimilación de NO_3^- en plantas

Las plantas absorben el NO_3^- por las raíces, donde sólo una pequeña parte es absorbida y asimilada. El resto del NO_3^- es transportado, a través del xilema, a la parte aérea para poder ser asimilado y acumulado (Monza & Márquez, 2004).

En el citoplasma de las células foliares, el NO_3^- se reduce a nitrito (NO_2^-) por la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR), y éste se transporta al cloroplasto, donde se reduce a amonio (NH_4^+) por la acción de la nitrito reductasa (NiR) (Bowsher et al. 2008). El NH_4^+ se incorpora a una molécula de glutamato produciendo glutamina por la acción de la glutamina sintetasa (GS), y dicha glutamina se incorpora a una molécula de 2-oxoglutarato para formar dos moléculas de glutamato, en una reacción catalizada por la glutamato sintasa (GOGAT). Este proceso constituye lo que se conoce como ciclo GS/GOGAT. El glutamato generado pasará a formar parte de otras moléculas organonitrogenadas, como proteínas y aminoácidos (N orgánico), que forman parte de los componentes celulares y estructurales de las plantas (Lea & Miñin, 1974) (Figura 2).

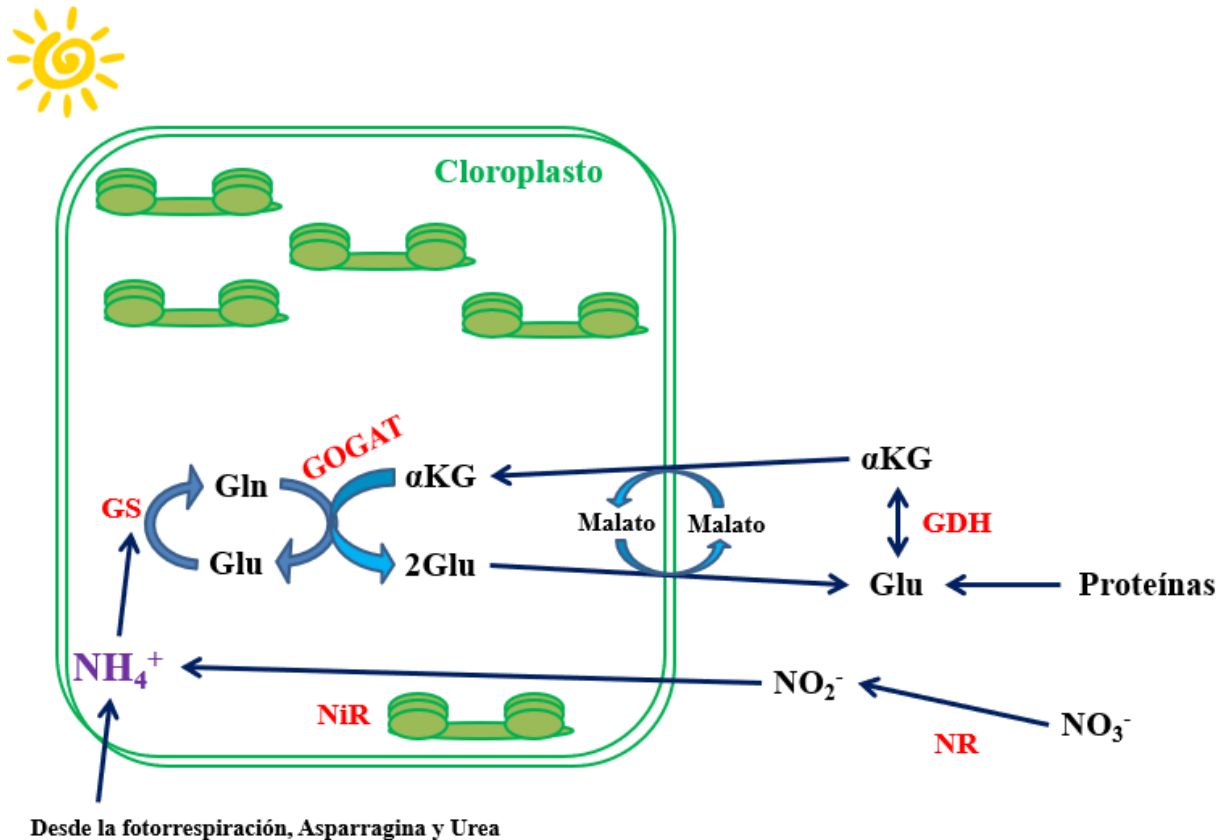


Figura 2. Esquema de la asimilación de N en las células vegetales. Glutamina sintasa (GS); glutamato sintasa (GOGAT); glutamato deshidrogenasa (GDH); nitrato reductasa (NR); nitrito reductasa (NiR) Gln (glutamina), Glu (glutamato); α KG (α -cetoglutarato) (Modificada de: Blasco León, 2010).

El glutamato procedente de la degradación de las proteínas puede ser desaminado por acción de la glutamato deshidrogenasa (GDH), produciendo NH_4^+ . La GDH también cataliza la reacción en sentido opuesto, esto es, sintetizando glutamato mediante la aminación reductiva del 2-oxoglutarato (Lea & Mifflin, 1974).

Cabe destacar que la funcionalidad del ciclo GS/GOGAT depende de energía, poder reductor y esqueletos carbonatados para formar el 2-oxoglutarato, lo que supone otra conexión entre el metabolismo del N y del C (Lea & Mifflin, 1974).

1.2.2. Interacción entre el Cl^- y el carbono (C) en plantas: efectos de la nutrición de Cl^- en la fotosíntesis

Existen canales aniónicos que presentan un mecanismo simporte $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$, localizados en el tonoplasto de las células guarda que exhiben una alta permeabilidad para Cl^- sobre NO_3^- . Durante la apertura estomática, estos transportadores acumulan Cl^- en las vacuolas de las células

guarda, provocando así que éste actúe como anión osmóticamente activo y genere el aumento de volumen de estas células (Kusumi et al., 2017), lo que es esencial para el movimiento de los estomas (Jossier et al., 2010).

Las envolturas del cloroplasto y de la membrana del tilacoide también presentan canales aniónicos para Cl^- . Cuando la planta recibe la luz solar al amanecer, entra Cl^- desde el estroma al lumen, produciéndose un aumento del volumen del tilacoide. Por el contrario, la exclusión de Cl^- al estroma hace que el volumen del tilacoide disminuya al atardecer, debido a la falta de luz. Esto ha sugerido la posibilidad de que el Cl^- intervenga en la adecuada regulación de la osmolaridad y el crecimiento del cloroplasto. Además, los flujos de Cl^- también juegan un papel importante en la regulación del transporte de electrones fotosintéticos y en los mecanismos fotoprotectores en los cloroplastos. La acumulación de protones en el lumen tilacoidal está eléctricamente contrarrestada por la entrada de Cl^- , lo que indica que éste regula la generación del gradiente de pH entre el lumen y el estroma del cloroplasto. Por tanto, el Cl^- , como macronutriente, es esencial para el correcto funcionamiento del cloroplasto gracias a que regula el volumen del tilacoide y el movimiento estomático durante la fotosíntesis, por lo que interviene en el correcto funcionamiento de la fotosíntesis (Franco-Navarro et al., 2019), y podría estar afectando al metabolismo del C en las plantas.

1.2.2.1. Asimilación de C en plantas

Las plantas terrestres capturan el dióxido de carbono (CO_2) procedente de la atmósfera a través de los estomas, cuyo aceptor es la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP). En las células vegetales, éste CO_2 se reduce para formar carbohidratos en el estroma de los cloroplastos mediante el ciclo de Calvin, es decir, se fija para incorporarse al metabolismo de las plantas. Para ello, son necesarias tres moléculas de CO_2 , de manera que el C pueda avanzar hacia la síntesis de carbohidratos, junto con la regeneración completa de RuBP, y, finalmente, originar triosas fosfatos (gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato), que son utilizadas para la síntesis de sacarosa y almidón (productos finales de la fotosíntesis) (Gil et al., 2008) (Figura 3).

