



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, DE LA
ACTIVIDAD FÍSICA Y DEL DEPORTE**

**Departamento de Tecnología de la
Alimentación y Nutrición**

**Estrategias de fertilización foliar nitrogenada en
pimiento**

Paula Cuadra Crespo

Director: Dr. D. Francisco Moisés del Amor Saavedra

Tutora: Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado

Murcia, Diciembre de 2011



UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, DE LA
ACTIVIDAD FÍSICA Y DEL DEPORTE

Departamento de Tecnología de la
Alimentación y Nutrición

Estrategias de fertilización foliar nitrogenada en
pimiento

Paula Cuadra Crespo

Director: Dr. D. Francisco Moisés del Amor Saavedra

Tutora: Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado

Murcia, Diciembre de 2011



UCAM

**Universidad Católica
San Antonio**

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN**

El Dr. D. Francisco Moisés del Amor Saavedra Director⁽¹⁾ de la Tesis Doctoral titulada “Estrategias de fertilización foliar nitrogenada en pimiento” realizada por D^a. Paula Cuadra Crespo en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

LO QUE FIRMO, PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS REALES DECRETOS 56/2005 Y 778/98, EN MURCIA A 13 DE DICIEMBRE DE 2011.

⁽¹⁾ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar y firmar ambos.

Tercer Ciclo. Vicerrectorado de Investigación
Campus de Los Jerónimos. 30107 Guadalupe (Murcia)
Tel. (+34) 968 27 88 22 • Fax (+34) 968 27 85 78 - C. e.: tercerciclo@pdi.ucam.edu



UCAM
Universidad Católica
San Antonio

RATIFICACIÓN DEL TUTOR

La Dra. D. ^a Estrella Núñez Delicado Profesora del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, y Tutora de la doctoranda D. ^a Paula Cuadra Crespo,

RATIFICO: El informe de D. Francisco Moisés del Amor Saavedra, Director de la Tesis titulada “Estrategias de fertilización foliar nitrogenada en pimiento” elaborada por la citada doctoranda.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 56/2005 y 778/98, en Murcia a 13 de Diciembre de 2011.

Tercer Ciclo. Vicerrectorado de Investigación
Campus de Los Jerónimos. 30107 Guadalupe (Murcia)
Tel. (+34) 968 27 88 22 • Fax (+34) 968 27 85 78 - C. e.: tercerciclo@pdi.ucam.edu

A mis padres y a Claudia.

A Nico.

AGRADECIMIENTOS

Después de cuatro años de investigación espero ser capaz de agradecer a todas las personas que de una u otra forma han hecho posible la elaboración de esta tesis.

En primer lugar, quisiera agradecer al doctor Francisco M. del Amor por su ayuda y colaboración como director de esta tesis doctoral y por darme la oportunidad de empezar en este mundo de la investigación.

Quisiera darle las gracias a mis compañeros de laboratorio, Mari Carmen y Miguel, por su ayuda durante todo este tiempo y por todos esos “aperitivos de investigación” algún que otro viernes. También a todos los del departamento y a todas esas personas del IMIDA que me han ayudado en todo lo posible y han hecho de estos cuatro años una experiencia única y muy positiva.

Agradecer al Instituto Murciano de Investigación Agrario y Alimentario (IMIDA) por la beca predoctoral (Beca-Contrato) en el Marco del Plan de Ciencia y Tecnología 2007-2010 Región de Murcia (Orden de 8 de marzo de 2007) de la Consejería de Agricultura y Agua, ya que sin ella este trabajo no sería posible. Así como también agradecer al personal del CIFEA de Torre Pacheco por su colaboración.

Esta tesis doctoral también se ha realizado gracias a los siguientes proyectos de investigación: (1) Proyecto del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) Titulado: "Evaluación de la respuesta fisiológica y agronómica de diferentes estrategias de fertilización enfocadas a la reducción de la contaminación por nitratos" Referencia: RTA2005-00087-C02-01.

(2) Proyecto de la Agencia Regional de Investigación (Fundación Séneca de la Región de Murcia) Titulado: “Soluciones de manejo y control para minimizar la contaminación por nitratos”. Referencia: 00554/PI/04.

A la Universidad Católica San Antonio de Murcia, en especial a la doctora Estrella Núñez Delicado y a Carmen.

Gracias a mis padres, Miguel y Raquel, por su apoyo y dedicación incondicional no sólo en estos cuatro años “de estudio del pimiento”, sino siempre. Muchas gracias por ser los mejores padres del mundo.

A mi hermana Claudia, por todos esos artículos a medias y por tu ayuda siempre que la he necesitado. Gracias por estar siempre ahí. También gracias a mi “otro hermano”, Castañuela, porque ahora es el niño bonito de casa.

A toda mi familia por poder contar siempre con ellos, y a todos mis amigos, que aunque no mencione aquí sus nombres, ellos saben muy bien quienes son.

Por último, y no menos importante, quiero darle las gracias a Nico por estos ocho años, porque siempre me has animado en las horas bajas y me has sacado una sonrisa cuando más lo necesitaba. Gracias por todo.

A todas esas personas que aunque no las nombre han hecho posible que hoy esté redactando esta tesis.

Muchas gracias a todos.

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Parte del contenido de esta tesis doctoral ha sido publicada en los siguientes trabajos:

1. del Amor, F. M.; **Cuadra-Crespo, P.**; Varo, P.; Gómez, M.C. **2009**. Influence of foliar urea on the antioxidant response and fruit color of sweet pepper under limited N supply. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 89, 504-510.
2. del Amor, F. M.; **Cuadra-Crespo, P.**; Walker, D. J.; Cámara, J. M.; Madrid, R. **2010**. Effect of foliar application of antitranspirant on photosynthesis and water relations of pepper plants under different levels of CO₂ and water stress. *Journal of Plant Physiology*. 167, 1232–1238.
3. del Amor, F. M.; **Cuadra-Crespo, P.** **2011**. Alleviation of salinity stress in broccoli using foliar urea or methyl-jasmonate: analysis of growth, gas exchange, and isotope composition. *Plant Growth Regulation*. 63, 55-62.
4. **Cuadra-Crespo, P.**; del Amor, F. M. **2010**. Effects of postharvest treatments on fruit quality of sweet pepper at low temperature. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 90, 2716-2722.
5. del Amor, F. M.; **Cuadra-Crespo, P.** **2011**. Gas exchange and antioxidant response of sweet pepper to foliar urea spray as affected by ambient temperature. *Scientia Horticulturae*. 127, 334-340.
6. del Amor, F. M.; **Cuadra-Crespo, P.** Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. *Functional Plant Biology*. Aceptado.

Parte del contenido de esta tesis doctoral ha sido también publicada en los siguientes congresos:

1. *Autores:* F. M. del Amor, **P. Cuadra-Crespo**, G. Ortuño, P. Varó, M.C. Gómez.
Título: Influence of foliar urea on antioxidant response and fruit quality of sweet pepper under limited N supply.
Congreso: XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB 2008).
Publicación: *Physiol. Plant.* 133, 2008.
Lugar de publicación y fecha: 17-22 Agosto de **2008**. Tampere, Finlandia.
2. *Autores:* F. M. del Amor, **P. Cuadra-Crespo**, G. Ortuño.
Título: Interacción de la urea foliar y la temperatura en plantas de pimiento sometidas a deficiencia de N.
Congreso: XII Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas.
Publicación: Libro de resúmenes (Pág. 40)
Lugar de publicación y fecha: 22-24 Octubre de **2008**. Granada.
3. *Autores:* F. M. del Amor, **P. Cuadra-Crespo**, G. Ortuño.
Título: Evaluación de la aplicación de antitranspirante en condiciones de estrés hídrico y elevado CO₂ ambiental.
Congreso: XII Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas.
Publicación: Libro de resúmenes (Pág. 39)
Lugar de publicación y fecha: 22-24 Octubre de **2008**. Granada.
4. *Autores:* F. M. del Amor, **P. Cuadra-Crespo**.
Título: Influencia de la salinidad en la calidad postcosecha de frutos de pimiento.
Congreso: V Congreso Nacional De Ciencia y Tecnología De Los Alimentos
Publicación: Libro de Resúmenes (Pág. 257)
Lugar de publicación y fecha: 26-29 Mayo de **2009**. Murcia.

5. *Autores:* F. M. del Amor, **P. Cuadra-Crespo**.
Título: Influencia de la aplicación de urea foliar en la calidad postcosecha de frutos de pimiento.
Congreso: V Congreso Nacional De Ciencia y Tecnología De Los Alimentos
Publicación: Libro de Resúmenes (Pág. 256)
Lugar de publicación y fecha: 26-29 Mayo de **2009**. Murcia.

6. *Autores:* F. M. del Amor, **P. Cuadra-Crespo**.
Título: Influencia de la aplicación de antitranspirante en la calidad postcosecha de frutos de pimiento.
Congreso: XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV)
Publicación: Libro de Resúmenes (Pág. 322)
Lugar de publicación y fecha: 8-11 Septiembre de **2009**. Zaragoza.

7. *Autores:* A. Pato, L. F. Condés, P. Mínguez, F. M. del Amor, **P. Cuadra-Crespo**, M. Marín.
Título: Riego de alta frecuencia en pimiento
Congreso: XXXIX Seminario de Técnicos Especialistas en Horticultura
Publicación: Libro de Resúmenes (Pág. 48)
Lugar de publicación y fecha: 28 Septiembre al 3 Octubre de **2009**. Puerto de la Cruz, Tenerife.

8. *Autores:* **P. Cuadra-Crespo**, M. C. Piñero, F. M. del Amor.
Título: Improving salt tolerance of pepper genotypes under high CO₂ concentration. Analysis of growth and isotopic composition.
Congreso: 8th APGC Symposium, Plant Functioning in a changing global and polluted environment.
Publicación: Libro de Resúmenes (Pág. 91)
Lugar de publicación y fecha: 5-9 Junio de **2011**. Groningen, Holanda.

9. *Autores:* F. M. del Amor, **P. Cuadra-Crespo**, M. C. Piñero.

Título: Evaluation of drought tolerance of pepper genotypes under high CO₂ concentration.

Congreso: GreenSys 2011. Advanced technologies and management towards sustainable greenhouse ecosystems.

Publicación: Libro de Resúmenes (Pág. 104-105)

Lugar de publicación y fecha: 5-10 Junio de **2011**. Halkidiki, Grecia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	23
ÍNDICE DE FIGURAS.....	27
ÍNDICE DE TABLAS.....	31
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	33
1. Introducción.....	35
1.1. EL CULTIVO DE PIMIENTO.....	35
1.1.1. El cultivo de pimiento en España.....	36
1.1.2. El cultivo de pimiento en la Región de Murcia.....	38
1.2. DESCRIPCIÓN DEL CULTIVO.....	41
1.2.1. Descripción botánica y morfología.....	41
1.2.2. Composición y valor nutritivo.....	42
1.2.3. Variedades cultivadas. Clasificación.....	43
1.3. MANEJO DEL CULTIVO SIN SUELO BAJO INVERNADERO.....	47
1.3.1. Exigencias climáticas.....	48
1.3.1.1. <i>Temperatura.....</i>	48
1.3.1.2. <i>Humedad.....</i>	48
1.3.1.3. <i>Luminosidad.....</i>	48
1.3.2. Sistemas de cultivo hidropónico.....	49
1.3.3. Tipos de sustratos utilizados en cultivo hidropónico...	49
1.3.4. Riego y fertilización.....	53

1.3.5. Ventajas y desventajas de la producción en cultivo sin suelo.....	56
1.4. CONTAMINACIÓN POR NITRATOS.....	57
1.5. FERTIRRIGACIÓN NITROGENADA.....	60
1.6. UREA. CARACTERÍSTICAS.....	63
1.6.1. Nutrición con urea foliar.....	65
1.7. ESTRÉS OXIDATIVO. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	67
1.8. DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE LAS PLANTAS.....	69
1.8.1. Catalasa.....	69
1.8.2. Ascorbato Peroxidasa.....	70
1.8.3. Ascorbato.....	70
1.8.4. Flavonoides.....	71
1.8.5. Carotenoides.....	72
1.8.6. α-Tocoferol.....	74
1.8.7. Antocianos.....	75
1.9. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	76
1.10. AMINOÁCIDOS.....	77
1.11. ANTITRANSPIRANTES.....	78
1.12. METIL JASMONATO.....	79
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	81
2. Objetivos.....	83
CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	85
3. Material y Métodos.....	87
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	87
3.1.1. Invernadero.....	87

3.1.2. Cámara climática	91
3.2. APLICACIÓN FOLIAR DE UREA, ANTITRANSPIRANTE Y METIL JASMONATO.....	92
3.3. CLOROFILAS.....	92
3.3.1. En campo y en cámara climática: SPAD-502	93
3.3.2. En laboratorio: Método DMF	94
3.4. FLUORESCENCIA DE LAS CLOROFILAS.....	95
3.5. FIRMEZA.....	96
3.6. ESPESOR DEL PERICARPIO.....	97
3.7. COLOR.....	97
3.8. PH Y CE.....	99
3.9. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	99
3.10. ANIONES.....	99
3.11. AMINOÁCIDOS.....	100
3.12. COMPUESTOS FENÓLICOS.....	101
3.13. FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACIÓN DE SUELOS.....	102
3.14. CLOROFILAS (A, B Y A+B), LICOPENOS Y B-CAROTENOS.....	104
3.15. ANTOCIANOS Y FLAVONOIDES TOTALES.....	104
3.16. ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	105
3.17. POTENCIALES HÍDRICO Y OSMÓTICO.....	105
3.18. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA.....	106
3.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	106
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
4. Resultados y Discusión	111
4.1. INFLUENCIA DE LA UREA FOLIAR EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE Y EN EL COLOR DE FRUTOS DE PIMIENTO DULCE BAJO N LIMITANTE.....	111

4.1.1. Introducción.....	111
4.1.2. Material y Métodos.....	113
4.1.2.1. <i>Descripción del ensayo y condiciones de crecimiento.....</i>	113
4.1.2.2. <i>Determinaciones.....</i>	115
4.1.3. Resultados y Discusión.....	115
4.1.3.1. <i>Nitrógeno total.....</i>	115
4.1.3.2. <i>Análisis de color.....</i>	116
4.1.3.3. <i>Antocianos y flavonoides totales.....</i>	119
4.1.3.4. <i>Peroxidación lipídica y enzimas antioxidantes.....</i>	121
4.2. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS POSTCOSECHA EN LA CALIDAD DE FRUTOS DE PIMIENTO DULCE A BAJA TEMPERATURA.....	125
4.2.1. Introducción.....	125
4.2.2. Material y Métodos.....	127
4.2.2.1. <i>Descripción del ensayo y condiciones de almacenamiento.....</i>	127
4.2.2.2. <i>Determinaciones.....</i>	127
4.2.3. Resultados y Discusión.....	128
4.2.3.1. <i>Firmeza y color.....</i>	128
4.2.3.2. <i>Contenido en fenoles totales.....</i>	132
4.2.3.3. <i>Enzimas antioxidantes.....</i>	133
4.2.3.4. <i>Peroxidación lipídica.....</i>	134
4.2.3.5. <i>Composición de aminoácidos.....</i>	136
4.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL INTERCAMBIO GASEOSO Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE LA PLANTA DE PIMIENTO CON APLICACIÓN DE UREA FOLIAR.....	139
4.3.1. Introducción.....	139
4.3.2. Material y Métodos.....	140
4.3.2.1. <i>Descripción del ensayo y condiciones de crecimiento.....</i>	140

4.3.2.2.	<i>Determinaciones.....</i>	141
4.3.3.	Resultados y Discusión.....	142
4.3.3.1.	<i>Fotosíntesis, fluorescencia de clorofilas y respiración de suelos.....</i>	142
4.3.3.2.	<i>Concentración de NO₃⁻.....</i>	145
4.3.3.3.	<i>Peroxidación lipídica.....</i>	146
4.3.3.4.	<i>Actividades enzimáticas.....</i>	147
4.4.	RESPUESTA DEL PIMIENTO DULCE A LA APLICACIÓN DE UREA FOLIAR O METIL JASMONATO BAJO DEFICIENCIA DE N.....	150
4.4.1.	Introducción.....	150
4.4.2.	Material y Métodos.....	151
4.4.2.1.	<i>Planteamiento y condiciones de crecimiento.....</i>	151
4.4.2.2.	<i>Determinaciones.....</i>	152
4.4.3.	Resultados y Discusión.....	153
4.4.3.1.	<i>Crecimiento.....</i>	153
4.4.3.2.	<i>Intercambio gaseoso y contenido de clorofilas.....</i>	154
4.4.3.3.	<i>Concentración de NO₃⁻.....</i>	155
4.4.3.4.	<i>Peroxidación lipídica.....</i>	156
4.4.3.5.	<i>Aminoácidos.....</i>	158
4.5.	EFFECTO DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE ANTITRANSPIRANTE EN LA FOTOSÍNTESIS Y LAS RELACIONES HÍDRICAS EN PLANTAS DE PIMIENTO BAJO DIFERENTES NIVELES DE CO ₂ Y ESTRÉS HÍDRICO.....	163
4.5.1.	Introducción.....	163
4.5.2.	Material y Métodos.....	164
4.5.2.1.	<i>Diseño experimental y condiciones de crecimiento.....</i>	164
4.5.2.2.	<i>Determinaciones.....</i>	165
4.5.3.	Resultados y discusión.....	166
4.5.3.1.	<i>Fotosíntesis.....</i>	166

4.5.3.2.	<i>Fluorescencia de hojas</i>	167
4.5.3.3.	<i>Respiración de suelo</i>	168
4.5.3.4.	<i>Relaciones hídricas</i>	169
4.5.3.5.	<i>Almidón, aminoácidos, prolina y azúcares solubles</i>	170
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES		179
5. Conclusiones		181
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA		185
6. Bibliografía		187

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

α -tocoferol Alfa-tocoferol

α,β - caroteno Alfa y beta caroteno

Ψ_w Potencial hídrico

Ψ_π Potencial osmótico

μmol Micromoles

$[\text{CO}_2]$ Concentración de CO_2

A Absorbancia

A_{CO_2} Fotosíntesis neta

APOX Ascorbato peroxidasa

ASC Ácido ascórbico

AT Antitranspirante

BHT Butilhidroxitolueno

C^* Croma

CAT Catalasa

CE Conductividad eléctrica

C/N Balance carbono/nitrógeno

CN Control

CO_2 Dióxido de carbono

DDT Días después del trasplante

DMF N,N-dimetilformamida

DW Materia seca

E Transpiración

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

FAO Organización para la agricultura y la alimentación

Fv/Fm	Fluorescencia
FW	Materia fresca
gs	Conductancia estomática
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HR	Humedad relativa
Ja	Jasmonato
kD	Kilo Daltons
kHz	Kilo hercio
M	Molaridad
MARM	Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino
MDA	Malondialdehido
MeJa	Metil jasmonato
meq	Miliequivalentes
mmol	Milimoles
MPa	Mega Pascales
N	Nitrógeno
NH ₄ ⁺	Amonio
nm	Nanómetros
NO ₃ ⁻	Nitrato
O ₂	Oxígeno
O ₂ ⁻	Anión superóxido
O ₂ [·]	Oxígeno singlete
OH [·]	Radical superóxido
OA	Ajuste osmótico

PSII	Fotosistema II
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RWC	Contenido relativo de agua
S1	Solución 1
S2	Solución 2
SR	Respiración de suelo
T	Tratamiento
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
UR	Urea
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Distribución mundial de cultivo de pimiento fresco.....</i>	36
Figura 1.2. <i>Evolución de la producción de pimiento fresco en España.....</i>	37
Figura 1.3. <i>Evolución de la superficie cultivada de pimiento fresco en la Región de Murcia.....</i>	39
Figura 1.4. <i>Evolución de precios de origen de pimiento tipo Lamuyo en la Región de Murcia.....</i>	40
Figura 1.5. <i>Tipos de pimiento caracterizados por su relación ancho/largo.....</i>	45
Figura 1.6. <i>Ciclo del nitrógeno.....</i>	61
Figura 1.7. <i>Diferencias en el crecimiento de la planta de pimiento bajo una concentración de N deficiente, media y normal (0.5mmol; 3.5mmol; 12.5mmol) con aplicación de urea foliar.....</i>	62
Figura 1.8. <i>Fórmula estructural de la urea.....</i>	63
Figura 1.9. <i>Generación, transporte y degradación de urea en células de plantas.....</i>	64
Figura 1.10. <i>Reacción de la ureasa.....</i>	65
Figura 1.11. <i>Efecto tóxico de la aplicación de urea en una hoja de pimiento.....</i>	67
Figura 1.12. <i>Reacción de la catalasa.....</i>	69
Figura 1.13. <i>Imagen de la catalasa.....</i>	70
Figura 1.14. <i>Reacción de la ascorbato peroxidasa.....</i>	70
Figura 1.15. <i>Estructura del ácido ascórbico.....</i>	71
Figura 1.16. <i>Estructura y tipos de flavonoides.....</i>	72
Figura 1.17. <i>Estructura de α-caroteno y β-caroteno.....</i>	73
Figura 1.18. <i>Estructura de diferentes tocoferoles.....</i>	74
Figura 1.19. <i>Estructura química de los antocianos.....</i>	75
Figura 1.20. <i>Mecanismo de la peroxidación lipídica.....</i>	76
Figura 1.21. <i>Estructura básica de un aminoácido.....</i>	77

Figura 1.22. Estructura del ácido jasmónico.....	80
Figura 1.23. Estructura del metil jasmonato.....	80
Figura 1.24. Síntesis de los jasmonatos en respuesta a las señales de desarrollo y ambientales.....	80
Figura 3.1. Detalle del interior del invernadero experimental.....	89
Figura 3.2. Detalle del plano de la instalación de riego en el invernadero experimental.....	90
Figura 3.3. Detalle de la cámara climática.....	91
Figura 3.4. Detalle de medida de clorofilas en campo con un medidor Minolta SPAD-502.....	94
Figura 3.5. Fluorímetro OS-30p.....	96
Figura 3.6. Detalle de medición de firmeza en fruto de pimiento tipo Lamuyo.....	96
Figura 3.7. Detalle de medición de espesor del pericarpio en fruto de pimiento tipo Lamuyo.....	97
Figura 3.8. Espectrofotómetro portátil Konica-Minolta CM-2600d.....	98
Figura 3.9. Diagrama tridimensional de color L^* , a^* y b^*	98
Figura 3.10. Cromatógrafo iónico Metrohm.....	100
Figura 3.11. Acquity UPLC Waters.....	101
Figura 3.12. Recta patrón de cuantificación de los compuestos fenólicos en muestras de pimiento.....	102
Figura 3.13. Detalle de la medición de intercambio gaseoso mediante un analizador portátil CIRAS-2.....	102
Figura 3.14. Detalle del CIRAS-2.....	103
Figura 3.15. SRC-1 Soil Respiration Chamber para medir la respiración de suelo.....	104
Figura 3.16. Cámara de presión para el potencial hídrico (Ψ_w).....	106
Figura 4.1. Detalle de las plantas de pimiento en invernadero.....	114
Figura 4.2. Efecto de la urea foliar en la concentración total de N en frutos.....	116

Figura 4.3. <i>Efecto de la urea foliar en los parámetros colorimétricos de los frutos: L*, a*, b*, C* (croma), h (ángulo hue) y ΔE* (la diferencia total de color en los tratamientos de urea con respecto a los tratamientos con bajo N y sin urea).....</i>	118
Figura 4.4. <i>Efecto de la urea foliar en la concentración de antocianos y flavonoides en los frutos.....</i>	120
Figura 4.5. <i>Efecto de la urea foliar en la peroxidación lipídica (A) y en la actividad de CAT (B) y APOX (C) en los frutos.....</i>	123
Figura 4.6. <i>Efecto de la aplicación de antitranspirante (AT) o urea foliar (UR) en la firmeza de los frutos.....</i>	129
Figura 4.7. <i>Diferencia en la firmeza de los frutos al aplicar o no AT.....</i>	130
Figura 4.8. <i>Efecto de la aplicación de antitranspirante (AT) o urea foliar (UR) en el color de los frutos.....</i>	131
Figura 4.9. <i>Efecto de la aplicación de antitranspirante (AT) o urea foliar (UR) en los compuestos fenólicos totales (A), catalasa (B), ascorbato peroxidasa (C) y peroxidación lipídica (D).....</i>	136
Figura 4.10. <i>Efecto de la temperatura y la urea foliar en la asimilación neta de CO₂ (A) y el máximo rendimiento del PSII (F_v/F_m) (B) en plantas de pimiento cultivadas con solución nutritiva control (12.5 mM NO₃⁻) o deficiente en N (0 mM NO₃⁻).....</i>	143
Figura 4.11. <i>Efecto de la temperatura y la urea foliar en la respiración de suelos en plantas de pimiento cultivadas con solución nutritiva control (12.5 mM NO₃⁻) o deficiente en N (0 mM NO₃⁻).....</i>	144
Figura 4.12. <i>Efecto de la temperatura y la urea foliar en la concentración de NO₃⁻ en hoja en plantas de pimiento cultivadas con solución nutritiva control (12.5 mM NO₃⁻) o deficiente en N (0 mM NO₃⁻).....</i>	146
Figura 4.13. <i>Efecto de la temperatura y la urea foliar en la peroxidación lipídica y la actividad catalasa y ascorbato peroxidasa en hojas de plantas de pimiento cultivadas con solución nutritiva control (12.5 mM NO₃⁻) o deficiente en N (0 mM NO₃⁻).....</i>	149
Figura 4.14. <i>Diferencia en el crecimiento de las plantas al aplicar diferentes concentraciones de N.....</i>	153

Figura 4.15. <i>Efecto de las diferentes concentraciones de N (12.5; 3.5 y 0.5 mM NO₃⁻) sobre el peso seco de las plantas de pimiento.....</i>	154
Figura 4.16. <i>Efecto de las diferentes concentraciones de N (12.5; 3.5 y 0.5 mM NO₃⁻) sobre la fotosíntesis de las plantas de pimiento.....</i>	154
Figura 4.17. <i>Efecto de las diferentes concentraciones de N (12.5; 3.5 y 0.5 mM NO₃⁻) sobre la cantidad de nitratos en las plantas de pimiento.....</i>	156
Figura 4.18. <i>Relación entre la conductancia estomática (Gs) y la tasa de fotosíntesis neta (A_{CO2}) de hojas después de la aplicación de AT a 380 ppm (A) ó 2000 ppm CO₂ (B).....</i>	167
Figura 4.19. <i>Efecto de la aplicación de antitranspirante en la respiración de suelo para plantas de pimiento dulce a dos concentraciones de CO₂ (380 ó 2000 μmol mol⁻¹) después de 8 días sin riego.....</i>	168

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. <i>Evolución de la producción de pimiento fresco en la Región de Murcia.....</i>	39
Tabla 1.2. <i>Clasificación de los cultivares de fruto grande y dulce de pimiento.....</i>	46
Tabla 1.3. <i>Propiedades físico-químicas de la fibra de coco.....</i>	51
Tabla 1.4. <i>Niveles de nutrientes en la solución nutritiva recomendada para distintos cultivos de pimiento sin suelo en mmol L⁻¹.....</i>	55
Tabla 1.5. <i>Cantidad de nutrientes aportados por fertilizante recomendada para un cultivo de pimiento sin suelo.....</i>	55
Tabla 4.1. <i>Aplicación de urea en las plantas de pimiento según los tratamientos.....</i>	114
Tabla 4.2. <i>Composición de la solución nutritiva aplicada.....</i>	114
Tabla 4.3. <i>Efecto de la urea foliar (UR) y antitranspirante en la concentración de aminoácidos en frutos de pimiento dulce a 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 5°C.....</i>	138
Tabla 4.4. <i>Efecto de las diferentes concentraciones de N (12.5; 3.5 y 0.5 mM NO₃⁻) sobre la peroxidación lipídica, SPAD, y contenido de clorofilas en las plantas de pimiento.....</i>	158
Tabla 4.5 (a). <i>Efecto de la urea foliar (UR), metil jasmonato (ME) y ambos (U+M) en la concentración de aminoácidos en hojas de plantas de pimiento dulce a diferentes concentraciones de N (12.5, 3.5 y 0.5).....</i>	161
Tabla 4.5 (b). <i>Efecto de la urea foliar (UR), metil jasmonato (ME) y ambos (U+M) en la concentración de aminoácidos en hojas de plantas de pimiento dulce a diferentes concentraciones de N (12.5, 3.5 y 0.5).....</i>	162

- Tabla 4.6.** *Efecto de la aplicación de antitranspirante en la tasa de asimilación de CO₂ en hoja (A), conductancia estomática (Gs), fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm), y respiración de suelo (SR), en plantas de pimiento dulce para dos concentraciones de CO₂ (380 o 2000ppm) y bajo sequía moderada o severa (4 o 8d sin riego).....* 175
- Tabla 4.7.** *Efecto de la aplicación de antitranspirante en las relaciones hídricas para plantas de pimiento dulce a dos concentraciones de CO₂ (380 o 2000 ppm) y bajo estrés hídrico moderado o severo (4 o 8d sin riego).....* 176
- Tabla 4.8.** *Efecto de la aplicación de antitranspirante en hoja en las concentraciones de almidón, aminoácidos, azúcares solubles y prolina, en plantas de pimiento a dos concentraciones de CO₂ (380 o 2000ppm) y bajo estrés hídrico moderado o severo (4 o 8d sin riego).....* 177

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CULTIVO DE PIMIENTO

El pimiento es una de las hortalizas cultivadas que ha experimentado una de las mayores expansiones a nivel mundial y, concretamente en España, es una de las que ha tenido los rendimientos más favorables durante los últimos años, sobre todo en Almería y Murcia, donde se ha desarrollado extraordinariamente de forma extensiva debido principalmente a sus características climáticas. Es una planta originaria de América del Sur, más concretamente de la zona de Perú-Bolivia, desde la que se expandió al resto de la zona Sur y Central de este continente. Fue introducida en España por Colón en el siglo XV y durante el siglo XVI se fue extendiendo por Europa, Asia y África.

Este cultivo forma parte de la familia de las Solanáceas y posee una gran variabilidad genética, que da lugar a que existan varias posturas respecto a su denominación botánica. Sin embargo, la mayoría de los autores están de acuerdo y aceptan que es *Capsicum annuum* la especie que engloba a casi todas las variedades cultivadas (Milla, 1996). La planta de pimiento es herbácea, con un sistema radical voluminoso y con una altura variable dependiendo de la variedad y de la fecha de transplante. Se desarrolla por un tallo principal que se ramifica en tres o cuatro tallos secundarios, éstos se vuelven a bifurcar de forma que aparecen los tallos terciarios y así sucesivamente hasta el final del ciclo. Las hojas son de tacto liso formadas por un largo pecíolo que une la hoja con el tallo, mientras que las flores son hermafroditas formadas por pétalos blancos. Los frutos se definen como una baya constituida por un pericarpio grueso y un tejido placentario al que se unen las semillas que son redondeadas y con una longitud de entre 3 y 5 mm de color amarillo pálido.

España es el principal productor europeo y el quinto en el ámbito mundial de diferentes variedades cultivadas de pimiento (**Figura 1.1**) (FAO, 2009).

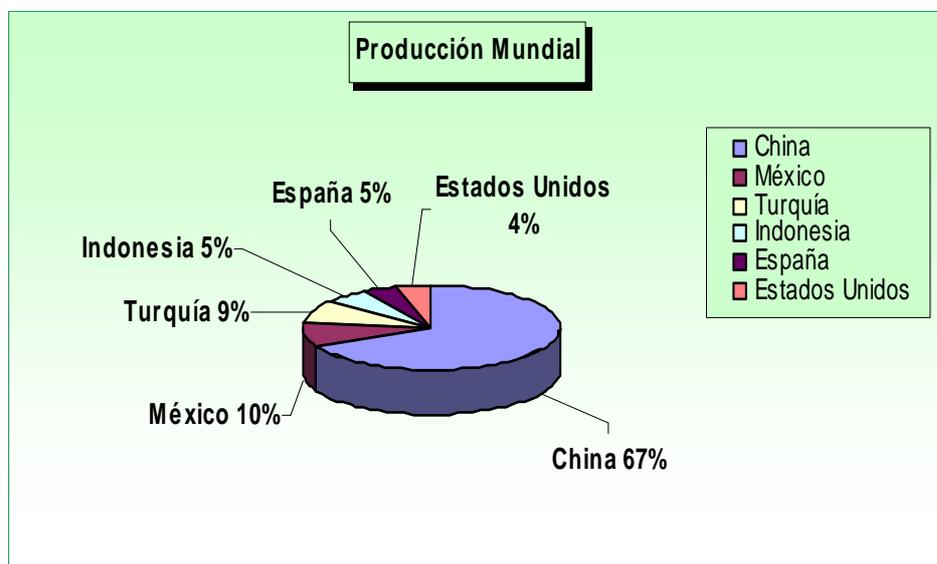


Figura 1.1. Distribución mundial de cultivo de pimiento fresco (FAO, 2009).

El cultivo de pimiento en invernaderos cubiertos con plástico está ampliamente extendido para responder a las exigencias de este cultivo fuera de la temporada. Los invernaderos con la estructura tipo parral de porte bajo, caracterizado por una insuficiente ventilación, están dejando paso a otros de porte alto con mayor volumen y mejor ventilación como el tipo multitúnel. En los últimos años, se han empezado a probar los cultivos sin suelo y con sistemas de riego cerrados, “cultivos hidropónicos”, que tienen como objetivos la limitación de las infecciones fitopatógenas del suelo y el reciclaje de la disolución nutritiva para el mejor aprovechamiento de los nutrientes.

1.1.1. El cultivo de pimiento en España

En España el pimiento es uno de los cultivos hortícolas más importantes. Según el Anuario de Estadística Agraria del MAPA (2009), es el sexto cultivo hortícola en importancia en cuanto a superficie, precedido por el tomate, el melón, la lechuga, la coliflor y la cebolla. En nuestro país aproximadamente un quinto de la producción total se destina a la industria de transformados, siendo la mayor parte destinados al mercado interior. En cuanto a la producción, destaca el

aprovechamiento de la superficie cultivada en Europa respecto a los demás continentes.

La producción total de pimiento en España en 2008 fue de 992.200 Tm y en 2009* fue de 1.011.700 Tm (* Valores estimados según FAO) (**Figura 1.2**). En cuanto a superficie cultivada de pimiento, en 2008 fue de 18.681 ha y en 2009 de 19.347 ha.

Los precios de la tierra han disminuido en 2009, continuando así el retroceso iniciado en 2008; por ello, el índice general experimenta un descenso del 4.6% en términos nominales y del 4.7% en términos reales. Las tierras de cultivo descienden sus precios en un 4,7% y los precios de las tierras ocupadas por aprovechamientos (prados y pastos) retroceden un 4,0%. Las tierras de cultivo que muestran mayores descensos de precios son las ocupadas por los cultivos protegidos, seguido de cerca por los cítricos y el fresón. Tanto el olivar como los frutales y hortalizas muestran depreciaciones en torno a la media general (de -5,0% a -7,0%). Por lo tanto, el valor del cultivo de pimiento ha descendido progresivamente desde 2006 donde presentaba una gran subida respecto a años anteriores.

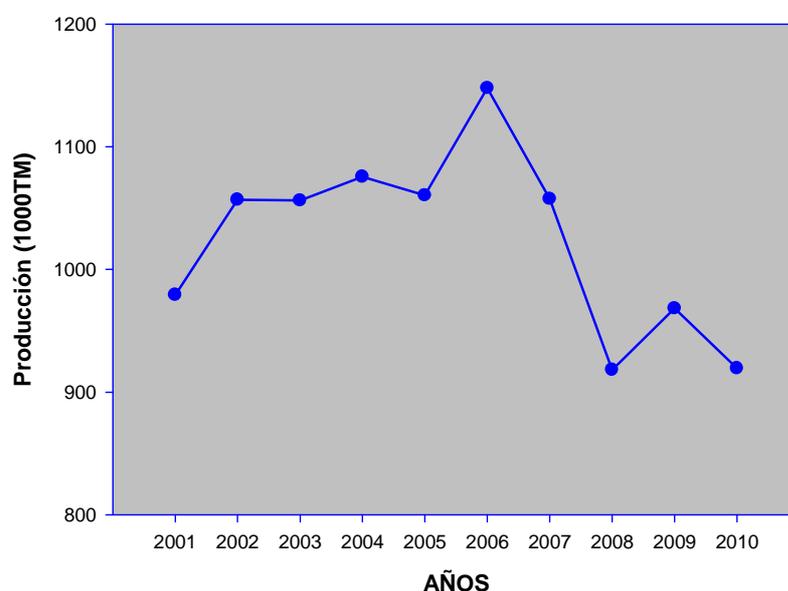


Figura 1.2. Evolución de la producción de pimiento fresco en España (Ministerio de MARM, 2009).

1.1.2. El cultivo de pimiento en la Región de Murcia

Durante los pasados años, la agricultura murciana ha alcanzado una participación extraordinaria y en continua ascensión en cuanto al sector de la hortofruticultura, por lo que su evolución está inexorablemente unida a la de los cultivos de frutas y hortalizas. De hecho, podríamos considerar que la característica más relevante de la agricultura murciana es la extraordinaria especialización hortofrutícola, muy superior a la de estas mismas producciones en la agricultura española y comunitaria.

El cultivo de pimiento tiene una gran importancia en la economía regional, ya que constituye un ejemplo típico de las nuevas orientaciones productivas de la agricultura comercial de la Región de Murcia. Introducido a comienzos del siglo XVI, fue desde mediados del siglo XIX hasta mediados del siglo pasado cuando el cultivo se extendió a lo largo de toda la Vega del Segura. Posteriormente, se produjeron cambios en los centros de producción, pasando a ser los principales, junto con la Vega del Segura, zonas como el Valle del Guadalentín y el Campo de Cartagena, que se mantienen en la actualidad como las principales zonas de cultivo de la Región.

En los últimos años, en la Región de Murcia se cultiva pimiento en una superficie de aproximadamente 1379 ha (**Figura 1.3**). La mayor parte se localiza en el Campo de Cartagena, de la cual el 80% fue cultivado bajo invernadero y acapara directa o indirectamente un gran número de mano de obra (CARM, 2010).

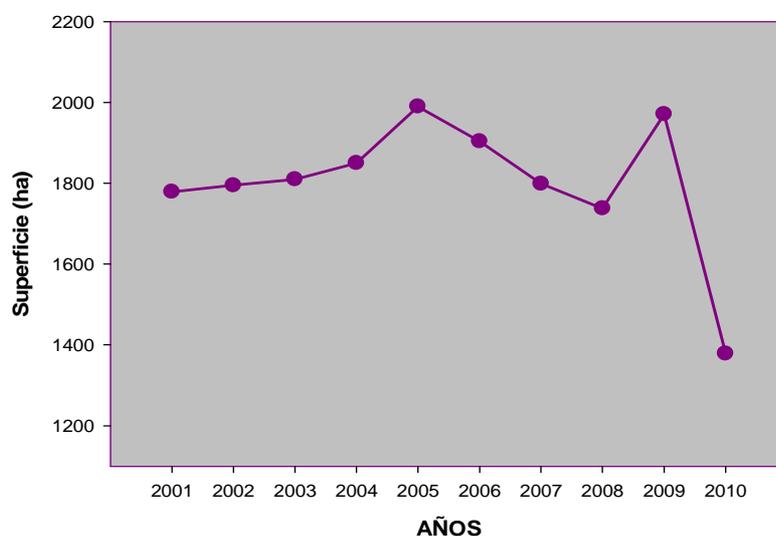


Figura 1.3. Evolución de la superficie cultivada de pimiento fresco en la Región de Murcia (CARM, 2010).

Por otro lado, también aumentó la producción anual en la Región de Murcia desde el año 2000 hasta el 2005 (**Tabla 1.1**), y a partir de 2006 hay un descenso progresivo. Gran parte de la producción se destina a la exportación siendo los principales países destinatarios Alemania, Francia, Holanda y Reino Unido. El resto de la producción se destina al mercado interior.

Tabla 1.1. Evolución de la producción de pimiento fresco en la Región de Murcia.

Producción (Tm)	AÑOS									
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010*
Región de Murcia	147140	153407	158945	162500	182500	162237	128618	125034	126741	113990

*Datos provisionales.

El cultivo del pimiento bajo invernadero constituye un ejemplo típico de las nuevas orientaciones productivas de la agricultura comercial de la Región de Murcia, el sur de la provincia de Alicante y Almería. En el conjunto de la Región existen unas 6.000 hectáreas de superficie invernada y el pimiento es el segundo cultivo en cuanto a importancia en invernadero después del tomate, aunque cabe destacar la pérdida de superficie de cultivo de alcachofa, pimiento y tomate que se ha producido en los últimos años. En cuanto a las variedades de pimiento, el tipo más cultivado para el comercio exterior es el de carne gruesa, como el tipo California de sección cuadrada, semilargo, pimiento amarillo, etc. En España, para los cultivos intensivos, en especial los de invernadero, se utilizan los pimientos gruesos de sección rectangular (más largos que anchos), de maduración en rojo cuyo modelo es el híbrido Lamuyo (Costa y Gil, 2001).

La evolución de los precios en los pimientos tipo Lamuyo ha sufrido grandes variaciones en los últimos años en la Región de Murcia, llegando en el año 2003 a ser su precio de origen de 1,02 € kg⁻¹ y 0,89 € kg⁻¹ en pimiento rojo y verde respectivamente, mientras que en el año 2010 fue de 0,89 € kg⁻¹ y 0,61 € kg⁻¹ (Figura 1.4).

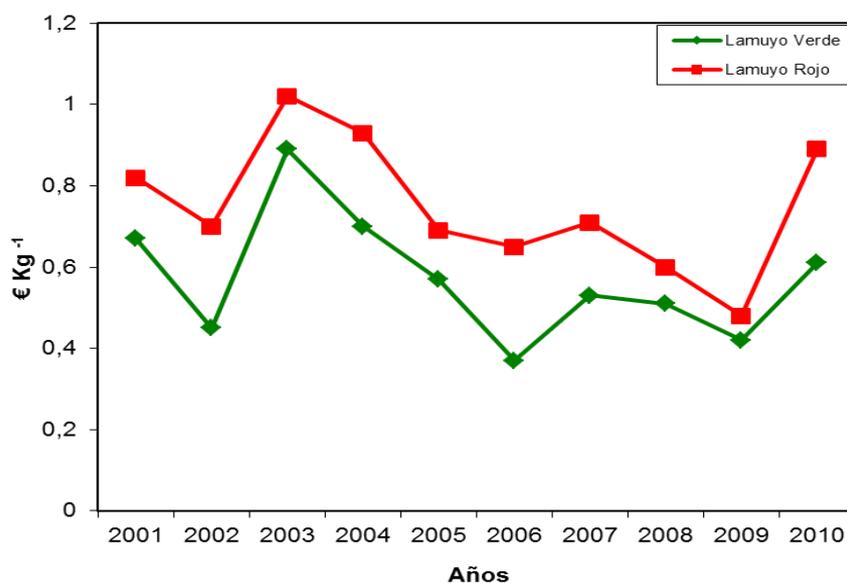


Figura 1.4. Evolución de precios de origen de pimiento tipo Lamuyo en la Región de Murcia (CARM, 2010).

1.2. DESCRIPCIÓN DEL CULTIVO

Todas las especies del género *Capsicum*, a excepción de *C. anomalum*, son originarias de América. La distribución precolombina de *Capsicum* se extendió probablemente desde el borde más meridional de los EE.UU. a la zona templada cálida del sur de Sudamérica (Namesny, 1996).

1.2.1. Descripción botánica y morfología

Todas las formas de pimiento pertenecen al género *Capsicum*. El nombre científico del género deriva del griego: según unos autores de *kapsō* (picar), según otros de *kapsakes* (cápsula).

La taxonomía dentro del género *Capsicum* es compleja, debido a la gran variabilidad de formas existentes en las especies cultivadas y a la diversidad de criterios utilizados en la clasificación.

El pimiento se cultiva como una planta herbácea anual. Su aspecto es lampiño, de tallos erguidos y de crecimiento limitado, con altura y forma de desarrollo muy variables en función del cultivar y de las condiciones de cultivo.

- Sistema Radicular: consta de una raíz pivotante, de la que se ramifica un conjunto de raíces laterales y abundantes, también con un número elevado de raíces adventicias (Nuez et al., 1996). La producción de estas raíces adventicias respecto de la biomasa total disminuye a medida que se desarrolla la planta (Somos, 1984).
- Hojas: éstas son simples, de forma lanceolada, con un ápice muy pronunciado (acuminado), lampiñas, de color verde oscuro, con un peciolo largo, de borde entero o ligeramente sinuado en la base, apareciendo alternas en el tallo.
- Flores: aparecen solitarias en cada nudo una vez han desarrollado las diez primeras hojas aproximadamente, con una inserción

aparentemente axilar. Son hermafroditas y autógamas, presentando un porcentaje variable de alogamia de entre el 10% y el 20% (Jiménez, 1992), aunque pueden encontrarse valores entre el 10% y el 46%. Son de color blanco y miden de dos a tres centímetros de diámetro.

- Fruto: se desarrolla a partir del gineceo de la flor y, más concretamente, a partir del ovario fecundado. Es una baya hueca, semicartilaginosa y deprimida que está insertada de forma pendular, con la superficie lisa y brillante, de color verde o morado al principio, para finalmente virar a colores que van del rojo a morado-negruzco, pasando por el amarillo. Al igual que la variedad de colores, la de formas es igualmente grande, con una longitud que varía entre los 3 y los 20 cm. Generalmente tienen de dos a cuatro celdas internas (dicho número de celdas será idéntico al número de carpelos del gineceo) separadas parcialmente.

En el fruto podemos distinguir las siguientes zonas:

- Epicarpio: capa externa del fruto, con una cutícula externa (exocarpo) que aparece una vez ha completado su desarrollo.
- Mesocarpio: zona carnosa intermedia.
- Endocarpio: capa membranosa interna.

1.2.2. Composición y valor nutritivo

En el fruto de pimiento, diferentes atributos como la textura, el sabor, el contenido en vitaminas y minerales, y otras características como la calidad del producto, son importantes debido al interés en la calidad y en las propiedades nutritivas por parte del consumidor.

En cuanto al contenido nutricional del pimiento, el principal componente es el agua y después los hidratos de carbono. Tiene un bajo contenido en proteínas y es una buena fuente de fibra, lo que hace del pimiento una hortaliza poco calórica.

Poseen un alto contenido en vitamina C y son, a su vez, una fuente importante de vitamina E, carotenoides (provitamina A) y en menor medida de vitaminas B₁ y B₂ (Krinsky, 2001).

