

Actividad de la enzima nitrato reductasa en plántulas de *Jatropha curcas* L. bajo diferentes porcentajes de sombra

Activity of the nitrate reductase enzyme in *Jatropha curcas* L. seedlings under different shade percentages

Hilda Beatriz Wencomo-Cárdenas <https://orcid.org/0000-0002-1450-5611>

Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey. Universidad de Matanzas. Ministerio de Educación Superior. Central España Republicana, CP 44280. Matanzas, Cuba. *Correspondencia: wencomo@ihatuey.cu

Resumen

Objetivo: Determinar la influencia de diferentes porcentajes de sombra sobre la actividad de la enzima nitrato reductasa en las hojas y raíces de plántulas de *Jatropha curcas* L.

Materiales y Métodos: Para ello, se probaron tres porcentajes de sombra (30, 50 y 70 %) y un tratamiento a pleno sol en tejidos foliares y radicales; y se determinó el contenido de proteína total soluble y la actividad de la enzima nitrato reductasa. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza simple y de regresión. Todo ello, con el empleo del programa estadístico SPSS® versión 22.0 para Microsoft Windows®.

Resultados: Los valores de la actividad nitrato reductasa fueron más altos en las hojas que en las raíces. Se observaron diferencias en la actividad de la enzima en las hojas, en relación con los porcentajes de sombra evaluados. A los 30 y 60 días de evaluación se halló una relación lineal, con $R^2 = 0,984$ y $R^2 = 0,945$, respectivamente, en la que se observó un decrecimiento de la actividad enzimática a medida que aumentó el porcentaje de sombra.

Conclusiones: La actividad de la enzima nitrato reductasa y la proteína soluble disminuyeron de forma lineal con el aumento de los porcentajes de sombra, lo cual indica la importancia de los altos índices de radiación luminosa para el buen funcionamiento del metabolismo del nitrógeno en *J. curcas*.

Palabras clave: metabolismo del nitrógeno, radiaciones, tejidos vegetales

Abstract

Objective: To determine the influence of three shade percentages on the activity of the nitrate reductase enzyme, in *Jatropha curcas* L. seedlings.

Materials and Methods: For such purpose, three shade levels (30, 50 and 70 %) and a treatment under full sunlight on leaf and root tissues were tested; and the total soluble protein content and activity of the nitrate reductase enzyme were determined. The data were processed through a simple variance and regression analysis. All this was done using the statistical program SPSS® version 22 for Microsoft Windows®.

Results: The values of the nitrate reductase activity were higher in the leaves than in the roots. Differences were observed in the enzyme activity in the leaves, with regards to the evaluated shade percentages. At 30 and 90 days of evaluation a linear relation was found, with $R^2 = 0,984$ and $R^2 = 0,945$, respectively, in which a decrease was observed of the enzymatic activity as the shade percentage increased.

Conclusions: The activity of the nitrate reductase enzyme and the soluble protein decreased linearly with the increase of the shade percentages, which indicates the importance of the high indexes of luminous radiation for the good functioning of nitrogen metabolism in *J. curcas*.

Keywords: nitrogen metabolism, radiations, plant tissues

Introducción

En la actualidad, la producción de biodiésel desempeña un papel importante en la economía mundial. En este contexto existen diferentes plantas, tales como *Jatropha curcas* L., *Moringa oleifera* Lam., *Ricinus communis* L. y *Reutealis trisperma* (= *Aleurites trisperma*) Airy Shaw, entre otras, que constituyen una alternativa viable para

la producción de biocombustible, pues son cultivos que no se utilizan en el consumo animal ni humano.

Uno de estos cultivos, el piñón manso (*J. curcas*), se diferencia del resto por ser una planta nativa de Mesoamérica (Ureña-Padilla *et al.*, 2012), que presenta un contenido elevado de aceite en sus semillas. Además, esta no compete por las áreas de

Recibido: 12 de diciembre de 2018

Aceptado: 06 de agosto de 2019

Como citar un artículo: Wencomo-Cárdenas, Hilda B. Actividad de la enzima nitrato reductasa en plántulas de *Jatropha curcas* L. bajo diferentes porcentajes de sombra. *Pastos y Forrajes*. 42 (4):268-276, 2019.

Este es un artículo de acceso abierto distribuido en Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> El uso, distribución o reproducción está permitido citando la fuente original y autores.

producción de alimentos y presenta resistencia a la sequía y a la salinidad (Campuzano-Duque *et al.*, 2016).

Por otra parte, la productividad de las especies vegetales se encuentra limitada por los factores bióticos y abióticos que provocan estrés en las plantas. Para contrarrestar la influencia de estas alteraciones en la productividad, se debe garantizar un uso eficiente del agua y de la capacidad fotosintética de las plantas en condiciones adversas.