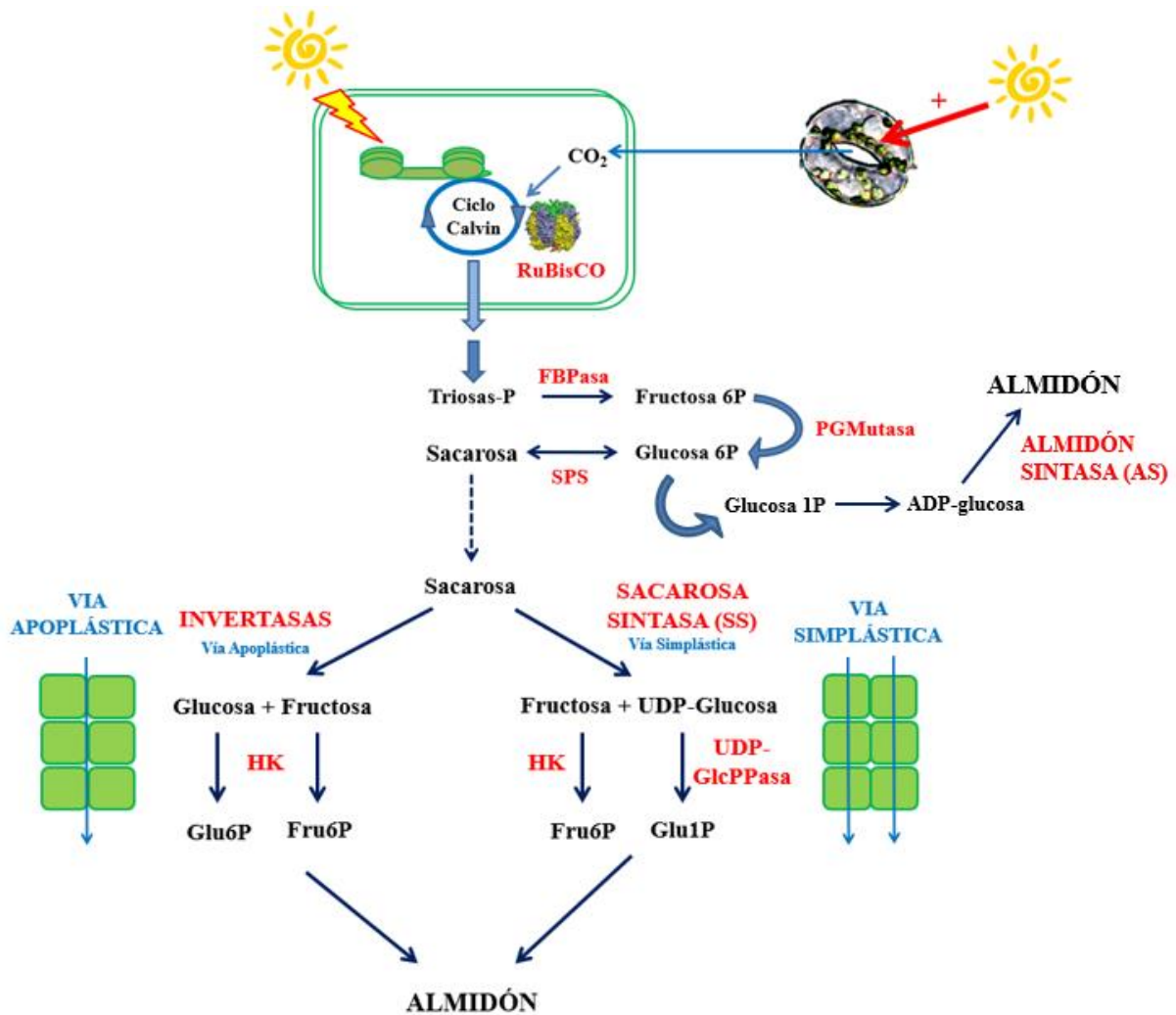


Figura 3. Esquema de la formación de almidón y sacarosa en plantas. Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa (RuBisCO); fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPa); fosfoglucomutasa (PGMutasa); sacarosa fosfato sintasa (SPS); UDP-glucosa pirofosforilasa (UDP-GlcPPasa); hexoquinasas (HK) (Modificada de: Blasco León, 2010).

En el cloroplasto, las triosas fosfato originadas por el ciclo de Calvin se transforman, por la enzima aldolasa, en fructosa-1,6-bisfosfato, y ésta en fructosa-6-fosfato por acción de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6BPasa), junto con la liberación de agua y fósforo inorgánico. La fructosa-6-fosfato, por isomerización, se transforma en glucosa-6-fosfato, y ésta en glucosa-1-fosfato. A continuación, la glucosa-1-fosfato se transforma en ADP-glucosa (glucosa dependiente de ADP), y, finalmente, la ADP-glucosa dará lugar a la formación de almidón, a través de la enzima almidón sintasa (AS) (Beck & Ziegler, 1989; Kaplan et al., 2006; Lu & Sharkey, 2006) (Figura 3).

Por otro lado, en el citosol, las triosas fosfatos pueden seguir otra vía distinta, en la que la glucosa-1-fosfato se transforma en UDP-glucosa (glucosa dependiente de uridín difosfato), y ésta en sacarosa fosfato por la sacarosa fosfato sintasa (SPS), lo que dará lugar a la formación de sacarosa por la misma enzima mediante la liberación de fosfato inorgánico (Huber et al., 1993; Sasaki et al., 2005). Una vez sintetizada, la sacarosa puede hidrolizarse en la célula vegetal en glucosa y fructosa, por la acción unas enzimas llamadas invertasas, la invertasa ácida (IA) y la invertasa neutra (IN), o escindir-se en UDP-glucosa y fructosa por la enzima sacarosa sintasa (SS) (Dieu-aide-Noubhani et al., 2007) (Figura 3).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es plantear los posibles mecanismos por los que la nutrición de Cl⁻ (en rango milimolar) aumenta la disponibilidad de NO₃⁻ en plantas de tabaco, promoviendo así un uso más eficiente de N, y exponer los efectos de la acumulación foliar de Cl⁻, y las nuevas funciones de éste como macronutriente beneficioso para las plantas:

- 1) Determinar los efectos de la nutrición de Cl⁻ sobre los parámetros hídricos y de desarrollo de plantas tratadas con distintos tratamientos con ratio Cl:SP ascendente.
- 2) Analizar los efectos de la nutrición de Cl⁻ sobre el contenido iónico, las diferentes formas de N, y sobre la modulación de las actividades enzimáticas relacionadas con la asimilación de NO₃⁻.
- 3) Relacionar la nutrición de Cl⁻ con el metabolismo del C y del N.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. Habana), la cuales fueron tratadas con 5 tratamientos nutricionales distintos que contenían concentraciones de Cl⁻ ascendente (Tabla 1). Se realizaron 6 réplicas biológicas independientes por cada tratamiento, es decir, 30 plantas en total, que se cultivaron durante 68 días después de siembra (DDS) en condiciones experimentales de invernadero: 24 ± 2°C / 17 ± 2°C (día/noche), humedad relativa del 60 ± 10% (registrador de datos EL-1-USB, Lascar Electronics Inc., Erie, PA, EEUU), y un fotoperíodo de 16 h/8 h con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos

(PAR promedio) de 300-350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sensor cuántico, LI-6400; Li-COR, Lincoln, NE, EEUU), y una emisión luminosa de 9000-10000 lux (Digital Lux Meter, LX1010B; Carson Electronics, Valemount, Canadá) (Franco-Navarro et al., 2016). En cada tratamiento se utilizó una solución SP equivalente para garantizar un equilibrio catiónico similar a la concentración de Cl^- en cada caso. Además, todos los cationes se encuentran balanceados entre los 5 tratamientos, así las diferencias que encontramos en las plantas se deberán exclusivamente a las diferencias entre los aniones. Por último, todas las soluciones experimentales se ajustaron a pH 5,6-5,9 con KOH (rango de pH óptimo en el que se absorben mejor los nutrientes minerales).

Tabla 1. Tratamientos nutricionales con ratios de Cl:SP ascendente.

Tratamiento (Cl:SP)	Concentración de iones (mM)							
	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	NO_3^-	SO_4^{2-}	PO_4^{3-}
1 (0:8)	0,1	9,28	2,6	2,6	0,075	8	3,2	4,8
2 (0,5:7)	0,1	9,2	2,56	2,56	0,575	8	3	4,5
3 (2:6)	0,1	8,96	2,45	2,45	2,075	8	2,4	3,6
4 (4:4)	0,1	8,64	2,3	2,3	4,075	8	1,6	2,4
5 (6:2)	0,1	8,32	2,15	2,15	6,075	8	0,8	1,2

Para la germinación de las semillas, éstas se vernalizaron en cámara fría a 4-7 °C durante 3-4 días, para sincronizar su germinación. Una vez vernalizadas, se sembraron en alveolos de 4 cm x 4 cm x 10 cm (3-4 semillas por alveolo, 12 alveolos por tratamiento), los cuales contenían arena tamizada previamente lavada con agua destilada, para evitar la presencia de Cl^- u otros elementos. Cada alveolo se regó, en cada caso, con la solución nutritiva del tratamiento correspondiente, y se transfirieron al invernadero.

A los 15 DDS, se realizó el trasplante a macetas más grandes (6 macetas por tratamiento), de 7.5 L (20 cm x 17 cm x 25 cm). Dichas macetas contenían una mezcla, medida en volumen, de vermiculita:perlita (70:30) como sustrato, el cual fue lavado previamente con agua destilada.

En el invernadero, todas las plantas se regaron (cada 3-4 días) siguiendo un régimen semihidropónico, y fueron rotando a su vez en el sentido de las agujas del reloj, procurando así que todas ellas estuvieran en las mismas condiciones ambientales y lumínicas durante todo su crecimiento.

Debido a causas provocadas por las restricciones tras la pandemia de la *COVID-19*, no se ha podido realizar el muestreo y la parte de los análisis experimentales de este trabajo. Se describe a continuación la metodología propuesta para el desarrollo de los objetivos.

A los 68 DDS se muestrean las plantas, en concreto, se toman muestras de las hojas maduras, completamente fotosintéticas y expandidas (no senescentes), de la parte media (Franco-Navarro et al., 2016), tallo y raíces. Una parte de las hojas cosechadas se congela inmediatamente con N₂ líquido, y éstas se mantienen a -80°C hasta su uso (Rubio-Wilhelmi et al., 2012). El resto del material vegetal se seca en un horno de aire forzado a 75°C durante 48 horas, y los tejidos secos se muelen en polvo usando un homogeneizador (Taurus, 25 790 Barcelona, España) (Franco-Navarro et al., 2016). Es necesario que las muestras se preserven en ambas formas (tejido congelado o seco) para la realización de los posteriores análisis.

3.2. Determinación de parámetros hídricos y de crecimiento

3.2.1. Peso fresco (PF) y peso seco (PS)

Para determinar el peso fresco (PF), a partir del trasplante a macetas a los 15 DDS, éstas se pesan cada semana hasta los 68 DDS, determinando así cómo varía el PF con el tiempo. Esto se realiza mediante métodos gravimétricos, y cuando el sustrato está a capacidad de campo (100% CC). La diferencia de peso que se obtiene entre macetas en CC al inicio y al final del experimento corresponderá al incremento de PF total de las plantas (medido en g). Además, durante todo el muestreo (15-68 DDS), han de tomarse las medidas de PF tanto de la de la parte aérea (hojas y tallos), como de la de raíces (Franco-Navarro et al., 2016).

Por otro lado, para determinar el peso seco (PS), las muestras de los tejidos secos en polvo de cada planta se pesan, obteniéndose así el PS (medido en g) (Franco-Navarro et al., 2016).

3.2.2. Eficiencia intrínseca del uso del agua (WUE)

La eficiencia intrínseca del uso del agua (WUE) en las hojas se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$WUE (\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}) = A_N/g_s$$

siendo A_N la tasa fotosintética neta (medida en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y g_s la conductancia estomática (medida en $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Franco-Navarro et al., 2016).

3.3. Determinación del contenido de nutrientes minerales

3.3.1. Determinación de Cl^- , fósforo (PO_4^{3-}) y sulfato (SO_4^{2-})

Para determinar el contenido de Cl^- , puede seguirse el método propuesto por Gilliam (1971), para ello, se usa un cloridómetro que permite medir la concentración de Cl^- en la muestra resultante, mediante valoración de iones de plata (Franco-Navarro et al., 2016).