La vitamina C destaca por sus propiedades antioxidantes y ayuda a prevenir algún tipo de cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, problemas oculares, etc (Davey et al., 2000). Al ser una vitamina hidrosoluble, no se almacena en el cuerpo durante mucho tiempo y por ello tiene que aportarse diariamente con la dieta. En el pimiento, se encuentra en un rango de valores de 63 a 243 mg/100g de peso fresco (Howard et al., 2000; Tadesse et al., 2002).

Uno de los aspectos más destacados en la maduración del pimiento es el cambio que experimenta el fruto de verde a rojo. Los responsables de ese color rojo son los carotenoides, también conocidos como precursores de la vitamina A. Al igual que la vitamina C, ayudan a proteger frente a diversas enfermedades, como pueden ser algunos tipos de cáncer, así como también ayudan a la diferenciación celular humana (Byers y Perry, 1992).

1.2.3. Variedades cultivadas. Clasificación

Dada la complejidad taxonómica existente en la especie *Capsicum annuum* L., resulta muy complicado establecer una clasificación clara y concisa que agrupe a las distintas variedades, debido a que el pimiento se caracteriza por la gran heterogeneidad de tamaños, formas y colores del fruto existentes entre los cultivares utilizados.

De manera más práctica y general se pueden dividir en tres grandes grupos: pimiento dulce, pimiento picante y pimiento de industria o pimentón (en realidad, a este último se le incluye como subgrupo del pimiento dulce). Las variedades de pimiento también se diferencian, además de por la gran diversidad

de caracteres morfológicos que puede presentar el fruto, por la conformación de la planta en cada caso.

Atendiendo a los diferentes tipos de frutos más importantes podemos citar los siguientes (**Figura 1.5**) (Milla, 1996):

- Pimientos cuadrados:

Dentro de este grupo se incluyen a tres familias de acuerdo con sus diferencias morfológicas: Cuadrado Americano, Cuadrado Holandés y Cuadrado Italiano.

- Pimientos rectangulares:

A este grupo pertenecen los rectangulares 1/2 largo, los 3/4 largos y los rectangulares largos.

- Pimientos codiformes o acorazonados:

Dentro de éstos cabe destacar al morrón de conserva. Los pimientos de este tipo se destinan principalmente a la industria de transformación.

- Dulce italiano:

Éstos se van a destinar tanto al mercado fresco como a la industria de transformación. Algunas variedades de referencia pueden ser: Estar, Itálico, Lipari, Teide o Doux Italien (Clause).

- Tipo cuerno picante:

A este grupo pertenecen los pimientos picantes tipo Cayenne, de pequeño tamaño. Se utilizan para el mercado fresco y se secan para obtener un polvo picante, que se utiliza como condimento.

La clasificación de cultivares internacionales más aceptada es la propuesta por Pochard en 1966, que se refiere sólo a cultivares de fruto grande y dulce por ser éstos los más corrientes en Europa y en otros lugares del mundo, y por utilizar un criterio sencillo para su clasificación. A continuación, la **Tabla 1.2** muestra los distintos tipos de pimiento que ya clasificara Pochard en su momento adaptada por Nuez et al. (1996).

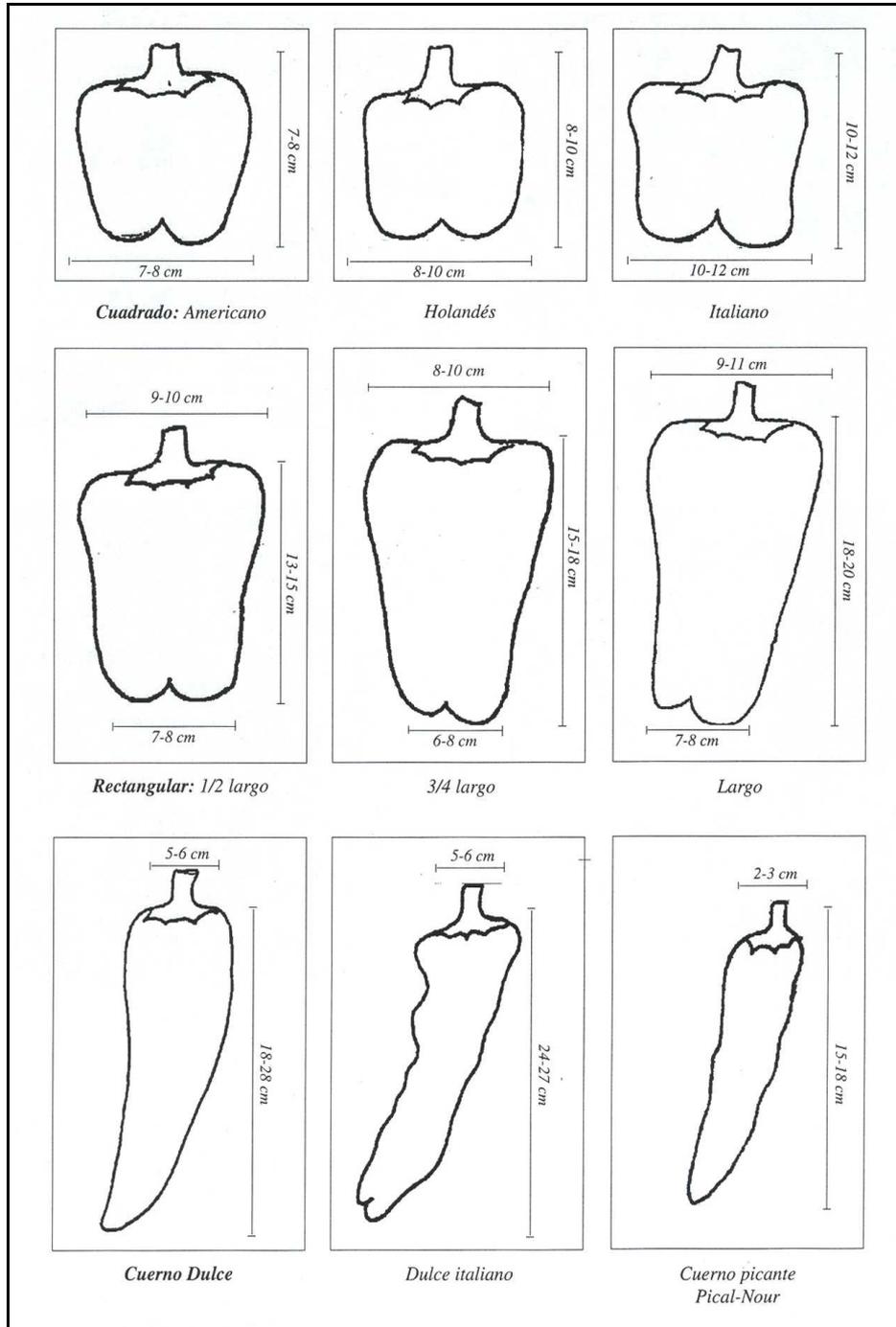


Figura 1.5. Tipos de pimiento caracterizados por su relación ancho/largo (Milla, 1996).

Tabla 1.2. Clasificación de los cultivares de fruto grande y dulce de pimiento.

A	Sección longitudinal Cuadrangular Largo = ancho	A 1	Superficie lisa. Pedúnculo no hundido, muy carnoso	California Wonder
		A 2	Pedúnculo hundido, bastante carnoso, lóculos marcados	Cuadrado de Asti
		A 3	Pedúnculo hundido, medianamente carnoso	Carré Doux Dulce Cuadrado
		A 4	Carne delgada, peso <100 g	Sverka
B	Sección longitudinal Rectangular Largo > ancho	B1	Relación longitud/anchura < 2	Morro de Vaca Lamuyo
		B2	Relación longitud/anchura > 2	Dulce de España Largo de Reus
		B3	Troncocónico, peso @ 100gr	Ruby King
		B4	Peso < 100 g	Jade Dulce Aurora
C	Sección longitudinal triangular	C1	Muy largo, puntiagudo	Cuerno de Toro Dulce Italiano
		C2	Muy largo, obtuso	Dulce de Argelia
		C3	Alargamiento medio, parte superior ancha	Najerano Infantes
		C4	Fruto corto, frecuentemente erecto	Pico de Mendavia Datler
F	Fruto aplastado, tipo tomate			Topepo
N	Fruto subsférico			Ñora o pimiento de bola
P	Fruto acorazonado			Morrón de conserva

Dicha clasificación está realizada en base a los distintos tamaños y aspectos morfológicos que poseen los pimientos dulces, diferenciándolos y denominándolos con letras, según la sección longitudinal de los frutos (cuadrados, rectangulares, triangulares, aplastados, subsféricos o acorazonados).

Dentro de cada grupo, al que se le asigna una letra diferente, los clasifica refiriéndose ahora a los distintos aspectos en cuanto al grosor de su carne, a la relación longitud/anchura, a la conformación de los lóculos, etc.

1.3. MANEJO DEL CULTIVO SIN SUELO BAJO INVERNADERO

En un principio, el término hidropónico se utilizó para definir a los cultivos cuyas raíces se desarrollaban directamente en la disolución acuosa provista de los nutrientes esenciales, suficientemente aireada y en ausencia de cualquier tipo de sustrato (Urrestarazu, 2004).

La hidroponía ha sido y es un sistema excelente para todo tipo de investigación en fisiología o patología vegetal y casi imprescindible para el estudio de la nutrición mineral de las plantas. Esta técnica ha permitido determinar qué elementos son esenciales y qué proporciones de los mismos son las más adecuadas para un mayor desarrollo de las plantas.

En los invernaderos tradicionales con limitados equipamientos, el suelo no constituía un factor limitante de la producción, pero sucesivas mejoras tecnológicas en sistemas de riego, climatización, fertilización, introducción de nuevas variedades, etc., incrementaron el uso intensivo y el potencial productivo de los mismos. Ésto condujo a la contaminación del suelo por cultivos repetitivos, lo cual sí era un factor limitante para la producción. Ello implicaba, a su vez, el traslado de ubicación de la estructura del invernadero a suelos no contaminados, con el consiguiente gasto económico.

Desde hace un par de décadas, la técnica de cultivo sin suelo se ha ido introduciendo como nueva solución y alternativa al suelo. Su mayor coste inicial pierde importancia y se diluye ante el generado por los completos equipamientos de los modernos invernaderos, que a su vez son los que permiten, con un mayor control de sus condiciones ambientales, obtener grandes producciones a lo largo de todo el año, lo que ha permitido la utilización de materiales de mejor calidad en la construcción de estructuras al tener éstos una ubicación definitiva.

1.3.1. Exigencias climáticas

En cuanto a las condiciones agroclimáticas, el pimiento es bastante exigente, por lo que el manejo equitativo de los factores climáticos es fundamental para el adecuado funcionamiento del cultivo.

1.3.1.1. *Temperatura*

Las temperaturas inferiores a 15°C retrasan o bloquean el desarrollo, siendo las temperaturas diurnas óptimas entre 23-25°C y las nocturnas entre 16-20°C, con un diferencial térmico día-noche entre 5-8°C. Las altas temperaturas, especialmente asociadas a una humedad relativa baja, conducen a la caída de flores y frutos recién cuajados.

1.3.1.2. *Humedad*

La humedad óptima del pimiento se encuentra entre el 50 y el 70%. La asociación de altas temperaturas y baja humedad puede ocasionar necrosis apical, y la caída de flores y frutos recién cuajados. Por otra parte, las humedades elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y dificultan la fecundación.

1.3.1.3. *Luminosidad*

El pimiento es una planta muy exigente en luz, situándose la intensidad lumínica óptima alrededor de los 3.000 lux. La cantidad de luz diaria total influye enormemente en la elongación del tallo, de manera que una intensidad lumínica baja provoca un crecimiento atrofiado.

1.3.2. Sistemas de cultivo hidropónico

Los sistemas de cultivo hidropónico se dividen en dos grandes grupos (Jensen y Malter, 1995):

- **Cerrados:** aquellos en donde la disolución nutritiva se recircula, aportando de forma más o menos continua, los nutrientes que la planta va consumiendo.
- **Abiertos a disolución perdida:** aquellos en los que los drenajes provenientes de la plantación, son desechados.

A escala mundial, aproximadamente el 90% son sistemas abiertos. En España, la mayoría de parcelas con cultivo hidropónico están bajo invernadero y son sistemas abiertos a disolución perdida, es decir, los lixiviados se dejan percolar en el suelo, o bien son canalizados fuera del invernadero para ser desechados.

Sin embargo, cada día se impone con más fuerza la necesidad de regeneración y reutilización de este agua de drenaje mediante sistemas cerrados, por razones tales como las que se citan a continuación:

- Posibilidad de tener un sistema cerrado de fertilizantes, para ser aprovechados al máximo.
- Escasez de recursos hídricos en algunas zonas de cultivo hortícola.
- Evitar el problema medioambiental de contaminación de acuíferos, debido a la acumulación de nitratos, fosfatos y plaguicidas.

1.3.3. Tipos de sustratos utilizados en cultivo hidropónico

Para elegir el sustrato adecuado es necesario tener en cuenta algunos factores físicos y químicos (Cantliffe et al., 2001). Debido a esas propiedades físico-químicas, los sustratos pueden reducir el crecimiento de la planta, especialmente cuando los sustratos tienen baja capacidad para retener agua, ya que se podría alterar el desarrollo de la raíz, al reducir el potencial hídrico en

tallo, hojas y frutos (del Amor y Gómez-López, 2009). Los sustratos más utilizados son los siguientes:

- **Fibra de coco**

Este tipo de sustrato es un subproducto de la industria del coco, que se encuentra disponible en grandes cantidades en los países productores de coco (*Cocos nucifera* L.).

Son varios los países que producen la fibra de coco, siendo Sri Lanka e India los principales productores, habiéndose encontrado una gran variabilidad en las propiedades físicas y químicas del sustrato entre los distintos orígenes (Noguera et al., 1999). La fibra de coco es un material ligero y tiene una porosidad total muy elevada, por encima del 93% (**Tabla 1.3**) (Alarcón, 2000). Presenta cantidades aceptables de agua fácilmente disponible y está bien aireado. Además, la fibra de coco se contrae poco cuando se deja secar (Abad et al., 1997).

Este material posee una elevada capacidad de retención del agua y se ha utilizado tradicionalmente para mejorar las propiedades físicas y químicas de los suelos (Savithri y Khan, 1993). La aplicación de fibra de coco mejora la retención de agua, aumenta la disponibilidad de nutrientes, la tasa de infiltración, la porosidad y la conductividad de los suelos donde se utiliza como enmienda.

La fibra de coco no se contrae ni se apelmaza y, aunque esté seca, recupera la misma capacidad de retener agua. Esto lo convierte en un sustrato importante en cuanto a las propiedades físico-químicas del suelo y mezclas de sustratos.

Como bien se ha dicho, la capacidad de retención hídrica de la fibra de coco es enorme, hasta ocho veces su peso en agua e incluso puede verse aumentada con el uso, pero no toda el agua retenida por este sustrato va a ser fácilmente disponible para el cultivo.

Apenas se detecta la presencia de nitratos en la fibra de coco, mientras que los valores que podemos encontrar de otros nutrientes tales como fósforo, calcio, potasio y magnesio son variables, aunque en general son altos para fósforo y potasio y bajos para calcio y magnesio. De igual manera, la cantidad de sales más o menos fitotóxicas como son los cloruros, el sodio y los sulfatos es muy variable, principalmente en función de los procesos de lavado (con agua dulce o de mar) a

los que se haya visto sometido el producto y las fertilizaciones realizadas en los cocoteros.

Tabla 1.3. *Propiedades físico-químicas de la fibra de coco.*

DETERMINACIÓN	VALOR	INTERPRETACIÓN
Densidad aparente (g cm ⁻³)	0,06	Baja
Densidad real (g cm ⁻³)	15,5	Media
Material sólido (% en volumen)	5	Bajo
Porosidad total (% en volumen)	95	Alto
Índice de grosor (% en peso)	20-35	Medio-bajo
Capacidad de aireación (% en volumen)	35-50	Alta
Agua fácilmente asimilable (% en volumen)	15-25	Media-baja
Agua de reserva (% en volumen)	5-15	Media-alta
Agua difícilmente asimilable (% en volumen)	20-35	Alta
Capacidad de intercambio catiónico (meq 100g ⁻¹)	50-90	Media-alta
pH	5,0-6,3	Ligeramente ácido
C.E. en extracto de saturación (dS m ⁻¹ a 25°C)	0,3-3,5	No salino-salino
Materia orgánica total (% en peso)	92	Media-alta
Cenizas (% en peso)	8	Media-alta
Relación C/N	100	Alta

La fibra de coco tiene una serie de ventajas, con respecto a otro tipo de materiales utilizados para el mismo fin, tales como:

- Inercia térmica más ventajosa: este sustrato, presenta un poder de amortiguación térmica ante temperaturas ambientales extremas (tanto máximas como mínimas), superior a otros sustratos como son la perlita y la lana de roca, lo que le convierte en una opción bastante interesante en cuanto a instalaciones desprovistas de calefacción, y más aún si se trabaja con cultivos muy sensibles a los cambios bruscos de temperatura, como es, por ejemplo, el pimiento. Esta inercia térmica se pierde si mantenemos una humedad excesiva y permanente, y por lo tanto, es importante mantener un buen nivel de humedad en el sustrato.

- Elevado poder de retención hídrica: su elevado poder de retención de agua, útil para la planta, reduce el riesgo de fallos del sistema, al ofrecer a la plantación un margen de tiempo con agua disponible, superior al de otros sustratos, ante inactivaciones de riegos. Este aspecto posibilita el establecimiento de una menor frecuencia de riegos.

✦ Mayor durabilidad: hablamos de un sustrato que puede ser utilizado hasta más de 5 años, sin pérdidas en las cosechas y cuyas cualidades pueden incluso mejorar con el paso del tiempo. Aún así, se deben ir reponiendo anualmente las pérdidas, por el efecto de su propia mineralización.

✦ Ventajosos aspectos medioambientales: se trata de un residuo de la industria textil, que es reaprovechado, y que cuando acaba su periodo útil, no genera riesgo por ser biodegradable. Es más ecológico que la turba.

✦ La producción y la calidad de cosechas, es similar a la de otros sustratos de empleo más extendido.

La fibra de coco tiene la desventaja de que, al ser orgánico, se descompone con el tiempo, debido a la actividad biológica que se desarrolla en su seno. Dicha degradación obliga a renovar el sustrato, normalmente cada dos años, con el fin de evitar problemas de encharcamiento.

- **Lana de roca**

La lana de roca se utiliza principalmente en la construcción, como aislante térmico y acústico. En Almería es muy utilizada; sin embargo, en Murcia se utiliza poco, debido a que es un sustrato que tiene mala inercia térmica. Es un material que presenta una baja densidad aparente ($0,08 \text{ g cm}^{-3}$), una porosidad total elevada (mayor del 96%), una alta capacidad de retención de agua fácilmente disponible (30%) y una alta aireación.

Desde el punto de vista químico, es un material prácticamente inerte y sus componentes no están en condiciones asimilables o disponibles para la planta. La fertilización, debe aplicarse con el riego (fertirrigación). Sin embargo, y debido a la interacción de la matriz sólida del sustrato con la disolución nutritiva, puede liberar calcio, magnesio, hierro y manganeso en cantidades importantes, que hay que tener en cuenta a la hora de preparar la disolución nutritiva.

- **Perlita**

Es un material sílico de origen volcánico que, sometido a altas temperaturas, se expande por deshidratación y da lugar a un material granulado, de muy baja densidad aparente, estéril y que es apto para ser utilizado en distintos campos de la agricultura y muy especialmente para cultivos de hortalizas en hidroponía o cultivo sin suelo. Es el sustrato más utilizado en cuanto a superficie de cultivo sin suelo en España (Alarcón, 2000).

- **Vermiculita**

Es un silicato hidratado de magnesio, hierro y aluminio. El material original presenta una estructura trilaminar, con moléculas de agua atrapadas entre las láminas. En su transformación industrial, este material es tratado en hornos a temperaturas elevadas (1000°C), durante un corto periodo de tiempo (60 segundos), lo que da lugar a que el agua se evapore, y el resultante incremento de la presión, hace que dichas láminas se expandan en dirección perpendicular a los planos de laminación, adquiriendo una estructura porosa y esponjosa.

1.3.4. Riego y fertilización

- **Riego**

Las necesidades de agua del pimiento son menores al inicio del cultivo, aumentando posteriormente, conforme avanza el desarrollo, hasta llegar a un máximo en la formación de frutos y disminuyendo ligeramente en el periodo de recolección, para fortalecer los frutos y facilitar la maduración (Katerji et al., 1993). La mayor sensibilidad al estrés hídrico, se produce en la fase de floración y fecundación. La planta de pimiento se considera moderadamente sensible a la salinidad, y por ello el volumen de cada riego también dependerá de las condiciones del agua utilizada: con aguas de CE elevadas se deberá incrementar los volúmenes de riego.

El déficit hídrico en pimiento, puede reducir significativamente la masa fresca de la planta, disminuyendo a su vez, el movimiento hídrico en el fruto (Dorji et al., 2005).

En los cultivos de pimiento sin suelo, el aporte de agua y parte de los nutrientes, se realizará mediante riego por goteo automatizados, frecuentes y cortos, y el control de los mismos se realizará por medio del porcentaje de drenaje y controlando su CE y pH, debido a que la calidad del agua de riego, es uno de los factores que nos condicionan en el cultivo hidropónico.

En el clima mediterráneo, es muy importante la combinación sustrato-riego, ya que hay estudios (Prieto et al., 2007) en los que los cultivos con suelo, obtienen menos área de hoja, que los cultivos hidropónicos (del Amor y Gómez-López, 2009). A su vez, Pinker et al. (2007) observaron, que las plantas bajo cultivo hidropónico, con sustrato de fibra de coco, eran más altas y vigorosas que aquellas no cultivadas en dicha fibra.

- **Fertilización**

El pimiento necesita grandes cantidades de nutrientes. La cantidad total y el equilibrio entre los diferentes nutrientes aportados, condicionan la cantidad y el rendimiento de la cosecha, así como su precocidad. Un nivel suficiente de los elementos nutritivos en las hojas de la planta, en el momento de la floración, resulta fundamental para obtener una buena cosecha (Llanos, 1998).

En la fertilización del cultivo sin suelo, es necesario el conocimiento de los procesos fisiológicos relativos a la absorción mineral e hídrica, y de otros aspectos como la fotosíntesis, la transpiración y la respiración, que están ligados a los primeros. La nutrición de la planta se aporta mediante la disolución nutritiva, por lo que se puede controlar con precisión la nutrición mineral, para obtener una mayor rentabilidad del cultivo. La nutrición mineral de un cultivo hidropónico, debe controlarse según la demanda de la planta, mediante análisis químicos (Alarcón, 1996). A partir de los datos obtenidos, se elabora una solución nutritiva de partida y, posteriormente, será el propio cultivo el que vaya demandando las aportaciones oportunas (**Tabla 1.4**) (Salas y Urrestarazu, 2004).

Tabla 1.4. Niveles de nutrientes en la solución nutritiva recomendada para distintos cultivos de pimiento sin suelo en mmol L⁻¹.

	CE	pH	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
California en fibra de coco	1-1,8	5,5	10-14	1,5-1,7	2,0	0,5	5,0	5,0	2,0
Lamuyo en fibra de coco	1-1,8	5,5	10-14	1,5-1,8	—	—	4-4,5	4-4,5	1,5-2
California en lana de roca	2,2		15,5	1,25	1,75	1,25	6,5	4,75	1,5
California en perlita			13,5	1,5	1,35		5,5	4,5	1,5

En función de lo que vaya demandando la planta, las condiciones climatológicas y el estado fenológico del cultivo, se ajustarán los nutrientes necesarios, mediante la equivalencia de cantidad de fertilizantes y los milimoles de los distintos nutrientes (**Tabla 1.5**) (Alarcón, 1996).

Tabla 1.5. Cantidad de nutrientes aportados por fertilizante recomendada para un cultivo de pimiento sin suelo.

Iones (mmoles g ⁻¹ fertilizante)	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	H ₂ PO ₄ ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SO ₄ ²⁻
Acido fosfórico 75%	—	—	12,26	—	—	—	—
Acido nítrico 59%	11,86	—	—	—	—	—	—
Nitrato amónico 33,5%	11,96	11,96	—	—	—	—	—
Nitrato cálcico 15,5% N	10,29	0,78	—	—	4,74	—	—
Nitrato potásico (13-0-46)	9,29	—	—	9,76	—	—	—
Sulfato potásico (0-0-52)	—	—	—	11,04	—	—	5,93
Sulfato magnésico 16% MgO	—	—	—	—	—	3,97	3,96
Nitrato magnésico 11% N	7,86	—	—	—	—	3,90	—

1.3.5. Ventajas y desventajas de la producción en cultivo sin suelo

La producción en “cultivo sin suelo” tiene numerosas ventajas (Penningsfield y Kurzmann, 1983; Cánovas, 1997; Borrelli, 1999):

- ✓ Mejor aprovechamiento de fertilizantes.
- ✓ Es posible alcanzar y mantener en el medio de raíces, la concentración del nutriente que se desee.
- ✓ Hay una mayor uniformidad en las plantas.
- ✓ La nutrición puede ser cambiada en cualquier momento, en función de las condiciones climáticas.
- ✓ La floración y fructificación están influenciadas por el N. Por ello, el aporte de este nutriente, puede regular las fases del ciclo vegetativo y reproductivo del desarrollo de las plantas.
- ✓ Menores posibilidades de que las plantas sufran, como consecuencia de la limitación de agua.
- ✓ Menores problemas fitosanitarios y mayor facilidad para su control.
- ✓ Permite cultivar plantas en zonas donde no hay suelo, o donde éste puede estar contaminado, o no reúna las condiciones de fertilidad adecuadas.
- ✓ El pH de la disolución puede mantenerse fácilmente en el rango más adecuado para cada cultivo.
- ✓ Pueden ser una alternativa importante, en caso de masivas infestaciones de parásitos del suelo, en cultivo tradicional.
- ✓ Notable reducción en la cuantía y complejidad de labores de cultivo.
- ✓ En sistemas bien manejados, se obtienen producciones muy elevadas y de muy alta calidad.

Entre sus desventajas, se pueden destacar (Penningsfield y Kurzmann, 1983; Cánovas, 1997):

- ✓ Elevado coste de implantación.
- ✓ Importantes gastos de mantenimiento.
- ✓ Requiere de una determinada cualificación del personal encargado de su manejo.
- ✓ La producción es limitada, comparada con la de campo.
- ✓ En condiciones de invernadero, su uso está limitado a cultivos de alto valor.

1.4. CONTAMINACIÓN POR NITRATOS

En las últimas décadas, la agricultura ha experimentado un avance espectacular con la aplicación de nuevas tecnologías, fertilizantes, productos fitosanitarios, semillas híbridas, nuevas técnicas de cultivo, etc. La combinación de todos estos recursos, entre otros muchos, ha logrado elevar las producciones y el nivel de vida del agricultor aceptablemente. A medida que los años pasan, los efectos de algunas prácticas agrícolas, van dejándose sentir en el medio ambiente, sobre todo en las zonas de cultivo. De sobra son conocidos los efectos del empleo de muchos productos químicos para tratamientos fitosanitarios.

Actualmente, hay un tipo de contaminación que ha empezado a cobrar una gran importancia; es el caso de “la contaminación de aguas por nitratos”. Los excesos de abonado con abonos nitrogenados, y su posterior arrastre por las aguas de lluvia o riegos, están provocando concentraciones elevadas de nitratos en aguas superficiales y subterráneas (del Amor et al., 2009). La contaminación por nitratos, es uno de los principales factores de contaminación de acuíferos y corrientes superficiales de alto impacto ambiental, derivado de actividades agropecuarias (Groeneveld et al., 2001).

Las aguas con dosis de nitrato altas, puede alterar la salud del ser humano si son consumidas por éste. Otro efecto, es el alto crecimiento de las plantas acuáticas, que habitan en aguas con elevadas dosis de nitrato. Este crecimiento se puede considerar perjudicial, ya que las plantas se pudren y consumen el oxígeno, causando la muerte de los peces.

Preocupado por el estado de la calidad de nuestras aguas, el Ministerio de Obras Públicas emprende a principios de la década de los 60, una serie de análisis físico-químicos y bacteriológicos, en un número de estaciones de muestreo, dispersas por todo el territorio nacional. Estos análisis, comienzan a ser publicados anualmente en 1973, en unos volúmenes editados por el propio Ministerio.

Prueba de la seriedad del problema, son las normas elaboradas por el Consejo de la Comunidad Europea en 1991 donde, en relación con el tema, se dictan una serie de buenas prácticas agrícolas y normas preventivas, con el fin de reducir el incremento del nitrato en las aguas. El Real Decreto 261/1996 del 16 de febrero sobre la protección de las aguas, contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias, establece una serie de programas y medidas para empezar a frenar la contaminación.

La normativa actual pone de manifiesto, que éste es un campo en el cual se va a trabajar intensamente a partir de ahora, ya que debido a la multitud de factores que intervienen en esta situación, se hace necesaria la participación de distintos organismos y técnicos de diversos campos, con el fin de profundizar los conocimientos sobre el tema, así como de elaborar nuevas prácticas agrarias beneficiosas y sistemas de depuración de aguas.

Entre las fuentes que contribuyen a la contaminación difusa de las aguas, la más importante, en la actualidad, es la aplicación excesiva o inadecuada de los fertilizantes nitrogenados en la agricultura, entendiéndose por contaminación difusa por nitrato, el vertido indiferente del ión NO_3^- en el suelo y consecuentemente en el agua, hasta alcanzar los 50 mg L^{-1} de concentración máxima admisible y 25 mg L^{-1} como nivel guía o recomendado.

Independientemente de los posibles efectos directos sobre la población, las altas concentraciones de nitratos en las aguas subterráneas en España, constituyen una grave amenaza a la integridad de nuestro patrimonio hídrico, principalmente por su carácter acumulativo.

Dos de los procesos del movimiento del agua en el suelo son:

- *Lixiviación*: La lixiviación o lavado del nitrato, es el arrastre del mismo por el agua del suelo, que percola más abajo de la zona radicular. Este proceso

es el que produce la contaminación de las aguas subterráneas por nitrato, ya que, en general, una vez que deja de estar al alcance de las raíces, continúa su movimiento descendente hacia los acuíferos, sin apenas ninguna transformación química o biológica. El agua de lixiviación arrastra consigo nutrientes, cationes básicos y, en ocasiones, pesticidas agroquímicos (Tapia et al., 2007).

- *Arrastre por escorrentía:* La escorrentía del agua en los suelos agrícolas, es el flujo del agua sobre la superficie del suelo, de modo que no se infiltra en el campo, sino que fluye normalmente hacia terrenos más bajos o cursos superficiales de agua. Se produce como consecuencia de lluvias o riegos excesivos y puede arrastrar cantidades variables de N. En general, estas pérdidas de N del suelo son pequeñas, excepto cuando la escorrentía se produce poco después de un abonado nitrogenado.

Para paliar este problema y en cumplimiento de la Directiva 91/676/CEE del Consejo del 12 de diciembre, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación, producida por nitratos de origen agrícola, que se incorpora al ordenamiento jurídico español, por medio del Real Decreto 261/1996 del 16 de febrero, sobre protección contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias, se publica en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, la Orden del 20 de diciembre de 2001 de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, por la que se designa las zonas vulnerables a dicha contaminación.

Además, se publica la Orden del 22 de diciembre de 2003, por la que se designa la zona vulnerable a la contaminación procedente de fuentes agrarias, en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, la correspondiente a los acuíferos de las Vegas Alta y Media de la Cuenca del Río Segura.

En invernadero, los nutrientes son suministrados en exceso a fin de evitar deficiencias. Incluso en sistemas de recirculación de la solución nutritiva, la disolución es desechada para evitar desequilibrios nutricionales. De esta forma, los agricultores no aplican un control óptimo sobre la producción y calidad de los frutos.

El ión NO_3^- es soluble en agua, por lo que puede lixiviarse fácilmente, alcanzando los acuíferos subterráneos y permaneciendo allí por décadas. La agricultura es la actividad humana que más contribuye a la contaminación por nitratos.

El origen del ión NO_3^- es variado, pudiendo provenir de fuentes localizadas y no localizadas. Las fuentes no localizadas, son todas aquellas donde no existe un punto fijo de entrada de los contaminantes. El aporte puede proceder tanto de la mineralización de nitrógeno orgánico (humus, estiércol, etc.), como del aporte de fertilizantes nitrogenados. Son muchos los estudios que han constatado este potencial contaminante de la agricultura, observándose una relación positiva entre el aumento de la actividad agrícola y la contaminación de las aguas por nitratos (Weil et al., 1990; Bauder et al., 1993; Lucey y Goolsby, 1993; Richards et al., 1996).

El Código de Buenas Prácticas Agrarias de la Región de Murcia (BORM, 2003), establece una normativa en el que se deberá fraccionar el nitrógeno a lo largo del ciclo de cultivo, como mínimo semanalmente, en forma nítrico-amoniacoal o nítrica. Siempre que sea posible, se recomienda utilizar abonos naturales procedentes del ganado. Sin embargo, con el abono natural (estiércoles o purines), hay que tener las mismas precauciones que con el abono químico o de síntesis, ya que contiene nitrógeno, que acabará convirtiéndose en nitratos. A la hora de calcular las necesidades totales, hay que tener en cuenta tanto el abono natural como el químico.

Las dosis de los nutrientes a aportar, serán calculadas a partir de las necesidades de los cultivos y del ajuste de los programas de abonado a las extracciones de las plantas, durante todo el ciclo de cultivo. Así como las características del suelo, las peculiaridades climáticas del año agrícola y el estado real de las siembras o plantaciones, a fin de evitar desviaciones entre las cantidades de nutrientes aportados y los realmente consumidos por los cultivos.

1.5. FERTIRRIGACIÓN NITROGENADA

El nitrógeno se encuentra distribuido en la atmósfera, la litosfera y la biomasa. El N de la litosfera participa escasamente en el intercambio de este

elemento entre los distintos reservorios (ciclo del N), por lo que la mayor parte del N que precisan las plantas para su crecimiento proviene en último término de la atmósfera (Aparicio-Tejo et al., 2000). El nitrógeno, después del carbono y del agua, es el nutriente más limitante para el crecimiento de plantas, en la mayoría de los ecosistemas terrestres y acuáticos (Vance, 1998), ejerciendo una presión constante en las plantas para el uso eficiente del nitrógeno (Vitousek y Howarth, 1991) (Figura 1.6).

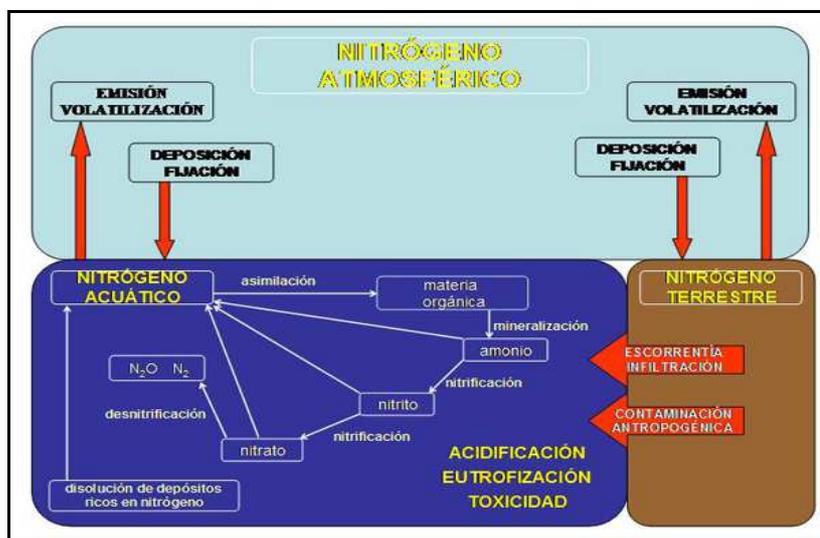


Figura 1.6. Ciclo del Nitrógeno.

Las plantas poseen una gran variedad de proteínas implicadas en la absorción y partición de nitrógeno, no sólo para el nitrato y el amonio, sino también para los aminoácidos, los péptidos, los nucleótidos y sus productos de degradación, y para la urea (Kojima et al., 2006; Rentsch et al., 2007; Mohlmann et al., 2010). Estos procesos son especialmente importantes durante la germinación y senescencia, cuando los tejidos fuente de nitrógeno (semillas, hojas senescentes), proporcionan nitrógeno para los sumideros metabólicos (plántulas, flores, semillas en desarrollo y los órganos de almacenamiento) (Witte, 2011).

El nitrógeno es el nutriente más utilizado como fertilizante en los cultivos vegetales (Marschner, 1995; Römheld, 2000), siendo el responsable del desarrollo verde de las hojas, debido a que el nitrógeno forma parte de la molécula de la clorofila. Los resultados de una insuficiente concentración de nitrógeno se reflejan

en un crecimiento pobre del cultivo y en un menor rendimiento del mismo (Figura 1.7).



Figura 1.7. Diferencias en el crecimiento de la planta de pimiento bajo una concentración de N deficiente, media y normal (0.5mmol; 3.5mmol; 12.5mmol) con aplicación de urea foliar.

El nitrógeno es probablemente el nutriente más contaminante de suelos y aguas terrestres en forma de nitrato (NO_3^-), y es especialmente propenso a causar contaminación, cuando se aplica en excesivas cantidades sobre el cultivo (van der Voet et al., 1996; Chen et al., 2009). La molécula de NO_3^- esta unida débilmente por las partículas del suelo y por lo tanto es altamente móvil por el mismo, lo que permite que el exceso de nitrato se pueda transportar, a través del agua del interior del suelo o circular por la superficie. El resultado de esto, podría ser una contaminación del agua.

La contaminación ambiental de los fertilizantes se produce por las pérdidas de nitrógeno que se dirigen tanto a la atmósfera como a las aguas superficiales y subterráneas. Estas pérdidas, son provocadas por la lixiviación de nitrato (NO_3^-) (Smith et al., 1990), la volatilización de amoníaco procedente del amonio (NH_4^+) y por la desnitrificación bacteriana del nitrato (Tiedje, 1988).

La planta absorbe el nitrógeno tanto en forma de nitrato (NO_3^-) como amoniacal (NH_4^+), demostrándose así, que un suministro combinado de ambas formas químicas, NO_3^- y NH_4^+ , produce mayor crecimiento y mayor producción

de frutos (Marschner, 1995), respecto a la aplicación única de nitratos. Sin embargo, la relación entre ambos iones es un factor de gran incidencia en el cultivo, puesto que un aumento excesivo de la relación $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ de la disolución nutritiva, puede limitar el crecimiento de la planta (Quasem y Hill, 1993) o producir el descenso de los rendimientos, debido a un menor número y menor peso medio de los frutos (Feigin et al., 1980). Tal y como describieron He et al. (2007), altas concentraciones de NO_3^- producen nitritos y otros compuestos tóxicos para las plantas, afectando también al crecimiento de la misma.

Los niveles de nutrientes en la planta durante el período de crecimiento cambian rápidamente, y disponer de información del estado nutricional del cultivo, permite actuar mediante el abonado de corrección, en caso de que se detecten deficiencias.

Una estrategia que persigue aumentar la rentabilidad del rendimiento del cultivo y a la vez evitar la contaminación del agua, es la de aplicar solamente las cantidades de nitrógeno que van a ser utilizadas para el crecimiento del cultivo. Esto puede lograrse con el uso de técnicas analíticas, observando *in situ* los niveles, con aparatos de campo, y evitando, por tanto, insuficiencias o excesos en la aplicación del fertilizante.

1.6. UREA: CARACTERÍSTICAS

La urea es una molécula pequeña, neutra, con un diámetro de 75.3 Å (Figura 1.8) y se encuentra en la naturaleza, donde es una fuente de nitrógeno para el crecimiento de varios organismos incluyendo bacterias, hongos y plantas.

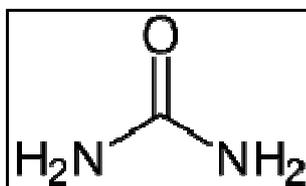


Figura 1.8. Fórmula estructural de la urea.

Las principales fuentes de urea en la naturaleza son, la descomposición de compuestos nitrogenados provenientes de organismos muertos y la excreción de la orina por los animales, por lo que las plantas son capaces de utilizar estos compuestos como fuente de N para su crecimiento (Wang et al., 2008) (**Figura 1.9**).

La urea es el fertilizante nitrogenado más utilizado en el mundo (Watson, 2000), su hidrólisis enzimática es de una gran transcendencia en la agricultura (Mobley et al., 1995) y se caracteriza por la alta tasa de penetración en la hoja y su bajo coste (Nestby y Tagliavini, 2005). La urea es metabolizada rápidamente por las enzimas de degradación de la urea presentes en el suelo (Watson et al., 1994) y no se acumula en el citosol (Witte et al., 2002).

Aunque la determinación de urea se ha centrado principalmente en aplicaciones clínicas (Taylor y Vadgama, 1992), está aumentando el interés por determinar la urea en otras matrices como por ejemplo leche (Lefier, 1996), extractos de suelo (Lambert et al., 2004) y vino (Francis, 2006). La urea también se usa en los suplementos de alimentación animal y tiene muchas aplicaciones industriales, incluyendo la manufactura de resinas, pegamentos, solventes y algunas medicinas. En los productos para el consumo, la urea se encuentra en muchos jabones líquidos, detergentes y otros productos de limpieza, y también se utiliza mucho en los tratamientos para pieles secas y en cosmética (Francis et al., 2002).

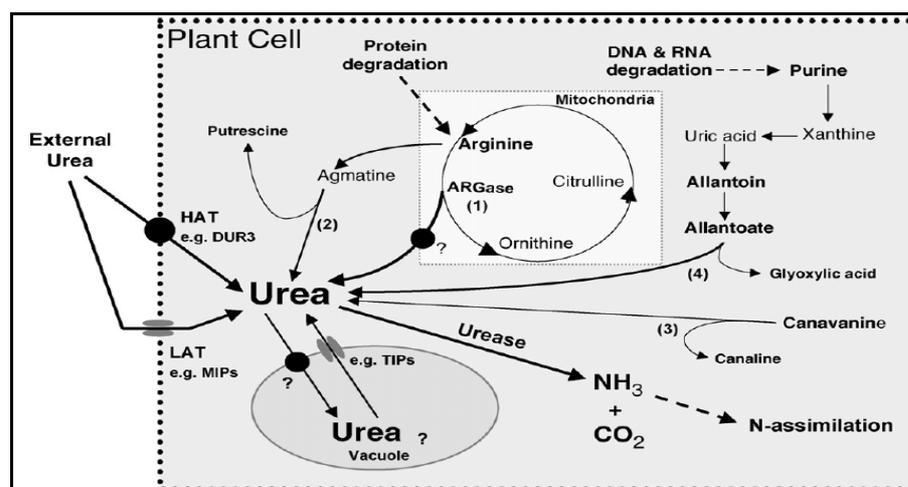


Figura 1.9. Generación, transporte y degradación de urea en células de plantas.

La utilización de la urea por la planta, cuando se aplica por vía foliar, requiere la presencia de una diastasa microbiana, la ureasa, que se encuentra en los tejidos de las hojas. La ureasa produce la hidrólisis de la urea que se transforma en aminoácidos y proteínas transportables, en su mayoría, desde las hojas a otras partes de la planta. La ureasa facilita la conversión de urea a amonio y dióxido de carbono (Sirko y Brodzik, 2000) (**Figura 1.10**). La hidrólisis de la urea también contribuye a la osmorregulación en diferentes órganos o tejidos (Sands, 2003). Los microorganismos oxidan el amonio a nitrato (NO_3^-) y, en condiciones anaeróbicas, reducen el nitrato a los óxidos de nitrógeno gaseoso y nitrógeno molecular. El nitrógeno suministrado en forma de urea también puede ser absorbido por las plantas y, posteriormente, por los animales herbívoros (Lambert et al., 2004). El ciclo de nitrógeno a través de los sistemas de plantas y animales resulta en un conjunto de nuevas reacciones y transferencias químicas, por lo tanto, la incorporación de nitrógeno en un rango de compuestos orgánicos, podría dar lugar a la regeneración de la urea (Merigout et al., 2008; Cao et al., 2010). Además, el nitrógeno suministrado como urea, puede ser transferido a la atmósfera por la volatilización de amoníaco o llevado al agua del suelo y a la superficie.

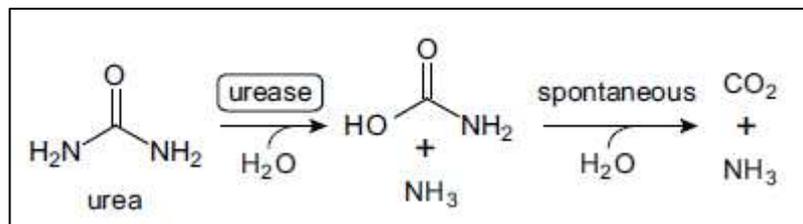


Figura 1.10. Reacción de la ureasa.

1.6.1. Nutrición con urea foliar

La fertilización química aplicada al suelo ha sido la forma más comúnmente utilizada para abastecer a los cultivos de nutrientes. Pero existen características químicas, físicas y biológicas que pueden limitar la disponibilidad de dichos nutrientes en la disolución del suelo. Bajo estas condiciones, la fertilización foliar podría ser particularmente útil (Mengel y Kirby, 1982). Tisdale y Werner (1988) mencionaron que la fertilización foliar debe utilizarse no sólo en aquellos casos en

los que la disponibilidad nutritiva en el suelo es un problema, sino también en casos donde se necesita subsanar problemas de deficiencias en los cultivos, sobre todo porque mediante esta técnica, los nutrientes se asimilan de forma más rápida (Swietlik y Faust, 1984). La nutrición vía foliar resulta más económica que la fertilización al suelo, por las bajas cantidades de producto utilizado, así como por su mayor aprovechamiento (Eibner, 1985), generando una menor contaminación en el suelo. Recientemente, ya se han establecido programas de abonado en los que se incluye la fertilización foliar para disminuir eficazmente la contaminación por nitratos en los acuíferos (Bondada et al., 2001).