En este sentido, la enzima nitrato reductasa (NR EC 1.6.6.1) es una molibdoenzima que cataliza la reducción del nitrato (NO_3^-) a nitrito ($-\text{NO}_2^-$); su función en las plantas superiores aún no está muy clara, aunque Raigón *et al.* (2006) señalaron que la existencia de nitrógeno en forma abundante colabora en la formación de clorofila, que aumenta la actividad fotosintética y, por tanto, el desarrollo vegetal. Una gran cantidad de nitrógeno hace que las células de las plantas lleguen más tarde a la senectud y se mantengan turgentes. Por otra parte, retrasa la lignificación y el endurecimiento de los tejidos. En general, el nitrógeno acelera y mantiene un gran desarrollo en la planta cultivada.

Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la influencia de diferentes porcentajes de sombra sobre la actividad de la enzima nitrato reductasa en las hojas y raíces de plántulas de *J. curcas*.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el invernadero del sector de Fisiología Vegetal, del departamento de Biología de la Universidade Federal de Lavras –UFLA– (Lavras, Minas Gerais, Brasil), la cual se localiza a 918 m de altitud, 21° 14' S de latitud y 45° 00' W de longitud.

Se sembraron tres semillas de piñón manso (*J. curcas* procedencia Cabo Verde) en bolsas de polietileno, con capacidad para tres litros de sustrato y con arena lavada, sin previo tratamiento pregerminativo. Estas semillas provenían de frutos secos y se mantuvieron en estufa con circulación forzada de aire, a una temperatura de 38 °C durante 24 h.

El experimento se regó diariamente por aspersión automática durante tres minutos, desde las 8 a.m. hasta las 5 p.m., para evitar el estrés hídrico. A los 15 días después de germinadas las semillas, se realizó una labor de raleo para uniformar la altura y el número de hojas, y se dejó una sola planta por bolsa.

Se aplicaron 40 mL por planta a través de dos soluciones nutritivas de Hoagland y Arnon (1938): una

contenía NO_3^- (solución 1) y otra no (solución 2), con una frecuencia de dos veces por semana, a partir de los 21 días después de la siembra.

- Solución 1: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50mM); KNO_3 (50mM); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20mM); KH_2PO_4 (10mM); H_3BO_3 (0,46mM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,091mM); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7,65μM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3,2μM); H_2MoO_4 (0,56μM).
- Solución 2: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2mM); KH_2PO_4 (1mM); $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2mM); K_2SO_4 (2mM); H_3BO_3 (0,46mM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,091mM); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7,65μM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3,2 μM); H_2MoO_4 (0,56μM).

Las dos soluciones se prepararon con micronutrientes y macronutrientes, excepto el hierro, que cual fue añadido en el momento de la aplicación, suministrado por la solución Fe-EDTA (33,2 g L⁻¹ Na₂-EDTA; 26 g L⁻¹ Fe SO₄ 7 H₂O; y 3,65 g L⁻¹ NaOH).

Diseño experimental y tratamientos. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los tratamientos consistieron en tres porcentajes de sombra (30, 50 y 70 %), proporcionados por medio de una tela de polietileno, y uno a pleno sol, para un total de 12 tratamientos con tres repeticiones.

Descripción de las variables evaluadas. Las determinaciones que se describen a continuación se realizaron en el laboratorio de nutrición de fisiología vegetal de la UFLA, con una frecuencia de 30, 60, 90 y 120 días después del inicio de los tratamientos; para ello se usaron cuatro plantas por cada uno, y se tuvieron en cuenta las hojas y las raíces. En el caso de las hojas, se muestrearon la primera y la segunda (hojas verdaderas) de la base hacia el ápice.

Cuantificación de las proteínas solubles. Las proteínas solubles se extrajeron de acuerdo con el método descrito por Bielecki y Turner (1966). Para 0,1 g de material fresco, se añadió 1 mL de solución MCW (60 mL de metanol, 25 mL de cloroformo y 15 mL de H₂O destilada). El material (hojas y raíces) se maceró a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 minutos a 3 000 rpm (en centrífuga refrigerada). Después de la centrifugación y separación del sobrenadante, se añadió 1 mL más de cloroformo y 1,5 mL de H₂O destilada por cada 4 mL de extracto, el cual permaneció en reposo durante 24 h en la nevera. Con posterioridad, el precipitado fue resuspendido en solución NaOH 0,1 g mol⁻¹, para una relación de 10 mL de solución por cada gramo de tejido fresco, y se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 3 000 rpm; el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de las proteínas.

Determinación del contenido de proteína total soluble. El contenido de proteína total soluble (PTS) se determinó a través de la metodología propuesta por Bradford (1976) y con el extracto descrito con anterioridad. Se usó 100 μL de extracto de las raíces y 50 μL del foliar, diluido en 50 μL de NaOH 0,1 g mol^{-1} y 5 mL de reactivo; este fue preparado con 200 mg de *Comassie Brilliant Blue* + 50 mL de etanol 95 %, el cual se agitó durante dos horas, seguido de la adición de 100 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) al 85 %, y se conservó durante dos horas más en agitación. Pasado este tiempo, la solución se mantuvo en reposo por 24 h y se completó hasta 1 000 mL con H_2O desionizada; después se filtró y se almacenó en un recipiente oscuro a 4 °C.