El contenido de PO_4^{3-} puede determinarse mediante el método de Hogue et al. (1970), por el cual puede medirse el PO_4^{3-} inorgánico (P_i) soluble y el P_i soluble total, calculándose éste último como la suma del PO_4^{3-} orgánico (P_o) soluble y el P_i soluble. Por otro lado, la determinación de SO_4^{2-} puede llevarse a cabo siguiendo el método de Novozamsky & Van Eck (1977), donde, una vez obtenida la mezcla resultante, se procede a la lectura de su absorbancia a 440 nm frente a una curva patrón con concentraciones conocidas de sulfato.

3.3.2. Determinación de las distintas formas de nitrógeno (N)

Para determinar el NO_3^- y el NH_4^+ soluble, se realiza una extracción de nutrientes solubles, es decir, una extracción con agua. Esto es debido a que el tejido vegetal se ha visto sometido a una elevada temperatura al secarse en un horno, lo que provoca que ocurran procesos de volatilización del NO_3^- , quedando únicamente el N orgánico en la muestra (Blasco León, 2010).

Para cuantificar el contenido de NO_3^- (expresado en mg g^{-1} PS) puede usarse el método propuesto por Cataldo et al. (1975), por el que se obtiene una muestra que se usa para la lectura de la absorbancia a 410 nm frente a una curva patrón de NO_3^- .

El contenido de N orgánico (expresado en mg g^{-1} PS) puede determinarse mediante el método de Krom (1980), a partir del sobrenadante usado para determinar el contenido de NO_3^- . Una vez obtenida las muestras, se mide la absorbancia a 630 nm y se compara frente a una curva de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Krom, 1980).

El contenido de NH_4^+ soluble (expresado en mg g^{-1} PS) se determina de la misma forma que el contenido de N orgánico, salvo que aquí la alícuota se toma de la extracción de macronutrientes directamente, y se compara con una curva patrón $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Blasco León, 2010).

3.4. Determinación de parámetros relacionados con el NUE

El contenido total de N (TNC) (medido en mg g^{-1} PS), representa la suma de los contenidos de N orgánico y NO_3^- , mientras que el contenido total de N asimilado (TNA) (medido en mg de N) se calcula mediante la suma de N orgánico y NH_4^+ (Blasco León, 2010).

Por otro lado, el NUE se divide a su vez en dos parámetros: la eficiencia de la utilización del N (NUtE), que es la fracción de N adquirido por la planta que se transformará en biomasa total o rendimiento de grano; y la eficiencia en la absorción de N (NUpE), definida como la capacidad de las raíces de las plantas para tomar N del suelo (Xu et al., 2012; Rosales et al., 2020). Éstos se calculan mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{NUtE (g PS mg}^{-1}\text{ N)} = \text{PS total/TNC}$$

$$\text{NUpE (mg de N g}^{-1}\text{ PS}_r\text{)} = \text{TNA/PS}_r$$

siendo PS_r el peso seco de la raíz (Rosales et al., 2020).

3.5. Determinación de actividades enzimáticas

3.5.1. Enzimas del metabolismo del N

3.5.1.1. Actividad *in vitro* de la nitrato reductasa (NR)

La actividad enzimática *in vitro* de la NR (expresada como $\mu\text{mol de NO}_2^-$ formados (mg proteína^{-1} (min^{-1})), puede determinarse siguiendo los métodos de Hageman & Hucklesby (1971) y Kaiser & Lewis (1984), mediante los cuales se mide la formación de NO_2^- en el medio de reacción. Tras la extracción enzimática, la muestra obtenida se usa para medir la absorbancia a 540 nm en placas multipocillos. Para conocer la concentración de NO_2^- correspondiente, se realiza una recta de calibrado elaborada en las mismas condiciones, con concentraciones de NO_2^- conocidas.

3.5.1.2. Actividad *in vitro* de la nitrito reductasa (NiR)

La actividad enzimática *in vitro* de la NiR (expresada como $\mu\text{mol NO}_2^-$ desaparecidos (mg proteína^{-1} (min^{-1})) se puede determinar siguiendo los métodos de Groat & Vance (1981), Lillo (1984) y Singh & Srivastava (1986). Una vez realizada la extracción enzimática, se mide la absorbancia a 540 nm de la muestra obtenida, midiendo la desaparición de NO_2^- del medio de reacción.

3.5.1.3. Actividad glutamato sintasa (GOGAT)

La glutamato sintasa (GOGAT) cataliza la transferencia reductiva del grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato para producir dos moléculas de glutamato. La isoforma NADH-GOGAT que usa NADH en la reacción se puede medir como $\mu\text{mol NADH oxidados (mg proteína)}^{-1} (\text{min})^{-1}$. Para determinar la actividad GOGAT se puede seguir las metodologías propuesta por Groat & Vance (1981) y Singh & Srivastava (1986), realizando el ensayo en placas multipocillos. Después de la extracción, se realiza un análisis espectrofotométrico de la muestra obtenida, midiendo la variación de absorbancia a 340 nm durante intervalos de tiempo de 3 min.

3.5.1.4. Actividad glutamato deshidrogenasa (GDH)

La enzima GDH cataliza la reacción de oxidación del glutamato a 2-oxoglutarato desprendiéndose amoníaco, también cataliza la reacción en sentido opuesto, esto es, sintetizando glutamato mediante la aminación reductiva del 2-oxoglutarato. Existen dos isoformas, dependiendo si utiliza NADH o NADPH. En este caso, se trataría de la isoforma EC 1.4.1.2, que usa NADH para la oxidación de glutamato a 2-oxoglutarato, por lo que la actividad GDH puede medirse como $\mu\text{mol NADH oxidados (mg proteína)}^{-1} (\text{min})^{-1}$, al igual que la actividad GOGAT (Farnden & Robertson, 1980; Groat & Vance, 1981; Singh & Srivastava, 1986).

Para la determinación de la actividad GDH puede seguirse los métodos propuestos por Farnden & Robertson (1980), Groat & Vance (1981), Kaiser & Lewis (1984) y Lillo (1984), realizando el ensayo en placas multipocillos. Con la muestra obtenida se realiza un análisis espectrofotométrico, midiendo la variación de absorbancia a 340 nm durante intervalos de tiempo de 3 min.

3.5.1.5. Actividad glutamina sintetasa (GS)

La actividad GS se determina mediante el ensayo de transferasa en el que se mide la aparición de γ -glutamihidroxamato, y puede expresarse como $\mu\text{mol } \gamma\text{-glutamihidroxamato (mg proteína)}^{-1} (\text{min})^{-1}$ (Kaiser & Lewis, 1984).

La actividad GS puede determinarse siguiendo los métodos propuestos por Kaiser & Lewis (1984) y González et al. (1995). Una vez obtenida la muestra, se mide la absorbancia a 540 nm, y se calcula la actividad GS a partir de una recta de calibrado preparada con concentraciones conocidas de γ -glutamihidroxamato.

3.5.2. Síntesis y degradación de azúcares

3.5.2.1. Actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6BPasa)

Para determinar la actividad F1,6BPasa, se realiza una extracción enzimática por el método de Holaday et al. (1992), tras la cual, la mezcla resultante se incuba a 25°C durante 10 min en oscuridad, y se le añade ácido tricloroacético (TCA) al 30% para detener la reacción. Por último, se analiza el fosfato inorgánico (Pi) liberado siguiendo el método de Geladopoulos et al. (1991). Una vez obtenida la muestra, se mide la absorbancia a 630 nm.

3.5.2.2. Actividad sacarosa fosfato sintasa (SPS)

La extracción de la enzima SPS puede llevarse a cabo por el método propuesto por Hubbard et al. (1989). Se determina la absorbancia a 520 nm de la muestra obtenida, y se calcula la actividad de la SPS a partir de una recta patrón de sacarosa (Cheikh & Brenner, 1992).

3.5.2.3. Actividad sacarosa sintasa (SS)

La actividad SS se define como la producción de UDP en la síntesis de sacarosa, debido a la rotura de la UDP-glucosa, y puede determinarse mediante la utilización de un ensayo acoplado a la piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa. Para ello, primeramente se realiza una extracción enzimática mediante el método de Zhu et al. (1997). Una vez obtenido el sobrenadante, se registra la oxidación de NADH mediante determinación espectrofotométrica del NAD⁺ producido, midiendo la absorbancia a 340 nm y pH 7 (Morell & Copeland, 1985).

3.5.2.4. Actividad invertasa ácida (IA) e invertasa neutra (IN)

Para la determinación de la actividad invertasa, que puede expresarse como $\mu\text{moles de glucosa producidos (min)}^{-1}$, puede seguirse el método propuesto por Schwimmer et al. (1961). A continuación, puede determinarse la glucosa liberada en la muestra obtenida espectrofotométricamente a 340 nm usando el kit de test de glucosa de Sigma. La glucosa producida se cuantifica como la diferencia existente entre el extracto crudo después y antes de la incubación (Zhu et al., 1997).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los experimentos y resultados mostrados en este trabajo corresponden a los resultados preliminares obtenidos por Juan D. Franco-Navarro, durante el desarrollo de su tesis doctoral, del grupo de investigación del Dr. José Manuel Colmenero Flores, perteneciente al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC). Mi objetivo en este proyecto era la reproducción de éstos con el fin de explorar, posteriormente, el efecto de la nutrición de Cl^- sobre el metabolismo del N y C en las plantas, por lo que, después de haber presentado una descripción de las técnicas y análisis necesarios para su obtención, discutiré estos resultados preliminares obtenidos, así como el posible efecto de la nutrición de Cl^- sobre los metabolismos del N y C, a fin de plantear nuevas perspectivas de trabajo.

4.1. Efectos de la nutrición de Cl^- en el crecimiento y el desarrollo de las plantas

Los 5 tratamientos utilizados fueron elegidos con el objetivo de averiguar qué proporción de $\text{Cl}^-:\text{SP}$ promueve el uso más eficiente de N en las plantas, manteniendo a su vez la concentración de cationes y NO_3^- constante en todo momento. En la Figura 4 se muestran los resultados referidos a los parámetros de crecimiento e hídricos en las plantas de tabaco, donde se observa un incremento significativo del PF y PS total (Figura 4A y 4B, respectivamente), tanto de la parte aérea (Figura 4C y 4D) como de las raíces (Figura 4E y 4F), cuando la concentración de Cl^- aumenta y la de NO_3^- se mantiene constante (8 mM) en las soluciones de riego, siendo mayor, en todos los casos, en las plantas tratadas con el tratamiento 6Cl:2SP.