El fertilizante a base de urea se distribuye en el suelo en forma de gránulos secos o disueltos en la solución, a menudo simultáneamente con el agua de riego, aunque también puede aplicarse a través del follaje facilitando la óptima administración de N en las prácticas de fertilización agrícola. Una vez en el suelo, la urea puede someterse a una serie de transformaciones químicas y físicas (Lambert et al., 2004). Los factores que afectan la eficiencia de las aplicaciones de urea incluyen: factores ambientales como la temperatura del aire, la humedad y la luz, factores tecnológicos como el pH (El-Otmani et al., 2002), la presencia de los tensoactivos y la concentración de la solución aplicada (Toselli et al., 2004) y factores fisiológicos como la etapa de desarrollo de la planta, la presencia de los sumideros de carbono / nitrógeno, el área foliar y el estado del N interno (Weinbaum et al., 2002).

La mayoría de las plantas absorben la urea foliar rápidamente aunque, un inconveniente de aplicar urea en spray, es el efecto tóxico de la urea si ésta se acumula en altas concentraciones, lo cual puede provocar un daño en la biomasa de los cultivos (Walker et al., 1985; Krogmeier et al., 1989; Nicoulaud y Bloom, 1996) (**Figura 1.11**).



Figura 1.11. Efecto tóxico de la aplicación de urea en una hoja de pimiento.

La posibilidad de la aplicación de urea foliar como fuente de nitrógeno en plantas fue demostrada por Nicoulaud y Bloom (1998). Estos resultados nos indican que:

- a) La urea aplicada vía foliar, puede suplir parte del N requerido para el mantenimiento del crecimiento.
- b) La urea es absorbida con la suficiente rapidez para compensar la falta de N.
- c) El inconveniente de suministrar N únicamente por vía foliar, puede residir en la fitotoxicidad de la urea y no en la deficiencia de N.

1.7. ESTRÉS OXIDATIVO. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), se produce principalmente por subproductos del metabolismo celular de la mitocondria (Purvis et al., 1995), cuya respiración está asociada con la pérdida de un electrón, dando como resultado una formación continua de ROS (Masaki et al., 1999; Terman et al., 2006). El daño oxidativo en membranas y proteínas, está causado principalmente por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Koc et al., 2004). La

acumulación de compuestos altamente reactivos, que conduce a una cascada de reacciones de radicales libres llamado estrés oxidativo, es uno de los principales factores que explican los daños del ADN y las proteínas, y el aumento de la permeabilidad de la membrana, alterando la homeostasis celular (Scandalios, 1993). La generación acelerada de las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas, es una de las primeras consecuencias del estrés (Kuzniak, 2002). El sistema de protección contra el estrés oxidativo es conocido por tener dos componentes: las enzimas antioxidantes y los antioxidantes de bajo peso molecular.

El consecuente cambio en el entorno redox de las células altera el metabolismo celular y la expresión de genes (Escoubas et al., 1995; Vener et al., 1995). ROS como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$), y oxígeno singlete (O_2), están presentes en las plantas a varios niveles como resultado del metabolismo aeróbico (Kuk et al., 2003), y todos estos compuestos reaccionan con lípidos, proteínas y ADN, e inducen daños estructurales en las membranas celulares y en macromoléculas (Asada, 1999).

Por ello, normalmente la generación de ROS se mantiene bajo control por la maquinaria antioxidante que incluye enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidasa (POX, EC 1.11.1.7), ascorbato peroxidasa (APOX, EC 1.11.1.11) (Omran, 1980; Foyer et al., 1991; Scandalios, 1993; Prasad, 1996; Lee y Lee, 2000; Oidaira et al., 2000) y moléculas antioxidantes como ascorbato, α -tocoferol, carotenoides, flavonoides y glutatión (Hodges et al., 1996; Alscher et al., 1997; Foyer et al., 1997; Noctor y Foyer, 1998). La resistencia de las plantas al estrés, está determinada por los niveles de estos compuestos antioxidantes y por la habilidad para incrementar rápidamente estas actividades (Sairam et al., 1998; Aroca et al., 2001; Shalata et al., 2001; Mittler, 2002). Cuando las plantas están sujetas a condiciones adversas, como pueden ser altas o bajas temperaturas, sequía o estrés salino, se puede producir un desequilibrio entre la producción y la destrucción de ROS dando lugar a un daño oxidativo (Price et al., 1989; Hodgson y Raison, 1991; Bowler et al., 1992; Zhang y Kirkham, 1994; Zhang y Han, 1997). En los frutos de las plantas, el ablandamiento es una característica de la maduración y una producción excesiva de ROS, acelera la maduración (Fry et al., 2001; Cheng et al., 2008). Por lo

tanto, se cree que la oxidación celular y la peroxidación están asociadas con el ablandamiento de los frutos.

La producción de ROS mejora bajo varios estreses bióticos y abióticos (Grant y Loake, 2000; Cuypers et al., 2001), y los sistemas antioxidantes mejoran las perturbaciones causadas por el estrés (Halliwell y Gutteridge, 1989; Cadenas, 1995).

1.8. DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE LAS PLANTAS

1.8.1. Catalasa

Las catalasas de plantas son hemoproteínas tetraméricas (220 kD) que catalizan la descomposición de H_2O_2 a O_2 y H_2O sin necesidad de un poder reductor (Starzynska et al., 2003; Singh et al., 2009) (**Figura 1.12**). La catalasa es una enzima muy abundante en los tejidos, y se encuentra localizada en los peroxisomas y glioxisomas de todas las células eucariotas (**Figura 1.13**), y es activa tan sólo a altas concentraciones de H_2O_2 . Esta enzima cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua. A diferencia de las peroxidasas, la catalasa no necesita reductores adicionales para llevar a cabo su función. Sin embargo, la catalasa posee baja afinidad por el peróxido de hidrógeno, por lo que resulta poco eficiente a bajas concentraciones de sustrato (Dalton, 1995).



Figura 1.12. Reacción de la catalasa.

La expresión de la enzima está regulada durante el desarrollo, pero también responde a diversas señales ambientales como el exceso de luz, y las temperaturas extremas, ya que generalmente, la enzima se inhibe tanto a temperaturas bajas como ante un shock térmico.

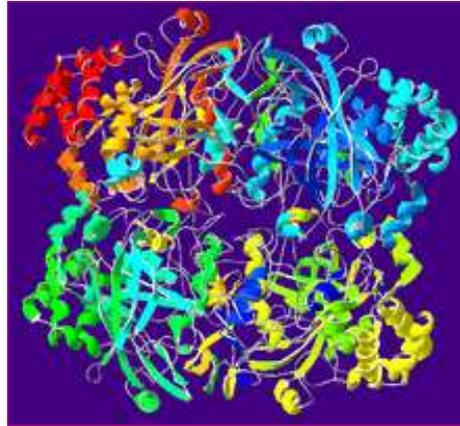


Figura 1.13. *Imagen de la catalasa.*

1.8.2. Ascorbato Peroxidasa

La ascorbato peroxidasa es una enzima que, intracelularmente, ayuda al ácido ascórbico a regular la división celular y las actividades relacionadas con el metabolismo del ácido ascórbico, y la respuesta antioxidante (Córdoba-Pedregosa et al., 2003). Detoxifica al peróxido de hidrógeno utilizando el ascorbato como sustrato, y cataliza la reacción en la que se produce dehidroascorbato y agua (**Figura 1.14**).

Ascorbato + Peróxido de Hidrógeno → Dehidroascorbato + Agua

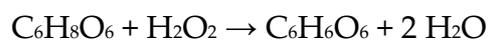


Figura 1.14. *Reacción de la ascorbato peroxidasa.*

1.8.3. Ascorbato

El ácido ascórbico (**Figura 1.15**), juega un papel esencial en la supervivencia de los organismos debido a sus propiedades antioxidantes. El ascorbato participa en la defensa contra el ataque de patógenos, así como en la regulación de la

elongación celular (Córdoba y González-Reyes, 1994) y la proliferación (Arrigoni, 1994; Potters et al., 2002). El ácido ascórbico no ejerce su acción directamente, sino que es utilizado como sustrato por enzimas que regulan esos procesos como la ascorbato peroxidasa, o inhibe otras peroxidadasas de la pared celular (Takahama y Oniki, 1992, 1994).

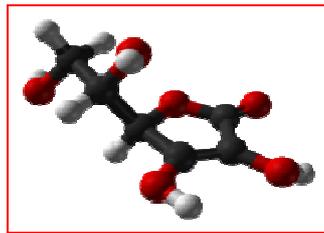


Figura 1.15. Estructura del ácido ascórbico.

1.8.4. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular con un esqueleto común de difenilpiranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (**Figura 1.16**). La actividad de los flavonoides como antioxidantes, depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors et al., 1990).

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.

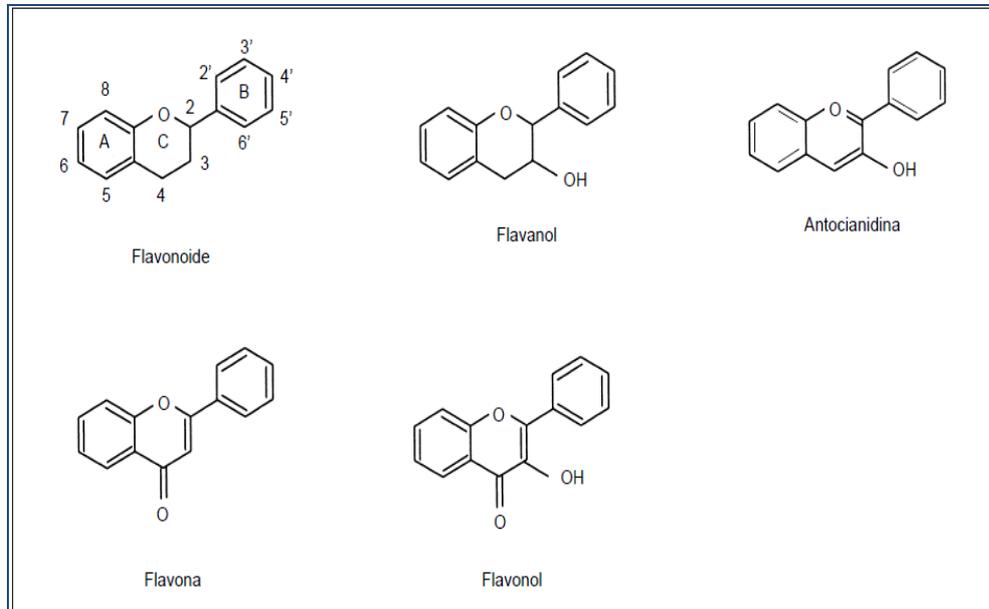


Figura 1.16. Estructura y tipos de flavonoides.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Havsteen, 1983). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Pace-Asciak et al., 1995; Jang et al., 1997). Sus propiedades anti-radicales libres, se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (Jovanovic et al., 1998).

1.8.5. Carotenoides

Los carotenoides pertenecen a la familia de los terpenos, es decir, están formados por unidades de isopreno (ocho unidades, o lo que es lo mismo, cuarenta átomos de carbono), y su biosíntesis se produce a partir de isopentenil pirofosfato (**Figura 1.17**). Son los responsables de la gran mayoría de los colores

amarillos, anaranjados o rojos presentes en los alimentos vegetales, y también de los colores anaranjados de varios alimentos animales. Se conocen alrededor de 600 compuestos de esta familia, que se dividen en dos tipos básicos: los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, sus derivados oxigenados (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996). En general, las xantofilas producen color amarillo, mientras que los carotenoides son anaranjados o rojizos. De los carotenoides conocidos, sólo alrededor del 10% tienen valor como vitamina A.

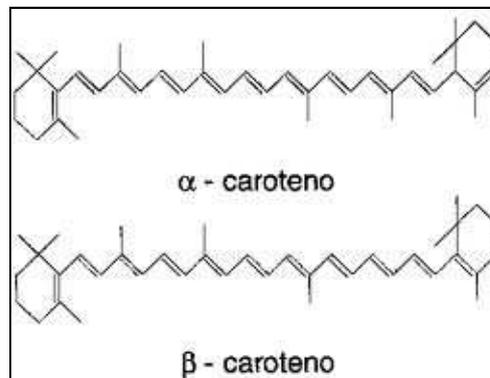


Figura 1.17. Estructura de α -caroteno y β -caroteno.

Los carotenoides pueden desempeñar un papel como antioxidantes en la protección del organismo frente a los radicales libres. La presencia de un gran número de dobles enlaces, hace a los carotenoides muy sensibles a la oxidación, especialmente en reacciones de fotooxidación con el oxígeno singlete. También se oxidan en presencia de lipoxigenasas, pero no de forma directa, sino por reacción con los hidroperóxidos (Omenn et al., 1996). Las reacciones de oxidación, dan lugar en todos los casos a la pérdida de color. Generalmente, existe una gran dependencia entre la velocidad de oxidación y el ambiente en el que se encuentran. Dentro de los alimentos, los carotenoides son mucho más resistentes a la oxidación que en materiales pulverizados y secos, o en extractos.

1.8.6. α -Tocoferol

El α -tocoferol o vitamina E, es una vitamina liposoluble que actúa como antioxidante impidiendo la propagación de las reacciones de radicales libres (Ingold et al., 1987; Packer, 1994; Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996). El grupo de los tocoferoles contiene 4 miembros: α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol (**Figura 1.18**), siendo el primero el más conocido y el que tiene un carácter más activo. El α -tocoferol aparece sólo en la regulación de la fosforilación de las cascadas. Es importante en la enfermedad del corazón donde la adhesión de las células, la proliferación y la producción oxidante deben modificarse a través de la vitamina E. Como todos los compuestos redox activos, se considera que la vitamina E puede ejercer efectos anti y pro oxidantes dependiendo de la reacción. Las funciones prooxidativas del α -tocoferol se han demostrado en LDL aislado (Bowry et al., 1992) y en pacientes con un defecto en el gen α -TTP (Kontush et al., 1996). En presencia de otros antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico, la vitamina E no tiene una función prooxidante (Upston et al., 1999).

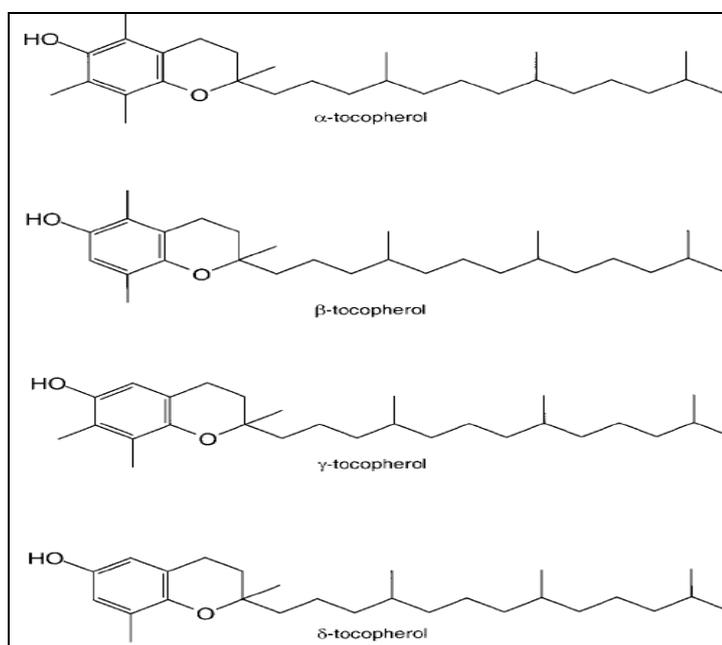


Figura 1.18. Estructura de los diferentes tocoferoles.

1.8.7. Antocianos

Los antocianos son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. Los antocianos, pigmentos flavonólicos, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos (Wang et al., 1997) o electrones a los radicales libres, o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática.

Una actividad antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado (Harborne y Williams, 2000). Los grupos hidroxilos libres en la posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4, son donadores de electrones (Miller y Rice-Evans, 1997). La diversidad estructural contribuye favorablemente a la existencia natural de unos 300 antocianos con diferentes sustituciones glucosídicas, en la estructura básica del ion fenil-2-benzopirilio o flavilio (**Figura 1.19**).

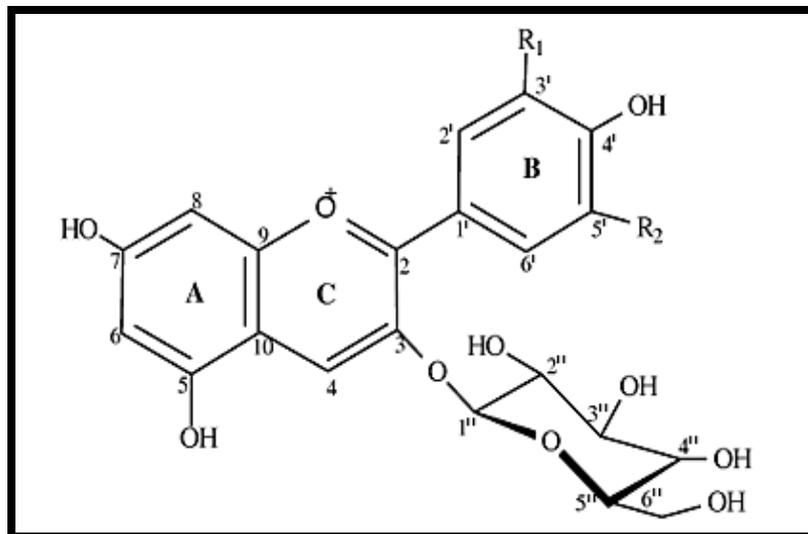


Figura 1.19. Estructura química de los antocianos.

1.9. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La peroxidación lipídica se puede definir como la degradación oxidativa de los lípidos, y es el resultado de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido al estrés oxidativo (**Figura 1.20**). En este proceso los radicales capturan electrones de los lípidos de las membranas celulares. Con la peroxidación lipídica se relacionan daños en la membrana, la degradación de proteínas, la inactivación de enzimas y el trastorno en las hebras de ADN (Allen, 1995), así como el desarrollo de diversas enfermedades (Murcia et al., 2009).

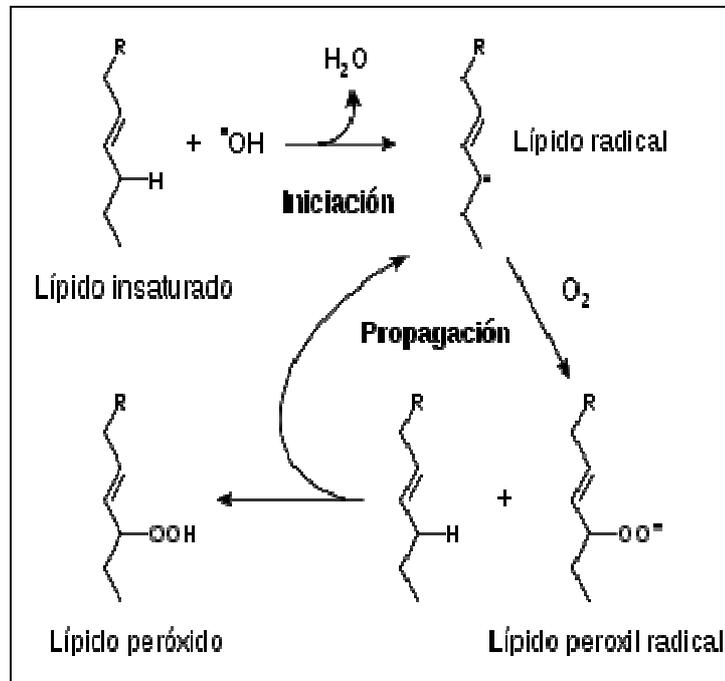


Figura 1.20. Mecanismo de la peroxidación lipídica.

El grado de peroxidación lipídica se estima normalmente midiendo la concentración de productos secundarios derivados de los hidroperóxidos. Los peróxidos de los ácidos grasos poliinsaturados generan malondialdehído en descomposición (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

El test de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) es una manera rápida de evaluar la peroxidación lipídica como los niveles de malondialdehído derivatizado (Kosugi et al., 1987; Esterbauer et al., 1991; Hodges et al., 1999).

1.10. AMINOÁCIDOS

Un aminoácido es una molécula orgánica con un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxílico ($-\text{COOH}$; ácido) (**Figura 1.21**). Los aminoácidos constituyen la base fundamental de cualquier molécula biológica y son compuestos orgánicos.

No puede realizarse ningún proceso biológico sin que en alguna fase del mismo intervengan los aminoácidos. Las proteínas son sustancias orgánicas nitrogenadas de elevado peso molecular, y todas están constituidas por series definidas de aminoácidos. Los aminoácidos son, por tanto, las unidades básicas de las proteínas. Los aminoácidos a pH bajo (ácido), se encuentran mayoritariamente en su forma catiónica (con carga positiva), y a pH alto (básico) se encuentran en su forma aniónica (con carga negativa). Sin embargo, existe un pH específico para cada aminoácido, donde la carga positiva y la carga negativa son de la misma magnitud y el conjunto de la molécula es eléctricamente neutro. En este estado se dice que el aminoácido se encuentra en su forma de ion dipolar o zwitterión.

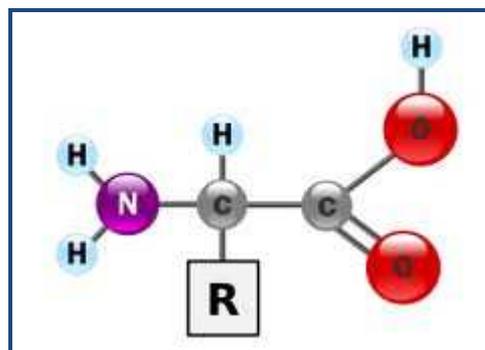


Figura 1. 21. Estructura básica de un aminoácido.

Los mamíferos son incapaces de sintetizar metabólicamente varios aminoácidos necesarios para la síntesis proteica y deben incorporarlos a partir de los alimentos en la dieta. Estos aminoácidos se denominan esenciales y al contrario que los mamíferos, los organismos fotosintéticos sí pueden sintetizarlos. Durante mucho tiempo, se ha aceptado que las rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos en las plantas son idénticas a las existentes en los microorganismos. Sin embargo, resultados recientes indican notables diferencias y un mayor nivel de complejidad debido a la existencia de múltiples enzimas, que se distribuyen en diferentes compartimentos subcelulares (de la Torre et al., 2002).

1.11. ANTITRANSPIRANTES

Los antitranspirantes son compuestos químicos de diferente naturaleza que, aplicados sobre las hojas de las plantas, reducen significativamente la velocidad de transpiración.

La posibilidad de minimizar las cantidades de agua transpirada, es algo muy importante para reducir el daño que sufre la planta debido al déficit de agua (Plaut et al., 2004). La transpiración se puede disminuir de las siguientes maneras: cubriendo la hoja mediante un film, regulando la apertura de los estomas, y utilizando materiales que reduzcan la captación de energía de los cultivos (Gale y Hagan, 1966).

Los antitranspirantes han sido utilizados en agricultura para evitar el estrés hídrico y mejorar la calidad de los frutos (del Amor et al., 2009). También se han aplicado a menudo en un intento de prevenir el estrés hídrico, debido a la formación de una fina película, ya que, pueden reducir el agua transpirada en un 30%, aumentando así la eficiencia en el uso del agua (Englert et al., 1993).

Algunos trabajos indican que, las características de permeabilidad de los polímeros que se forman con el film, inhiben la difusión de CO₂ más que de H₂O (Brown y Rosenberg, 1973). El hecho de que algunos de esos polímeros sean menos permeables al CO₂ que al vapor de agua, se debe al mayor peso molecular del CO₂ y a la naturaleza polar de las dos moléculas (Brandrup y Immergut, 1975).

Por otra parte, si la fotosíntesis se inhibe más que la transpiración, se obtiene un importante descenso en el rendimiento de la planta y por tanto hay que evaluar el efecto de los antitranspirantes para que no reduzcan la fotosíntesis.

1.12. METIL JASMONATO

Los jasmonatos (ácido jasmónico y su metil éster MeJa) (**Figura 1.22 y 1.23 respectivamente**), están presentes de forma generalizada en los compuestos derivados de los lípidos y se acumulan rápidamente cuando la planta está bajo estrés abiótico (Xu et al., 1994; Lehmann, 1995) y biótico (Farmer y Ryan, 1992; McConn et al., 1997).

Aplicados exógenamente, pueden inducir cambios fisiológicos idénticos a las respuestas características al estrés (Tsonev et al., 1998). Cuando se aplican directamente a las plantas, producen efectos como la inducción a la senescencia de las plantas (Weidhase et al., 1987), abscisión, y síntesis de etileno (Czapski y Saniewski, 1985). Por tanto, los jasmonatos se han identificado como moduladores del estrés, suprimiendo las respuestas de las plantas al estrés.

Los jasmonatos promueven diversos procesos de las plantas incluyendo la maduración, la senescencia, la formación del polen y las respuestas de defensa contra infecciones mecánicas o producidas por insectos (Creelman y Mullet, 1997), así como participan en el crecimiento y desarrollo de la planta (Wasternack, 2007). También se ha visto que están implicados en otros procesos como la estimulación de la apertura de los cogollos (Zeng et al., 1999) y la formación de los bulbos (Ravnikar et al., 1992), y el desarrollo de flores y de frutos (Wilén et al., 1991) (**Figura 1.24**). Así, en un estudio anterior, Parra-Lobato et al. (2009) observaron que los metil jasmonatos (MeJa) podrían tener alguna relación en los procesos de estrés oxidativo, al regular las actividades de las enzimas antioxidantes.

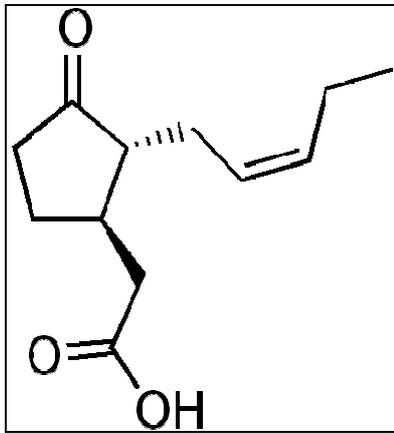


Figura 1.22. Estructura del ácido jasmónico.

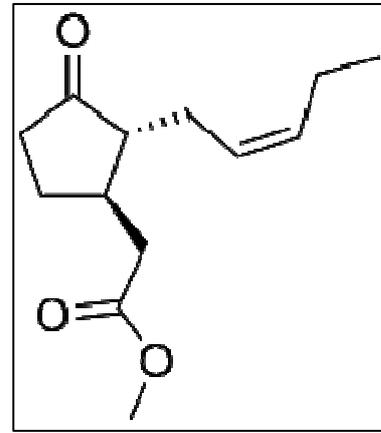


Figura 1.23. Estructura del metil jasmonato.

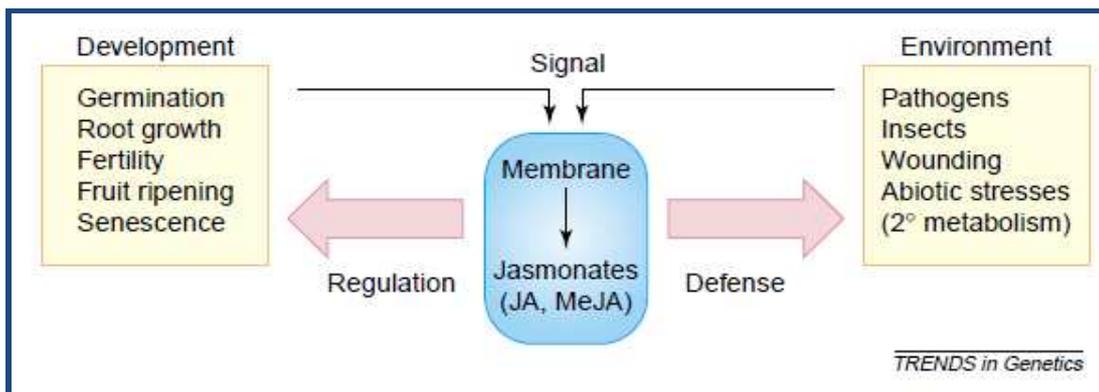


Figura 1.24. Síntesis de los jasmonatos en respuesta a las señales de desarrollo y ambientales.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Ante la necesidad de encontrar una solución eficaz para disminuir la contaminación por nitratos procedentes de la actividad agrícola, este proyecto presenta una alternativa que resultaría en una importante disminución de dichas emisiones contaminantes. Para lograrlo, pretendemos incrementar notablemente la eficiencia en la aplicación, la absorción y la distribución en la planta del abonado nitrogenado aplicado por vía foliar. De esta manera, forzaríamos a la planta a mantener sus tasas de crecimiento, de producción y de calidad comparables a cuando el nitrógeno es aplicado al suelo, pero con la ventaja de limitar la contaminación por nitratos.

Se establecerán las bases fisiológicas y morfológicas que permitirán definir la mejor estrategia de manejo en la fertilización foliar. Además, el realizar este proyecto tanto en invernadero como en cámara climática, brinda la oportunidad de un mayor conocimiento de los distintos parámetros de manejo en las diferentes técnicas de cultivo y su efecto en la calidad del fruto.

Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis es evaluar el efecto de la urea foliar sobre diferentes aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas de pimiento y sobre la calidad de los frutos.

Para ello establecemos los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterizar el efecto de la fertilización foliar sobre la producción y calidad comercial de los frutos, mediante el análisis de aminoácidos, el color de los frutos, aniones, así como su efecto sobre el contenido en clorofilas y carotenoides en hoja, flavonoides y antocianos.

2. Identificar el efecto de la fertilización sobre la peroxidación lipídica, las enzimas y demás compuestos antioxidantes.
3. Identificar el efecto de la fertilización foliar nitrogenada (frecuencia, dosis y temperatura) sobre la distribución de biomasa, la absorción y la distribución del N, así como sobre la fotosíntesis y transpiración, respiración de suelos, fluorescencia de las clorofilas y su efecto en la calidad del pimiento.
4. Estudiar el efecto y la interacción de la urea foliar con la aplicación de otros compuestos como los antitranspirantes y las hormonas (metil jasmonato).

- El objetivo principal se complementa con el siguiente plan de trabajo:

- Experimentos realizados en cámara climática: donde se analizará cómo afecta la urea foliar a las plantas y frutos de pimiento mediante diferentes ensayos como la aplicación de diversos rangos de temperatura, varias concentraciones de N en las soluciones nutritivas aplicadas, diferentes concentraciones de CO₂ y otras aplicaciones foliares.
- Experimentos en invernadero: donde analizaremos los efectos de la urea foliar sobre plantas y frutos de pimiento, cultivados con diferentes concentraciones de N, y en su caso, almacenados a bajas temperaturas durante un cierto tiempo con otras aplicaciones foliares a parte de la urea.

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

3.1.1. Invernadero

El invernadero está localizado en el Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias (CIFEA) de Torre Pacheco, en la provincia de Murcia (**Figura 3.1**). El sustrato empleado en los experimentos fue fibra de coco, marca Pelemix. Los sacos de fibra de coco constaban de ladrillos altamente comprimidos, con unas dimensiones de 10 x 18 x 5 cm, y un peso aproximado de 600 g; una vez rehidratado, cada ladrillo daba un volumen de 8 a 9 L aproximadamente. El control de riego quedará establecido de acuerdo a los módulos comerciales Xilema NX300-hidropónico y Xilema CL-400-controlador clima (Novedades Agrícolas S.A.) (**Figura 3.2**). El invernadero es multitúnel, de 5,5 m de altura, con estructura de acero galvanizado, controlando automáticamente el riego, la fertilización, la climatización y la calefacción con agua caliente mediante ordenador. Más detalladamente, el invernadero donde se desarrollaron los experimentos está compuesto por tres módulos o túneles de 30 x 8 m (720 m²) de 4 m de altura bajo canal.

En el invernadero se realizó una plantación de pimiento *Capsicum annuum* L., tipo Lamuyo, variedad Herminio, tipo *B₁* según la clasificación de Pochard y adaptada por Nuez et al. (1996). Se denomina así a este tipo de pimiento gracias a la variedad obtenida por el INRA francés, con frutos de gran tamaño de forma casi rectangular y alargada de carne gruesa, tanto verdes (inmaduros) como rojos, que es como más se comercializan. Tienen una superficie lisa, con tres o cuatro cascós o lóbulos, un poco asurcada, el rojo llega a adquirir un color casi púrpura en su madurez. Esta variedad es de gran vigor, de entrenudo medio y buen cuaje en frío, dando lugar a frutos que destacan por su pared lisa, buen tamaño y coloración en verde y rojo, con precocidad media-alta, una producción constante y una buena uniformidad del fruto desde el inicio hasta el final. Está especialmente indicada por las plantaciones en invernadero de noviembre y

diciembre, para una recolección a partir de primavera-verano, cuya producción precoz proporciona un alto porcentaje de frutos de categoría extra y primera.

Los componentes fundamentales de los que está compuesto el invernadero son:

❖ **Material de cubierta:** Formada por placas de policarbonato en el techo y los laterales, y de film de plástico las ventanas cenitales y laterales.

❖ **Pantalla térmica y de sombreo:** Hay 12 pantallas térmicas de 8 m de ancho por 5 m de largo (6 pantallas por túnel). Estas pantallas se despliegan automáticamente según los valores de temperatura y radiación del invernadero.

❖ **Sistema de ventilación:** Dispone de ventilación lateral y cenital, con una malla antitrips en ambas. Estas ventanas se abren cuando la humedad supera el 80% de humedad relativa y las temperaturas del invernadero superan los 28°C.

❖ **Calefacción:** La calefacción es por agua caliente mediante una caldera de 195 kW de potencia con quemador a gasóleo, portando una chimenea de acero inoxidable, con tubería de calefacción en acero negro, con un diámetro de 25 cm.

❖ **Suelo:** Éste se encuentra recubierto por una malla de polipropileno para evitar la aparición de malas hierbas dentro del invernadero.



Figura 3.1. *Detalle del interior del invernadero experimental.*

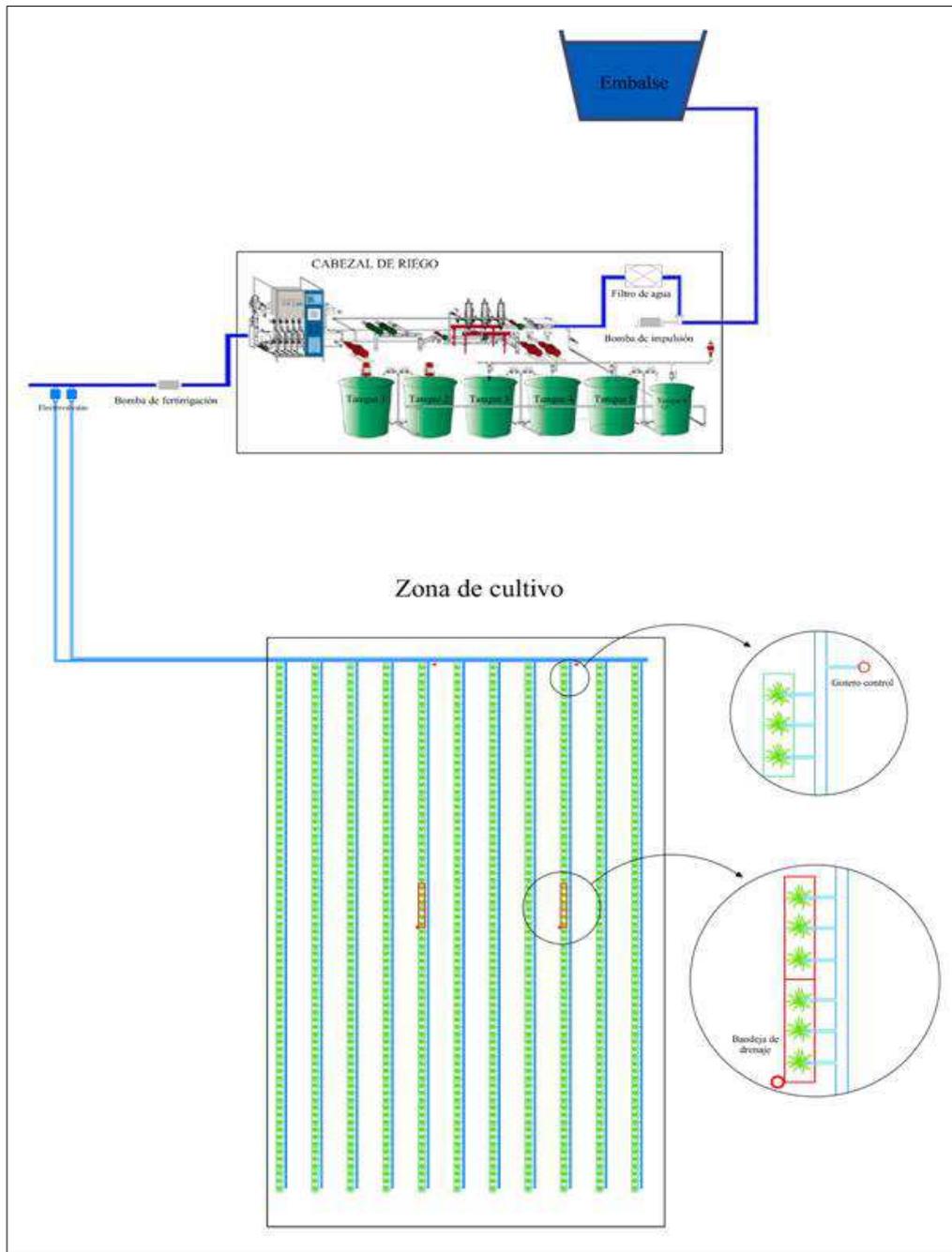


Figura 3.2. Detalle del plano de la instalación de riego en el invernadero experimental.

3.1.2. Cámara climática

La cámara climática fue diseñada por nuestro departamento específicamente para las investigaciones con material vegetal, y está situada en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) (**Figura 3.3**). Tiene 2.90 m de alto, 4 m de ancho, 3.70 m de largo y puede controlar la concentración de CO₂ mediante una inyección de aire comprimido externo o mediante una botella de CO₂ controlado por el sistema Dräger Politron IR CO₂. Así mismo, la cámara también controla la temperatura, la humedad relativa y el tiempo de luz/oscuridad o fotoperiodo que está proporcionado por una combinación de lámparas fluorescentes (Philips TL-D Master reflex 830 y 840) y por otras lámparas de sodio (Philips Son-T Agro). Dispone también de sensores de humedad, temperatura, irradiación, flujo de savia, diámetro del tallo y del fruto (Phytech, LTD, Israel).



Figura 3.3. *Detalle de la cámara climática.*

Las plantas de los diferentes experimentos fueron plantadas en macetas de plástico negro (12-L) con fibra de coco como sustrato, y cada maceta tenía su correspondiente gotero con sistema autocompensante para el riego automático (2

L h⁻¹), el cual estaba compuesto por una solución Hoagland con las siguientes cantidades en meq L⁻¹: (NO₃⁻: 12.5; H₂PO₄⁻: 1.0; SO₄²⁻: 6.5; K⁺: 7.0; Ca²⁺: 9.0; Mg²⁺: 4.0.) con diferentes modificaciones dependiendo del tratamiento al que estaban sometidas las plantas.

3.2. APLICACIÓN FOLIAR DE UREA, ANTITRANSPIRANTE Y METIL JASMONATO

Para los diferentes estudios realizados (tanto en invernadero como en cámara climática) se aplicó por vía foliar:

- Urea (Urée Technique 46, Grande Paroisse S.A. Puteaux, Francia).
- Antitranspirante (Pinolene, Vapor Gard. Miller Chemical & Fertilizer CO, Pennsylvania, EE.UU).
- Metil jasmonato (Methyl jasmonate, 95%, Sigma-Aldrich Chemistry, St. Louis, MO, EE.UU).

Las aplicaciones difieren en la frecuencia y cantidad de aplicación según el experimento, pero todas se realizaron mediante un pulverizador, empapando completamente toda la superficie foliar de las plantas y, en su caso, la totalidad del fruto de pimiento.

3.3. CLOROFILAS

Las clorofilas se determinaron a partir de dos procedimientos diferentes, uno en campo y en cámara climática mediante un medidor portátil (SPAD), y otro en laboratorio a través de la técnica del DMF (N,N-dimetilformamida). Se marcaba una hoja en cada planta para hacer los dos análisis en la misma, primero el SPAD (Konica Minolta, Japón) y luego la técnica del DMF.

3.3.1. En campo y en cámara climática: medidor portátil Minolta SPAD-502

La determinación de clorofilas en campo se realizó mediante un medidor portátil de clorofilas Minolta SPAD-502 (**Figura 3.4**). El medidor portátil de clorofilas mide un índice de verdor en unidades SPAD proporcional a la concentración de clorofila (Finnan et al., 1997), que actúa como un indicador sensible del nivel fisiológico de la planta, relacionado con el contenido de N en hojas. Diversos investigadores han encontrado que la intensidad del color de las hojas está directamente relacionada con el contenido de clorofila y con la cantidad de nitrógeno en la hoja (Reeves et al., 1993; Fox et al., 1994).

Este índice tiene la ventaja, con respecto al contenido de Ntotal en hoja, de que no requiere del envío de muestras al laboratorio porque las lecturas de SPAD pueden realizarse en campo. Este medidor es una herramienta de diagnóstico portátil, que estima en forma instantánea el contenido relativo de este compuesto en las hojas sin destruir el tejido. Este valor se calcula en base a la cantidad de luz transmitida por la hoja en dos longitudes de onda diferentes. La luz emitida por el aparato corresponde a luz roja (650 nm de longitud de onda) y a luz infrarroja (940 nm de longitud de onda). Ésta pasa a través de la hoja y llega a un receptor de SPD (*silicon photodiode*), convirtiendo la luz transmitida en una señal eléctrica. La señal es llevada a un amplificador y de ahí se convierte en una señal digital que es usada por un microprocesador para calcular un valor SPAD determinado que corresponde al contenido relativo de clorofila. En nuestros experimentos la determinación de clorofilas mediante SPAD se realizó tomando cinco mediciones por hoja, evitando siempre el nervio central de la misma.

El medidor de clorofila Minolta-SPAD 502 constituye una alternativa interesante al ser un instrumento de lectura instantánea, de fácil manejo y no destructivo. El medidor de Clorofila SPAD-502 indica al instante el contenido de clorofila en las plantas: simplemente apretando las pinzas del medidor a una hoja se recibe una lectura con el contenido de clorofila en menos de 2 segundos.



Figura 3.4. Detalle de medida de clorofilas en campo con un medidor Minolta SPAD-502.

3.3.2. En laboratorio: Método DMF (N,N-dimetilformamida)

Determinamos el contenido en clorofilas de las hojas de pimiento sometidas a los distintos tratamientos utilizando la dimetilformamida como agente extractante.

Todas las hojas medidas eran transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno con autocierre y sumergidas en hielo para que no perdieran turgencia. Para la realización del análisis, se corta un disco de hoja de área conocida, en nuestro caso, de aproximadamente un diámetro de un vial de centelleo. Este disco obtenido de la hoja se introdujo en 4 mL de DMF (N,N-dimetilformamida) en botes de centelleo de vidrio, y se dejaron durante 72 horas en una cámara frigorífica a unos 4°C en oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia del extracto de DMF en un espectrofotómetro Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800 a 647, 664 y 750 nm. Para el cálculo de las concentraciones de clorofila a y b utilizamos las ecuaciones de Porra et al. (1989). Las unidades de clorofilas se expresaron en mg 100 mL⁻¹.

3.4. FLUORESCENCIA DE LAS CLOROFILAS

Las medidas de fluorescencia se determinaron mediante un fluorímetro OS-30p Chlorophyll Fluorometer, Opti-Sciences (**Figura 3.5**). En este tipo de mediciones, normalmente se parte con material adaptado a la oscuridad para obtener unos parámetros máximos de fluorescencia. De este modo, se obtienen puntos de comparación con la condición iluminada. Posteriormente, se enciende una luz modulada de baja intensidad, que se prende en forma intermitente a una frecuencia, que oscila entre los 1,6 y 100 kHz. Esta luz es capaz de excitar los pigmentos de la antena sin excitar el centro de reacción de PSII, por lo tanto, sin activar la fotoquímica, generando una fluorescencia basal (F_0). Después se aplica un pulso saturante de luz y se obtiene la fluorescencia máxima (F_m). Una vez que la fluorescencia vuelve a su nivel basal, se enciende una luz actínica de intensidad regulable y bajo esta condición lumínica, se vuelve a aplicar pulsos saturantes que nuevamente cierran todos los centros de reacción y se obtiene la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$).

La relación entre la fluorescencia variable y la máxima es un indicador de la funcionalidad de la conversión fotoquímica de energía luminosa en el fotosistema II.

Para su determinación, colocamos 10 pinzas (objetos utilizados para realizar la medición) en hojas maduras, de distintas plantas, elegidas totalmente al azar de cada tratamiento, próximas a la zona apical, de color verde-oscuras, de tamaños uniformes en todas las plantas y en el tallo principal preferentemente y sin tapan el nervio central de la hoja, dejándolas en oscuridad aproximadamente unos 30 minutos (pinza cerrada). Al cabo de ese tiempo, se coloca la pinza en el brazo del fluorímetro, se prosigue con la apertura de la pinza, y se realiza la medida automáticamente, registrándose en el aparato instantáneamente. Los datos eran posteriormente volcados al ordenador para su análisis estadístico.



Figura 3.5. Fluorímetro OS-30p.

3.5. FIRMEZA

La firmeza de los frutos se determinó mediante un penetrómetro Fruit Pressure Tester BERTUZZI mod. FT-327 (3.27 Lbs; 0-13 kg.). Se realizaron 3 medidas en la parte ecuatorial del fruto, para ver la consistencia de dichos frutos, obteniéndose los resultados en kg cm^{-2} (**Figura 3.6**).

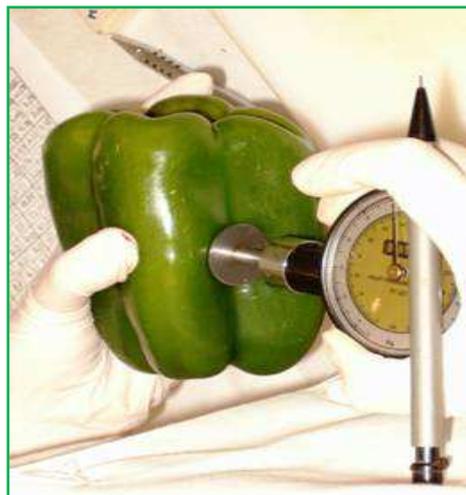


Figura 3.6. Detalle de medición de firmeza en fruto de pimiento tipo Lamuyo.

3.6. ESPESOR DEL PERICARPIO

Para obtener el espesor del pericarpio se realizaron 3 medidas con una mitad del fruto, una basal, otra apical y otra ecuatorial, mediante un calibre Mitutoyo *ABSolute Digimatic Caliper* (**Figura 3.7**). Los resultados se expresaron en mm.