La reacción colorimétrica se leyó en el espectrofotómetro UV-visible marca Genesys 20® Thermo Scientific® a 595 nm. Los valores se expresaron en miligramos de proteína por gramo de materia fresca (MF). El patrón que se usó para la proteína fue de 10 a 100 mg de albúmina de suero bovino (BSA).

Determinación de la actividad de nitrato reductasa. Para la determinación de la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR), se empleó un ensayo *in vivo*, descrito por Radin (1973), tanto en las hojas como en las raíces, con algunas modificaciones (en cuanto a concentraciones, por la presencia de metabolitos secundarios) para la especie en estudio. Las muestras se colectaron a las 7 a.m. en días calientes y soleados, y se almacenaron en cajas de polietileno con hielo; después se transportaron hasta el laboratorio y se lavaron con H_2O desionizada.

Se pesaron 0,5 g de hojas frescas y 1 g de raíces de cuatro plantas al azar, cortadas en pedazos de aproximadamente 5 x 5 mm, y se inocularon en tubos de ensayo que contenían 5 mL de tampón fosfato 0,1M + KNO_3 0,1M, pH 7,5. Los tubos de ensayo se revistieron con papel de aluminio, con el fin de evitar daños oxidativos provocados por la luz. Las muestras fueron infiltradas al vacío tres veces durante dos minutos, para facilitar y aumentar la penetración de la solución en los tejidos, seguido de la introducción de aire. Posteriormente el ensayo se incubó en baño de María a 30 °C durante una hora.

Para el caso de las hojas se retiró una alícuota de 100 μL . El medio de reacción se preparó con 2,9 mL de agua destilada + 1 mL de la mezcla (v:v) de dicloruro de N-naftiletileno 0,02 %, la cual detiene la reacción; y sulfanilamida al 1 % preparada en HCl 1,5 N, que reacciona y da coloración. Para las raíces se retiró una alícuota de 500 μL y el medio de

reacción se preparó con 0,5 mL de agua destilada + 1 mL de mezcla de N-naftiletileno y sulfanilamida.

Pasados 15 minutos (reacción colorimétrica), se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-visible marca Genesys 20® Thermo Scientific® a 540 nm, y los valores de la actividad de NR se expresaron en $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g MF}^{-1} \text{h}^{-1}$, determinada por la cantidad producida de nitrito; se usó una curva patrón de solución de nitrito de sodio (de 0 a 200 μmoles).

Análisis estadístico. Los datos se sometieron a análisis de varianza, según modelo lineal de clasificación simple, considerando los niveles de sombra; las medias se compararon mediante la dócima de Duncan para un 5 % de significación, después de verificarse que cumplían con el ajuste de distribución normal y de homogeneidad de varianza. También se realizó un análisis de regresión; para seleccionar la ecuación de mejor ajuste se tomaron en consideración los criterios de Guerra *et al.* (2003) relacionados con el nivel de significación, el coeficiente de determinación R^2 mayor que 0,70, la varianza residual $V(e)$, el análisis de residuos (e_i) y el error estándar de los parámetros estimados ES (β_i). Todo ello, con el empleo del programa estadístico SPSS® versión 22.0 para Microsoft Windows®.

Resultados y Discusión

En la tabla 1 se muestra la actividad de la enzima nitrato reductasa en las hojas y las raíces, en relación con los porcentajes de sombra en los cuatro momentos evaluados.

La actividad de la NR fue mayor en las hojas que en las raíces. Según refieren Hernández-Cruz *et al.* (2015), el nitrato absorbido por las plantas, en su gran mayoría, puede ser asimilado por las raíces o por las hojas. Estos mismos autores señalan que en muchas plantas, cuando se reciben pequeñas cantidades de nitrato, se reduce su absorción en las raíces; por ello, a medida que el aporte de nitrato aumenta se incrementa su absorción por este órgano y, por ende, una mayor proporción es transportada al tallo y de ahí hacia las hojas, en las cuales la actividad de la mencionada enzima es más alta, sobre todo cuando estas están totalmente extendidas y fisiológicamente maduras. El aprovechamiento del nitrato por la planta varía en función de la especie, la diferenciación morfológica, la edad o crecimiento de la raíz y las condiciones ambientales, tal y como indica la actividad de la NR en cada uno de los órganos.