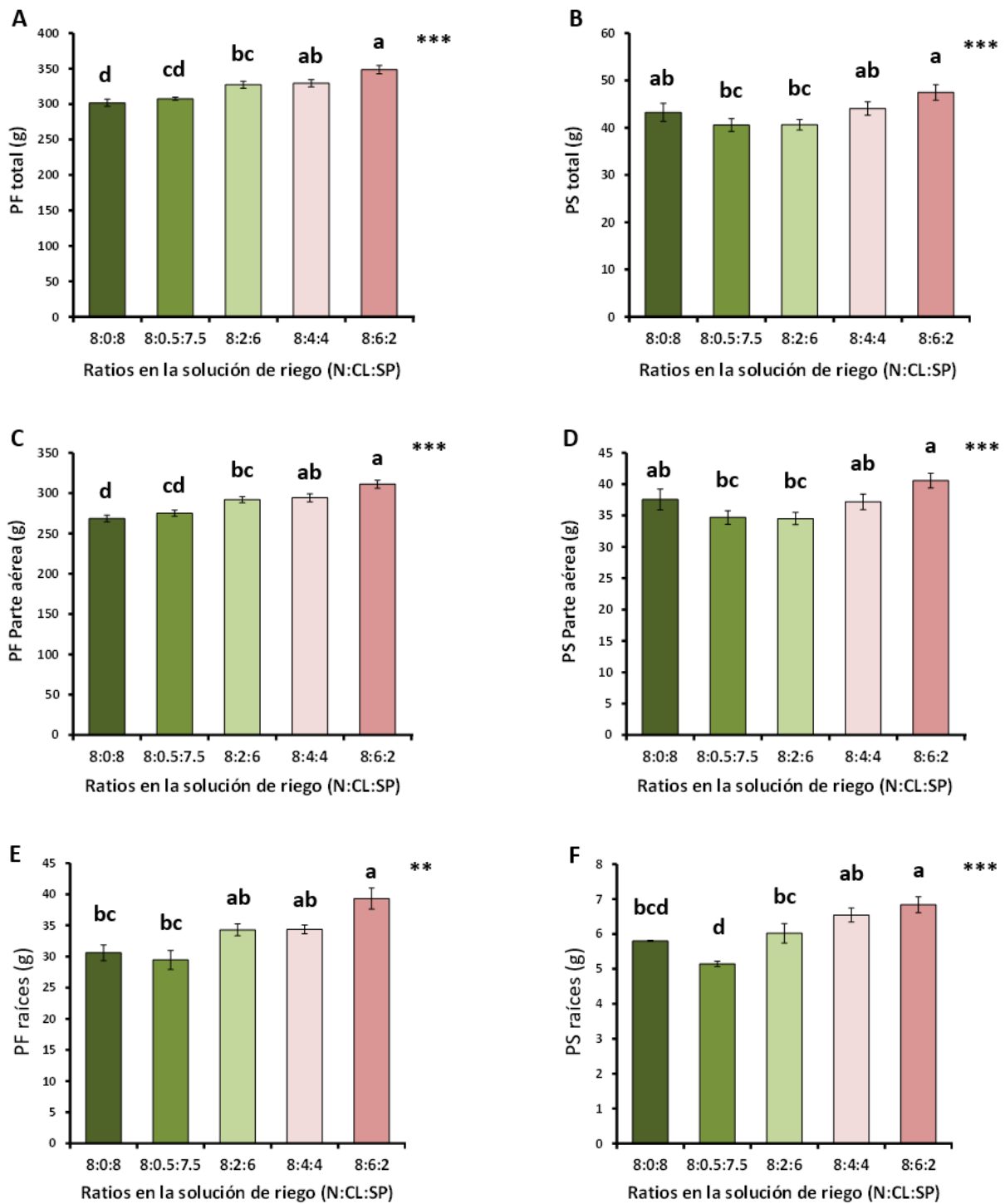


Figura 4. Medida en g de la biomasa fresca y seca de las plantas de tabaco con tratamientos nutricionales con ratios de Cl:SP ascendente: concentraciones crecientes de Cl^- (0-6 mM), y concentraciones decrecientes de $\text{SO}_4^{2-} + \text{PO}_4^{3-}$ (8-2 mM), mientras se mantiene constante la concentración de NO_3^- (8 mM). (A, B) PF y PS total, (C, D) PF y PS de la parte aérea, (E, F) PF y PS de las raíces, respectivamente. Niveles de significación: ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. Las estadísticas de "grupo homogéneo" se calcularon mediante pruebas ANOVA y multivariadas (MANOVA), donde los valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Tukey.

Estos resultados pueden deberse a la estimulación de un mayor tamaño celular y crecimiento de las hojas y raíces provocada por el Cl^- cuando se aplica en concentraciones de macronutriente, tal y como se plantea en los estudios de Franco-Navarro et al. (2016, 2019). En éstos se ha visto que plantas de tabaco tratadas con Cl^- (5 mM) presentan una mayor tasa de crecimiento relativo (aumento de PS total, de hojas, tallos y raíz, a lo largo del tiempo de muestreo) y mayor biomasa, así como un mayor tamaño celular y crecimiento de las hojas, en comparación con plantas de tabaco cultivadas con tratamientos SP (5 mM). Sin embargo, esto no ocurrió con las plantas cultivadas con tratamientos N (5 mM), que exhibieron la mayor biomasa como consecuencia de la fertilización extra por N, lo que dio lugar a una mayor asimilación de CO_2 y una fuerte estimulación de la división celular y el crecimiento de los órganos vegetativos (Franco-Navarro et al., 2016).

4.2. Efectos de la nutrición de Cl^- en el contenido iónico y las diferentes formas del N en las plantas

Para demostrar que el Cl^- se acumula a concentración de macronutriente en los tejido foliares, es necesario un análisis del contenido iónico de las plantas. En el estudio de Rosales et al. (2020), se muestra el contenido de iones de plantas de tabaco sometidas a 3 tratamientos nutricionales: CL (Cl^- 5 mM), N (NO_3^- 5 mM) y SP (5 mM) (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de iones foliares en plantas de tabaco sometidas a diferentes tratamientos (Modificada de: Rosales et al., 2020).

Tratamientos	Contenido de iones (mg g^{-1} PS)						
	Cl	NO_3^-	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}
SP	0.42 ± 0.04 b	2.24 ± 0.43 b	13.92 ± 0.18 a	35.01 ± 2.40 a	48.41 ± 2.32	14.25 ± 1.34	8.16 ± 1.11
N	0.56 ± 0.07 b	10.24 ± 0.58 a	10.37 ± 0.19 b	11.91 ± 0.96 b	49.24 ± 2.36	15.63 ± 0.63	7.41 ± 0.80
CL	55.10 ± 1.05 a	1.03 ± 0.07 c	11.07 ± 0.12 b	12.31 ± 0.15 b	49.56 ± 1.84	15.29 ± 2.16	7.69 ± 0.77
Valor de P	***	***	***	***	ns	ns	ns

Los tratamientos consistieron en una solución nutritiva basal suplementada con 5 mM Cl^- (CL), 5 mM NO_3^- (N), o una mezcla de sales de $\text{SO}_4^{2-} + \text{PO}_4^{3-}$ (SP) que contenía el mismo equilibrio catiónico que en los suplementos CL y N. Niveles de significación: $P > 0.05$ (ns, diferencias no significativas); $P \leq 0.001$ (***). Las estadísticas del "grupo homogéneo" se calcularon mediante ANOVA.

Estos resultados mostraron que las plantas tratadas con Cl^- (5 mM) acumularon este ion a nivel de macronutriente, al igual que el K^+ . Además, el contenido foliar de Cl^- en las plantas CL fue mayor que el contenido de NO_3^- y $\text{SO}_4^{2-} + \text{PO}_4^{3-}$ en las plantas N y SP, respectivamente. Cabe destacar que, en las plantas N y SP, tratadas con bajos niveles de Cl^- , el contenido foliar de este ion supero el umbral de concentración de deficiencia crítica reportada para el Cl^- en plantas no halófitas ($<0,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$), por lo que las plantas N y SP satisfacían los requisitos de Cl^- sin presentar deficiencia de este ion. Por tanto, estos resultados mostraron que, cuando se cultivan plantas de tabaco con tratamientos con Cl^- a niveles de macronutriente, éste estimula su crecimiento y, por el contrario, cuando son tratadas con bajo contenido de Cl^- (a nivel de micronutriente, tratamientos N y SP) se descarta la aparición de deficiencia de este ion en las plantas (Rosales et al., 2020).

La Figura 5 muestra el contenido de las distintas formas de N presentes en las plantas de tabaco. En la Figura 5A se ve un efecto campana en el contenido de N orgánico a medida que aumenta la concentración de Cl^- en la solución nutritiva, donde 2 mM de Cl^- inducen la formación de N orgánico y 6 mM la reducen. Esto pasa de la misma forma con el contenido de NO_3^- (Figura 5B) y, por tanto, con el TNC (Figura 5D), que representa la suma de ambos. Sin embargo, se observa un incremento en el contenido de NH_4^+ (Figura 5C), siendo mayor de nuevo en el tratamiento 6Cl:2SP.