Figura 3.7. Detalle de medición de espesor del pericarpio en fruto de pimiento tipo Lamuyo.

3.7. COLOR

El color de los frutos se determinó midiendo los parámetros del sistema CIELAB, (L^* , a^* y b^*) mediante un espectrofotómetro portátil Konica-Minolta CM-2600d. (**Figura 3.8**). También se determinaron los siguientes parámetros: Croma (C^*), que es la saturación de color, $C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$; Ángulo hue (h°), es una rueda de color con un tono rojo-morado para el ángulo 0° , amarillo a 90° , azulado-verde a 180° y azul a 270° , $h^\circ = \tan^{-1} (b^*/a^*)$ y la diferencia total de color (ΔE^*), $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$. Los datos eran posteriormente exportados al ordenador utilizando el software SpectraMagic NX Versión 1.7, obteniéndose por reflexión su índice de color. El instrumento se estandarizó con una placa de calibración del blanco CM-A145. Se realizaron 3 lecturas por fruto a lo largo de la zona ecuatorial, procurando que fueran representativas del color del fruto.



Figura 3.8. Espectrofotómetro portátil Konica-Minolta CM-2600d.

El parámetro L^* indica la luminosidad, brillo o claridad del fruto. El color negro presenta una luminosidad 0 mientras que el blanco presenta una luminosidad 100. La luminosidad es la cantidad de luz incidente que es reflejada por la superficie del fruto. Los parámetros a^* y b^* se utilizan para evaluar la saturación y el tono. La saturación nos da la pureza de un color y el tono es el color propiamente dicho. El parámetro a^* presenta valores positivos para los colores rojizos, y negativos para los verdes. El parámetro b^* tiene valores positivos para los colores amarillentos y negativos para los azulados (**Figura 3.9**).

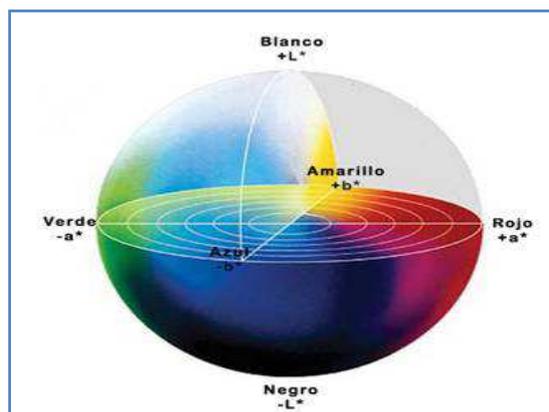


Figura 3.9. Diagrama tridimensional de color L^* , a^* y b^* .

3.8. PH Y CE

Parte de los frutos destinados a la calidad se licuaron con una licuadora Moulinex A753. El pH se midió sobre este jugo con un pH-metro portátil *pH-WTW 340i/SET*. Del mismo modo, la conductividad eléctrica se analizó mediante un conductímetro portátil *cond-WTW 340i/SET* sobre el jugo licuado de los frutos.

3.9. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La peroxidación lipídica se determina como la cantidad de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBA), mediante la reacción de dicho ácido (Heath y Packer, 1968). Las muestras frescas de fruto y hoja de pimiento congeladas a -80°C se homogeneizaron en 9 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, y el homogenizado se centrifugó a 3.500 xg durante 20 minutos. Del sobrenadante, se cogieron 3 mL y se le añadieron otros 3 mL de TCA al 20%, con TBA al 0.5% y 100 μL de BHT al 4%. La mezcla se calentó a 95°C durante 30 minutos e inmediatamente después se introdujo en hielo. Se volvió a centrifugar a 10000 xg durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 532 nm y a 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800. La concentración de TBARS se calculó usando un coeficiente de extinción de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Balestrasse et al., 2006).

3.10. ANIONES

Para la determinación de aniones se secaron las hojas y los frutos de pimiento en una estufa a 65°C durante al menos 72 h. La extracción se realizó mediante 0.4 g de materia seca en 20 mL de agua ultrapura. Los diferentes aniones se analizaron en un cromatógrafo iónico (METROHM 861 Advanced Compact IC; METROHM 838 Advanced Sampler) usando la columna METROHM Metrosep A Supp7 250/4.0mm. Los cromatogramas resultantes se procesaron y analizaron mediante el software IC Net Versión 2.3 Metrodata (Metrohm) (**Figura 3.10**).



Figura 3.10. Cromatógrafo iónico Metrohm.

3.11. AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos se midieron a partir del extracto de hoja y del licuado de fruto de pimiento congelados a -80°C mediante el método AccQ·Tag-ultra ultra-performance liquid chromatography (UPLC) de Waters. Para la derivatización se mezclan $70\ \mu\text{L}$ de tampón borato con $10\ \mu\text{L}$ de muestra o patrón y $20\ \mu\text{L}$ de un reactivo reconstituido, se agita inmediatamente y se calienta a 55°C durante 10 minutos. Después, se usa una alícuota de esa mezcla para la inyección en el UPLC (**Figura 3.11**). El UPLC funciona con el sistema Acquity (Waters, Milford, MA, USA) y está equipado con un detector de fluorescencia (FLR). La columna usada para la detección de aminoácidos fue BEH C18 $100\ \text{mm} \times 2.1\ \text{mm}$, $1.7\ \mu\text{m}$ (Waters) siendo el flujo de $0.7\ \text{mL min}^{-1}$, la temperatura de la columna 55°C y el volumen de inyección $1\ \mu\text{L}$. Las longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) fueron $266\ \text{nm}$ y $473\ \text{nm}$ respectivamente. El solvente del sistema eran dos eluyentes: (A) AccQ·Tag-ultra eluent A concentrado (5%, v/v) y agua (95%, v/v); (B) AccQ·Tag ultra eluent B. Para la detección se utilizó el siguiente gradiente: 0–0.54 min, 99.9%A–0.1%B; 5.74 min, 90.9% A–9.1% B; 7.74 min, 78.8% A–21.2% B; 8.04 min, 40.4% A–59.6% B; 8.05–8.64min. 10% A–90% B; 8.73–10 min, 99.9%A–0.1% B. Una vez obtenidos los cromatogramas, los datos eran procesados mediante el software Empower 2 (Waters). Los patrones utilizados para la cuantificación fueron: (ala) alanina; (arg) arginina; (asp) ácido aspártico; (cys) cisteína; (glu) ácido glutámico; (gly) glicina; (his) histidina; (ile) isoleucina; (leu)

leucina; (lys) lisina; (met) metionina; (phe) fenilalanina; (pro) prolina; (ser) serina; (thr) treonina; (tyr) tirosina; (val) valina.



Figura 3.11. *Acquity UPLC Waters.*

3.12. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos fueron extraídos a partir de 0.4 g de fruto de pimiento congelado a -80°C con 4 mL de metanol y 0.1 mol L^{-1} de HCl, y el homogenizado se centrifugó a 15000 xg durante 20 minutos a 4°C . Para la determinación se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada (1:10). Al sobrenadante se le añadieron 2 mL del reactivo Folin diluido y carbonato sódico al 7.5%, para posteriormente guardar la mezcla en oscuridad durante 30 minutos y centrifugarla a 5000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se utiliza para medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 765 nm siguiendo la metodología de Kähkönen et al. (1999). Los valores de absorbancia se extrapolaron a mg/mL de ácido gálico, haciendo una recta de calibrado con concentraciones crecientes de ácido gálico de 0 a 1 mg/mL (**Figura 3.12**).

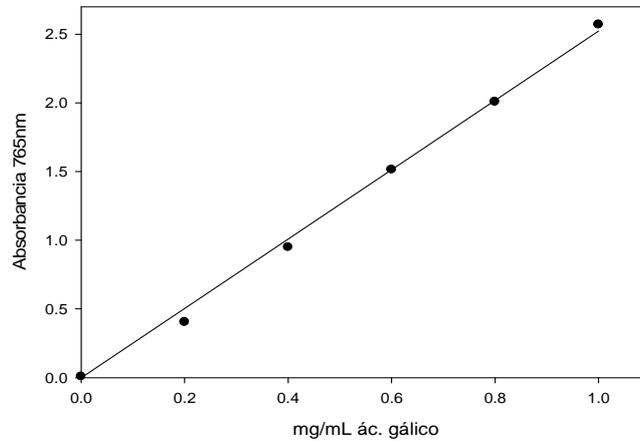


Figura 3.12. Recta patrón de cuantificación de los compuestos fenólicos en muestras de pimiento. Como estándar se utilizó ácido gálico.

3.13. FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACIÓN DE SUELOS

Los parámetros de intercambio gaseoso, tasa de fotosíntesis neta (A), conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) fueron evaluadas a primera hora de la mañana, entre las 8:00 y 10:00 a.m. en campo, mientras que en la cámara climática se realizaban entre las 9:00 y las 11:00 a.m. Los datos se recogían cuando las medidas eran estables, realizándose en todos los tratamientos, en plantas diferentes y totalmente al azar, en hojas sanas, adultas y en el medio de la planta (**Figura 3.13**), al final de cada experimento.



Figura 3.13. Detalle de la medición de intercambio gaseoso mediante un analizador portátil CIRAS-2.



Figura 3.14. *Detalle del Ciras-2.*

Las medidas fueron realizadas mediante un analizador portátil CIRAS-2 (PP System, Amesbury, MA, USA) (**Figura 3.14**) con una cubeta automática universal PLC6 (U) y, posteriormente, transferidas al ordenador para procesar los datos. Durante la realización de las medidas la temperatura de la cámara foliar se mantuvo a 24 °C y la humedad relativa entre el 30-50%. La tasa de flujo molar de aire a través de la cámara fue mantenida a 200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ durante todas las medidas. El CO_2 del aire de referencia fue ajustado y mantenido a 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (CO_2 ambiente). Todas las medidas fueron realizadas con saturación de luz, con una radiación fotosintéticamente activa de 800 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, suministrada por una fuente de luz 6400-02B LED acoplada a la cámara.

La respiración del suelo se midió después de la fotosíntesis con el CIRAS-2 y el SRC-1 Soil Respiration Chamber. Para determinarla, se ponía encima del sustrato después de estabilizar el aparato unos 15 segundos. La calibración se llevó a cabo antes de cada medida, y éstas se recogían después de la estabilización del CO_2 (un máximo de 60 segundos) (**Figura 3.15**).



Figura 3.15. SRC-1 Soil Respiration Chamber para medir la respiración de suelo.

3.14. CLOROFILAS (A, B y A+B), LICOPENOS Y β -CAROTENOS

El método de Nagata y Yamashita (1992) consistió en que a partir de muestras de frutos de los distintos tratamientos previamente congelados a -80°C , se pesaba aproximadamente 1 g de pimiento en una balanza de precisión. Los pigmentos son extraídos en una solución acetona-hexano (2:3), se homogeniza y separa por centrifugación a 3500 rpm durante 6 minutos a 4°C . Después se mide el sobrenadante en el espectrofotómetro a cuatro longitudes de onda al mismo tiempo (663 nm, 645nm, 505 nm y 453 nm). Con esos valores, el contenido de clorofila a, clorofila b, licopeno y β -caroteno puede ser estimado usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a (mg/100ml)} = 0.999A_{663} - 0.0989A_{645}$$

$$\text{Clorofila b (mg/100ml)} = -0.328 A_{663} + 1.77A_{645}$$

$$\text{Licopeno (mg/100ml)} = -0.0458A_{663} + 0.204A_{645} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453}$$

$$\beta\text{-caroteno (mg/100ml)} = 0.216A_{663} - 1.22A_{645} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453}$$

3.15. ANTOCIANOS Y FLAVONOIDES TOTALES

Los antocianos y flavonoides totales se obtuvieron de frutos de pimiento congelados a -80°C . Se pesó 1g de muestra añadiéndole una mezcla de metanol,

agua y HCl, y se homogenizó mediante un polytrón para dejarla en oscuridad durante 72 h a 0°C. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos y el sobrenadante se utilizó para determinar el contenido en antocianos y flavonoides, midiendo en el espectrofotómetro a las siguientes longitudes de onda: 300, 530 y 657 nm. Las concentraciones de flavonoides se expresaron como la absorbancia (A) a 300nm g⁻¹ y los antocianos, fueron calculados mediante la siguiente ecuación: $A = A_{530} - 1/3(A_{657})$.

3.16. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para la determinación de catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APOX), los extractos se prepararon a partir de hoja y fruto de pimiento congelado a -80°C. La muestra se homogenizó con un tampón de extracción que lleva tampón fosfato (pH 7.4) 50 mM, EDTA 1mM, polivinilpirrolidona (PVP) 1 g y Triton X-100 0.5% a 4°C. Se centrifugó a 10000 xg durante 20 minutos a 4°C para usar el sobrenadante en las posteriores mediciones en el espectrofotómetro.

La actividad catalasa se determinó midiendo el descenso a 240 nm ($\epsilon_{240} = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un medio que contenía tampón fosfato potásico (pH 7.2) 50 mM, H₂O₂ 2 mM y sobrenadante en un volumen final de 1 mL.

La ascorbato peroxidada se midió a 290 nm ($\epsilon_{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un medio de tampón fosfato potásico (pH 7.0) 50 mM, H₂O₂ 0.1 mM, ascorbato 0.5 mM, EDTA 0.1 mM y sobrenadante en un volumen final de 1 mL (Nakano y Asada, 1981).

3.17. POTENCIALES HÍDRICO Y OSMÓTICO

El potencial hídrico (Ψ_w) se determinó en las mismas hojas donde se midió la fotosíntesis, extrayendo la savia mediante centrifugación y midiéndolo en una cámara de presión (Scholander et al., 1965) (**Figura 3.16**).



Figura 3.16. Cámara de presión para el potencial hídrico (Ψ_w).

La osmolaridad, expresada en mmol Kg^{-1} , se midió mediante un osmómetro (Wescor 5500) y se convirtió en potencial osmótico (Ψ_π) de acuerdo a la siguiente ecuación: $(\Psi_\pi) = -RTC$, donde R es una constante gaseosa ($0.00832 \text{ L MPa K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura (293 K), y C es el número de moles de soluto en 1Kg de agua (=1 L a 293 K).

3.18. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA

El contenido relativo de agua (RWC), se calculó en hojas de tamaño y edad similares a las usadas para los potenciales hídricos y osmóticos. Se cogía un círculo de cada hoja fresca (FM), teniendo en cuenta que todas las hojas tuvieran el mismo diámetro, y se le añadía agua destilada dejándolas en oscuridad durante 24 horas. Después, se pesaban los círculos, obteniendo así el peso de turgencia (TM) y después de secar las hojas a 80°C durante 48 horas, se pesaban para obtener el peso seco (DM). El porcentaje de contenido relativo de agua se calculó usando la siguiente fórmula: $\text{RWC} = [(FM - DM) / (TM - DM)] \times 100$.

3.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los datos de esta tesis se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y, dependiendo del ensayo, se les aplicó un test multivariante de

Tukey o de Duncan, que tienen como finalidad, determinar las diferencias significativas entre tratamientos en los diferentes experimentos realizados. Los resultados se representaron como $p \leq 0.05$. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS 12.0 y 13.0 (SPSS Science, Chicago, IL, USA) y el programa Statgraphics centurión v.15. Statistical package (stat point TECHNOLOGIES Inc., Warenton, VA, USA). Para mostrar los datos gráficamente se utilizó el programa Sigmaplot 9.0. Systat software Inc (SSI) (San José, California, USA).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. INFLUENCIA DE LA UREA FOLIAR EN LA REPUESTA ANTIOXIDANTE Y EN EL COLOR DE FRUTOS DE PIMIENTO DULCE BAJO DISPONIBILIDAD DE N LIMITANTE

4.1.1. Introducción

En las últimas décadas, la agricultura ha experimentado un avance espectacular con la aplicación de nuevas tecnologías, fertilizantes, productos fitosanitarios, semillas híbridas, nuevas técnicas de cultivo, etc (Bacon, 1995). La combinación de todos estos recursos, entre otros muchos, ha logrado elevar las producciones y el nivel de vida del agricultor aceptablemente. A medida que los años pasan, los efectos de algunas prácticas agrícolas van dejándose sentir en el medio ambiente, sobre todo en las zonas de cultivo (Evans, 1998). De sobra son conocidos los efectos contaminantes del empleo de dosis no apropiadas de abonado químico sobre el medio ambiente (del Amor, 2006 (a)).

Actualmente, hay un tipo de contaminación que ha empezado a cobrar una gran importancia; es el caso de “la contaminación de aguas por nitratos”. Los excesos de abonado, con abonos nitrogenados, y su posterior arrastre por las aguas de lluvia o riego, están provocando concentraciones elevadas de nitratos en aguas superficiales y subterráneas (Kellman y Hillaire-Marcel, 2003). Como consecuencia, el equilibrio de la cantidad de N necesaria para el crecimiento óptimo de las plantas, sigue siendo un reto importante para mejorar la eficiencia del uso de nutrientes agrícolas (Dinnes et al., 2002), mientras que se reduce al mínimo la pérdida de NO_3^- en la superficie y en las aguas subterráneas.

La aplicación foliar de fertilizantes tiene potenciales beneficios, incluyendo la posibilidad de suministrar nutrientes del suelo a la planta, cuando las condiciones restringen la absorción de la raíz (Boynton, 1954; Swietlik y Faust, 1984). Para los cultivos agrícolas, la urea, el NH_4^+ y el NO_3^- se absorben bien cuando se aplican vía foliar, pero se prefiere la urea porque tanto el NH_4^+ como el NO_3^- pueden causar daños (Bowman y Paul, 1992). Se ha sugerido que la urea se absorbe más rápidamente por las hojas que el NO_3^- o el NH_4^+ , presumiblemente

debido a que la urea se difunde con mayor facilidad a través de la cutícula (Wittwer et al., 1963). En algunos casos, se ha observado con frecuencia, un quemado de las hojas después de la fertilización foliar de las plantas con urea, y también se ha observado necrosis en la punta de la hoja después de la fertilización foliar con urea, la cual se atribuye generalmente al amoniaco generado en la hidrólisis de la urea por la ureasa de la planta (Harper, 1984). La urea se caracteriza por sus propiedades físico-químicas únicas, incluyendo la no-polaridad, la rápida absorción, la baja fitotoxicidad, y la alta solubilidad en aceite y agua (Wittwer et al., 1963; Yamada et al., 1965; Knoche et al., 1994). Además, la urea puede absorberse rápida y eficientemente por las hojas de la mayoría de los cultivos (Gooding y Davies, 1992; Reickenberg y Pritts, 1996). Reducir el ritmo de aplicación de N del suelo en combinación con N foliar puede reducir la cantidad de N perdido para el medio ambiente y aumentar el rendimiento (Roberts et al., 2006).

Los efectos del estrés nutricional provocan estrés oxidativo en las plantas, como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cakmak y Marschner, 1988; Blokhina et al., 2003). ROS pueden provocar daños en la membrana celular, peroxidación lipídica y degradación de proteínas entre otras cosas, por lo que las enzimas antioxidantes como la catalasa y la ascorbato peroxidasa, actúan detoxificando esas moléculas (Allen, 1995). Las ROS, que se producen durante los procesos de respiración y fotosíntesis, bajo condiciones fisiológicas normales, son depuradas a través de una serie de complejos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Desde hace algunos años, se ha empezado a reconocer que las ROS tienen un papel importante en los procesos de señalización en plantas, y que controlan procesos fundamentales en las plantas tales como el crecimiento, el desarrollo, la respuesta a estímulos medio-ambientales y la muerte celular programada (Apel y Hirt, 2004; Bailey-Serres y Mittler, 2006).

La fertilización foliar puede minimizar los efectos de una reducción del aporte de N vía radicular, por lo que los objetivos de este estudio fueron: (i) examinar los efectos de la aplicación de la urea foliar en frutos de pimiento dulce, (ii) identificar flavonoides y antocianos, así como evaluar los daños producidos y la respuesta antioxidante y, (iii) optimizar la frecuencia en la aplicación de urea para minimizar el aporte bajo de N por vía radicular.

4.1.2. Material Y Métodos

4.1.2.1. Descripción del ensayo y condiciones de crecimiento

Este experimento tuvo lugar en el invernadero localizado en el Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias (CIFEA) de Torre Pacheco (**Figura 4.1**). Las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tipo Lamuyo, cv. Herminio se plantaron el 15 de Diciembre de 2006 y crecieron en sacos de fibra de coco con tres plantas y tres goteros por saco, con una humedad relativa del 40-80% y un rango de temperatura entre 10 y 30°C. A los 73 días después del transplante (DDT), se empezaron a aplicar los tratamientos, los cuales consistían en dos soluciones nutritivas con diferentes concentraciones de N: estándar (S1)= 12mmol L⁻¹ NO₃⁻ (T1) y deficiente (S2)= 3.5mmol L⁻¹ NO₃⁻. A las plantas regadas con solución deficiente en N (S2) se les aplicó 15 g L⁻¹ de urea foliar a diferentes frecuencias: (T2) cada 15 días, (T3) cada semana, (T4) una vez a la semana hasta los 150 DDT y después, dos veces a la semana, (T5) dos veces a la semana desde que comenzó el tratamiento, y (T6) sin aplicación de urea foliar. La urea se aplicaba por la mañana temprano, empapando bien toda la superficie de las hojas de forma homogénea. El volumen de urea aplicado iba aumentando conforme crecían las plantas, llegando al siguiente consumo total de urea por planta: T2, 8.9 g; T3, 15.1 g; T4, 25.6 g; T5, 29.7g (**Tabla 4.1**). Las plantas fueron regadas con la siguiente composición de solución nutritiva (meq L⁻¹): (S1): NO₃⁻, 12.5; H₂PO₄⁻, 1.5; SO₄²⁻, 7.5; K⁺, 7.5; Ca²⁺, 9.5; Mg²⁺, 4.5; o (S2): NO₃⁻, 3.5; H₂PO₄⁻, 2.5; SO₄²⁻, 17.5; K⁺, 6.5; Ca²⁺, 8.5; Mg²⁺, 8.5 (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.1. Aplicación de urea en las plantas de pimiento según los tratamientos.

Tratamiento	Aplicación Urea	Consumo Total Urea/Planta (g)
T1	Sin Aplicación	0
T2	Cada 15 días	8.9
T3	Cada semana	15.1
T4	Una vez por semana hasta 150 DDT	25.6
T5	Dos veces por semana	29.7
T6	Sin Aplicación	0

Tabla 4.2. Composición de la solución nutritiva aplicada.

Solución Nutritiva (meq L ⁻¹)	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SO ₄ ²⁻
S1	12.5	1.5	7.5	9.5	4.5	7.5
S2	3.5	2.5	6.5	8.5	8.5	17.5

**Figura 4.1.** Detalle de las plantas de pimiento en invernadero.

4.1.2.2. Determinaciones

Se realizaron las siguientes determinaciones en frutos de pimiento detalladas en Materiales y Métodos (Capítulo III):

- N total, determinado sobre materia seca

En materia fresca se analizaron:

- Color, determinando los parámetros L^* , a^* y b^* , así como C^* , h° , ΔE^* .
- Antocianos y Flavonoides
- Peroxidación Lipídica
- Actividades enzimáticas, determinando las enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa

El diseño experimental consistía en cuatro bloques completamente aleatorios. Dentro de cada bloque, cada tratamiento tenía cuatro sacos de sustrato con 12 plantas por bloque, siendo un total de 48 plantas por tratamiento. Los datos son la media de 6 frutos por bloque y cuatro bloques por tratamiento, con un total de 24 frutos por tratamiento. El análisis de varianza, se aplicó a cada uno de los parámetros analizados y las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante un test multivariante Tukey ($P \leq 0.05$). Para las gráficas se utilizó el programa Sigmaplot 9.0.

4.1.3. Resultados Y Discusión

4.1.3.1. Nitrógeno total

Cuando se aplicó urea foliar, las plantas con una solución de nutrientes de $3.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ (S2), mantuvieron la concentración de N total al mismo nivel que los frutos control ($12.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$) (**Figura 4.2**). Sin embargo, cuando no se aplica urea, el bajo suplemento de N por la raíz reduce la concentración de N total en frutos un 38%. La absorción de N, debida a las aplicaciones foliares, es menos dependiente en condiciones húmedas y puede ser efectiva cuando la absorción por la raíz está dañada debido al suelo seco, o a la reducción de la

actividad de la raíz al final del crecimiento. Sin embargo, para pimiento dulce, la oportuna aplicación de urea foliar sí tiene una influencia significativa en el contenido total de N. En manzana, se han obtenido resultados similares ya que la concentración de N en fruto, aumentó notablemente debido a la aplicación de urea (Meheriuk et al., 1996).

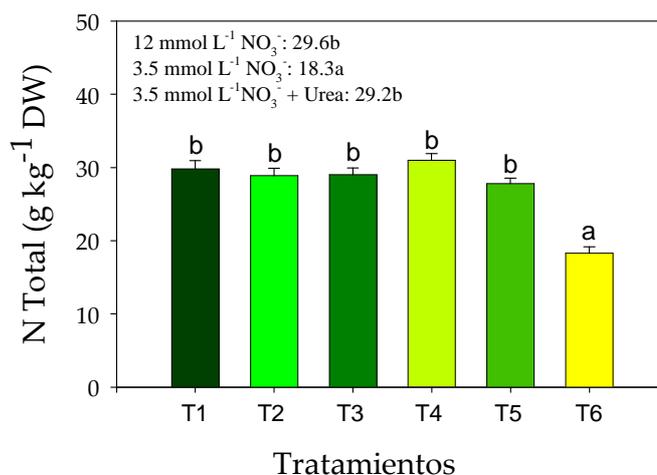


Figura 4.2. Efecto de la urea foliar en la concentración total de N en frutos. Las barras verticales representan la media de los valores \pm SE; los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango de Tukey). T1: riego con $12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ sin aplicación de urea. T2, T3, T4, T5 y T6: riego con $3.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ y urea foliar aplicada cada quince días (T2), cada semana (T3), una vez a la semana hasta los 150 DDT y dos veces a la semana después (T4), dos veces a la semana (T5), y sin tratamiento con urea (T6).

4.1.3.2. Análisis de color

La apariencia externa de los frutos, en concreto el color, es de fundamental importancia cuando consideramos los diferentes atributos para definir la calidad. Así, en el caso de los pimientos dulces, son de especial relevancia los destinados al consumo en fresco.

El cambio de color en la superficie del pimiento, es el resultado de la degradación de las clorofilas y de un aumento considerable en el contenido de carotenoides (Pérez-López et al., 2007). El uso de los atributos cromáticos (L^* , a^* y b^*) hace posible seguir el desarrollo del color que tiene lugar en los frutos durante

su maduración (Madrid et al., 1999). Además, se ha demostrado que la disponibilidad de N también afecta al contenido de clorofilas en este fruto (del Amor, 2006 (a)). En nuestro experimento, cuando los frutos crecen con una solución baja de N, la aplicación de urea foliar afecta significativamente a los parámetros L^* , a^* , b^* y C^* comparados con los tratamientos sin aplicación de urea (**Figura 4.3 (A), (B), (C) y (D), respectivamente**): L^* aumentó sus valores (media de los tratamientos con urea) desde 29.8 a 39.8 (más claro), a^* desde -8.29 a -14.5 (más verde), b^* desde 10.1 a 21.9 (más amarillo), y C^* desde 13 a 26 (saturación de color). Además, cuando se aplicó urea a alta frecuencia (T5), los valores de los parámetros L^* , b^* y h (**Figura 4.3 (E)**) fueron mayores que en los frutos que crecieron con aporte de N control (T1). Los resultados relacionados con la frecuencia de aplicación de urea, pueden ser resumidos por la diferencia de color total (ΔE) (Hallier et al., 2007), donde la mayor diferencia de color está en los valores del tratamiento T5 (alta frecuencia) (**Figura 4.3 (F)**). Sin embargo, en ningún caso, las aplicaciones de urea foliar (independientemente de su frecuencia) tuvieron valores más altos que los observados en el tratamiento control (T1).

Padem y Yildirim (1996) vieron una mejora en la calidad del cultivo de repollo, cebolla, pepino y calabacín con la aplicación de urea. Las diferencias observadas en diversas especies, se pueden atribuir a la concentración de la urea empleada, a las condiciones ambientales y a la tolerancia de la hoja a la posible fototoxicidad de la urea, donde el NH_4^+ es liberado durante la asimilación de urea.

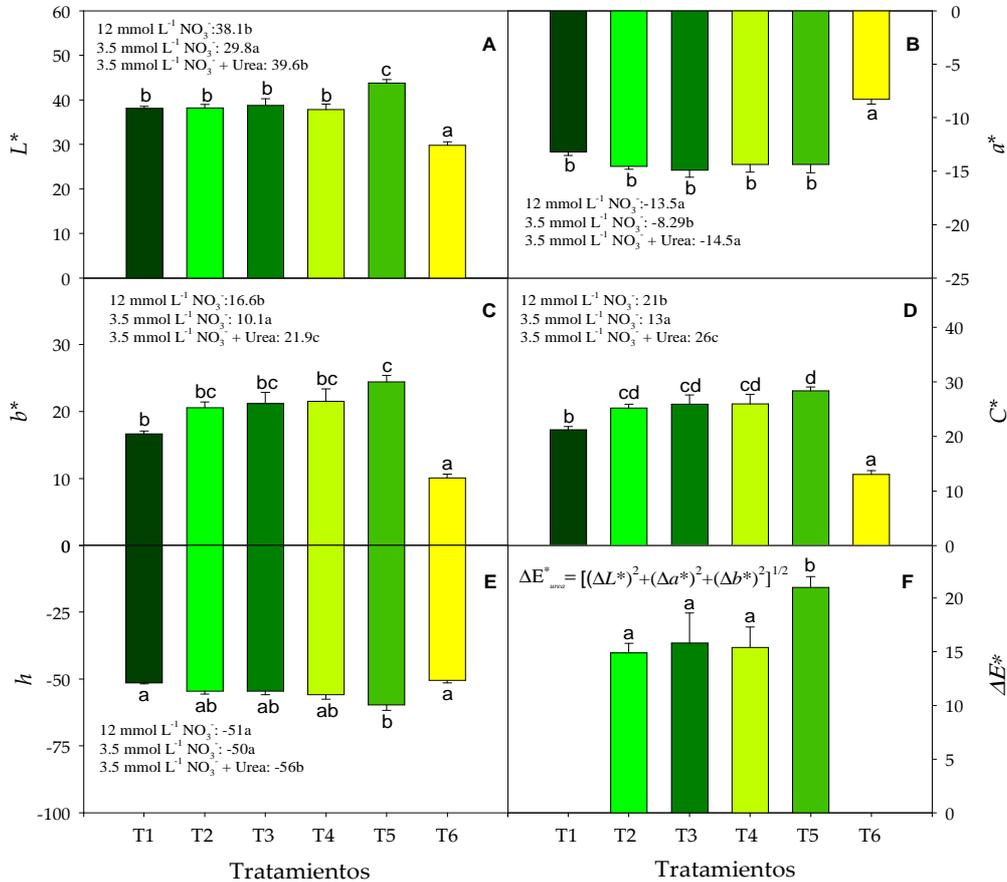


Figura 4.3. Efecto de la urea foliar en los parámetros colorimétricos de los frutos: L^* , a^* , b^* , C^* (croma), h (ángulo hue), y ΔE^* (la diferencia total de color en los tratamientos de urea con respecto a los tratamientos con bajo N y sin urea). Las barras verticales representan la media de los valores \pm SE; los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango de Tukey). T1: riego con 12 mmol L⁻¹ NO₃⁻ sin aplicación de urea. T2, T3, T4, T5 y T6: riego con 3.5 mmol L⁻¹ NO₃⁻ y urea foliar aplicada cada quince días (T2), cada semana (T3), una vez a la semana hasta los 150 DDT y dos veces a la semana después (T4), dos veces a la semana (T5), y sin tratamiento con urea (T6).

Los altos niveles de NH₄⁺ esparcen los gradientes de pH a través de las membranas biológicas necesarias para muchos procesos metabólicos, en los que se incluye la fotosíntesis y respiración (Bloom, 1997). Además, el efecto fisiológico de la urea foliar puede variar con los cultivos (Peltonen, 1993) y las estaciones

(Han et al., 1989), y también se ha visto que los experimentos en campo tienden a ser menos consistentes que los experimentos en invernadero, al mostrar un efecto beneficioso en la aplicación de urea foliar (Peltonen, 1993). Nuestros datos, bajo condiciones climáticas controladas en invernadero, muestran una mejora general en las propiedades del color de frutos de pimiento, cuando se aplicó urea bajo una limitada disponibilidad de N.

4.1.3.3. *Antocianos y flavonoides totales*

Los antocianos son el producto final de la ruta de biosíntesis de flavonoides (Lightbourn et al., 2007), y junto con otros flavonoides, son conocidos por sus potenciales beneficios para la salud (Nijveldt et al., 2001). Numerosos estudios han demostrado que la acumulación de flavonoides y antocianos en las plantas, proporciona un mecanismo de defensa, y la concentración de flavonoides en las plantas podría verse afectada por el suministro de NO_3^- (Chimphango et al., 2003).

En estudios recientes, Strissel et al. (2005) observaron una disminución en la concentración de flavonoides en manzanos cultivados con una nutrición elevada en nitrógeno (N), y destacaron la influencia de la susceptibilidad del cultivo. Además, Stewart et al. (2001) vieron que la disponibilidad reducida de nitrógeno no tuvo ningún efecto notable sobre el contenido de flavonoides de frutos de tomate, mientras que Yang et al. (2006) observaron que la aplicación de NO_3^- era favorable para la acumulación de flavonoides.

Las diferentes respuestas podrían atribuirse a las diferentes especies, cultivo y órgano considerado, y especialmente a la medida en que el agotamiento del N se aplica bajo condiciones atmosféricas particulares.

Nuestro experimento, bajo limitados pero no agotados suministros de N y bajo condiciones sin suelo, mostró un aumento en antocianos (**Figura 4.4 (A)**) y flavonoides totales (**Figura 4.4 (B)**) cuando se aplicó la urea, en comparación con los frutos sin aplicación de urea, especialmente en la frecuencia más alta. Nuestros datos muestran que los antocianos fueron significativamente reducidos ($P \leq 0,05$), cuando las plantas se regaron con bajo nivel de N, sin aplicación de urea. Por lo tanto, la concentración de flavonoides, se redujo en un 36% en las plantas regadas con bajos niveles de N, en comparación con las plantas que recibieron urea foliar. Además, cuando se aplicó la urea, no se encontraron

diferencias con respecto a las plantas control y las diferencias que se observaron en la concentración de antocianos en las diferentes frecuencias de aplicación, no fueron significativas. Nuestros datos evidencian que los antocianos y flavonoides muestran un patrón similar, pero en los flavonoides sólo la frecuencia más elevada de aplicación (T4 y T5), dio lugar a diferencias significativas con respecto al tratamiento sin aplicación (T6). Nuestro estudio muestra claramente que, el efecto de la fertilización foliar con N en los antocianos, se aprecia en una respuesta general, basada en la frecuencia de aplicación en el caso de los flavonoides totales.

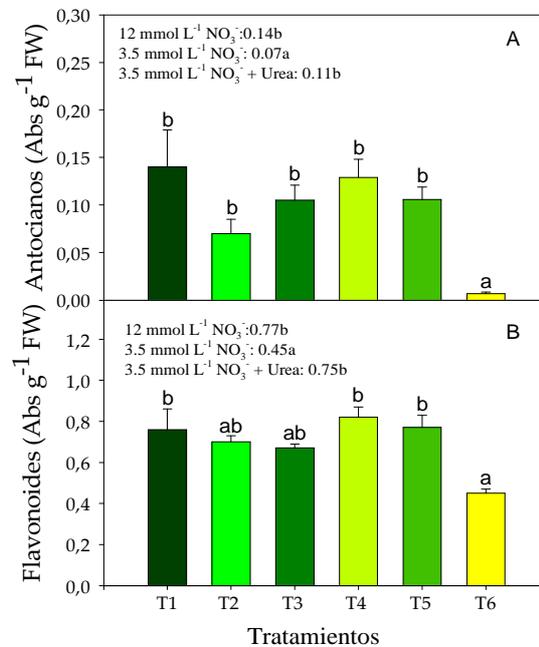


Figura 4.4. Efecto de la urea foliar en la concentración de antocianos y flavonoides en los frutos. Las barras verticales representan la media de los valores \pm SE; los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango de Tukey). T1: riego con $12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ sin aplicación de urea. T2, T3, T4, T5 y T6: riego con $3.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ y urea foliar aplicada cada quince días (T2), cada semana (T3), una vez a la semana hasta los 150 DDT y dos veces a la semana después (T4), dos veces a la semana (T5), y sin tratamiento con urea (T6).

4.1.3.4. Peroxidación lipídica y enzimas antioxidantes

La peroxidación lipídica (medida como la cantidad de TBARS), aumentó significativamente de 6.8 a 14.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW, cuando se redujo el N en la solución nutritiva (**Figura 4.5 (A)**). Cuando se aplicó urea, no se observaron diferencias significativas respecto a los frutos control, con un efecto no significativo en la frecuencia de aplicación. Balestrasse et al. 2006, publicaron que la formación de TBARS en plantas expuestas a condiciones ambientales adversas, es un indicador fiable de la generación de radicales libres en los tejidos. Este hecho podría confirmar la menor condición de estrés en plantas con urea foliar aplicada, a pesar del bajo aporte de N por las raíces. Las actividades CAT y APOX se vieron significativamente afectadas cuando el N estaba reducido, en comparación con las plantas control: la actividad catalasa aumentó de 1.81 a 30.29 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW (**Figura 4.5 (B)**), mientras que APOX aumentó de 49 a 376 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW (**Figura 4.5 (C)**). La actividad catalasa se vio afectada por la frecuencia de aplicación de urea (**Figura 4.5 (C)**). Las aplicaciones de urea dos veces por semana (T5), aumentaron la actividad catalasa de 11.9 a 24.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW comparadas con una aplicación cada dos semanas (T2), pero no se obtuvo una respuesta notable en los tratamientos de baja frecuencia (T2 y T3) respecto del control. Además, las diferentes frecuencias, no afectaron la actividad ascorbato peroxidasa comparada con los valores control, pero la aplicación de urea la redujo significativamente en comparación con las plantas sin aplicación de urea.

Intracelularmente, la ascorbato peroxidasa ayuda al ácido ascórbico (ASC) a regular la división celular y las actividades relacionadas con el metabolismo del ácido ascórbico y la respuesta antioxidante. Los resultados citados en la literatura coinciden con los nuestros. Así, en el estudio de Tewari et al. (2006), la peroxidación lipídica y las actividades de la ascorbato peroxidasa aumentaron en plantas carentes de N, observando un aumento en la peroxidación lipídica y en las actividades antioxidantes cuando el N de los tejidos de la hoja se redujo de 53 a 12 mg g^{-1} . Además, en los trabajos publicados por Logan et al. (1999) y Poleskaya et al. (2004), las actividades de las enzimas antioxidantes eran mayores en plantas con N limitado. Sin embargo, en el trabajo de Huang et al. (2004) los efectos de la deficiencia de N en la catalasa y en la peroxidación lipídica en hojas aumenta inicialmente, pero con una deficiencia progresiva de N, las actividades de las enzimas antioxidantes disminuyen. Estos aumentos en la capacidad de la

defensa antioxidante en frutos con deficiencia de nutrientes, podrían indicar un aumento, cuando hay deficiencia de N inducida por la producción de especies tóxicas de O_2 , particularmente O_2 y H_2O_2 , y está bien documentado que tales mecanismos de protección, son inducidos bajo condiciones de estrés que estimulan la producción de especies tóxicas de O_2 (Elstner et al., 1988; Rabinowitch y Fridovich, 1983). Así, la acumulación de ROS, da lugar a un aumento en las actividades de las enzimas antioxidantes, proporcionando evidencias indirectas de la extensión de la generación de ROS y la importancia de esas enzimas en busca de radicales libres (Smirnoff, 1993). Cadenas y Davies (2000), estudiaron que la actividad catalasa no se satura a ninguna concentración de H_2O_2 , catalizando su conversión en H_2O y O_2 molecular. Así, la catalasa protege a las células contra el H_2O_2 que se genera en las células. Kandlbinder et al. (2004) demostraron la pérdida de N provocada por los cambios redox y la inducción del estrés oxidativo, con un patrón definido en las alteraciones específicas de nutrientes en el metabolismo. Recientemente, Kovacik y Backor (2007), publicaron que la actividad catalasa aumentó en las raíces de plantas deficientes en N y la peroxidación lipídica aumentó en las raíces deficientes en N, indicando que la protección antioxidante era insuficiente para contrarrestar las especies reactivas de oxígeno ya generadas. Muy poco se sabe acerca de la aplicación foliar de urea en las actividades antioxidantes. En el estudio realizado por Marezcek y Leja (2005), indicaron que la aplicación de urea foliar causó un aumento significativo en la actividad radical en lechuga y brócoli, los cuales concuerdan con nuestros resultados, para los frutos de pimiento. La degradación de los pigmentos cloroplásticos y proteínas, y un aumento en la peroxidación lipídica, son también indicadores de senescencia, que se forman debido al aumento de la generación de ROS (Buchanan-Wollaston et al., 2003).

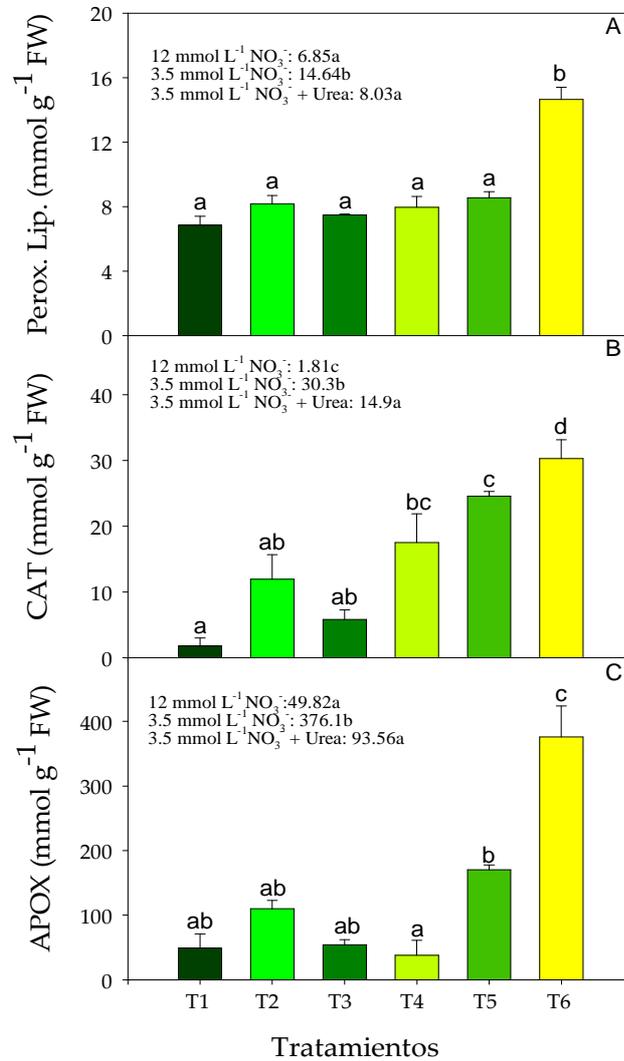


Figura 4.5. Efecto de la urea foliar en la peroxidación lipídica (A) y en la actividad de CAT (B) y APOX (C) en los frutos. Las barras verticales representan la media de los valores \pm SE; los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango de Tukey). T1: riego con $12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ sin aplicación de urea. T2, T3, T4, T5 y T6: riego con $3.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ y urea foliar aplicada cada quince días (T2), cada semana (T3), una vez a la semana hasta los 150 DDT y dos veces a la semana después (T4), dos veces a la semana (T5), y sin tratamiento con urea (T6).

Como conclusión de este trabajo, se podría decir que la urea foliar puede separar la demanda de N de la demanda de agua, optimizando el suplemento de agua y nutrientes en cualquier momento del ciclo del cultivo. El aumento en las actividades de las enzimas antioxidantes y las concentraciones de TBARS (peroxidación lipídica) en plantas deficientes en N, implica que el estrés oxidativo se redujo por la aplicación foliar de urea. Además, los aumentos en las concentraciones de antocianos y flavonoides, al aplicar urea foliar en frutos de plantas cultivadas con una solución nutritiva deficiente en N y en frutos de plantas cultivadas con una solución nutritiva control, correlacionados con un aumento en la concentración total de N, junto con la mejora significativa del color, con respecto al bajo aporte de N y a los frutos no aplicados, podría recomendar esta estrategia de fertilización en el cultivo de pimiento dulce.

4.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS POSTCOSECHA EN LA CALIDAD DE FRUTOS DE PIMIENTO DULCE A BAJA TEMPERATURA

4.2.1. Introducción

La tecnología postcosecha ha ganado una gran importancia en los últimos años, debido al aumento de la demanda de frutas y hortalizas frescas (Banaras et al., 2005). La piel de estos alimentos juega un papel importante en el intercambio gaseoso que se produce entre el producto y el ambiente que lo rodea (Díaz-Pérez et al., 2007), por este motivo, es muy importante la protección del pericarpio, frente a la deshidratación después de la cosecha, ya que los frutos no reciben ni agua ni nutrientes de la planta.

La temperatura de almacenamiento tiene una gran influencia en la respuesta fisiológica, de manera que la temperatura y la humedad son los factores ambientales que más influyen sobre la calidad del fruto (Díaz-Pérez et al., 2007). Así, la regulación de la temperatura, es la herramienta más efectiva para prolongar la vida de los productos frescos, incluyendo el pimiento (Paull, 1990). Sin embargo, el almacenamiento a bajas temperaturas puede ocasionar una maduración inusual, una pérdida de agua, un aumento de CO₂, y una alta permeabilidad en las membranas celulares, induciendo la pérdida de iones; el daño es progresivamente más severo cuanto más dura el tiempo de exposición a bajas temperaturas (Kehr, 2002).

Si los radicales libres no son neutralizados por los animales o las plantas, éstos pueden dañar las células y los órganos, causando muchas enfermedades neurodegenerativas y susceptibilidad al estrés biótico y abiótico (Singh et al., 2009). Las bajas temperaturas pueden inducir la producción de radicales libres y las ROS, pueden contribuir a la pérdida de funciones celulares a través de la peroxidación lipídica (Boonsiri et al., 2007). Por lo tanto, las enzimas antioxidantes son los componentes más importantes en el sistema para destruir las ROS (Núñez et al., 2003) y los pimientos contienen sustancias activas que son importantes en la protección contra el daño oxidativo producido por los radicales libres (Ogiso et al., 2008).