Asimismo, Taiz y Zeiger (2013) aseguran que en algunas plantas, como el cadillo (*Xanthium stru-*

Tabla 1. Actividad de la enzima nitrato reductasa en relación con los niveles de sombra ($\mu\text{moles NO}_2^- \text{ g MF}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Sombra, %	Momento de evaluación, días			
	30	60	90	120
Hojas				
0	3,79 ^a	3,12 ^a	1,34	1,51
30	3,27 ^a	2,69 ^b	1,41	1,42
50	2,90 ^b	3,09 ^a	1,76	1,62
70	2,27 ^c	2,21 ^c	1,0	1,16
$\bar{X}$	3,06	2,6	1,42	1,46
EE $\pm$	0,15 ^{**}	0,14 ^{**}	0,07 ^{ns}	0,07 ^{ns}
Raíces				
0	0,05 ^a	0,06	0,05 ^a	0,16 ^a
30	0,06 ^a	0,06	0,06 ^a	0,16 ^a
50	0,04 ^b	0,07	0,05 ^a	0,11 ^b
70	0,04 ^b	0,05	0,04 ^b	0,09 ^b
$\bar{X}$	0,04	0,06	0,05	0,13
EE $\pm$	0,0023 ^{**}	0,003	0,002 [*]	0,006 ^{**}

Letras diferentes en una misma columna difieren para $p > 0,05$ ^{**} $p > 0,01$; ^{*} $p > 0,05$

mariuum L.), el nitrato se absorbe en las hojas; mientras que en otras, como el lupino blanco (*Lupinus albus* L.), la mayoría del nitrato se asimila en las raíces. En general, las especies nativas de regiones templadas realizan un mayor aprovechamiento del nitrato por las raíces que las originarias de climas tropicales y subtropicales.

En ese sentido, las especies herbáceas, entre las que se incluyen los cultivos de interés económico, reducen las concentraciones de nitrato tanto en las raíces como en las hojas; al respecto, Rodríguez-Larramendi *et al.* (2016) plantearon que su asimilación depende de dos factores: la actividad de la NR y la disponibilidad de nitrato (NO_3^-) en el medio.

Una mayor actividad de la NR en las hojas se debe a la asimilación del nitrato, que ocurre en mayor cuantía en este tejido, que aportan la energía (ATP) y los agentes reductores (proveedores de electrones) necesarios para dicho proceso. Además, en las hojas es donde hay mayor actividad fotosintética. En este sentido, la cantidad de clorofila se relaciona con una mayor acción de la NR (Taiz y Zeiger, 2013).

Similar comportamiento al de este estudio fue reportado por Hernández-Cruz *et al.* (2015) en algodón (*Gossypium hirsutum* L.); sin embargo, en otras especies como el girasol (*Helianthus annuus* L.), el rábano (*Raphanus raphanistrum* subsp. sa-

tivus) y la seringueira o árbol del caucho (*Hevea* spp.), esta última de la misma familia que *J. curcas* (Euphorbiaceae), las raíces presentaron una actividad NR mayor que en las hojas (Hiraki, 2011).

En las hojas, las medias de la actividad de la NR disminuyeron de forma gradual en cada período evaluado. Este comportamiento fue descrito en *G. hirsutum* (Hernández-Cruz *et al.*, 2015) y en otras investigaciones realizadas por Min *et al.* (2014) y Palacios (2017); lo que puede ser atribuido a la fertilización que se realizó al inicio del periodo y al riego durante la etapa experimental.

Por ello, la reducción en los promedios generales de la actividad de la NR en las hojas de *J. curcas* podría explicarse por la senescencia natural de los tejidos, ya que las hojas muestreadas estaban siempre en la misma posición de las plantas (primera y segunda hojas verdaderas de la base hacia el ápice).

En este sentido, Duursma *et al.* (2014) refirieron que en las hojas de *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. ocurrió una reducción de la actividad de la enzima mencionada en el sentido ápice-base; resultados similares se verificaron también en soya (*Glycine max* L.). Según estos autores, la mayor actividad de la enzima en las hojas jóvenes se debe a la mayor concentración de nitrato y de fotoasimilados y a la mayor capacidad de síntesis de proteína en esas hojas; también se debió al autosombreado de las hojas de la capa basal,

provocado por el aumento en el número medio de hojas.

Se observaron diferencias en la actividad de la NR en las hojas en relación con los porcentajes de sombra (tabla 1). En los periodos de 30 y 60 días (fig. 1), el modelo que explicó con mayor bondad de ajuste esta relación ($R^2 = 0,984$ y $R^2 = 0,945$, respectivamente) fue el lineal, donde se observó un decrecimiento de la actividad enzimática a medida que aumento del porcentaje de sombra.

En el caso de las raíces se halló diferencia en la actividad a los 30, 60 y 90 días, pero no a los 120 días

(tabla 1). El modelo que explicó con mayor bondad de ajuste esta relación ($R^2 = 0,953$, $R^2 = 0,939$ y $R^2 = 0,911$, respectivamente) fue el cuadrático (fig. 2), donde se observó un ligero aumento de actividad con el 30 % de sombra y una reducción después de ese valor. A los 120 días la actividad de la NR disminuyó de forma lineal con el aumento del porcentaje de sombra (fig. 2C), como sucedió en las hojas.