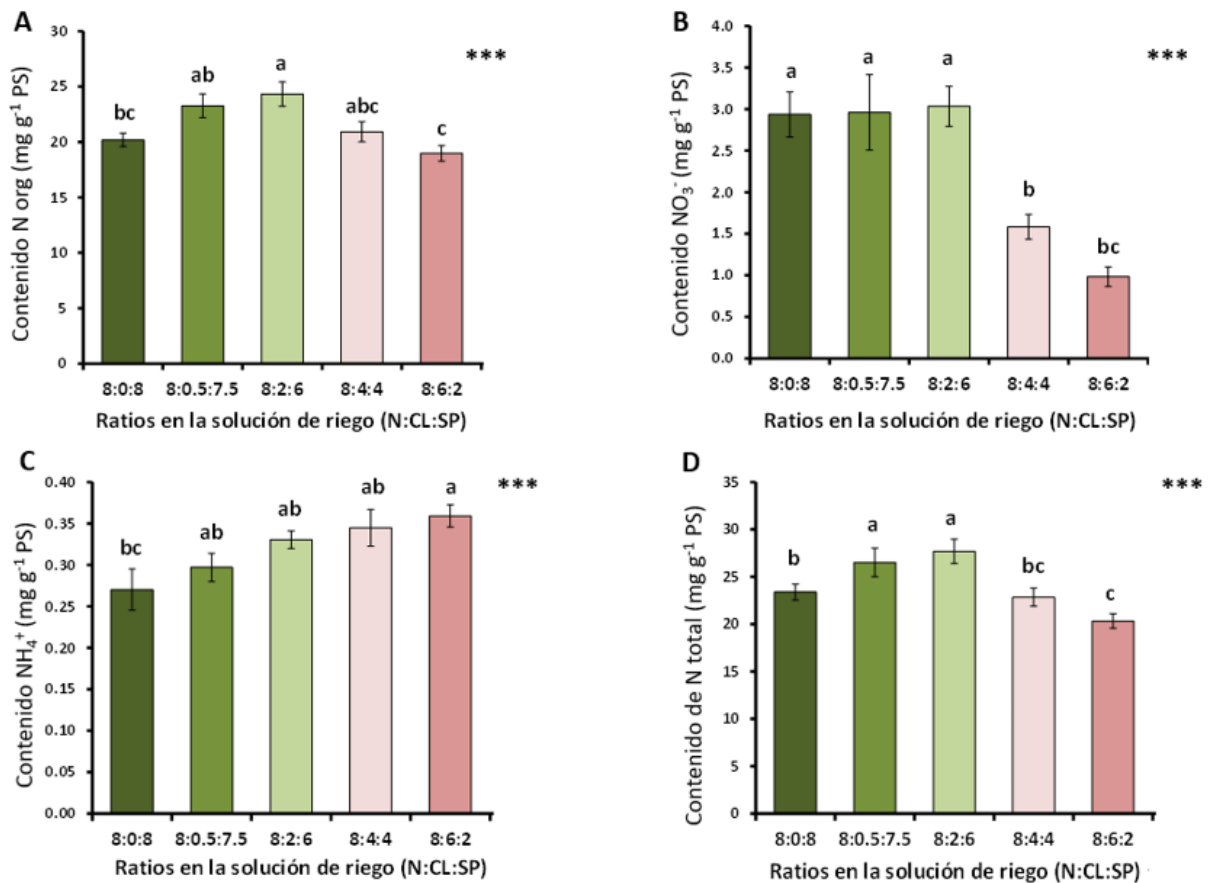


Figura 5. Medida en mg g⁻¹ PS del contenido del (A) N orgánico, (B) NO₃⁻, (C) NH₄⁺ y (D) TNC de las plantas de tabaco cultivadas con tratamientos nutricionales con ratios de Cl⁻:SP ascendente: concentraciones crecientes de Cl⁻ (0-6 mM), y concentraciones decrecientes de SO₄²⁻ + PO₄³⁻ (8-2 mM), mientras se mantiene constante la concentración de NO₃⁻ (8 mM). Niveles de significación: *** P ≤ 0.001. Las estadísticas de "grupo homogéneo" se calcularon mediante pruebas ANOVA y multivariadas (MANOVA), donde los valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Tukey.

Como explicación a estos resultados, Siddiqi et al. (1991) y Radcliffe et al. (2005) propusieron que el Cl⁻ se compartimenta preferentemente en la vacuola, mientras que el NO₃⁻ se asimila preferentemente. Como se ha mencionado anteriormente, algunos transportadores de aniones del tonoplasto de las células del mesófilo transportan NO₃⁻ y Cl⁻ desde el citosol hasta el interior de la vacuola, con alta selectividad para el NO₃⁻ sobre el Cl⁻ (De Angeli et al., 2006; Wege et al., 2010). Se ha sugerido que estos transportadores podrían ser los responsables de compartimentar el Cl⁻ en la vacuola cuando aumenta su concentración en el citosol en condiciones de salinidad, lo que podría provocar que el NO₃⁻ no pueda ser transportado al interior de la vacuola y se reduzca inmediatamente a NO₂⁻ en el citosol para su asimilación metabólica (Lorenzen et al., 2004), lo que podría causar la disminución del NO₃⁻ y del N

orgánico, respectivamente, y el aumento del NH_4^+ en las hojas. Por otra parte, la acumulación de Cl^- en la vacuola también genera un potencial osmótico más negativo y, por tanto, un aumento de la turgencia celular, respecto a tratamientos N y SP, dando lugar a células foliares con mayor grosor y succulencia, lo que estaría relacionado con el aumento de la biomasa vegetal observado en la Figura 4. Al igual que con el NO_3^- , el Cl^- también puede desplazar de la vacuola a moléculas que representan una importante fuente de C, como el malato (Franco-Navarro et al., 2016).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, podríamos esperar una respuesta enzimática en las plantas mediada por el efecto del Cl^- . Por lo que, a medida que la concentración de Cl^- aumentara en la solución de riego (0,5 – 6 mM), esperaríamos un aumento de la asimilación del NO_3^- y, especialmente, de la actividad NiR, debido a la disminución del contenido foliar de NO_3^- , inducida por el tratamiento 6 mM Cl^- así como un aumento del contenido de NH_4^+ . Por otro lado, se esperaría una disminución tanto de la actividad GS como de la GOGAT, dando lugar a una menor actividad del ciclo GS/GOGAT. Esto podría explicar el aumento en el contenido foliar de NH_4^+ , ya que, si se reduce la actividad del ciclo GS/GOGAT, también se reduce la asimilación de NH_4^+ , lo que provoca su acumulación. Todo ello indica que las plantas tratadas con 6 mM Cl^- tienen menor contenido en N a pesar de tener una mayor biomasa y, por tanto, mayor contenido en C (mayor ratio C:N), lo indica una posible conexión entre ambos metabolismos. Esto puede deberse a que, como se ha nombrado con anterioridad, cuando aumenta la concentración de Cl^- , tanto el NO_3^- como el malato, son desplazados por éste de la vacuola, por lo que están más disponibles para ser asimilados por la planta (Franco-Navarro et al., 2016; Rosales et al., 2020).

4.3. Efectos de la nutrición de Cl^- en las relaciones hídricas de las plantas

El aumento de biomasa también puede deberse a un mayor contenido de agua en las plantas provocado por el Cl^- . En la Figura 6 se observa que la WUE de las plantas de tabaco se incrementa, significativamente, a medida que la concentración de Cl^- de la solución nutritiva aumenta y la de NO_3^- se mantiene constante (8 mM), alcanzándose el mayor valor de WUE en el tratamiento 6Cl:2SP.

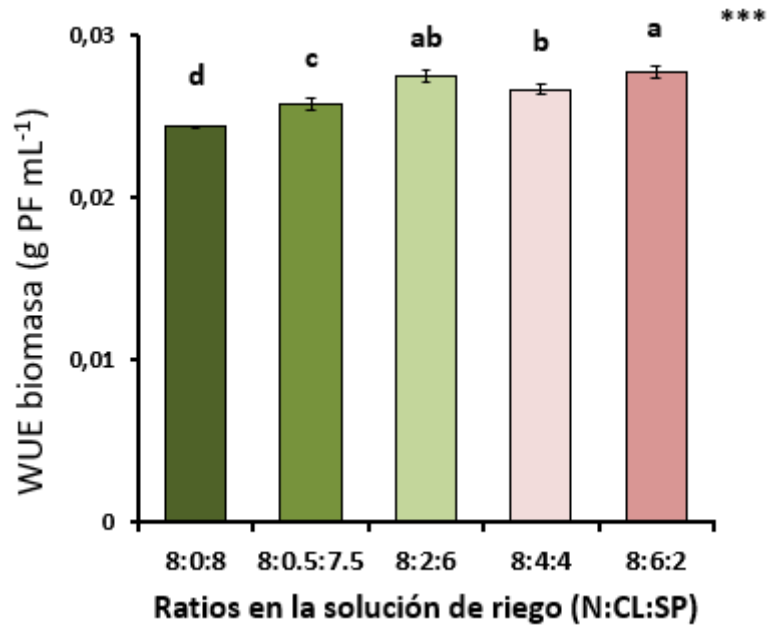


Figura 6. Medida en g PF mL^{-1} de la eficiencia intrínseca del uso del agua (WUE) de las plantas de tabaco cultivadas con tratamientos nutricionales con ratios de $\text{Cl}^-:\text{SP}$ ascendente: concentraciones crecientes de Cl^- (0-6 mM), y concentraciones decrecientes de $\text{SO}_4^{2-} + \text{PO}_4^{3-}$ (8-2 mM), mientras se mantiene constante la concentración de NO_3^- (8 mM). Niveles de significación: *** $P \leq 0.001$. Las estadísticas de "grupo homogéneo" se calcularon mediante pruebas ANOVA y multivariadas (MANOVA), donde los valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Tukey.

El factor más importante en la regulación del contenido hídrico vegetal es la transpiración. Se ha demostrado que plantas de tabaco tratadas con Cl^- (5 mM) muestran menor transpiración que las plantas cultivadas con tratamientos N (5 mM) o SP (5 mM). Esto se debe a que este anión reduce la g_s , lo que provoca una mayor WUE (Figura 7) y, como consecuencia, las plantas consumen menos agua y presentan un mayor rendimiento en la eficiencia del PSII en déficit hídrico (Franco-Navarro et al., 2016, 2019), lo que explicaría estos resultados.