Se considera la urea como la forma más apropiada de aplicar N foliar debido a su rápida absorción, baja toxicidad y alta solubilidad en agua y aceite

(Knoche et al., 1994). El nutriente con el mejor efecto en la calidad del fruto es el N (Crisosto y Mitchell, 2002). Sin embargo, la calidad y el rendimiento en frutos de pimiento se ven afectadas por diferentes prácticas agrícolas y por la disponibilidad de N por la planta (del Amor, 2006 (b); Pérez-López et al., 2007). La aplicación de urea foliar aumenta la pigmentación verde en manzana, después del periodo de almacenamiento (Meheriuk et al., 1996), y aumenta el contenido de clorofilas en brócoli (Yildirim et al., 2007). Además, tiene un efecto beneficioso en las hojas de pimiento, manteniendo la permeabilidad de la membrana (Kaya y Higgs, 2003).

Los antitranspirantes, son compuestos aplicados a las hojas de las plantas para reducir la transpiración, ya que reducen la apertura estomática y aumentan la resistencia de la hoja a la difusión de vapor de agua; a menudo, se aplican en un intento de prevenir el estrés hídrico (Harris y Bassuk, 1995). Los antitranspirantes se han usado en la agricultura satisfactoriamente para controlar la transpiración de la hoja y mejorar la calidad del pimiento dulce (del Amor y Rubio, 2009), de los tomates (Phelps y Morelock, 1987), de las cebollas (Lipe et al., 1982) y de las patatas (Byari y Okeefe, 1982).

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que se combinan para formar proteínas. Existen dos tipos principales de aminoácidos que están agrupados según su procedencia y características. Estos grupos son aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales. Los aminoácidos que se obtienen de los alimentos, se llaman aminoácidos esenciales, mientras que los aminoácidos que puede fabricar nuestro organismo a partir de otras fuentes, se llaman aminoácidos no esenciales. Las plantas sintetizan aminoácidos a partir de compuestos inorgánicos y los usan para generar una amplia variedad de productos, entre los que se incluyen proteínas, pigmentos, nucleótidos, hormonas, componentes estructurales y agentes de defensa. En la mayoría de las plantas no leguminosas, el órgano dominante en la síntesis y distribución de los aminoácidos es la hoja, la cual usa la energía y los esqueletos carbonados producidos por la fotosíntesis, para asimilar el nitrógeno en los productos primarios de aminoácidos (Noctor et al., 2002).

Los objetivos de este trabajo fueron: (i) determinar el efecto de las aplicaciones foliares de urea y de antitranspirante en frutos de pimiento, respecto a las características físicas y químicas en postcosecha (metabolismo oxidativo y aminoácidos). (ii) Estudiar diversos parámetros de calidad como la firmeza de los

frutos, el color, la peroxidación lipídica, las enzimas antioxidantes, los compuestos fenólicos y los aminoácidos, con el fin de ayudar a definir una estrategia eficiente en el tratamiento postcosecha, para mantener la calidad de los frutos de pimiento a baja temperatura.

4.2.2. Material Y Métodos

4.2.2.1. Descripción del ensayo y condiciones de almacenamiento

Las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cv. Herminio se cultivaron en el invernadero localizado en el Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias (CIFEA) de Torre Pacheco. Las plantas crecieron en sacos de fibra de coco bajo condiciones ambientales controladas y riego automático controlado. Cada saco tenía tres plantas con tres goteros autocompensantes y antidrenantes 2 L h⁻¹. Las plantas fueron regadas mediante una solución nutritiva con un pH entre 5.6 y 6.0 y con la siguiente composición de nutrientes (meq L⁻¹): NO₃⁻, 12.5; H₂PO₄⁻, 1.5; SO₄²⁻, 7.5; K⁺, 7.5; Ca²⁺, 9.5; Mg²⁺, 4.5. A los 150 DDT, los frutos se recolectaron de manera aleatoria dentro de cada tratamiento y se almacenaron a 5°C y 90-95% de humedad relativa en una cámara fría durante 21 días. Los frutos se cogieron en estado inmaduro (verde). Los tratamientos consistieron en la aplicación de antitranspirante (AT, pinolene 5% comercializado como "Vapor Gard" = 96% pinolene en 4% de ingredientes inertes), urea foliar (UR, 15g L⁻¹) y frutos no tratados (control (CN)). Se procesaron 15 frutos por tratamiento y por día a 0 (antes del almacenamiento), 7, 14 y 21 días de almacenamiento.

4.2.2.2. Determinaciones

A los frutos almacenados se les realizaron las siguientes determinaciones detalladas en Materiales y Métodos (Capítulo III). Los análisis siempre se realizaron sobre materia fresca. Cada fruto fue considerado como una muestra.

- Color, determinando los parámetros L*, a* y b*.
- Firmeza

- Compuestos Fenólicos
- Peroxidación Lipídica
- Actividades enzimáticas: (enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa)
- Aminoácidos

Los datos se representan como la media de cinco repeticiones por tratamiento. El diseño experimental consistía en cuatro bloques completamente aleatorios. Dentro de cada bloque cada tratamiento tenía cuatro sacos de sustrato con 12 plantas por bloque, siendo un total de 48 plantas por tratamiento. El análisis de varianza se aplicó a cada uno de los parámetros analizados y las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante un test de múltiple rango Duncan de ($P \leq 0.05$). El análisis estadístico se hizo usando el programa SPSS 12.0 (SPSS Science, Chicago, IL, USA). Para las gráficas se utilizó el programa Sigmaplot 9.0.

4.2.3. Resultados Y Discusión

4.2.3.1. Firmeza y color

La firmeza es una de las técnicas más utilizadas en el control de la maduración de la fruta, y su medida, es una buena forma de controlar el reblandecimiento de los frutos y predecir el daño durante la recolección y durante el tratamiento postcosecha, ya que mide la resistencia de penetración de los tejidos del fruto (Valero et al., 2007). Una mayor firmeza de los frutos proporciona una mejor resistencia a los daños físicos y una mejor aptitud para la conservación y transporte. Por lo tanto, la pérdida acelerada de la textura, se considera uno de los principales factores que limitan la vida útil de los tejidos frescos (King y Bolin, 1989).

En nuestro estudio, el almacenamiento a 5°C fue efectivo para el mantenimiento de la firmeza del fruto en el tratamiento control (sin aplicación) durante 21 días. Después de 7 días, se observó un aumento significativo en la firmeza (expresada en Newtons (N)), para aquellos frutos con urea o AT comparados con los frutos control. Después de 14 días, la firmeza se fue

reduciendo en aquellos frutos a los que se le había aplicado urea hasta valores cercanos a los frutos control, pero el AT aumentó la firmeza en un 29.1% comparado con frutos a los que no se les había aplicado nada después de 14 días de almacenamiento, y un 29.5% después de 21 días (**Figura 4.6**).

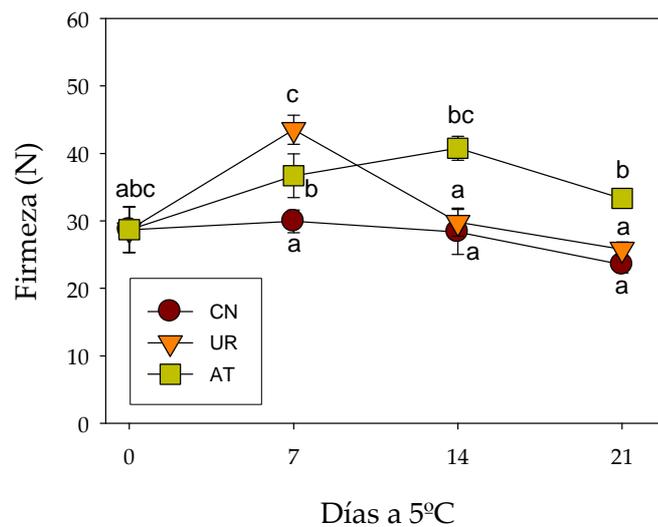


Figura 4.6. Efecto de la aplicación de antitranspirante (AT) o urea foliar (UR) en la firmeza de los frutos. CN indica frutos no tratados (control). Las barras verticales indican los errors estándar de las medias, solo se muestran cuando son más grandes que el símbolo. Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango Duncan).

Reduciendo la temperatura de los frutos no climatéricos como el pimiento, se reduce su índice de maduración y deterioro (Kays, 1991). Sin embargo, los pimientos frescos son más sensibles al daño por frío, y los síntomas característicos del daño en pimiento dulce son el ablandamiento y la predisposición a pudrirse (Encyclopedia of Fruits and Nuts, 2008).

Nuestro estudio con cv. Herminio no mostró variaciones en la firmeza a 5°C en frutos control, mientras que sí hubo un aumento en la firmeza de frutos con urea. Sin embargo, se mantuvo una diferencia más estable y duradera comparada con frutos control cuando se aplicó AT. El ablandamiento de los frutos durante la maduración, se caracteriza por la solubilización de las pectinas (Von Mollendorff et al., 1993). Así, el efecto observado podría deberse a un aumento en la

viscosidad de las pectinas de las paredes celulares, implicando un efecto rápido y duradero de la urea debido a una rápida absorción, y a un efecto duradero del AT, por una efectiva cobertura de la piel del fruto hasta 21 días sin absorción ni alteración del AT (**Figura 4.7**).

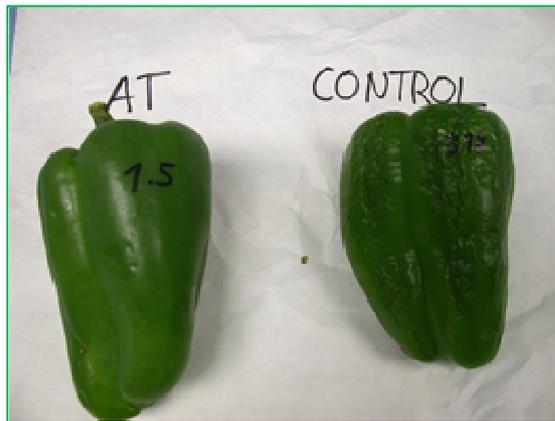


Figura 4.7. Diferencia en la firmeza de los frutos al aplicar o no AT.

El cambio de color en la superficie del pimiento tiene como resultado la degradación de las clorofilas y un aumento considerable en el contenido de carotenoides (Pérez-López et al., 2007). Meir et al. (1995) estudiaron que la recolección de frutos de pimiento en el estado verde inmaduro es sensible a temperaturas inferiores a 6°C y desarrolla el daño. El parámetro de color L^* representa la luminosidad, con un rango entre 0 (negro) y 100 (blanco) y el cambio de color se observa en el descenso de L^* (Cox et al., 2004). Así, después de 7 días de almacenamiento a 5°C, tanto los frutos con aplicación como sin ella, tuvieron una tendencia a oscurecerse, pero después de 21 días no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 4.8 (A)**). El parámetro a^* muestra un patrón inverso comparado con L^* , pero después de 21 días los valores de los frutos tratados con urea disminuyeron significativamente comparados con los frutos control (**Figura 4.8 (B)**). Este aumento en a^* en los tratamientos control y antitranspirante, daría lugar a frutos rojizos y por tanto, a un aumento en la maduración (estos frutos de pimiento pasaron de verde a rojo). De esta manera, la urea podría retrasar la senescencia, así como fue capaz de mantener bajos los

valores de a^* después de 21 días. Además, los altos valores de a^* para los frutos control y con antitranspirante respecto a los de urea, podrían indicar una degradación significativa de los pigmentos de las clorofilas en estos tratamientos.

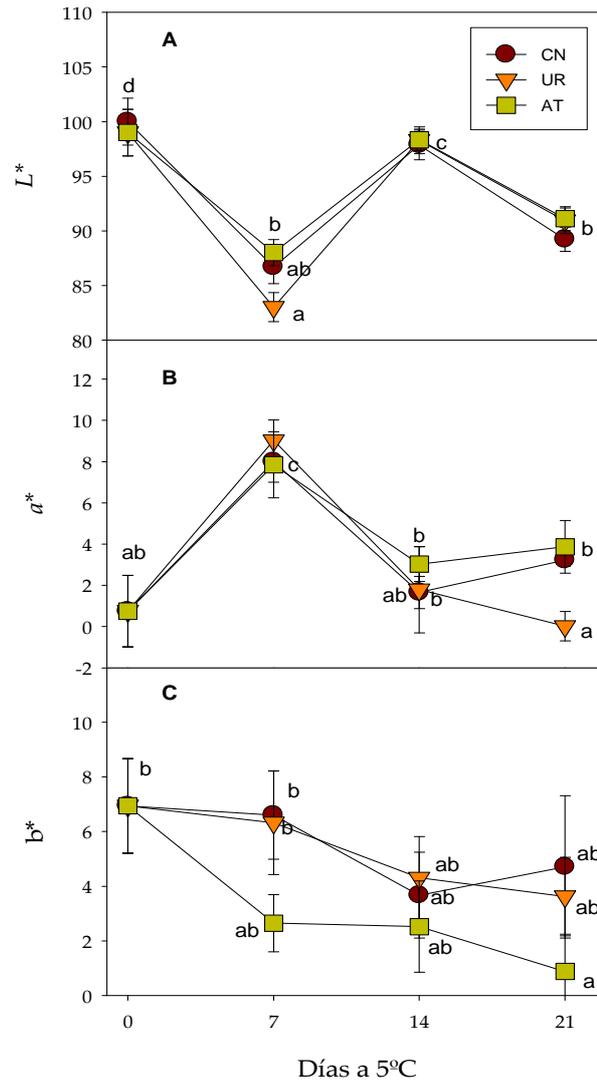


Figura 4.8. Efecto de la aplicación de antitranspirante (AT) o urea foliar (UR) en el color de los frutos. CN indica frutos no tratados (control). Las barras verticales indican los errores estándar de las medias, solo se muestran cuando son más grandes que el símbolo. Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango Duncan).

En un estudio anterior de del Amor (2006 (a)), se demostró que la concentración de los pigmentos de clorofilas estaban relacionados con el aporte de N a las raíces y, por tanto, la urea podría proporcionar una fuente de N para mantener esos pigmentos. Resultados similares se estudiaron por parte de del Amor et al. (2009): las aplicaciones de la urea durante el cultivo de pimiento aumentaron L^* y a^* y redujeron b^* , comparados con los tratamientos con un aporte limitado de N. Algunas diferencias en las respuestas de la urea entre ese estudio, bajo condiciones en invernadero, y este otro (postcosecha) podrían deberse también a las diferencias en la intensidad del estrés de N. Así, nuestros frutos fueron cosechados de plantas con un adecuado suministro nutricional y no bajo deficiencia de N.

4.2.3.2. Contenido en fenoles totales

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de plantas. Algunos son polímeros estructurales, protectores de UV, antioxidantes, y otros están involucrados en los mecanismos de defensa no específicos (Papoulias et al., 2009). La composición fenólica de frutos, y por lo tanto sus propiedades antioxidantes, puede ser modificada por factores ambientales y de postcosecha, incluyendo el almacenamiento y el procesado (Robards et al., 1999). También, los fenoles son de gran importancia para determinar algunos atributos de calidad y algunas propiedades en frutos frescos y hortalizas, como color, textura, sabor y flavor. Además, los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes en diferentes reacciones de la planta. Así, numerosos estudios han demostrado que la acumulación de compuestos fenólicos como los flavonoides y los antocianos proporciona un mecanismo defensivo, y la concentración de flavonoides en plantas podría estar afectada por el aporte de NO_3^- (Chimphango et al., 2003; del Amor et al., 2009).

En nuestro estudio, los fenoles totales, expresados como la [Ácido Gálico], en los frutos control no se vieron afectados a los 21 días de almacenamiento a 5°C (**Figura 4.9 (A)**), mientras que al aplicar urea se observó un aumento significativo. Algunos investigadores encontraron que la aplicación de NO_3^- es favorable para la acumulación de compuestos fenólicos (Yang et al., 2006). En el caso del

tratamiento con AT, los compuestos fenólicos no cambiaron y siguieron un patrón similar a los frutos control. Shin et al. (2007) observaron que los compuestos fenólicos aumentaron durante el almacenamiento, pero en nuestro estudio este efecto se dio sólo como resultado de la aplicación de urea. Padma y Picha (2008) mostraron que el contenido fenólico está influenciado por el cultivo y otras condiciones de pre y postcosecha y la larga exposición a bajas temperaturas. Cordenunsi et al. (2005) estudiaron que los fenoles totales siguen constantes o incluso descienden. Por el contrario, Robards et al. (1999) mostraron que el contenido de fenoles aumentó significativamente en manzanas almacenadas a 0°C, mientras que Ayala-Zavala et al. (2004) demostraron que los fenoles totales aumentaron durante el almacenamiento en frío en fresas. En nuestros frutos control, los fenoles totales mostraron una ligera tendencia a aumentar después de 7 días de almacenamiento.

4.2.3.3. *Enzimas antioxidantes*

Las plantas tienen sistemas de defensa antioxidante que pueden prevenir la acumulación de ROS y reparar el daño oxidativo. El daño en las plantas tiene como resultado unos niveles elevados de ROS y las enzimas antioxidantes protegen contra estas moléculas potencialmente peligrosas (Wongsheree et al., 2009). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un compuesto potencialmente tóxico, el cual es reducido a agua por la CAT y APOX (Imahori et al., 2000). Así, la catalasa protege a las células contra el H_2O_2 que se genera en estas células, catalizando su conversión a H_2O y O_2 molecular, y destruyendo las sustancias tóxicas que puedan entrar en las células (Cadenas y Davies, 2000).

Sin embargo, la respuesta de CAT y APOX no fue exactamente la misma cuando se aplicó urea para el crecimiento de frutos deficientes en N (del Amor et al., 2009) o de frutos bien nutridos bajo almacenamiento a bajas temperaturas. En este estudio, la catalasa se vio afectada después de 7 días por urea o AT, mientras que se redujo en frutos control en menor medida (**Figura 4.9 (B)**). Así, la actividad catalasa en frutos con AT, primero aumentó durante los primeros 7 días y luego descendió permanentemente sobre el siguiente periodo. Sin embargo, el efecto de la urea fue el inverso que el observado en frutos con AT (mientras que el AT desciende, la urea aumenta), pero a los 21 días ambos tratamientos mostraron la

misma actividad, significativamente más alta que en los frutos control. También se observó un patrón similar para la actividad APOX (**Figura 4.9 (C)**). Sin embargo, las diferencias entre el AT y la urea se mantuvieron a los 21 días aunque con la tendencia contraria.

Imahori et al. (2008) indicaron que los frutos de pimiento almacenados a 6°C presentan un descenso gradual en la actividad catalasa y la ascorbato peroxidasa a los 15 días de almacenamiento, y mostraron que los cambios en la actividad CAT durante el almacenamiento en frío, están también relacionados con la resistencia y el desarrollo del estrés oxidativo. Así, Baker (1994) observó que la actividad CAT en hojas de pimiento desciende antes que los síntomas visibles de senescencia, mientras que Zilkah et al. (1996) también indicaron un efecto beneficioso de la urea foliar: el aumento de la tolerancia al frío en aguacate y melocotón. Por tanto, nuestros resultados muestran que el aumento de la actividad enzimática producido por la urea, puede suponer una mayor protección durante el almacenamiento a bajas temperaturas ya que, comparadas con el control, una actividad inferior de las enzimas a temperaturas muy bajas, puede afectar a la capacidad de las plantas para romper los productos de la fotorreducción de oxígeno (Baker, 1994). Además, Lim et al. (2009) estudiaron que el daño aumenta los niveles de especies activas de oxígeno (ROS) en plantas sensibles al daño, y la reducción del daño en plantas resistentes, debería estar relacionada con su capacidad para reducir o buscar radicales libres por el aumento de la actividad enzimática. Así, se observaron actividades más bajas de CAT en frutos sensibles al daño que en frutos tolerantes, después del almacenamiento a 0°C (Ju et al., 1994). Sin embargo, como se apuntó anteriormente, CAT y APOX tienden a disminuir con AT pero aumentan con urea después de 7 días desde la aplicación. También se observó un patrón diferente durante los primeros 7 días de almacenamiento, en comparación con el resto de los periodos.

4.2.3.4. Peroxidación lipídica

El estrés ambiental induce especies activas de oxígeno, las cuales pueden llevar a la oxidación de las membranas lipídicas y trastocarlas (Blokhina et al., 2003). La peroxidación lipídica contribuye al desarrollo del daño (Wang et al.,

1992) y éste favorece la degeneración lipídica en frutos de pepino y en el pericarpio del tomate (Wang, 1995). El ensayo con ácido tiobarbitúrico (TBA) se usa comúnmente para medir sustancias reactivas de ese ácido (TBARS), resultantes de la oxidación lipídica; la reacción de TBARS sirve como un indicador de la peroxidación lipídica (Davey et al., 2005). Los cambios en los niveles de peroxidación lipídica en un tejido pueden ser un buen indicador de la integridad estructural de las membranas de plantas sujetas a bajas temperaturas (Posmyk et al., 2005).

Nuestros datos muestran que la peroxidación lipídica se redujo en todos los tratamientos durante los primeros 7 días. Después, los frutos control mostraron una tendencia a aumentar TBARS, mientras que en frutos tratados con AT se observó un aumento significativo después de 14 días de almacenamiento (**Figura 4.9 (D)**). Los frutos tratados con urea muestran valores más bajos que los frutos control y AT. El estrés oxidativo puede ser definido como un incremento de especies oxidantes y una disminución de las defensas antioxidantes. Así, este efecto diferencial de AT puede ser atribuido a un repentino descenso de actividad CAT y APOX observada después de 7 días de almacenamiento. Por lo tanto, es de preveer que ambas actividades en frutos con AT continúen descendiendo por debajo de los niveles control. Sin embargo, el aumento en TBARS, se produjo antes del descenso más evidente de las enzimas antioxidantes en el tratamiento de AT. Esto podría indicar una inducción retrasada en el sistema defensivo, que contrarresta el aumento de TBARS a bajas temperaturas en este tratamiento. Wismer et al. (1998) demostraron que las bajas temperaturas pueden modificar las propiedades biofísicas de las membranas por la propia composición de éstas, lo cual contribuye a que los síntomas del daño sean visibles, e induce estrés oxidativo en la célula. Por otra parte, el mantenimiento de la integridad de la membrana a baja temperatura se considera esencial en la resistencia a bajas temperaturas. Además, el incremento en TBARS observado podría estar asociado con cambios en la insaturación de ácidos grasos y en la composición fosfolipídica de las membranas mitocondriales, produciendo cambios en la fluidez de la membrana y en la actividad de los complejos respiratorios (Gualanduzzi et al., 2009). Sin embargo, es menos probable que el aumento de TBARS resulte de la peroxidación de los galactolípidos, los cuales son ricos en ácidos linoleico y linolénico (fuente de malondialdehído).

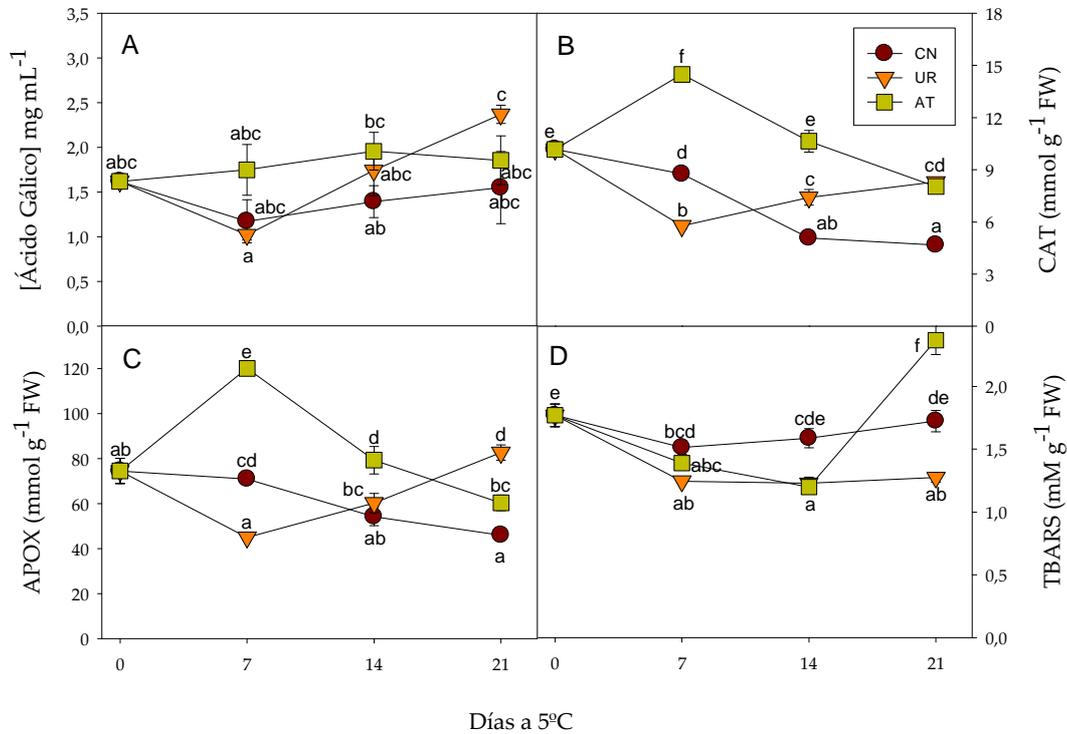


Figura 4.9. Efecto de la aplicación de antitranspirante (AT) o urea foliar (UR) en los compuestos fenólicos totales (A), catalasa (B), ascorbato peroxidasa (C) y peroxidación lipídica (D). CN indica frutos no tratados (control). Las barras verticales indican los errores estándar de las medias, solo se muestran cuando son más grandes que el símbolo. Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango Duncan).

4.2.3.5. Composición de aminoácidos

El metabolismo de aminoácidos es uno de los procesos bioquímicos más importantes en plantas. Los aminoácidos libres están involucrados en el metabolismo secundario de las plantas y en la biosíntesis de compuestos como los glucosinolatos y los fenólicos, los cuales directa o indirectamente juegan un papel destacado en la interacción de la planta y la salud humana; así, es notable la determinación del perfil de los aminoácidos (Gomes y Rosa, 2000). Además, los aminoácidos son vitales para la nutrición humana y afectan a la calidad de la comida, incluyendo el sabor, el aroma y el color (Belitz y Grosch, 1999).

En este estudio, la arginina (arg) fue el mayor aminoácido en los frutos de pimiento representando la mitad del contenido total de aminoácidos, mientras que los valores de ácido aspártico (Asp), treonina (Thr), alanina (Ala), lisina (Lys) y tirosina (Tyr) fueron moderados y los de prolina (Pro), isoleucina (Ile), leucina (Leu) y fenilalanina (Phe), muy bajos (**Tabla 4.3**). Histidina (His), glicina (Gly), ácido glutámico (Glu) y cisteína (Cys), no se detectaron en los extractos de pimiento. En general, las concentraciones de aminoácidos no se vieron afectadas cuando se almacenaron los pimientos a 5°C durante 21 días, y se mantuvieron próximos a las concentraciones iniciales antes del almacenamiento.

La arginina está considerada como un aminoácido semi-esencial para los humanos, siendo requerida para garantizar que el hígado, las articulaciones, los músculos (incluido el músculo cardíaco) y la piel se mantengan sanos. Oliveira et al. (2008) estudiaron que la arginina es también de gran importancia como producto intermediario en la síntesis de urea, siendo (teóricamente) la forma más eficiente de almacenamiento de N debido a su baja proporción de C/N (Titus y Kang, 1982). La conservación del perfil de aminoácidos a la temperatura estudiada es necesaria para las características nutricionales del pimiento. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que aunque el metabolismo enzimático relacionado con enzimas antioxidantes o color, está alterado por la baja temperatura, sólo se observaron unos cambios mínimos en la composición de los aminoácidos de pimiento. Además, se encontró un efecto diferencial positivo en el tratamiento de urea, el cual mejora el color y la mitigación de la peroxidación lipídica por el aumento de la catalasa y la ascorbato peroxidasa.

En este estudio se puede concluir que, el almacenamiento de los frutos de pimiento a bajas temperaturas provocó un aumento en las enzimas antioxidantes y en los fenoles totales. Los frutos a los que se les aplicó urea, incrementaron la actividad de la ascorbato peroxidasa, catalasa, y los compuestos fenólicos totales a los 21 días después de la recolección, indicando así una respuesta significativa del fruto a la aplicación de urea foliar durante el periodo de postrecolección. Tras 21 días de conservación a bajas temperaturas, los frutos tratados con antitranspirante (AT), también incrementaron su actividad de la ascorbato peroxidasa (APOX), de la catalasa (CAT) y del contenido en fenoles totales.

Tabla 4.3. Efecto de la urea foliar (UR) y antitranspirante (AT) en la concentración de aminoácidos en frutos de pimiento dulce a 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 5°C. Los valores con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango de Duncan).

		Aminoácidos ($\mu\text{M/L}$)											
Días	Tratamiento	Ser	Arg	Asp	Thr	Ala	Pro	Lys	Tyr	Val	Ile	Leu	Phe
0		5.08	16.13ab	4.11a	2.54	3.01	0.00	2.15	0.42a	2.02a	0.00a	0.98	0.22
7	CN	4.31	15.89ab	5.22bc	2.35	3.30	0.00	1.97	3.67d	2.55b	0.00a	0.24	0.00
	UR	4.25	16.42ab	5.87cd	2.52	3.34	0.00	1.74	1.97abcd	1.87a	0.00a	0.00	0.00
	AT	5.59	18.86bc	6.18d	2.92	3.35	0.25	2.29	2.53bcd	2.03a	0.23ab	0.70	0.24
14	CN	4.60	16.00ab	4.11a	2.31	3.19	0.00	1.92	1.41abc	2.52b	0.00a	0.54	0.00
	UR	4.33	16.44ab	5.66bcd	1.97	2.56	0.00	1.90	1.65abc	1.86a	0.00a	0.24	0.00
	AT	5.63	22.67c	6.25d	2.54	3.31	0.00	2.71	3.19cd	1.74a	0.00a	0.74	0.24
21	CN	5.29	16.02ab	4.91ab	2.38	3.45	0.25	2.50	0.95ab	1.79a	0.00a	0.30	0.24
	UR	5.98	13.00a	5.12bc	2.68	3.58	0.27	2.34	0.96ab	1.78a	0.48b	1.04	0.25
	AT	5.70	15.37ab	5.92cd	2.58	3.18	0.00	1.59	1.45abc	1.68a	0.00a	1.12	0.00

4.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL INTERCAMBIO GASEOSO Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE LA PLANTA DE PIMIENTO CON APLICACIÓN DE UREA FOLIAR

4.3.1. Introducción

Hoy en día, los agricultores tienen que adaptarse a las nuevas limitaciones y responder a nuevos retos, con implicaciones importantes, para el medio ambiente y el manejo de cultivos. De esta manera, tienen que combinar varios objetivos: (1) lograr un rendimiento óptimo, lo que limita los costes de producción, (2) maximizar el beneficio, (3) conservar los recursos naturales al limitar el impacto negativo de la producción agrícola en el medio ambiente y (4) obtener productos vegetales con las cualidades que exige el mercado (Jeuffroy et al., 2002).

El método de aplicación de N (tanto en suelo como en hojas) afecta en gran medida a la calidad de la planta a través del crecimiento y del almacenamiento de N (Habib et al., 1993). Por lo tanto, las aplicaciones foliares de fertilizantes tienen potenciales beneficios, incluyendo la posibilidad de aportar nutrientes a la planta cuando las condiciones del suelo restringen el consumo por la raíz o durante períodos de crecimiento rápido. La urea es un fertilizante nitrogenado de bajo coste que, aplicado en las hojas, puede reducir eficazmente la aplicación de N por la raíz y disminuir la lixiviación de nitratos a las aguas subterráneas y a las corrientes de aguas superficiales (del Amor et al., 2009). Sin embargo, la urea puede dañar las células de la planta y liberar radicales superóxido (Witte et al., 2002). Además, el estrés nutricional (deficiencia) provoca una de las primeras respuestas de estrés oxidativo en las plantas (Cakmak y Marschner, 1988). Debido a que el estrés oxidativo, en concreto ROS, puede causar peroxidación lipídica y daño en las membranas, entre otras cosas, las plantas utilizan enzimas antioxidantes capaces de metabolizar ROS a compuestos menos tóxicos (Polle, 2001). La alteración del metabolismo y del crecimiento por el N, puede requerir la presencia de mecanismos de defensa adicionales contra ROS (Mullineaux y Creissen, 1997).

La absorción foliar de las sustancias aplicadas puede aumentar con la temperatura (Baur y Schonerr, 1995). De ese modo, la penetración a través de las

cutículas se ve afectada por la temperatura a la cual se aplica la urea (Knoche et al., 1994). La actividad fotosintética es especialmente sensible al estrés causado por temperaturas desfavorables; así, los efectos de la temperatura en la fotosíntesis pueden darse aumentando la actividad oxigenasa de Rubisco, debido al daño producido en la membrana y en el transporte de electrones (Berry y Bjorkman, 1980).

El interés en estudiar la aplicación óptima de urea y la respuesta de la planta, afectada por la temperatura de crecimiento, proviene de estudios anteriores, donde se exponen las ventajas de los métodos de aplicación foliar, como la respuesta rápida y eficiente a la demanda de la planta, una cantidad menor de la necesidad del producto e independencia de las condiciones del suelo (Yildirim et al., 2007).

Los objetivos de este trabajo fueron: (i) comparar los efectos de la alta y la baja temperatura en la asimilación de CO₂ y la respiración de suelos en plantas de pimiento con baja disponibilidad de N en el crecimiento; (ii) identificar la capacidad de tratar con urea foliar las plantas a diferentes temperaturas para compensar la limitación de N en el crecimiento; y (iii) examinar el daño (peroxidación lipídica) y el papel del sistema antioxidante (catalasa y ascorbato peroxidasa) bajo el efecto combinado de la temperatura y la fertilización foliar.

4.3.2. Material Y Métodos

4.3.2.1. Descripción del ensayo y condiciones de crecimiento

Las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L. cv. Herminio) fueron plantadas en macetas con fibra de coco como sustrato. Las plantas fueron regadas con una solución Hoagland modificada (control) con la siguiente composición (meq L⁻¹): NO₃⁻, 12.0; H₂PO₄⁻, 1.0; SO₄²⁻, 7.0; K⁺, 7.0; Ca²⁺, 9.0; Mg²⁺, 4.0. El riego se aplicó mediante goteros autocompensantes (2 L h⁻¹) y la solución de nutrientes se aplicó para evitar la acumulación de sales, con un drenaje mínimo del 35% (del Amor y Gómez-López, 2009). Las plantas crecieron en una cámara climática diseñada específicamente por nuestro equipo de trabajo, con condiciones ambientales controladas: 70% HR, un fotoperiodo de 16/8 h día/noche y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 250 μmol m⁻² s⁻¹ proporcionada por

la combinación de lámparas fluorescentes (Philips TL-D Master réflex 830 y 840) y de sodio (Philips Son-T Agro). El experimento se llevó a cabo a 10, 20 y 30°C con una duración de 20 días cada uno de ellos, empezando con plantas de 36 días. Éstas se suplementaron con solución control (+N) o con solución deficiente en N (0N) con la siguiente composición (meq L⁻¹): H₂PO₄⁻, 3.0; SO₄²⁻, 20.9; K⁺, 8.6; Ca²⁺, 11.0; y Mg²⁺, 4.9. A las hojas de la mitad de las plantas cultivadas con 0N se les aplicó completa y homogéneamente urea foliar (15 g L⁻¹) dos veces durante el experimento (una vez a la semana).

4.3.2.2. Determinaciones

Los métodos para determinar los diferentes análisis realizados en este trabajo están detallados en Materiales y Métodos (Capítulo III).

Antes de finalizar el experimento y cortar las plantas para las posteriores determinaciones se midieron los siguientes parámetros:

- Fotosíntesis y Respiración de suelos, mediante el analizador portátil CIRAS-2 (PP System, Amesbury, MA, USA).
- Fluorescencia de las clorofilas, mediante el fluorímetro Opti-Sciences.

Una vez determinados los parámetros anteriores las plantas se cortaron y se hicieron medidas sobre materia liofilizada y materia seca.

A) Sobre materia liofilizada se analizaron:

- Peroxidación lipídica
- Enzimas antioxidantes (catalasa y ascorbato peroxidasa)

B) Sobre materia seca se determinó la concentración de NO₃⁻ en el cromatógrafo iónico.

Para la estadística se utilizó el programa Statgraphics Centurión v.15. Para conocer las diferencias entre las medias se utilizó el test de Tukey, en un procedimiento de comparación múltiple a un nivel significativo de 0.05. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con seis plantas por tratamiento (9 tratamientos en total): control (+N en la solución nutritiva, sin urea y con 3 temperaturas), plantas con deficiencia de N y sin urea (0N en la solución

nutritiva y 3 temperaturas), y plantas deficientes en N pero con aplicación foliar de urea (0N en la solución nutritiva y 3 temperaturas con urea).

4.3.3. Resultados Y Discusión

4.3.3.1. Fotosíntesis, fluorescencia de clorofilas y respiración de suelos

La asimilación de CO₂ en la hoja de plantas control se redujo drásticamente a 10°C en comparación con las plantas a 20 y 30°C (**Figura 4.10 (A)**). Así, para las plantas control, la asimilación de CO₂ se redujo un 38% y un 77.5% a 20 y 10°C respectivamente, comparadas con plantas a 30°C. Esta inhibición de la fotosíntesis a bajas temperaturas se ha asociado con la inactivación del regulador, las enzimas activadas tiorredoxina del ciclo de Calvin (Sassenrath et al., 1990), la pérdida irreversible de la proteína Rubisco (Brüggemann et al., 1992), la selectiva inhibición de la síntesis de productos finales, que resultan en la acumulación de metabolitos fosforilados y la limitación de fosfato (Sharkey et al., 1986), y una inhibición de la salida del floema, produciendo una rápida acumulación de azúcares solubles, los cuales reprimen la expresión de los genes fotosintéticos (Jeong et al., 2002).

La aplicación de urea no está totalmente compensada por la ausencia del aporte de N por las raíces, y la fotosíntesis se redujo significativamente en comparación con plantas cultivadas a 12mM NO₃⁻. Sin embargo, pulverizar las plantas deficientes en N con urea aumentó la fotosíntesis. Castle et al. (2007) encontraron en plantas de trébol blanco, que las aplicaciones de urea foliar aumentaron la fotosíntesis y el área foliar en comparación con plantas suplementadas con N vía radicular. La retirada de aporte de N por las raíces afectó la fotosíntesis cuando la temperatura fue de 20°C o mayor. Cuando se aplicó urea foliar en plantas deficientes en N, la fotosíntesis aumentó en un 48.9% y un 30.2% a 20 y 30°C respectivamente, comparada con las plantas no pulverizadas. Yamasaki et al. (2002) demostraron que al aumentar la temperatura de crecimiento aumenta la temperatura óptima para la fotosíntesis. Orbovic et al. (2001) observaron que aumentando la temperatura de 19 a 28°C, hay un aumento de la cantidad total de urea, la cual pasa a través de las cutículas en las primeras 24 horas después de la aplicación de urea foliar. Esto concuerda con nuestros

resultados donde la fertilización foliar produce una respuesta visible de fotosíntesis, especialmente a temperatura moderada (20°C).

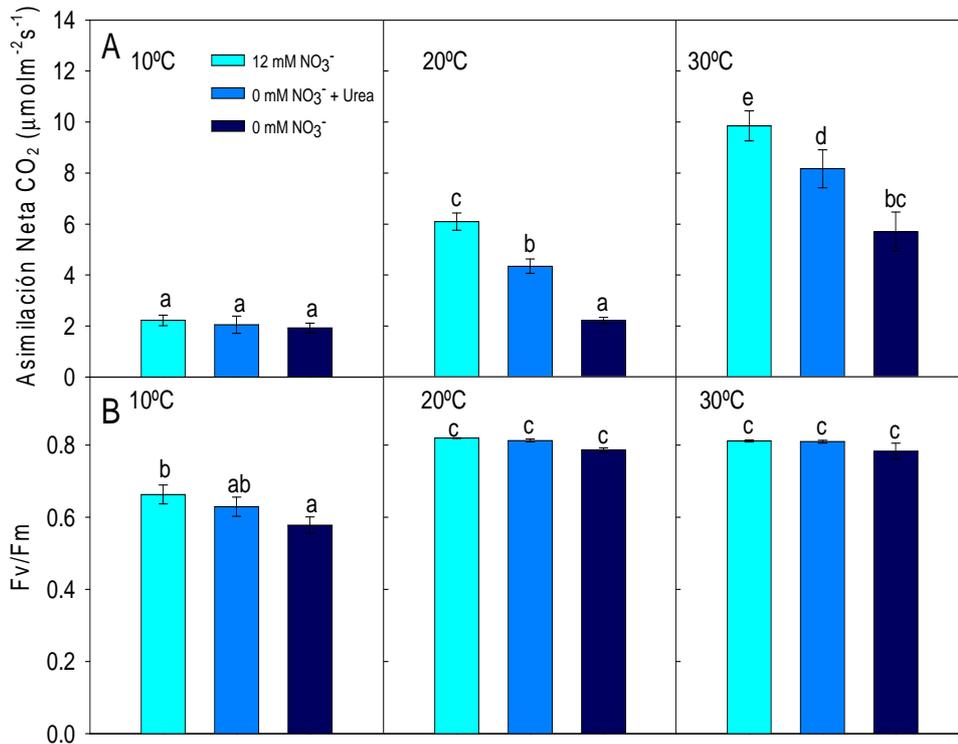


Figura 4.10. Efecto de la temperatura y la urea foliar en la asimilación neta de CO₂ (A) y el máximo rendimiento del PSII (Fv/Fm) (B) en plantas de pimienta cultivadas con solución nutritiva control (12.5 mM NO₃⁻) o deficiente en N (0 mM NO₃⁻). Las barras de error representan la media ± SE; n=6, las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes en $P \leq 0.05$ (Test de múltiple rango de Tukey).

La baja temperatura (10° C) redujo la eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm) (**Figura 4.10 (B)**) comparada con los valores observados a 20 ó 30° C. Nuestros resultados concuerdan con los presentados por Camejo et al. (2010), quienes no observaron un efecto en la eficiencia del PSII en tomate cuando la temperatura de la hoja se incrementó a 35°C. A 10°C, el coeficiente Fv/Fm de las hojas control, era mejor que en las plantas deficientes en N que no estaban tratadas con urea. Las plantas deficientes tratadas con urea no cambiaron

representativamente la fluorescencia de las hojas de pimiento. Así, Zilkah et al. (1996) indicaron que las hojas tratadas de aguacate eran 2.5 veces más tolerantes al frío que las no tratadas, al mismo nivel de senescencia.

La urea no tuvo ningún efecto en la respiración radicular a ninguna de las temperaturas (**Figura 4.11**). La respiración radicular se redujo drásticamente a 10°C en comparación con plantas cultivadas a 20°C y 30°C. Además, a 20 y 30°C la respiración radicular de las plantas control fue mejor que la de las plantas tratadas con urea.

Varios factores afectan al índice de la respiración del suelo, como son la temperatura, la humedad, las concentraciones de N en la raíz, la textura y la cantidad y calidad del sustrato (Buchmann, 2000). Aunque Luo y Zhou (2006) observaron que la respiración del suelo aumentó con suplementos de N, las respuestas de la respiración a la fertilización con N, son extremadamente variables y dependen del tipo de fertilizante, del nivel de carga y de las condiciones del terreno; este hecho respalda nuestras observaciones, según las cuales la fertilización foliar no proporcionó suficiente N para mantener el mismo nivel de respiración radicular que cuando se provee el N completamente mediante el riego.

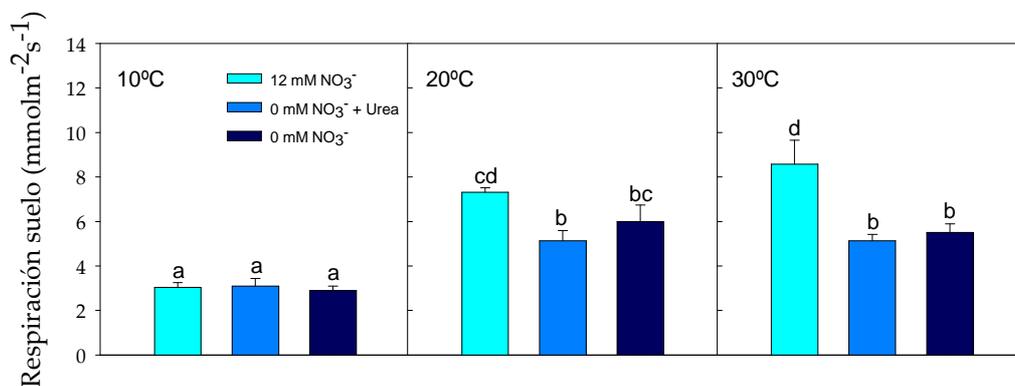


Figura 4.11. Efecto de la temperatura y la urea foliar en la respiración de suelos en plantas de pimiento cultivadas con solución nutritiva control (12.5 mM NO₃⁻) o deficiente en N (0 mM NO₃⁻). Las barras de error representan la media ± SE; n=6, las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes en $P \leq 0.05$ (Test de múltiple rango de Tukey).

4.3.3.2. Concentración de NO_3^-

La concentración de NO_3^- en hoja se incrementó en plantas control cuando la temperatura aumentó de 10 a 20°C pero no se encontró ningún efecto cuando la temperatura aumentó de 20 a 30°C (**Figura 4.12**). Además, cuando se aplicó urea a plantas deficientes en N a 10°C, la concentración de NO_3^- en hoja fue más alta que en plantas control; este efecto se atenuó cuando se aumentó la temperatura. Así, a 30°C, no se observó ninguna diferencia visible en este parámetro comparado con plantas sin tratar y con N limitante.