La influencia de la luz sobre la actividad de la NR fue observada en plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) por Acheampong *et al.* (2013), y

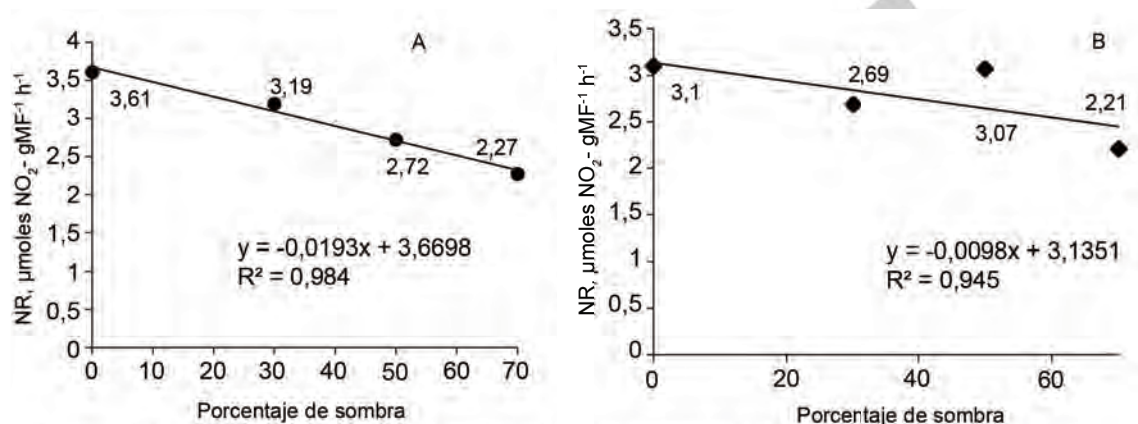


Figura 1. Actividad de la enzima nitrato reductasa (NR) en las hojas a los 30 (A) y 60 (B) días.

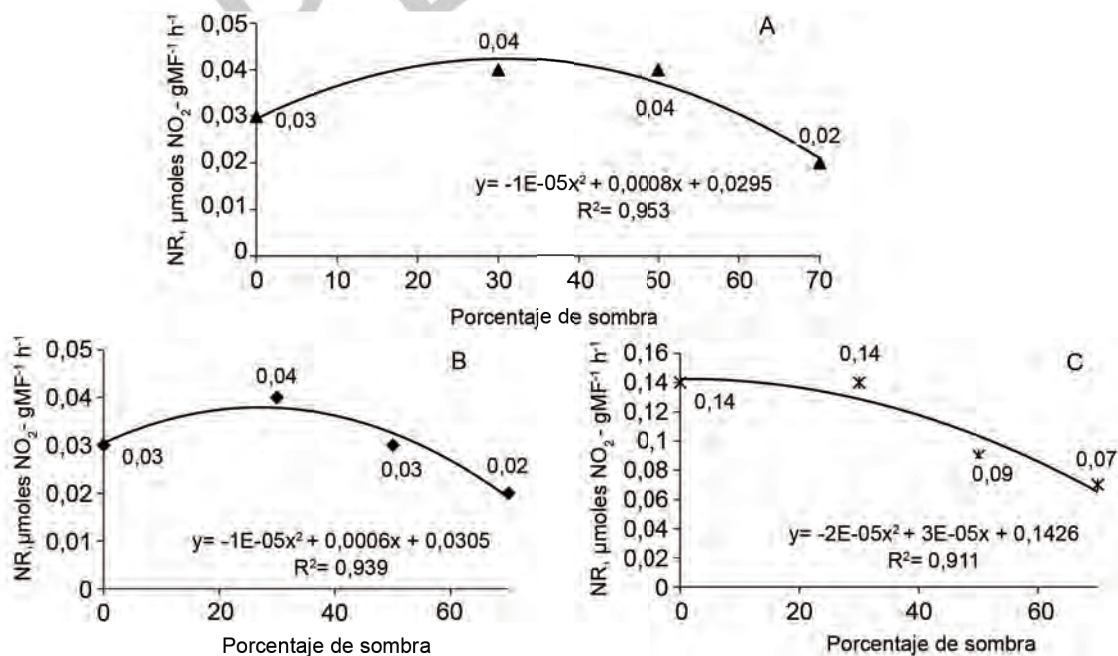


Figura 2. Actividad de la enzima nitrato reductasa (NR) en las raíces a los 30 (A), 90 (B) y 120 (C) días.

en palmas aceiteras por Rivera *et al.* (2013). Estos autores refirieron que los diferentes regímenes de irradiación (20, 50 y 100 % de la luz solar) influyeron en la partición de la enzima entre las hojas y las raíces; y que con altos niveles de irradiación y nitrato, la reducción de este último ocurre más en las hojas que en las raíces y viceversa.