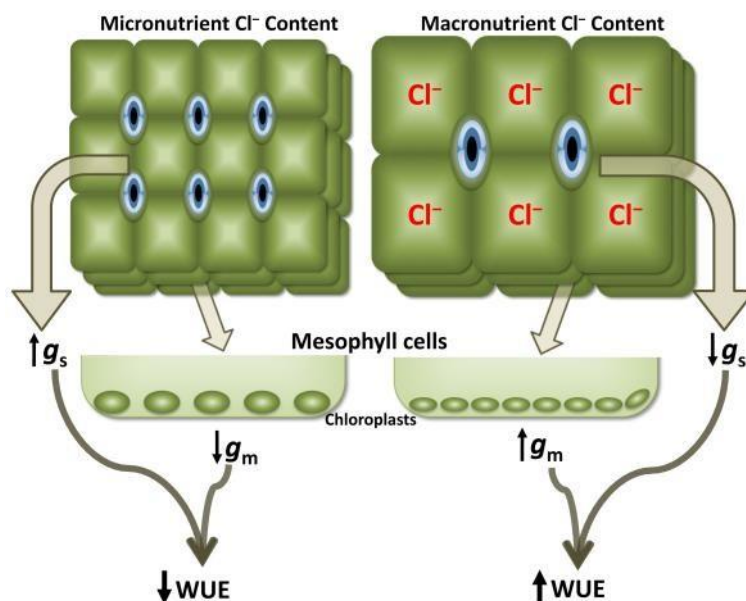


Figura 7. La nutrición de cloruro (Cl^-) a niveles de macronutriente aumenta significativamente el tamaño de las células epidérmicas foliares, provocando una reducción de la densidad estomática y, por tanto, de la conductancia (g_s). Al mismo tiempo, el Cl^- mejora la conductancia de difusión del mesófilo al CO_2 (g_m), ya que provoca un aumento de la superficie de los cloroplastos expuesta al espacio intercelular. Este aumento de g_m compensa la reducción de g_s , lo que provoca una mayor eficiencia intrínseca en el uso del agua (WUE) (Tomada de: Colmenero-Flores et al., 2019).

El aumento de biomasa no puede deberse solo al mayor contenido de agua en las plantas, ya que el PS también aumentó (Figura 4), lo que podría indicar que tratamientos con Cl^- en el rango milimolar también mejoran el metabolismo y crecimiento vegetal (Franco-Navarro et al., 2016). Por tanto, todos los resultados anteriores muestran que, a concentraciones superiores a 0,5 mM, el Cl^- aumenta significativamente la WUE y la biomasa, y estimula el crecimiento en plantas de tabaco, en comparación con tratamientos con bajo contenido en este ion.

4.4. Efectos de la nutrición de Cl^- en la absorción de NO_3^- y la eficiencia en el NUE en las plantas

El uso más eficiente de N se produjo en las plantas de tabaco que mostraron los valores NUE más altos (Figura 8). El aumento de la concentración de Cl^- en la solución de riego provocó un incremento en el NUE, a pesar de presentar el contenido más bajo en NO_3^- , siendo mayor, de nuevo, en las plantas con tratamientos 6Cl:2SP.

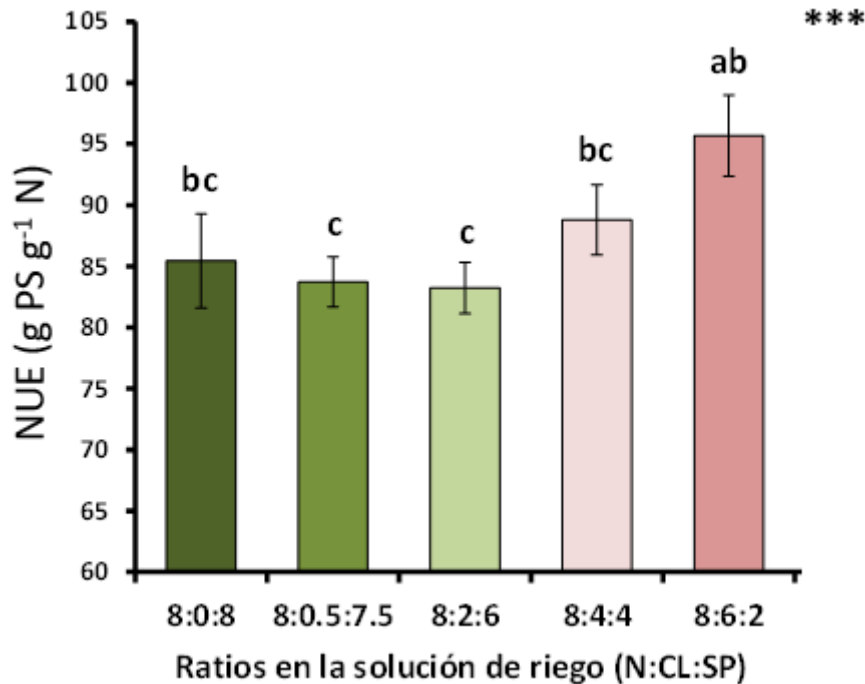


Figura 8. Medida en g PS g⁻¹ N del NUE de las plantas de tabaco cultivadas con tratamientos nutricionales con ratios de Cl⁻:SP ascendente: concentraciones crecientes de Cl⁻ (0-6 mM), y concentraciones decrecientes de SO₄²⁻ + PO₄³⁻ (8-2 mM), mientras se mantiene constante la concentración de NO₃⁻ (8 mM). Niveles de significación: *** P ≤ 0.001. Las estadísticas de "grupo homogéneo" se calcularon mediante pruebas ANOVA y multivariadas (MANOVA), donde los valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Tukey.

En el estudio de Rosales et al. (2020) se ha observado que cuando hay poca disponibilidad de NO₃⁻, los transportadores de Cl⁻ radicales, por los cuales éste se absorbe en la raíz, están más activos, aumentando el contenido de este ion en la vacuola y reemplazando así el NO₃⁻, lo que facilita la asimilación de éste y, por tanto, aumenta el NUE de la planta (Franco-Navarro et al., 2016).

Como se ha explicado con anterioridad, el NUE se divide en NUtE y NUpE (Figura 9). Las plantas de tabaco mostraron valores NUtE ascendentes (Figura 9A) y, por el contrario, valores NUpE descendentes (Figura 9B), a medida que la concentración de Cl⁻ aumentó en la solución de riego, como resultado de la menor disponibilidad de NO₃⁻ en las plantas, al igual que en Rosales et al. (2020). Este estudio señala que plantas tratadas con N (5 mM) presentan un mayor crecimiento y rendimiento, ya que tienen una mayor disponibilidad de NO₃⁻, por lo que tienen aumento considerable de NUpE, del TNC y del TNA. Sin embargo, presentan un valor de NUtE

más bajo, a diferencia de plantas tratadas con Cl^- , que han llegado a mostrar un valor de NUtE de hasta un 41% más alto en comparación con plantas tratadas con N. Por tanto, en base a esto y a los resultados mostrados, se ha confirmado que el Cl^- mejora el NUE de las plantas de tabaco, mejorando la utilización de absorción de NO_3^- , y no su eficiencia, existiendo así una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la NUtE y el contenido foliar de Cl^- , lo que no se establece con el NUpE en plantas de tabaco.

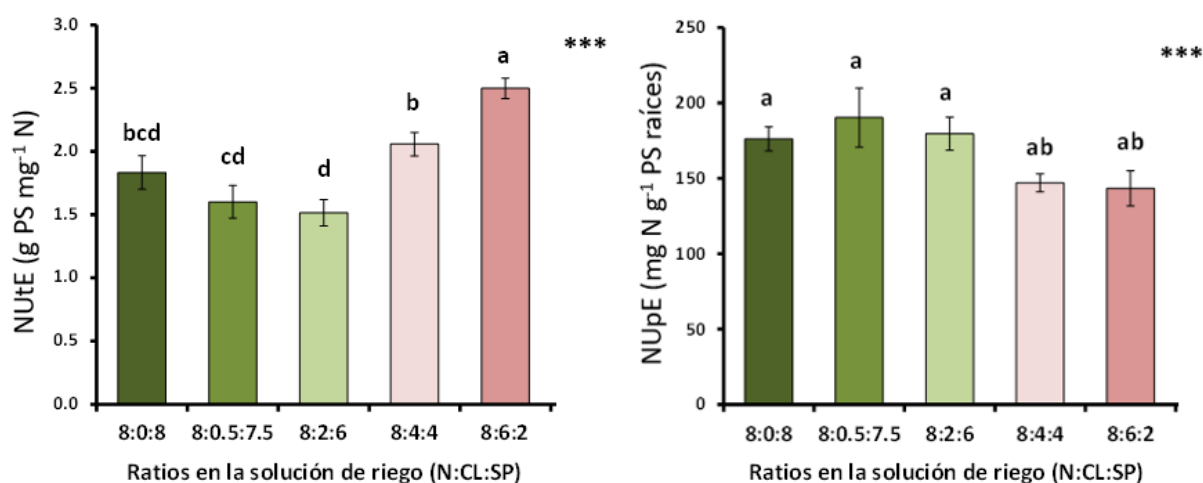


Figura 9. (A) Medida en $\text{g PS mg}^{-1} \text{N}$ de la eficiencia en el uso del N (NUtE) y (B) en $\text{mg N g}^{-1} \text{PS raíces}$ de la eficiencia en la absorción de N (NUpE) de las plantas de tabaco cultivadas con tratamientos nutricionales con ratios de Cl^- :SP ascendente: concentraciones crecientes de Cl^- (0-6 mM), y concentraciones decrecientes de $\text{SO}_4^{2-} + \text{PO}_4^{3-}$ (8-2 mM), mientras se mantiene constante la concentración de NO_3^- (8 mM). Niveles de significación: *** $P \leq 0.001$. Las estadísticas de "grupo homogéneo" se calcularon mediante pruebas ANOVA y multivariadas (MANOVA), donde los valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Tukey. Las correlaciones entre NUtE o NUpE se calcularon a través del coeficiente de correlación producto-momento de Pearson (r^2).

En la Figura 10 se observa que, cuando la concentración de Cl^- supera los 2 mM en la solución nutritiva, el TNA disminuye significativamente. Esto podría deberse a la menor disponibilidad de NO_3^- en las hojas a causa del aumento del contenido de Cl^- en la solución nutritiva. La disminución de TNA determina a su vez el decremento del valor de NUpE en las plantas de tabaco (Figura 9B), nombrado anteriormente, ya que este valor determina la eficiencia de absorción de N en las plantas (Rosales et al., 2020).