La dependencia de temperatura de la absorción de nitrato ha sido claramente demostrada en plantas superiores (Zhao et al., 2008). Así, las bajas temperaturas (10 °C) podrían limitar la absorción de N por las raíces en plantas control, comparadas con plantas cultivadas a 20 o 30°C. Pero la urea foliar, a pesar de su relativamente escasa difusión a bajas temperaturas (Orbovic et al., 2001), podría incrementar la concentración de nitratos en hoja comparándolas con plantas control que reciben un deficiente suministro de N a través de las raíces. A temperatura moderada (20°C), aunque la urea se difunde mejor por las cutículas, el efecto dilución (crecimiento) podría reducir notablemente la concentración de nitratos en comparación con plantas tratadas a 10°C. Zilkah et al. (1987) estudiaron que el contenido de N en la hoja puede ser rápidamente incrementado por la aplicación foliar de urea, mientras que Bi et al. (2007) estudiaron que la aplicación de urea en otoño puede mejorar la eficiencia de N, aumentando el almacenamiento de N y el óptimo crecimiento de la planta. Además, Zilkah et al. (1996) observaron que el enriquecimiento de N a través de la cubierta vegetal, debería ser de aplicación preferente en suelo, durante el invierno y el principio de la primavera, cuando la absorción y movilización a través de las raíces están todavía limitadas debido a la saturación de agua y a la baja temperatura del suelo. A 30°C, el efecto de la urea en la concentración de NO_3^- no fue notable en comparación con las plantas no tratadas. Esto podría ser debido al rápido descenso en el tiempo de secado de las gotas con el aumento de la temperatura. La alta temperatura puede aumentar la volatilización de amonio de la urea, perjudicando la penetración. Por lo tanto, para lograr mejores efectos en el spray de urea, se deberían evitar altas temperaturas.

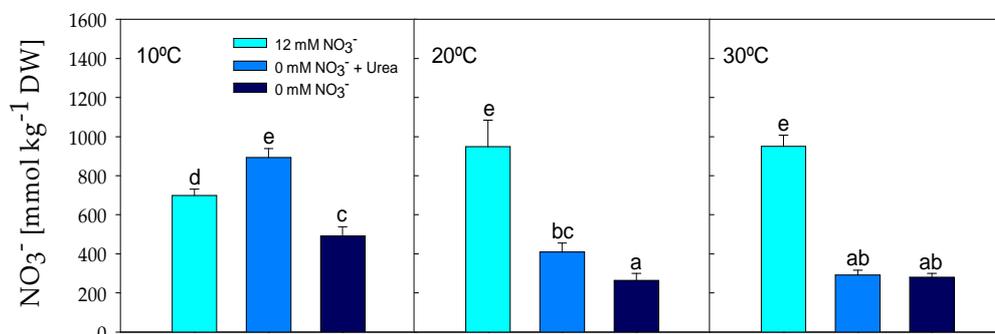


Figura 4.12. Efecto de la temperatura y la urea foliar en la concentración de NO_3^- en hoja de plantas de pimiento cultivadas con solución nutritiva control (12.5 mM NO_3^-) o deficiente en N (0 mM NO_3^-). Las barras de error representan la media \pm SE; $n=6$, las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes en $P \leq 0.05$ (Test de múltiple rango de Tukey).

4.3.3.3. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se vio incrementada cuando la temperatura se redujo de 30 a 10°C (**Figura 4.13 (A)**). Cuando ésta disminuyó de 20 a 10°C, aumentó un 34.8% en plantas control, pero no hubo un efecto significativo cuando se redujo la temperatura de 30 a 20°C. Cuando no se aplicó N por las raíces, la peroxidación lipídica aumentó a 20°C, en comparación con plantas control, pero no a 30°C. Además, la urea foliar produjo una reducción en la peroxidación lipídica cuando ésta se aplicó a 20°C, en comparación con plantas no tratadas bajo limitación de N.

Las bajas temperaturas pueden inducir la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, pudiendo evaluar el grado de degradación de la membrana por el ácido tiobarbitúrico (TBA) que reacciona con los productos de la degradación de los lípidos, como el malondialdehído (MDA) (Boonsiri et al., 2007). Por lo tanto, los cambios en los niveles de peroxidación lipídica en un tejido pueden ser un buen indicador de la integridad estructural de las membranas en plantas sujetas a baja temperatura (Posmyk et al., 2005).

Nuestros datos demuestran que la temperatura afectó a la peroxidación lipídica debido al aumento de los niveles de TBARS conforme descendía la temperatura. El efecto de la urea fue más evidente cuando se aplicó a 20°C. Como

observaron Gülen et al. (2008), las bajas temperaturas inducen estrés oxidativo en los tejidos y consecuentemente aumentan la peroxidación lipídica: esto indica algunos daños celulares en las hojas de pimiento dulce cultivado a 10°C. La deficiencia de N disminuye el crecimiento de la planta, la producción de biomasa, la fotosíntesis y las concentraciones de pigmentos cloroplásticos en pimiento dulce (del Amor, 2006 (a)). Nuestros resultados también muestran que la peroxidación lipídica aumentó en plantas deficientes en N. Tewari et al. (2007) indicaron que la peroxidación lipídica aumenta en las hojas de plantas deficientes en N y que la relación entre la deficiencia de macronutrientes y el estrés oxidativo es obvia. A moderadas temperaturas (20°C), la urea foliar redujo la peroxidación lipídica, pero no lo hizo a elevadas temperaturas (30°C).

4.3.3.4. *Actividades enzimáticas*

El aumento de la temperatura disminuyó las actividades de CAT y APOX en plantas control (**Figura 4.13 (B)** y **4.13 (C)**). Este descenso fue notable cuando la temperatura se incrementó de 10 a 20°C pero no se observaron reducciones a 30°C. En general, las actividades de esas dos enzimas se vieron menos afectadas por la temperatura que la peroxidación lipídica (TBARS), y el efecto del aumento de temperatura no fue significativo en la actividad enzimática en plantas deficientes en N (en plantas tratadas y no tratadas con urea). Consecuentemente, la reducción observada en TBARS (10°C comparados con 30°C) para estos tratamientos, no tuvo ninguna influencia en la respuesta de las actividades CAT o APOX. Sin embargo, a 20°C se observó una respuesta diferente y la urea redujo la actividad de APOX en comparación con plantas deficientes en N que no fueron tratadas.

La exposición de plantas a diferentes condiciones ambientales adversas causa estrés oxidativo y, bajo esas condiciones, los mecanismos que contribuyen a la desenergización de los fotosistemas, como la fotorespiración y la reacción de Mehler, aumentan la producción de H₂O₂ y, en algunos casos, O₂ (Perl-Treves y Perl, 2002). Así, para paliar el estrés oxidativo, las plantas producen varios compuestos antioxidantes y actividades enzimáticas. Éstos han sido usados para evaluar las respuestas de las plantas al estrés: bajo condiciones de prolongado estrés, el aumento de la generación de ROS perjudica el balance normal de las células (Apel y Hirt, 2004) y las plantas sujetas a condiciones adversas, como la

alta y baja temperatura o el desequilibrio de nutrientes, pierden su función y el balance entre la producción y la extinción de especies activas de oxígeno se puede desequilibrar, dando como resultado un daño oxidativo. O'Kane et al. (1996) demostraron que en *Arabidopsis* sujeta a bajas temperaturas, el H₂O₂ acumulado en las células y la actividad de APOX disminuyen. Polesskaya et al. (2004) estudiaron que el N, aplicado en deficiencia, afecta a los niveles y al curso de las actividades de las enzimas antioxidantes en respuesta a los tratamientos de baja temperatura y, consecuentemente, la actividad de APOX aumentó bajo esta deficiencia de N.

Pero, en general, CAT y APOX no se vieron afectadas por el rango de temperaturas estudiado: la urea foliar tuvo un gran efecto en la actividad APOX sólo a 20°C. Sin embargo, Tewari et al. (2007) también observaron que la deficiencia de N aumenta las actividades de APOX y estos aumentos se correlacionaron bien con el aumento de la concentración de H₂O₂ en plantas deficientes en N. Nuestro estudio refleja que las actividades de APOX, pero no las de CAT, aumentan el H₂O₂ inhibiendo la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y protegen a las hojas de la peroxidación de los lípidos de las membranas y el daño oxidativo bajo estrés de N. El aumento de la actividad enzimática antioxidante fue particularmente efectivo para contrarrestar ROS cuando se aplica la urea foliar a temperatura moderada (20 °C).

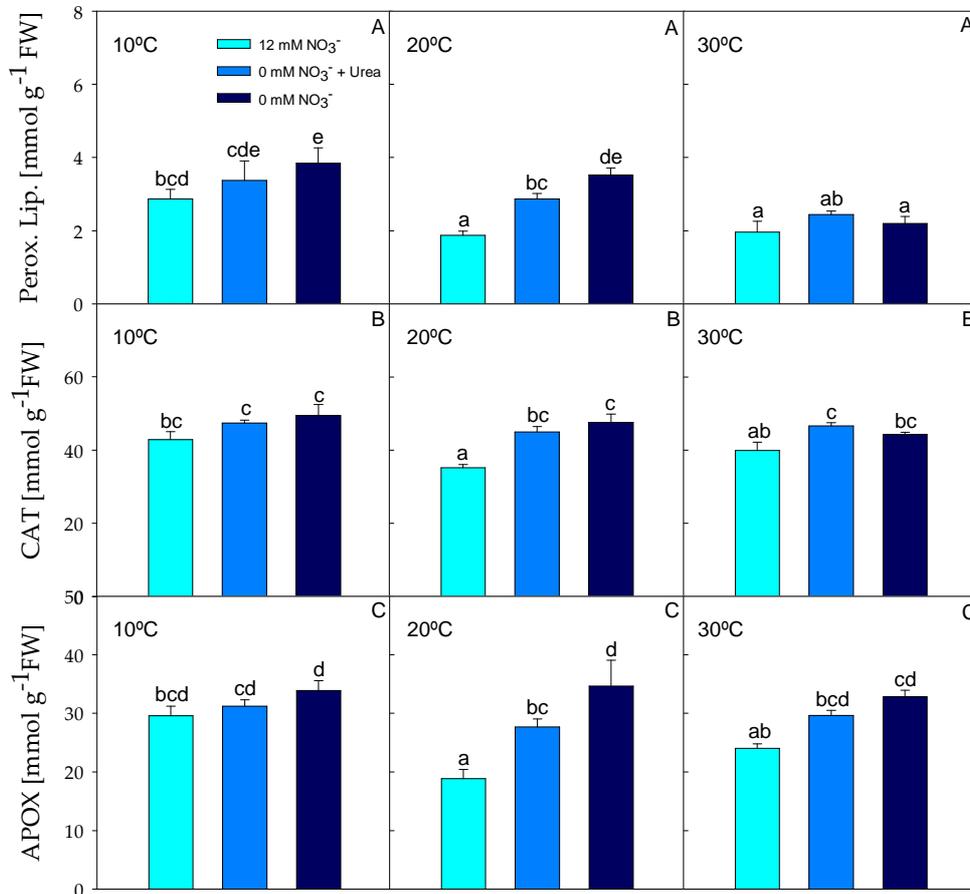


Figura 4.13. Efecto de la temperatura y la urea foliar en la peroxidación lipídica y la actividad catalasa y ascorbato peroxidasa en hojas de plantas de pimienta cultivadas con solución nutritiva control (12.5 mM NO₃⁻) o deficiente en N (0 mM NO₃⁻). Las barras de error representan la media \pm SE; $n=6$, las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes en $P \leq 0.05$ (Test de múltiple rango de Tukey).

Este trabajo destaca que para plantas deficientes en N, la urea foliar fue especialmente efectiva ya que aumentó la concentración de NO₃⁻ en la hoja y redujo la peroxidación lipídica (degradación de la membrana), cuando se aplicó a 20°C. Esto quiere decir que, si la urea foliar se usa como nutriente en la práctica de cultivo, se debería tener en cuenta su aplicación a este rango de temperatura.

4.4. RESPUESTA DEL PIMIENTO DULCE A LA APLICACIÓN DE UREA FOLIAR O METIL-JASMONATO BAJO DEFICIENCIA DE N

4.4.1. Introducción

El nitrógeno (N) es el elemento mayoritario esencial para el crecimiento de la planta, y el N del suelo está disponible para la planta en forma de nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+) (Chen et al., 2009). Hay relaciones positivas entre el estado del N y el crecimiento de la planta que se manifiestan en la cercana relación entre la fotosíntesis y el N en hoja, así como también en el índice de crecimiento relativo de toda la planta (Evans, 1983). Sin embargo, los efectos positivos de los altos contenidos de N en la productividad, están acompañados por el aumento de los índices de la respiración, los cuales pueden compensar parcialmente los beneficios de altos contenidos de N en los índices netos de acumulación de C (Alt et al., 2000).

Las aplicaciones foliares de fertilizantes tienen potenciales beneficios entre los que se incluye la posibilidad de suplementar nutrientes a la planta, cuando las condiciones restringen la asimilación por la raíz, o durante periodos de rápido crecimiento cuando los requerimientos pueden exceder al aporte por la raíz (Boynton, 1954; Swietlik, 1984). Para los cultivos agrícolas, la urea, el NH_4^+ , y el NO_3^- se absorben igualmente bien cuando se aplican vía foliar, pero la urea es la preferida debido a que el NH_4^+ y el NO_3^- pueden causar más daños en las hojas (Bowman, 1992). La aplicación de urea foliar es una práctica bien aceptada por la producción de viveros y plantas decorativas (Dong et al., 2004). Entre sus muchas características, la urea se puede absorber rápidamente por las hojas de la mayoría de los cultivos (Gooding y Davies, 1992; Reickenberg y Pritts, 1996).

Los pimientos contienen altos niveles de compuestos biológicamente activos que proporcionan efectos beneficiosos para la salud más allá de la nutrición básica y tienen un alto contenido en ascorbato (ASC) o vitamina C, así como cantidades significativas de glutatión, dos compuestos antioxidantes que juegan un papel importante en la protección de las células frente a radicales libres o al daño oxidativo (Pascual et al., 2010). Las alteraciones en las membranas se deben a la peroxidación lipídica (asociada también al consecuente deterioro de los alimentos) por la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por

los factores de estrés (Gonçalves de Oliveira et al., 2009). Las ROS también están asociadas con el desarrollo de diversas enfermedades (Murcia et al., 2009).

El metil jasmonato (MeJa) es una fitohormona, con una distribución ubicua entre las plantas y se considera un modulador de eventos fisiológicos en las plantas, como respuestas de defensa, floración y senescencia (Parra-Lobato et al., 2009). MeJa podría estar asociado al estrés oxidativo (Devoto y Turner, 2003), debido al potencial que las especies reactivas de oxígeno tienen para interactuar con muchos compuestos celulares, conduciendo al daño en la membrana y causando una respuesta inmediata en la señal de defensa de la planta (van Breusegem et al., 2001).

Los objetivos de este estudio fueron: (i) determinar el efecto de las aplicaciones de urea foliar y metil jasmonato en plantas de pimiento regadas con una solución nutritiva con diferentes concentraciones de N, (ii) determinar el efecto de la baja concentración de N en las plantas y (iii) evaluar el efecto de las aplicaciones foliares y la diferente concentración de N en diversos parámetros como peroxidación lipídica, aminoácidos, intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas, contenido relativo de agua y concentración de nitratos.

4.4.2. Material Y Métodos

4.4.2.1. Planteamiento y condiciones de crecimiento

Las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cv. Herminio se plantaron en macetas con fibra de coco como sustrato, en una cámara climática con condiciones ambientales controladas: 70% HR, 16/8 h día/noche, 28/20°C y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por la combinación de lámparas fluorescentes (Philips TL-D Master reflex 830 y 840) y de sodio (Philips Son-T Agro). Las plantas se dividieron en tres grupos dependiendo de las concentraciones de N: 12.5 mM NO_3^- , 3.5 mM NO_3^- y 0.5 mM NO_3^- . Cada grupo tenía 20 plantas y se regaron con una solución Hoagland modificada con la siguiente composición en meq L^{-1} ; i) para el tratamiento de 12.5 mM; NO_3^- : 12.5; H_2PO_4^- : 1.0; SO_4^{2-} : 6.5; K^+ : 7.0; Ca^{2+} : 9.0; Mg^{2+} : 4.0. ii) para el tratamiento de 3.5 mM; NO_3^- : 3.5; H_2PO_4^- : 2.5; SO_4^{2-} : 17; K^+ : 8.0; Ca^{2+} : 10.5; Mg^{2+} : 4.5

y iii) para el tratamiento de 0.5 mM; NO₃⁻: 0.5; H₂PO₄⁻: 3; SO₄²⁻: 20.5; K⁺: 8.5; Ca²⁺: 11.0; Mg²⁺: 4.5.

Cinco días DDT empezaron los tratamientos foliares con urea (5 gL⁻¹), con MeJa (5 mM/100), y una combinación de ambos: urea foliar + metil jasmonato. Estos 3 tratamientos se compararon con uno control (sin tratamientos foliares). A las fertilizaciones foliares se les añadió Triton X-100 (0.125%) y etanol (0.04%) como surfactante y solvente respectivamente. Estos tratamientos se aplicaron una vez a la semana durante la totalidad del experimento (en total se hicieron 4 aplicaciones). Dos veces por semana se midió la altura de las plantas y la elongación de una hoja de la tercera posición. Al final del experimento (38 DDT), se analizaron las 60 plantas (5 plantas por tratamiento), pesando y separando la parte aérea (hojas y tallos). Parte de la hoja se congeló a -80°C y otra parte, junto con la totalidad del tallo, se secó en una estufa a 65°C para posteriores determinaciones.

4.4.2.2. Determinaciones

Los métodos para determinar los diferentes análisis realizados en este trabajo están detallados en Materiales y Métodos (Capítulo III).

Antes de finalizar el experimento se midieron los siguientes parámetros:

- Fotosíntesis, mediante el analizador portátil CIRAS-2 (PP System, Amesbury, MA, USA).
- Determinación de clorofilas mediante el método DMF y SPAD.

Sobre materia seca se determinó:

- Concentración de NO₃⁻ en hoja

Sobre materia fresca se analizó:

- Peroxidación Lipídica
- Aminoácidos

Los datos se analizaron primero para la homogeneidad de la varianza y la normalidad de la distribución con el programa SPSS (versión 13.0) mediante un test de múltiple rango de Duncan para determinar las diferencias significativas

($P \leq 0.05$). Para cada tratamiento teníamos cinco repeticiones y los datos representados son la media de esas cinco repeticiones.

4.4.3. Resultados Y Discusión

4.4.3.1. Crecimiento

Las plantas de pimienta presentaron diversos valores de crecimiento a diferentes concentraciones de nitrógeno. Las plantas con una concentración de N de 12.5mM NO_3^- crecieron prácticamente el doble que las plantas regadas con 3.5mM NO_3^- , y respecto de las de 0.5mM NO_3^- , crecieron tres veces más (**Figura 4.14**). Las plantas estresadas mostraron valores más pequeños de biomasa en todos sus órganos. También el crecimiento de las hojas siguió un patrón similar y tanto en crecimiento de planta como de hojas, las plantas tratadas con urea foliar presentaron los mismos valores de materia seca en relación con los otros 3 tratamientos en condiciones de adecuado suministro de N a las raíces (control, MeJa, y urea+MeJa) (**Figura 4.15**).

Peñuelas et al. (1993) obtuvieron resultados similares a los nuestros ya que en su trabajo mostraron que las plantas de pimienta estresadas con una concentración baja de N crecían menos y tenían menos biomasa que las plantas con alta concentración de N.



Figura 4.14. Diferencia en el crecimiento de las plantas al aplicar diferentes concentraciones de nitrógeno.

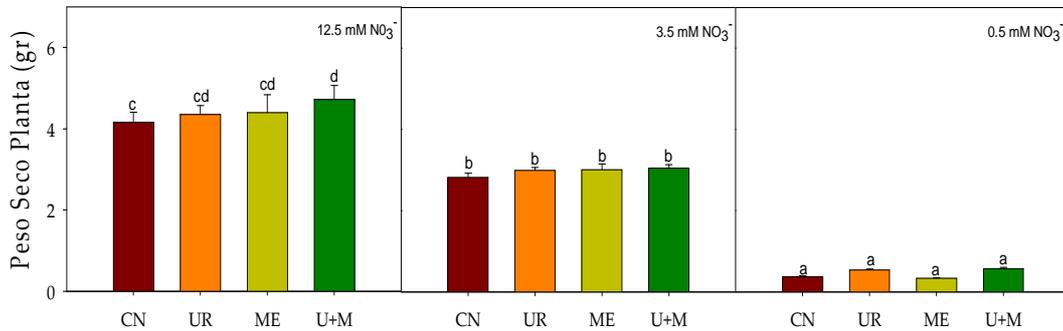


Figura 4.15. Efecto de las diferentes concentraciones de N (12.5; 3.5 y 0.5 mM NO₃⁻) sobre el peso seco de las plantas de pimiento.

4.4.3.2. Intercambio gaseoso y contenido de clorofilas

La asimilación de CO₂ en la hoja, disminuye en plantas control conforme desciende la concentración de N. Por ese motivo el riego es muy significativo, ya que al aplicar una concentración baja de N (0.5mM NO₃⁻), los valores de la fotosíntesis fueron más pequeños que los de las plantas regadas con 12.5 mM NO₃⁻. También, las plantas a las que se les aplicó MeJa, presentaron valores más altos de fotosíntesis que las plantas control en las 3 soluciones nutritivas (**Figura 4.16**).

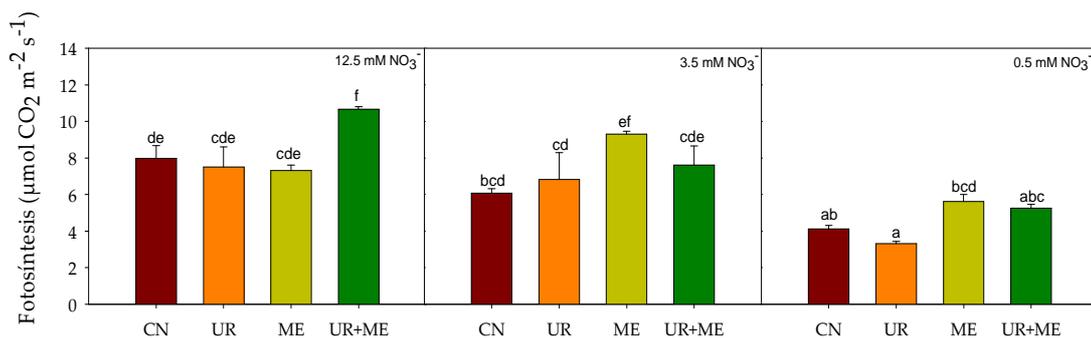


Figura 4.16. Efecto de las diferentes concentraciones de N (12.5; 3.5 y 0.5 mM NO₃⁻) sobre la fotosíntesis de las plantas de pimiento.

Ougham et al. (2008) observaron que los cambios en los contenidos de los pigmentos fotosintéticos también indican el progreso de la senescencia de la hoja. Agüera et al. (2010) coinciden con nuestros resultados puesto que estudiaron que la pérdida de la actividad fotosintética en plantas de girasol, fue más grande en hojas de plantas cultivadas con menos nitrógeno que en plantas cultivadas con mayor cantidad, sugiriendo que la deficiencia de N acelera la senescencia de la hoja. Además, del Amor (2006 (a)) mostró que la deficiencia de N, disminuye el crecimiento de la planta, la producción de biomasa, la fotosíntesis y las concentraciones de pigmentos cloroplásticos en pimiento dulce.

La pérdida de clorofila asociada con la degeneración de los cloroplastos, es un biomarcador usado frecuentemente para indicar el comienzo de la senescencia, por lo que la degradación de la clorofila es una señal de senescencia temprana (Buchanan- Wollaston et al., 2003). En nuestro estudio, el contenido de clorofila fue mayor en plantas cultivadas con 12.5mM NO_3^- en comparación con plantas cultivadas con deficiencia de N (0.5mM NO_3^-) (**Tabla 4.4**). La urea foliar presenta diferencias notables en la clorofila *a* y *a+b* para 0.5mM NO_3^- , aumentando así los valores respecto a las plantas control para este tratamiento de riego. Nuestros resultados coinciden con los de Peñuelas et al. (1993), quienes observaron que el contenido de clorofila en plantas de pimiento con baja concentración de N, fue menor que en plantas cultivadas con alta concentración de N. Es probable que un aumento en el contenido de clorofila, en relación con la tasa de asimilación de CO_2 , cause daño fotooxidativo debido al desequilibrio entre el ascenso y la dispersión de energía, el cual podría inducir estrés oxidativo promoviendo la fotorreducción de O_2 a radical anión superóxido.

4.4.3.3. Concentración de NO_3^-

La concentración de NO_3^- en hoja disminuyó en las plantas de pimiento según descendía la concentración de N en la solución nutritiva (**Figura 4.17**). Cuando se aplicó urea a las plantas regadas con 12.5mM NO_3^- , los valores de los nitratos fueron menores que los de las plantas control, mientras que para los riegos deficientes en N (3.5 y 0.5 mM NO_3^-) los valores de NO_3^- fueron más altos o similares a los valores control. Además, las plantas tratadas con MeJa presentaron valores similares a las plantas control para todos los tratamientos de riego.

Aumentando el aporte de N, se estimula el crecimiento de la planta y la productividad, así como la capacidad fotosintética de las hojas a través del aumento de las cantidades de proteínas (Pankovic et al., 2000). El contenido de N en las hojas está muy influenciado por el tratamiento de fertilización.

Rossato et al. (2002) observaron en *Brassica napus* L. que después de 8 días de aplicar MeJa, los nitratos descendieron en comparación con plantas control, y nuestros datos coinciden también con los resultados de Estiarte et al. (1994) en los que demostraron que en plantas de pimiento, las regadas con una solución nutritiva alta en N, tenían valores más elevados de N en hoja, y una tasa C:N más baja que las cultivadas con poco N.

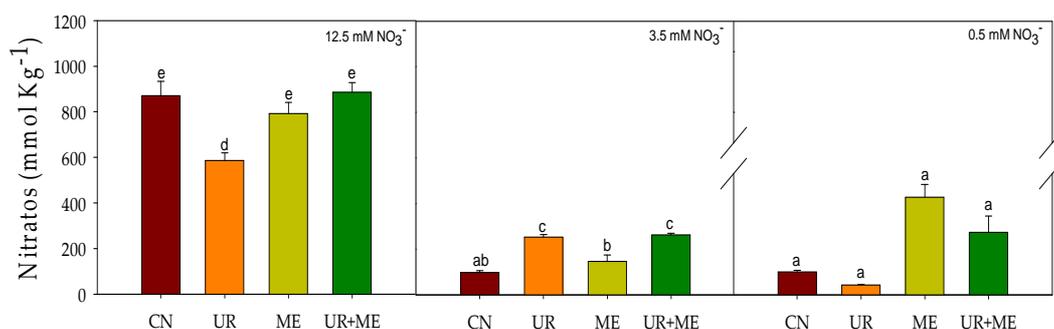


Figura 4.17. Efecto de las diferentes concentraciones de N (12.5; 3.5 y 0.5 mM NO₃⁻) sobre la cantidad de nitratos en las plantas de pimiento.

4.4.3.4. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica aumentó en las plantas de pimiento cuando la solución nutritiva era deficiente en N (**Tabla 4.4**), siendo notable el efecto de la urea foliar y del MeJa, y los niveles de peroxidación aumentaron en todos los tratamientos. A 12.5mM NO₃⁻ y 3.5 mM NO₃⁻ no se vio un aumento significativo cuando se aplicó urea con respecto a las plantas control, mientras que a 0.5 mM NO₃⁻, se observó un incremento en plantas tratadas con urea foliar, con respecto a las plantas control. El efecto del MeJa fue significativo para todas las irrigaciones, debido a que las plantas presentaron valores de peroxidación lipídica más altos que las plantas control.

Balestrasse et al. (2006) estudiaron que la formación de TBARS en plantas expuestas a condiciones ambientales adversas, es un indicador fiable de la generación de radicales libres en los tejidos. La peroxidación lipídica se muestra como una de las principales causas de deterioro de la membrana durante la senescencia y está asociada con muchos desórdenes en la membrana de las plantas (Wismer et al., 1998).

En un estudio anterior, demostramos que la peroxidación lipídica aumenta en plantas deficientes en N (del Amor et al., 2009), y a esas concentraciones bajas de N (3.5 mM NO_3^-), las plantas tratadas con urea presentaron valores más bajos que las plantas control. Tewari et al. (2007) sugirieron que la peroxidación lipídica aumentaba en hojas de plantas deficientes en N, y que la relación entre la deficiencia de macronutrientes y el estrés oxidativo era obvia. Chou y Kao (1992) publicaron que los jasmonatos se conocen por ser potentes promotores de la senescencia de la hoja, y consideraron la peroxidación lipídica como un mecanismo importante en la senescencia. Hung y Kao (1998) observaron que el nivel de MDA en hojas de arroz tratadas con MeJa, era mayor que en hojas control tratadas con agua y este hecho mostró que el MeJa promueve la senescencia de las hojas del arroz y está relacionado con la peroxidación lipídica.

Tabla 4.4. Efecto de las diferentes concentraciones de N (12.5; 3.5 y 0.5 mM NO₃⁻) sobre la peroxidación lipídica, SPAD, y contenido de clorofilas en las plantas de pimienta.

TRATAMIENTOS		Peroxidación Lipídica (μmol g ⁻¹ FW)	SPAD	Clorofila a (Chl _a) (mg L ⁻¹ FW)	Clorofila b (Chl _b) (mg L ⁻¹ FW)	Clorofila a+b (Chl _{a+b}) (mg L ⁻¹ FW)
12.5N	Control	1.42a	45.18c	27.88c	13.06b	42.23c
	Urea	1.41a	46.84cd	28.27c	14.89bcd	43.10cd
	MeJa	1.53ab	45.86c	27.77c	14.32bc	42.09c
	Urea+MeJa	1.69abc	48.20cde	28.24c	16.22cde	44.47cd
3.5N	Control	1.83abc	49.24de	27.92c	20.96f	48.87e
	Urea	1.61abc	46.24cd	28.02c	15.79bcde	43.80cd
	MeJa	1.78abc	47.80cd	28.27c	17.30de	45.50cde
	Urea+MeJa	2.31c	51.08e	28.24c	18.09d	46.33de
0.5N	Control	1.56ab	35.50a	23.86a	7.96a	31.81a
	Urea	2.26bc	36.82a	26.05b	9.74a	35.79b
	MeJa	2.20bc	35.68a	23.48a	7.21a	30.88a
	Urea+MeJa	2.15abc	40.76b	25.83b	9.39a	35.22b
ANOVA						
Riego		**	***	***	***	***
Urea		*	**	***	*	*
MeJa		*	*	NS	NS	NS
Urea + MeJa		NS	**	NS	*	*
Riego X Urea		NS	*	***	**	***
Riego X MeJa		NS	NS	NS	*	NS
Riego X Urea X MeJa		*	*	NS	*	*

4.4.3.5. Aminoácidos

Los aminoácidos son importantes para la nutrición humana y afectan a la calidad de los alimentos, incluyendo el aroma, el color y el gusto. Además, los aminoácidos libres se identificaron como los precursores de varias clases de metabolitos secundarios en plantas, concretamente flavonoides y glucosinolatos (Oliveira et al., 2008). Durante la degradación de la proteína, los aminoácidos libres se liberan y probablemente se interconvierten, hidrolizan, catabolizan o exportan sin modificaciones a otro lugar en la planta (Diaz et al., 2005). La principal fuente de proteína de los tejidos de la planta es la urea como fuente de N, y los aminoácidos y los requerimientos de N en cantidades esenciales se

conocen como una medida para aumentar el crecimiento y el rendimiento de todos los cultivos (Abd El-Aal et al., 2010). Además, el nitrógeno y los aminoácidos son los ingredientes fundamentales en el proceso de síntesis de proteínas y la importancia del N o de los aminoácidos viene dada por su amplio uso en la biosíntesis de una gran variedad de materiales nitrogenados, no proteicos, como por ejemplo pigmentos, vitaminas, coenzimas, bases púricas y pirimidínicas (Kamar y Omar, 1987).

En este trabajo el ácido aspártico (Asp) fue el principal aminoácido libre en las hojas de plantas de pimiento, y otros como glicina (Gly), alanina (Ala), prolina (Pro), lisina (Lys), tirosina (Tyr), valina (Val), isoleucina (Ile), leucina (Leu) y fenilalanina (Phe), presentaron valores moderados (**Tabla 4.5 (a) y (b)**). Por otra parte, histidina (His), serina (Ser), arginina (Arg), ácido glutámico (Glu), treonina (Thr) y cisteína (Cys), fueron los aminoácidos con menor presencia en las plantas de pimiento. El tratamiento de riego fue muy significativo en la mayoría de los aminoácidos debido a que conforme disminuye la concentración de N en la solución nutritiva en plantas control, los valores de aminoácidos también descienden. Sólo los valores de serina (Ser), alanina (Ala), cisteína (Cys) y tirosina (Tyr), aumentaron en plantas control cuando la concentración de N disminuyó.

La urea y el metil jasmonato, tuvieron un efecto destacado en plantas tratadas con ellos puesto que, los valores de los aminoácidos disminuyeron en estos dos tratamientos según disminuía la concentración de N en las soluciones nutritivas, y afectaron sobretodo a arginina (Arg), glicina (Gly), ácido aspártico (Asp), alanina (Ala), prolina (Pro), cisteína (Cys), lisina (Lys), isoleucina (Ile) y fenilalanina (Phe).

Diversos estudios han demostrado que la aplicación foliar nitrogenada provocó un aumento en el crecimiento de la planta, en el rendimiento de los frutos y de sus componentes en pepino, ajo, patata, y pimiento dulce (Karuppaiah et al., 2000; Awad et al., 2007) bajo deficiencia de N. También otros estudios han puesto de manifiesto que el tratamiento foliar con urea como fuente de N para muchas hortalizas, es de gran influencia en el crecimiento de la planta, en el rendimiento de los frutos, así como las calidades físicas y químicas en pimiento dulce, pepino y pera (Shaheen et al., 2006).

Como ha corroborado nuestro estudio, el MeJa ha interferido en algunos aminoácidos y en sus propiedades, Velitchkova y Fedina (1998) indicaron que el

MeJa aumenta la acumulación de prolina que puede regular el balance osmótico de la célula y puede actuar como modulador del estrés, cambiando la respuesta del estrés de las plantas de una manera completa.

Tabla 4.5 (a). Efecto de la urea foliar (UR), metil jasmonato (Me) y ambos (U+M) en la concentración de aminoácidos en hojas de plantas de pimiento dulce a diferentes concentraciones de N (12.5, 3.5 y 0.5). Los valores con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango de Duncan).

		Aminoácidos (µM/L)									
Tratamiento	His	Ser	Arg	Gly	Asp	Glu	Thr	Ala	Pro		
12.5N	CN	1.04a	0.33abc	5.38d	47.82ab	112.06cd	0.59ab	0.15ab	37.40ab	18.60ab	
	UR	2.73bc	0.16ab	8.96e	118.33d	142.20de	0.44a	0.16ab	94.48c	27.34bc	
	ME	2.67bc	0.23ab	4.41cd	82.26bcd	229.71fg	0.94bcd	0.17ab	90.77c	37.53cd	
	U+M	2.77bc	0.30ab	5.01cd	181.87e	265.80g	1.26de	0.25ab	90.98c	38.46cd	
3.5N	CN	1.70abc	0.17ab	1.40ab	44.22ab	114.18cd	0.38a	0.11a	28.53a	28.55bc	
	UR	2.69bc	0.10a	3.35abcd	92.04cd	91.41bc	1.41e	0.12a	86.64c	42.21d	
	ME	2.84c	0.18ab	3.79bcd	75.30bc	166.23d	1.14cde	0.19ab	83.86c	34.99cd	
	U+M	2.96c	0.51bcd	4.39cd	116.33d	217.72f	2.23f	0.29b	92.16c	39.74cd	
0.5N	CN	2.23abc	0.67d	0.93a	21.43a	28.34a	0.46a	0.19ab	45.29ab	11.73a	
	UR	2.18abc	0.29ab	2.46abc	42.85ab	55.17ab	0.94bcd	0.21ab	56.69abc	28.31bc	
	ME	1.45ab	0.65cd	1.35ab	32.80a	38.94a	0.99bcde	0.24ab	65.29abc	28.00bc	
	U+M	2.13abc	0.39abcd	2.64abc	44.47ab	84.66bc	0.80abc	0.25ab	69.14bc	30.07bcd	
ANOVA											
Riego	*	***	***	***	***	***	***	*	*	***	***
Urea	*	*	***	***	**	***	***	*	***	***	***
MeJa	*	*	NS	***	***	***	**	**	***	***	***
UR+MeJa	*	*	*	NS	*	NS	NS	NS	**	*	*
Riego X Urea	NS	*	NS	**	NS	***	***	NS	*	NS	NS
Riego X MeJa	*	*	**	*	***	*	*	*	NS	*	*
Riego X Urea X MeJa	*	NS	NS	NS	*	*	*	NS	*	NS	NS

Tabla 4.5 (b). Efecto de la urea foliar (UR), metil jasmonato (Me) y ambos (U+M) en la concentración de aminoácidos en hojas de plantas de pimiento dulce a diferentes concentraciones de N (12.5, 3.5 y 0.5). Los valores con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes a $P < 0.05$ (Test de múltiple rango de Duncan).

		Aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$)								
Tratamiento	Cys	Lys	Tyr	Met	Val	Ile	Leu	Phe		
12.5N	CN	1.61a	17.85bc	6.57ab	4.24ab	14.65a	9.92ab	14.30abc	14.88ab	
	UR	2.26a	17.68bc	7.28ab	5.26ab	15.96ab	8.91ab	12.68ab	13.25ab	
	ME	4.23abc	18.35bc	11.24abc	7.81b	30.89c	18.23d	26.85c	26.19d	
	U+M	2.12a	30.19e	10.75abc	6.01ab	22.34b	14.39c	22.27bc	18.36bc	
3.5N	CN	1.95a	22.01cd	5.18a	4.35ab	14.22a	9.78ab	149.42bc	13.87ab	
	UR	3.12ab	15.18ab	5.36a	7.43ab	14.46a	9.36ab	27.19c	12.91ab	
	ME	3.99ab	14.61ab	5.04a	6.87ab	16.87ab	8.50ab	21.55bc	13.66ab	
	U+M	3.34ab	23.65d	8.48abc	7.18ab	23.17b	11.99bc	26.58c	21.28cd	
0.5N	CN	8.06c	11.43ab	15.68c	3.23a	13.11a	7.23a	6.65a	10.21a	
	UR	7.91c	13.71ab	12.88bc	13.41c	18.09ab	9.18ab	20.66bc	12.42ab	
	ME	6.48bc	10.47a	9.74abc	12.64c	16.63ab	7.22a	22.34bc	10.51a	
	U+M	7.07bc	17.80bc	10.26abc	8.57b	18.17ab	8.72ab	23.94bc	13.43ab	
ANOVA										
Riego	***	***	***	***	*	***	*	*	***	***
Urea	NS	***	NS	*	*	NS	*	*	NS	NS
MeJa	NS	**	NS	*	***	**	**	**	***	***
UR+MeJa	*	***	*	***	*	NS	*	*	NS	NS
Riego X Urea	NS	*	NS	*	*	*	*	*	**	**
Riego X MeJa	*	*	*	NS	*	***	*	*	*	*
Riego X Urea X MeJa	NS	*	NS	**	*	*	*	NS	*	*

4.5. EFECTO DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE ANTITRANSPIRANTE EN LA FOTOSÍNTESIS Y LAS RELACIONES HÍDRICAS EN PLANTAS DE PIMIENTO BAJO DIFERENTES NIVELES DE CO₂ Y ESTRÉS HÍDRICO

4.5.1. Introducción

La concentración atmosférica de CO₂ ([CO₂]) está aumentando y, por sus efectos directos en el crecimiento de la planta, se prevé que este cambio aumente la media de la temperatura global, teniendo como consecuencia, un aumento en la severidad de las condiciones de sequía en el verano (Gregory et al., 2003). En el sureste de Europa se esperan efectos adversos y los aumentos pronosticados en la escasez de agua, reducirán los rendimientos y la superficie de los cultivos, lo que afectará directamente a la subsistencia de los agricultores mediterráneos (Metzger et al., 2006). Hay una variación considerable en la dirección y magnitud de las respuestas del crecimiento a una elevada [CO₂], en parte dependiendo de la duración de la exposición, del desarrollo de la planta, de las especies y de la disponibilidad de los recursos primarios (Poorter et al., 1996).

Los experimentos sobre el efecto de la interacción del enriquecimiento en CO₂ y el aporte hídrico en el crecimiento y rendimiento de cultivos C3, generalmente indicaron una respuesta de CO₂ relativamente más alta cuando se limita el agua (Kang et al., 2002). Además, el calentamiento global induce reducciones en la disponibilidad del agua del suelo que puede atenuar los efectos de una elevada [CO₂] (Niklaus y Körner, 2004).

Además del efecto de la [CO₂] sobre el comportamiento de los estomas, la aplicación foliar de antitranspirantes es una técnica prometedora en la regulación de la transpiración, para mantener un estado hídrico favorable en la planta (Goreta et al., 2007). La formación de una fina película puede también minimizar la pérdida de agua de la planta por la disminución de la conductancia estomática, reduciendo así las pérdidas de la transpiración, mejorando el estado hídrico y reduciendo la senescencia (Gu et al., 1998). Sin embargo, la magnitud de la respuesta al intercambio gaseoso limitado, es muy dependiente de las especies y del cultivo (Russo y Díaz-Pérez, 2005). También, muchos trabajos indican que las características de permeabilidad de los polímeros que se forman con el film inhiben la difusión de CO₂ más que aquellos con H₂O (Brown y Rosenberg, 1973).

Por otra parte, si la fotosíntesis se inhibe más que la transpiración, se obtiene un importante descenso en el rendimiento de la planta. Así, varios estudios han demostrado el efecto beneficioso de los antitranspirantes, especialmente en cultivos hortícolas. En patatas, bajo condiciones controladas de estrés, el uso del antitranspirante aumenta el rendimiento del tubérculo (Byari y O'keefe, 1982). En cebollas, se obtuvo un aumento del rendimiento y fue atribuido a un descenso de la humedad entre las aplicaciones hídricas (Lipe et al., 1982). En tomate, mejoró la calidad del fruto (Phelps y Morelock, 1987), y en pimiento dulce, se redujo la fisiopatía de blossom-end rot (del Amor y Rubio, 2009). En árboles frutales, se observó un descenso importante en el consumo de agua (Steinberg et al., 1990).

El objetivo de este estudio es determinar si aumentando la $[CO_2]$ se podrá disminuir o contrarrestar el aumento de la resistencia estomática de la hoja, debido a la aplicación del antitranspirante, es decir, mantener o incrementar las tasas de asimilación de CO_2 mientras se reduce la pérdida de H_2O . Para ello en este trabajo: (i) se determinó si una elevada $[CO_2]$ podría paliar los efectos adversos de la sequía y la asimilación fotosintética de carbono en plantas de pimiento, (ii) se examinó la respuesta cuando se aplicó antitranspirante y se determinó su efecto a diferentes $[CO_2]$, (iii) se evaluó si la conservación del agua bajo elevadas $[CO_2]$ está mediada por el ajuste osmótico o por el descenso de la conductancia estomática, (iv) se estudió la respuesta de la respiración radicular al estado hídrico de la planta bajo sequía a diferentes $[CO_2]$ ambientales y, por último, (v) se investigó el impacto de la síntesis de almidón en la aclimatación fotosintética a elevadas $[CO_2]$ y su papel en las diferentes intensidades de sequía en plantas de pimiento dulce.

4.5.2. Material Y Métodos

4.5.2.1. *Diseño experimental y condiciones de crecimiento*

Las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cv Herminio se plantaron en macetas con fibra de coco como sustrato. Las plantas se regaron con una solución Hoagland modificada con la siguiente composición en meq L^{-1} : NO_3^- , 12.0; $H_2PO_4^-$, 1.0; SO_4^{2-} , 7.0; K^+ , 7.0; Ca^{2+} , 9.0; Mg^{2+} , 4.0. Cada maceta se regó con 3L de agua desionizada antes del transplante. El riego durante el experimento se llevó a cabo mediante goteros autocompensantes y se aplicó la solución nutritiva nueva para

evitar la acumulación de sales, con un mínimo de drenaje del 35%. Las plantas crecieron en una cámara climática con condiciones ambientales controladas: 70% HR, 16/8 h día/noche, 26/18°C, y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por la combinación de lámparas fluorescentes (Philips TL-D Master réflex 830 y 840) y de sodio (Philips Son-T Agro). El control del CO_2 en la cámara se lleva a cabo mediante una inyección externa de aire comprimido (botella [CO_2] $\geq 99.9\%$), controlado por el sistema Dräger Politron IR CO_2 . Los tratamientos consistían en la aplicación de dos niveles de estrés hídrico (moderado: 4 días sin riego o severo: 8 días sin riego), combinados con la aplicación o la no aplicación de antitranspirante (AT) (pinolene como preparado comercial "Vapor Gard" = 96% pinolene en 4% de ingredientes inertes). El AT se aplicó sobre la totalidad de las hojas al 2.5% (v/v) una vez que empezaron los tratamientos (38 días después del trasplante). La dosis que utilizamos concuerda con las recomendaciones del fabricante. El experimento se realizó a [CO_2] de 380 y 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

4.5.2.2. Determinaciones

Los métodos para determinar los diferentes análisis realizados en este trabajo están detallados en Materiales y Métodos (Capítulo III).

Antes de finalizar el experimento y cortar las plantas para las posteriores determinaciones se midieron los siguientes parámetros:

- Fotosíntesis y Respiración de suelos, mediante el analizador portátil CIRAS-2 (PP System, Amesbury, MA, USA).
- Fluorescencia de las clorofilas.
- Potencial hídrico y osmótico (Ψ_w , Ψ_π).
- Contenido relativo de agua (RWC).

Una vez determinados los parámetros anteriores, las plantas se cortaron y se hicieron medidas sobre materia liofilizada donde se analizó:

- Almidón, aminoácidos, prolina y azúcares solubles, siguiendo el método de Walker et al. (2008).

Los datos se analizaron primero para la homogeneidad de la varianza y la normalidad de la distribución con el programa SPSS (versión 13.0) mediante un test de múltiple rango de Duncan para determinar las diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Se utilizaron 8 combinaciones de tratamientos distribuidos en 3 niveles hídricos (control, y sin riego durante 4 ó 8 días), dos tratamientos foliares (con o sin aplicación de AT), y dos $[CO_2]$, con 6 plantas por combinación.