Según referencias de Taiz y Zeiger (2013), en condiciones óptimas de crecimiento la capacidad de reducción del nitrato es, aproximadamente, el doble de la necesidad de la planta. La actividad de la NR varía durante el día y presenta baja actividad en la oscuridad para la mayoría de las especies. En condiciones normales de activación y en presencia de luz, su acción sería del orden del 70 al 90 %, con una reducción del 10 a 30 % en la oscuridad. Sin embargo, la luz no es una señal directa para la activación de esa enzima, pues incluso bajo intensa y continua luminosidad esta es inactiva cuando falta gas carbónico; ello indica que se requiere la fotosíntesis para su activación y que, probablemente, los fotoasimilados exportados fuera del cloroplasto son los indicadores para ello (Arboleda y Piña, 2010).

Es válido mencionar que la cantidad de carbohidratos presentes, la luminosidad disponible y otros factores ambientales, como la disponibilidad de agua, activan la fosfatasa, enzima responsable

de la desfosforilación de varios residuos de serina en la proteína NR, lo cual favorece su actividad; mientras que la ausencia de luz y de magnesio estimulan la fosforilación de los residuos de serina que interactúan con una proteína inhibidora que actúa en la inactivación de la nitrato reductasa (Farfán-Valencia y Mestre-Mestre, 2004).

Se observó diferencia en los contenidos de proteína total soluble, tanto para las hojas como para las raíces de *J. curcas*, en relación con los tratamientos. De la misma forma que fue informado para las hojas en *Hevea brasiliensis* por Lemos *et al.* (1999), los promedios de proteína total soluble fueron siempre superiores a las medias de las raíces.

En cada uno de los periodos analizados, el aumento en el porcentaje de sombra ocasionó disminuciones lineales en los contenidos de proteína soluble foliar (fig. 3), comportamiento acompañado por la actividad de la enzima NR en los mismos tejidos; ello sugiere que existe una estrecha relación entre la actividad de esta enzima y la producción de proteína en los tejidos. En el caso de las raíces, el modelo que explicó con mayor bondad de ajuste a los 30 y 120 días fue el lineal, y a los 60 días, el cuadrático (fig. 4).

De acuerdo con las investigaciones realizadas por Duursma *et al.* (2014) y Felicito-Alberca (2016),

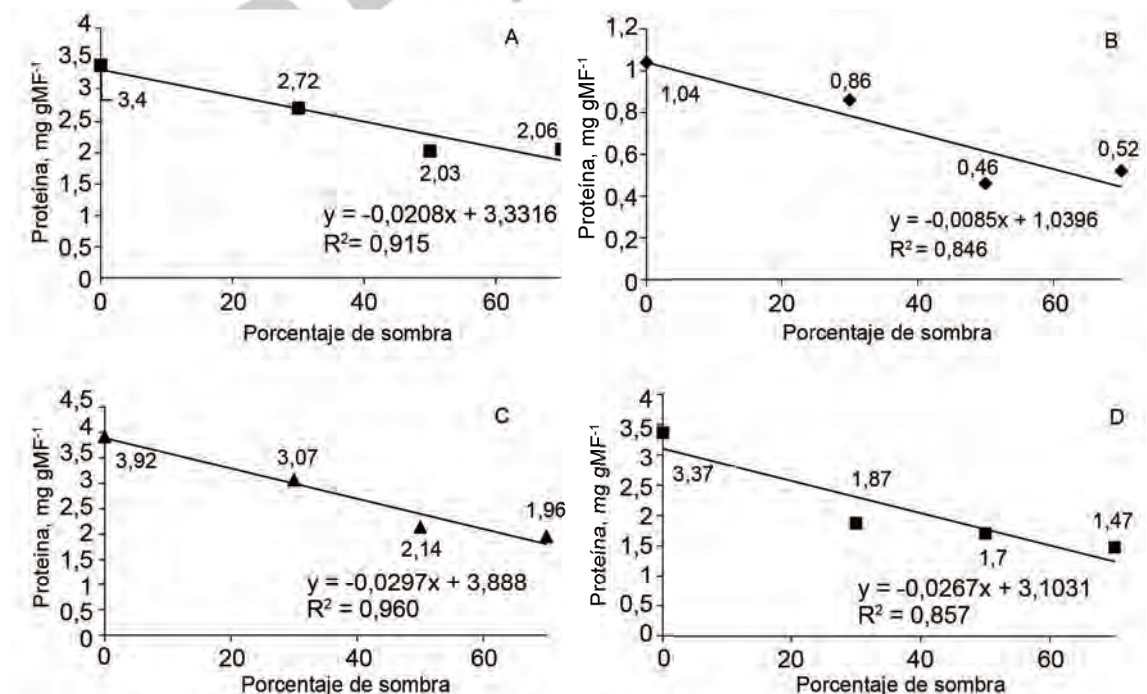


Figura 3. Contenido de proteína total soluble en las hojas de plántulas de *J. curcas* a los 30 (A), 60 (B), 90 (C) y 120 (D) días.

la capacidad fotosintética de las plantas depende del suministro de nitratos. Una considerable fracción de ese elemento se encuentra en las hojas, en las proteínas involucradas en el proceso fotosintético. Asimismo, se pudo demostrar que el contenido de proteína total soluble disminuyó con el aumento del porcentaje de sombra.