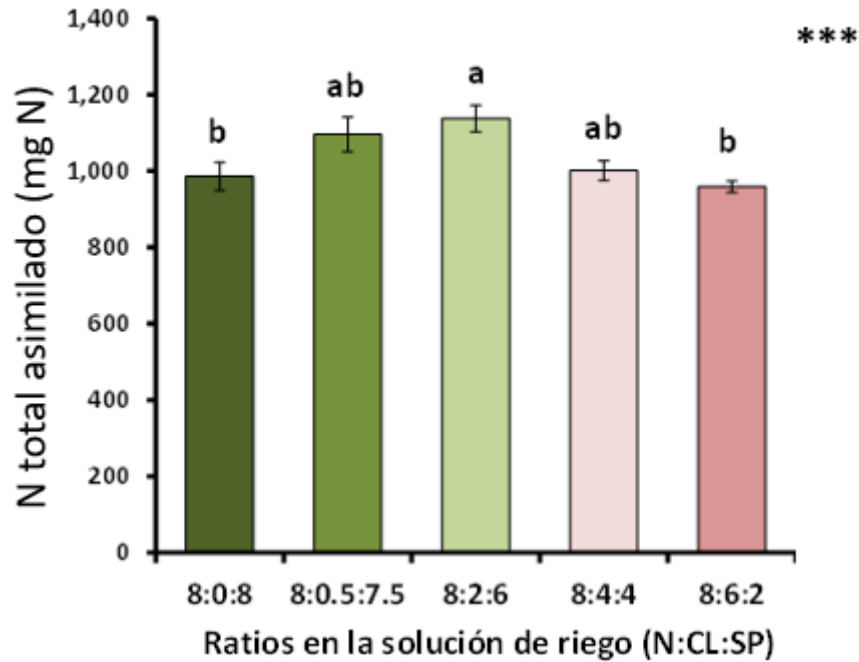


Figura 10. Medida en mg N del TNA de las plantas de tabaco cultivadas con tratamientos nutricionales con ratios de Cl⁻:SP ascendente: concentraciones crecientes de Cl⁻ (0-6 mM), y concentraciones decrecientes de SO₄²⁻ + PO₄³⁻ (8-2 mM), mientras se mantiene constante la concentración de NO₃⁻ (8 mM). Niveles de significación: *** P ≤ 0.001. Las estadísticas de "grupo homogéneo" se calcularon mediante pruebas ANOVA y multivariadas (MANOVA), donde los valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Tukey.

En resumen, todos los resultados anteriores sugieren que, el Cl⁻, como macronutriente, reduce el contenido foliar de NO₃⁻ en plantas de tabaco, ya que promueve una mayor asimilación de este ion, lo que resulta en un aumento del NUE, la biomasa y, por tanto, del crecimiento general de las plantas, destacando el tratamiento con ratio 6Cl:2SP como el más eficiente para ello.

4.5. Efectos de la nutrición de Cl⁻ en la asimilación de C, y su interacción con el NO₃⁻ en las plantas

Como se ha visto en el apartado 4.3., debido a que las plantas de tabaco tratadas con Cl⁻ muestran menor transpiración y, por tanto, una menor g_s , éstas pierden menos agua por los estomas, lo que está relacionado con la captura de CO₂ por parte de las plantas C₃ (capturan menos CO₂ atmosférico). Al capturarse menos CO₂, las plantas deberían presentar una menor

A_N . Sin embargo, curiosamente, plantas tratadas con Cl^- (5 mM) muestran una A_N similar a plantas cultivadas con tratamientos SP (5 mM). La difusión del CO_2 se produce desde las cavidades estomáticas hasta los sitios de carboxilación, donde éste difunde en la hoja y pasa a través de una serie de barreras anatómicas y celulares, por lo que la alteración de la disposición de los cloroplastos provocadas por el Cl^- , mencionadas anteriormente, podría provocar una mayor difusión de éste, lo que influye en el aumento de la conductancia de difusión del mesófilo al CO_2 (g_m). En respuesta a estos resultados, se ha sugerido que el Cl^- puede intervenir en el metabolismo del C de las plantas, mejorando la carboxilación y actividad de la RuBP, y aumentando, de este modo, la velocidad de difusión del CO_2 atmosférico en las células del mesófilo, es decir, aumentando la g_m (Figura 2) (Franco-Navarro et al., 2019).

El hecho de que el Cl^- pueda mejorar la carboxilación y actividad de la RuBP provocaría un aumento de la síntesis tanto de sacarosa como de almidón en las plantas (Franco-Navarro et al., 2019), lo que fundamenta el hecho de que el Cl^- promueva el crecimiento y desarrollo vegetal. Como se ha explicado anteriormente, la FB1,6Bpasa y la SPS son los puntos de control clave de la síntesis de sacarosa, por lo que, si la concentración de Cl^- aumentara en la solución de riego (0,5 – 6 mM), provocaría el aumento de la actividad FB1,6Bpasa, debido a la presencia de triosas P en el medio, y, por el contrario, la disminución de la actividad SPS, ya que esta se inhibe por la presencia de sacarosa en la muestra vegetal. En el caso del almidón, el aumento de su síntesis resultaría en una disminución tanto de la actividad invertasa como de la SS, que también se encontrarían inhibidas por la existencia de éste en la muestra (Champigny, 1985).

Además, como también se ha mencionado, el ciclo GS/GOGAT depende de energía, poder reductor y esqueletos carbonatados provenientes del metabolismo del C para formar el 2-oxoglutarato que dará lugar a glutamato, y poder así realizar la correcta asimilación de NH_4^+ en las plantas (García Calderón, 2009). Por tanto, en ausencia de Cl^- o a baja concentración de este, las moléculas carbonatadas se compartimentalizarían en la vacuola, y podría no llevarse a cabo la correcta fijación de C. Como consecuencia, no estarían disponibles los elementos necesarios, procedentes del metabolismo del C, para llevar a cabo la correcta función del ciclo GS/GOGAT y poder llevar a cabo la asimilación de NH_4^+ .

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Al contrario de perjudicar la nutrición de NO_3^- , el Cl^- , como macronutriente, facilita la utilización del NO_3^- , mejorando el NUE en las plantas, promoviendo así el crecimiento y desarrollo de éstas. Esto es debido a que el Cl^- mejora la NUtE y, en menor medida, la NUpE de las plantas cuando se usa el NO_3^- como única fuente de N. Tanto los resultados anteriores, como los pertenecientes a los estudios de la bibliografía mencionada, sugieren que la nutrición de Cl^- , en rango milimolar, reemplaza al NO_3^- en la vacuola de los tejidos foliares, haciendo que éste esté disponible para su asimilación y conversión en N orgánico. Estos resultados, por tanto, cambian la interpretación agrícola de las funciones que ejerce el Cl^- en las plantas superiores como macronutriente beneficioso, que promueve un uso más eficiente del agua, el N y el C, convirtiéndose en un recurso potencial para mejorar la producción y la calidad agrícolas (Rosales et al., 2020). Debido a la creciente demanda de alimentos actual, es de gran importancia aumentar los recursos alimentarios mediante la mejora de los cultivos agrícolas. Tan solo el 30-40% del N aplicado en el suelo es utilizado por los cultivos, por lo que una mayor NUE podría mejorar el rendimiento y calidad de éstos, disminuyendo los costes económicos en producción agrícola y los efectos negativos al medioambiente causados por la entrada nociva de NO_3^- en el ecosistema (Baligar et al., 2001). Así, los cultivos con un mayor NUE promoverían un mayor rendimiento con un menor requerimiento de N o con un contenido de N limitado (Ruiz et al., 2006; Kant, 2011; Rubio-Wilhelmi et al., 2012). Por tanto, la nutrición con Cl^- supondría una herramienta muy útil para aumentar el rendimiento y la calidad de los cultivos, además de que favorecería a una agricultura sostenible, reduciendo el impacto negativo del NO_3^- tanto en el medio ambiente como en la salud humana (Rosales et al., 2020).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anjana, S. U., & Iqbal, M. (2007). Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications: a review. *Agron. Sustain. Dev.*, 27, 45–57.
- Baligar, V. C., Fageria, N. K., & He, Z. L. (2001). Nutrient use efficiency in plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(7–8), 921–950.
- Beck, E., & Ziegler, P. (1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 95–117.
- Blasco León, B. (2010). *Biofortificación con yodo en plantas de lechuga (Lactuca sativa L.): Implicaciones fisiológicas y nutricionales (Tesis doctoral)*. Universidad de Granada.
- Bowsher, C., Steer, M., & Tobin, A. (2008). Plant Biochemistry. Garland Science. *Taylor & Francis*, 621, 329-333.
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Function of Nutrients: Micronutrients. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*, 191–248.
- Broyer, T. C., Carlton, A. B., Johnson, C. M., & Stout, P. R. (1954). Chlorine—A Micronutrient Element for Higher Plants. *Plant Physiology*, 29(6), 526–532.
- Cataldo, D. A., Haroon, M. H., Schrader, L. E., & Youngs, V. L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6(1), 71–80.
- Champigny, M. L. (1985). Regulation of photosynthetic carbon assimilation at the cellular level: a review. *Photosynthesis Research*, 6(3), 273–286.
- Cheikh, N., & Brenner, M. L. (1992). Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves: Effect of dark and light conditions and role of gibberellins and abscisic acid. *Plant Physiology*, 100(3), 1230–1237.
- Churchill, K. A., & Sze, H. (1984). Anion-sensitive, H⁺-pumping ATPase of oat roots: direct effects of Cl⁻, NO₃⁻, and disulfonic stilbene. *Plant Physiology*, 76(2), 490–497.
- Colmenero-Flores, J. M., Franco-Navarro, J. D., Cubero-Font, P., Peinado-Torrubia, P., & Rosales, M. A. (2019). Chloride as a beneficial macronutrient in higher plants: New roles and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 1–32.

- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J. M., Thomine, S., Gambale, F., & Barbier-Brygoo, H. (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, *442*(7105), 939–942.
- Dieuaide-Noubhani, M., Alonso, A. P., Rolin, D., Eisenreich, W., & Raymond, P. (2007). Metabolic flux analysis: recent advances in carbon metabolism in plants. *Plant Systems Biology*, *97*, 213–243.
- Farden, K. J. F., & Robertson, J. G. (1980). Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenases. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Wiley, New York, 265-314.
- Flowers, T. J. (1988). Chloride as a nutrient and as an osmoticum. *Advances in plant nutrition (USA)*.
- Franco-Navarro, J. D., Brumós, J., Rosales, M. A., Cubero-Font, P., Talón, M., & Colmenero-Flores, J. M. (2016). Chloride regulates leaf cell size and water relations in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, *67*(3), 873–891.
- Franco-Navarro, J. D., Rosales, M. A., Cubero-Font, P., Calvo, P., Álvarez, R., Diaz-Espejo, A., & Colmenero-Flores, J. M. (2019). Chloride as a macronutrient increases water-use efficiency by anatomically driven reduced stomatal conductance and increased mesophyll diffusion to CO₂. *Plant Journal*, *99*(5), 815–831.
- Frink, C. R., Waggoner, P. E., & Ausubel, J. H. (1999). Nitrogen fertilizer: Retrospect and prospect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(4), 1175–1180.
- García Calderón, M. (2009). *Consecuencias fisiológicas de la deficiencia de glutamina sintasa plástica en plantas de Lotus japonicus (Tesis doctoral)*. Universidad de Sevilla.
- Geilfus, C.-M. (2018). Chloride: From Nutrient to Toxicant. *Plant and Cell Physiology*, *59*(5), 877–886.
- Geladopoulos, T. P., Sotiroudis, T. G., & Evangelopoulos, A. E. (1991). A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Analytical Biochemistry*, *192*(1), 112–116.
- Gil, H. M., Galmés, J. G., & Sans, J. F. (2008). Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de foto asimilados. In *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana

- de España* (2^a edición, pp. 211–225).
- Gilliam, J. W. (1971). Rapid Measurement of Chlorine in Plant Materials. *Soil Science Society of America Journal*, 35(3), 512–513.
- Gilliam, M., & Tester, M. (2005). The regulation of anion loading to the maize root xylem. *Plant Physiology*, 137(March), 819–828.
- González, E. M., Gordon, A. J., James, C. L., & Arrese-Igor, C. (1995). The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *Journal of Experimental Botany*, 46(10), 1515–1523.
- Groat, R. G., & Vance, C. P. (1981). Root Nodule Enzymes of Ammonia Assimilation in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) . *Plant Physiology*, 67(6), 1198–1203.
- Guan, P. (2017). Dancing with hormones: A current perspective of nitrate signaling and regulation in arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8(September), 1–20.
- Hageman, R. H., & Hucklesby, D. P. (1971). Nitrate Reductase from Higher Plants. *Methods in Enzymology*, 23, 491–503.
- Hänsch, R., & Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 259–266.
- Hogue, E., Wilcox, G., & Cantliff, D. (1970). Effect of soil phosphorus levels on phosphate fractions in tomato leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 95, 174–176.
- Holaday, A. S., Martindale, W., Aired, R., Brooks, A. L., & Leegood, R. C. (1992). Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. *Plant Physiology*, 98(3), 1105–1114.
- Hubbard, N. L., Huber, S. C., & Pharr, D. M. (1989). Sucrose Phosphate Synthase and Acid Invertase as Determinants of Sucrose Concentration in Developing Muskmelon (*Cucumis melo* L.) Fruits. *Plant Physiology*, 91(4), 1527–1534.
- Huber, S. C. (1992). The regulation of sucrose synthesis leaves. *Carbon partitioning within and between organisms*.
- Jossier, M., Kroniewicz, L., Dalmas, F., Le Thiec, D., Ephritikhine, G., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., Vavasseur, A., Filleur, S., & Leonhardt, N. (2010). The Arabidopsis vacuolar

- anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *Plant Journal*, 64(4), 563–576.
- Kaiser, J. J., & Lewis, O. A. M. (1984). Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L. *Plant and Soil*, 77(1), 127–130.
- Kant, S. (2011). Understanding nitrate uptake, signaling and remobilisation for improving plant nitrogen use efficiency. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 74, 89–96.
- Kaplan, F., Sung, D. Y., & Guy, C. L. (2006). Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 120–128.
- Kohler, B., & Raschke, K. (2000). The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. *Plant Physiology*, 122(1), 243–254.
- Krapp, A., David, L. C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A. S., Chaillou, S., Ferrario-Méry, S., Meyer, C., & Daniel-Vedele, F. (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 789–798.
- Krom, M. D. (1980). Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *The Analyst*, 105(1249), 305–316.
- Kusumi, K., Hashimura, A., Yamamoto, Y., Negi, J., & Iba, K. (2017). Contribution of the S-type anion channel SLAC1 to stomatal control and its dependence on developmental stage in rice. *Plant and Cell Physiology*, 58(12), 2085–2094.
- Kusunoki, M. (2007). Mono-manganese mechanism of the photosystem II water splitting reaction by a unique Mn₄Ca cluster. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(6), 484–492.
- Lea, P. J., & Miflin, B. J. (1974). *Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants*. 251, 614–616.
- Lillo, C. (1984). Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiologia Plantarum*, 61(2), 214–218.
- Lorenzen, I., Aberle, T., & Plieth, C. (2004). Salt stress-induced chloride flux: A study using

- transgenic Arabidopsis expressing a fluorescent anion probe. *Plant Journal*, 38(3), 539–544.
- Lu, Y., & Sharkey, T. D. (2006). The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell and Environment*, 29(3), 353–366.
- Metzler, D. E. (1979). Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells. In *Academic Press New York, NY, USA*.
- Monza, J; Marquez, A.J. (2004). *El metabolismo del nitrógeno en las plantas*. Cordoba, Espana: Almuzana
- Morell, M., & Copeland, L. (1985). Sucrose Synthase of Soybean Nodules. *Plant Physiology*, 78(1), 149–154.
- Motavalli, P. P., Goyne, K. W., & Udawatta, R. P. (2008). Environmental Impacts of Enhanced-Efficiency Nitrogen Fertilizers. *Crop Management*, 7(1), 0.
- Moya, J. L., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., & Talon, M. (2003). Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), 825–833.
- Novozamsky, I., & Van Eck, R. (1977). Total sulphur determination in plant material. *Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie*, 286(5), 367–368.
- Parlamento Europeo, C. de la U. E. (2019). Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de junio de 2019 por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) nº 1069/200. *Diario Oficial de La Unión Europea. Serie L*, 117, 1–114.
- Radcliffe, S. A., Miller, A. J., & Ratcliffe, R. G. (2005). Microelectrode and ¹³³Cs nuclear magnetic resonance evidence for variable cytosolic and cytoplasmic nitrate pools in maize root tips. *Plant, Cell and Environment*, 28(11), 1379–1387.
- Raven, J. A. (2017). Chloride: Essential micronutrient and multifunctional beneficial ion. *Journal of Experimental Botany*, 68(3), 359–367.
- Roelfsema, M. R. G., & Hedrich, R. (2005). In the light of stomatal opening: New insights into “the Watergate.” *New Phytologist*, 167(3), 665–691.

- Rognes, S. E. (1980). Anion regulation of lupin asparagine synthetase: Chloride activation of the glutamine-utilizing reactions. *Phytochemistry*, *19*(11), 2287–2293.
- Rosales, M. A., Franco-navarro, J. D., Peinado-torrubia, P., Díaz-rueda, P., Alvarez, R., & Colmenero-flores, J. M. (2020). Chloride improves nitrate utilization and NUE in plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 442.
- Rubio-Wilhelmi, M. del M., Sanchez-Rodriguez, E., Rosales, M. A., Blasco, B., Rios, J. J., Romero, L., Blumwald, E., & Ruiz, J. M. (2012). Ammonium formation and assimilation in PSARK-IPT tobacco transgenic plants under low N. *Journal of Plant Physiology*, *169*(2), 157–162.
- Ruiz, J. M., Rivero, R. M., Cervilla, L. M., Castellano, R., & Romero, L. (2006). Grafting to improve nitrogen-use efficiency traits in tobacco plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(6), 1014–1021.
- Sanders, D., & Hansen, U. P. (1981). Mechanism of Cl⁻ transport at the plasma membrane of *Chara corallina*: II. Transinhibition and the determination of H⁺/Cl⁻ binding order from a reaction kinetic model. *The Journal of Membrane Biology*, *58*(2), 139–153.
- Sasaki, H., Edo, E., Uehara, N., Ishimaru, T., Kawamitsu, Y., Suganuma, S., Ueda, D., & Ohsugi, R. (2005). Effect of sucrose on activity of starch synthesis enzymes in rice ears in culture. *Physiologia Plantarum*, *124*(3), 301–310.
- Schwimmer, S., Makower, R. U., & Rorem, E. S. (1961). Invertase & invertase inhibitor in potato. *Plant Physiology*, *36*(3), 313–316.
- Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., & Ruth, T. J. (1991). Studies of the uptake of nitrate in barley: III. Compartmentation of NO₃⁻. *Journal of Experimental Botany*, *42*(244), 1455–1463.
- Singh, R. P., & Srivastava, H. S. (1986). Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiologia Plantarum*, *66*(3), 413–416.
- Wang, Y. Y., Hsu, P. K., & Tsay, Y. F. (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*, *17*(8), 458–467.
- Wege, S., Gilliham, M., & Henderson, S. W. (2017). Chloride: Not simply a “cheap osmoticum”, but a beneficial plant macronutrient. *Journal of Experimental Botany*, *68*(12), 3057–3069.

- Wege, S., Jossier, M., Filleur, S., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., Gambale, F., & De Angeli, A. (2010). The proline 160 in the selectivity filter of the Arabidopsis NO₃⁻/H⁺ exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta. *Plant Journal*, *63*(5), 861–869.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: A review. *Annals of Botany*, *88*(6), 967–988.
- Xu, G., Fan, X., & Miller, A. J. (2012). Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, *63*(1), 153–182.
- Xu, G., Magen, H., Tarchitzky, J., & Kafkafi, U. (2000). Advances in Chloride Nutrition of Plants. In *Advances in Agronomy* (Vol. 68, Issue C).
- Zhu, Y. J., Komor, E., & Moore, P. H. (1997). Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiology*, *115*(2), 609–616.