4.5.3. Resultados Y Discusión

4.5.3.1. Fotosíntesis

Cuando las plantas regadas crecieron en una alta $[CO_2]$ ($2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$), la asimilación de CO_2 en los tejidos (A_{CO_2}) se incrementó un 77% en comparación con la $[CO_2]$ estándar ($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (**Tabla 4.6**). Después de 4 días sin agua, A_{CO_2} se redujo significativamente a $[CO_2]$ alta y estándar; sin embargo, las reducciones para las plantas con aplicación de AT en alta $[CO_2]$ fueron significativamente menores que para aquellas plantas sin AT. El AT no tuvo un efecto en las plantas estresadas después de 8 días de sequía a $[CO_2]$ alta y estándar, pero se encontró una reducción en A_{CO_2} para las plantas control (bien regadas) cultivadas en $[CO_2]$ estándar cuando se aplicó AT. No se observó esta reducción en A_{CO_2} cuando se aplicó AT cuando la $[CO_2]$ aumentó a $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Así, se observó una respuesta diferencial para AT según la $[CO_2]$, pero también según la intensidad de la sequía. Las plantas control redujeron notoriamente la conductancia estomática (g_s) cuando la $[CO_2]$ aumentó, pero la sequía moderada o severa redujo este parámetro en grado similar (**Tabla 4.6**). La g_s se redujo (22.3%) después de 4 días de aplicación de AT bajo una $[CO_2]$ estándar y sin sequía (**Tabla 4.6**). Se observó una conducta similar para la transpiración de la hoja. La **Figura 4.18** muestra la respuesta diferente de la fotosíntesis y la conductancia estomática a la aplicación de AT a los dos niveles de $[CO_2]$. En una $[CO_2]$ estándar, el AT limita la fotosíntesis, pero con una $[CO_2]$ alta se observa un patrón diferente y el AT tan sólo tiene un efecto menor en lo que se refiere a la limitación de A_{CO_2} .

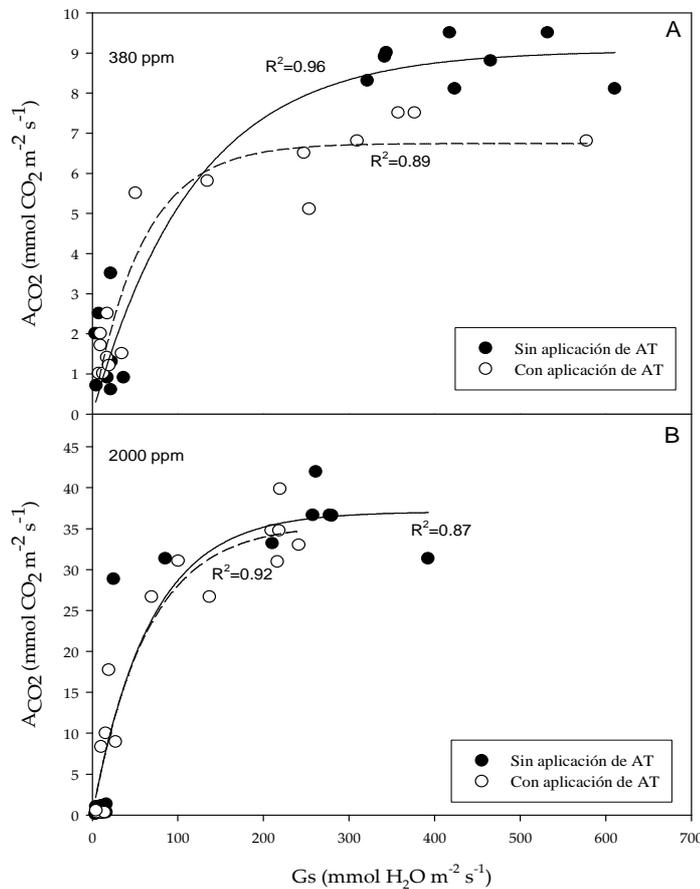


Figura 4.18. Relación entre la conductancia estomática (G_s) y la tasa de fotosíntesis neta (A_{CO_2}) de hojas después de la aplicación de AT a 380 ppm (A) ó 2000 ppm CO_2 (B).

4.5.3.2. Fluorescencia de hojas

Ni la $[CO_2]$, ni la sequía, ni el AT mostraron ningún efecto en la fluorescencia de clorofilas bajo un estrés moderado de sequía (Tabla 4.6). Sin embargo, después de una sequía severa (8 días sin agua) a una $[CO_2]$ estándar, la fluorescencia de clorofilas se redujo un 8.9%, pero no se encontró ningún efecto en una alta $[CO_2]$.

4.5.3.3. Respiración de suelo

La elevada $[\text{CO}_2]$ aumentó la respiración de la raíz y los efectos de la sequía fueron significativamente modulados por el nivel de $[\text{CO}_2]$ (**Figura 4.19**). Así, la respiración de suelo, se redujo drásticamente después de la sequía severa bajo una $[\text{CO}_2]$ estándar y el descenso observado (65%) fue similar para las plantas tratadas con y sin AT. Además, la alta $[\text{CO}_2]$ aumentó la respiración del suelo un 54.7%, pero no se observó ningún efecto del AT cuando las plantas fueron completamente regadas. Por otra parte, se encontró una gran diferencia cuando se aplicó AT en una alta $[\text{CO}_2]$, y las raíces de esas plantas mostraron una respiración de $16 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, más alta que las plantas no tratadas, bajo las mismas condiciones de estrés, pero también más altas que las plantas control a $[\text{CO}_2]$ estándar ($11 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

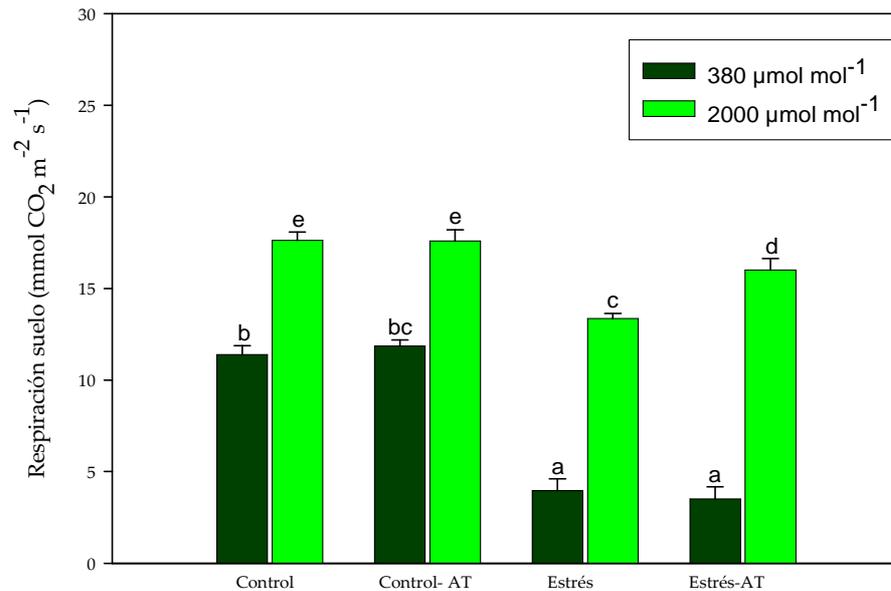


Figura 4.19. Efecto de la aplicación de antitranspirante en la respiración de suelo para plantas de pimiento dulce a dos concentraciones de CO_2 (380 ó $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$) después de 8 días sin riego.

4.5.3.4. Relaciones hídricas

La elevada $[\text{CO}_2]$ no afectó al Ψ_w , al Ψ_π , o al RWC en las hojas de plantas no estresadas (**Tabla 4.7**). Sin embargo, tanto la alta $[\text{CO}_2]$ como el AT afectaron drásticamente estos parámetros cuando se detuvo el riego. Tras 4 días sin regar, el Ψ_w había disminuido ya en 0.46 MPa con una $[\text{CO}_2]$ estándar, pero sólo en 0.23 MPa cuando aumentó la $[\text{CO}_2]$. La respuesta al AT también se vio afectada por la $[\text{CO}_2]$, aumentando el Ψ_w en 0.16 MPa con una $[\text{CO}_2]$ estándar y en 0.15 MPa con una $[\text{CO}_2]$ alta. Este efecto fue más fuerte después de 8 días de estrés, cuando el AT aumentó el Ψ_w en 0.6 MPa y en 0.45 MPa en $[\text{CO}_2]$ estándar y alta respectivamente, en comparación con el control (no estresado) a $380 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$. El Ψ_π y el RWC se vieron afectados en menor grado en comparación con el Ψ_w después de un estrés moderado, pero un estrés severo (8 días) redujo notablemente ambos parámetros. Así, el Ψ_π se redujo en 1.26 MPa a $[\text{CO}_2]$ estándar y en 0.65 a $[\text{CO}_2]$ alta; sin embargo, no se aprecia un efecto del AT después de 8 días de sequía. El RWC se redujo desde que se dejó de regar durante 8 días de un 91.5% a un 48.2% a $380 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ y a un 59.7% a $380 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$, pero no se observó ningún efecto del AT. Es más, se vio un ligero descenso en RWC al cuarto día del estrés hídrico en una $[\text{CO}_2]$ estándar, y al octavo día, el descenso fue mayor en una $[\text{CO}_2]$ estándar que en una $[\text{CO}_2]$ elevada. Para plantas control (regadas), el Ψ_w y el Ψ_π no cambiaron durante el ensayo y la turgencia ($\Psi_w - \Psi_\pi$) siempre fue +0.33 MPa como mínimo. A una $[\text{CO}_2]$ elevada, el descenso en el Ψ_π no fue obvio, mientras que la aplicación de AT redujo el descenso tanto en el Ψ_w como en el Ψ_π , especialmente el del Ψ_w de modo que la turgencia fue 0.36 MPa más positivo en ambos regímenes de $[\text{CO}_2]$ después de ocho días sin regar. Las únicas plantas que mantuvieron valores de turgencia positivos tras 8 días de sequía, fueron aquellas cultivadas a $380 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$, particularmente en el caso de aquellas tratadas con AT, para las cuales el ajuste osmótico (OA), en relación a sus controles de agua, también fue mayor (-0.308, comparado con el -0.251 MPa para las plantas no tratadas a $380 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$, -0.126 para las plantas tratadas con AT y -0.038 MPa para las plantas no tratadas a $2000 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$). Cuatro días después del inicio de la sequía no había prácticamente OA.

4.5.3.5. Almidón, aminoácidos, prolina y azúcares solubles

La concentración de almidón, aumentó en plantas bien regadas cultivadas con una [CO₂] alta, en comparación con aquellas cultivadas con una [CO₂] estándar (**Tabla 4.8**). Sin embargo, el AT disminuyó significativamente la concentración de almidón en hojas, especialmente en plantas no estresadas y durante los primeros días de la aplicación de AT. Al aumentar la sequía, las plantas cultivadas con una [CO₂] estándar evidenciaron una reducida concentración de almidón, pero el AT no afectó este parámetro. Al comparar las plantas control y las plantas estresadas por la sequía, la concentración de azúcares solubles aumentó más o menos paralelamente al descenso en la concentración de almidón. En general, la concentración total de aminoácidos no se vio afectada ni por el AT ni por la [CO₂] con una sequía moderada, pero después de 8 días de sequía, se observó un claro aumento en relación a las plantas no estresadas, tanto para una [CO₂] estándar como para una [CO₂] elevada. Todos los azúcares solubles tuvieron una respuesta significativa tras la aplicación de AT, pero sólo cuando se aplicó un estrés moderado a la [CO₂] estándar. En una [CO₂] elevada, no se encontró ningún efecto de la sequía o del AT a este nivel de estrés, pero con el aumento de la sequía los azúcares solubles de la hoja, también aumentaron. Para los aminoácidos, el estrés hídrico favoreció un aumento que se observó a los 4 días en la [CO₂] estándar (\pm AT), pero no hasta el octavo día en la [CO₂] elevada (igual que los azúcares). Contrariamente a lo que ocurre con los azúcares, tratar las plantas con AT aumenta la acumulación de aminoácidos bajo estrés hídrico. Sin embargo, la reducción de la concentración de prolina en todos los aminoácidos muestra que, en una [CO₂] estándar, el aumento extremo en la acumulación de prolina ocurre en gran medida a costa de otros aminoácidos. En 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ [CO₂], la elevada concentración de prolina no afecta los niveles totales de otros aminoácidos.

El efecto de la [CO₂] que contrarresta la respuesta foliar a la sequía, se precibió en la concentración de prolina. Por lo tanto, con un estrés moderado y una [CO₂] estándar, la prolina aumentó notablemente en un 41.2%, pero no se obtuvo ninguna respuesta con una [CO₂] elevada. Sin embargo, una sequía severa aumentó la prolina de 2.4 a 120.6 mmol kg⁻¹DM y de 1.4 a 60.7 mmol kg⁻¹ DM en una [CO₂] estándar y elevada respectivamente. Es más, sólo en una [CO₂] estándar la aplicación de AT aumentó la prolina bajo sequía severa.

Como discusión de este trabajo se puede decir que nuestros datos muestran el aumento en A_{CO_2} debido a la elevada $[CO_2]$, pero cuando se inició la sequía, tanto la $[CO_2]$ como el AT modificaron esta respuesta. No obstante, el AT sólo fue efectivo al mejorar el estrés por la sequía en una $[CO_2]$ alta, y bajo un suave estrés por sequía; bajo una sequía prolongada (8 días) no se podía mantener A_{CO_2} . Aunque la elevada $[CO_2]$ causó el cierre parcial de los estomas, también permitió a las plantas compensar esto y la resistencia adicional generada por la película de AT. Morison (1993) observó que elevadas $[CO_2]$ disminuyen la conductancia estomática en un 30-60% de media, lo cual reduce sucesivamente la pérdida de agua en la planta. Como consecuencia, el CO_2 puede paliar el estrés hídrico de la planta reduciendo el uso del agua. Sin embargo, las plantas cuyo crecimiento está estimulado por altas $[CO_2]$, a menudo tienen un incremento del área de la hoja y así aumenta la transpiración de la planta, moderando de ese modo su interacción (Poorter y Pérez-Soba, 2001). Como consecuencia, la humedad del suelo se podría preservar durante más tiempo, posponiendo el comienzo de la sequía. Para mantener la tasa fotosintética después de 4 días sin riego, no sólo fue necesario aumentar la $[CO_2]$, sino que también hubo que aplicar AT. De este modo, 8 días de sequía fueron excesivos y la fotosíntesis fue insignificante.

Goreta et al. (2007) observaron que el AT no influye en el intercambio gaseoso de la hoja, o en las relaciones hídricas de plántulas de pimiento expuestas al déficit hídrico. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, Plaut et al. (2004) vieron que la aplicación de la película acrílica disminuye g_s y A_{CO_2} en plantas de pimiento cultivadas en invernadero. Además, Nitzsche et al. (1991) encontraron que una formulación diferente de AT, permite aumentar el Ψ_w en plántulas trasplantadas en diversos días. Berkowitz y Rabin (1988) observaron que aplicar brevemente AT aumenta la resistencia de la hoja, y el Ψ_w inmediatamente después de trasplantar, permite aumentar visiblemente el estatus hídrico de la planta en semillas de pimiento. Las diferencias en las respuestas al AT bajo sequía entre estos estudios y el nuestro, podrían deberse a los efectos de las especies y de los cultivos, y a las diferencias en la edad y la hoja de la planta, las características físico-químicas del antitranspirante y a la intensidad del estrés.

La difusión de CO_2 en las hojas está restringida cuando el estoma se cierra para evitar la pérdida de agua por la transpiración (Chaves, 1991). Así, la capacidad para mantener la funcionalidad de la maquinaria fotosintética bajo

estrés hídrico es de mayor importancia para la tolerancia a la sequía. El ratio F_v/F_m , que caracteriza el punto de máximo rendimiento de las reacciones primarias fotoquímicas en las hojas adaptadas a la oscuridad, no se vio afectado después de 4 días sin riego. Esto indica la moderada resistencia a la sequía del fotosistema II (PSII). Chakir y Jensen (1999) proponen que el transporte fotosintético del electrón a través del PSII sea inhibido bajo estrés hídrico. En nuestro experimento, la menor inhibición ocurrió después de 8 días sin riego a concentración estándar, pero no en una alta $[CO_2]$. Kaiser (1987) atribuyó tales descensos a un efecto directo de la deshidratación en Rubisco, del aumento de la hidrólisis de Rubisco (Evans, 1989), y a la disminución en su capacidad catalítica. Estos resultados indican que la reducción de g_s es la limitación dominante a la fotosíntesis, durante la mayor parte del periodo de sequía-estrés. Esto está respaldado por el hecho de que el ritmo de transporte de electrones desciende mucho menos que A_{CO_2} , especialmente después de 8 días sin riego. Este resultado coincide con los de Delfine et al. (2002) para hojas de pimiento, donde la eficiencia fotoquímica resistió a la sequía impuesta. Bota et al. (2004) concluyeron que la discapacidad de la actividad de Rubisco y el contenido de RuBP no limitan la fotosíntesis hasta que la sequía es muy severa. Además, Tezara et al. (2002) indicaron que la actividad Rubisco disminuye sólo con valores bajos de g_s , y la respuesta está influenciada por las especies consideradas.

Se observó una reducción de A_{CO_2} en plantas control (regadas) en una alta $[CO_2]$. Un rasgo común en muchas plantas expuestas a un elevado CO_2 , es una aclimatación que se caracteriza por la acumulación de almidón y carbohidratos solubles y una reducción en la fotosíntesis. Esta reducción, puede deberse a la baja regulación de la transcripción de los genes relacionados con la fotosíntesis, a través de la detección y la señalización de azúcar (aumento de los niveles de hexosa; inhibición de la retroalimentación) y la disminución de la expresión de Rubisco y otras proteínas implicadas en la fotosíntesis, debido a la aceleración de la senescencia de la hoja (Jang y Sheen, 1997). Además, la tasa de fotosíntesis en una elevada $[CO_2]$ podría llegar a estar limitada por la velocidad a la cual el carbono recién fijado se convierte en almidón y sacarosa. Una elevada $[CO_2]$ lleva a un aumento en la tasa de fotosíntesis en pimiento dulce, y a mayores niveles de almidón en hoja, pero después de 8 días en una elevada $[CO_2]$, el almidón no disminuyó en estas plantas. De este modo, la aclimatación a altas

[CO₂] no se podría atribuir a la baja regulación de la fotosíntesis por una alta concentración de almidón, sino que más bien estaría relacionada con la ontogenia de la hoja. Kauder et al. (2000) observaron que el enriquecimiento en CO₂ también acelera la senescencia de la hoja causando así un cambio en el desarrollo, que estaría relacionado con la reducción de la fotosíntesis. El hecho de que la subida del nivel de CO₂ aumente la concentración de almidón, podría indicar que los azúcares solubles se convierten rápidamente en almidón. Ludewiga et al. (1998) estudiaron que los niveles elevados de CO₂ llevan a una tasa elevada de fotosíntesis en patatas jóvenes, lo que da como resultado niveles más altos de los carbohidratos de la hoja, especialmente de almidón. De acuerdo con Fitchner et al. (1995), es de preveer poco almidón foliar en entornos que limitan el CO₂, ya que la producción de los carbohidratos de almacenamiento sólo ocurre generalmente después de que se satisface la demanda de carbohidratos para el crecimiento (sacarosa).

La escasez de agua da como resultado una reducción sustancial en el crecimiento del cultivo y en el rendimiento (Foulkes et al., 2001). Sin embargo, las plantas pueden adaptarse a la deficiencia de agua acortando su ciclo de crecimiento, o tienen la capacidad de evitar el estrés de la sequía aumentando el crecimiento de la raíz, incrementando así sus absorciones de agua (Molnár et al., 2004). Nuestros datos muestran una drástica reducción de la respiración de la raíz después de una sequía severa bajo una [CO₂] estándar, pero no a una [CO₂] elevada, así que una respuesta efectiva de la actividad de la raíz a una sequía severa sólo es posible bajo una alta [CO₂] (atribuible a un mayor crecimiento), con la que también mejoró la aplicación foliar de AT.

El efecto del AT en el estado hídrico de la hoja depende claramente de la [CO₂]. Win et al. (1991) observaron que los tratamientos con AT aumentaron significativamente el Ψ_w en la hoja durante toda la sequía. Además, Polley et al. (1999) indicaron que los efectos de una elevada [CO₂] en OA son mínimos; por lo tanto, el mantenimiento del Ψ_w menos negativo en plantas cultivadas a elevada [CO₂], podría ser un resultado del control estomático. Nuestros datos muestran claramente que los niveles de prolina durante una sequía severa a elevadas [CO₂], fueron la mitad que los de aquellos bajo el mismo estrés y [CO₂] estándar, con lo que se pone de manifiesto, el papel de la resistencia estomática en la regulación del nivel del agua y la respuesta en la fotosíntesis.

Se ha planteado a menudo que numerosos procesos fisiológicos y de crecimiento sólo son óptimos si la turgencia del tejido está por encima de un determinado valor umbral. Sin embargo, el no emparejamiento de los estomas de la mayor parte del tejido (Henson et al., 1983), debido a la existencia de un gradiente de Ψ_w entre ellos, hace que esta relación (crecimiento y potencial hídrico) sea menos clara (Nonami y Boyer, 1990). En los glicofitos, para mantener la turgencia, el OA implica principalmente, la síntesis y la acumulación intracelular de osmolitos orgánicos como la prolina, otros aminoácidos, ácidos orgánicos, y azúcares solubles, a costa del crecimiento (Sánchez et al., 2004). En condiciones de estrés, la acumulación de la mayoría de los aminoácidos se da en la vacuola (Büßis y Heineke, 1998). La acumulación de carbohidratos solubles y el descenso en almidón bajo estrés hídrico, que ocurre paralelamente al descenso en el Ψ_w y el RWC en plantas de pimiento (Goicoechea et al., 2000), podría deberse a la degradación del almidón más que a la nueva síntesis de los azúcares solubles (Lee et al., 2008). La acumulación de azúcares también puede funcionar indirectamente en ROS (Cruz de Carvalho, 2008), y ayudar a mantener las estructuras de las membranas y de las macromoléculas (Lee et al., 2008).

En estudios previos con diferentes especies, la acumulación de prolina se daba sólo cuando la deshidratación del tejido alcanzó un cierto umbral, sobre 75-88% RWC (Good y Zaplachinski, 1994). En nuestras plantas de pimiento, la acumulación de prolina empezó cuando RWC descendió de los valores control (90-95%) a casi el 85% en $380 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$, y fue más grande a $\text{RWC} \leq 60\%$. El papel de la prolina podría ser el de un osmolito compatible en el citoplasma y los cloroplastos (Büßis y Heineke, 1998), manteniendo así el balance osmótico intracelular. Asumiendo una localización citoplásmica casi exclusiva de la prolina, y que el citoplasma representa un 5-6% del volumen total de la hoja (Büßis y Heineke, 1998), la concentración de prolina citoplásmica es de 400-580 mM ($380 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$) o 200-240 mM ($2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$) en las hojas de plantas sin regar durante 8 días. Hay pruebas de que la prolina también funciona como un antioxidante en el control redox del metabolismo de la planta, en la estabilización estructural de las membranas celulares y de las proteínas, y como fuente de energía, reduciendo la potencia, el carbono y el nitrógeno en la recuperación después del estrés (Cushman, 2001).

Tabla 4.7. Efecto de la aplicación de antitranspirante en las relaciones hídricas para plantas de pimiento dulce a dos concentraciones de CO₂ (380 o 2000 ppm) y bajo estrés hídrico moderado o severo (4 o 8d sin riego).

Tratamientos		Ψ _w (MPa)		Ψ _π (MPa)		RWC (%)	
CO ₂	Riego AT	(+4d)	(+8d)	(+4d)	(+8d)	(+4d)	(+8d)
380ppm	Sin AT	-0.344a	-0.308a	-0.784abc	-0.823a	89.65abc	91.55c
	Con AT	-0.413a	-0.369a	-0.746a	-0.795a	92.16abc	94.19c
Estrés	Sin AT	-0.806c	-2.000c	-0.902cd	-2.082c	85.89ab	48.22a
	Con AT	-0.650b	-1.394b	-0.779ab	-1.847bc	84.98a	57.20ab
2000ppm	Sin AT	-0.349a	-0.379a	-0.948d	-0.872a	95.51c	92.77c
	Con AT	-0.391a	-0.323a	-0.856abcd	-0.936a	94.78c	91.29c
Estrés	Sin AT	-0.569b	-1.933c	-0.858abcd	-1.567b	93.38bc	59.68b
	Con AT	-0.421a	-1.483b	-0.875bcd	-1.477b	92.57abc	60.40b
ANOVA							
CO ₂		***	NS	**	NS	**	NS
Riego		***	***	NS	***	*	***
AT		**	***	*	NS	NS	NS
Riego X CO ₂		***	NS	*	**	NS	NS
Riego X AT		***	***	NS	NS	NS	NS
CO ₂ X AT		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Riego X CO ₂ X AT		NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabla 4.8. Efecto de la aplicación de antitranspirante en hoja en las concentraciones de almidón, aminoácidos, azúcares solubles y prolina, en plantas de pimiento a dos concentraciones de CO₂ (380 o 2000ppm) y bajo estrés hídrico moderado o severo (4 o 8d sin riego).

Tratamientos	Almidón (g kg ⁻¹ DM)		Aminoácidos (mmol kg ⁻¹ DM)		Carbohidratos (g kg ⁻¹ DM)		Prolina (mmol kg ⁻¹ DM)			
	(+4d)	(+8d)	(+4d)	(+8d)	(+4d)	(+8d)	(+4d)	(+8d)		
CO ₂	Riego	AT								
	Sin AT	Con AT	122.3c	44.2c	77.7a	99.9bc	21.4a	59.1ab	3.17b	2.4a
380ppm	Control		45.4a	67.7d	95.9ab	86.5ab	77.5b	75.6bc	3.19b	2.1a
	Estrés		42.2a	20.1a	112.5ab	136.5d	133.4c	108.0c	5.39c	120.6c
2000ppm	Control		53.2ab	22.3a	118.8b	183.9e	46.5a	93.0c	5.89c	165.3d
	Estrés		210.3d	218.5e	92.5ab	84.0ab	29.6a	31.3a	1.68a	1.4a
ANOVA			61.7ab	35.1bc	91.2ab	64.2a	26.6a	33.0a	2.15ab	1.4a
			70.8ab	39.5bc	85.6ab	126.2cd	36.5a	108.2c	1.75a	60.7b
			85.3b	31.3ab	85.5ab	145.4d	38.4a	78.3c	1.49a	66.9b
ANOVA			***	**	NS	**	**	**	***	***
CO ₂			***	***	NS	***	***	***	***	***
Riego			***	***	NS	NS	NS	NS	NS	**
AT			NS	***	*	NS	NS	NS	NS	***
Riego X CO ₂			***	***	NS	*	*	*	NS	**
Riego X AT			*	***	NS	NS	***	NS	NS	*
CO ₂ X AT			***	***	NS	NS	NS	NS	NS	*
Riego X CO ₂ X AT			***	***	NS	NS	***	NS	NS	*

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta los objetivos planteados al inicio de este trabajo, podemos concluir:

A) Respecto a las plantas de pimiento:

- En las plantas cultivadas con una solución nutritiva carente de N, la urea foliar aumenta la concentración de nitratos respecto a plantas carentes de N sin aplicación de urea foliar, independientemente de la temperatura aplicada en el experimento a las plantas. Al combinar la aplicación foliar de urea y metil jasmonato, la concentración de nitratos aumenta respecto a las plantas control.

- En relación con el daño oxidativo (peroxidación lipídica), en plantas cultivadas con una solución nutritiva sin N, la urea foliar disminuye el daño respecto de las plantas carentes de N sin aplicación foliar de urea a diferentes temperaturas de crecimiento. En las plantas cultivadas con diferentes concentraciones de NO_3^- , a bajas concentraciones la urea aumenta los niveles de la peroxidación lipídica en relación a las plantas cultivadas con altas concentraciones de NO_3^- . Combinando la urea con el metil jasmonato, la peroxidación lipídica aumenta respecto a las plantas control tanto a altas como a bajas concentraciones de NO_3^- .

- Las concentraciones de las enzimas antioxidantes CAT y APOX disminuyen al aplicar urea foliar en hojas de plantas cultivadas con una solución nutritiva sin N, respecto a las plantas sin aplicación de urea. Al aplicar diferentes temperaturas de crecimiento (10, 20 y 30°C), se observó que en plantas cultivadas con una solución nutritiva alta en N, las concentraciones de las enzimas disminuyen respecto de las plantas cultivadas con soluciones deficientes en N, siendo 20°C la temperatura más significativa en el estudio, por las diferencias que presentan las plantas al combinar el efecto de la temperatura, de la urea foliar, y de la concentración de nitrógeno.

- La asimilación de CO₂, tanto a moderadas como a altas temperaturas, aumenta al aplicar urea foliar en plantas cultivadas con una solución nutritiva deficiente en N, aunque la tasa de fotosíntesis es mayor en plantas cultivadas con una solución nutritiva control. Al aplicar urea foliar y metil jasmonato en plantas cultivadas con una solución nutritiva alta en N, la fotosíntesis aumenta respecto a las plantas control.

- La aplicación foliar de urea incrementa las concentraciones de aminoácidos en hojas de plantas de pimiento cultivadas con una solución nutritiva control, frente a una solución nutritiva deficiente en N. En general, la aplicación foliar de metil jasmonato también aumenta las concentraciones de aminoácidos en hojas de plantas cultivadas a diferentes concentraciones de N.

- La aplicación de AT resultó efectiva para gestionar el estrés hídrico moderado, pero no el severo, en hojas de plantas de pimiento, especialmente bajo una alta [CO₂] (2000 μmol mol⁻¹). Este efecto sinérgico del AT y de una alta [CO₂] también se dio en la respiración radicular bajo condiciones de mayor estrés (8 días de sequía). Nuestros resultados indican que los efectos negativos en la fotosíntesis de pimiento, resultantes de la sequía, pueden ser mitigados por el AT bajo una [CO₂] más elevada. La aplicación de AT podría ser una práctica efectiva para reducir la pérdida de agua debido a un incremento en la superficie foliar a elevada [CO₂].

B) Respecto a los frutos de pimiento:

- En frutos de pimiento, las concentraciones de N aumentan al aplicar urea foliar, tanto en frutos de plantas cultivadas con una solución nutritiva control, como con una solución nutritiva deficiente en N.

- Durante su almacenamiento postcosecha a 5°C, el color de los frutos se ve afectado: los frutos sin aplicación foliar de urea disminuyen sus parámetros de L*, a* y b*, tanto en frutos de plantas cultivadas con una solución nutritiva rica en N, como en frutos con una solución nutritiva deficiente en N. Las aplicaciones foliares de urea y de antitranspirante, hacen que los frutos de pimiento tengan un color más rojizo, y por tanto, aceleraron la maduración. Respecto a la firmeza, la

aplicación foliar de antitranspirante tiene un efecto positivo sobre los frutos a bajas temperaturas, ya que aumenta la firmeza de los mismos en comparación con frutos control y frutos tratados con urea foliar.

- La aplicación de urea foliar eleva la concentración de los compuestos fenólicos en frutos almacenados a bajas temperaturas, respecto a los frutos sin ninguna aplicación foliar.

- La peroxidación lipídica se incrementa en frutos de pimiento sin aplicación foliar de urea en plantas cultivadas con una solución nutritiva deficiente en N. En frutos de pimiento almacenados a bajas temperaturas, la urea foliar disminuye los niveles de peroxidación lipídica con respecto a las plantas sin aplicación foliar.

- Las concentraciones de las enzimas antioxidantes CAT y APOX, aumentan al no aplicar urea foliar en frutos de plantas cultivadas con una solución nutritiva deficiente en N, mientras que en frutos almacenados a bajas temperaturas, las aplicaciones foliares, tanto de urea como de antitranspirante, elevan las concentraciones de estas enzimas con respecto a las plantas sin aplicación foliar.

- Las concentraciones de los aminoácidos en frutos de pimiento almacenados a bajas temperaturas, se incrementan con las aplicaciones foliares de urea y de antitranspirante, si bien los aumentos más significativos se producen en las concentraciones de arginina.

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M.; Noguera, P.; Noguera, V.; Roig, A.; Cegarra, J.; Paredes, C. **1997**. Reciclado de residuos orgánicos y su aprovechamiento como sustratos de cultivo. Actas de Horticultura 19. I Congreso Ibérico y III Nacional de Fertirrigación. SECH.
- Abd El-Aal, F. S.; Shaheen, A. M.; Ahmed, A. A.; Mahmoud, A. R. **2010**. Effect of foliar application of urea and amino acids mixtures as antioxidants on growth, yield and characteristics of squash. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 6, 583-588.
- Agüera, E.; Cabello, P.; de la Haba, P. **2010**. Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. *Physiol. Plant.* 138, 256–267.
- Alarcón, A. L. **1996**. Fertirrigación del pimiento dulce en invernadero. En: “Compendios de Horticultura 9”. Coordinado por A. Namesny. Ediciones de Horticultura. 5, 45-51.
- Alarcón, A. L. **2000**. Introducción a los cultivos sin suelo. Sistemas y sustratos. Tecnología para cultivos de alto rendimiento. *Horticultura* 123, 37-42.
- Allen, R. D. **1995**. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107, 1049–1054.
- Alscher, R. G.; Donahue, J. L.; Cramer, C. L. **1997**. Reactive oxygen species and antioxidant: relationship in green cells. *Physiol. Plant.* 100, 224–233.
- Alt, C.; Kage, H.; Stützel, H. **2000**. Modelling nitrogen content and distribution in cauliflower (*Brassica oleracea* L. *botrytis*). *Ann. Bot.* 86, 963-973.
- Aparicio-Tejo, P. M.; Arrese-Igor, C.; Becana, M. **2000**. Fijación biológica de nitrógeno. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed: Azcón-Bieto, J.; Talón, M. McGraw-Hill Interamericana. pp 193-213.
- Apel, K.; Hirt, H. **2004**. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Aroca, R.; Irigoyen, J. J.; Sanchez-Diaz, M. **2001**. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity. *Plant Sci.* 161, 719–726.

- Arrigoni, O. **1994**. Ascorbate system in plant development. *J. Bioener. Biomembr.* 26, 407–419.
- Asada, K. **1999**. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- Awad, El-M. M.; Abd El-Hameed, A. M.; Shall, Z. S. **2007**. Effect of glycine, lysine and nitrogen fertilizer rates on growth, yield and chemical composition of potato. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ.* 32, 8541 - 8551.
- Ayala-Zavala, J. F.; Wang, S. Y.; Wang, C. Y.; González-Aguilar, G. A. **2004**. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensm. Wiss. Technol.* 37, 687–695.
- Bacon, P. E. **1995**. Nitrogen Fertilization in the Environment. New York. USA.
- Bailey-Serres, J.; Mittler, R. **2006**. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 141, 311.
- Baker, N. R. **1994**. Chilling stress and photosynthesis. En: Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Ed: Foyer, C. H.; Mullineaux, P. M. CRC Press, Boca Raton, Florida. USA. pp. 127–154.
- Balestrasse, K. B.; Gallego, S. M.; Tomaro, M. L. **2006**. Aluminium stress affects nitrogen fixation and assimilation in soybean (*Glycinemax* L.). *Plant Growth Regul.* 48, 271–281.
- Banaras, M.; Bosland, P. W.; Lownds, N. K. **2005**. Effects of harvest time and growth conditions on storage and post-storage quality of fresh peppers (*Capsicumannuum* L.). *Pak. J. Bot.* 37, 337–344.
- Bauder, J. W.; Sinclair, K. N.; Luna, R. E. **1993**. Physiographic and land use characteristics associated with nitrate-nitrogen in Montana groundwater. *J. Environ. Qual.* 22, 255-262.
- Baur, P.; Schonerr, J. **1995**. Temperature dependence of the diffusion of organic compounds across plant cuticles. *Chemosphere* 30, 1331–1340.
- Belitz, H. D.; Grosch, W. **1999**. Amino acids, peptides, and proteins. *Food Chem.* Springer, Berlin. Germany pp. 8–34.
- Berkowitz, G. A.; Rabin, J. **1988**. Antitranspirant associated abscisic-acid effects on the water relations and yield of transplanted bell peppers. *Plant Physiol.* 86, 329–331.

- Berry, J.; Bjorkman, O. **1980**. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 491–543.
- Bi, G.; Scagel, C. F.; Fuchigami, L. H.; Regan, R. P. **2007**. Rate of nitrogen application during the growing season alters the response of container-grown rhododendron and azalea to foliar application of urea in the Autumn. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 82, 753–763.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. V. **2003**. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91, 179–194.
- Bloom, A. J. **1997**. Interactions between inorganic nitrogen nutrition and root development. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 160, 253–259.
- Bondada, B. R.; Syvertsen, J. P.; Albrigo, L. G. **2001**. Urea nitrogen uptake by citrus leaves. *HortScience* 36, 1061-1065.
- Boonsiri, K.; Ketsa, S.; van Doorn, W. G. **2007**. Seed browning of hot peppers during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 358–365.
- Borrelli, A. **1999**. Cultivo en invernadero. 3ª Edición Mundi-Prensa, Madrid. pp. 345-348.
- Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. **1990**. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186, 343-355.
- Bota, J.; Medrano, H.; Flexas, J. **2004**. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytol.* 162, 671–681.
- Bowler, C.; van Montagu, M.; Inze, D. **1992**. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.
- Bowman, D. C. **1992**. Foliar absorption of urea, ammonium, and nitrate by perennial ryegrass turf. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 117, 75–79.
- Bowry, V. W.; Ingold, K. U.; Stocker, R. **1992**. Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem. J.* 288, 341–344.
- Boynton, D. **1954**. Nutrition by foliar application. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 5, 31-54.
- Brandrup, J.; Immregut, E. H. **1975**. Polymer handbook 2nd edition. John Wiley, New York. USA.

- Brown, K. W.; Rosenberg, N. J. **1973**. A resistance model to predict evapotranspiration and its application to a sugar beet field. *Agron. J.* 65, 341–347.
- Bruggemann, W.; Kooij, T. A. W.; Hasselt, P. R. **1992**. Long-term chilling of young tomato plants under low light. II. Chlorophyll a fluorescence, carbon metabolism and activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 186, 179–187.
- Buchanan-Wollaston, V.; Earl, S.; Harrison, E.; Mathas, E.; Navabpour, S.; Page, T.; Pink, D. **2003**. The molecular analysis of leaf senescence: a genomics approach. *J. Plant Biotechnol.* 11, 3–22.
- Buchmann, N. **2000**. Biotic and abiotic factors controlling soil respiration rates in *Picea abies* stands. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1625–1635.
- Büßis, D.; Heineke, D. **1998**. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *J. Exp. Bot.* 49, 1361–1370.
- Byari, S. H.; O'keefe, R. B. **1982**. Effect of antitranspirants on heat and drought response of potato varieties. *HortScience* 17, 513–518.
- Byers, T.; Perry, G. **1992**. Dietary carotenes, vitamin C and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Ann. Rev. Nutr.* 12, 139–159.
- Cadenas, E. **1995**. Mechanism of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. En: *Oxidative stress and antioxidant defences in biology*. Ed: Ahmad, S. Chapman and Hall, New York. USA, pp. 1–61.
- Cadenas, E.; Davies, J. A. **2000**. Mitochondrial free radical generation: oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 220–230.
- Cakmak, I.; Marschner, H. **1988**. Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. *J. Exp. Biol.* 39, 1449–1460.
- Camejo, D.; Nicolas, E.; Torres, W.; Alarcon, J. J. **2010**. Differential heat-induced changes in the CO₂ assimilation rate and electron transport in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 85, 137–143.
- Cánovas, F. **1997**. Los sustratos y su manejo práctico. La disolución de fertirrigación. Manual de cultivo sin suelo. Univ. Almería. pp. 166–189.
- Cantliffe, D. J.; Shaw, N.; Jovicich, E.; Rodriguez, J. C.; Secker, I.; Karchi, Z. **2001**. Passive ventilated high-roof greenhouse production of vegetables in a humid, mild winter climate. *Acta Hort.* 559, 195–201.

- Cao, F. Q.; Werner, A. K.; Dahncke, K.; Romeis, T.; Liu, L. H.; Witte, C. P. **2010**. Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant Physiol.* 154, 98–108.
- Castle, M. L.; Crush, J. R.; Rowarth, J. S. **2007**. Effects of foliar and root applied nitrogen on nitrogen uptake and movement in white clover at low temperature. *New Zealand J. Agric. Res.* 50, 463–472.
- Chakir, S.; Jensen, M. **1999**. How does *Lobaria pulmonaria* regulate photosystem II during progressive desiccation and osmotic water stress? A chlorophyll fluorescence study at room temperature and at 77 K. *Physiol. Plant.* 105, 256–264.
- Chaves, M. M. **1991**. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 42, 1–16.
- Chen, L.; Liu, S. C.; Gai, J. Y.; Zhu, Y. L.; Yang, L. F.; Wei, G. P. **2009**. Effects of nitrogen forms on the growth, ascorbate-glutathione cycle and lipid peroxidation in developing seeds of vegetable soybean. *Afric. J. Agric. Research* 4, 1178–1188.
- Cheng, G.; Duan, X. W.; Yang, B.; Jiang, Y. M.; Lu, W. J.; Luo, Y. B.; Jiang, W. B. **2008**. Effect of hydroxyl radical on the scission of cellular wall polysaccharides *in vitro* of banana fruit at various ripening stages. *Acta Physiol. Plant.* 30, 257–263.
- Chimphango, S. B. M.; Musil, C. F.; Dakora, F. D. **2003**. Response of purely symbiotic and NO₃⁻ fed nodulated plants of *Lupinus luteus* and *Vicia atropurpurea* to ultraviolet-B radiation. *J. Exp. Bot.* 54, 1771–1784.
- Chou, C. M.; Kao, C. H. **1992**. Methyl jasmonate, calcium, and leaf senescence in rice. *Plant Physiol.* 99, 1693–1694.
- Cordenunsi, B. R.; Genovese, M. I.; do Nascimento, J. R.; Hassimotto, N. M.; dos Santos, R. J.; Lajolo, F. M. **2005**. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chem.* 91, 113–121.
- Córdoba, F.; González-Reyes, J. A. **1994**. Ascorbate and plant cell growth. *J. Bioener. Biomembr.* 26, 399–405.

- Córdoba-Pedregosa, M. D.; Córdoba, F.; Villalba, J. M.; González-Reyes, J. A. **2003**. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxidase contents, peroxidase, and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. *Plant Physiol.* 131, 697–706.
- Costa, J. C.; Gil, R. **2001**. La Horticultura Española. S.E.C.H. 208-211.
- Cox, K. A.; McGhie, T. K.; White, A.; Woolf, A. B. **2004**. Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 287–294.
- Creelman, R. A.; Mullet, J. E. **1997**. Biosynthesis and action of jasmonates in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 48, 355–381.
- Crisosto, C. H.; Mitchell, J. P. **2002**. Preharvest factors affecting fruit and vegetable quality, En: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, Ed: Kader, A. A. University of California, Oakland, California. USA. p. 519.
- Cruz de Carvalho, M. H. **2008**. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal Behav.* 3, 156–165.
- Cushman, J. C. **2001**. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *Am. Zool.* 41, 758–769.
- Cuypers, A.; Vangronsveld, J.; Clijsters, H. **2001**. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 657–664.
- Czapski, J.; Saniewski, M. **1985**. Effect of methyl jasmonate on carotenoids in tomato fruits. *Gartenbauwissenschaft* 50, 35-37.
- Dalton, D. A. **1995**. Antioxidant defenses of plants and fungi. En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Ed: Ahmad, S. Chapman and Hall, New York. USA, pp 298-355.
- Davey, M. W.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Sanmartín, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N.; Benzie, I. J. J.; Favel, D.; Fletcher, J. **2000**. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 80, 825-860.
- Davey, M. W.; Stals, E.; Panis, B.; Keulemans, J.; Swennen, R. L. **2005**. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Anal. Biochem.* 347, 201–207.

- de la Torre, F.; García-Gutiérrez, A.; Crespillo, C.; Cantón, F. R.; Avila, C.; Cánovas, F. M. **2002**. Functional expression of two pine glutamine synthetase genes in bacteria reveals that they encode cytosolic isoenzymes with different molecular and catalytic properties. *Plant Cell Physiol.* 43, 802–809.
- del Amor, F. M. **2006 (a)**. Growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of sweet pepper plants as affected by the cultivation method. *Ann. Appl. Biol.* 148, 133–139.
- del Amor, F. M. **2006 (b)**. Yield and fruit quality response of sweet pepper to organic and mineral fertilization. *Renewable Agric. Food Syst.* 22, 233–238.
- del Amor, F. M.; Gómez-López, M. D. **2009**. Agronomical response and water use efficiency of sweet pepper plants grown in different greenhouse substrates. *HortScience* 44, 810–814.
- del Amor, F. M.; Rubio, J. S. **2009**. Effects of antitranspirant spray and potassium: calcium: magnesium ratio on photosynthesis, nutrient and water uptake, growth, and yield of sweet pepper. *J. Plant Nutr.* 32, 97–111.
- del Amor, F. M.; Cuadra-Crespo, P.; Varó, P.; Gómez, M. C. **2009**. Influence of foliar urea on the antioxidant response and fruit color of sweet pepper under limited N supply. *J. Sci. Food Agric.* 89, 504–510.
- Delfine, S.; Tognetti, R.; Loreto, F.; Alvino, A. **2002**. Physiological and growth responses to water stress in field-grown bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 77, 697–704.
- Devoto, A.; Turner, J. G. **2003**. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* 92, 329–337.
- Diaz, C.; Purdy, S.; Christ, A.; Morot-Gaudry, J. F.; Wingler, A.; Masclaux-Daubresse, C. **2005**. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. *Plant Physiol.* 138, 898–908.
- Díaz-Pérez, J. C.; Muy-Rangel, M. D.; Mascorro, A. G. **2007**. Fruit size and stage of ripeness affect postharvest water loss in bell pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 87, 68–73.
- Dinnes, D. L.; Karlen, D. L.; Jaynes, D. B.; Kaspar, T. C.; Hatfield, J. L.; Colvin, T.S.; Cambardella, C. A. **2002**. Nitrogen management strategies to reduce nitrate leaching in tile-drained Midwestern soils. *J. Agron.* 94, 153–171.