Los resultados demostraron que la actividad de la enzima NR y el contenido de proteína soluble

disminuyeron de forma lineal con el aumento de los niveles de sombra, lo cual indica la importancia de los altos índices de radiación luminosa para la asimilación de los nitratos en *J. curcas*.

Agradecimientos

Agradezco a CAPES por la estadía postdoctoral en la Universidad Federal de Lavras, Brasil, que permitió la realización de esta investigación.

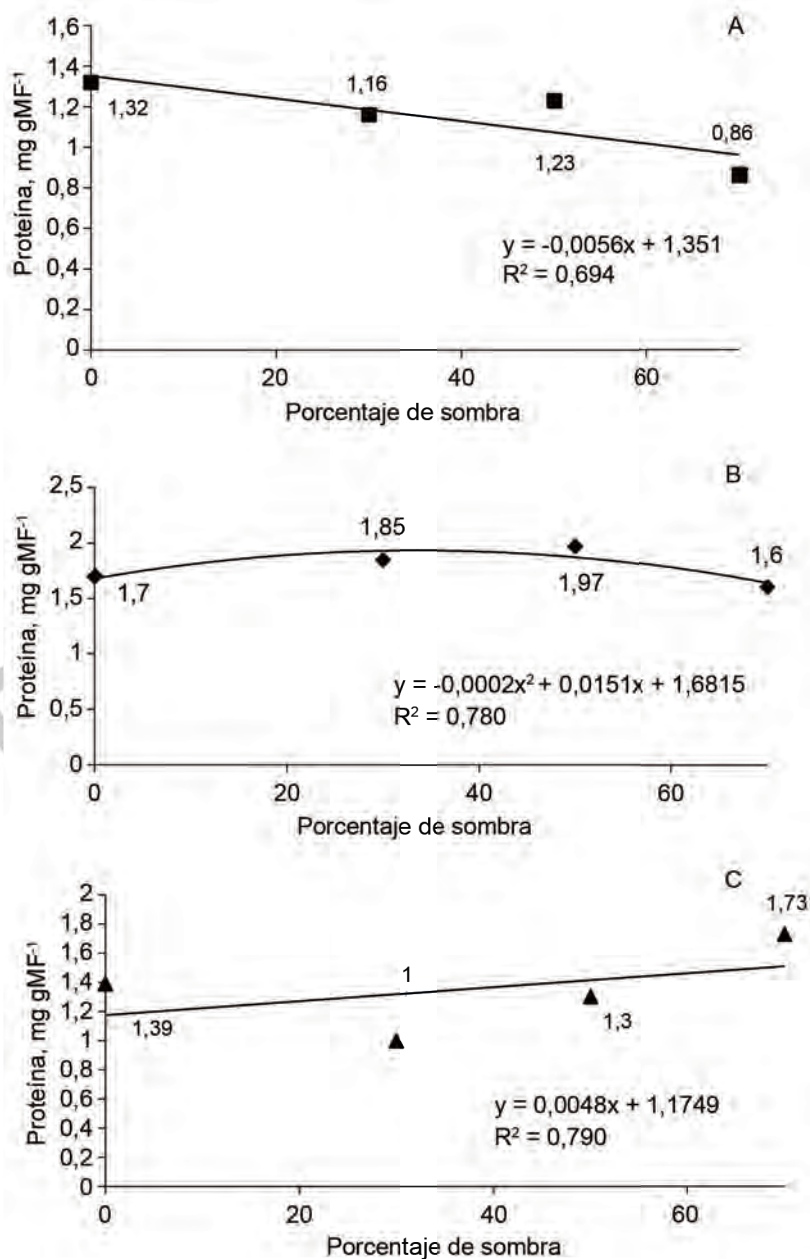


Figura 4. Contenido de proteína total soluble en las raíces de plántulas de *J. curcas*, a los 30 (A), 60 (B) y 120 (C) días.