- Dong, S.; Cheng, L.; Scagel, C. F.; Fuchigami, L. H. **2004**. Nitrogen mobilization, nitrogen uptake and growth of cuttings obtained from poplar stock plants grown in different N regimes and sprayed with urea in autumn. *Tree Physiol.* 24, 355–359.
- Dorji, K.; Behboudian, M. H.; Zegbe-Dominguez, J. A. **2005**. Water relations, growth, yield, and fruit quality of hot pepper under deficit irrigation and partial rootzone drying. *Sci. Hort.* 104, 137–149.
- Eibner, R. **1985**. Foliar fertilization importance on prospects in crop production. En: Proc. First Int. Symp. Foliar Fert. Berlin, Germany. p. 412.
- El-Otmani, M.; Ait-Oubahou, A.; Zahra Taini, F. **2002**. Efficacy of foliar urea as a N source in sustainable *Citrus* production systems. *Acta Horticulturae* 594, 611–617.
- Elstner, E. F.; Wagner, G. A.; Schutz, W. **1988**. Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. *Curr. Top Plant Biochem. Physiol.* 7, 159–187.
- Encyclopedia of Fruits and Nuts. **2008**. En: University of Hawaii at Manoa, Ed. Janick, J.; Paull, R. E. Purdue University, West Lafayette. Hawaii, p. 976.
- Englert, J. M.; Warren, K.; Fuchigami, L. H.; Chen, T. H. H. **1993**. Antidesiccant compounds improve the survival of bare-root deciduous nursery trees. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 118, 228–235.
- Escoubas, J. M.; Lomas, M.; LaRoche, J.; Falkowski, P. G. **1995**. Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by a redox state of plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 10237–10241.
- Esterbauer, H.; Cheeseman, K. H. **1990**. Determination of aldehydic lipidperoxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407–421.
- Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. **1991**. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde, and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81–128.
- Estiarte, M.; Filella, I.; Serra, J.; Pefiuelas, J. **1994**. Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Oecologia* 99, 387–391.
- Evans, J. R. **1983**. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 72, 297–302.

- Evans, J. R. **1989**. Photosynthesis and nitrogen relationship in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78, 9–19.
- Evans, L. T. **1998**. Feeding the Ten Billion. Cambridge University Press, Cambridge. UK.
- Farmer, E. E.; Ryan, C. A. **1992**. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129–134.
- Feigin, A.; Zwibel, M.; Rylski, I.; Zamir, N.; Levav, N. **1980**. The effect of ammonium/nitrate ratio in the nutrient solution on tomato yield and quality. *Acta Hort. (ISHS)* 98, 149-160.
- Fichtner, K.; Koch, G. W.; Mooney, H. A. **1995**. Photosynthesis, storage and allocation. En: *Ecophysiology of photosynthesis*. Ed. Schulze, E. D.; Caldwell, M. N. Berlin: Springer- Verlag. Germany, p. 576.
- Finnan, J. M.; Burke, J. I.; Jones, M. B. **1997**. A note on a non-destructive method of chlorophyll determination in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Irish J. Agric. Food Res.* 36, 85-89.
- Foulkes, M. J.; Scott, R. K.; Sylvester-Bradley, R. **2001**. The ability of wheat cultivars to withstand drought in UK conditions: formation of grain yield. *J. Agric. Sci.* 38, 153–169.
- Fox, H.; Piekielek, P.; Macneal, K. M. **1994**. Using chlorophyllmeter to predict nitrogen fertilizer needs of winter wheat. *Comm. Soil Plant Anal.* 25, 171-181.
- Foyer, C. H. ; Lelandais, M. ; Galap, C. ; Kunert, K. J. **1991**. Effect of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol.* 97, 863–872.
- Foyer, C. H.; Lopez-Delgado, H.; Dat, J. F.; Scott, I. M. **1997**. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100, 241–254.
- Francis, P. S. **2006**. The determination of urea in wine – a review. *Austr. J. Grape Wine Res.* 12, 97-106.
- Francis, P. S.; Lewis, S. W.; Lim, K. F. **2002**. Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *Trends Anal. Chem.* 21, 389-400.

- Fry, S. C.; Dumville, J. C.; Miller, J. G. **2001**. Fingerprinting of polysaccharides attacked by hydroxyl radicals *In vitro* and in the cell walls of ripening pear fruit. *Biochem J.* 357, 729-737.
- Gale, J.; Hagan, R. M. **1966**. Plant antitranspirants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17, 269–282.
- Gandul-Rojas, B.; Mínguez-Mosquera, M. I. **1996**. Chlorophyll and carotenoids composition in virgin olive oils from various spanish olive varieties. *J. Sci. Food Agric.* 72, 31-39.
- Goicoechea, N.; Aguirreolea, J.; Cenoz, S.; García-Mina, J. M. **2000**. *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 19–25.
- Gomes, M. H.; Rosa, E. **2000**. Free amino acid composition in primary and secondary inflorescences of 11 broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cultivars and its variation between seasons. *J. Sci. Food Agric.* 81, 295–299.
- Gonçalves de Oliveira, J.; da Costa, P. L.; Pierre, A. **2009**. Alterations in chlorophyll *a* fluorescence, pigment concentrations and lipid peroxidation to chilling temperature in coffee seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 67, 71–76.
- Good, A. G.; Zaplachinski, S. T. **1994**. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 90, 9–14.
- Gooding, M. J.; Davies, W. P. **1992**. Foliar urea fertilization of cereals: a review. *Fertil. Res.* 32, 209–222.
- Goreta, S.; Leskovar, D. I.; Jifon, J. L. **2007**. Gas exchange, water status, and growth of pepper seedlings exposed to transient water deficit stress are differentially altered by antitranspirants. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 132, 603–610.
- Grant, J. J.; Loake, G. J. **2000**. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21–29.
- Gregory, J. M.; Mitchell, J. F. B.; Brady, A. J. **2003**. Summer drought in northern midlatitudes in a time-dependent CO₂ climate experiment. *J. Climate* 10, 662–686.

- Groeneveld, R.; Bowman, L.; Krwitwagen, S.; Van Ierland, E. **2001**. Land cover changes as a result of environmental restrictions on nitrate leaching in dairy farming. *Environ. Mod. Assess.* 6, 101-109.
- Gu, S.; Fuchigami, L. H.; Cheng, L.; Guak, S. H.; Shin, C. **1998**. Effects of antitranspirant and leaching on medium solution osmotic potential, leaf stomatal status, transpiration, abscisic acid content and plant growth in 'Early Girl' tomato plants (*Lycopersicon esculentum*). *J. Hortic. Soc. Biotechnol.* 73, 473-477.
- Gualanduzzi, S.; Baraldi, E.; Braschi, I.; Carnevali, F.; Gessa, C. E.; De Santis, A. **2009**. Respiration, hydrogen peroxide levels and antioxidant enzyme activities during cold storage of zucchini squash fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 16-23.
- Gülen, H.; Çetinkaya, C.; Kadioglu, M.; Kesici, M.; Cansev, A.; Eris, A. **2008**. Peroxidase activity and lipid peroxidation in strawberry (*Fragaria X ananassa*) plants under low temperature. *J. Biol. Environ. Sci.* 2, 95-100.
- Habib, R.; Millard, P.; Proe, M. F. **1993**. Modeling the seasonal nitrogen partitioning in young sycamore (*Acer pseudoplatanus*) trees in relation to nitrogen supply. *Ann. Bot.* 71, 453-459.
- Hallier, A.; Chevallier, S.; Serot, T.; Prost, C. **2007**. Influence of farming conditions and texture of European catfish (*Silurus glanis*) flesh. *J. Sci. Food Agric.* 87, 814-823.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. **1989**. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford. UK. pp. 164-165.
- Han, Z.; Zeng, X.; Wang, F. **1989**. Effects of autumn foliar application of ¹⁵N-urea on nitrogen storage and reuse in apple. *J. Plant Nutr.* 12, 675-685.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A. **2000**. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 52, 481-504.
- Harper, J. E. **1984**. Nitrogen in crop production, Ed: Hauck, R. D. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 165-182.
- Harris, J. R.; Bassuk, N. L. **1995**. Effects of defoliation and antitranspirant treatments on transplant response of scarlet oak, green ash and Turkish hazelnut. *J. Arboric.* 21, 33-36.
- Havsteen, B. **1983**. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1141-1148.

- He, F. F.; Chen, Q.; Jiang, R. F.; Chen, X. P.; Zhang, F. S. **2007**. Yield and nitrogen balance of greenhouse tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with conventional and site-specific nitrogen management in northern china. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 77, 1-14.
- Heath, R. L.; Packer, L. **1968**. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198.
- Henson I. E.; Alagarswamy, G.; Mahalakshmi, V.; Bidinger, F. R. **1983**. Stomatal response to water stress and its relationship to bulk leaf water status and osmotic adjustment in pearl millet (*Pennisetum americanum* [L.] Leeke). *J. Exp. Bot.* 34, 442–450.
- Hodges, D. M.; Andrews, C. J.; Johnson, D. A.; Hamilton, R. I. **1996**. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiol. Plant.* 98, 685–692.
- Hodges, D. M.; DeLong, J. M.; Forney, C. F.; Prange, R. K. **1999**. Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611.
- Hodgson, R. A. J.; Raison, J. K. **1991**. Superoxide production by thylakoids during chilling and its implication in the susceptibility of plants to chilling-induced photoinhibition. *Planta* 183, 222–228.
- Houdusse, F.; Garnica, M.; García-Mina, J. M. **2007**. Nitrogen fertiliser source effects on the growth and mineral nutrition of pepper (*Capsicum annuum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 87, 2099–2105.
- Howard, L. R.; Talcott, S. T.; Brenes, C. H.; Villalon, B. **2000**. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum Species*) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1713-1720.
- Huang, Z. A.; Jiang, D. A.; Yang, Y.; Sun, J. W.; Jin, S. H. **2004**. Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica* 42, 357–364.
- Hung, K. T.; Kao, C. H. **1998**. Involvement of lipid peroxidation in methyl jasmonate-promoted senescence in detached rice leaves. *Plant Growth Regul.* 24, 17–21.

- Imahori, Y.; Kanetsune, Y.; Ueda, Y.; Chachin, K. **2000**. Changes in hydrogen peroxide content and antioxidative enzyme activities during the maturation of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit. *J. Japan Soc. Hortic. Sci.* 69, 690–695.
- Imahori, Y.; Takemura, M.; Bai, J. **2008**. Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 54–60.
- Ingold, K. U.; Webb, A. C.; Witter, D.; Burton, G. W.; Metcalfe, T. A.; Muller, D. P. R. **1987**. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 224–225.
- Jang, J. C.; Sheen, J. **1997**. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 2, 208–214.
- Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W.; Fong, H. H.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R. G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. **1997**. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218–221.
- Jensen, M. H.; Malter, A. J. **1995**. Protected Agriculture: a global review. World Bank Technical Paper, N° 253.
- Jeong, S. W.; Choi, S. M.; Lee, D. S.; Ahn, S. N.; Hur, Y.; Chow, W. S.; Park, Y. **2002**. Differential susceptibility of photosynthesis to light-chilling stress in rice (*Oryza sativa* L.) depends on the capacity for photochemical dissipation of light. *Mol. Cells* 13, 419–428.
- Jeuffroy, M. H.; Ney, B.; Ourry, A. **2002**. Integrated physiological and agronomic modelling of N capture and use within the plant. *J. Exp. Bot.* 370, 809–823.
- Jiménez, M. **1992**. Desde América a Europa con escala en Canarias. Pimientos I Parte. *Horticultura* 83, 22–28.
- Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Simic, M. G.; Hara, Y. **1998**. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. En: *Flavonoids in health and disease*. Ed: Rice Evans, C.; Parker, L. Marcel Dekker, Nueva York. USA, pp. 137–161.
- Ju, Z.; Yuan, Y.; Liou, C.; Zhan, S.; Xiu, S. **1994**. Effects of low temperature on H₂O₂ and heart browning of Chili and Yali pear (*Pyrus bretschneideri* R.). *Sci. Agric. Sin.* 27, 77–81.

- Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M. **1999**. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954–3962.
- Kaiser, W. **1987**. Effects of water deficits on photosynthetic capacity. *Physiol. Plant.* 71, 142–149.
- Kamal-Eldin, A.; Appelqvist, L. A. **1996**. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671–701.
- Kamar, M. E.; Omar, A. **1987**. Effect of nitrogen levels and spraying with aminal-forte (amino acids salvation) on yield of cucumber and potatoes. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ.* 12, 900-907.
- Kandlbinder, A.; Finkemeier, I.; Wormuth, D.; Hanitzsch, M.; Dietz, K. J. **2004**. The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 120, 63–73.
- Kang, S.; Zhang, F.; Hu, X.; Zhang, J. **2002**. Benefits of CO₂ enrichment on crop plants are modified by soil water. *Plant Soil* 239, 59–77.
- Karuppaiah, P.; Manivonnar, K.; Sriramach Andrasakaron, M. V.; Kuppusamy, G. **2000**. Responses of cucumber to foliar application of nutrients on light mine spoil. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 49, 150-153.
- Katerji, N.; Mastrorilli, M.; Hamdy, A. **1993**. Effects of water stress at different growth stages on pepper yield. *Acta Hort.* 335, 165–171.
- Kauder, F.; Ludewig, F.; Heineke, D. **2000**. Ontogenetic changes of potato plants during acclimation to elevated carbon dioxide. *J. Exp. Bot.* 51, 429–437.
- Kaya, C.; Higgs, D. **2003**. Relationship between water use and urea application in salt-stressed pepper plants. *J. Plant Nutr.* 26, 19–30.
- Kays, S. J. **1991**. Postharvest physiology and handling of perishable plant products. Van Nostrand-Reinhold, New York. USA. p. 733.
- Kehr, E. **2002**. Susceptibilidad a daño por enfriamiento en postcosecha de pimiento y tratamientos para disminuir su efecto. *Agric. Téc.* 62, 509–518.
- Kellman, L. M.; Hillaire-Marcel, C. **2003**. Evaluation of nitrogen isotopes as indicators of nitrate contamination sources in an agricultural watershed. *Agric. Ecosyst. Environ.* 95, 87–102.
- King, A. D.; Bolin, H. R. **1989**. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.* 43, 132–135.

- Knoche, M.; Petracek, P. D.; Bukovac, M. J. **1994**. Urea penetration of isolated tomato fruit cuticles. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 761–776.
- Koc, A.; Gasch, A. P.; Rutherford, J. C.; Kim, H. Y.; Gladyshev, V. N. **2004**. Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and -independent components of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 7999–8004.
- Kojima, S.; Bohner, A.; Von Wiren, N. **2006**. Molecular mechanisms of urea transport in plants. *J. Membr. Biol.* 212, 83–91.
- Kontush, A.; Finckh, B.; Karten, B.; Kohlschutter, A.; Beisiegel, U. **1996**. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 37, 1436–1448.
- Kosugi, H.; Kato, T.; Kikugawa, K. **1987**. Formation of yellow, orange, and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid. *Anal. Biochem.* 165, 456–464.
- Kovacik, J.; Backor, M. **2007**. Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Soil* 297, 255–265.
- Krinsky, N. I. **2001**. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition* 17, 815–817.
- Krogmeier, M. J.; McCarty, G. W.; Bremner, J. M. **1989**. Phytotoxicity of foliar-applied urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 8189–8191.
- Kuk, Y. I.; Shin, J. S.; Burgos, N. R.; Hwang, T. E.; Han, O.; Cho, B. H.; Jung, S.; Guh, J. O. **2003**. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Sci.* 43, 2109–2117.
- Kuzniak, E. **2002**. Transgenic plants: An insight into oxidative stress tolerance mechanisms. *Acta Physiol. Plant.* 24, 97–113.
- Lambert, D. F.; Sherwood, J. E.; Francis, P. S. **2004**. The determination of urea in soil extracts and related samples- a review. *Austr. J. Soil Res.* 42, 709–717.
- Lee, B. R.; Jin, Y. L.; Jung, W. J.; Avice, J. C.; Morvan-Bertrand, A.; Ourry, A.; Park, C. W.; Kim, T. H. **2008**. Water-deficit accumulates sugars by starch degradation-not by de novo synthesis-in white clover leaves (*Trifolium repens*). *Physiol. Plant.* 134, 403–411.
- Lee, D. H.; Lee, C.B. **2000**. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: In gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159, 75–85.

- Lefier, D. **1996**. Analytical methods for the determination of the urea content in milk. *Bulletin of the International Dairy Federation* 315, 35–38.
- Lehmann, J.; Atzorn, R.; Brückner, C.; Reinbothe, S.; Leopold, J.; Wasternack, C.; Parthier, B. **1995**. Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* 197, 156–162.
- Lightbourn, G. J.; Stommel, J. R.; Griesbach, R. J. **2007**. Epistatic interactions influencing anthocyanin gene expression in *Capsicum annuum*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 132, 824–829.
- Lim, C. S.; Kang, S. M.; Cho, J. L. **2009**. Antioxidizing enzyme activities in chilling-sensitive and chilling-tolerant pepper fruit as affected by stage of ripeness and storage temperature. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 134, 156–163.
- Lipe, W. N.; Hondnet, K.; Gerst, M.; Wendt, C. W. **1982**. Effects of antitranspirants on water use and yield of greenhouse and field grown onion. *HortScience* 17, 242–244.
- Llanos, M. **1998**. El pimiento en cultivo intensivo en España. *Vida rural*. Año V, 68, 52-54.
- Logan, B. A.; Demmig-Adams, B.; Rosenstiel, T. N.; Adams, W. W. **1999**. Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics. *Planta* 209, 213–220.
- Lucey, K. J.; Goolsby, E. **1993**. Effect of climatic variations over 11 years on nitrate-nitrogen concentrations in the racoon river, Iowa. *J. Environ. Qual.* 22, 38-46.
- Ludewiga, F.; Sonnewalda, U.; Kauderb, F.; Heinekeb, D.; Geigerc, M.; Stittc, M.; Müller-Röberd, B. T.; Gillissene, B.; Kühne, C.; Frommere, W. B. **1998**. The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO₂. *FEBS Lett.* 429, 147–151.
- Luo, Y.; Zhou, X. **2006**. *Soil respiration and the environment*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Madrid, R.; Navarro, F.; Collados, I.; Egea, C.; Alarcón, A. L. N. **1999**. Development of color in red pepper fruits in soilless culture. *J. Hort. Sci. Biotech.* 74, 175-180.
- Mareczek, A.; Leja, M. **2005**. Effects of urea foliar application on antioxidative properties of lettuce and broccoli. *Hortic. Veg. Grow.* 24, 235–241.

- Marschner, H. **1995**. Mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed. Academic press. New York. USA, p. 78.
- Masaki, H.; Okano, Y.; Sakurai, H. **1999**. Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1428, 45-56.
- McConn, M.; Creelman, R. A.; Bell, F.; Mullet, J. E.; Browse, J. **1997**. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5473–5477.
- Meheriuk, M.; McKenzie, D. L.; Neilsen, G. H.; Hall, J. W. **1996**. Fruit pigmentation of four green apple cultivars responds to urea sprays but not to nitrogen fertilization. *HortScience* 31, 992–993.
- Meir, S.; Rosenberger, I.; Aharon, Z.; Grinberg, S.; Fallik, E. **1995**. Improvement of the postharvest keeping quality and colour development of bell pepper (cv. 'Maor') by packaging with polyethylene bags at a reduced temperature. *Postharvest Biol. Technol.* 5, 303–309.
- Mengel, K.; Kirby, E. A. **1982**. Principles of plant nutrition. International Potash Institute. Switzerland. pp. 295-491.
- Merigout, P.; Lelandais, M.; Bitton, F.; Renou, J. P.; Briand, X.; Meyer, C.; Daniel-Vedele, F. **2008**. Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* 147, 1225–1238.
- Metzger, M. J.; Rounsevell, M. D. A.; Acosta-Michlik, L.; Leemans, R.; Schroter, D. **2006**. The vulnerability of ecosystem services to land use change. *Agric. Ecosyst. Environ.* 114, 69–85.
- Milla, A. **1996**. *Capsium* de capsia, cápsula: el pimiento. En Compendios de Horticultura, Ed. Horticultura, Reus. España, pp. 21-31.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A. **1997**. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem.* 60, 331-337.
- Mittler, R. **2002**. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–409.
- Mobley, H. L.; Island, M. D.; Hausinger, R. P. **1995**. Molecular biology of microbial urease. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.

- Möhlmann, T.; Bernard, C.; Hach, S.; Ekkehard-Neuhaus, H. **2010**. Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biol.* 12, 26–34.
- Molnár, I.; Gáspár, L.; Sárvári, E.; Dulai, S.; Hoffmann, B.; Molnár-Láng, M.; Galiba, G. **2004**. Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Funct. Plant Biol.* 31, 1149–1159.
- Morison, J. I. L. **1993**. Responses of plants to CO₂ under water limited conditions. En: CO₂ and the biosphere. Ed. Rozema, J.; Lambers, H.; van de Geijn, S. C.; Cambridge, M. L. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, p. 193–209.
- Mullineaux, O. M.; Creissen, G. P. **1997**. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. En: Scandalios, J.G. Ed: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA, pp. 667–713.
- Murcia, M. A.; Jiménez, A. M.; Martínez-Tomé, M. **2009**. Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage. *Food Res. Int.* 42, 1046–1052.
- Nagata, M.; Yamashita, I. **1992**. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *J. Japan Soc. Food Sci. Technol.* 121, 1117-1121.
- Nakano, Y.; Asada, K. **1981**. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.
- Namesny, A. **1996**. El pimiento en el mundo. Pimiento. Compendios de Horticultura 9. Coordinado por A. Namesny. Ediciones de Horticultura. 1, 13-19.
- Nestby, R.; Tagliavini, M. **2005**. Foliar uptake and partitioning of urea-N by strawberry plants as affected by timing of supply and plant N status. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 80, 272–275.
- Nicoulaud, B. A. L.; Bloom, A. J. **1996**. Absorption and assimilation of foliarly applied urea in tomato. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121, 1117–1121.
- Nicoulaud, B. A. L.; Bloom, A. J. **1998**. Nickel supplements improve growth when foliar urea is the sole nitrogen source for tomato. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123, 556-559.

- Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. A. M. **2001**. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418–425.
- Niklaus, P. A.; Körner, C. **2004**. Synthesis of a six-year study of calcareous grassland responses to in situ CO₂ enrichment. *Ecol. Monogr.* 4, 491–511.
- Nitzsche, P.; Berkowitz, G. A.; Rabin, J. **1991**. Development of a seedling- applied antitranspirant formulation to enhance water status, growth, and yield of transplanted bell pepper. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116, 405–411.
- Noctor, G.; Foyer, C. H. **1998**. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.
- Noctor, G.; Novitskaya, L.; Lea, P. J.; Foyer, C. H. **2002**. Coordination of leaf minor amino acid contents in crop species: significance and interpretation. *J. Exp. Bot.* 53, 939-945.
- Noguera, P.; Noguera, V.; Abad, M.; Puchades, R.; Maquieira, A. **1999**. Variación de la presentación de las propiedades físicas y químicas de residuos de fibra de coco comercializados como sustratos o componentes de sustratos de cultivo en el estado español. Actas de Horticultura 26. VIII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas, Murcia.
- Nonami, H.; Boyer, J. S. **1990**. Primary events regulating stem growth at low water potentials. *Plant Physiol.* 93, 1601–1609.
- Nuez, F.; Gil Ortega, R.; Costa, J. **1996**. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ediciones Mundi-Prensa. 1, 11-123.
- Núñez, M.; Mazzafera, P.; Mazorra, L. M.; Siquira, W. J.; Zullo, M. A. T. **2003**. Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. *Biol. Plant.* 47, 67–70.
- Ogiso, Y.; Hosoda-Yabe, R.; Kawamoto, Y.; Kawamoto, T.; Kato, K.; Yabe, T. **2008**. An antioxidant of dried chili pepper maintained its activity through postharvest ripening for 18 months. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 3297–3300.
- Oidaira, H.; Satoshi, S.; Tomokazu, K.; Takashi, U. **2000**. Enhancement of antioxidant enzyme activities in chilled rice seedlings. *Plant Physiol.* 156, 811–813.
- O’Kane, D.; Gill, V.; Boyd, P.; Burdon, R. **1996**. Chilling, oxidative stress and antioxidante responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* 198, 371–377.

- Oliveira, A. P.; Pereira, D. M.; Andrade, P. B.; Valenta, P.; Sousa, C.; Pereira, J. A.; Bento, A.; Rodrigues, M. A.; Seabra, R. M.; Silva, B. M. **2008**. Free amino acids of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. *costata* DC): influence of leaf position (internal or external) and collection time. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5216–5221.
- Omenn, G. S.; Goodman, G. E.; Thornquist, M. D.; Balmes, J.; Cullen, M. R.; Glass, A.; Keogh, J. P.; Meyskens, F. L.; Valanis, B.; Williams, J. H.; Barnhart, S.; Hammar, S. **1996**. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 1150-1155.
- Omran, R. J. **1980**. Peroxide level and the activities of catalase, peroxidase, and indolacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 65, 407–408.
- Orbovic, V.; Achor, D.; Petracek, P.; Syvertsen, J. P. **2001**. Air temperature, humidity, and leaf age affect penetration of urea through grapefruit leaf cuticles. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126, 44–50.
- Ougham, H.; Hörtensteiner, S.; Armstead, I.; Donnison, I.; King, I.; Thomas, H.; Mur, L. **2008**. The control of chlorophyll catabolism and the status of yellowing as a biomarker of leaf senescence. *Plant Biol.* 1, 4–14.
- Pace-Asciak, C. R.; Hahn, S.; Diamandis, E. P.; Soleas, G.; Goldberg, D. M. **1995**. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* 235, 207-219.
- Packer, L. **1994**. Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci. Am. Sci. Med.* 1, 54–63.
- Padda, M. S.; Picha, D. H. **2008**. Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweet potatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 176–180.
- Padem, H.; Yildirim, E. **1996**. Effect of foliar fertilizer on yield and yield components of summer squash (*Cucurbita pepo* L.), En: 1st Egyptian–Hungarian Horticultural Conference, Kafr El-Sheikh. Egypt.
- Pankovic, D.; Plesnicar, M.; Arsenijevic –Maksimovic, I.; Petrovic, N.; Sakac, Z.; Kastori, R. **2000**. Effects of nitrogen nutrition on photosynthesis in Cd-treated sunflower plants. *Ann. Bot.* 86, 841-847.

- Papoulias, E.; Siomos, A. S.; Koukounaras, A.; Gerasopoulos, D.; Kazakis, E. **2009**. Effects of genetic, pre- and post-harvest factors on phenolic content and antioxidant capacity of white asparagus spears. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 5370–5380.
- Parra-Lobato, M. C.; Fernandez-Garcia, N.; Olmos, E.; Alvarez-Tinaut, M. C.; Gómez-Jiménez, M. C. **2009**. Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 66, 9–17.
- Pascual, I.; Azcona, I.; Aguirreolea, J.; Morales, F.; Corpas, F. J.; Palma, J. M.; Rellán-Alvarez, R.; Sánchez-Díaz, M. **2010**. Growth, yield, and fruit quality of pepper plants amended with two sanitized sewage sludges. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6951–6959.
- Paull, R. E. **1990**. Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin, En: *Chilling Injury of Horticultural Crops*, Ed: Wang, C. Y. CRC Press, Boca Raton, Florida. USA, pp. 17–36.
- Peltonen, J. **1993**. Interaction of late season foliar spray of urea and fungicide mixture in wheat production. *J. Agron. Crop Sci.* 170, 296–308.
- Pennigfield, F.; Kurzmann, P. **1983**. Cultivos hidropónicos y en turba. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp. 342-344.
- Peñuelas, J.; Biel, C.; Estiarte, M. **1993**. Changes in biomass, chlorophyll content and gas exchange of beans and peppers under nitrogen and water stress. *Photosynthetica* 29, 535-542.
- Pérez-López, A. J.; López-Nicolás, J. M.; Núñez-Delicado, E.; del Amor, F. M.; Carbonell-Barrachina, A. A. **2007**. Effects of agricultural practices on color, carotenoids composition, and minerals contents of sweet peppers, cv. *Almuden*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8158–8164.
- Perl-Treves, R.; Perl, A. **2002**. Oxidative stress: an introduction. En: *Oxidative Stress in Plants*. Taylor & Francis, London. UK, pp. 1–32.
- Phelps, E.; Morelock, T. **1987**. Antitranspirants as a selection technique in breeding for tomato fruit cracking resistance. *HortScience* 22, 728–738.
- Pinker, I.; Vuksani, G.; Dietz, R.; Böhme, M. **2007**. Effects of different substrates on acclimatization of *Echinodorus* in vitro plants in greenhouse conditions. *Propag. Ornament. Plants* 7, 195–198.

- Plaut, Z.; Magril, Y.; Kedem, U. **2004**. A new film forming material, which reduces water vapour conductance more than CO₂ fixation in several horticultural crops. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 79, 528–532.
- Poleskaya, O. G.; Kashirina, E. I.; Alekhina, N. D. **2004**. Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 615–620.
- Polle, A. **2001**. Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modelling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126, 445–462.
- Polley, H. W.; Tischler, C. R.; Johnson, H. B.; Pennington, R. E. **1999**. Growth, water relations, and survival of drought exposed seedlings from six maternal families of honey mesquite (*Prosopis glandulosa*): response to CO₂ enrichment. *Tree Physiol.* 19, 359–366.
- Poorter, H.; Pérez-Soba, M. **2001**. The growth response of plants to elevated CO₂ under nonoptimal environmental conditions. *Oecologia* 129, 1–20.
- Poorter, H.; Roumet, C.; Campbell, B. D. **1996**. Interspecific variation in the growth response of plants to elevated CO₂: a search for functional types. En: Carbon dioxide, populations, communities. Ed: Körner, C.; Bazzaz, F. A. San Diego. USA, pp. 375–412.
- Porra, R. J.; Thompson, W. A.; Kriedemann, P. E. **1989**. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents. *BBA* 975, 384–394.
- Posmyk, M. M.; Bailly, C.; Szafranska, K.; Janas, K. M.; Corbineau, F. **2005**. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. *J. Plant Physiol.* 162, 403–412.
- Potters, G.; De Gara, L.; Asard, H.; Horemans, N. **2002**. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.* 40, 537–548.
- Prasad, T. K. **1996**. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance: Changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities. *Plant J.* 10, 1017–1026.
- Price, A. H.; Atherton, N. M.; Hendry, G. A. F. **1989**. Plants under drought-stress generated activated oxygen. *Free Radical Res. Commun.* 8, 61–66.

- Prieto, M.; Peñalosa, J.; Sarro, M. J.; Zornoza, P.; Gárate, A. **2007**. Seasonal effect on growth parameters and macronutrient nutrient use of sweet pepper. *J. Plant Nutr.* 30, 1–18.
- Purvis, A. C.; Shewfelt, R. L.; Gegogaine, J. W. **1995**. Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit. *Physiol. Plant.* 94, 743–749.
- Quasem, J. R.; Hill, T. A. **1993**. Effects of the form of nitrogen on the growth and nutrient uptake of tomato, groundsel and fat-hen. *J. Hortic. Sci.* 68, 161–170.
- Rabinowitch, D. H.; Fridovich, I. **1983**. Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochem. Photobiol.* 37, 679–690.
- Ravnikar, M.; Vilhar, B.; Gogala, N. **1992**. Stimulatory effects of jasmonic acid on potato stem node and protoplast culture. *Plant Growth Regul.* 11, 29–33.
- Reeves, D. W.; Mask, P. L.; Wood, C. W.; Delaney, D. P. **1993**. Determination of wheat nitrogen status with a hand held chlorophyll meter: influence of management practices. *J. Plant Nutr.* 16, 781–796.
- Reickenberg, R. L.; Pritts, M. P. **1996**. Dynamics of nutrient uptake from foliar fertilizers in red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121, 158–163.
- Rentsch, D.; Schmidt, S.; Tegeder, M. **2007**. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Lett.* 581, 2281–2289.
- Richards, R. P.; Baker, D. B.; Creameer, N. L.; Kramer, J. W.; Ewing, D. E.; Merryfield, B. J.; Wallrabenstein L. K. **1996**. Well water quality, well vulnerability, and agricultural contamination in the Midwestern United States. *J. Environ. Qual.* 25, 384–402.
- Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. **1999**. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66, 401–436.
- Roberts, R. K.; Kenty, M. M.; Thomas, J. M.; Howard, D. D. **2006**. Economic evaluation of soil and foliar applied nitrogen fertilization programs for cotton production. *J. Cotton Sci.* 10, 193–200.
- Römheld, V. **2000**. The chlorosis paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves in grapevine. *J. Plant Nutr.* 23, 1629–1643.

- Rossato, L.; MacDuff, J. H.; Laine, P.; Le Deunff, E.; Ourry, A. **2002**. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *J. Exp. Bot.* 53, 1131-1141.
- Russo, V. M.; Díaz-Pérez, J. C. **2005**. Kaolin-based particle film has no effect on physiological measurements, disease incidence or yield in peppers. *HortScience* 40, 98–101.
- Sairam, R. K.; Deshmukh, P. S.; Saxena, D. C. **1998**. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol. Plant.* 41, 387–394.
- Salas, M. C.; Urrestarazu, M. **2004**. Cultivo del pimiento. En: Tratado de Cultivo sin Suelo. Mundi-Prensa. 21, 749-788.
- Sánchez, F. J.; de Andrés, E. F.; Tenorio, J. L.; Ayerbe, L. **2004**. Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. *Field Crops Res.* 86, 81–90.
- Sands, J. M. **2003**. Mammalian urea transporters. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 543– 566.
- Sassenrath, G. F.; Ort, D. R.; Portis Jr, A. R. **1990**. Impaired reductive activation of stromal bisphosphatases in tomato leaves following low-temperature exposure at high light. *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 302–308.
- Savithri, P.; Khan, H. H. **1993**. Characteristics of coconut coir peat and its utilization in agriculture. *J. Plant Crop* 22, 1–18.
- Scandalios, J. G. **1993**. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101, 7–12.
- Scholander, P.; Bradstreet, E.; Hemmingsen, E.; Hammel, H. **1965**. Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148, 339–346.
- Shaheen, A. M.; Abdel-Mouty, M. M.; Ali, A. H.; El-Desuki, M. **2006**. The application of some chemical substances as promoters for enhancing growth, yield and its same nutritional values of okra plant (*Hibiscus esculentus*, L.). *J. Agric. Sci. Monsoura Univ.* 31, 1547-1556.
- Shalata, A.; Mittova, V.; Volokita, M.; Guy, M.; Tal, M. **2001**. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol. Plant.* 112, 487–494.

- Sharkey, T. D.; Stitt, M.; Heineke, D.; Gerhardt, R.; Raschke, K.; Heldt, H. W. **1986**. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. *Plant Physiol.* 81, 1123–1129.
- Shin, Y.; Liu, R. H.; Nock, J. F.; Holliday, D.; Watkins, C. B. **2007**. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 349–357.
- Singh, B. K.; Sharma, S. R.; Singh, B. **2009**. Combining ability for superoxide dismutase, peroxidase and catalase enzymes in cabbage head (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). *Sci. Hortic.* 122, 195–199.
- Sirko, A.; Brodzik, R. **2000**. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1189–1195.
- Smirnoff, N. **1993**. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125, 27–58.
- Smith, S.; Schepers, J.; Porter, L. K. **1990**. Assessing and managing agricultural nitrogen losses to the environment. *Adv. Soil Sci.* 14, 1-43.
- Somos, A. **1984**. The paprika. Ed: Akadémiai, Kiado, Budapest. Hungary, pp. 182-192.
- Starzynska, A.; Leza, M.; Mareczek, A. **2003**. Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescence during short term storage, related to temperature and packaging. *Plant Sci.* 165, 1387–1395.
- Steinberg, S. L.; Mcfarland, M. J.; Worthington, J. W. **1990**. Antitranspirant reduces water use by peach trees following harvest. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115, 20–24.
- Stewart, A. J.; Chapman, W.; Jenkins, G. I.; Graham, I.; Martin, T.; Crozier, A. **2001**. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.* 24, 1189–1197.
- Strissel, T.; Halbwirth, H.; Hoyer, U.; Zistler, C.; Stich, K.; Treutter, D. **2005**. Growth-promoting nitrogen nutrition affects flavonoid bio-synthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves. *Plant Biol.* 7, 677–685.
- Swietlik, D.; Faust, M. **1984**. Foliar nutrition of fruit crops. *Hortic. Rev.* 6, 287–355.
- Tadesse, T.; Hewett, E. W.; Nichols, M. A.; Fisher, K. J. **2002**. Changes in physicochemical attributes of sweet pepper cv. *Domino* during fruit growth and development. *Sci. Hortic.* 93, 91-103.

- Takahama, U.; Oniki, T. **1992**. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 33, 379–387.
- Takahama, U.; Oniki, T. **1994**. The association of ascorbate and ascorbate oxidase in the apoplast with IAA-enhanced elongation of epicotyls from *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol.* 35, 257–266.
- Tapia, L. M.; Larios, A.; Tapia, L.; Anguiano, J.; Vidales, I. **2007**. Lixiviación de nitratos en dos sistemas de manejo nutricional y de agua en aguacate de Michoacan. Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate). Viña Del Mar, Chile.
- Taylor, A. J.; Vadgama, P. **1992**. Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of urea. *Ann. Clinic. Biochem.* 29, 245–264.
- Terman, A.; Gustafsson, B.; Brunk, U. T. **2006**. Mitochondrial damage and intralysosomal degradation in cellular aging. *Mol. Aspects Med.* 27, 471–482.
- Tewari, R. K.; Kumar, P.; Sharma, P. N. **2007**. Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. *J. Integr. Plant Biol.* 49, 313–322.
- Tezara, W.; Mitchell, V. J.; Driscoll, S. D.; Lawlor, D. W. **2002**. Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *J. Exp. Bot.* 53, 1781–1791.
- Tiedje, J. M. **1988**. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. En: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Ed: Zehnder, A.; Wiley, J. Inc. New York. USA, pp. 179–244.
- Tisdale, S. L.; Werner, L. N. **1988**. Fertilidad de los suelos y fertilizantes. UTEHA. México, D.F.
- Titus, J. S.; Kang, S. M. **1982**. Nitrogen metabolism, translocation, and recycling in apple trees. *Hortic. Rev.* 4, 204–246.
- Toselli, M.; Thalheimer, M.; Tagliavini, M. **2004**. Leaf uptake and subsequent tree partitioning of urea-N as affected by the concentration and volume of sprayed solution and by the shoot leaf position in apple (*Malus domestica*). *J. Hortic. Sci. Biotech.* 79, 97–100.
- Tsonev, T. D.; Lazova, G. N.; Stoinova, Z. G.; Popova, L. P. **1998**. A possible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedlings to salinity stress. *J. Plant Growth Regul.* 17, 153–159.

- Upston, J. M.; Terentis, A. C.; Stocker, R. **1999**. Tocopherol-mediated peroxidation (TMP) of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB J.* 13, 977-994.
- Urrestarazu, M. **2004**. Bases y sistemas de los cultivos sin suelo. En: Tratado de Cultivo sin Suelo. Mundi-Prensa. Madrid. 1, 3-31.
- Valero, C.; Crisosto, C. H.; Slaughter, D. **2007**. Relationship between nondestructive firmness measurements and commercially important ripening fruit stages for peaches, nectarines and plums. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 248–253.
- van Breusegem, F.; Vranova, E.; Dat, J. F.; Inze, D. **2001**. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161, 405–414.
- van der Voet, E.; Kleijn, R. K.; Udo de Haes, H. A. **1996**. Nitrogen pollution in the European union-origins and proposed solutions. *Environ. Conserv.* 23, 120–132.
- Vance, C. P. **1998**. Legumes symbiotic nitrogen fixation: Agronomic aspects. En: The rhizobiaceae. Ed: Spaink, H. P.; Kondorosi, A.; Hooykaas, P. J. J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Netherlands, pp. 509-530.
- Velitchkova, M.; Fedina, I. **1998**. Response of photosynthesis of *Pisum sativum* to salt stress as affected by methyl jasmonate. *Photosynthetica* 35, 89-97.
- Vener, A. V.; Vankan, P. J. M.; Gal, A.; Andersson, B.; Ohad, I. **1995**. Activation-deactivation cycle of redox-controlled thylakoid protein phosphorylation: role of plastoquinol bound to the reduced cytochrome bf complex. *J. Biol. Chem.* 270, 25225–25232.
- Vitousek, P. M.; Howarth, R. W. **1991**. Nitrogen limitation on land and in the sea – how can it occur. *Biogeochemistry* 13, 87–115.
- Von Mollendorff, L. J.; De Villiers, O. T.; Jacobs, G.; Westraad, I. **1993**. Molecular characteristics of pectic constituents in relation to firmness, extractable juice, and woolliness in nectarines. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 118, 77–80.
- Walker, C. D.; Graham, R. D.; Madison, J. T.; Cary, E. E.; Welch, R. M. **1985**. Effects of nickel deficiency on some nitrogen metabolites in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Plant Physiol.* 79, 474–479.
- Walker, D. J.; Romero, P.; de Hoyos, A.; Correal, E. **2008**. Seasonal changes in cold tolerance, water relations and accumulation of cations and compatible solutes in *Atriplex halimus* L. *Environ. Exp. Bot.* 64, 217-224.

- Wang, C. Y. **1995**. Effects of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest Biol. Technol.* 5, 67–76.
- Wang, C. Y.; Kramer, G. F.; Whitaker, B. D.; Lusby, W. R. **1992**. Temperature preconditioning increases tolerance to chilling injury and alters lipid composition in zucchini squash. *J. Plant Physiol.* 140, 229–235.
- Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. **1997**. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45, 304–309.
- Wang, W. H.; Köhler, B.; Cao, F. Q.; Liu, L. H. **2008**. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science* 175, 467–477.
- Wasternack, C. **2007**. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 100, 681–697.
- Watson, C. J. **2000**. Urease activity and inhibition. Principles and practice. *Proceedings International Fertiliser Society* 454, 1–38.
- Watson, C. J.; Miller, H.; Poland, P.; Kilpatrick, D. J.; Allen, M. B. D.; Garret, M. K.; Christianson, C. B. **1994**. Soil properties and the ability of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1165–2117.
- Weidhase, R. A.; Kramell, H. M.; Lehmann, J.; Liebisch, H. W.; Lerbs, W.; Parthier, B. **1987**. Methyl jasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescencing barley leaf segments. *Plant Sci.* 51, 177–186.
- Weil, R. R.; Weismiller, R. A.; Turner, R. S. **1990**. Nitrate contamination of ground water under irrigated coastal plain soils. *J. Environ. Qual.* 19, 441–448.
- Weinbaum, S. A.; Brown, P. H.; Johnson, R. S. **2002**. Application of selected macronutrients in deciduous orchards: physiological and agrotechnical perspectives. *Acta Horticulturae* 594, 59–64.
- Wilens, E. W.; Rooijen, G. J. H.; Pearce, D. W.; Pharis, R. P.; Holbrook, L. A.; Moloney, M. M. **1991**. Effects of jasmonic acid on embryo-specific processes in *Brassica* and *Linum* oilseeds. *Plant Physiol.* 95, 399–405.
- Win, K.; Berkowitz, G. A.; Henninger, M. **1991**. Antitranspirant-induced increases in leaf water potential increase tuber calcium and decrease tuber necrosis in water-stressed potato plants. *Plant Physiol.* 96, 116–120.

- Wismer, W. V.; Worthing, W. M.; Yada, R. Y.; Marangoni, A. G. **1998**. Membrane lipid dynamics and lipid peroxidation in the early stages of low-temperature sweetening in tubers of *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 102, 396–410.
- Witte, C. P. **2011**. Urea metabolism in plants. *Plant Sci.* 180, 431–438.
- Witte, C. P.; Tiller, S. A.; Taylor, M. A.; Davies, H. V. **2002**. Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of ¹⁵N after foliar urea applications in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol.* 128, 1129–1136.
- Wittwer, S. H.; Bukovac, M. J.; Tukey, H. B. **1963**. Advances in foliar feeding of plant nutrients. En: Fertilizer Technology and Usage, Ed: McVickar, M. H.; Bridger, G. L.; Nelson, L. B. American Society of Agronomy, Madison, USA, pp. 429–455.
- Wongsheree, T.; Ketsa, S.; van Doorn, W. G. **2009**. The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (*Ocimum × citriodourum*) leaves. *Postharvest Biol. Technol.* 51, 91–96.
- Xu, Y.; Chang, P. L.; Liu, D.; Narasimhan, M. L.; Raghothama, K. G.; Hasegawa, P. M.; Bressan, R. A. **1994**. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6, 1077–1085.
- Yamada, Y.; Jyung, W. H.; Wittwer, S. H.; Bukovac, M. J. **1965**. Effect of urea on ion penetration through isolated cuticular membranes. *Plant Physiol.* 39, 978–982.
- Yamasaki, T.; Yamakawa, T.; Yamane, Y.; Koike, H.; Satoh, K.; Katoh, S. **2002**. Temperature acclimation of photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. *Plant Physiol.* 128, 1087–1097.
- Yang, S. H.; Tao, J.; Liu, X. F.; Guo, D. A.; Zheng, J. H. **2006**. Effects of carbon source and nitrogen source on callus growth and flavonoid content in *Glycyrrhiza uralensis*. *J. Chin. Mater. Med.* 31, 1857–1859.
- Yildirim, E.; Guvenc, I.; Turan, M.; Karatas, A. **2007**. Effect of foliar urea application on quality, growth, mineral uptake and yield of broccoli (*Brassica oleracea* L., var. *italica*). *Plant Soil Environ.* 53, 120–128.

- Zeng, X. C.; Zhou, X.; Zhang, W.; Murofushi, N.; Kitahara, T.; Kamuro, Y. **1999**. Opening of rice floret in rapid response to methyl jasmonate. *J. Plant Growth Regul.* 18, 153-158.
- Zhang, J. X.; Kirkham, M. B. **1994**. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.* 35, 785–791.
- Zhang, Y. Z.; Han, Y. H. **1997**. Effect of high temperature and drought stress on the activities of SOD and POD of intact leaves in two soybean (*G. max*) cultivars. *Soybean Genet. Newsl.* 24, 39–40.
- Zhao, W. Y.; Xu, S.; Li, J. L.; Cui, L. J.; Chen, Y. N.; Wang, J. Z. **2008**. Effects of foliar application of nitrogen on the photosynthetic performance and growth of two fescue cultivars under heat stress. *Plant Biol.* 52, 113–116.
- Zilkah, S.; Klein, I.; Femgenbaum, S.; Weinbaum, S. A. **1987**. Translocation of foliar applied urea ¹⁵N to reproductive and vegetative sinks of avocado and its effect of initial fruit set. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 112, 1061–1065.
- Zilkah, S.; Wiesmann, Z.; Klein, I.; David, I. **1996**. Foliar applied urea improves freezing protection to avocado and peach. *Sci. Hortic.* 66, 85–92.

- <http://www.carm.es>
- <http://www.fao.org>
- <http://www.mapa.es>