Contribución de los autores

- Hilda Beatriz Wencomo-Cárdenas. Realizó la concepción, el diseño, la adquisición, el análisis y la interpretación de los datos, así como la redacción y la revisión del manuscrito.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Referencias bibliográficas

- Acheampong, K.; Hadley, P. & Daymond, A. J. Photosynthetic activity and early growth of four cacao genotypes as influenced by different shade regimes under West African dry and wet season conditions. *Exp. Agric.* 49 (1):31-42, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0014479712001007>.
- Arboleda, María E. & Piña, Margarito. Efecto de dos ambientes lumínicos en el crecimiento inicial y calidad de plantas *Crescentia cujete*. *Bioagro*. 22 (1):61-66, 2010.
- Bieleski, R. L. & Turner, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 78 (17):278-293, 1966. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90206-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90206-5).
- Bradford, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1-2):248-254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Campuzano-Duque, L. F.; Ríos, L. A. & Cardeno-López, F. Caracterización composicional del fruto de 15 variedades de *Jatropha curcas* L. en el departamento del Tolima, Colombia *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 17 (3):379-390, 2016. DOI: https://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:514.
- Duursma, R. A.; Barton, C. V. M.; Lin, Y. S.; Medlyn, Belinda E.; Eamus, D.; Tissue, D. T. *et al.* The peaked response of transpiration rate to vapour pressure deficit in field conditions can be explained by the temperature optimum of photosynthesis. *Agr. Forest Meteorol.* 189-190:2-10, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2013.12.007>.
- Farfán-Valencia, F. & Mestre-Mestre, A. Manejo del sombrero y fertilización del café en la zona central colombiana. *Avances técnicos CENICAFÉ*. 330. <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0330.pdf>, 2004.
- Felicitó-Alberca, L. E. *Comportamiento fisiológico y desarrollo vegetativo en plantas de café (Coffea arabica L.), en condiciones de campo, con cuatro niveles de sombra en San Antonio de las Aradas del Cantón Quilanga*. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Loja, Ecuador: Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Universidad Nacional de Loja, 2016.
- Guerra, Caridad W.; Cabrera, A. & Fernández, Lucía. Criterios para la selección de modelos estadísticos en la investigación científica. *Rev. cubana Cienc. agric.* 37 (1):3-10, 2003.
- Hernández-Cruz, A. E.; Sánchez, E.; Preciado-Rangel, P.; García-Bañuelos, M. L.; Palomo-Gil, A. & Espinoza-Banda, A. Nitrate reductase activity, biomass, yield, and quality in cotton in response to nitrogen fertilization. *PHYTON*. 84:454-460, 2015.
- Hiraki, Simone S. *Sombreamento e aplicação de nitrogênio em plantas jovens de Jatropha curcas L.* Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira-UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Especialidade: Sistemas de Produção. São Paulo, Brasil: Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2011.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. *The water culture method for growing plants without soil*. USA: California Agricultural Experiment Station Circulation, 1938.
- Lemos, Gidelma B. de; Delú Filho, N.; Oliveira, L. E. M. de & Purcino, A. A. C. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11 (2):113-118, 1999.
- Min, W.; Hou, Z.; Ma, L.; Zhang, W.; Ru, S. & Ye, J. Effects of water salinity and N application rate on water- and N-use efficiency of cotton under drip irrigation. *J. Arid Land*. 6:454-467, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40333-013-0250-3>.
- Palacios, Dahyana A. *Participación del óxido nítrico y nitrato reductasa en la inhibición por nitrato de la interacción leguminosa-rizobio*. Tesina de grado. Córdoba, Argentina: Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, 2017.
- Radin, J. W. *In vivo* assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. *Plant Physiol.* 51 (2):332-336, 1973. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.51.2.332>.
- Raigón, M. D.; García-Martínez, M. D.; Guerrero, C. & Esteve, P. Actividad de la nitrato reductasa y su relación con los factores productivos en lechuga. *VII Congreso SEAE*. Zaragoza, España: Sociedad Española de Agricultura Ecológica. <https://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2006/CD%20Congreso%20Zaragoza/Ponencias/157%20Raig%C3%B3n%20Com-%20Actividad.pdf>, 2006.
- Rivera, Yurany D.; Cayón, D. G. & López, J. E. Caracterización fisiológica y morfológica de pal-

- mas americanas de aceite (*Elaeis oleifera* HBK Cortés) y sus híbridos (*Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis*) de la plantación Indupalma. *Agron. Colomb.* 31 (3):314-323, 2013.
- Rodríguez-Larramendi, L. A.; Guevara-Hernández, F.; Gómez-Castro, H.; Fonseca-Flores, María; Gómez-Castañeda, J. C. & Pinto-Ruiz, R. Anatomía foliar relacionada con la ruta fotosintética en árboles de café (*Coffea arabica* L., var. Caturra Rojo) expuestos a diferentes niveles de radiación solar en la Sierra Maestra, Granma, Cuba. *Acta Agronóm.* 65 (3):248-254, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n3.46731>.
- Taiz, L. & Zeiger, E. *Fisiología vegetal*. 5 ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2013.
- Ureña-Padilla, Á.; Arnáez-Serrano, Elizabeth; Herrera-Murillo, F.; Moreira-González, Ileana; Hernández-López, J. & Loaiza-Cárdenas, J. *Guía técnica para el establecimiento y producción del cultivo de *Jatropha curcas* (tempate) en Costa Rica*. Cartago, Costa Rica: Editorial Tecnológica de Costa Rica, 2012.